

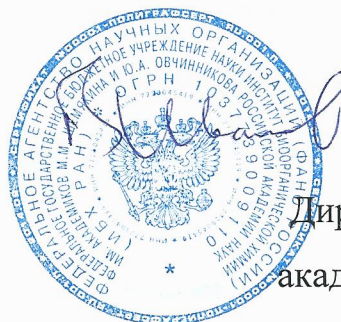


Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

08.12.16 № 158-214.1-920

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_



"УТВЕРЖДАЮ"  
Директор Института  
академик В.Т.Иванов

" " декабря 2016 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Дугеовой Евгении Владимировны «Разработка низкомолекулярных ингибиторов репродукции переносимых клещами флавивирусов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.16 – медицинская химия

Среди заболеваний, вызываемых флавивирусами, для России наиболее острую проблему представляет клещевой энцефалит: на эндемичных по клещевому энцефалиту территориях, проживает около 64 млн. человек, ежегодно количество случаев заболевания в России достигает 3 000. Помимо этого, имеются очаги совместного распространения вируса клещевого энцефалита и других флавивирусов, в частности, вируса лихорадки Западного Нила или вируса Повассан. Наиболее эффективным методом борьбы с клещевым энцефалитом является своевременная вакцинация, однако уровень

вакцинирования населения РФ по-прежнему остается низким, а заболеваемость клещевым энцефалитом растет в некоторых регионах. Таким образом, существует необходимость в разработке новых подходов и препаратов для лечения клещевого энцефалита и других заболеваний, вызываемых близкородственными флавивирусами. Диева Е. В. в своей работе сосредоточилась на рациональном поиске малых молекул, способных связываться в гидрофобном кармане белка Е оболочки флавивирусов и предотвращать репродукцию вируса клещевого энцефалита и родственного ему вируса Повассан. Круг объектов исследования выбран по критерию важности и актуальности для медицинских и фармакологических приложений.

Диссертационная работа построена традиционно и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа Диевой Е. В. изложена на 130 страницах и содержит 23 таблицы и 48 рисунков. Библиографический указатель включает 266 наименований.

Во введении четко обоснована актуальность темы диссертации и выбор рассматриваемых объектов, каковыми являются вирус клещевого энцефалита и вирус Повассан, для дизайна ингибиторов, сформулирована цель работы и обоснована ее практическая значимость, а также отмечен личный вклад автора в представленные результаты.

В обзоре литературы изложены современные представления об эпидемиологической картине флавивирусных инфекций, переносимых клещами, жизненном цикле флавивирусов, подробно описано строение выбранной мишени — белка Е оболочки флавивирусов, описан механизм процесса слияния вирусной и клеточной мембран и роль белков оболочки в нем. Отдельно стоит выделить обзор ингибиторов репродукции флавивирусов, мишенью которых является белок Е и стадия слияния. Представленный обзор содержит актуальную информацию (представлены публикации вплоть до 2016 года) и может быть полезен для специалистов в области медицинской химии, работающих в области дизайна противовирусных соединений. Представленный автором критический обзор литературных источников дает основание сделать вывод об актуальности



выбранной для диссертационного исследования темы и позволяет получить адекватное представление о современном состоянии исследований по проблематике работы.

Условно работу диссертанта можно разбить на теоретическую и экспериментальную части. В разделе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны методики вычислительных и вирусологических экспериментов, которые при необходимости можно легко воспроизвести.

В первой довольно краткой главе раздела «Результаты и обсуждение» описывается построение по гомологии моделей пространственной структуры растворимых эктодоменов белков E вируса клещевого энцефалита и вируса Повассан. Построенные модели в дальнейшем используются для поиска соединений с антивирусной активностью.

Вторая глава посвящена виртуальному скринингу библиотеки ХимЭкс низкомолекулярных гетероциклических соединений. По результатам докинга из 6000 соединений автором было отобрано 89, которые были протестированы *in vitro* против вирусов клещевого энцефалита и Повассан. Основным результатом главы является идентификация 7 соединений, относящихся к классам 1,4-дигидропиридина и 1,3,5-тиадиазина и эффективно ингибирующих репродукцию вируса клещевого энцефалита. Максимальная величина  $EC_{50}$  составила 0,07 мкМ. Два из обнаруженных соединений активны и против вируса Повассан. Автор также приводит результаты исследования механизма действия идентифицированных ингибиторов, которые свидетельствуют о том, что данные низкомолекулярные соединения проявляют активность на стадии проникновения вируса в клетку, по всей вероятности, взаимодействуя с белками вирусной оболочки.

