

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера
академик РАН, профессор, д.м.н.

А.А. Тотолян

«28» ноября 2023 г.

М. П.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Козловской Любови Игоревны на тему: «Фенотип-направленный анализ противовирусной активности потенциальных лекарственных препаратов в отношении РНК - содержащих вирусов», представленной к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология»

Актуальность темы диссертационного исследования и ее связь с планами отраслевой науки

Диссертационная работа Козловской Л.И. посвящена разработке и характеристике методик фенотипической идентификации противовирусных препаратов.

Наиболее эффективным средством контроля вирусных инфекций является вакцинация. Однако во многих случаях, в том числе новых для человеческой популяции возбудителей, сама по себе разработка вакцин занимает длительное время, не говоря уже о производстве необходимого количества доз и их доставке в необходимые регионы. До сих пор не до конца изучен вопрос об изменчивости многих вирусов, что не позволяет с достоверностью говорить об эффективности вакцины. Транспортировка и хранение вакцин требует соблюдения жесткого температурного регламента. Кроме того, существует прослойка населения с противопоказаниями к вакцинации, что также ограничивает ее эффективность. Наконец, в ряде случаев серьезным препятствием для широкого применения вакцин является развитие специфических иммунных реакций, отягощающих течение заболевания при инфицировании. Поэтому применительно ко многим вирусным инфекциям важным, если не ведущим способом контроля является применение специфических противовирусных химиопрепаратов для терапии уже развившейся инфекции.

Однако таких препаратов на сегодняшний день зачастую не разработано, либо их арсенал немногочислен, а используемые препараты не обладают достаточной степенью безопасности. Для некоторых инфекций, таких как

COVID-19, применяется ряд препаратов, которые можно рассматривать как средства патогенетической терапии – противовоспалительные средства, антикоагулянты и др. Эти соединения направлены не на подавление репродукции вируса, а на подавление других факторов патогенеза коронавирусной инфекции – цитокинового шторма, тромбообразования и т.д. При этом доступные и эффективные препараты прямого противовирусного действия в клинической практике отсутствуют, что с учетом высокой контагиозности вируса и тяжести заболевания определяет высокую актуальность и приоритет запланированного исследования.

Помимо этого, работа несет в себе значительный методический элемент, т.е. во многом посвящена оценке и валидации методик тестирования активности противовирусных соединений. В мире существует большое число научных лабораторий, групп и компаний, разрабатывающих средства противовирусной терапии. Каждая из них использует свои методические приемы и протоколы для оценки активности соединений, поэтому зачастую сравнение результатов, полученных разными коллективами, представляет значительную сложность. В этой связи актуальность унификации подходов и протоколов тестирования, как и оценка положительных и отрицательных сторон каждой из методик, является исключительно актуальной задачей.

С учетом изложенного, представленная работа является не просто исключительно актуальным, а ожидаемым и широко востребованным исследованием.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

В результате проведенных исследований были впервые разработаны и валидированы методики для фенотипического скрининга ингибиторов репродукции высоко актуальных вирусов семейств *Flaviviridae*, *Togaviridae* и *Coronaviridae*. Проведенные исследования позволили выявить низкомолекулярные эффективные ингибиторы переносимых клещами ортофлавивирусов (ВКЭ, ПОВ, ВОГЛ) путём фенотипического скрининга противовирусной активности химических библиотек *in vitro*. В рамках оптимизации методических подходов впервые проведено сравнение количественных показателей противовирусной активности, полученных с использованием различных методик фенотипического скрининга *in vitro* (на примере вируса клещевого энцефалита, вируса Чикунгунья, коронавируса SARS-CoV-2, а также энтеровирусов видов А, В и С. Разработаны также подходы к стандартизации параметров методик фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* в отношении литических РНК-содержащих вирусов. Разработанные методики фенотипического скрининга

