

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Н.Б. Рудометовой на тему

“Конструирование псевдовирусов рекомбинантной формы CRF63\_02A и подтипа A6 ВИЧ-1 и их использование для поиска ингибиторов проникновения вируса в клетку-мишень“, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5. 3 – “Молекулярная биология“

### Актуальность темы.

По последним данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, по состоянию на конец первого полугодия 2021 г. среди граждан Российской Федерации было зарегистрировано 1 528 356 человек с подтвержденным в иммунном блоте диагнозом «ВИЧинфекция», в том числе: 1 122 879 россиян, живущих с ВИЧ, и 405 477 умерших. Пораженность (показатель наличия инфекции на 100 000 населения) ВИЧ-инфекцией на 30 июня 2021 г. уже составила 768,2 на 100 тыс. населения России, что пока меньше, чем в странах Евросоюза (1303/100 000 населения <https://www.ecdc.europa.eu>), но уже больше, чем в США (431/100 000 населения старше 13 лет (по данным на 30.06.2021, <https://www.hiv.uw.edu>). Столь значительный рост заболеваемости и сложности терапии ВИЧ-инфекции в условиях генетического разнообразия возбудителя подчеркивают актуальность исследований, направленных на поиск наиболее специфичных лекарственных средств против ВИЧ-1.

Перспективы лечения ВИЧ-инфекции во многом связывают с разработкой широкой линейки препаратов, проявляющих активность на наиболее ранних этапах взаимодействия вируса с клетками-мишенями организма и действующих как блокаторы проникновения вируса в клетки, предотвращая создание резервуаров вируса и ограничивая его распространение в организме. Использование естественных, первичных изолятов ВИЧ для проведения целенаправленного, расширенного скрининга химических соединений и фармакологических препаратов с такой активностью значительно затрудняет, замедляет и удорожает эксперименты вследствие необходимости соблюдения проблем биобезопасности. Имеющиеся библиотеки псевдовирусов, несущих на своей поверхности структурно идентичный натуральному поверхностный белок Env, не покрывают всего разнообразия подтипов ВИЧ, доминирующих в различных географических зонах и странах. Поэтому изучение генетического разнообразия вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в разных регионах страны, и разработка скринирующих систем, помогающих высокотехнологичному поиску соответствующих препаратов, является актуальной темой. Выбранное диссертантом направление научных исследований – исследование генетического разнообразия вариантов ВИЧ-1 и создание рекомбинантных псевдовирусов на основе полученных результатов, последующее применение созданных псевдовирусов для скрининга соединений, блокирующих ранние этапы взаимодействия ВИЧ-1 с клеткой-мишенью, имеет непосредственное отношение к решению этой актуальной для Российской Федерации проблемы. Особенно актуальна выбранная тема для Сибирского федерального округа, поскольку работа направлена на обоснование и разработку вариантов псевдовирусов, которые были бы полезны при скрининге препаратов, способствующих предотвращению достаточно быстро развивающейся в

данном регионе эпидемии ВИЧ-1 – с учетом специфики доминирующих в регионе генетических вариантов ВИЧ-1.

### **Характеристика работы и соответствие темы диссертации выбранной научной специальности**

Тема диссертационной работы Н.Б. Рудометовой посвящена исследованию генетического разнообразия вариантов ВИЧ-1, созданию рекомбинантных псевдовирусов на основе доминирующих в Сибирском регионе вариантов ВИЧ-1 и их последующему применению для скрининга соединений, блокирующих ранние этапы взаимодействия ВИЧ-1 с клеткой-мишенью. По сути, в диссертации изложены результаты интенсивных исследований диссертанта по получению фундаментальных знаний о генетическом разнообразии вариантов ВИЧ-1 в различных регионах Сибирского федерального округа и разработке на основе полученных сведений рекомбинантных молекулярных продуктов – псевдовирусов, полезных для использования в качестве компонента высокотехнологичной системы скрининга молекул - ранних ингибиторов ВИЧ-1, в особенности – доминирующих в данном конкретном регионе. Работу отличает тщательное и адекватное использование спектра современных молекулярно-биологических методов, включающих генетическое конструирование, клонирование ДНК с последующим биоинформатическим анализом нуклеотидных последовательностей, работа с рекомбинантными молекулами ДНК, методы оценки экспрессии рекомбинантных генов в клетках стабильной, генетически модифицированной клеточной линии TZM-bl, экспрессирующей ключевой и вспомогательные рецепторы ВИЧ-1 – CD4, CCR5, CXCR4, ПЦР в реальном времени, анализ продуктов ПЦР с помощью электрофоретического разделения.

