

ОТЗЫВ

Официального оппонента, кандидата химических наук Иванова Александра Владимировича на диссертационную работу Орлова Алексея Александровича "Исследование химического пространства ингибиторов репродукции вируса клещевого энцефалита *in silico* и *in vitro*", представленную в диссертационный совет Диссертационный совет Д 002.102.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.16 - "медицинская химия (химические науки)"

Диссертационная работа Алексея Александровича Орлова посвящена поиску и исследованию ингибиторов репликации вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), принадлежащего роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Вирусы этого семейства являются небольшими оболочечными вирусами, геном которых представлен (+)-цепью РНК. Кроме ВКЭ, к этому семейству принадлежат такие патогены как вирусы японского энцефалита, лихорадок Денге, Зика, Западного Нила и ряд других, также вызывающих острые и опасные инфекции. Среди вирусов рода *Flavivirus* на территории России распространен ВКЭ. Несмотря на существующую эффективную профилактическую вакцину, этот патоген до сих пор представляет угрозу для населения, как из-за неполного охвата данной вакциной даже проживающих в эндемичных районах людей, так и ввиду отсутствия терапевтических лекарственных средств для инфицированных пациентов. Нет разрешенных к использованию лекарственных препаратов и против других инфекций данного рода вирусов. При этом, существуют эффективные лекарства для излечения вируса гепатита С, относящегося к другому роду семейства *Flaviviridae*. Соответственно, представляется актуальной и значимой для вирусологии задачей поиск веществ, обладающих ингибиторной активностью в отношении ВКЭ, что и является задачей представленной диссертационной работы. И основным подходом, выбранным диссертантом, является систематический анализ данных в ряде баз об существующих ингибиторах репликации этого вируса и других флавивирусах для выявления соединений. Этот подход позволяет установить зависимости "структура-активность", попытаться предположить другие патогены, которые могут быть чувствительны к данному веществу, а также попытаться установить его механизм действия (выявить мишень).

Диссертационная работа имеет классическую структуру и состоит из разделов "Введение", "Обзор литературы", "Результаты и обсуждение", "Экспериментальная часть",

"Выводы", "Литература" и "Список сокращений". Она изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 38 рисунков и 19 таблиц. Список использованной литературы содержит 337 источников.

Введение аргументирует актуальность проблемы, кратко суммирует данные о разработанности темы, говорит о задачах диссертационной работы, ее научной новизне и значимости. Кроме того, данный раздел кратко излагает основные методы и подходы исследования. Наконец, во введении приведены данные о структуре диссертации, ее основные выносимые на защиту положения, а также говорится о достоверности результатов, их апробации и личном вкладе автора в их получении

Обзор литературы состоит из двух разделов изложения основных данных о флавивирусах и о методах анализа химического пространства. В первом из этих подразделов схематично представлены знания о клеточном цикле флавивирусов и об описанных в литературе ингибиторах репликации этих вирусов. Более того, в этом подразделе проведено обсуждение механизмов действия веществ и их мишеней. Во втором подразделе приведены данные о базах данных о биологической активности низкомолекулярных соединений, их архитектуре, концепции "химического пространства", подходах к его анализу и уменьшению его размерности. Незначительным замечанием к обзору литературы может быть отсутствие обсуждения модификации седьмого положения гетероцикла производных нуклеозидов (см. Рисунок 1.13): из текста диссертации можно сделать косвенный вывод, что замена атома азота на углерод необходима для взаимодействия лиганда с полимеразой, тогда как такая замена необходима для предотвращения узнавания веществ аденозиндезаминазой, которая может катаболизировать это производное аденозина. Кроме того, сам класс модифицированных нуклеозидов неверно именуется в работе нуклеозидными ингибиторами полимераз (см. второй абзац подраздела 1.1.3.4.2. На самом деле эти вещества превращаются в соответствующие трифосфаты (это в диссертации указано), которые являются не ингибиторами, а терминаторными субстратами РНК-полимераз, а ингибиторами они являются в отношении репликации вирусов.

Раздел "Результаты и обсуждение" состоит из четырех подразделов и заключения. В первом подразделе проведен анализ соединений, обладающих активностью в отношении флавивирусов в базе данных ChEMBL (FlaviChEMBL). В нем дано описание базы и видов аннотаций, описано количество веществ и спектр их известной активности, выделены наиболее часто встречающиеся мотивы и приведены примеры веществ с активностью в отношении широкого спектра вирусов. Во втором подразделе, который на

мой взгляд является основным в диссертационной работе, приведены экспериментальные данные исследования противовирусной активности веществ различных типов в отношении ВКЭ, в том числе серо- и селеносодержащих соединений, производных нуклеозидов с модификацией аминогруппы, 3'-метилированных нуклеозидов, нуклеозидов с полярными гидрофильными заместителями в гетероцикле, а также других различных производных пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов с модификациями азотистых оснований. Некоторые из исследованных соединений проявили ингибиторную активность в отношении вируса в микромолярных концентрациях. Наиболее активное вещество - N⁶-алкилированное производное аденозина с объемным (напр., тритильным) заместителем и в 5'-положении подавляло репродукцию ВКЭ на 50% в концентрации всего 2 мкМ. В диссертации предположено, что это и родственные вещества могут выступать в качестве ингибиторов РНК-полимеразной или метилтрансферазной активностей неструктурного белка NS5, для чего был выполнен докинг соединений в активных центрах фермента. Он показал, что теоретически эти вещества могут связываться с белком вируса, причем их положение частично перекрывается с положением природных субстратов. Этот вывод, хотя внешне и корректен, вызывает некоторое удивление: до сих пор 5'-O-триметильные производные нуклеозидов считались ингибиторами клеточных или паразитарных нуклеозидтрифосфатаз. Последнее ставит вопрос, почему в работе не исследовалось возможное взаимодействие веществ с NTPазным центром хеликазы NS3 (хеликазы флавивирусов обладают и NTPазной активностью), а также не принято в расчет, что активный полимеразный центр полимеразы содержит два иона дивалентных металлов, что требует наличия у субстрата трех остатков фосфорной кислоты. Наконец, возможность взаимодействия веществ с полимеразой вируса можно было бы проверить экспериментально, получив рекомбинантный белок. Основываясь на данных о других флави- и пестивирусах, клонирование и экспрессия гена неструктурного белка NS5(b) в клетках бактерий и наладка систем измерения его ферментативной(ых) активности(ей) представляет собой не очень сложную задачу.

