

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Е.С. Пустюльги «Моделирование олигопептидных лигандов, синтез и создание на их основе новых биоспецифических сорбентов для связывания иммуноглобулинов класса G»,
представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности
02.00.10 – биорганическая химия

Соответствие содержания диссертации заявленной специальности и отрасли науки

Диссертационная работа Е.С. Пустюльги посвящена рациональному выбору аминокислот, ди- и трипептидов в качестве функциональных групп неподвижной фазы сорбентов для селективной и аффинной сорбции иммуноглобулинов G с применением методов *in silico* (докинг, компьютерный анализ сайтов связывания в константной области IgG) и экспериментальных (органический синтез пептидов, их конъюгация на поверхности иммобилизованной на частицы полиакриловой кислоты, тесты с образцами модифицированных аминокислотами и пептидами сорбентов на сорбцию IgG из плазмы крови).

При выполнении работы использованы такие методы исследований, как пептидный синтез, секвенирование по Эдману, химическая модификация полимерной матрицы активированными эфирами, определение белка по Лоури, иммуноферментное определение подклассов IgG, масс-спектрометрия, белок-лигандный докинг и некоторые другие расчетно-теоретические методы.

Материал диссертационной работы соответствует паспорту специальности 02.00.10 – биорганическая химия, разделам 1, частично 3 и 6 Паспорта специальности, в частности: 1. ...Синтез..., 3 Создание тест-систем для выделения белковых маркеров, 6 ...молекулярный докинг...

Следовательно, диссертационная работа Е.С. Пустюльги соответствует заявленной специальности 02.00.10 – биорганическая химия и относится к химическим наукам.

Актуальность темы диссертации

Тема диссертационной работы Е.С. Пустюльги соответствует приоритетному направлению научной деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 гг. (Указ Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 № 166): «Медицина, фармация, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний, фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы»; приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг. (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190): «Химический синтез и продукты» и «Медицина и фармация».

Объекты исследований – аминокислоты, пептиды и сорбенты на основе их конъюгатов с полиакриловой кислотой, иммуноглобулины. Исследования, посвященные рациональному дизайну полимерных сорбентов иммобилизованных на их матрице низкомолекулярных соединений для аффинной сорбции белков являются классикой, однако не утратили своей актуальности и сегодня с учетом типа сорбируемых белков и назначений использования. В работе соискателя сорбенты разрабатывались для использования в медицинской практике для проведения процедуры удаления антител класса IgG из крови, что может и отчасти используется при терапии аутоиммунных заболеваний, увеличение которых регистрируется за последние пять лет со скоростью примерно 3-9 % в год. Хотя на рынке представлены сорбенты для IgG, отечественной продукции такого назначения явно не хватает в связи с закупкой импортной.

Поэтому, рациональный дизайн и получение новых материалов для эффективного и селективного удаления антител из крови, которым посвящен работа Пустюльги Е.С., являются актуальными научно-практическими задачами.

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту

В работе соискателя впервые получены новые синтетические полимерные материалы для эффективной и селективной сорбции антител класса IgG из плазмы крови на основе коротких пептидов, выбор которых был рационализирован с использованием рассчитанной *in silico* аффинности интеракции структур пептидов с константной областью IgG. Также отмечу рациональность использования D-формы аминокислоты в составе таких пептидов для повышения стабильности материалов под действием протеаз и пептидаз крови. Используя плазму крови проведено сравнение вновь полученных сорбентов с некоторыми коммерчески-доступными на предмет селективности взаимодействия с различными подклассами IgG. Согласно проведенному мною анализу научной литературы, такие данные получены впервые.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Экспериментальные и расчетно-теоретические данные в работе можно считать достоверными поскольку методики их получения рациональны и описаны полно, исходные материалы приобретены у хорошо зарекомендовавших себя фирм-поставщиков и известных марок реактивов для научных исследований.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию

Научная значимость результатов состоит в получении новых данных о взаимодействии подклассов IgG с сорбентами на основе полиакриловой кислоты,

модифицированной ди- и трипептидами, взаимодействие которых с константной областью IgG рационализировано методом молекулярного докинга.

