

Заключение комиссии диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по диссертации Волобуевой Александрины Сергеевны на тему: «Характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

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.

Диссертация Волобуевой Александрины Сергеевны посвящена изучению противовирусной активности *in vitro* и *in vivo* новых химических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов в отношении вирусов рода *Enterovirus*. Методологическая основа работы заключалась в выявлении соединений-лидеров в каждой группе химических соединений по их способности ингибировать репродукцию вирусов *in vitro*; изучении спектра активности выбранных соединений в отношении вирусов Коксаки, ЕСНО, риновирусов в клетках линий Vero, RD, MRC-5; оценке защитных свойств соединений-лидеров по лечебно-профилактической схеме на модели энтеровирусного панкреатита у мышей BALB/c; выявлении стадии репликативного цикла вирусов, ингибируемой лидерными соединениями в клетках Vero; получении штаммов, резистентных к наиболее перспективным соединениям-лидерам и их характеристике.

Впервые в одном исследовании была изучена ингибирующая активность новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов в отношении вирусов рода *Enterovirus*. В группе аналогов плеконарила обнаружено новое лидерное соединение (N,N-диметил-5-[3-[2-метил-4-[5-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил]фенокси]пропил]изоксазол-3-карбоксамид), ингибирующее штамм вируса Коксаки, резистентный к плеконарилу. Указанное соединение-лидер обладало протективной активностью на модели энтеровирусного панкреатита, вызванного внутрибрюшинным введением вируса Коксаки В5 мышам BALB/c. Впервые показаны сниженные ростовые характеристики штамма вируса Коксаки, резистентного к указанному аналогу плеконарила, в геноме которого выявлены ранее не описанные мутации, сопровождающиеся аминокислотными заменами в структурных белках VP1 и VP3. Впервые для соединений группы лейковердазилов показано, что наличие объемного заместителя в положении 6 тетразинового кольца сопровождается снижением противовирусной активности в отношении вирусов Коксаки и вирусов ЕСНО *in vitro*. В исследовании впервые показана широта спектра ингибирующей активности соединения-лидера из группы лейковердазилов (2-(3,5-дифенил-5,6-дигидро-4Н-[1,2,4,5]тетразин-1-ил)-бензотиазол)

в отношении вирусов Коксаки и вирусов ЕСНО *in vitro*. Впервые показано, что указанное соединение-лидер ингибирует внутриклеточный этап репродукции вируса Коксаки В3. Впервые получен штамм вируса Коксаки, резистентный к указанному соединению-лидеру из группы лейковердазилов, в его геноме выявлены несинонимические мутации, приводящие к аминокислотным заменам в неструктурном белке 2С.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что результаты исследования противовирусной активности и цитотоксичности новых соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов расширяют знания об их биологической активности и пополняют теоретическую базу для их дальнейшего исследования. Результаты свидетельствуют о высоком потенциале соединений группы лейковердазилов как ингибиторов широкого спектра энтеровирусов. Получены сведения о сайтах в белках VP1, VP3 и 2С вирусов Коксаки, ассоциированных с развитием резистентности к соединениям групп аналогов плеконарила и производных лейковердазилов, приводящих к снижению ростовых характеристик вируса; что может быть использовано для мишень-ориентированной разработки препаратов для терапии энтеровирусных инфекций. Практическая значимость работы заключается в выявлении нового аналога плеконарила с широким спектром ингибирующей активности в отношении вирусов Коксаки (включая плеконарил-резистентный штамм), вирусов ЕСНО и риновирусов *in vitro*, а также обладающего протективной активностью *in vivo*. Преимуществом данного соединения являются сниженные ростовые характеристики штамма, резистентного к нему. Полученные результаты демонстрируют перспективность данного соединения как кандидата для проведения полного цикла доклинических исследований в качестве ингибитора энтеровирусной инфекции.

Комиссия диссертационного совета отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

определены соединения-лидеры, относящиеся к группам лейковердазилов, аналогов плеконарила и безолсульфамидов, обладающие высокой ингибирующей активностью в отношении вируса Коксаки В3 (штамм Nancy);

установлено, что среди соединений-лидеров из групп аналогов плеконарила, бензолсульфамидов, лейковердазилов, проявлявших выраженный ингибирующий эффект в отношении различных штаммов вирусов рода *Enterovirus*, наиболее широкий спектр активности был отмечен для аналога плеконарила (N,N-диметил-5-[3-[2-метил-4-[5-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил]фенокси]пропил]изоксазол-3-карбоксамид);

