

## О Т З Ы В

официального оппонента к.х.н. Сидоровой М.В. о диссертационной работе Матусевича Олега Владимировича «Синтез и изучение фрагментов РНК-полимеразы вируса гриппа А», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

**Актуальность** избранной диссертантом темы не вызывает сомнений. По данным ВОЗ во время сезонных эпидемий гриппа в мире ежегодно умирает от 250 до 500 тысяч человек. Эпидемическую опасность для людей представляют вирусы гриппа А и В. Несмотря на огромное количество исследований по поиску терапевтических и профилактических противогриппозных препаратов, их выбор в настоящее время весьма ограничен. Это связано с высокой изменчивостью антигенной структуры вируса гриппа и развитием резистентности к уже существующим лекарственным средствам. В связи с этим поиск противовирусных препаратов нового поколения является важной и актуальной задачей. Именно в русле подобных исследований находится выбранная диссертантом тема. Диссертационная работа О.В. Матусевича посвящена поиску и разработке методов получения оригинальных пептидных препаратов, подавляющих репликацию вируса гриппа А и представляет интерес, как с научной, так и с практической точки зрения. Мне кажется очень важным тот факт, что для поиска противовирусных препаратов была выбрана РНК-полимераза. Этот фермент не только играет центральную роль в жизненном цикле вируса гриппа - катализирует синтез вирусной РНК, но и является консервативным структурным компонентом в отличие от поверхностных белков гемагглютинина и нейраминидазы. Пептидные фрагменты РНК-полимеразы, обладающие противовирусной активностью, на мой взгляд, могут стать основой для дальнейшей разработки лекарственных средств для профилактики и терапии гриппа.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций** в диссертации О.В. Матусевича, на мой взгляд, достаточно высока. Автор корректно использует известные научные методы и положения для обоснования полученных им результатов, выводов и рекомендаций. Диссертантом изучены и критически анализируются известные достижения и теоретические положения других авторов по вопросам, непосредственно связанным с избранной темой диссертации. В литературном обзоре систематизированы подходы к конструированию протеолитически устойчивых аналогов пептидов, представлены современные данные по методам синтеза

пептидов, по методам выявления коротких пептидных последовательностей, перспективных в плане создания модификаторов белок - белковых взаимодействий. Такие соединения интересны не только как инструменты для изучения функций белков, но и как потенциальные терапевтические средства - активаторы или ингибиторы функций того или иного белка. Автор очень подробно рассматривает структурные компоненты вируса гриппа, роль каждого в жизненном цикле вируса и потенциальные мишени для специфической химиотерапии, а также существующие на сегодняшний день противогриппозные лекарственные препараты, их достоинства и недостатки. Список литературы в диссертации достаточно обширный и содержит 192 наименования. Прделанная автором работа с литературой приводит его к весьма обоснованной формулировке цели и задач исследования, выбору объектов синтеза и методов их получения.

Для поиска потенциальных противогриппозных препаратов, подавляющих репликацию вируса гриппа А, из 16-ти белков вирусного генома выбрана ключевая субъединица РВ1 РНК-полимеразы. Этот выбор представляется мне интересным и весьма перспективным, т.к. этот белок по сравнению с поверхностными белками изучен намного меньше, кроме того, он обладает высокой консервативностью.

С помощью компьютерного моделирования структуры белка РВ1 и анализа литературных данных были выбраны 18 базовых пептидов для синтеза и изучения противовирусной активности. На этом этапе работы диссертантом сделано следующее:

- 1) с использованием наиболее современной Fmoc/Bu<sup>t</sup>-техники разработаны методики твердофазного синтеза (ТФС) выбранных пептидов, насчитывающих от 6 до 25 аминокислотных остатков, с применением ступенчатого наращивания пептидной цепи по одной аминокислоте или, в случае длинных пептидов, фрагментной конденсации;
- 2) разработаны методики твердофазного синтеза аналогов ряда пептидов, обладающих повышенной устойчивостью к действию протеолитических ферментов – карбокси- и аминопептидаз;
- 3) получен флуоресцентно меченый аналог фрагмента РВ1 (6-14), необходимый для изучения механизма действия этого пептида;
- 4) изучена природа побочных продуктов при синтезе метионинсодержащих пептидов, отработана методика восстановления окисленного остатка метионина.



Изучение противовирусной активности синтезированных фрагментов субъединицы PB1 РНК-полимеразы и их аналогов с модифицированными N- и C-концевыми аминокислотами выявило ряд соединений, эффективно подавляющих репликацию вируса гриппа А. При этом амиды пептидов, как правило, обладали более высокой активностью, чем соответствующие кислоты. Модификация N-концевой аминокислоты оказалась эффективной лишь в отдельных случаях.

**Достоверность** полученных результатов и выводов не вызывает сомнения, так как все синтезированные диссертантом соединения охарактеризованы данными аналитической высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе и данными масс-спектрометрии, исследование противовирусной активности пептидов выполнено на высоком методическом уровне. Проведено сравнение наиболее активных пептидов с коммерческими противогриппозными препаратами – ремантадином и осельтамивиром. Экспериментальная часть диссертации, на мой взгляд, даже излишне подробно.

