

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Матусевич Олег Владимирович

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Санкт-Петербург - 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель:

Титов Михаил Иванович
доктор химических наук,
профессор

Официальные оппоненты:

Позднев Владимир Федорович,
доктор химических наук,
главный научный сотрудник
ФГБУ НИИ биомедицинской химии имени
В.Н.Ореховича (г. Москва)

Сидорова Мария Владимировна,
кандидат химических наук,
руководитель лаборатории синтеза пептидов
ФГБУ «Российский кардиологический
научно-производственный комплекс»
Минздрава РФ (г. Москва)

Ведущая организация:

ФГБУ Институт молекулярной генетики
РАН (г. Москва)

Защита состоится _____ 2014 г. в ____ часов на заседании совета Д 212.232.28 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Средний пр., д. 41/43, Большая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. А. М. Горького, СПбГУ, Университетская наб., д. 7/9 и на сайте www.spbu.ru

Автореферат разослан " "

2014 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



/В.Н.Сорокоумов/

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы.

В настоящее время выбор препаратов для терапии инфекционных заболеваний, вызванных вирусами гриппа, весьма ограничен. Высокая изменчивость вируса и развитие резистентности к уже существующим препаратам диктуют необходимость разработки противовирусных препаратов нового поколения.

Для профилактики и лечения гриппа используют вакцины, интерфероны и их индукторы, а также препараты, непосредственно воздействующие на вирусные белки. К последним относятся четыре препарата, одобренных агентством FDA: два ингибитора нейраминидазы - занамивир и осельтамивир и два блокатора протонного канала M2 – амантадин и ремантадин. Препарат рибавирин, несмотря на широкий спектр противовирусной активности, используется при гриппе лишь по жизненным показаниям вследствие большого количества побочных эффектов.

Геном вируса гриппа А кодирует 16 белков, которые могут быть потенциальными лекарственными мишенями: гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA), матричный белок 1 (M1), протонный канал M2, нуклеопротеин (NP), неструктурный белок 1 (NS1), ядерный экспортный белок (NEP или NS2), белки M42, PB1-F2, PB1-F3 (N40), PA-X, PA-N155, PA-N182, а также три белка, составляющие РНК-полимеразу - PB1, PB2 и PA. Несмотря на наличие в жизненном цикле вируса множества потенциальных мишеней для специфической химиотерапии, на сегодняшний день использованы немногие из них.

Перспективной мишенью для химиотерапии гриппа являются консервативные белки: использование таких мишеней может позволить в значительной степени избежать проблемы формирования резистентности к препаратам. Одной из таких мишеней, не задействованной в современных препаратах, используемых в клинической практике, в случае вируса гриппа А является фермент РНК – полимеразы, катализирующий синтез вирусной РНК. Белки, составляющие этот фермент - PB1, PB2 и PA, являются консервативными. Сборка фермента осуществляется путем межмолекулярного взаимодействия этих белков (Рис. 1).

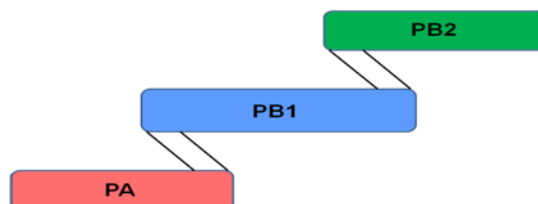


Рис. 1 Схема структурной организации РНК-полимеразы вируса гриппа. Косыми линиями показаны взаимодействующие участки субъединиц.

Белок PB1 является ключевым компонентом полимеразного комплекса, так как содержит активный центр фермента, а также два домена, взаимодействующих с субъединицами PB2 и PA.

Цель работы: поиск пептидов из аминокислотной последовательности белка PB1, подавляющих репликацию вируса гриппа А. Для достижения поставленной цели в работе были решены следующие задачи:

1. выбор пептидов из аминокислотной последовательности белка PB1;
2. разработка синтеза целевых соединений;
3. тестирование синтезированных пептидов;
4. модификация наиболее активных соединений с целью увеличения их биологической активности.

Научная новизна исследования:

1. Разработан синтез 34 ранее неизвестных пептидов – фрагментов белка PB1 РНК-полимеразы вируса гриппа А.
2. На основании изучения противовирусной активности синтезированных соединений на культуре клеток MDCK в отношении пандемического вируса гриппа A/California/07/2009 (H1N1) pdm09 впервые показано, что пептиды – фрагменты 6-13, 6-14, 26-30, 395-400, 531-540 белка PB1, а также их производные эффективно подавляют репликацию вируса гриппа.
3. Изучение флуоресцентно-меченого фрагмента 6-14 белка PB1 показало, что препарат действует внутри клетки на ранних стадиях репликации вируса гриппа.

Практическая ценность работы. В ряду синтезированных пептидов выявлены соединения с высокой противовирусной активностью, которые могут быть использованы в качестве основы для создания лекарственных препаратов для профилактики и лечения гриппа А. Получен патент на пептид, обладающий высокой противовирусной активностью.

На защиту выносятся положения и результаты проведенного исследования, включающие:

1. выбор пептидов из аминокислотной последовательности белка PB1, входящего в состав РНК-полимеразы вируса гриппа А;
2. синтез 34 пептидов – фрагментов белка PB1 РНК-полимеразы вируса гриппа А;
3. на основании изучения противовирусной активности синтезированных пептидов выявлены соединения, эффективно подавляющие репликацию пандемического вируса гриппа A/California/07/2009 (H1N1) pdm09 в культуре клеток MDCK.

Личный вклад автора. Основная часть работы выполнена автором самостоятельно. Она включает в себя непосредственное получение экспериментальных данных, разработку методологии исследования и интерпретацию полученных результатов, формулировку цели, задач и выводов данной работы, написание и публикацию статей.