Практическая, экономическая и социальная значимость связана с пригодностью полученных образцов сорбентов для дальнейших тестов на пути к одобрению к серийному производству и применению в медицине, что в перспективе даст шанс вовлекать такую отечественную продукцию для терапии людей с аутоиммунными заболеваниями. Соискателем с коллегами поучен патент на соответствующий аффинный сорбент и его применение.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертации опубликованы в 14 печатных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (2,0 авторских листа), 5 статей в сборниках конференций и тезисы 5 докладов в материалах конференций и также 1 патенте. Опубликованные материалы находятся в соответствии с содержанием работы и положениями, выносимыми на защиту.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертация Пустюльги Е.С. изложена на 127 страницах и состоит из перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, библиографического списка (включающего 114 процитированные работы и 15 публикаций соискателя) и 3 приложений. Работа содержит 17 таблиц, 4 схемы и 27 рисунков. Автореферат информативен, корректно отражает сущность проведенного диссертационного исследования и текста диссертации. Диссертационная работа и автореферат оформлены в соответствии с требованиями «Инструкции по оформлению диссертации, автореферата и публикаций по теме диссертации», принятой ВАК.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени кандидата химических наук

Как отмечено выше, для выполнения задач диссертационной работы соискателем использованы современные методы исследования, сочетаны подходы *in silico* и *in vitro*, что подразумевает владение соответствующими приборами, методами пептидного синтеза и анализа на высоком уровне. Анализ опубликованных научных статей, а также подготовленных автореферата и диссертации позволяет сделать вывод о высокой научной квалификации Е.С. Пустюльги и о возможности присудить ему ученую степень кандидата химических наук по специальности «02.00.10 – биорганическая химия».

Замечания и вопросы по работе

При анализе диссертационной работы Пустюльги Е.С. возникли некоторые уточняющие вопросы и замечания, которые, однако, не затрагивают принципиально значимых выводов:

Замечания:

Неудачные выражения: стр. 2 «рецепторы как источники лигандов», стр. 85 «лавинообразно», «сценарии».

Стр. 36. и далее следует писать полиакриловой кислотой, так как облученные радиацией полимерные шарики из-за сохраненных радикальных и пероксидных фрагментов инициируют прививочную полимеризацию акриловой кислоты на поверхности этих объектов.

Стр. 31. Опечатка в интерпретации иона: $[M]^+$, вероятно, следует $[M+H]^+$.

Вопросы:

- 1) Почему в параметрах для докинга указано генерация 50 результирующих конформаций, когда в работе описывается лишь одна? Были ли альтернативные сайты связывания для каких-либо пептидов с сопоставимой с наименьшей энергией связывания? Каким размерам ячейки грида для Autodock Vina соответствует определение «по всей поверхности»?
- 2) Как учитывалась энергетически-затрудненное вращение амидной связи при докинге?
- 3) Насколько хорошо и во всех ли случаях коррелируют результаты докинга с полученной на практике аффинностью IgG к сорбенту на его основе?
- 4) Каковы по мнению соискателя причины того, что сорбенты на основе пептидов в экспериментальных тестах проявили себя лучше, чем их коммерческие прототипы на основе мышинных антител и белка А, хотя согласно [MAbs. 2017 Jul; 9(5): 767–773] и [<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/protein-a-g>] их аффинность к IgG человека характеризуется величинами 10^{-6} – 10^{-8} и 10^{-9} , соответственно.

Заключение:

Таким образом, диссертационная работа Пустюльги Е.С. является законченным научным исследованием, основные положения работы обладают достаточной степенью новизны и основываются на достоверных результатах, полученных соискателем. Диссертация Пустюльги Е.С. по актуальности и значимости исследования, объему экспериментальных работ, научной и практической значимости полученных результатов соответствует всем установленным требованиям ВАК Республики Беларусь к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия за новые научно обоснованные результаты, **закключающиеся в:**

- создание новых сорбентов на основе модифицированных ди- и трипептидами сорбентов на основе иммобилизованной на полиэтиленовых гранулах полиакриловой

кислоты, способных с хорошей аффинностью и селективностью связывать IgG из плазмы крови;

- за комплексный подход в дизайне таких лигандов, сочетающий использование молекулярного докинга для прогноза сайтов связывания и сродства к целевому белку и использования в их структурах D-аминокислоты D-Тур для большей стабильности материала к гидролитической деструкции протеазами и пептидазами крови;

- за детальную характеристику специфичности данных сорбентов в отношении сорбции отдельных подклассов IgG плазмы крови человека;

что, в совокупности, вносит существенный вклад в решение важной задачи по дизайну и получению материалов медицинского назначения с применением подходов тонкого органического синтеза, полимерной химии и биохимии белковых молекул. Это важно как с точки зрения получения новых научных данных, а также перспектив внедрения новых средств медицинскую практику терапии аутоиммунных заболеваний.

кандидат химически наук, доцент

Я.В. Фалетров