В третьей главе проводится анализ влияния связывания малых молекул — ингибиторов репродукции - с димерами белков оболочки E методом моделирования молекулярной динамики. На основании полученных результатов автор делает вывод о том, что связывание с ингибитором приводит к увеличению конформационной подвижности белка E, что в свою очередь может вызывать снижение инфекционности вирионов.

Четвертая глава посвящена дизайну производных 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксида в качестве ингибиторов репродукции вируса клещевого энцефалита на основе докинга 2,6-замещенных 4-фторпиримидин-N-оксидов в карман модели белка E (дизайн, основанный на фрагментном подходе). Из 27 предложенных соединений 9 проявили ингибирующую активность в испытаниях *in vitro*. Данные о способах связывания молекул в кармане белка, полученные в результате докинга, хорошо согласуются с экспериментально установленными величинами активности.

В пятой главе проведен анализ биологической активности 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов по отношению к 8 различным штаммам вируса клещевого энцефалита всех известных подтипов. При этом установлено, что идентифицированные в ходе работы соединения способны ингибировать репродукцию всех исследованных штаммов. Это является важным шагом в разработке прототипа противовирусного соединения, так как на одних и тех же территориях могут циркулировать различные варианты вируса, следовательно, широкий спектр активности является важнейшим качеством противовирусного препарата. На основе полученных результатов в диссертационной работе была выдвинута гипотеза о том, что часть белка E, не участвующего в формировании инфекционных вирионов, может играть значительную роль в определении активности противовирусных соединений, действующих на белки оболочки. Также приводятся результаты экспериментов, подтверждающих эту гипотезу.

Оценивая в целом диссертационную работу Дугевой Е. В., необходимо отметить большой объем проделанных исследований, высокую степень достоверности и надежности полученных результатов и их новизну. Выводы и заключения конкретны и достаточно обоснованы. Представленное исследование является важным шагом в разработке препаратов, направленных против вируса клещевого энцефалита и других родственных вирусов. Однако работа не лишена отдельных недостатков, в связи с чем возникает ряд вопросов и замечаний:

- 1) Время моделирования молекулярной динамики в 30 нс представляется недостаточными, чтобы надежно констатировать изменение подвижности белков под действием связывания малых молекул.



2) Вводную информацию к главе 3 «Результатов и обсуждения» было бы уместно перенести в раздел Обзор литературы.

3) На рисунке 29 не указана погрешность измерений.

4) В тексте присутствует небольшое количество опечаток.

Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают высокой, в целом, оценки работы Дуевой Е. В. Работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит новые интересные научные данные. Полученные автором результаты, наряду с важным справочным материалом, несомненно будут полезны специалистам в области медицинской химии и могут найти применение в ВУЗах и научно-исследовательских организациях — на ряде естественнонаучных факультетов МГУ имени М.В. Ломоносова, СПбГУ, НГУ и др, в Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и др.

Среди материалов диссертационной работы следует выделить ряд полученных автором результатов, представляющих наибольшее практическое значение:

1) Найденные ингибиторы репродукции вирусов клещевого энцефалита и Повассан могут быть использованы в качестве прототипов для создания терапевтических средств для борьбы с вызываемыми этими вирусами инфекциями.

2) Установленное влияние белка оболочки, не участвующего в формировании инфекционных вирионов, следует учитывать при подготовке и характеристике вирусных препаратов для испытания соединений, действующих на белки оболочки, и при сравнении результатов измерений их активностей, полученных разными научными группами.

3) Полученные модели структур белков оболочки E могут быть применены для дальнейшего поиска новых ингибиторов репродукции флавивирусов методами, основанными на знании структур мишени, что было невозможно до представленной работы. Примечательно, что модели находятся в

открытом доступе.

