

О результатах публичной защиты диссертации

ВОЛОБУЕВОЙ Александрины Сергеевны

диссертация 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.

Диссертационный совет 24.1.255.01 на базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) принял решение о присуждении ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10. Вирусология ВОЛОБУЕВОЙ Александре Сергеевне (Протокол № 37 от 17 сентября 2025 года).

Присутствовали: Ишмухаметов А.А. д.м.н., профессор, академик РАН (1.5.10. Вирусология), Белякова А.В. к.б.н. (1.5.10. Вирусология), Костинов М.П. д.м.н., профессор, член-корр. РАН (1.5.10. Вирусология), Дзагурова Т.К. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Иванов А.П. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Еровиченков А.А. д.м.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Гамбарян А.С. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Калинина Н.О. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Иванова О.Е. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Кюрегян К.К. д.б.н., профессор РАН (1.5.10. Вирусология), Колясникова Н.М. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Никитин Н.А. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Гордейчук И.В. к.м.н. (1.5.10. Вирусология), Козловская Л.И. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Карганова Г.Г. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология).

Председатель диссертационного совета 24.1.255.01
академик РАН, профессор, доктор медицинских наук

А.А. Ишмухаметов

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.255.01
кандидат биологических наук

«17» сентября 2025 г.

А.В. Белякова



ПРОТОКОЛ № 37

заседания совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, соискание ученой степени кандидата наук
24.1.255.01 на базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита)

от 17 сентября 2025 года
11:00 час. МСК.

По списку членов диссертационного совета – 21 чел.

Присутствовало на заседании – 15 чел.

Председатель

диссертационного совета

– академик РАН, профессор, д.м.н. Ишмухаметов А.А.

Заместитель председателя

– профессор, д.м.н. Еровиченков А.А.

Ученый секретарь

– к.б.н. Белякова А.В.

Члены диссертационного совета:

Костинов М.П. д.м.н., профессор, член-корр. РАН (1.5.10. Вирусология), Дзагурова Т.К. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Иванов А.П. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Никитин Н.А. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Карганова Г.Г. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Иванова О.Е. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Козловская Л.И. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Гамбарян А.С. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Колясникова Н.М. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Гордейчук И.В. к.м.н. (1.5.10. Вирусология), Калинина Н.О. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Кюрегян К.К. д.б.н. (1.5.10. Вирусология).

ПОВЕСТКА ЗАСЕДАНИЯ:

1. Защита 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. Работа выполнена в 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.

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.

Официальные оппоненты:

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 Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, д. 71).

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Россия, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Летняя, 23).

СЛУШАЛИ: доклад 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.

Актуальность темы 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 (ОРВИ). 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 (вакцины одобрены ВОЗ) и EVA71 (вакцины зарегистрированы только в Китае). В большинстве случаев ЭВИ протекает без осложнений, в основе терапии лежит лечение, направленное на облегчение наиболее тяжелых симптомов, с применением иммунокорригирующих, патогенетических и симптоматических средств. Пациенты с поражением нервной системы и других органов, а также дети до 7 лет (при вспышках ЭВИ) подлежат госпитализации. 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 ЭВИ. Одним из недостатков применения этиотропных лекарственных средств является выработка вирусом резистентности к действующему веществу. Эту проблему помогает решить применение комбинаций лекарственных препаратов с различными механизмами действия. 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.