Апробация диссертационной работы. Материал диссертации был представлен на 4 конференциях и 2 симпозиумах, как российских, так и международных. По теме диссертации опубликованы 2 статьи, 1 патент, тезисы 7 докладов.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 127 страницах, содержит 37 таблиц и 22 рисунка. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, заключения, списка цитированной литературы из 192 наименований.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, профессору М.И. Титову, коллективу лаборатории синтеза пептидов: И.А. Глуздикову, С.К. Никольской, И.И. Елисееву, А.А. Краснощек, сотрудникам НИИ Гриппа: О.И. Киселеву, В.В. Зарубаеву, А.А. Штро, В.В. Егорову, Ю.П. Гармаю, А.В. Слите, М.И. Дюкову за неоценимую помощь и поддержку при выполнении диссертационной работы.

2. Основные результаты и их обсуждение

Для поиска новых пептидных противовирусных препаратов из аминокислотной последовательности белка PB1 (штамм A/Hong Kong/156/97(H5N1)) были выбраны выделенные на рисунке 2 области: 1-30, 111-130, 271-290, 381-420, 525-540. Эти консервативные области высокопатогенного штамма H5N1 и наиболее актуального A/California/07/2009 (H1N1) pdm09 отличаются лишь на 1 неэквивалентную замену Met119Val.

1 MDVNPTLLFLKVP AQNAISTTFPYTGDPPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSEKGRWTTNTE 60
 61 TGAPQLNPIDGPLPEDNEPSGYAQTDCVLEAMAFLEESHPLGFENSCLLETMEVVQQTRMD 120
 121 KLTQGRQTYDWTLNRNQPAATALANTIEVFRSNGLTANESGRLIDFLKDVME SMDKEEME 180
 181 ITTTFQRKRRVRDNMTKKMVTQRTIGKKKQRLTKKSYLIRALTLNTMTKDAERGKLRRA 240
 241 IATPGMQIRGFVHFVEALARSICEKLEQSGLPVGGNEKKAKLANVVRKMMTNSQDTELSF 300
 301 TVTGDNTKWENQNPRIFLAMITYITRNQPEWFRNVL SIAPIMFSNKMARLGKGYMFESK 360
 361 SMKLR TQIPAEMLANIDLKYFNESTRKKIEKIRPLLVEGTASLSPGMMGMFNMLSTVLG 420
 421 VSILNLGQKRYTKTTYWWDGLQSSDDFALIVNAPNHEGIQAGVDRFYRTCKLVGINMSKK 480
 481 KSYINRTGTFEFTSFFYRYGFVANFSMELPSFGVSGINESADMSIGVTVIKNNMINNDLG 540
 541 PATAQMALQLFIKDYRYTYRCHRGDTQIQTRRSFELKKLWEQTRSKAGLLVSDGGPNLYN 600
 601 IRNLHIPEVGLKWELMDEDYQGRLCNPLNPFVSHKEVESVNNAVVMPAHGPAKSMEYDAV 660
 661 ATTHSWIPKRNR SILNTSQRGILEDEQMYQKCTLFEKFFPSSSYRRPVGISSMMEAMVS 720
 721 RARIDARIDFESGRIKKEEFAEILKICSTIEELGRQ GK 758

Рис. 2 Аминокислотная последовательность белка PB1 вируса гриппа A/Hong Kong/156/97(H5N1). Серым цветом выделены выбранные для исследования области.

Из литературы известно, что наиболее важным для связывания с белком PA является фрагмент 1-15 белка PB1. Наличие в клетке фрагмента 1-25 белка PB1 подавляет репликацию вируса в клетке. Авторы исследований при этом полагают, что пептидный ингибитор конкурирует с белком PB1 за связывание с белком PA. Учитывая вышеперечисленное, мы решили более детально изучить эту область.

При анализе первичной структуры N-концевой части белка PB1 было установлено, что фрагмент 6-25 содержит зеркально-симметричный мотив (рисунок 3). Из литературы известно, что такие мотивы чаще встречаются вблизи функционально значимых участков белков.



Рис. 3 Зеркально-симметричный мотив в структуре фрагмента 6-25 белка PB1. Аминокислотные остатки в симметричных позициях обозначены жирным шрифтом, а взаимодействующие с белком PA подчёркнуты.

Для изучения пространственной структуры фрагмента 6-25 сотрудниками лаборатории структурной и функциональной протеомики НИИ Гриппа было проведено компьютерное моделирование структуры этого пептида методами молекулярной динамики. По расчетным данным, соединение образует структуры типа β -шпильки (рисунок 4); аминокислотные остатки, необходимые для стабилизации данной структуры, находятся в районе фрагмента 6-13.

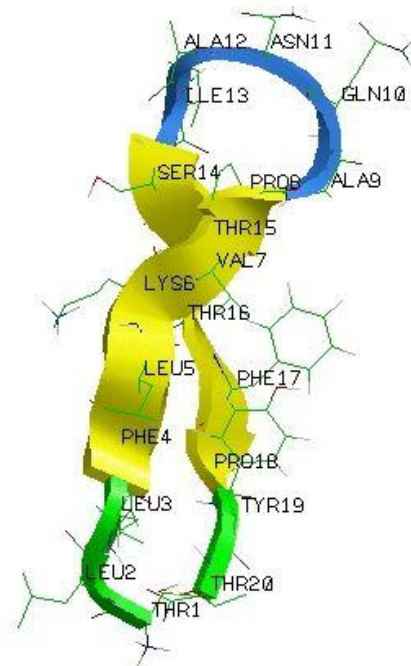


Рис. 4 Предполагаемая пространственная структура фрагмента 6-25 белка PB1 по данным компьютерного моделирования.

