

«УТВЕРЖДАЮ»

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

А.А. Тотолян



«11» декабря 2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14)

Диссертационная работа Волобуевой Александрины Сергеевны на тему: «Характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология, выполнена в лаборатории экспериментальной вирусологии Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В период подготовки диссертации соискатель Волобуева А.С. с 2018 года и по настоящее время работает в лаборатории экспериментальной вирусологии в должности научного сотрудника ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

В 2024 году Волобуева А.С. окончила аспирантуру ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки, научной специальности 1.5.10. Вирусология, (диплом №107827 0002287 от 01.07.2024г.)

В 2007 году Волобуева А.С. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» по направлению 020200 «Биология», выдан диплом №107819 0056071 от 22.09.2022 г., присуждена квалификация бакалавр биологии.

В 2009 году Волобуева А.С. окончила Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-

Петербургский государственный университет» по направлению «Биология», выдан диплом №ВМА 0077558 от 16.12.2009 г., присуждена квалификация магистр биологии.

Научный руководитель:

Зарубаев Владимир Викторович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

По итогам обсуждения на заседании Ученого совета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера диссертационной работы Волобуевой Александрины Сергеевны на тему: «Характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus*», принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Диссертация Волобуевой А.С. является научно-квалифицированной работой, которая содержит изложение новых научно-обоснованных результатов в области разработки мер терапии инфекций, вызываемых вирусами рода *Enterovirus*. Диссертация является актуальной, законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой.

Автор владеет проблематикой, языком, методологией и терминологией. Сформулированная во введении цель исследования – «дать характеристику противовирусных свойств *in vitro* и *in vivo* новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов в отношении вирусов рода *Enterovirus*» достаточно и подробно отражена в четырех главах работы.

Диссертация раскрывает вопросы поставленных задач и соответствует требованию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследований и взаимосвязи результатов и выводов.

Актуальность темы диссертационного исследования

Энтеровирусы представляют собой многочисленную группу безоболочечных РНК-содержащих вирусов рода *Enterovirus*, семейства *Picornaviridae*. Представители рода – полиовирусы, вирусы Коксаки, вирусы ЕСНО (enteric cytopathic human orphan, кишечные цитопатогенные человеческие «сиротские» вирусы), риновирусы являются возбудителями заболеваний человека. Особую опасность инфекции, вызываемые этими вирусами, представляют для детей младшего возраста. Полиомиелит – опасное острое вирусное заболевание с разными клиническими формами, самой тяжелой из которых является паралитическая. Заражение неполиомиелитными

энтеровирусами в большинстве случаев не вызывает заболевания, тем не менее, ежегодно в мире регистрируются спорадические случаи и вспышки энтеровирусной инфекции с широким разнообразием клинических форм. На долю риновирусов приходится более половины всех случаев острых респираторных вирусных инфекций. Все чаще диагностируются легочные и внелегочные осложнения при риновирусной инфекции. Также известно, что риновирусная инфекция является одной из причин обострения астмы и муковисцидоза у детей и хронического бронхита у взрослых.

С учетом высокой генетической изменчивости энтеровирусов в будущем возможно появление новых высокопатогенных штаммов. Из-за высокого генетического и серологического разнообразия энтеровирусов разработка вакцин для профилактики энтеровирусных инфекций затруднена. Специфическая вакцинопрофилактика доступна только в отношении полиовируса и EVA71. Несмотря на усилия в области разработки этиотропных лекарственных средств для лечения инфекций, вызванных вирусами рода *Enterovirus*, на сегодняшний день в мире отсутствуют зарегистрированные этиотропные препараты для терапии энтеровирусной инфекции. Таким образом, поиск новых химических соединений, обладающих прямой противовирусной активностью в отношении широкого спектра энтеровирусов, для их последующего применения в качестве монотерапии или в виде комбинаций является важным направлением исследований.

Цель исследования: дать характеристику противовирусных свойств *in vitro* и *in vivo* новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов в отношении вирусов рода *Enterovirus*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи исследования:

