

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права

УДК 544.723.21+542.06:577.112.6+544.165+616-097

ПУСТЮЛЬГА
ЕГОР СЕРГЕЕВИЧ

**Моделирование олигопептидных лигандов, синтез и создание на их основе
новых биоспецифических сорбентов для связывания
иммуноглобулинов класса G**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Минск, 2022

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель: **Голубович Владимир Петрович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси

Официальные оппоненты: **Усанов Сергей Александрович**, член-корреспондент НАН Беларуси, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси

Фалетров Ярослав Вячеславович, кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов НИИ ФХП Белорусского государственного университета

Оппонирующая организация: ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

Защита состоится «28» июня 2023 г. в 13.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220084, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, зал заседаний Ученого совета, e-mail: tbozhok@iboch.by, тел. +375(17)3979612.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «26» мая 2023 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук

Т.С. Божок

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время спектр известных аутоиммунных заболеваний весьма широк. Примерами аутоиммунных заболеваний являются системная красная волчанка (СКВ), антифосфолипидный синдром (АФС), гемолитическая болезнь плода (ГБП) и новорожденных (ГБН) и др.

Применение в лечении только фармакотерапевтических схем с использованием иммуномодуляторов и иммуносупрессантов зачастую не приносит ожидаемых результатов. При этом наблюдается клинико-лабораторная активность патологических процессов, отсутствие эффекта от проводимого медикаментозного лечения или его непереносимость, быстро прогрессирующее течение заболевания, что определяет актуальность и обоснованность применения у данной категории больных комбинированной (синхронизированной) терапии. Включение в комплексную терапию аутоиммунных заболеваний плазмафереза и гемосорбции позволяет оптимизировать лечение больных этими аутоиммунными патологиями.

Избирательная сорбция применяется для удаления из биологических жидкостей (плазмы, лимфы, крови) целевых токсических веществ-мишеней различной молекулярной массы и природы при онкологических, аутоиммунных, инфекционных, аллергических и других заболеваниях.

В настоящее время для избирательной сорбции применяются IgG-сорбенты на основе различных активных лигандов, таких как В-домен протеина А бактерий, нанофибра и т.д. Подобные сорбенты обладают существенным количеством недостатков, в число которых входят высокая стоимость производства, сложность создания и возможные негативные побочные эффекты, возникающие при применении.

Таким образом, поиск новых сорбентов, способных связывать большие количества IgG, имеющих высокую селективность и простоту производства, является актуальной задачей научных исследований, для решения которой может быть использован целый ряд методов, включая молекулярное моделирование лиганд-рецепторных взаимодействий, модификации химических структур и дальнейший виртуальный скрининг лиганд-рецепторных комплексов.

В диссертационной работе использован комплексный подход к созданию новых лигандов, включающий методы молекулярного докинга и пептидного синтеза. Идентифицированы перспективные лиганды, осуществлен синтез этих молекул, и на их основе созданы экспериментальные образцы сорбентов. Исследования свойств экспериментальных образцов сорбентов *in vitro* показали высокую аффинность идентифицированных молекул, сорбционную емкость, высокую селективность к подклассам иммуноглобулинов G и низкую к другим белкам плазмы крови.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными программами (проектами) и темами. Работа являлась частью плановых исследований лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси, выполненных в рамках ГПНИ «Химические технологии и материалы» на 2016-2020 гг., подпрограмма «Биологически активные вещества», задание 2.12 «Разработка гемосорбентов для избирательного удаления иммуноглобулинов класса G» (№ г.р. 20162000); гранта на выполнение научно-исследовательских работ аспирантами, кандидатами и докторами наук НАН Беларуси «Изучение свойств экспериментальных образцов сорбентов для удаления IgG на основе ароматических аминокислот в качестве лигандов» на 2018 год. (№ г.р. 20180834); грантов на выполнение научно-исследовательских работ аспирантами, кандидатами и докторами наук Национальной академии наук Беларуси «Изучение свойств экспериментальных образцов сорбентов для удаления IgG на основе ароматических аминокислот в качестве лигандов» № 2018-27-039 от 02.04.2018, № г.р. 20180834 и № 2019-27-119 от 15.04.2019 и № г.р. 20191531.

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научно-технической 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».

Цель исследования: разработать на основе синтезированных олигопептидов новые биоспецифические сорбенты для связывания иммуноглобулинов класса G и их подклассов из биологических жидкостей.

Задачи исследования:

1. Провести поиск пептидных лигандов и моделирование их взаимодействий с Fc-фрагментами иммуноглобулинов класса G.
2. Синтезировать пептидные лиганды и создать на их основе экспериментальные образцы сорбентов для связывания IgG и подклассов.
3. Определить параметры связывания общего иммуноглобулина G экспериментальными образцами сорбентов, а также их удельную насыщенность и оценить селективность экспериментальных образцов сорбентов к подклассам иммуноглобулинов класса G, общему белку плазмы крови, альбумину, а также другим классам иммуноглобулинов.

Объект исследования: лиганды, имеющие высокую степень сродства к иммуноглобулинам класса G, экспериментальные образцы сорбентов, изготовленные на их основе.

Предмет исследования: сродство лигандов и активность сорбентов на их основе к иммуноглобулинам класса G, сорбционные свойства разработанных сорбентов.

Научная новизна. Впервые установлены закономерности функциональных свойств лигандов, состоящих из трех аминокислотных остатков формулы Phe-Xaa-Tyr, где Xaa – Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, к связыванию с общим иммуноглобулином класса G и его подклассами.

Осуществлен синтез новых трипептидов Phe-Trp-DTyr, Trp-Phe-DTyr и Phe-Xaa-Tyr-OMe, где Xaa – Ala, Asn, Asp(OBzl), Gln, Gly.

Методом стендовых испытаний на плазме крови с варьирующимся уровнем антител получена сравнительная характеристика параметров селективности новых экспериментальных сорбентов с различными классами и подклассами иммуноглобулинов. Установлено, что экспериментальные сорбенты обладают высокой селективностью к IgG и подклассам и почти не взаимодействуют с другими классами иммуноглобулинов – IgE, IgM, а также с альбумином.

Положения, выносимые на защиту:

1. Идентификация новых потенциальных лигандов для биоспецифических сорбентов на основе ди- и трипептидов, содержащих аминокислоты ароматической группы и обладающих высоким сродством к Fc-фрагментам подклассов иммуноглобулинов класса G, методом молекулярного докинга.

2. Новые ди- и трипептидные соединения на основе аминокислот ароматической группы, полученные классическими методами пептидного синтеза, используемые в качестве лигандов сорбентов.

3. Впервые созданные на основе синтезированных лигандов и матриц в виде активированных полиэтиленовых гранул экспериментальные образцы сорбентов для избирательного связывания общего иммуноглобулина класса G и его подклассов.