Выносимые на защиту результаты в достаточной мере отражены в трех статьях в рецензируемых международных журналах (индексируются в Web of Science) и тезисах международных и российских конференций. В двух статьях Е. В. Дуева является первым автором.

Таким образом, работа Дуевой Е. В. отвечает всем требованиям ВАК РФ, включая п. 9 – 14 Положения о порядке присуждения ученых степеней (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 года в редакции от 21.04.2016 года), предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор — Дуева Евгения Владимировна — заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.16 – медицинская химия.

Зав. лабораторией молекулярной токсикологии  
ФГБУН Институт биоорганической  
химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
д.х.н., профессор



Уткин Ю. Н.



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук  
( ИБХ РАН )

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

*02.02.16 № 158-651.4-919*

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_



В диссертационный совет Д  
501.001.69 при Московском  
государственном  
университете имени М.В.  
Ломоносова

О назначении ведущей организации

ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук согласен выступить в качестве ведущей организации по диссертации Дуевой Евгении Владимировны на тему «Разработка низкомолекулярных ингибиторов репродукции переносимых клещами флавивирусов», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.16 – медицинская химия.

Директор ФГБУН Институт  
биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
академик



Иванов В. Т.





Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

08.12.16 № 158-651.4-921

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

В диссертационный совет Д  
501.001.69 при Московском  
государственном  
университете имени М.В.  
Ломоносова

Сведения о ведущей организации

по диссертационной работе Дуевой Евгении Владимировны «Разработка низкомолекулярных ингибиторов репродукции переносимых клещами флавивирусов», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.16 – медицинская химия.

- 1) Полное наименование ведущей организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук».
- 2) Адрес ведущей организации: 117997, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.
- 3) Сайт в сети интернет, адрес электронной почты: [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru), [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru).
- 4) Телефон: +7-495-335-01-00.
- 5) Список публикаций сотрудников ведущей организации по теме диссертации соискателя:

Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Janickova H., Dolejsi E., Dolezal V., Utkin Y.N., Tsetlin V.I., Arseniev A.S., Efremov R.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. (2015). Structural Insight into



Specificity of Interactions between Nonconventional Three-finger Weak Toxin from *Naja kaouthia* (WTX) and Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* 290 (39), 23616–236.

Utkin Y.N., Weise C., Kasheverov I.E., Andreeva T.V., Kryukova E.V., Zhmak M.N., Starkov V.G., Hoang N.A., Bertrand D., Ramerstorfer J., Sieghart W., Thompson A.J., Lummis S.C., Tsetlin V.I. (2012). Azemiopsin from *Azemiops feae* viper venom, a novel polypeptide ligand of nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 287 (32), 27079–86.

Kudryavtsev D.S., Shelukhina I.V., Son L.V., Ojomoko L.O., Kryukova E.V., Lyukmanova E.N., Zhmak M.N., Dolgikh D.A., Ivanov I.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Ramerstorfer J., Sieghart W., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. (2015). Neurotoxins from Snake Venoms and  $\alpha$ -Conotoxin ImI Inhibit Functionally Active Ionotropic GABA Receptors. *J. Biol. Chem.* 290(37), 22747-58.

Дубовский П.В., Уткин Ю.Н. (2014). Цитотоксины кобр: структурная организация и антибактериальная активность. *Acta Naturae* 6 (3), 12–19.

Hoang A.N., Vo H.D., Vo N.P., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Andreeva T.V., Serebryakova M.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. (2014). Vietnamese *Heterometrus laoticus* scorpion venom: evidence for analgesic and anti-inflammatory activity and isolation of new polypeptide toxin acting on Kv1.3 potassium channel. *Toxicon* 77, 40–48.

Kudryavtsev D., Shelukhina I., Vulfius C., Makarieva T., Stonik V., Zhmak M., Ivanov I., Kasheverov I., Utkin Y., Tsetlin V. (2015). Natural compounds interacting with nicotinic acetylcholine receptors: from low-molecular weight ones to peptides and proteins. *Toxins (Basel)* 7 (5), 1683–1701.

Директор ФГБУН Институт  
биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
академик



  
Иванов В. Т.