

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ФГАНУ
«Федеральный научный центр
исследований и разработки
иммунобиологических препаратов»
(Институт полиомиелита)
академик РАН, профессор, д.м.н.



А.А. Ишмухаметов

«*Ишмухаметов*» 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного автономного научного учреждения
«Федеральный научный центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита)

Диссертация Козловской Любови Игоревны на тему: «Фенотип-направленный анализ противовирусной активности потенциальных лекарственных препаратов в отношении РНК-содержащих вирусов», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология» выполнена в лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

В период подготовки диссертации соискатель Козловская Любовь Игоревна с 2013 г. по настоящее время работает заведующим лабораторией полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом (с 2013 г. в ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН», а с 2016 г. после объединения Института и производства в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Кроме того, с 2020 г. Козловская Л.И. руководит отделом актуальных и вновь возникающих инфекций с пандемическим потенциалом.

В 2007 году Козловская Л.И. окончила Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (присуждена квалификация биохимика по специальности «биохимия»). В том же году она поступила в очную академическую аспирантуру ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных

энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН» по специальности 03.02.02. - «Вирусология». Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - «Вирусология» на тему: «Гликозаминогликан-связывающие варианты вируса клещевого энцефалита» Козловская Л.И. успешно защитила в 2010 году в диссертационном совете, созданном на базе ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН».

Научный консультант – Ишмухаметов Айдар Айратович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность работы

Разработка лекарств — это рискованный, дорогостоящий и трудоёмкий процесс, зависящий от междисциплинарных методов создания безопасных и эффективных препаратов. Существуют два принципиально различных подхода к поиску лекарств: мишень-направленный (Target-Based Discovery (TDD)) и фенотип-направленный (Phenotype-Based Discovery (PDD)). Мишень-направленный подход сосредоточен на конкретных молекулярных мишенях, определяющих течение заболевания, тогда как фенотипический подход рассматривает условия развития признаков (фенотипа) заболевания и способы его предотвращения. Фенотип заболевания при этом подразумевает совокупность изменений нормальных клеточных процессов, происходящих при развитии патологии, которую можно описать и количественно оценить.

Прогресс в молекулярной и клеточной биологии, генетике и связанных с ними технологий, ознаменовавший начало XXI века, открыл возможность непосредственного изучения влияния низкомолекулярных соединений на функции конкретных белков. Однако прошедшие десятилетия показали, что TDD имеет свои ограничения ввиду множества факторов, лежащих в основе патогенеза заболевания, в том числе низкой исследованности мишеней, слабого понимания механизма их функционирования при патологии и плохой корреляции модельных систем с заболеваниями человека. При этом даже в годы активного развития и использования TDD, PDD успешно применяли для поиска терапии сложных заболеваний с ограниченным пониманием механизма. Прогресс в области создания клеточных моделей, технологий детекции и изучения механизма действия (Mechanism of Action, MoA) способствовал

возрождению фенотипических стратегий поиска новых лекарственных средств и эволюции PDD как нового научного направления, которое предполагает тестирование большого количества соединений в системном подходе с использованием независимого от конкретной молекулярной мишени метода анализа, который отслеживает фенотипические изменения. Новое понимание фенотипического подхода требует создания своих методов и технологий, в том числе, разработки новых модельных систем и методик оценки изменения фенотипических признаков развития заболевания. Более того, современный фенотипический подход позволяет не только находить новые лекарственные препараты, но и новые мишени и ассоциированные с ними сигнальные пути, вовлечённые в развитие патологического процесса. PDD обладает более высоким потенциалом трансляции результатов в клиническую практику, чем мишень-ориентированные подходы, ввиду обычно большей биологической релевантности фенотипических модельных тест-систем, которые включают всю сложность клеточных структур и сигнальных путей и позволяют оценивать исследуемые соединения в контексте полноценно функционирующей клетки.

В современной классификации вирусов выделяют более одиннадцати тысяч видов, среди которых более двух сотен представляют собой РНК-содержащие вирусы, ассоциированные с заболеваниями человека. Несмотря на значительный прогресс в разработке противовирусных лекарственных средств, на сегодняшний день всего лишь для пары десятков вирусных инфекций применяется специфическая терапия. Мутации и появление новых вариантов давно известных вирусов, а также вспышки вирусных инфекций, вызываемых малоизученными вирусами, делают разработку новых противовирусных препаратов актуальной задачей. Более того, быстрое распространение новых вирусных инфекций по миру, продемонстрированное на примерах лихорадки Зика и пандемии COVID-19, стимулирует поиск новых соединений, обладающих широким спектром противовирусной активности. С одной стороны, это обосновано экономически, поскольку разработка специфических препаратов для лечения десятков вирусных инфекций требует значительных ресурсов. С другой стороны, такие препараты могут быть первым вариантом выбора для противодействия новым, пока неизвестным инфекциям.