4. Характеризация новых сорбентов по их активности к иммуноглобулинам класса G, их подклассам, а также селективности относительно других классов иммуноглобулинов и белков, содержащихся в плазме крови человека.

Личный вклад соискателя. Получение экспериментальных образцов сорбентов, проведение теоретических и экспериментальных исследований, синтез олигопептидов, подготовка методик, анализ полученных результатов, поиск, систематизация и анализ научной и патентной литературы по теме диссертации, подготовка иллюстрированного материала и написание рукописи

диссертации выполнены соискателем. Постановка цели и задач исследования, интерпретация результатов, подготовка материалов для научных публикаций осуществлялась совместно с д.б.н., проф. Голубовичем В.П. При выполнении работы соискатель пользовался консультационной помощью к.х.н. Мартинович В.П., к.х.н. Грибовской О.В. и Ермолы Е.М.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Результаты исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, представлены и доложены на Международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, Беларусь, 2019, 2022), Международной научной конференции «Молодежь в науке» (Минск, Беларусь, 2017, 2019, 2020), Международной научно-практической конференции «Биохимия и молекулярная биология» (содержит материалы, представленные на 1-ю Белорусско-польско-литовскую конференцию «Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм») (Гродно, Беларусь, 2018), II Международном биохимическом конгрессе «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, Беларусь, 2018), Международной научно-практической конференции «Актуальные медико-биологические проблемы алкогольной и других химических зависимостей» (Гродно, Беларусь, 2019), Международной научно-практической конференции «Биотехнология: достижения и перспективы развития» (Пинск, Беларусь, 2019), Международной научно-практической конференции «Биологически активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности» (Гродно, Беларусь, 2021).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 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. Результаты работы защищены 1 патентом Республики Беларусь. Общий объем опубликованных материалов – 3,3 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертация 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 Биоспецифические сорбенты для связывания иммуноглобулинов класса G (литературный обзор)

Приведен анализ современной литературы, посвященной проблеме связывания иммуноглобулинов класса G, существующие на данный момент

патологии, связанные с гиперпродукцией иммуноглобулинов класса G, а также существующие экспериментальные и выведенные на рынок сорбенты, способные связывать как класс иммуноглобулинов G, так и их подклассы. К настоящему времени создано большое количество сорбентов для связывания подклассов иммуноглобулинов G, однако большинство из них имеет свои недостатки, связанные либо с низкими результатами сорбции, либо с особенностями производства.

Глава 2 Материалы и методы

Изложены основные методы, используемые в работе. Теоретический поиск лигандов и моделирование взаимодействий с молекулами белков проводили с помощью программ докинга. Синтез пептидов был проведен классическими методами пептидной химии. Прививку акриловой кислоты на полиэтиленовые гранулы проводили прямым радиационным методом в ГНУ «ОИЭЯИ-СОСНЫ». Для иммобилизации полученных олигопептидов на гранулы последние предварительно модифицировали N-гидроксисукцинимидом с помощью N,N'-диизопропилкарбодиимида. Определение концентрации общего иммуноглобулина G и его подклассов производили иммуноферментным анализом, определение концентрации общего белка проводили методом Лиамы, определение концентрации альбумина – наборами для определения альбумина. Определение сорбционных свойств экспериментальных образцов осуществляли стендовыми статическими и динамическими экспериментами.

Глава 3 Теоретический поиск и моделирование аминокислотных лигандов, обладающих высоким сродством к молекулам IgG

Третья глава работы посвящена описанию поиска лигандов и моделированию их взаимодействий с молекулами Fc-фрагментов подклассов иммуноглобулинов G. В результате выявлены ди- и трипептидные последовательности, показавшие высокие результаты связывания и предположительную селективность в отношении молекул-мишеней.

Поиск олигопептидных соединений, в качестве лигандов обладающих сродством к IgG и подклассам, был проведен путем скрининга поверхности взаимодействия белковой молекулы FcγRI-рецептора. Для реализации скрининга была взята за основу модель FcγRI-Fc (IgG) (код: 4W4O в Банке данных белков).

Скрининг поверхности взаимодействия и дальнейший сравнительный анализ состава последовательностей аминокислотных остатков показали, что пептидные последовательности Lys128-Tyr129-Phe130-His131-His132, Ser161-Ser162-Glu163-Thr164, Gly156-Ser157-Lys158-Asn159, Trp110-Lys111-Asn112-Thr113, Tyr129-Phe-130-His131-His132, Asn112-Thr113-Ala114, Gly124-Lys125-Asp126, Asn123-Gly124-Lys125, Ile85-Gly86-Trp87 можно использовать для дальнейших исследований в качестве лигандов.

Докинг пептидных молекул с Fc-фрагментами IgG (коды: 4HDI, 4I4J, 5JII, 5W5M в Банке данных белков) показал, что различия в энергиях связывания не дают возможности установить специфичность связывания с конкретными подклассами IgG. Дальнейшее выяснение роли отдельно взятых аминокислот дает возможность модификации олигопептидов, обладающих более низкой энергией связывания и ярко выраженной специфичностью к подклассам IgG.

В процессе молекулярного докинга были выявлены аминокислоты, показавшие наибольшее сродство к Fc-фрагментам IgG разных подклассов. По результатам проведенного докинга аминокислот и молекул выявлено, что аминокислоты ароматической группы (Tyr, Trp, Phe) обладают высоким сродством к Fc-фрагментам IgG (величины энергии связывания составляли –5,6; –5,3; –5,1 ккал/моль соответственно). Также выявлено, что аминокислоты Ala, Arg, Asn, Asp, Gln и Gly могут быть использованы в качестве вспомогательных в дальнейшем моделировании олигопептидов.

Исходя из данных активности аминокислот, для дальнейшего исследования были созданы модели ди- и трипептидов Trp-Tyr, Phe-Tyr, Trp-Phe-Tyr, Phe-Trp-Tyr. Данные, полученные в результате проведенного моделирования взаимодействий трипептидов с Fc-фрагментами IgG, свидетельствуют о том, что трипептид Phe-Trp-Tyr имеет энергию связывания выше, чем Trp-Phe-Tyr, исходя из средних значений, а также с учетом оценки значений относительно подклассов IgG, с которыми проводилось моделирование. В частности, Trp-Phe-Tyr показал высокие результаты при связывании с IgG1 и IgG4, а Phe-Trp-Tyr – при связывании с IgG2 и IgG3. Однако общее среднее значение связывания выше для трипептида Phe-Trp-Tyr.

Далее олигопептиды были модифицированы. L-форма тирозина была заменена на D-форму (таблица 1).