1. провести первичный скрининг противовирусной активности и цитотоксичности тестируемых соединений в опытах *in vitro*, выявить среди них соединения-лидеры;
2. оценить вирус-ингибирующую активность идентифицированных соединений-лидеров в отношении различных типов энтеровирусов;
3. разработать модель энтеровирусного панкреатита у животных и оценить защитные свойства наиболее активных соединений *in vivo*;
4. определить стадию жизненного цикла вируса Коксаки – мишень действия соединений-лидеров при помощи тестов с использованием перmissive клеточной культуры;
5. получить устойчивые к наиболее перспективным соединениям-лидерам штаммы энтеровирусов, локализовать в них генетические изменения и аминокислотные замены, связанные с резистентностью.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Автором проведен сбор и анализ научной литературы по теме диссертационного исследования, сформулированы цель и задачи исследований, определены объекты и объем работы, проведен поиск методов и их обоснование для решения поставленных задач. Проведены эксперименты по изучению противовирусной активности и механизма действия новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и бензолсульфамидов *in vitro*, адаптации модели энтеровирусного панкреатита у белых мышей и оценке активности соединений-лидеров в условиях энтеровирусной инфекции *in vivo*, селекции и характеристике резистентных штаммов вирусов *in vitro*, подбору праймеров и подготовке ПЦР-фрагментов для секвенирования и анализу результатов секвенирования. Выполнено формирование базы данных и осуществлена обработка полученных результатов, проведено их обобщение и обсуждение, выполнено оформление диссертации, подготовлены публикации по теме диссертации. Вклад соавторов заключается в приготовлении материалов для гистологического и электронно-микроскопического анализа, выполнении работ по секвенированию подготовленных ПЦР-фрагментов вирусного генома.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Основные результаты диссертационного исследования апробированы на всероссийских и международных конференциях: Весенняя школа-конференция ХимРар по медицинской химии «МедХимРар-21» (Москва, 2021); Первая школа по медицинской химии для молодых ученых «MedChemSchool-2021» (Новосибирск, 2021); XXVII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (онлайн формат, 2021); XXVIII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022» (онлайн формат, 2022); 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2021» (Волгоград, 2022); III Международный форум Дни вирусологии 2022 (Санкт-Петербург, 2022), «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, 2023), Международный симпозиум - научная конференция «100 лет с именем Пастера», (Санкт-Петербург, 2023), «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM 2024) (Екатеринбург, 2024), VIII Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2024). Наиболее значимые тезисные сообщения:

1. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Шетнев А.А., Панова В.А., Васильева Д.М. Характеристика противовирусной активности новых капсид связывающих агентов производных сульфонамидобензойной кислоты. // Сборник тезисов III Международный форум Дни вирусологии 2022 (Санкт-Петербург, 3-5 октября 2022 г.) - Санкт-Петербург, 2022. - С.21
2. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Дерябина Т.Г. Характеристика противовирусной активности и механизма действия новых гетероциклических соединений группы лейковердазилов. // Сборник тезисов докладов Восьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, 24-27 апреля, 2023 г.) / под редакцией К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной. – М.: «Перо», 2023. – С. 29.
3. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Федорченко Т.Г., Липунова Г.Н., Мин Хоанг. Характеристика противовирусной активности тиенил-содержащих лейковердазилов в отношении энтеровирусов. // Сборник тезисов VIII Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 5-7 июня 2024 г.) Проблемы медицинской микологии Т.26, №2, – Санкт-Петербург, 2024 - С.97.

Новизна и практическая значимость результатов проведенных исследований

Впервые в рамках одного исследования дана характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов в отношении вирусов рода *Enterovirus*.

Среди аналогов плеконарила выявлено новое соединение-лидер, преодолевающее резистентность вируса к прототипному препарату-плеконарилу. Для нового соединения-лидера впервые показана протективная активность *in vivo* на модели энтеровирусного панкреатита у мышей BALB/c. Впервые охарактеризован штамм вируса Коксаки, резистентный к новому соединению-лидеру из группы аналогов плеконарила, показана его сниженная репликативная активность, выявлены новые аминокислотные замены в белке VP1 (I207T, S225A, G254A, G264A) и белке VP3 (Y178F), соответствующие резистентному фенотипу.

В результате исследования выявлена новая группа химических веществ (лейковердазилов), обладающих высокой ингибирующей активностью в отношении широкого спектра энтеровирусов в культуре клеток. Впервые для данной группы соединений выполнен анализ «структура-активность», оценен вклад боковых заместителей в противовирусную активность соединений. Показано, что внесение объемных заместителей в положение 6 тетразинового кольца приводит к ухудшению активности соединений.

Впервые определена стадия жизненного цикла вируса, которую ингибирует соединение группы лейковердазилов. Показано, что соединение из группы лейковердазилов проявляет вирус-ингибирующую активность при добавлении в культуру клеток не позже начала репликации вирусного генома.