В настоящее время активно проводятся исследования по поиску противовирусных препаратов, однако существует ряд проблем. Значительная часть накопленных данных относится к семействам *Retroviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae* и *Coronaviridae*, что объясняется принадлежностью к ним наиболее изученных видов вирусов: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вируса гепатита С, вируса гриппа А и нового вируса SARS-CoV-2. С другой стороны, информация об активности неравномерно распределена по химическим классам соединений.

Как правило, наиболее изученными являются известные лекарственные препараты и их аналоги.

Таким образом, требуется расширение знаний о спектрах активности известных соединений против различных вирусов, поиск новых классов химических соединений и определение их противовирусной активности, а также целенаправленный поиск противовирусных препаратов широкого спектра действия, которые могли бы быть использованы для противостояния новым вирусным угрозам.

При поиске противовирусных соединений во многих случаях фенотипический подход предпочтителен ввиду отсутствия знаний о конкретных мишенях и молекулярных особенностях развития патогенеза вирусной инфекции. Наиболее прямым способом поиска новых противовирусных соединений является скрининг противовирусной активности в интактных клетках против инфекционного вируса по фенотипическим признакам развития вирусной инфекции, например, гибель клеток или синтез вирусных белков и геномов. Этот подход даёт возможность определить эффективность ингибирования репродукции вируса в целом, без фиксации на конкретных стадиях вирусного репликативного цикла и белковых мишенях.

Для оценки применимости методики фенотипического исследования противовирусной активности необходимо провести валидацию методики с использованием известных ингибиторов репродукции. Наиболее адекватным контролем для такой оценки могут стать нейтрализующие противовирусные антитела, а уже затем соединения широкого спектра действия. Валидированную таким образом методику можно использовать для поиска новых противовирусных соединений.

Для описания активности соединения и перспективности его дальнейшего исследования чаще всего используют следующие характеристики: полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}), то есть концентрация соединения, которая оказывает целевой эффект на уровне 50% от максимального; полумаксимальная токсическая концентрация (CC_{50}), то есть концентрация соединения, которая приводит к токсическому эффекту на уровне 50% от максимального, а также их соотношение – индекс селективности (selectivity index, SI) или терапевтический индекс, который определяется как отношение между концентрацией лекарственного средства, вызывающей терапевтический эффект, и концентрацией этого же средства, при которой наблюдается первый побочный эффект. Методики, используемые в различных лабораториях, позволяют получить значения вышеописанных характеристик для активных соединений. Однако, часто значения, полученные разными лабораториями, сильно отличаются ввиду различий в условиях проведения экспериментов. Следовательно, требуется изучение параметров используемых

методов фенотипического тестирования противовирусной активности и разработка подходов к их сравнению.

Для наиболее полного описания активных соединений и отбора соединений-лидеров для дальнейшего исследования, и возможного введения их в клиническую практику, требуется разработка последовательного процесса поиска противовирусных соединений. Такой процесс может быть основан на нескольких фенотипических методиках и должен включать следующие стадии: отбор активных соединений-хитов из большой библиотеки, определение количественных показателей их активности и изучение механизма действия, исследование соотношений структура-активность (Structure-Activity Relationship, SAR) для дизайна наиболее активных и низкотоксичных соединений, которые в итоге должны приводить к выбору молекулы или серии лидера для дальнейшей разработки.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Автором проведен анализ научной литературы, осуществлено планирование этапов исследования и разработка протоколов экспериментов, а также лично или под его руководством выполнены лабораторные исследования. Автором лично проведена систематизация и статистическая обработка экспериментальных данных с последующей их визуализацией для подготовки к печати публикаций и написания диссертации. Вклад автора заключается в непосредственной разработке методик фенотипического скрининга, проведения оценки активности соединения от времени добавления и оценки вирулицидной активности соединений различных химических классов против рассматриваемых вирусов и проведения их валидации, а также внедрение в лабораторную практику для поиска новых противовирусных лекарственных средств.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов определяется повторностью экспериментов и большим набором экспериментальных данных, использованием статистических методов и современного программного обеспечения для обработки результатов проведенных экспериментов.

Работа по поиску ингибиторов репродукции энтеровирусов была удостоена диплома 1-й степени конкурса молодых учёных Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Научная поддержка противоэпидемических мер в здравоохранении: проблемы и решения», посвящённая 100-летию создания НИИЕМ, Нижний Новгород, Россия, 11-12.09.2019 г.