Степень разработанности темы исследования

Поиску препаратов для терапии инфекций, вызванных энтеровирусами, традиционно уделяется большое внимание. Среди препаратов с охарактеризованной активностью в отношении энтеровирусов с известным механизмом действия, можно выделить следующие группы: ингибиторы, связывающиеся с капсидом вируса и препятствующие его проникновению в клетку (плеконарил, пиродавир, вапендавир, покапавир, дизоксарил), ингибиторы вирусных протеаз (рупинтривир), ингибиторы вирусных полимераз (рибавирин, энвироксим, гемцитабин, амилорид), ингибиторы вирусной геликазы (дибукаин, флуоксетин). Тем не менее, ни один из перечисленных препаратов не прошел стадию клинических испытаний успешно. Среди соединений групп оксадиазолов и бензосульфамидов ранее было выявлено несколько активных молекул: плеконарил (в 1990-х гг.), 4 – (диметиламино)-бензойная кислота (в 2019 году), позже были синтезированы их производные. Был изучен механизм их действия, и было установлено, что соединения этих групп являются капсид-связывающими агентами. Производные плеконарила из класса оксадиазолов реализуют свою активность путем связывания с гидрофобным карманом, образованным капсидным белком VP1. Производные 4 – диметиламино бензойной кислоты из группы бензосульфамидов связываются с карманом на границе соседних протомеров вирусного капсида, образованного двумя белками VP1 и одним белком VP3. Для соединений класса лейковердазилов были описаны антиоксидантные свойства в бесклеточной системе. ЭВИ сопровождается окислительным стрессом, при этом показано, что генерация активных форм кислорода способствует репликации вирусного генома, а дефицит антиоксидантов усугубляет патогенез инфекции. Известно, что соединения с антиоксидантными свойствами могут обладать противовирусным действием. Например, на модели панкреатита мышей, зараженных вирусом Коксаки В4, применение дигидрокверцетина – антиоксиданта натурального происхождения – обеспечивало снижение титра вируса в ткани поджелудочной железы и восстанавливало нарушенные антиоксидантные свойства ткани. Таким образом, использование антиоксидантов либо в качестве монотерапии, либо в сочетании с различными этиотропными препаратами, воздействующими на разные этапы жизненного цикла вируса, может быть полезным для лечения вирусной инфекции.

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 пермиссивной клеточной культуры;

5. получить устойчивые к наиболее перспективным соединениям-лидерам штаммы энтеровирусов, локализовать в них генетические изменения и аминокислотные замены, связанные с резистентностью.

Научная новизна исследования

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 2C. Впервые показано, что штамм, резистентный к соединению-лидеру из группы лейковердазилов, несущий аминокислотные замены в вирусном белке 2C (S109I, N318Q), обладает сниженными ростовыми характеристиками в культуре клеток.

Теоретическая и практическая значимость исследования

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 2C, 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 полного цикла доклинических исследований.

Методология и методы исследования

Цитотоксичность новых гетероциклических соединений оценивали с помощью классической методики метилтетразолиевого теста. Исследование противовирусной активности соединений *in vitro* проводили на культурах клеток Vero, RD, MRC5 по лечебно-профилактической схеме. Титр вируса в среде определяли методом предельных серийных разведений. Для исследуемых соединений определяли значения 50% цитотоксической концентрации (CC_{50}), 50% эффективной концентрации (EC_{50}), 50% ингибирующей концентрации (IC_{50}), рассчитывали индекс селективности (SI). Определение механизмов действия наиболее перспективных соединений выполняли с помощью вирусологических методов. Для характеристики резистентных штаммов вируса Коксаки В3 использовали вирусологические и молекулярно-биологические методы. Оценку активности выбранных соединений *in vivo* проводили по лечебно-профилактической схеме введения на модели коксакивирусной инфекции у мышей BALB/c. Результаты анализировали с помощью обоснованных статистических методов. Значения $p \leq 0,05$ считали достаточными для вывода о статистической значимости различий, полученных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Соединения групп лейковердазилов, аналогов плеконарила и бензолсульфамидов обладают способностью ингибировать репродукцию энтеровирусов. Применение соединения-лидера из группы аналогов плеконарила (3-(3-Метил-4-(3-(3-N,N-диметилкарбамоилизоксазол-5-ил)пропокси)фенил)-5-трифторметил-1,2,4-оксадиазола) в экспериментах *in vivo* на модели коксакивирусной инфекции у мышей приводит к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в органе-мишени.

