

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора,
академика РАН Борисевича Сергея Владимировича
на диссертацию Козловской Любови Игоревны
«Фенотип-направленный анализ противовирусной активности потенциальных
лекарственных препаратов в отношении РНК-содержащих вирусов»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 1.5.10 «Вирусология»

В настоящее время в различных отечественных и зарубежных научно-исследовательских учреждениях активно проводятся исследования по целенаправленному поиску эффективных химиопрепаратов, особенно широкого спектра действия, которые могли бы быть использованы для терапии актуальных вирусных инфекций.

Одним из 2-х рациональных подходов выбора активных химических соединений является их скрининг в перевиваемых культурах клеток, позволяющий количественно оценивать противовирусную эффективность соединений по количественным показателям (критериям) клеточных процессов: цитопатическому действию, фокусообразованию и бляшкообразованию. Однако эти рутинные исследования занимают длительное время. При этом одновременно по существующим методикам можно оценить активность 5-10 химических соединений одновременно. В тоже время, современное технологическое оборудование обеспечивает синтез сотен и тысяч химических соединений, что требует новых методических подходов полуколичественной оценки активности исследованных соединений. За последние 10... 15 лет у нас в стране и за рубежом, чаще всего используют для описания противовирусной активности препаратов три показателя: концентрация лекарственного средства, вызывающая 50% терапевтический эффект (EC_{50}), концентрация лекарственного средства, вызывающая первое токсическое проявление (CC_{50}) и, наконец, терапевтический (селективный)

индекс, вытекающий из соотношения CC_{50} и EC_{50} , результаты определения которых в разных лабораториях могут значительно отличаться.

Таким образом, существующие рутинные технологии не позволяют осуществлять массовый поиск активных противовирусных соединений и определять механизм действия соединения - лидера, а также выявлять факторы, определяющие количественные различия при определении их противовирусной активности и определяют **актуальность данной работы**, целью которой являлась разработка и внедрение фенотип-направленного подхода к оценке противовирусной активности соединений *in vitro* для создания лекарственных препаратов против различных РНК-содержащих вирусов.

Для достижения поставленной цели **автором были решены следующие задачи**: разработаны методики фенотипической оценки противовирусной активности *in vitro* в отношении РНК-содержащих вирусов семейств Flaviviridae, Togaviridae, Coronaviridae, Picornaviridae и Retroviridae, и с их помощью определена противовирусная активность соединений различных химических классов. Кроме того, выявлены контролируемые параметры фенотипических методик скрининга противовирусной активности соединений *in vitro*, а также разработаны схемы фенотипического поиска потенциальных противовирусных лекарственных препаратов *in vitro* для дальнейшего исследования.

В результате выполненных теоретических и экспериментальных исследований автором решена проблема в части разработки фенотипических подходов оценки эффективности соединений *in vitro*, которые будут активны в отношении исследуемых эпидемически значимых возбудителей *in vivo*.

Научная новизна. Впервые разработаны и валидированы методики для фенотипического скрининга ингибиторов репродукции вирусов клещевого энцефалита, Повассан, омской геморрагической лихорадки, лихорадки Чикунгунья, SARS-CoV-2, выявлены низкомолекулярные ингибиторы переносимых клещами ортофлавивирусов (клещевого энцефалита,

Повассан, омской геморрагической лихорадки) путём фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro*, проведено сравнение количественных показателей противовирусной активности, полученных с использованием различных методик фенотипического скрининга *in vitro* (на примере вирусов клещевого энцефалита, Чикунгунья, SARS-CoV-2, а также энтеровирусов видов А, В и С, разработаны подходы к стандартизации параметров методик фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* в отношении литических РНК-содержащих вирусов.

Научная новизна диссертации подтверждена патентом на изобретение RU2733945.

Теоретическая значимость работы заключается в возможности выявления параметров фенотипического определения противовирусной активности *in vitro*, влияющих на результаты исследования: метод оценки характеристики вируса (штамм, доза) и вирусного препарата, проведении сравнения параметров методик фенотипической оценки противовирусной активности с разными способами оценки ингибирования репродукции вируса, а также в экспериментальном подтверждении, 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 и в реакциях ингибирования вирус-индуцированного ЦПД и бляшкообразования вируса Чикунгунья) при всегда более низком значении в тесте ингибирования бляшкообразования.

Практическая значимость работы очевидна и заключается в разработке, апробировании и внедрении в лабораторную практику методов фенотипического скрининга противовирусной активности соединений, начального определения механизма их действия и оценки вирулицидной активности в отношении различных возбудителей социально значимых

инфекционных заболеваний (БКЭ, ПОВ, ВОГЛ, вируса лихорадки Чикунгунья, SARS-CoV-2, энтеровирусов видов А, В и С, ВИЧ-1), 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 репликативного цикла, на которую действует соединение-ингибитор. Эффективность разработанных методик фенотипической оценки противовирусной активности подтверждена выявлением новых низкомолекулярных ингибиторов репродукции представителей родов *Orthoflavivirus* (БКЭ, ПОВ, ВОГЛ), *Enterovirus* (виды ЭВ-А, ЭВ-В, ЭВ-С), *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), *Alphavirus* (ЧИКВ) и *Lentivirus* (ВИЧ-1). 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. 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 их исследования.

Основные научные результаты, изложенные в диссертации, представлены в виде 37 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Апробация работы проведена на 7 международных, 2 всероссийских с международным участием и 3 всероссийских научных конференций.