Научная новизна

Впервые разработаны и валидированы методики фенотипического скрининга низкомолекулярных ингибиторов репродукции вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ), Повассан (ПОВ) и омской геморрагической лихорадки (ВОГЛ) семейства *Flaviviridae*; вируса Чикунгунья семейства *Togaviridae* и вируса SARS-CoV-2 семейства *Coronaviridae*.

Впервые выявлены низкомолекулярные ингибиторы переносимых клещами ортофлавириусов путём фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro*.

Впервые проведено сравнение количественных показателей противовирусной активности, полученных с использованием различных методик фенотипического скрининга *in vitro*.

Разработаны подходы к стандартизации параметров методик фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* в отношении литических РНК-содержащих вирусов.

Теоретическая и практическая значимость

Разработаны, апробированы и внедрены в лабораторную практику методы для фенотипического скрининга противовирусной активности соединений, начального определения механизма их действия и оценки вирулицидной активности в отношении различных возбудителей социально значимых инфекционных заболеваний (переносимых клещами вирусами семейства *Flaviviridae*; вирус Чикунгунья семейства *Togaviridae*; SARS-CoV-2 семейства *Coronaviridae*; энтеровирусов видов А, В и С семейства *Picornaviridae*; ВИЧ-1 семейства *Retroviridae*), которые могут быть использованы для разработки противовирусных профилактических и/или лекарственных препаратов. Разработанные методики позволяют выявлять молекулы с противовирусной активностью, определять количественные показатели активности и цитотоксичности, проводить анализ соотношений структура–активность (SAR) для серии активных молекул и выявлять стадию вирусного цикла, на которую действует соединение-ингибитор.

Эффективность разработанных методик фенотипической оценки противовирусной активности подтверждена выявлением новых низкомолекулярных ингибиторов репродукции представителей родов *Orthoflavivirus*, *Enterovirus*, *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), *Alphavirus* и *Lentivirus*.

Разработанные методики фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* позволяют проанализировать от 300 до 2500 соединений в одном эксперименте без применения роботизированных технологий. А также

могут стать основой для разработки автоматизированных систем для высокоэффективного скрининга.

Выявлены параметры фенотипического определения противовирусной активности *in vitro*, влияющие на результаты исследования: метод оценки, характеристики вируса (штамм, доза) и вирусного препарата.

Проведено сравнение параметров методик фенотипического анализа противовирусной активности с разными способами оценки ингибирования репродукции вируса и показано, что количественные показатели активности, полученные в одинаковых условиях, статистически достоверно не различаются:

- в реакциях ингибирования бляшкообразования и фокусообразования вируса клещевого энцефалита;
- в реакциях ингибирования, энтеровирус-индуцированного ЦПД с расчётом показателя методом Кербера и по метаболизму резазурина с расчётом показателя методом аппроксимации нелинейной функцией;
- в реакциях ингибирования, вирус-индуцированного ЦПД и бляшкообразования вируса Чикунгунья, при этом значения в тесте ингибирования бляшкообразования всегда ниже.

Предложена схема поиска потенциальных лекарственных препаратов против РНК-содержащих вирусов на основе комбинации фенотипических методик определения противовирусной активности и токсичности *in vitro* с выявлением соединений-лидеров для последующего исследования в доклинических и клинических испытаниях.

Научная специальность, которой соответствует диссертация

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. – «Вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют пункту 10: Разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии – паспорта специальности.

Внедрение полученных результатов исследования в практику

С использованием разработанных методик фенотипической оценки противовирусной активности низкомолекулярных соединений показана активность производных изоксазолов в ингибировании репродукции вирусов, относящихся к роду *Orthoflavivirus*, и получен патент №2733945 «Замещённые изоксазолы, композиции на их основе, обладающие противовирусной активностью, и способ их применения».

Последовательности геномов штаммов SARS-CoV-2, полученные в ходе работы, были депонированы в базы данных GISAID и VGenBank.

Апробированные при проведении исследований методические подходы внедрены в научную и педагогическую работу по обучению дисциплине «Вирусология» студентов по направлению подготовки Биотехнология/Биоинформатика ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) и в аспирантуре по специальности 1.5.10. – «Вирусология» в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 37 научных работах, из них работ, опубликованных согласно Перечню рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК) – 37, в том числе работ в научных изданиях, индексируемых базами Scopus и/или Web of Science – 34. Получено патентов на изобретение в РФ – 1.

Доля личного участия в получении, обобщении, анализе и интерпретации вирусологических экспериментальных данных 95 %.