Таблица 1 – Энергии связывания в лиганд-рецепторных взаимодействиях между Fc-фрагментами IgG и пептидными лигандами (ккал/моль)

Иммуноглобулин	Аминокислотная последовательность			
	Trp-DTyr	Phe-DTyr	Trp-Phe-DTyr	Phe-Trp-DTyr
IgG1	–5,9	–6,2	–8,0	–7,3
IgG2	–7,0	–6,0	–7,2	–7,8
IgG3	–7,2	–7,0	–8,1	–8,9
IgG4	–6,5	–6,4	–7,3	–7,2
Среднее значение	–6,7	–6,4	–7,7	–7,8

На основе данных молекулярного моделирования взаимодействий моделей ди- и трипептидов можно заключить, что Trp-Phe-DTyr и Phe-Trp-DTyr не только

демонстрируют высокую аффинность к IgG, но и могут быть дифференцированы по значению энергии связывания относительно подклассов.

В дальнейшем было проведено сравнение энергий связывания олигопептидов, найденных в результате скрининга поверхности взаимодействия FcγRI и модифицированных пептидов, полученных в результате подбора аминокислотного состава.

Таблица 2 – Энергия связывания лиганд-рецепторных взаимодействий между Fc-фрагментами IgG и олигопептидными лигандами (ккал/моль)

Олигопептидный лиганд	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Среднее значение
Asn-Gly-Lys	-4,9	-4,9	-5,2	-4,5	-4,9
Asn-Thr-Ala	-5,0	-4,7	-5,4	-5,3	-5,1
Gly-Lys-Asp	-4,5	-4,7	-4,9	-5	-4,8
Gly-Ser-Lys-Asn	-4,9	-5,1	-5,4	-5,6	-5,3
Ile-Gly-Trp	-6,2	-5,5	-6,0	-5,6	-5,8
Lys-Tyr-Phe-His-His	-6,3	-5,5	-6,9	-5,6	-6,1
Ser-Ser-Glu-Thr	-5,4	-4,9	-5,0	-5,6	-5,2
Trp-Lys-Asn-Thr	-5,8	-6,3	-6,4	-5,5	-6,0
Tyr-Phe-His-His	-6,8	-6,6	-6,8	-5,9	-6,5
Trp- <i>DTyr</i>	-5,9	-7,0	-7,2	-6,5	-6,7
Phe- <i>DTyr</i>	-6,2	-6,0	-7,0	-6,4	-6,4
Trp-Phe- <i>DTyr</i>	-8,0	-7,2	-8,1	-7,3	-7,7
Phe-Trp- <i>DTyr</i>	-7,3	-7,8	-8,9	-7,2	-7,8

В результате сравнения было выявлено, что трипептиды Phe-Trp-*DTyr* и Trp-Phe-*DTyr* демонстрируют наиболее высокие результаты в ряду предложенных олигопептидов, что может объясняться их составом, включающим только ароматические аминокислоты. Преимущество данных трипептидов обеспечивается лучшим сродством с Fc-фрагментами IgG3 как наиболее предпочтительным по отношению ко второй группе трипептидов, а также возможностью четкого разграничения возможной аффинности к различным подклассам IgG.

Следующим этапом стала проверка гипотезы, согласно которой, изменяя аминокислотный остаток во втором положении в моделируемом трипептиде Phe-Trp-Tyr, можно изменить активность олигопептида к IgG как в общем, так и к его подклассам, в частности. В связи с этим были изготовлены модели трипептидов Phe-Хаа-Tyr, в которых Хаа – остатки аминокислот Arg, Asn, Gln, Glu и His.

Было выявлено, что лиганд Phe-Trp-Tyr может изменить активность олигопептида как в общем к IgG, так и к его подклассам, в частности. В связи с

этим были изготовлены модели трипептидов Phe-Хаа-Tyr, где Хаа – остатки аминокислот Ala, Arg, Asn, Asp, Gln и Gly.

Дополнительно были введены бензильная и метильная группы в качестве дополнительной защиты от протеолиза в трипептидах Phe-Tyr-Tyr и Phe-Asp-Tyr, из которых в результате модификации получили Phe-Tyr(OBzl)-Tyr-OMe и Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe.

Полученные результаты подтверждают правильность выбранных последовательностей аминокислотных остатков в трипептидах Phe-Хаа-DTyr. Созданные на основе аминокислот Ala, Arg, Asn, Asp, Gln и Gly трипептиды показали высокий результат связывания различных подклассов IgG (таблица 3).

Таблица 3 – Энергия связывания лиганд-рецепторных взаимодействий между Fc-фрагментами IgG и аминокислотными лигандами (ккал/моль)

Аминокислотный лиганд	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Среднее значение
Phe-Ala-Tyr	-6,4	-6,6	-7,2	-6,3	-6,6
Phe-Arg-Tyr	-6,0	-6,3	-6,8	-6,2	-6,3
Phe-Asn-Tyr	-6,9	-6,9	-6,9	-6,5	-6,8
Phe-Asp-Tyr	-6,4	-6,9	-7,3	-6,7	-6,8
Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe	-6,8	-6,5	-6,7	-6,1	-6,5
Phe-Gln-Tyr	-6,8	-6,8	-7,1	-6,5	-6,8
Phe-Gly-Tyr	-7,0	-6,7	-6,8	-6,0	-6,6
Phe-Tyr-Tyr	-7,8	-7,4	-7,7	-7,4	-7,6
Phe-Tyr(OBzl)-Tyr-OMe	-7,4	-7,4	-7,3	-6,6	-7,2
Phe-Phe-Tyr	-7,6	-6,2	-7,3	-7,2	-7,1
Phe-Trp-Tyr	-8,0	-7,2	-8,1	-7,3	-7,8

Полученные на основе аминокислот Ala, Arg, Asn, Asp, Gln и Gly трипептиды показали в той или иной степени низкую энергию связывания с различными подклассами IgG в сравнении с результатами энергий связывания трипептидов, созданных на основе активного центра FcγRI, а также в некоторых случаях проявились свойства специфичности. Так, с введением в трипептид Phe-Хаа-DTyr аланина общие показатели связывания упали с -7,8 ккал/моль (для Phe-Trp-DTyr) до -6,6 ккал/моль, однако увеличилась энергия связывания с белком IgG3. Подобные показатели демонстрируют Phe-Gln-DTyr и Phe-Arg-DTyr. Параметры энергии связывания трипептида Phe-Asn-DTyr с подклассами IgG показывают, что после модификации активность к подклассу IgG4 уменьшилась, таким образом увеличив специфичность к остальным трем подклассам. Модифицированный трипептид Phe-Asp-DTyr показывает активность к IgG2 и IgG3. К IgG1 активность демонстрирует трипептид с заменой Gly.

Глава 4 Синтез олигопептидных соединений и создание экспериментальных образцов сорбентов

Обсуждены результаты синтеза пептидных лигандов классическими методами пептидной химии, а также создания экспериментальных образцов сорбентов с использованием полиэтиленовых матриц.