По результатам моделирования пространственной структуры фрагмент 6-13 склонен к образованию линейной структуры и не образует внутримолекулярные связи. На основании вышеизложенного мы предполагаем, что фрагменты 6-13 и 6-25 белка PB1 могут взаимодействовать друг с другом вследствие конкуренции за внутримолекулярные связи фрагмента 6-13 с той частью молекулы пептида 6-25, которая образует β -структуру. Таким образом возможна стабилизация N-концевой части белка PB1 в виде β -структуры, препятствующей взаимодействию белков PB1 и PA, что, как следствие, будет приводить к ингибированию вирусной репликации в клетке.

Выбор пептидов, не принадлежащих N-концу белка PB1, был во многом произвольным, при этом принимали во внимание такие факторы, как гидрофобность,

растворимость, способность проникать сквозь клеточную мембрану, наличие кластеров повторяющихся аминокислотных остатков.

Так, например, фрагмент 525-540 белка РВ1 был выбран, поскольку содержит кластер из остатков аспарагина. Известно, что кластеры остатков аспарагина или глутамина повышают склонность белков к образованию амилоидных агрегатов, где преобладает β -складчатая структура. На основании вышесказанного было сделано предположение, что пептид РВ1 531-540 может быть блокатором образования β -складчатой структуры и нарушать стабильность соответствующего домена полноразмерного белка. По сходному принципу был выбран участок 111-130, содержащий повтор глутамина, а также повтор остатков валина.

Сравнение различных вариантов проводилось согласно расчетам индексов, предложенных в 2005 году Хэлбринком и соавторами.

В результате для синтеза были выбраны следующие пептиды - фрагменты белка РВ1: 1-5, 1-25, 6-13, 6-14, 6-25, 14-25, 26-30, 111-130, 271-290, 381-386, 381-390, 381-400, 391-400, 395-400, 411-420, 525-530, 525-535, 531-540.

2.1 Синтез пептидов

Синтез пептидов проводили твердофазным методом на 2-хлортритилхлоридной и Ринк-амидной смолах по Fmoc-/t-Bu стратегии с использованием как методик последовательного наращивания цепи, так и конвергентного подхода. Очистку полученных пептидов проводили методом препаративной обращеннофазной ВЭЖХ, их структура подтверждена масс-спектрометрически (ESI).

Для фрагментов 6-13, 6-14, 26-30, 395-400 и 531-540 были получены амиды, а также N-ацетилированные производные пептидов и их амидов. Аминокислотные последовательности синтезированных пептидов и их производных представлены в таблицах 1 и 2 соответственно.

Таблица 1. Базовые пептиды 1-18

№	обозначения пептидов	аминокислотная последовательность	Выход, % *	Чистота, % (ВЭЖХ)	[M+H] ⁺ рассчитано	[M+H] ⁺ найдено
1	PB1 (1-5)	H-Met ¹ -Asp ² -Val ³ -Asn ⁴ -Pro ⁵ -OH	64	95.1	575.2494	575.2512
2	PB1 (1-25)	H-Met ¹ -Asp ² -Val ³ -Asn ⁴ -Pro ⁵ - -Thr ⁶ -Leu ⁷ -Leu ⁸ -Phe ⁹ -Leu ¹⁰ -Lys ¹¹ -Val ¹² -Pro ¹³ - -Ala ¹⁴ -Gln ¹⁵ -Asn ¹⁶ -Ala ¹⁷ -Ile ¹⁸ -Ser ¹⁹ -Thr ²⁰ -Thr ²¹ -Phe ²² -Pro ²³ -Tyr ²⁴ -Thr ²⁵ -OH	22 **	96.3	2781.4532	2781.4643
3	PB1 (6-13)	H-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ -OH	32	98.6	930.6023	930.6038
4	PB1 (6-14)	H-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -OH	26	98.8	1001.6394	1001.6354
5	PB1 (6-25)	H-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ - -Ala ⁹ -Gln ¹⁰ -Asn ¹¹ -Ala ¹² -Ile ¹³ -Ser ¹⁴ -Thr ¹⁵ -Thr ¹⁶ -Phe ¹⁷ -Pro ¹⁸ -Tyr ¹⁹ -Thr ²⁰ -OH	28	97.5	2225.2216	2225.2127
6	PB1 (14-25)	H-Ala ¹ -Gln ² -Asn ³ -Ala ⁴ -Ile ⁵ -Ser ⁶ -Thr ⁷ -Thr ⁸ -Phe ⁹ -Pro ¹⁰ -Tyr ¹¹ -Thr ¹² -OH	29	98.1	1313.6372	1313.6428
7	PB1 (26-30)	H-Gly ¹ -Asp ² -Pro ³ -Pro ⁴ -Tyr ⁵ -OH	77	96.4	548.2351	548.2332
8	PB1(111-130)	H-Met ¹ -Glu ² -Val ³ -Val ⁴ -Gln ⁵ - -Gln ⁶ -Thr ⁷ -Arg ⁸ -Met ⁹ -Asp ¹⁰ -Lys ¹¹ -Leu ¹² -Thr ¹³ - -Gln ¹⁴ -Gly ¹⁵ -Arg ¹⁶ -Gln ¹⁷ -Thr ¹⁸ -Tyr ¹⁹ -Asp ²⁰ -OH	32	94.5	2427.1755	2427.1849
9	PB1(271-290)	H-Leu ¹ -Pro ² -Val ³ -Gly ⁴ -Gly ⁵ -Asn ⁶ -Glu ⁷ -Lys ⁸ -Lys ⁹ -Ala ¹⁰ -Lys ¹¹ -Leu ¹² -Ala ¹³ -Asn ¹⁴ -Val ¹⁵ -Val ¹⁶ -Arg ¹⁷ -Lys ¹⁸ -Met ¹⁹ -Met ²⁰ -OH	14	97.2	2183.2515	2183.2597
10	PB1(381-386)	H-Phe ¹ -Asn ² -Glu ³ -Ser ⁴ -Thr ⁵ -Arg ⁶ -OH	57	95.7	753.3526	753.3552
11	PB1(381-390)	H-Phe ¹ -Asn ² -Glu ³ -Ser ⁴ -Thr ⁵ -Arg ⁶ -Lys ⁷ -Lys ⁸ -Ile ⁹ -Glu ¹⁰ -OH	37	95.2	1251.6692	1251.6646
12	PB1(381-400)	H-Phe ¹ -Asn ² -Glu ³ -Ser ⁴ -Thr ⁵ -Arg ⁶ - -Lys ⁷ -	19	96.3	2358.3503	2358.3594