Перечень использованных в диссертации методов, направление исследований, содержание научных исследований диссертанта, изложенное в диссертационной работе, указывают однозначно на то, что тематика диссертации полностью соответствует паспорту, утвержденному ВАК для заявленной специальности: 1.5.3 – молекулярная биология.

### **Основные результаты диссертационной работы. Научная новизна и практическая ценность работы.**

Структурные элементы работы – введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и цитированная литература – традиционно и информативно изложены на 127 страницах. Иллюстрируют исследование 26 рисунков, 10 таблиц и 1 приложение с данными образцов, включенных в исследование. Вполне современный список литературы включает 248 источников, из которых 20 отечественных источников; более трети источников – свежие, до 5 лет (2016-2021 г.г.).

В диссертационном исследовании Н.Б. Рудометовой изучено распространение генетических вариантов ВИЧ-1 в различных регионах Сибирского федерального округа, на основе полученных сведений разработаны 13 рекомбинантных молекулярных продуктов – псевдовирусов, экспрессирующих белок оболочки Env, конструированных на основе доминирующих в регионе форм CRF63-02A и подтипа A6, заложены основы и валидирована технология скрининга фармакологически активных соединений - ранних ингибиторов ВИЧ-1.



При исследовании генетического разнообразия вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в нескольких западных областях Сибирского федерального округа РФ, верифицировано доминирование рекомбинантной формы 63 - CRF63-02A – она встречается более чем в 70%. Впервые показано, что в республике Алтай более 50% изученных изолятов принадлежат к подтипу А6, при этом в данном субрегионе к форме CRF63-02A относится до трети всех выявленных изолятов. Впервые при исследовании данных форм ВИЧ-1 охарактеризован спектр мутаций областей генов ВИЧ-1, кодирующих протеазу и обратную транскриптазу, в том числе – мутации резистентности к нуклеодиным (M41L, K65R) и ненуклеозидным (K103N) ингибиторам обратной транскриптазы. Разработанная новая высокотехнологичная система скрининга соединений, активных в отношении регион-специфических подтипов ВИЧ-1, позволила впервые выявить кандидатные фармакологически активные соединения – триникотинаты глицирризиновой кислоты и производное адамантана N-(2- адамантил)-N-(2-п-бромфенил)амин, ингибирующих проникновение разработанных псевдовирuses в клетки.

Несомненное достоинство диссертационного исследования в том, что путем анализа нуклеотидной последовательности участка V3 гена env псевдовирuses были достаточно четко охарактеризованы их субтипы. Проведение большого массива работы (проанализировано 70 клонов псевдовирuses) позволило выявить 13 функционально активных псевдовирусных частиц, 11 из которых принадлежали к рекомбинантной форме 63 и 2 варианта – к подтипу А6. Определение функциональной активности псевдовирuses по способности инфицировать модельную клеточную линию TZM-bl и их чувствительности к нейтрализации верифицированными на международном уровне молекулярными реагентами - моноклональными антителами, нейтрализующими ВИЧ-1 (Программа реагентов [по изучению] СПИД, Институт здоровья, США), позволили обосновать высокий потенциал адекватности выделенных и охарактеризованных псевдовирuses как полезных инструментов для решения практических задач с высоким потенциалом клинического значения. Так, разработанные псевдовирuses могут быть использованы как биобезопасные агенты для первичного скрининга в высокотехнологичном формате моноклональных антител, коллекций других рекомбинантных молекул (на основе пептидов или нуклеиновых кислот) в единой системе с клетками-мишенями ВИЧ-1 с целью выявления анти-Env молекул, препятствующих вхождению вируса в клетки. Другой практической формой реализации результатов работы диссертанта может явиться применение новых псевдовирuses при мониторинге иммунного ответа – при разработке вакцин для оценки нейтрализующей активности сыворотки вакцинированных животных и вакцинированных - при клинических исследованиях, а впоследствии – и для массового мониторинга вируснейтрализующей активности сывороток вакцинированных для оценки пост-вакцинного уровня адаптивного иммунитета к ВИЧ-1 или даже уровня протективного иммунитета в популяции региона.