Для получения используемых пептидов разработаны две основные схемы их синтеза с использованием незащищенной карбоксильной группы С-концевой аминокислоты или карбоксила, защищенного этерификацией, с образованием метилового эфира (рисунок 1).

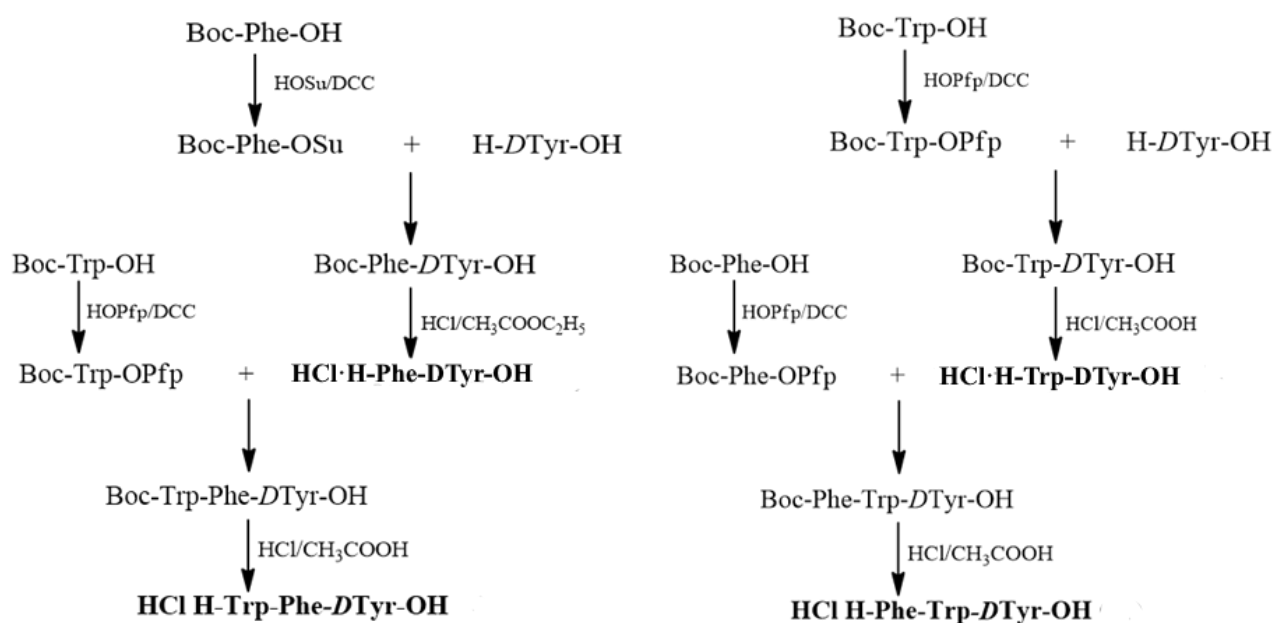
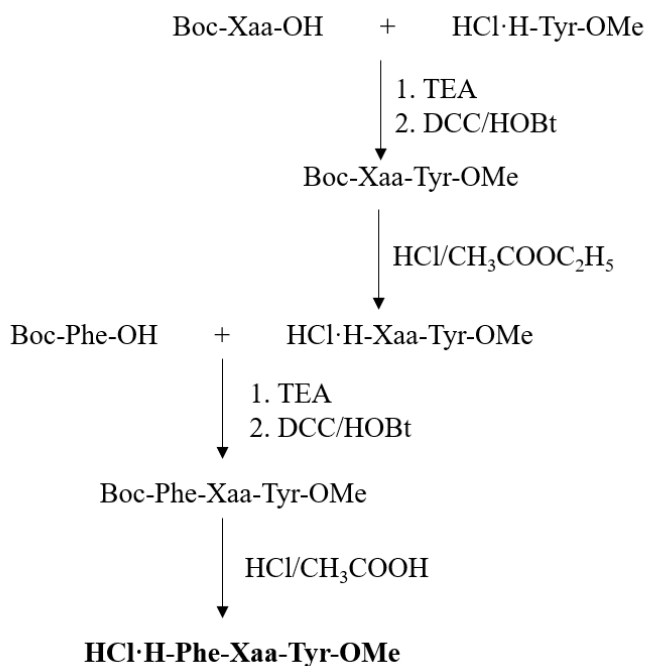


Рисунок 1 – Схемы синтеза Phe-DTyr, Trp-Phe-DTyr, Trp-DTyr и Phe-Trp-DTyr

Синтез дипептида Phe-DTyr осуществляли с применением сукцинимидного эфира Boc-Phe-OH. Синтез дипептида Trp-DTyr проводили с использованием пентафторфенилового эфира Boc-Trp-OH, полученного по методу Кишфалуди. Трипептид Trp-Phe-DTyr был получен с использованием пентафторфенилового эфира триптофана (Trp), который вводили в реакцию с ранее полученным гидрохлоридом Phe-DTyr. Трипептид Phe-Trp-DTyr также был получен с использованием пентафторфенилового эфира фенилаланина (Phe), который вводили в реакцию с ранее полученным гидрохлоридом Trp-DTyr.

Синтез трипептидов последовательности Phe-Xaa-Tyr-OMe проводили с использованием сложного эфира тирозина, α-аминогруппы блокировали третбутилоксикарбонильной защитой. В качестве конденсирующего агента использовали DCC с добавлением HOBT. Дипептиды формулы Boc-Xaa-Tyr-OMe

деблокировали обработкой 4,5 н. раствором HCl в этилацетате и, используя DCC/HOBt-метод, присоединяли Вос-фенилаланин (рисунок 2).



Xaa – Asn, Gln, Asp(OBzl), Ala и Gly

Рисунок 2 – Схема синтеза HCl·H-Phe-Xaa-Tyr-OMe

Таким образом, синтез ди- и трипептидов происходил с высоким выходом, в результате которого получены лиганды для сорбентов. Phe-Trp-DTyr был получен с общим выходом 56%, для Trp-Phe-DTyr, Phe-DTyr, Trp-DTyr выход составил 55%, 69%, 81% соответственно. Phe-Asp(OBzl)-DTyr-OMe был получен с общим выходом 94%, выход Phe-Asn-Tyr-OMe – 80%, Phe-Gln-Tyr-OMe – 94%, для Phe-Ala-Tyr-OMe и Phe-Gly-Tyr-OMe выход составил 94% и 80% соответственно.

Доказательства первичной структуры пептидных соединений были получены путем секвенирования по методу Эдмана.

Для получения экспериментальных образцов сорбентов пептидные лиганды иммобилизовали на матрицу, представляющую собой полиэтиленовые гранулы с привитой акриловой кислотой (прививку проводили радиационным способом). Активацию карбоксильных групп проводили путем образования сукцинимидных эфиров при модификации матрицы N-гидроксисукцинимидом (HOSu) с использованием N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIPC) в качестве конденсирующего агента.