		Lys ⁸ -Ile ⁹ -Glu ¹⁰ -Lys ¹¹ -Ile ¹² -Arg ¹³ -Pro ¹⁴ - - Leu ¹⁵ -Leu ¹⁶ -Val ¹⁷ -Glu ¹⁸ -Gly ¹⁹ -Thr ²⁰ -OH				
13	PB1(391-400)	H-Lys ¹ -Ile ² -Arg ³ -Pro ⁴ -Leu ⁵ -Leu ⁶ -Val ⁷ -Glu ⁸ - Gly ⁹ -Thr ¹⁰ -OH	33	96.5	1125.6990	1125.6948
14	PB1(395-400)	H-Leu ¹ -Leu ² -Val ³ -Glu ⁴ -Gly ⁵ -Thr ⁶ -OH	48	96.9	631.3661	631.3630
15	PB1(411-420)	H-Met ¹ -Phe ² -Asn ³ -Met ⁴ -Leu ⁵ -Ser ⁶ -Thr ⁷ -Val ⁸ - Leu ⁹ -Gly ¹⁰ -OH	37	94.9	1112.5479	1112.5447
16	PB1(525-530)	H-Ile ¹ -Gly ² -Val ³ -Thr ⁴ -Val ⁵ -Ile ⁶ -OH	29	95.3	601.3919	601.3901
17	PB1(525-535)	H-Ile ¹ -Gly ² -Val ³ -Thr ⁴ -Val ⁵ -Ile ⁶ -Lys ⁷ -Asn ⁸ - Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ile ¹¹ -OH	27	94.7	1201.6973	1201.6929
18	PB1(531-540)	H-Lys ¹ -Asn ² -Asn ³ -Met ⁴ -Ile ⁵ -Asn ⁶ -Asn ⁷ - Asp ⁸ -Leu ⁹ -Gly ¹⁰ -OH	41	94.5	1132.5415	1132.5457

Примечание: знаком || обозначены фрагменты для конвергентного синтеза.

* выход приведен в расчете на первый аминокислотный остаток с учетом очистки пептида с помощью препаративной обращенно-фазной ВЭЖХ

** выход приведен для пептида, синтезированного последовательным наращиванием пептидной цепи

Таблица 2. Производные базовых пептидов 3 а-в, 4 а-г, 7 а-в, 14 а-в, 18 а-в

№	обозначения пептидов	аминокислотная последовательность	Выход % *	Чистота % (ВЭЖХ)	[M+H] ⁺ рассчитано	[M+H] ⁺ найдено
3а	PB1 (6-13)	H-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ -NH ₂	27	93.5	929.6183	929.6202
3б		Ac-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ -OH	15	94.8	972.6128	972.6098
3в		Ac-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ -NH ₂	34	97.2	971.6288	971.6256
4а	PB1 (6-14)	H-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -NH ₂	59	97.3	1000.6554	1000.6561
4б		Ac-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -OH	19	93.6	1043.6499	1043.6528
4в		Ac-Thr ¹ -Leu ² -Leu ³ -Phe ⁴ -Leu ⁵ -Lys ⁶ -Val ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -NH ₂	28	95.2	1042.6659	1042.6628
4г		FITC-Ahx ¹ -Thr ² -Leu ³ -Leu ⁴ -Phe ⁵ -Leu ⁶ -Lys ⁷ -Val ⁸ -Pro ⁹ -Ala ¹⁰ -NH ₂	30	94.3	1502.7752	1502.7805
7а	PB1 (26-30)	H-Gly ¹ -Asp ² -Pro ³ -Pro ⁴ -Tyr ⁵ -NH ₂	38	97.7	547.2511	547.2497
7б		Ac-Gly ¹ -Asp ² -Pro ³ -Pro ⁴ -Tyr ⁵ -OH	50	98.1	590.2457	590.2466
7в		Ac-Gly ¹ -Asp ² -Pro ³ -Pro ⁴ -Tyr ⁵ -NH ₂	34	96.2	589.2616	589.2595
14а	PB1 (395-400)	H-Leu ¹ -Leu ² -Val ³ -Glu ⁴ -Gly ⁵ -Thr ⁶ -NH ₂	71	98.7	630.3821	630.3793
14б		Ac-Leu ¹ -Leu ² -Val ³ -Glu ⁴ -Gly ⁵ -Thr ⁶ -OH	36	98.0	673.3767	673.3737
14в		Ac-Leu ¹ -Leu ² -Val ³ -Glu ⁴ -Gly ⁵ -Thr ⁶ -NH ₂	69	97.3	672.3927	672.3916
18а	PB1 (531-540)	H-Lys ¹ -Asn ² -Asn ³ -Met ⁴ -Ile ⁵ -Asn ⁶ -Asn ⁷ -Asp ⁸ -Leu ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂	34	95.4	1131.5575	1131.5541
18б		Ac-Lys ¹ -Asn ² -Asn ³ -Met ⁴ -Ile ⁵ -Asn ⁶ -Asn ⁷ -Asp ⁸ -Leu ⁹ -Gly ¹⁰ -OH	29	93.5	1174.5521	1174.5553
18в		Ac-Lys ¹ -Asn ² -Asn ³ -Met ⁴ -Ile ⁵ -Asn ⁶ -Asn ⁷ -Asp ⁸ -Leu ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂	23	93.7	1173.5681	1173.5728