Высокий потенциал практического использования результатов проведенного исследования подтверждается и проведенным анализом противовирусной активности библиотеки фармакологически активных соединений – 47 производных природных терпеноидов, а также 11 других препаратов на основе глицирризиновой кислоты. Достоинством исследования было предварительное проведение оценки токсичности соединений с использованием классического МТТ теста и определение противовирусной активности уже в диапазоне нетоксических концентраций. Использование референс-препарата – официально одобренного для клинического применения лекарственного препарата маравирок – ингибитора проникновения ВИЧ-1 в клетки, явилось еще одним

методическим приемом, свидетельствующим о качестве дизайна исследования. В результате были выявлены препараты, активные как в отношении псевдовирюсов, входящих в международную панель и мимицирующих подтипы ВИЧ-1 с широким распространением в других регионах, так и ингибирующих проникновение в клетки-мишени псевдовирюсов, полученных в ходе данного исследования, т.е. биобезопасных вариантов, моделирующих специфичные для региона формы и подтип ВИЧ-1. Практически значимой новизной исследования оказалось обнаружение довольно высокой активности - в отношении псевдовирюсов, мимицирующих обнаруженные в работе доминирующие в регионе генетические варианты ВИЧ-1 - некоторых уже известных анти-ВИЧ-1 препаратов, содержащих ди- и триникотинаты глицирризиновой кислоты, не изучавшихся ранее с использованием псевдовирюсных систем, а также производных адамантанового ряда, в том числе - лекарственных препаратов, в отношении которых антивирюсная активность ранее была неизвестна.

### **Обоснованность положений диссертации и достоверность полученных результатов**

Использование разнообразного набора современных методов молекулярной биологии, биоинформатических он-лайн ресурсов, в сочетании с современным, адекватным характеру исследований статистическим аппаратом, высокая информативная ценность 36 единиц иллюстративного материала (таблиц и рисунков) обеспечили высокую достоверность всех полученных результатов. Однонаправленный характер результатов – в том числе, в части исследования, при использовании разных концентраций соединений в комбинации с информативно иллюстрирующими значимость различий рисунками - дополнительно подтверждают их достоверность .

**Строгая аргументированность, доказательная логика подробного изложения, последовательная детализация при описании проведенных экспериментов и молекулярно-биологических исследований, новизна выводов диссертационной работы, обоснованность которых доказывается на достаточном для выявления значимых различий статистически обработанном материале, позволяют считать диссертацию завершенной.** Новые данные, содержащиеся в диссертации, в отношении разработанных псевдовирюсных конструкций, мимицирующих регионально распространенные генетические варианты ВИЧ-1, делают существенный вклад в технологическое обеспечение биобезопасного поиска высокоактивных препаратов анти-ВИЧ-1, способных препятствовать быстрому распространению инфекции в организме.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Н.Б. Рудометовой на тему “Конструирование псевдовирюсов рекомбинантной формы CRF63\_02A и подтипа A6 ВИЧ-1 и их использование для поиска ингибиторов проникновения вируса в клетку- мишень“, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5. 3 – “Молекулярная биология“, является законченной научно-квалификационной работой. В ней на основании выполненных автором исследований предложено новое научно обоснованное технологическое решение - создание псевдовирюсных конструкций, учитывающих генетическое разнообразие ВИЧ-1 с доминированием генетически различных подтипов вируса в отдельных регионах Российской Федерации, что позволит осуществлять высокопроизводительный скрининг антивирюсных препаратов для выявления соединений с высокой активностью в отношении ВИЧ-1 в организме инфицированных на территории определенных регионов. Использование подобных биобезопасных псевдовирюсных



конструкций в стратегиях экспериментальных разработок вакцин и поиска лекарственных препаратов позволит разрабатывать более эффективные средства профилактики и лечения, учитывающие специфичные для региона особенности распространения вирусного возбудителя социально значимой вирусной инфекции.

Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3 – “Молекулярная биология”.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией и главный научный сотрудник  
лаборатории молекулярных механизмов критических состояний  
Научно-исследовательского института общей реаниматологии  
имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и  
реабилитологии Министерства образования и науки Российской Федерации, ведущий  
научный сотрудник лаборатории ИСМП Центрального научно-исследовательского  
института эпидемиологии Роспотребнадзора,  
доктор медицинских наук, профессор

Владимир Митрофанович Писарев

“ 30 “ ноября 2021 г.

Подпись Писарева Владимира Митрофановича, заведующего лабораторией  
молекулярных механизмов критических состояний НИИОР имени В.А.Неговского ФНКЦ  
РР, заверяю:

Зам. директора-руководитель НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФНКЦ  
РР,

д.м.н., доцент



107031 Российская Федерация, Москва, Петровка, 25, строение 2

Тел. +7 (495) 694 27 08

Сайт: <https://fnkcr.ru> e-mail: kuzovlev@fnkcr.ru