Расчетная концентрация привитых COOH-групп составляла 0,65 ммоль/мл матрицы. Концентрация рассчитывалась по привесу акриловой кислоты после проведения прививания.

Количество привитых лигандов составило от 0,19 до 0,62 ммоль/мл сорбента для аминокислот и от 1,02 до 2,00 мкмоль/мл сорбента для пептидов.

Глава 5 Исследование функциональных свойств экспериментальных образцов сорбентов

Представлены собственные результаты оценки свойств созданных экспериментальных образцов сорбентов, таких как сорбционная емкость, насыщаемость, специфичность сорбента к IgG относительно общего белка и альбумина в плазме крови, специфичность к IgG относительно других классов Ig, специфичность к подклассам IgG.

В результате статических экспериментов были получены данные концентрации общего IgG в контрольных пробах плазмы, а также пробах плазмы, подвергшихся воздействию образцов сорбентов на основе аминокислотных лигандов.

Результаты свидетельствуют о том, что высокую активность проявляют образцы сорбентов на основе аминокислот ароматического ряда (Tyr, Trp, Phe). Количество сорбированного ароматическими аминокислотами общего IgG составляет $8,13 \pm 0,04$, $7,56 \pm 0,85$ и $6,44 \pm 0,28$ мг соответственно.

Следующими в ряду ёмкости идут образцы сорбентов на основе Gly ($6,18 \pm 0,67$ мг общего IgG), а также Gln ($6,07 \pm 1,27$ мг общего IgG). Следует отметить образцы на основе Asp ($5,30 \pm 0,99$ мг общего IgG), Asn ($5,13 \pm 0,30$ мг общего IgG) и Ala ($5,09 \pm 0,80$ мг общего IgG). Ёмкость неактивированных гранул матрицы с отсутствующей на них акриловой кислотой составила $2,59 \pm 0,05$ мг общего IgG. Активированные гранулы матрицы с привитой на них акриловой кислотой сорбировали $4,08 \pm 0,13$ мг общего IgG. Данный факт говорит о том, что привитая акриловая кислота также обладает активностью по отношению к общему IgG. При сравнении обоих результатов сорбционная емкость акриловой кислоты составила 1,04 мг общего IgG. Таким образом, зная емкость гранул матрицы и акриловой кислоты, можно определить емкость самих лигандов. Для ароматических аминокислот емкость составила: Tyr – 4,5 мг сорбированного общего IgG, Trp – 3,93 мг IgG, Phe – 2,81 мг IgG. Для экспериментальных образцов на основе Gly – 2,55 мг сорбированного общего IgG, Gln – 2,44 мг общего IgG. Также следует отметить, что образцы на основе аминокислоты Ala (неполярные), Asn (полярные незаряженные), Asp (полярные отрицательные), Gln (полярные незаряженные) и Gly (неполярные) показали результаты в составе сорбента (в качестве лиганда) – 5,14 (1,58) мг, 5,13 (1,5) мг IgG и 5,3 (1,67) мг сорбированного общего IgG соответственно. Данные аминокислоты были выбраны для дальнейших исследований с той точки зрения, что их сорбционная емкость как лигандов, т.е. без учета емкости матрицы, превышает сорбционную емкость акриловой кислоты как нижнюю границу для емкости лиганда. Таким образом, все шесть отобранных вместе с тирозином, триптофаном и

фенилаланином аминокислот можно рекомендовать для дальнейшего проведения с их участием экспериментов по установлению активности в составе олигопептидов.

На следующем этапе работы были проведены статические эксперименты с участием образцов сорбентов на основе ди- и трипептидов, сродство к IgG которых было подтверждено молекулярным моделированием ранее. Были созданы образцы сорбентов на основе ди- и трипептидов Trp-*D*Tyr, Phe-*D*Tyr Trp-Phe-*D*Tyr, Phe-Trp-*D*Tyr. Результаты экспериментов показали высокую активность образцов.

Сорбционная емкость образца на основе Phe-Trp-*D*Tyr составила $10,16 \pm 0,45$ мг сорбированного общего IgG, остальные образцы показали результаты меньшей активности. Так, образец на базе Phe-*D*Tyr сорбировал $7,20 \pm 0,70$ мг общего IgG, Trp-*D*Tyr – $8,03 \pm 0,64$ мг общего IgG, Trp-Phe-*D*Tyr – $9,26 \pm 0,81$ мг общего IgG/мл сорбента.

Далее была проверена гипотеза, согласно которой во втором положении в трипептиде Phe-Хаа-*D*Tyr может находиться один из предложенных ранее аминокислотных остатков. В результате проведенной модификации трипептидов были получены следующие последовательности: Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe, Phe-Gln-Tyr-OMe и Phe-Gly-Tyr-OMe.

Эксперименты показали, что все образцы показали хорошие результаты связывания. Наибольшей активностью из созданных образцов обладает сорбент на основе трипептида Phe-Gln-Tyr-OMe и Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe. Их сорбционная емкость составила $9,43 \pm 0,32$ и $9,25 \pm 0,33$ мг общего IgG соответственно. Сорбционная емкость других образцов составила: $8,73 \pm 0,50$ мг сорбированного общего IgG для образца Phe-Asn-Tyr-OMe; $8,65$ мг сорбированного общего IgG для образца Phe-Ala-Tyr-OMe и $8,65 \pm 0,30$ мг сорбированного общего IgG для Phe-Gly-Tyr-OMe. При высоких показателях аффинности к общему IgG экспериментальные образцы могут также иметь селективность к определенным подклассам IgG.

Свойства насыщаемости были установлены посредством динамических экспериментов. Цель экспериментов – установить время, за которое происходит насыщение экспериментальных образцов сорбентов и связывание максимального количества общего IgG. Таким образом, получены данные об активности образцов сорбентов.

В ходе динамических стендовых экспериментов были получены данные удельной насыщаемости для трипептидов Phe-Trp-*D*Tyr, Trp-Phe-*D*Tyr, Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe, Phe-Gln-Tyr-OMe и Phe-Gly-Tyr-OMe.

Для образца на основе Phe-Trp-*D*Tyr полное насыщение можно отметить на 36-й минуте эксперимента. Такая же картина динамики характерна для

образца Phe-Gln-Tyr-OMe. Концентрация общего IgG в плазме на 12-й минуте резко сокращается с 9,68 мг/мл до 6,37 мг/мл. Значения концентрации IgG в плазме при воздействии на нее образца на основе Phe-Ala-Tyr-OMe уменьшаются, постепенно достигнув своего максимума на 36-й минуте, и имеют значение 7,28 мг/мл. За период проведения эксперимента над образцом на основе Phe-Asn-Tyr-OMe наблюдалось постепенное снижение концентрации общего IgG до 24-й минуты с заметным скачком, наблюдаемым на 36-й минуте, и дальнейшим медленным спадом к 60-й минуте. Такое же течение сорбции характерно и для образца на основе Phe-Gly-Tyr-OMe. Образец уменьшил количество общего IgG в плазме с 8,20 мг/мл до 6,14 мг/мл. При определении насыщаемости образца на основе Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe концентрация плазмы уменьшалась с 11,16 мг/мл до 6,76 мг/мл на протяжении 36 минут. Начиная с 36-й минуты, до конца эксперимента наблюдается повышение концентрации с 6,76 мг/мл до 7,45 мг/мл.