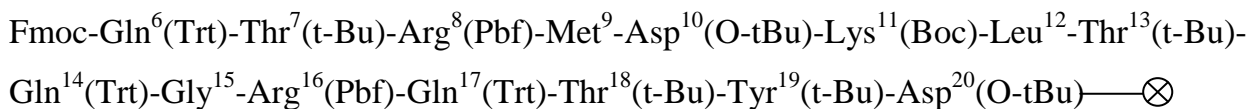
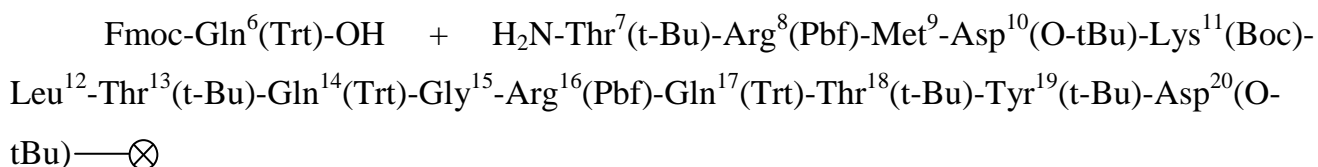
* выход приведен в расчете на первый аминокислотный остаток с учетом очистки пептида с помощью препаративной обращенно-фазной ВЭЖХ

2.1.1 Последовательное наращивание пептидной цепи

Все представленные в таблице 1 пептиды, кроме PB1(111-130) и PB1(381-400) были синтезированы последовательным наращиванием пептидной цепи по одной аминокислоте. Пептид PB1 (1-25) был синтезирован двумя способами – указанным выше, а также конвергентно.

Синтетические проблемы при “посадке” следующего аминокислотного остатка или же деблокировании Fmoc-группы при синтезе всех обсуждаемых пептидов возникали, чаще всего, в реакциях с гидрофобными, пространственно-затрудненными защищенными аминокислотами – Val, Leu, Ile, Asn, Gln, а также Lys, особенно, если они оказывались соседними в аминокислотной последовательности.

Фрагмент 111-130 белка PB1 (соединение 8) не удалось получить последовательным наращиванием пептидной цепи - проблемы в синтезе были отмечены при присоединении остатка глутамина в положении 6:



Реакцию не удавалось провести до конца. По данным аналитической обращено-фазной ВЭЖХ смесь продуктов, полученная после финального деблокирования, содержала два пика, отвечающие, по данным масс-спектрометрии, пептидам 6-20 и 7-20 соответственно:



Целевое соединение удалось получить конвергентным методом при использовании фрагментов 1-5, 6-13 и 14-20.

Пептид PB1(271-290) (соединение 9), синтезированный последовательным наращиванием пептидной цепи, содержит два остатка метионина в положениях 19 и 20. После финального деблокирования данного пептида на хроматограмме полученной смеси присутствовало 4 пика (рисунок 5а).

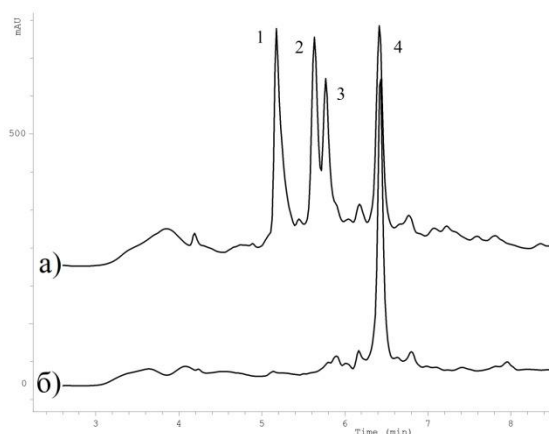


Рис. 5 Хроматограммы пептида PB1(271-290) (RP-HPLC) а) после финального деблокирования б) после восстановления.

Мы предположили, что пики 1-3 соответствуют соединениям, содержащим окисленные формы остатков метионина (рисунок 6):

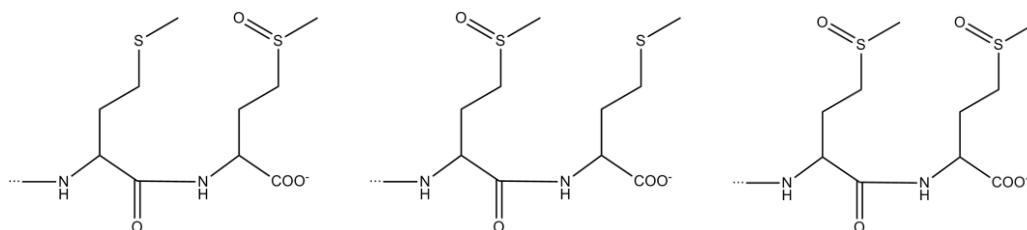


Рис. 6 Окисленные формы остатков метионина.

Действительно, восстановление данной смеси с помощью 1,2-этандитиола и триметилбромсилана в растворе трифторуксусной кислоты привело к целевому соединению, соответствующему пику 4 (рисунок 5б).

Аналогичная картина наблюдалась с пептидом PB1 (525-535) (соединение 17), содержащим один остаток метионина в положении 10 – на рисунке 7 представлены хроматограммы до (а) и после (б) его восстановления: пики 1 и 3 соответствуют окисленной форме, а пик 2 - целевому соединению. Пика 4 соответствует Fmoc-защищенный пептид, что подтверждается исчезновением данной группы пиков (3 и 4) после обработки смеси водным раствором аммиака.