**Научная новизна представленной работы.** Полученные автором результаты являются новыми. О.В. Матусевичем синтезировано 34 оригинальных пептидных фрагмента субъединицы PB1 РНК-полимеразы, среди них найдены соединения, эффективно подавляющие репликацию вируса гриппа. На момент начала исследований диссертанта было известно, что N-концевой фрагмент белка PB1 ингибирует репликацию вируса гриппа А. Диссертантом эта область была изучена более детально, в частности, показано, что активностью обладают и относительно короткие (содержащие не более 10 аминокислот) пептиды из этой области. Эти результаты хорошо согласуются с уже известными данными и существенно дополняют их. Кроме того, впервые было установлено, что искомой активностью обладают фрагменты других областей белка (395-400) и (531-540). В результате проведенных исследований найдено соединение, которое не только обладает противовирусной активностью, но и проникает через клеточную мембрану, что очень важно для создания лекарственных препаратов против гриппа. Один из наиболее активных пептидов защищен патентом на изобретение РФ.

**Практическая значимость** работы заключается в получении новых пептидных препаратов из консервативной субъединицы PB1 РНК-полимеразы, обладающих высокой противовирусной активностью. Эти пептиды относительно короткие (не более 10 аминокислотных остатков), что делает их привлекательными для практического использования в качестве прототипов противогриппозных лекарственных средств.

Полученные соединения могут найти применение в научных исследованиях, в медицине и в сельском хозяйстве.

**Автореферат и публикации** адекватно отражают содержание диссертации. Статьи по теме диссертации опубликованы в отечественной и зарубежной периодике, получен патент РФ на изобретение. Работа хорошо написана и оформлена. Результаты работы неоднократно обсуждались на отечественных и зарубежных конференциях и симпозиумах.

Выводы, сформулированные в диссертации, полностью соответствуют положениям и результатам, выносимым на защиту. Выводы подтверждаются экспериментальными данными.

В диссертации мною не обнаружено существенных недостатков. Однако, есть отдельные **замечания**. Мне кажется, что было бы уместно обсудить выбор 2-хлортритилхлоридной смолы для синтеза не только защищенных пептидных фрагментов, но и свободных пептидов. Ведь именно этот выбор позволил автору успешно получить несколько пептидов, содержащих пролин в первом или во втором положении с С-конца пептида. Достоинством 2-хлортритилхлоридной смолы является минимальное образование дикетопиперазинов на стадии аминокислотных пролинсодержащих дипептидилполимеров, приводящее к потере пептидных цепей в процессе ТФС. При использовании другой смолы, например, традиционно применяемого полимера Ванга вряд ли удалось бы получить эти пептиды с высокими выходами. На мой взгляд, обоснование выбора полимера для ТФС только украсило бы обсуждение результатов. Тактика ТФС пептидов в диссертации очень грамотная, но хотелось бы каких-то пояснений по тексту. Например, синтез «длинных» пептидов проводится на смоле с низкой степенью замещения стартовой аминокислотой. Для этого автор берет недостаток стартовой аминокислоты по отношению к содержанию хлора на полимере, а затем отщепляет остаточный хлор с носителя. И это правильно. Но, к сожалению, пояснений, как и зачем это делается, в тексте нет. Кроме того, мне кажется, было бы интересно выяснить причину такого катастрофического окисления остатков метионина при синтезе пептида, соответствующего последовательности (271-290) РВ1-субъединицы РНК-полимеразы. Возможно, изменение состава смеси при заключительном деблокировании этого пептида или процедуры его выделения позволило бы свести к минимуму эту побочную реакцию. Однако, автор с честью вышел из создавшегося положения, проведя восстановление метионина. Ещё одно замечание касается твердофазно-фрагментного синтеза. При синтезе пептида, соответствующего последовательности (111-130), время



фрагментных конденсаций карбодииимидным методом составляет от 7 до 14 дней. Мне это время кажется чрезмерным, тем более, что разбивка на фрагменты выполнена по рацемизирующимся аминокислотам – глутамину и треонину. Возможно, надо было бы поменять конденсирующий агент или сделать депротонирование аминогруппы аминокомпонента. Сделанные замечания, однако, не влияют на главные научные и практические результаты диссертации О.В. Матусевича.

**Заключение.** В рамках поставленной задачи диссертация представляет собой законченное научное исследование, выполненное автором самостоятельно на высоком научном уровне. Представленная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой решается задача поиска пептидных фрагментов РНК-полимеразы вируса гриппа А, подавляющих его репликацию, имеющая существенное значение для биологии и медицины. В результате работы найдены соединения, обладающие заданными противовирусными свойствами. Один из пептидов перспективен для разработки на его основе лекарственного препарата для терапии и профилактики гриппа А. Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. По объему, уровню выполнения и новизне полученных результатов диссертационная работа отвечает требованиям пункта 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор - Матусевич О.В. - заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Официальный оппонент, кандидат  
химических наук, руководитель лаборатории  
синтеза пептидов

М.В. Сидорова

Подпись официального оппонента заверяю  
Ученый секретарь



С.А. Левашова

ФГБУ «Российский кардиологический научно-  
производственный комплекс» Минздрава РФ

« 8 » сентября 2014 г.