Таким образом, учитывая все вышеописанное, можно сделать вывод, что сорбенты проявляют должную активность по отношению к общему IgG. Процесс сорбции у образцов на основе Phe-Trp-DTyr и Phe-Gln-Tyr-OMe проходит лавинообразно вначале и выравнивается уже к середине отведенного времени, остальные же образцы демонстрируют неспешный темп сорбции на большем отрезке времени, что позволяет предположить различные сценарии использования всех образцов сорбентов.

Свойства емкости были установлены посредством расчета данных количеств, полученных в ходе динамических экспериментов, и расчетов максимального количества сорбированного общего IgG на 1 г сорбента.

Количество сорбированного общего IgG образцом на основе Phe-Trp-DTyr составило 202,6 мг, или 50,65 мг/г, сорбента, для образцов на основе Trp-Phe-DTyr – 12,51 мг/г, Phe-Gln-Tyr-OMe – 33,1 мг/г, Phe-Asn-Tyr-OMe – 30,32 мг/г, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe – 32,43 мг/г, Phe-Ala-Tyr-OMe – 20,91 мг/г, Phe-Gly-Tyr-OMe – 18,22 мг/г.

Для определения селективности образцов сорбентов к IgG и другим классам Ig проводились статические эксперименты с использованием иммуноферментного анализа. Дальнейшая характеристика свойствам специфичности давалась на основе сравнения количества сорбированного класса Ig к сорбированному общему IgG.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов выявлено, что селективность образцов к IgG находится в пределах от 60,34 до 75,94%, что является показателем высокой селективности.

Были получены данные специфичности образцов к классам Ig, таким как IgE и IgM. В результате проведенных статических экспериментов было выявлено, что сорбционные свойства экспериментальных образцов сорбентов к

IgM низкие, в пределах от 0,73 мг/мл до 2,46 мг/мл при общем количестве IgM в контрольной плазме, составляющем 10,91 мг/мл, что составляет от 6,7 до 24,1%.

Установлено, что концентрация IgE в 1 мл контрольной плазмы составляла 64,49 МЕ. Образцами Phe-Asn-Tyr-OMe и Phe-DTyr сорбировано наименьшее количество IgE (3,33% и 9,04% соответственно), что показывает почти полное отсутствие активности в отношении IgE. Образцы на основе Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe и Trp-Phe-DTyr сорбировали наибольшее количество IgE (23,1% и 20,6% соответственно).

Расчетные данные селективности к альбуминовой фракции свидетельствуют о том, что образцы проявляют низкую активность к альбумину, а селективность образцов составляет от 1,87% (Phe-Trp-DTyr) до 10,43% (Phe-Asn-Tyr-OMe).

Свойство специфичности экспериментальных образцов к подклассам IgG является наиболее важным свойством, определяющим дальнейший подход в использовании в медицине, биохимии, а также других целевых направлениях.

Анализ контрольной плазмы выявил следующий состав по подклассам: IgG1 – 7,46 мг/мл, IgG2 – 0,70 мг/мл, IgG3 – 2,27 мг/мл, IgG4 – 1,47 мг/мл.

Выявлено, что к IgG1 проявляют наиболее высокую активность образцы на основе Phe-Trp-DTyr и Phe-Gln-Tyr-OMe (67,36% и 86,53%) при том, что остальные образцы практически к нему неактивны (0,03% – 5,31%), что говорит как о специфичности данных образцов к IgG1, так и о том, что IgG1 имеет наибольшую концентрацию в пуле иммуноглобулинов G. Образцы на основе Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe, Trp-Phe-DTyr проявляют высокую активность к IgG2, низкую к IgG3 и практически не проявляют активности к IgG1 и IgG4, что дает возможность отнести их к IgG2-специфичным сорбентам. Наибольшую активность к IgG3 проявляют образцы на основе Phe-Trp-DTyr и Phe-Gln-Tyr-OMe (59,52% и 58,47%), что дает возможность предложить эти образцы в качестве IgG3-сорбентов. Также образец на основе Phe-Trp-DTyr, как и образец на основе Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe, проявляет высокую активность к IgG4 (55,05% и 42,9%).

Сравнительный анализ степени прочности связывания полученных экспериментальных моделей сорбентов с мировыми аналогами показал, что существующее на данный момент множество как экспериментальных, так и выведенных на рынок сорбентов показывает различные подходы к достижению главной цели – высокого результата в связывании IgG. Стоит отметить, что разные подходы к разработке селективных сорбентов приводят к наличию различных систем со своими особенностями.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что созданные экспериментальные образцы сорбентов превосходят имеющиеся на данный момент аналоги как экспериментальные, так и выведенные на рынок.

Превосходство, в основном, обеспечивается за счет сорбционной емкости экспериментальных образцов, их селективности к общему IgG.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Методом молекулярного моделирования взаимодействий аминокислот и Fc-фрагментов IgG выявлены аминокислоты ароматического ряда (Tyr, Trp, Phe), обладающие высоким сродством к IgG. На основе результатов молекулярного моделирования были созданы лиганды: Phe-Trp-DTyr, Trp-Phe-DTyr, а также олигопептиды формулы Phe-Xaa-Tyr, в которых Xaa – аминокислота Ala, Asn, Asp, Gln, Gly с высоким сродством к Fc-фрагментам различных подклассов IgG [1-A, 5-A, 6-A, 12-A].

2. С применением классических методов пептидной химии разработаны оригинальные схемы синтеза новых пептидов Phe-Trp-DTyr, Trp-Phe-DTyr, и трипептидов общей формулы Phe-Xaa-Tyr-OMe, в которых Xaa – аминокислота Ala, Asn, Asp(OBzl), Gln, Gly, а также дипептидов Phe-DTyr, Trp-DTyr, и проведен синтез этих пептидов с выходом 64-94%. На основе аминокислот, а также ди- и трипептидных лигандов с использованием модифицированных полиэтиленовых матриц созданы экспериментальные образцы сорбентов [2-A, 3-A, 14-A].