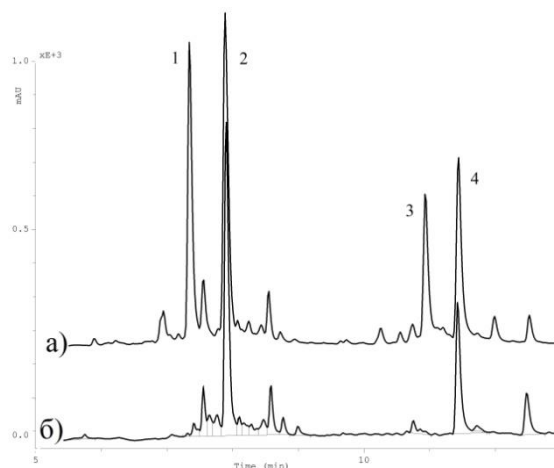
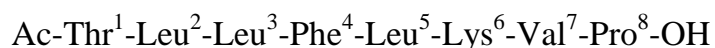
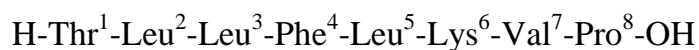
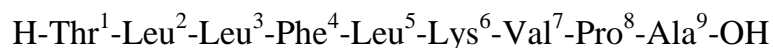


Рис. 7 Хроматограммы пептида PB1(525-535) (RP-HPLC) а) после финального деблокирования б) после восстановления.

Синтез фрагмента 6-13 белка PB1 (соединение 3) и его N-ацетилированного производного (соединение 3б, таблица 2)

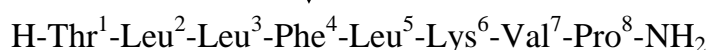
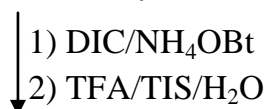


не представляет сложностей в условиях твердофазного синтеза. Однако синтез в таких же условиях фрагмента 6-14 белка PB1 и его N-ацетилированного производного (соединения 4 и 4б),

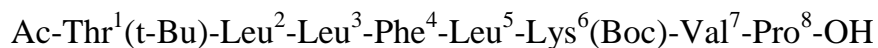


отличающихся от фрагмента 6-13 остатком аланина в положении 9, приводит к возникновению проблем как с присоединением треонина-1, так и с последующим деблокированием Fmoc-группы. В данном случае эти проблемы решает увеличение избытка реагентов на стадии присоединения Thr-1, а также времени протекания реакции. Для деблокирования Fmoc-группы Thr-1 в случае соединений 4 и 4б возникает необходимость в использовании более эффективного реагента DBU (1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен).

Амид фрагмента 6-13 (соединение 3а) был получен амидированием, которое проводили с использованием аммиачной соли гидроксibenзотриазола и диизопропилкарбодиимида:



Получить соединения 3в и 7в описанным выше способом не удалось – реакции не проходили до конца при увеличении как избытка реагентов, так и времени протекания реакции. Синтез соединения 3в также осложнялся плохой растворимостью защищенного пептида:



Поэтому соединения 3в и 7в, а также соединения 4а, 4в, 4г, 7а, 14а, 14в, 18а, 18в были синтезированы с использованием Ринк-амидной смолы, позволяющей получать соответствующие амиды на стадии отщепления от полимерного носителя. Получаемые таким образом амиды не содержат примесей соответствующих кислот (как в случае проведения реакции амидирования с помощью карбодиимида), что упрощает очистку целевых соединений.

2.1.2 Конвергентный синтез

Конвергентно были синтезированы пептиды PB1 (1-25), PB1 (111-130) и PB1 (381-400) (таблица 3).

Таблица 3. Конвергентный синтез пептидов

№	обозначения пептидов	конденсации фрагментов	растворитель	избыток карбоксильной компоненты	реагент
2	PB1 (1-25)	(6-13) + (14-25)	NMP	2.0	<i>HO₂t</i>
		(1-5) + (6-25)	DMF	2.7	<i>HO₂t</i>
8	PB1 (111-130)	(6-13) + (14-20)	DMF	2.9	<i>HOAt</i>
		(1-5) + (6-20)	DMF	3.0	<i>HOAt</i>
12	PB1 (381-400)	(7-14) + (15-20)	DMF	2.4	<i>HOAt</i>
		(1-6) + (7-20)	DMF	3.5	<i>HOAt</i>

Наличие в молекулах PB1 (1-25), PB1(381-400) остатков пролина в положениях 5, 13 (для PB1 (1-25)), 14 (для PB1(381-400)) открыло возможности для использования в их синтезе фрагментных конденсаций с разбивкой аминокислотной последовательности по данной аминокислоте. Такой выбор обусловлен весьма низкой способностью пролина подвергаться рацемизации. В случае пептида PB1(381-400)

разбивку проводили также по аргинину в положении 6. В конденсациях использовали 2-3.5-кратные избытки защищенных фрагментов.

В случае фрагмента 1-25 целевое соединение, полученное с использованием конвергентного синтеза на хроматограмме совпадало с таковым, полученным последовательным наращиванием пептидной цепи. Лучшие результаты были получены в случае конвергентного синтеза.

2.2 Противовирусная активность пептидов

Испытания по противовирусной активности пептидов были проведены сотрудниками лаборатории молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций НИИ Гриппа на культуре клеток MDCK, активность оценивали в отношении вируса гриппа (A/California/07/2009 (H1N1) pdm09), вызвавшего пандемию в 2009 году. В экспериментах оценивали 50%-е цитотоксическую (CTD₅₀) и эффективную (ED₅₀) дозы, на основании которых рассчитывали индекс селективности (SI). Считали активными препараты, имеющие SI >10.