Третий, краткий, подраздел, посвящен краткому обсуждению полученных в работе данных о цитотоксичности исследованных соединений. Следует отметить, что автор критически рассматривает полученные им данные и верно обсуждает их в контексте данных о противовирусной активности. Некоторым пожеланием можно высказать приведение данных о растворимости исследуемых соединений в присутствии выбранного процента ДМСО для соотнесения с данными об активности/цитотоксичности.

Четвертый подраздел отражает часть работы, заключающуюся в виртуальном скрининге веществ в отношении ВКЭ и энтеровирусов среди библиотеки соединений компании InterBioScreen, отбору соединений, которые могли являться ингибиторами репродукции вируса и верификации такого отбора исследованием свойств *in vitro*. Виртуальный скрининг позволил выбрать почти пятьдесят веществ для исследования активности. В рамках работы установлено, что ряд соединений подавлял репродукцию ВКЭ в микромолярных концентрациях. Исходя из аннотации веществ как ингибиторов других флавивирусов, были сделаны рациональные предположения о механизме их действия в отношении ВКЭ.

Раздел "Экспериментальная часть" содержит методики проведения всех экспериментов, на которых строится данная диссертация, как теоретических, так и биологических. Их содержание и оформление полностью достаточно для воспроизведения экспериментов. Пожеланиями к данному разделу являются указание каталожного номера диметилсульфоксида (так как ряд клеточных линий очень чувствительны к его качеству), четкому приведению максимальной концентрации данного растворителя в культуральной среде при исследовании противовирусной активности и цитотоксичности веществ и указанию источника клеточной линии СПЭВ.

Выводы, сделанные автором в работе, являются достоверными, полностью аргументированы и подкреплены экспериментальными данными. Они соответствуют поставленным задачам.

Значимые замечания по содержанию диссертационной работы и методическим ее аспектам отсутствуют. Комментарии к разделам работы, приведенные выше, являются вопросами или комментариями и абсолютно не влияют на уровень диссертации, достоверность материала и не ставят под сомнение выводы. Кроме этих замечаний, можно отметить наличие в тексте работы нескольких неудачных слов и словосочетаний. Например, "белок капсида С", которое встречается в литературном обзоре: С и обозначает Capsid (капсид). Другим - слово "цитозол" на рисунке 1.9: есть русское слово "цитоплазма". Представляется также, что заголовки подразделов 1.1.3.4.1 и 1.1.3.4.2 правильнее было бы изменить на "Ингибиторы метилтрансферазной/полимеразной активности белка NS5", и сделать то же самое для заголовка подраздела 1.1.3.2.2. - "Ингибиторы хеликазной активности белка NS3". Тем не менее, хотелось бы отметить, что А.А. Орлов очень тщательно подошел и к оформлению работы: она легко читается, заметного количества опечаток нет, список литературы оформлен в строгом соответствии с ГОСТом.

Данная диссертационная работа обладает несомненно высокой научной новизной и является значимой для области исследований. В ней А.А. Орловым было исследовано 148 соединений нуклеозидной и нуклеозидной природы и выявлено несколько групп веществ, которые обладают заметной ингибиторной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита. Это может стать основой для разработки на их основе лекарственных препаратов для терапии заболевания, вызываемого этим патогеном. Кроме того, в работе отработан подход по поиску уже известных в литературе веществ с биологической активностью и перепрофилированию их в качестве потенциальных блокаторов репродукции исследуемого вируса. Это может быть востребовано для поиска противовирусных препаратов в отношении иных вирусов рода *Flavivirus*.

Текст автореферата полно отражает содержание самой диссертации. Он включает поставленные в работе задачи, выносимые на защиту положения, все основные результаты, заключение и выводы. Основные результаты диссертации отражены в 18 публикациях, в том числе в 8 статьях в высокорейтинговых научных рецензируемых журналах, 9 тезисов докладов на конференциях и 1 патента РФ. Кроме того, они представлены на 7 международных конференциях.

Таким образом, диссертация Алексея Александровича Орлова является завершенной научно-квалификационной работой, посвященной поиску новых блокаторов репродукции флавивирусов на примере вируса клещевого энцефалита. По своему содержанию, актуальности, новизне и научному уровню диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук (с изменениями, утвержденными постановлением Правительства Российской Федерации от 01.10.2018 г. №1168), а ее автор, Алексей Александрович Орлов, заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.16 - "медицинская химия (химические науки)".

Официальный оппонент:

Иванов Александр Владимирович

Ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии вирусных инфекций

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук (ИМБ РАН)

Кандидат химических наук

А.В. Иванов

шифр специальности 03.01.03 - "молекулярная биология"

Адрес: 119991, ул. Вавилова, д.32

Рабочий телефон +7(499)135-6065

Адрес электронной почты: aivanov@yandex.ru

03 сентября 2019 г.

Подпись к.х.н. Иванова А.В.

ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ИМБ РАН

К.в.н,



А.А. Бочаров