представлены данные, показывающие оптимизацию модели энтеровирусного панкреатита у мышей линии BALB/c;

выявлено, что:

- применение соединения-лидера из группы аналогов плеконарила (N,N-диметил-5-[3-[2-метил-4-[5-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил]фенокси]пропил]изоксазол-3-карбоксамид) по лечебно-профилактической схеме на разработанной модели энтеровирусного панкреатита приводит к статистически значимому снижению степени проявления инфекции, в отличие от соединения-лидера из группы лейковердазилов и

производных бензолсульфамидов (2-(3,5-дифенил-5,6-дигидро-4Н-[1,2,4,5]тетразин-1-ил)-бензотиазол);

- соединения-лидеры из группы аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов являются капсид-связывающими агентами, ингибирующими ранний этап жизненного цикла вируса;

- соединение-лидер из группы лейковердазилов (2-(3,5-дифенил-5,6-дигидро-4Н-[1,2,4,5]тетразин-1-ил)-бензотиазол) ингибирует внутриклеточный этап репродукции вируса.

получены:

- данные, подтверждающие, что резистентность вируса Коксаки В3 к соединениям-лидерам из группы аналогов плеконарила и группы лейковердазилов развивается в ходе серийного пассирования вируса в культуре Vero в присутствии указанных соединений в повышающейся концентрации за 7-9 последовательных пассажей;

- резистентность к соединению-лидеру из группы аналогов плеконарила сопровождается аминокислотными заменами в структурных белках VP1 (I207T, S225A, G254A, G264A) и VP3 (Y178F), к соединению-лидеру из группы лейковердазилов – заменами в неструктурном белке 2C (S109I, H318Q).

использованы современные методы исследования, применен адекватный дизайн и статистические методы обработки полученных данных, а объем и качество проанализированного материала являются достаточными для решения поставленных задач и получения репрезентативных данных.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Автором самостоятельно проведено планирование, организация всех этапов диссертационного исследования; определены цели и задачи, осуществлено проведение экспериментальной работы, систематизация и сбор первичных данных и их статистическая обработка.

Вклад соавторов заключается в приготовлении материалов для гистологического и электронно-микроскопического анализа, выполнении работ по секвенированию подготовленных ПЦР-фрагментов вирусного генома. Результаты исследования представлены на российских и международных конференциях, подготовлены основные публикации по выполненной работе. Диссертация охватывает главные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критериям внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформы, идейной линии, концептуальности и взаимосвязи выводов.

Использование современных методологических подходов, статистическая обработка данных, объективность в изложении концептуальных положений диссертации, аргументированная интерпретация научных результатов и выводов позволяют считать результаты диссертационного исследования достоверными и обоснованными. В работе были использованы классические методы вирусологии, современные молекулярно-биологические методы, а также методы работы с животными.

Диссертация соответствует профилю диссертационного совета 24.1.255.01.

Диссертация не содержит недостоверных сведений в опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Достоверность результатов подтверждена корреляцией полученных практическими методами данных с теоретическими заключениями. Текст диссертации, представленный в диссертационный совет, идентичен тексту диссертации, размещенному на сайте ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Проведенный анализ отчета системы «Антиплагиат.Эксперт» показал, что автором рукописи диссертации были правомерно использованы ранее опубликованные тексты в объемах, оправданных целями цитирования, с указанием необходимых ссылок на используемые источники информации и соблюдением авторских прав правообладателей. Неправомерных совпадений нет. Другие показатели распределены следующим образом: цитирования – 3,87%; самоцитирования – 2,3%, оригинальность – 93,83%. Долю уникального авторского текста в работе следует определять, как сумму показателей самоцитирования и оригинальности, что составляет 96,13%.

По материалам диссертации опубликованы 6 научных публикаций: 2 научные публикации в рецензируемом научном издании, рекомендованном ВАК, 3 научные публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных – Web of Science, Scopus, PubMed. Получен 1 патент на изобретение РФ.

Комиссия диссертационного совета пришла к выводу о том, что диссертация Волобуевой Александрины Сергеевны на тему: «Характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus*», представляет собой научно-квалификационную работу, по объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости соответствует требованиям, установленным в пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (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 диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, ученой степени кандидата наук.

В качестве официальных оппонентов рекомендуются:

Ленёва Ирина Анатольевна – доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Россия, г. Москва, ул. Малый Казенный переулок, д.5а).

Голицына Людмила Николаевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций, руководитель референс-центра по мониторингу за энтеровирусными инфекциями