Основные научные результаты диссертации достаточно полно отражены в следующих опубликованных статьях:

- Kozlovskaya L.I., Golinets A.D., Eletskaia A.A., Orlov A.A., Palyulin A.V., Kochetkov S.N., Alexandrova L.A., Osolodkin D.I. Selective inhibition of Enterovirus A species members' reproduction by furano[2, 3-d]pyrimidine nucleosides revealed by antiviral activity profiling against (+)ssRNA viruses. *Chemistry Select* 2018;3:2321-2325.
- Kozlovskaya L., Pinaeva A., Ignatyev G., Selivanov A., Shishova A., Kovpak A., Gordeychuk I., Ivin Y., Berestovskaya A., Prokhortchouk E., Protsenko D., Rychev M., Ishmukhametov A. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;99:40-46.
- Kozlovskaya L.I., Volok V.P., Shtro A.A., Nikolaeva Y.V., Chistov A.A., Matyugina E.S., Belyaev E.S., Jegorov A.V., Snoeck R., Korshun V.A., Andrei G., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Aralov A.V. Phenoxazine nucleoside derivatives with a multiple activity against RNA and DNA viruses. *Eur J Med Chem.* 2021;220:113467.

- Chistov A.A., Chumakov S.P., Mikhnovets I.E., Nikitin T.D., Slesarchuk N.A., Uvarova V.I., Rubekina A.A., Nikolaeva Y.V., Radchenko E.V., Khvatov E.V., Orlov A.A., Frolenko V.S., Sukhorukov M.V., Kolpakova E.S., Shustova E.Y., Galochkina A.V., Streshnev P.P., Osipov E.M., Sapozhnikova K.A., Moiseenko A.V., Brylev V.A., Proskurin G.V., Dokukin Y.S., Kutyaakov S.V., Aralov A.V., Korshun V.A., Strelkov S.V., Palyulin V.A., Ishmukhametov A.A., Shirshin E.A., Osolodkin D.I., Shtro A.A., Kozlovskaya L.I., Alferova V.A., Ustinov A.V. 5-(Perylen-3-ylethynyl)uracil as an antiviral scaffold: Potent suppression of enveloped virus reproduction by 3-methyl derivatives in vitro. *Antiviral Res.* 2023;209:105508.

Результаты диссертации представлены на международных и всероссийских научных конференциях, форумах, в том числе на XXII International Symposium in Medicinal Chemistry ChemMedChem, Берлин, Германия, 2-6 сентября 2012 г. и 4th Antivirals congress, Sitges, Barcelona, Spain, 18-21 сентября 2016 г.

Общее заключение

Диссертация Козловской Любови Игоревны на тему: «Фенотип-направленный анализ противовирусной активности потенциальных лекарственных препаратов в отношении РНК-содержащих вирусов» является завершенным научно-квалификационным исследованием, в котором на основании выполненных автором задач решена научная проблема поиска лекарственных препаратов на основании фенотипического анализа оценки активности соединений *in vitro* против вирусов вызывающих социально-значимые заболевания, включая COVID-19. Сведения полученные соискателем, обоснованы и имеют важное научное и практическое значение. Основные научные положения, выводы и практические рекомендации полностью отражают объем выполненного исследования. В диссертации изложены новые научно обоснованные решения, внедрение которых в практику здравоохранения позволит в значительной степени уменьшить тяжесть социально-экономических последствий, связанных с заболеваемостью вирусными инфекциями, сопровождающимися нередко летальным исходом.

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, и свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку.

Диссертация Козловской Любови Игоревны на тему: «Фенотип-направленный анализ противовирусной активности потенциальных лекарственных препаратов в отношении РНК-содержащих вирусов» соответствует требованиям, установленным в пп. 9-14 Положения «О порядке

присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; с изменениями в действующей ред. от 18.03.2023 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, ученой степени кандидата наук и рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология».

Заключение принято на заседании научной экспертной комиссии ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Присутствовало на заседании 16 членов комиссии (имеющих ученую степень доктора наук – 10 членов, кандидата наук – 6 членов) из 21 члена по списочному составу научной экспертной комиссии.

Результаты голосования: «за» – 16 чел.; «против» – нет; «воздержалось» – нет; Протокол заседания № 4 от 8 августа 2023 г.

Председатель научной экспертной комиссии,
руководитель научного направления учреждения
доктор медицинских наук, профессор

Е.А. Ткаченко

Секретарь научной экспертной комиссии,
ученый секретарь
кандидат биологических наук

А.В. Белякова

Подписи д.м.н., проф. Ткаченко Е.А., к.б.н. Беляковой А.В. удостоверяю.
Начальник отдела кадров ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита)



А.И. Симакова

«14» августа 2023 г.