Первоначально были протестированы базовые соединения 1-18 (таблица 4), для дальнейшей работы были выбраны наиболее активные. В качестве препаратов сравнения были выбраны ремантадин, в отношении которого исследуемый штамм обладает устойчивостью, а также осельтамивир, к которому он чувствителен.

Таблица 4. Противовирусная активность базовых пептидов

№	обозначения пептидов	показатели активности		
		CTD ₅₀ , мкг/мл	ED ₅₀ , мкг/мл	SI
1	PB1 (1-5)	745	106	7.0
2	PB1 (1-25)	1000	340	2.9
3	PB1 (6-13)	1000	95	10.5
4	PB1 (6-14)	1000	34	29.4
5	PB1 (6-25)	1000	287	3.5
6	PB1 (14-25)	1000	500	2.0
7	PB1 (26-30)	1000	63	15.9
8	PB1(111-130)	500	140	3.6
9	PB1(271-290)	600	72	8.3
10	PB1(381-386)	1000	500	2.0
11	PB1(381-390)	500	500	1.0
12	PB1(381-400)	330	54	6.1

13	PB1(391-400)	700	80	8.7
14	PB1(395-400)	1000	57	17.5
15	PB1(411-420)	1000	411	2.4
16	PB1(525-530)	1000	500	2.0
17	PB1(525-535)	500	500	1.0
18	PB1(531-540)	1000	58	17.2
препараты сравнения				
	ремантадин	50	20	2.5
	осельтамивир	300	0.3	1000

Как следует из приведенных в таблице 4 данных, синтезированные соединения нетоксичны для клеток. Наиболее активными в отношении вируса гриппа пептидами являются фрагменты 6-13, 6-14, 26-30, 395-400, 531-540 белка PB1 (соединения 3, 4, 7, 14, 18). Интересно отметить, что соединения 14 и 18 не являются фрагментами N-концевой области белка PB1, необходимой для связывания с белком PA.

Индексы селективности фрагментов 6-13 и 6-14 белка PB1 (соединения 3 и 4) отличаются почти в три раза. Возможно, это связано с увеличением количества проникшего в клетки соединения 4 по сравнению с соединением 3 за счет наличия в составе соединения 4 гидрофобного остатка аланина. Кроме того, остаток аланина в положении 14 белка PB1 взаимодействует с остатком глутамина-670 белка PA.

Для увеличения стабильности и биодоступности наиболее активных соединений было решено синтезировать модифицированные пептиды – ацетилированные по N-концевой аминогруппе и амидированные по C-концевой карбоксильной группе. Данные модификации позволяют повысить устойчивость пептидов к экзопептидазам и облегчить их проникновение через клеточную мембрану. Результаты тестирования представлены в таблице 5.

Таблица 5. Противовирусная активность модифицированных пептидов

№	аминокислотная последовательность	показатели активности		
		CTD ₅₀ мкг/мл	ED ₅₀ мкг/мл	SI
3	H-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-OH	1000	95	10.5
3а	H-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-NH ₂	1000	32	31.2
3б	Ac-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-OH	1000	32	31.2
3в	Ac-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-NH ₂	>500	11	>45
4	H-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-Ala-OH	>500	33	>15
4а	H-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-Ala-NH ₂	>500	6	>83
4б	Ac-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-Ala-OH	1000	85	11.8

4в	Ac-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-Ala-NH ₂	>500	4.5	>111
4г	FITC-Ahx-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Lys-Val-Pro-Ala-NH ₂	>500	5	>100
7	H-Gly-Asp-Pro-Pro-Tyr-OH	1000	63	15.9
7а	H-Gly-Asp-Pro-Pro-Tyr-NH ₂	1000	55	18.2
7б	Ac-Gly-Asp-Pro-Pro-Tyr-OH	1000	56	17.9
7в	Ac-Gly-Asp-Pro-Pro-Tyr-NH ₂	500	150	3.3
14	H-Leu-Leu-Val-Glu-Gly-Thr-OH	1000	57	17.5
14а	H-Leu-Leu-Val-Glu-Gly-Thr-NH ₂	500	500	1.0
14б	Ac-Leu-Leu-Val-Glu-Gly-Thr-OH	500	200	2.5
14в	Ac-Leu-Leu-Val-Glu-Gly-Thr-NH ₂	500	500	1.0
18	H-Lys-Asn-Asn-Met-Ile-Asn-Asn-Asp-Leu-Gly-OH	1000	58	17.2
18а	H-Lys-Asn-Asn-Met-Ile-Asn-Asn-Asp-Leu-Gly-NH ₂	1000	50	20.0
18б	Ac-Lys-Asn-Asn-Met-Ile-Asn-Asn-Asp-Leu-Gly-OH	1000	83	12.0
18в	Ac-Lys-Asn-Asn-Met-Ile-Asn-Asn-Asp-Leu-Gly-NH ₂	1000	128	7.8

Как следует из таблицы, во всех случаях, кроме производных фрагмента 395-400 (соединения 14, 14 а-в), амиды оказались более активными, чем соответствующие кислоты, а введение N-концевой ацетильной группы в амиды пептидов привело к увеличению активности только в случае фрагментов 6-13 и 6-14 белка PB1 (соединения 3 и 4). Наиболее активным из всех протестированных соединений оказалось соединение 4в, имеющее SI >111.

Для изучения механизма противовирусной активности этого соединения в следующей серии опытов были изучены его вирулицидные свойства (противовирусная активность вне клеток) и клеточная локализация.