В диссертации приведены **результаты, полученные лично автором** (планирование, разработка протоколов экспериментов, руководство и

постановка экспериментов) и выполненные совместно с другими сотрудниками, представленные с их согласия.

Достоверность полученных данных определяется использованием современных статистических методов и программного обеспечения.

Совокупность новых научных положений, выносимых на защиту, обоснована приведенным по тексту теоретическим и большим экспериментальным материалом, который обуславливает и подтверждает достоверность положений, выносимых на защиту, и представленных выводов.

Выводы, сформулированные Козловской Любовью Игоревной, корректны и в полной мере отражают суть и научную значимость результатов работы.

Работа выполнена на современном научно-методическом уровне и имеет внутреннее единство. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. «Вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 6, 10, 11 паспорта научной специальности.

Автореферат диссертации на 48 листах в полной мере отражает содержание диссертации.

Полученные автором результаты, а именно полногеномные последовательности геномов выделенных штаммов ПИК35, 4724d, 7995o вируса SARS-CoV-2, депонированы в международную и отечественную базы данных GISAID и VGARus.

Оценивая работу положительно, следует отметить наличие в диссертации ряда недостатков, не снижающих общего положительного впечатления об оппонируемой работе и не влияющих на ее научную и практическую значимость:

1. Формулировка второго положения соискателя не совсем удачная: «Разработанные фенотипические методы можно применять ...». Она должна быть утверждающая, а не предполагаемая.

2. Диссертант ошибочно относит клещевой энцефалит, энцефалит Повассан, омскую геморрагическую лихорадку, лихорадку Чикунгунья, COVID-19 и энтеровирусные инфекции к социально-значимым инфекциям. Согласно постановления Правительства Российской Федерации № 715 от 01.12.2004 г. к социально-значимым отнесены следующие заболевания: туберкулез, гепатиты В и С, СПИД и инфекции, передающиеся половым путем.

3. Требуется пояснение соискателя по поводу градации значений эффективности соединений по показателю EC_{50} . Есть ли нормативные документы, которые определяют эти градации?

4. Почему в работе для оценки эффективности соединений использовались различные инфицирующие дозы (50, 100, 200 БОЕ)? Чем мотивирован выбор их и почему не использовался подход в расчете (MOI) в виде множественности инфицирования дозы на клетку?

5. Диссертант по всему тексту своей работы не верно применяет очень важный термин в вирусологии (жаргон): «количество урожая вируса». Правильно говорить об уровне накопления вируса (возбудителя), но не урожая.

6. Соискатель неправильно трактует словосочетание ЦПД ($ЦПД_{50}$) (стр. 87, 88, 92), расшифровывая его не как цитопатическое действие, а как «...50% цитотоксических доз» либо «цитотоксических доз ($ЦТД_{50}$)».

7. На стр. 98 фигурирует штамм Софьин вируса клещевого энцефалита, однако в перечне исследованных штаммов этого штамма нет (стр. 84). Кроме того, в таблицах 12-15 не указаны штаммы вируса клещевого энцефалита, которые были использованы в исследованиях (их же 8). Необходимо пояснение автора.

8. Автор в своей работе допускает жаргонные и неудачные выражения и формулировки, например: «снижая токсичность лечения» (стр. 78), «Во всех схемах вирус оставляли в клетках ...» (стр. 96), «... гибель клеток в монослое» (стр. 102), «...мы рассадили клетки Vero и RD с разной исходной

плотностью,...» (стр. 105), «...реакцию нейтрализации инфекционности (ЦПД)...» (стр. 139, 156), «...урожаем вируса сильно зависит от благополучия клетки» (стр. 153), «...отработать методику его наращивания в культуре клеток» (стр. 171), полностью останавливали образование бляшек...» (стр. 95), «В основном, соединения, неактивные против шт.46973 были неактивны и против шт.BrCr, а активные были активны» (стр. 208).

9. Имеются не выправленные стилистические, пунктуационные ошибки и опечатки (стр. 13, 40, 49, 64, 79, 80, 87, 95, 96, 97, 118, 135, 190, 196, 197, 201, 234, 248 и др.).

Тем не менее, указанные недостатки, в целом, не снижают общей положительной оценки диссертации.

Вывод. 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», является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема, имеющая важное значение для обеспечения биологической безопасности Российской Федерации, в области разработки фенотипических методов поиска эффективных противовирусных препаратов *in vitro* в отношении возбудителей клещевого энцефалита, омской геморрагической лихорадки, COVID-19, лихорадки Чикунгунья, энтеровирусной инфекции, СПИД.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и урону научных публикаций диссертация соответствует требованиям п. 9, 10, 11, 13 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 г., № 748 от 02 августа 2016 г., № 650 от 29 мая 2017 г., № 1024 от 28 августа 2017 г., № 1168 от 01 октября 2018 г.,

№ 751 от 26.05.2020 г., № 1690 от 26.09.2022 г., № 842 от 23.09.2023 г.), а соискатель заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10 «Вирусология».

Официальный оппонент:

Начальник федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации
доктор биологических наук, кандидат медицинских наук,
профессор по специальности «Вирусология», академик РАН

Борисевич Сергей Владимирович

«27» ноября 2023 г.

141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11.,
тел. 8(496)552-12-00, 48cnii@mil.ru.

Подпись официального оппонента Борисевича С.В. заверяю.

Ученый секретарь научно-технического совета
федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник

Краснянский Владимир Павлович

«24» ноября 2023 г.