противовирусной активности *in vitro* позволяют проанализировать до 2500 соединений в одном эксперименте без применения роботизированных технологий, а также могут стать основой для разработки автоматизированных систем для высокоэффективного скрининга химических библиотек.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, отражающие научную новизну и практическую значимость работы, хорошо аргументированы. Результаты исследований подтверждены статистическим анализом с применением адекватно подобранных критериев описательной и аналитической статистики. Все полученные результаты воспроизводимы и статистически достоверны. Результаты работы представлены на российских и международных профильных конференциях, симпозиумах и совещаниях: Симпозиум биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств, конгресс «Человек и лекарство», Москва, Россия, 12-13 апреля 2010 г.; XXII International Symposium in Medicinal Chemistry ChemMedChem, Берлин, Германия, 2-6 сентября 2012; 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry, MedChem 2015, Новосибирск, Россия, 5-10 июля 2015 г.; 4th Antivirals congress, Sitges, Barcelona, Spain, 18-21 сентября 2016 г.; XXIV Международная молодёжная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 10-14 апреля 2017г.; 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants, MedChem 2019, Екатеринбург, Россия, 10-14 июня 2019 г.; Markovnikov Congress on Organic Chemistry, Москва-Казань, Россия, 21-28 июня 2019 г.; Всероссийская научно-практическая конференция 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.; VIII Международная научно-практическая конференция молодых учёных биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio, Кольцово, Россия, 2021 г.; IX Международная научно-практическая конференция молодых учёных биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio, Кольцово, Россия, 2022 г.; XXIX Международная молодёжная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 12-22 апреля 2022 г.; XXXIV Международная зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, Россия, 8-11 февраля 2022 г. Результаты исследования опубликованы в 37 научных работах, из них работ, опубликованных согласно Перечню рецензируемых

научных изданий (Перечень ВАК) – 37, в том числе работ в научных изданиях, индексируемых базами Scopus и/или Web of Science – 34. По результатам исследования получен патент №2733945 «Замещённые изоксазолы, композиции на их основе, обладающие противовирусной активностью, и способ их применения». Последовательности геномов штаммов SARS-CoV-2 были депонированы в базы данных GISAID и VGARus.

Содержание диссертации и её оценка

Общий объем диссертации составляет 294 страницы. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из следующих основных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 373 ссылки, из них 11 на русском языке, 362 - англоязычные. Работа включает 67 таблиц и проиллюстрирована 44 рисунками.

Первая глава посвящена обзору данных литературы по основной теме работы на основании анализа научных публикаций за период 1980-2023 годов. Автором проанализированы основные проблемы поиска противовирусных препаратов, подходы к их идентификации в составе химических библиотек и дальнейшей разработке в качестве фармакологических средств. Подробно описаны особенности протоколов мишень-ориентированного и фенотип-ориентированного скрининга потенциальных лекарственных препаратов. Далее автор подробно рассматривает частные вопросы разработки конкретных препаратов против РНК-геномных вирусов, а также методы оценки вирусингибирующей активности химических соединений. Используемые в работе вирусы семейств *Flaviviridae*; *Togaviridae*; *Coronaviridae*; *Picornaviridae*; *Retroviridae*) подробно охарактеризованы с точки зрения систематики, строения, организации и стратегии репродукции генома. Изложение материала этого раздела помогает глубже познакомиться с проблемой и потому специальных комментариев не требует.

Во второй главе представлена информация об использованных в работе материалах и методах исследования. Из представленной информации видно, что в работе использован широкий спектр физиологических, молекулярно-биологических, вирусологических, морфологических и иммунологических методов исследования. Так, изоляты использованных в работе вирусов выделены при помощи культивирования в клеточных культурах, их инфекционная активность в присутствии исследуемых соединений оценена при помощи методов титрования с индикацией вируса по цитопатогенному действию, по снижению числа бляшко- и фокусообразующих единиц, снижению инфекционной активности вирусного потомства. Кроме того, с той же целью использованы методы иммуноферментного анализа и ОТ-ПЦР.

Структура вирионов изучена при помощи концентрирования ультрацентрифугированием и электронной микроскопии. Набор методов адекватен поставленным задачам исследования.