Впервые путем серийного пассирования в культуре показана возможность выработки резистентности к соединению группы лейковердазилов, и охарактеризован резистентный штамм вируса Коксаки. Впервые показано, что развитие резистентности к соединению из группы лейковердазилов сопровождается мутацией в белке 2С. Впервые показано, что штамм, резистентный к соединению-лидеру из группы лейковердазилов, несущий аминокислотные замены в вирусном белке 2С (S109I, H318Q); обладает сниженными ростовыми характеристиками в культуре клеток.

Теоретическая и практическая значимость

В результате проведенного исследования получены сведения об активности и токсичности *in vitro* библиотеки химических соединений вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов. Результаты свидетельствуют о высоком потенциале соединений группы лейковердазилов как соединений – ингибиторов широкого спектра энтеровирусов. Полученные данные расширяют знания о биологической активности новых соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов и пополняют теоретическую базу для их дальнейших исследований.

Охарактеризованы новые сайты в вирусных белках VP1, VP3 и 2С, мутации в которых ассоциированы с резистентностью и пониженными ростовыми характеристиками энтеровирусов. На основе полученных данных возможна разработка новых подходов к направленному синтезу мишень-ориентированных химических соединений.

Практическая значимость заключается в выявлении активного аналога плеконарила, обладающего широким спектром активности в отношении энтеровирусов, включая плеконарил-резистентный штамм вируса Коксаки В3, и риновируса, а также протективным действием *in vivo*. Преимуществом данного соединения являются пониженные ростовые свойства штамма, резистентного к нему. Таким образом, данное соединение можно рассматривать как потенциального кандидата для проведения расширенных доклинических исследований.

Практические рекомендации

Полученные в ходе исследования сведения о химической структуре, цитотоксичности и активности в отношении вирусов рода *Enterovirus* новых гетероциклических соединений групп лейковердазилов, аналогов плеконарила и

бензолсульфамидов могут быть использованы для пополнения баз данных программных продуктов, реализующих методы исследований *in silico*.

Выявленные в ходе экспериментов по выведению резистентных штаммов энтеровирусов мишени белках VP1, VP3, 2С представляют исходные данные для последующего сайт-специфического синтеза новых противовирусных средств.

Научная специальность, которой соответствует диссертация

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология (биологические науки) и направлениям исследования: пункту 4 «Молекулярная биология вирусов, структурно-функциональная биология вирусных белков. Структура и экспрессия вирусных геномов. Эволюция вирусов и их разнообразие. Генетика и геномика вирусов. Популяционная генетика»; пункту 10 «Разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии»; пункту 11 «Противовирусные препараты. Интерфероны и индукторы интерферона: изучение механизма действия, получение и применение. Вирусные вакцины, в том числе живые (аттенуированные), инактивированные, субъединичные, рекомбинантные (реплицирующиеся и нереплицирующиеся), векторные и вакцины на основе вирусоподобных частиц».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 6 научных работах, из них работ, опубликованных согласно перечня российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК РФ) - 2, а также работ в научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и/или Scopus- 3 статьи. Получено патентов на изобретение в РФ - 1.

Основные научные результаты диссертации полно отражены в следующих работах:

1. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Ланцева К.С. / Разработка противовирусных препаратов для терапии инфекции коксакивируса В3 // Инфекция и иммунитет. - 2021. - Т. 11. - № 1. - С. 57-67. DOI: 10.15789/2220-7619-DOA-1273 (Web of Science, RSCI, Scopus, ВАК, K1).

2. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Федорченко Т.Г., Липунова Г.Н., Тунгусов В.Н., Чупахин О.Н. / Противовирусные свойства вердазилов и лейковердазилов и их активность в отношении энтеровирусов группы В //

Инфекция и иммунитет. - 2023. - Т. 13- № 1. - С. 107-118. DOI: 10.15789/2220-7619-VAL-2065 (Web of Science, RSCI, Scopus, BAK, K1).

3. Shetnev A.A., **Volobueva A.S.**, Panova V.A., Zarubaev V.V., Baykov S.V. / Design of 4-Substituted Sulfonamidobenzoic Acid Derivatives Targeting Coxsackievirus B3 // Life. – 2022. – Vol. 12. – N. 11. – P. 1832. DOI: 10.3390/life12111832 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q2).

4. **Volobueva A.S.**, Fedorchenko T.G., Lipunova G.N., Valova M.S., Sbarzaglia V.A., Gladkikh A.S., Kanaeva O.I., Tolstykh N.A., Gorshkov A.N., Zarubaev V.V. / Leucoverdazyls as Novel Potent Inhibitors of Enterovirus Replication // Pathogens. – 2024. – Vol. 13. – N. 5. – P. 410. DOI: 10.3390/pathogens13050410 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q2).