3. Созданные экспериментальные образцы сорбентов на основе трипептидных лигандов показали высокие результаты связывания общего IgG из плазмы крови. Установлена высокая предельная насыщаемость образцов сорбентов на основе трипептида Phe-Trp-DTyr, а также олигопептидов формулы Phe-Xaa-Tyr-OMe, в которых Xaa – аминокислота Ala, Asn, Asp(OBzl), Gln, Gly. Выявлена высокая сорбционная емкость сорбентов (12,51-50,65 мг IgG/г сорбента), высокая селективность к общему IgG (от 60,34 до 75,94%), достаточно низкая селективность к IgM (в пределах от 6 до 20%), очень низкая к IgE (в пределах от 3 до 24%), низкая селективность к общему белку (от 6,07 до 11,42%) и к альбумину (от 1,87 до 10,43%) [1-A – 4-A, 7-A – 9-A, 10-A – 13-A, 15-A].

4. Показана, что к IgG1 имеет наиболее высокую селективность образец на основе Phe-Gln-Tyr-OMe (86,53%), к IgG2 имеют селективность образцы на основе Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe и Trp-Phe-DTyr (60,20%, 46,79% и 55,06% соответственно), к IgG3 – образцы на основе Phe-Trp-DTyr и Phe-Gln-Tyr-OMe (59,52% и 58,47% соответственно), к IgG4 – образцы на основе Phe-Trp-DTyr и Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe (55,05% и 42,9% соответственно). Образец на основе Phe-Trp-DTyr не имеет четко выявляемой селективности к подклассам IgG [4-A].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Для практического использования в медицине, ветеринарии, биохимии и биоорганической химии представляют интерес новые образцы сорбентов на основе лигандов Phe-Trp-*D*Tyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe, Trp-Phe-*D*Tyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe для избирательного удаления общего IgG и его подклассов из биологических жидкостей, а также эффективный метод их получения.

Разработанные эффективные методы поиска лигандов, заключающиеся в комплексном применении молекулярного моделирования и химического синтеза, могут использоваться для дальнейших исследований и подбора соединений, обладающих высокой активностью к белкам-мишеням.

Полученные результаты могут быть использованы для учебных и методических программ высшей школы.

Результаты работы защищены патентом Республики Беларусь.

Опытные образцы сорбентов на основе олигопептидов для удаления IgG из биологических жидкостей, полученные в результате исследований, использовались в деятельности научно-исследовательской лаборатории производственной трансфузиологии ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» и показали свою эффективность.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1-А. Молекулярный докинг лигандов, перспективных для сорбции IgG, из биологических жидкостей / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, В. П. Голубович // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 1. – С. 88–95.

2-А. Селективность аффинных сорбентов на основе ароматических пептидов для связывания иммуноглобулинов класса G / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, В. П. Голубович // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 333–338.

3-А. Тестирование экспериментальных образцов сорбентов на основе ароматических пептидов / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, В. П. Голубович // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 456–472.

4-А. Оценка свойств селективности сорбентов для связывания IgG на основе трипептидных лигандов / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, В. П. Голубович, А. Г. Мойсеёнок // Доклады Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 309–315.

Статьи в сборниках материалов научных конференций:

5-А. **Пустюльга, Е. С.** Поиск и оценка функциональных качеств лигандов сорбентов на основе ароматических аминокислот при связывании IgG из биологических жидкостей / **Е. С. Пустюльга**, Е. М. Ермола, В. П. Голубович // Биохимия и молекулярная биология. Вып. 2 : Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм: Междунар. науч.-практ. конф. / Ин-т биох. биол. активн. соед. НАН Беларуси ; под ред. И. Н. Семенени (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2018. – С. 132–135.

6-А. **Пустюльга, Е. С.** Поиск лигандов сорбентов для извлечения IgG из биологических жидкостей / **Е. С. Пустюльга**, Е. М. Ермола // Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : 2-й Междунар. биохим. конгресс: Междунар. науч.-практ. конф. / Ин-т биох. биол. активн. соед. НАН Беларуси ; под ред. И. Н. Семенени (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2018. – С. 482–487.

7-А. Возможности применения сорбентов к иммуноглобулинам класса G и M в лечении больных алкогольной и наркотической зависимостью / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, А. Н. Лапко, В. П. Голубович // Актуальные медико-биологические проблемы алкогольной и других химических зависимостей : Междунар. науч.-практ. конф. / Ин-т биох. биол. активн. соед. НАН Беларуси ; под ред. И. Н. Семенени (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2019. – С. 160–165.

8-А. Исследование свойств активности и селективности сорбентов на основе пептидных лигандов / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, А. Н. Лапко, В. П. Голубович // Биотехнология: достижения и перспективы

развития : сб. материалов IV Междунар. науч.-практ. конф. / ПолесГУ ; под ред. К. К. Шебеко (гл. ред.) [и др.]. – Пинск, 2019. – С. 93–96.

9-А. Оценка свойств насыщаемости и емкости сорбентов для связывания IgG на основе трипептидных лигандов / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, В. П. Голубович, А. Г. Мойсеёнок // Биологически активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности : Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 5-6 окт. 2021 г. / Ин-т биох. биол. активн. соедин. НАН Беларуси ; редкол.: И. Н. Семененя (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2021. – С. 398–401.

Тезисы докладов конференций:

10-А. **Пустюльга, Е. С.** Теоретический поиск лигандов сорбента для связывания IgG1 из биологических жидкостей / Е. С. Пустюльга, В. П. Голубович // Молодежь в науке – 2017 : XIV Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 30 окт. - 2 нояб. 2017 г. / Нац. акад. наук Респ. Беларусь ; под ред. В. Г. Гусакова (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – С. 320.

11-А. Результаты стендового эксперимента с сорбентами на основе пептидных лигандов для удаления IgG из биологических жидкостей / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, А. Н. Лапко, В. П. Голубович, В. В. Кирковский // Белорусские лекарства : Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 10-11 окт. 2019 г. / Ин-т биоорг. хим. НАН Беларуси. – Минск, 2019. – С. 126–129.

12-А. **Пустюльга, Е. С.** Разработка пептидных лигандов сорбентов к IgG методом молекулярного докинга / Е. С. Пустюльга // Молодежь в науке – 2019 : XVI Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 14-17 окт. 2019 г. / Нац. акад. наук Респ. Беларусь ; под ред.: В. Г. Гусакова (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2019. – С. 555.

13-А. **Пустюльга, Е. С.** Свойства сорбционной емкости аффинных сорбентов для избирательного удаления IgG из биологических жидкостей / Е. С. Пустюльга // Молодежь в науке – 2020 : XVII Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 22-25 сент. 2020 г. / Нац. акад. наук Респ. Беларусь ; под ред. В. Г. Гусакова (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2020. – С. 539–541.

14-А. **Пустюльга, Е. С.** Подтверждение структуры пептидных лигандов сорбентов путем секвенирования по эдману жидкостей / Е. С. Пустюльга, В. П. Голубович // Белорусские лекарства : Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23-25 нояб. 2022 г. / Ин-т биоорг. хим. ; под общ. ред.: Е. Н. Калиниченко. – Минск, 2022. – С. 185–187.