В 3 главе – «Результаты собственных исследований» - представлены данные об отработке протоколов исследования противовирусных свойств соединений и анализе с их помощью химических библиотек соединений. В состав изученных классов химических веществ вошли производные 1,4-дигидропиридина и пиридотиадиазина, 4-аминотетрагидрохиназолина, перилена, перилентриазолов, нуклеозидов, изоксазола, а также селенорганические соединения, гуминовые вещества и растительные экстракты. Приведены данные об их цитотоксичности, а также противовирусных свойствах в отношении пикорна-, ретро-, тога, флави- и коронавируса. Для соединений-лидеров охарактеризованы стадии вирусной репродукции – мишень действия соединения, а также изучен в ряде случаев механизм действия. Из приведенных данных достоверно следует, что при помощи разработанных и охарактеризованных методов возможно проведение различных вариантов фенотипической оценки противовирусной активности соединений против вирусов рода *Orthoflavivirus* (БКЭ, ПОВ, ВОГЛ), рода *Enterovirus* (ЭВ-А, ЭВ-В, ЭВ-С), рода *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), рода *Alphavirus* (ЧИКВ) и рода *Lentivirus* (ВИЧ-1). Важно, что комбинируя эти методики, можно не только оценивать свойства библиотек химических соединений и выявлять соединения-хиты с высокой противовирусной активностью, но и проводить исследования механизма их действия и поиска возможных мишеней.

Полученные результаты сопоставлены с данными, полученными другими авторами, работающими в той же области.

В главе «Заключение» приведена трактовка представленных результатов, описывается, насколько использованные методы и полученные в работе данные соответствуют методикам и результатам, полученным ранее в других лабораториях, а также представлены гипотезы о взаимосвязи ранее полученных результатов других исследований с данными собственных экспериментов.

Выводы составлены четко и логично вытекают из материалов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения. Апробацию результатов работы следует признать достаточной: по материалам диссертационной работы опубликовано 37 научных работ в том числе работ в научных изданиях, индексируемых базами Scopus и/или Web of Science – 34. На основании результатов работы получен один патент РФ на изобретение.

Принципиальных замечаний по существу диссертации нет.

Из недочетов работы следует указать следующие.

На стр.11 автор приводит данные о количестве идентифицированных на сегодняшний день вирусов и их геномной организации. Поскольку эти данные постоянно меняются и уточняются, следует привести ссылку на источник этой информации.

При описании морфологии вирионов ВКЭ, полученной при помощи электронной микроскопии (стр.220), было бы нагляднее привести собственно микрофотографии полноценных и неполноценных частиц, не ограничиваясь лишь их описанием.

В тексте работы присутствуют ряд грамматических и орфографических неточностей, несовпадений падежей и опечаток:

«...полумаксимальная токсическая концентрация (CC50), то есть концентрацию соединения...» (стр.13);

Фраза «...для оптимизации соединения-лидера...» (стр.19) применительно к ранее упоминаемым растительным экстрактам выглядит некорректной, и в данном случае лучше говорить об идентификации соединения-лидера или образца с наибольшей активностью.

Во фразе «В препаратах зрелых вирионов количество неинфекционных (GCP) к инфекционным (БОЕ) частиц составило...» (стр.220) следует заменить «количество» на «отношение» (доля).

Перечисленные замечания не носят принципиального характера, а касаются лишь технических и оформительских аспектов работы. Из достоинств диссертации следует отметить высокий уровень владения автором литературным языком и очевидную орфографическую грамотность при изложении материала.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в работе результаты можно будет использовать для разработки и оптимизации протоколов тестирования противовирусных соединений. Разработка и применение новых противовирусных соединений, направленных на различные мишени актуальных для человека вирусов и обладающих различными механизмами действия, сможет послужить весомым вкладом в развитие терапевтических протоколов для расширения фармакологического арсенала и достижения оптимальных результатов при лечении вирусных инфекций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Козловской Любови Игоревны «Фенотип-направленный анализ противовирусной активности потенциальных лекарственных препаратов в отношении РНК - содержащих вирусов», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических

наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология», представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, по актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости отвечающую требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного 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 докторским диссертациям, а ее автор, Козловская Любовь Игоревна, заслуживает присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Проблемной комиссии по вирусологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», протокол № 7/23 от «9» ноября 2023 года.

Заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии
ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
доктор биологических наук
e-mail: zarubaev@pasteurorg.ru
тел. +7(812)233-20-92

Владимир Викторович Зарубаев

Подпись д.б.н. Зарубаева В.В. заверяю.
Начальник отдела кадров
ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»



Л.В. Чебакова

« 28 » ноября 2023 г.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 197101, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, дом 14.
Телефон +7(812)233-20-92, <https://www.pasteurorg.ru/>