2. Наиболее активные соединения среди изученных аналогов плеконарила (соединение 32, 3-(3-метил-4-(3-(3-N,N-диметилкарбамоилизоксазол-5-ил)пропокси)фенил)-5-трифторметил-1,2,4-оксадиазол) и бензолсульфамидов (соединение 41, 2-((4-N-(4-карбоксифенил)сульфамоил)фенил)карбамоил) бензойная кислота, соединение 42, 4-((4-карбоксипропаноиламино) фенил)сульфонамидо)бензойная кислота) относятся к группе капсид-связывающих агентов.

3. Соединение 65 (2-(3,5-дифенил-5,6-дигидро-4Н-[1,2,4,5]тетразин-1-ил)- бензотиазол) из группы лейковердазилов ингибирует внутриклеточный этап репродукции энтеровирусов.

4. Резистентность вируса Коксаки В3 к соединению 32 сопровождается аминокислотными заменами в вирусных белках VP3 и VP1. Резистентность вируса Коксаки В3 к соединению 65 сопровождается аминокислотными заменами в вирусном белке 2С. Резистентные штаммы имеют сниженные ростовые характеристики.

Публикации по теме диссертации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 6 научных работах. Из них в журналах Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК) – 2 статьи, в научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и/или Scopus – 3 статьи. Получено патентов на изобретение в РФ – 1.

Личный вклад автора

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.

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».

Соответствие диссертации паспортам научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенной работы соответствуют областям исследований: пунктам 4, 10 и 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Выводы

1. В результате скринингового исследования среди лейковердазилов, аналогов плеконарила и бензолсульфамидов идентифицированы ингибиторы, обладающие максимальной активностью в отношении вируса Коксаки В3 (штамм Nancy).

2. Соединения-лидеры из группы аналогов плеконарила (соединение 32), бензолсульфамидов (соединения 41, 42), лейковердазилов (соединение 65), проявляли выраженный ингибирующий эффект в отношении различных штаммов вирусов рода *Enterovirus in vitro*. Наиболее широкий спектр активности был отмечен для аналога плеконарила.

3. В экспериментах *in vivo* проведена оптимизация модели энтеровирусного панкреатита у мышей. На разработанной модели показано, что применение соединения-лидера из группы аналогов плеконарила (соединение 32) по лечебно-профилактической схеме приводит к статистически значимому снижению степени проявления инфекции, в отличие от соединения-лидера из группы лейковердазилов (соединение 65) и производных бензолсульфамидов (соединения 41, 42).

4. Соединения 32, 41, 42 являются капсид-связывающими агентами, ингибирующими ранний этап жизненного цикла вируса. Соединение 65 ингибирует внутриклеточный этап репродукции вируса.

5. Резистентность вируса Коксаки В3 к соединениям 32 и 65 развивается в ходе серийного пассирования вируса в культуре Vero в присутствии указанных соединений. Резистентность к соединению 32 сопровождается аминокислотными заменами в белке VP1 (I207T, S225A, G254A, G264A) и белке VP3 (Y178F), к соединению 65 – заменами в белке 2C (S109I, H318Q).

Официальные оппоненты - Ленёва И.А. д.б.н., Голицына Л.Н. к.б.н. – *дали положительные отзывы на диссертацию.*

Ведущая организация – Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. (Россия, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Летняя, 23) - *дала положительный отзыв на диссертацию.*

Счетная комиссия избрана в составе: председатель – проф., д.б.н. Карганова Г.Г., члены комиссии – д.б.н., Козловская Л.И., к.м.н. Гордейчук И.В.

Результаты голосования: диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 15 докторов наук по специальности 1.5.10. Вирусология, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали: за – «15», против – «нет», недействительных бюллетеней – «нет».

Протокол тайного голосования утвержден открытым голосованием.

ПОСТАНОВИЛИ: основываясь на результатах тайного голосования присудить ВОЛОБУЕВОЙ Александrine Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Председатель диссертационного совета 24.1.255.01
академик РАН, профессор, доктор медицинских наук

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.255.01
кандидат биологических наук



А.А. Ишмухаметов

А.В. Белякова

«17» сентября 2025 г.