Заявки на выдачу патента РБ:

15-А. Аффинный сорбент для избирательного связывания иммуноглобулинов класса G человека : пат. ВУ 23532 / **Е. С. Пустюльга**, О. В. Грибовская, Е. М. Ермола, В. П. Голубович. – Оpubл. 30.10.2021.



РЕЗЮМЕ

Пустюльга Егор Сергеевич

Моделирование олигопептидных лигандов, синтез и создание на их основе новых биоспецифических сорбентов для связывания иммуноглобулинов класса G

Ключевые слова: сорбция, сорбенты, аутоиммунные заболевания, иммуноглобулины, подклассы, белки, олигопептиды, лиганды, сорбционная емкость, специфичность, селективность.

Цель работы: разработать на основе синтезированных олигопептидов новые биоспецифические сорбенты для связывания иммуноглобулинов класса G и их подклассов из биологических жидкостей.

Методы исследования: молекулярный докинг, ИФА, синтез пептидов.

Объекты исследования: лиганды, имеющие высокую степень сродства к иммуноглобулинам класса G, экспериментальные образцы сорбентов, изготовленные на их основе.

Предмет исследования: сродство лигандов и активность сорбентов на их основе к иммуноглобулинам класса G, сорбционные свойства разработанных сорбентов.

Полученные результаты и их новизна: установлены закономерности свойств лигандов, состоящих из трех аминокислот N-Phe-Trp-Tyr, где во втором положении может находиться аминокислота (Ala, Asn, Asp(OBzl), Gln, Gly), определяющая тенденцию к связыванию с общим иммуноглобулином класса G и его подклассами, а также селективность. Проведена сравнительная характеристика параметров селективности и функциональных показателей полученных опытных образцов сорбентов в отношении иммуноглобулинов G. Осуществлена оценка взаимодействия полученных экспериментальных сорбентов с различными классами иммуноглобулинов методом стендовых испытаний на биологических жидкостях с варьирующимся уровнем антител.

Рекомендации по использованию: образцы сорбентов на основе лигандов Phe-Trp-DTyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Ala-Tyr, Phe-Asn-Tyr, Trp-Phe-DTyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Asp(OBzl)-Tyr-OMe рекомендуются для избирательного удаления общего IgG и его подклассов из биологических жидкостей.

Область применения: медицина, ветеринария, биология, биохимия, биоорганическая химия.

РЭЗІЮМЭ

Пустюльга Ягор Сяргеевіч

Мадэляванне алігапептыдных лігандаў, сінтэз і стварэнне на іх аснове новых біяспецыфічных сарбентаў для звязвання імунаглабулінаў класа G

Ключавыя словы: сорбцыя, сарбенты, аутаімунныя захворванні, імунаглабуліны, падкласы, бялкі, алігапептыды, ліганды, сарбцыйная ёмістасць, спецыфічнасць, селектыўнасць.

Мэта работы: распрацаваць на аснове сінтэзаваных алігапептыдаў новыя біяспецыфічныя сарбенты для звязвання імунаглабулінаў класа G і іх падкласаў з біялагічных вадкасцяў.

Метады даследавання: малекулярны докінг, ІФА, сінтэз пептыдаў.

Аб'екты даследавання: ліганды, якія маюць высокую ступень роднасці да імунаглабулінаў класа G, эксперыментальныя мадэлі сарбентаў, вырабленыя на іх аснове.

Прадмет даследавання: актыўнасць лігандаў і сарбентаў на іх аснове да імунаглабулінаў класа G, сарбцыйныя ўласцівасці распрацаваных сарбентаў.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: устаноўлены заканамернасці ўласцівасцяў лігандаў, якія складаюцца з трох амінакіслот N-Phe-Trp-Tyr, дзе ў другім становішчы можа знаходзіцца амінакіслата (Ala, Asn, Asp(OBzl), Gln, Gly), якія вызначаюць тэндэнцыю да звязвання з агульным імунаглабулінам класа G і іх падкласамі, а таксама селектыўнасць. Праведзена параўнальная характарыстыка параметраў селектыўнасці і функцыянальных паказчыкаў, атрыманых вопытных узораў сарбентаў ў дачыненні да імунаглабулінаў G. Ажыццёўлена адзнака ўзаемадзеяння атрыманых эксперыментальных сарбентаў з рознымі класамі імунаглабулінаў метадам стэндавых выпрабаванняў на біялагічных вадкасцях з узроўнем антыцелаў, які вар'іруецца.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: узоры сарбентаў на аснове лігандаў Phe-Trp-DTyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe, Trp-Phe-DTyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe рэкамендуюцца для выбарчага выдалення агульнай IgG і яго падкласаў з біялагічных вадкасцяў.

Галіна выкарыстання: медыцына, ветэрынарыя, біялогія, біяхімія, біяарганічнай хімія.

SUMMARY

Pustylga Yegor Sergeevich

Modeling of oligopeptide ligands, synthesis and creation on their basis of new biospecific sorbents for binding class G immunoglobulins

Key words: adsorption, sorbents, autoimmune diseases, immunoglobulins, subclasses, proteins, oligopeptides, ligands, adsorption capacity, specificity, selectivity.

The aim of the research: develop new biospecific sorbents based on the synthesized oligopeptides for binding class G immunoglobulins and their subclasses from biological fluids.

Methods of investigation: molecular docking, ELISA, peptide synthesis.

The object of the research: ligands with a high degree of affinity for class G immunoglobulins, experimental samples of sorbents made on their basis.

The subject of the research: activity of ligands and sorbents based on them to class G immunoglobulins, sorption properties of the developed sorbents.

Obtained results and their novelty: the regularities of the properties of ligands consisting of three amino acids N-Phe-Trp-Tyr were established, where an amino acid (Ala, Asn, Asp, Gln, Gly) can be located in the second position, which determine the tendency to bind to the total immunoglobulin of the class G and its subclasses, as well as selectivity. A comparative characteristic of the selectivity parameters and functional parameters of the obtained experimental samples of sorbents in relation to immunoglobulins G. The interaction of the obtained experimental sorbents with different classes of immunoglobulins was assessed by the method of bench tests on biological fluids with varying levels of antibodies.

Application guidelines: new sorbent samples based on ligands: Phe-Trp-DTyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Ala-Tyr, Phe-Asn-Tyr, Trp-Phe-DTyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe are of recommended to be used for selective removal of total IgG and its subclasses from biological liquids.

Fields of application: medicine, veterinary medicine, biology, biochemistry, bioorganic chemistry.

Подписано в печать 16.05.2023.
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 1,22. Тираж 60 экз. Заказ № 168.

ФТИ НАН Беларуси.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/12 от 21.11.2013.
220084, ул. Академика Купревича, 10, г. Минск.