5. Lane T.R., Fu J., Sherry B., Tarbet B., Hurst B.L., Riabova O., Kazakova E., Egorova A., Clarke P., Leser J.S., Frost J., Rudy M., Tyler K.L., Klose T., **Volobueva A.S.**, Belyaevskaya S.V., Zarubaev V.V., Kuhn R.J., Makarov V., Ekins S. / Efficacy of an isoxazole-3-carboxamide analog of pleconaril in mouse models of Enterovirus-D68 and Coxsackie B5 // Antiviral Res. – 2023. – Vol. 216. – P. 105654. DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105654 (Scopus, PubMed, Q1).

6. Патент № 2783659 Российская Федерация, МПК C07D 417/04 (2006.01), A61K 31/428 (2006.01), A61P 31/14 (2006.01). 2-[5-(4-метокси)-3-фенил-5,6-дигидро-4H-[1,2,4,5]тетразин-1-ил]-бензотиазолы с противовирусной активностью в отношении вирусов коксаки В3 : N 2022101582 : заявл. 24.01.2022 : опубликовано 15.11.2022 / Федорченко Т.Г., **Волобуева А.С.**, Тунгусов В.Н., Зарубаев В.В., Липунова Г.Н., Чупахин О.Н. ; заявитель ФГБУН ИОС им. И.Я. Пастовского УО РАН, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера . – 4 с. : ил. – Текст: непосредственный.

Диссертация проверена в системе «Антиплагиат.Эксперт». Доля уникального авторского текста диссертационной работы составляет 96,13%. Автором рукописи диссертации правомерно использованы ранее опубликованные тексты с указанием необходимых ссылок на источники информации и соблюдением авторских прав правообладателей.

Внедрение результатов исследования

В международную базу данных была депонирована нуклеотидная последовательность части генома вируса Коксаки В3 (Nancy), резистентного к соединению 65 (GenBank: PP845344.1).

Полученные результаты были использованы в учебно-педагогическом процессе в центре химической инженерии Федерального государственного

автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО».

Общее заключение

Диссертационное исследование Волобуевой Александрины Сергеевны на тему: «Характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus*», является законченной научно-квалификационной работой. В диссертационной работе получены и обоснованы данные о противовирусной активности и механизмах действия новых гетероциклических соединений, относящихся к группам лейковердазилов, бенолсульфамидов и аналогов плеконарила. Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные данные и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов. Достоверность результатов подтверждена корреляцией полученных практическими методами данных с теоретическими заключениями.

Диссертационное исследование Волобуевой Александрины Сергеевны на тему: «Характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 в редакции постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, 26.01.2023 г. №101, 18.03.2023 г. №415, 26.10.2023 г. №1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 №1382), предъявляемым к кандидатским диссертациям и может быть рекомендована к защите.

Заключение по диссертационной работе обсуждено и одобрено на заседании Ученого совета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Присутствовало на заседании 23 человека из 31 человек списочного состава, в том числе 16 докторов наук, 7 кандидатов наук. Результаты голосования: «за» - 23 человек, «против» - 0 человек, «воздержались» - 0 человек (протокол № 08 от 16 октября 2024 года).

Заключение принято и утверждено на заседании экспертной комиссии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по подготовке заключения Ученого совета для предоставления в диссертационный совет.

Присутствовало на заседании 27 человек из 30 человек списочного состава, в том числе 19 докторов наук, 8 кандидатов наук. Результаты голосования: «за» - 27 человек, «против» - 0 человек, «воздержались» - 0 человек.

Протокол заседания экспертной комиссии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера по подготовке заключения Ученого совета для предоставления в диссертационный совет № 07/2024 от 18.11.2024 года.

Председатель экспертной комиссии по подготовке заключения
Ученого совета для предоставления в диссертационный совет,
заместитель директора по науке
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера
кандидат медицинских наук

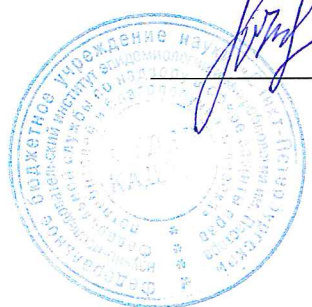

В.Г. Дедков

Секретарь экспертной комиссии по подготовке заключения
Ученого совета для предоставления в диссертационный совет,
Ученый секретарь ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера
кандидат медицинских наук


Г.Ф. Трифонова

Подписи к.м.н. В.Г. Дедкова, к.м.н. Г.Ф. Трифоновой заверяю.
Начальник отдела кадров ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени Пастера


Л.В. Чебакова



« 11 » декабря 2024 г.