Эксперименты по вирулицидному действию соединений 4в и 4г показали снижение титра вируса на 1.5 и 1 lgEID₅₀ по сравнению с контролем, что свидетельствует об их слабом вирулицидном действии. Вероятно, данный механизм не является основным для этих соединений.

Также был проведен эксперимент по изучению влияния соединения 4в на различные стадии жизненного цикла вируса гриппа. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что соединение 4в, вероятно, влияет на ранние стадии жизненного цикла вируса гриппа.

Для изучения способности соединения 4в к проникновению в клетки в амид соответствующего пептида была введена флуоресцентная метка с помощью флуоресцеин-5-изотиоцианата, линкером выступала 6-аминогексановая кислота.

Введение флуоресцентной метки практически не отразилось на противовирусной активности изучаемого препарата (4г, таблица 5) что свидетельствует о сходстве механизмов действия соединений 4в и 4г.

Исследование локализации флуоресцентно-меченого соединения 4г в клетках MDCK с помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии позволило сделать вывод о том, что исследуемое соединение проникает через клеточную мембрану. С помощью проточной цитофлуориметрии было показано, что данный пептид способен к связыванию с живыми клетками MDCK. Изучение окрашенных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии показало, что окрашивание происходит за счёт проникновения соединения 4г сквозь мембрану клетки.

Вероятно, противовирусная активность соединения 4в – N-ацетилированного амида фрагмента 6-14 белка PB1 реализуется путем нарушения сборки комплекса РНК-полимеразы либо за счет связывания пептида 4в с белком PA, либо за счет стабилизации β -структурированного состояния N-концевой части белка PB1.

Данное соединение, на наш взгляд, является перспективной основой для дальнейшей разработки средств профилактики и/или терапии гриппа.

3. Выводы

1. Разработан синтез пептидов из областей 1-30, 111-130, 271-290, 381-400, 525-540 белка PB1 РНК-полимеразы вируса гриппа А. Всего получено 34 соединения.
2. На основании изучения противовирусной активности синтезированных соединений на культуре клеток MDCK в отношении пандемического вируса гриппа А/California/07/2009 (H1N1) pdm09 показано, что пептиды – фрагменты 6-13, 6-14, 26-30, 395-400, 531-540 белка PB1, а также их производные эффективно подавляют репликацию вируса гриппа.
3. Изучение флуоресцентно-меченого фрагмента 6-14 белка PB1 показало, что препарат проникает через мембрану клетки и действует на ранних стадиях репликации вируса гриппа.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

Статьи:

1. Матусевич, О. В.; Глуздилов, И. А.; Титов, М. И. Синтез фрагментов субъединицы PB1 РНК-полимеразы вирусов гриппа А // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2011. – серия 4. вып. 2. – С. 150–156.

2. Egorov, V. V.; Matusevich, O. V.; Shaldzhyan, A. A.; Skvortsov, A. N.; Zabrodskaya, Y. A.; Garmay, Y. P.; Landa, S. B.; Lebedev, D. V.; Zarubayev, V. V.; Sirotkin, A. K.; Vasin, A. V.; Kiselev, O. I. Structural features of the peptide homologous to 6-25 fragment of influenza A PB1 protein // International Journal of Peptides. – 2013. – Vol. 2013. – ID 370832.

Патент:

Киселёв, О. И.; Деева, Э. Г.; Зарубаев, В. В.; Штро, А. А.; Матусевич, О. В.; Титов, М. И.; Глуздииков, И. А. Пат. 2492178 РФ С1. Противовирусный пептид, подавляющий репликацию вируса гриппа – № 2012115794/10; заявл. 19.04.2012; опубл. 10.09.2013, Бюл. № 25. 12 С.

Тезисы докладов:

1. Matusevich, O. V.; Kiselev, O. I. The Synthesis of Some Peptides Intended to Be Inhibitors of the RNA-Polymerase of Influenza A Virus // Proceedings of the 31st European Peptide Symposium, Copenhagen, Denmark, September 5-9, 2010. P. 548.

2. Matusevich, O. V. Synthesis of the PB1 protein fragment of RNA-polymerase of influenza A virus // Journal of Peptide Science. – 2010. – Vol. 16. S1. – P. 65.

3. Глуздииков, И. А.; Краснощек, А. А.; Матусевич, О. В.; Титов, М. И.; Киселев, О. И. Синтез фрагментов белка PB1-субъединицы РНК-полимеразы вируса гриппа типа А // Тез. докл. IV Российского симпозиума “Белки и пептиды”, Казань, 23-27 июня 2009. С. 147.

4. Матусевич, О. В. Синтез фрагмента белка PB1 РНК-полимеразы вируса гриппа А // Материалы междунар. конф. "Основные тенденции развития химии в начале XXI-го века", Санкт-Петербург, 21-24 апреля 2009. С. 403.

5. Матусевич, О. В.; Глуздииков, И. А. Синтез фрагмента PB1 (111-130) РНК-полимеразы вируса гриппа А // Тез. докл. V Всерос. конф. студентов и аспирантов “Химия в современном мире”, Санкт-Петербург, 2011. – СПб: ВВМ, 2011. – С. 404.

6. Забродская, Я. А.; Шалджян, А. А.; Матусевич, О. В.; Егоров, В. В. Пептиды, способные к взаимодействию с белками вируса гриппа // Тез. докл. конф. молодых специалистов “Грипп: эпидемиология, вирусология, профилактика и лечение”, СПб, 2012. С. 21.

7. Забродская, Я. А.; Егоров, В. В.; Матусевич, О. В.; Гармай, Ю. П.; Васин, А. В.; Киселёв, О. И. Структурные особенности сайта связывания белка PB1 и белка PA вируса гриппа А // Тез. докл. 16-й Междунар. школы-конф. молодых ученых “Биология – наука XXI века”, Пущино, 16-21 апреля, 2012. С. 109.