

ОТЗЫВ

на диссертационную работу **Крылова Вадима Борисовича** «Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: Синтез и приложение в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия

В настоящее время лекарственная устойчивость (резистентность) наиболее опасных видов возбудителей клинически значимых видов бактериальных и грибковых инфекций превращается в государственную проблему. Например, смертность детей от стафилококкового сепсиса сегодня такая же, что и до появления антибиотиков. В результате тяжелых резистентных бактериальных инфекций даже в странах Европейского союза ежегодно умирает около 30 тысяч человек. Различные микроорганизмы стали проявлять устойчивость уже к самым современным лекарственным средствам, меняется спектр возбудителей, грамположительная флора меняется на грамотрицательную и наоборот, патогенная – на условно-патогенную, а инфекционные заболевания по-прежнему являются основной причиной смертности в мире в странах с низким уровнем дохода (к ним сейчас уже можно отнести и РФ ?). Одним из важнейших путей борьбы с лекарственной резистентностью является разработка перспективных высокоэффективных лекарственных препаратов с новым механизмом действия. К таковым относятся вакцины 3-его поколения на основе синтетических олигосахаридных лигандов строго определенного строения, соответствующего строению антигенных полисахаридов бактериальных и грибковых патогенов. В РФ такие вакцины не производятся, а закупаемые на Западе антимикробные вакцины (их можно пересчитать на пальцах одной руки), во-первых, дороги, а, во-вторых, в связи с санкциями, их поставка может прекратиться. Поэтому диссертационная работа Вадима Борисовича Крылова, посвященная разработке принципиально нового метода синтеза и сам синтез гетероолигосахаридов строго заданного строения, соответствующего строению поверхностных антигенных полисахаридов опаснейших бактериальных и грибковых патогенов, с целью создания на их основе иммуноферментных диагностикумов и антимикробных вакцин 3-го поколения,, является **безусловно актуальной и практически значимой**.

Диссертационная работа состоит из трех разделов – синтетического, структурного и биологического.

Синтетический раздел диссертационной работы посвящен описанию открытой В.Б.Крыловым пиранозид-фуранозидной перегруппировки и её применению для синтеза гетероолигосахаридов, моделирующих фрагменты антигенных полисахаридов, входящих в состав клеточной стенки ряда патогенных бактерий и грибов. Открытая пиранозид-фуранозидная перегруппировка, протекающая при исчерпывающем сульфатировании полигидроксильных олигосахаридов в присутствии сильных кислот, представляет собой **новый, оригинальный метод органического синтеза**, безусловно востребованный для получения гликанов с фуранозидными остатками. Дело в том, что традиционный подход к синтезу фуранозидсодержащих олигосахаридов, заключающийся в модификации в требуемых положениях стандартных фуранозидных предшественников, которые затем вовлекаются в реакции гликозилирования, эффективен лишь для получения сравнительно простых олигосахаридов и не пригоден для синтеза практически значимых олигосахаридов с галактофуранозидными остатками, соответствующих фрагментам антигенных полисахаридов патогенных бактерий и грибов.

Синтетические возможности открытой перегруппировки были использованы диссертантом для синтеза обширной библиотеки олигосахаридов, структурно родственных фрагментам природного полисахарида галактоманнана, входящего в состав клеточной стенки грибов рода *Aspergillus*. Инфицирование данным грибом вызывает у людей с ослабленным иммунитетом тяжелые и трудноизлечимые инвазивные микозы, в том числе смертельное заболевание инвазивный аспергиллёз лёгких.

Другим практически значимым объектом данного исследования был полисахарид галактан I, входящий в состав O-цепи липополисахаридов большинства антибиотикорезистентных штаммов бактерии *Klebsiella pneumoniae*. Эта бактерия является широко распространенным возбудителем больничных и внебольничных пневмоний и входит в перечень патогенов группы «ESKAPE», представляющих наибольшую опасность для человечества в связи с растущей антибиотикорезистентностью. С использованием открытой перегруппировки были синтезированы структурно подобные галактану I ди-, тетра- и гексасахариды, содержащие чередующиеся остатки α -D-галактопиранозы и β -D-галактофуранозы, связанные между собой (1 \rightarrow 3)-гликозидными связями. Следует отметить, что они были успешно использованы в качестве антигенов для скрининга антител в сыворотках крови животных, иммунизированных препаратами из различных штаммов *K. Pneumoniae*.

Значительная часть этого раздела посвящена синтезу олигосахаридов, моделирующих фрагменты дигетерогликана, являющегося поверхностным антигеном наиболее опасных серотипов бактерии *Enterococcus faecalis*. С использованием пиранозид-фуранозидной перегруппировки были синтезированы модельные галактофуранозид-галактопиранозидный дисахарид с остатком (R)-молочной кислоты и серия ди-, тетра-, гекса- и октасахаридов (уже без остатка R-молочной кислоты), структурно соответствующих полисахаридам клеточной стенки *E. faecalis*.

Разработанные диссертантом синтетические подходы были им успешно использованы для получения три- и дисахаридов, родственных фрагменту галактоксиломаннана гриба *Cryptococcus neoformans*.

Подводя итог этому разделу диссертационной работы, следует отметить, что успешно проведенный с использованием пиранозид-фуранозидной перегруппировки синтез олигосахаридов, моделирующих ключевые структурные фрагменты (эпитопы) полисахаридов, входящих в состав клеточной стенки грибов *A.fumigatus*, *C.neoformans* и бактерий *K.pneumoniae* и *E.faecalis*, выдвигает открытую диссертантом перегруппировку, позволяющую получать избирательно замещенные фуранозидные предшественники, труднодоступные с использованием известных методов, на **одно из первых мест в современном арсенале синтетических методов химии углеводов.**

Структурный раздел диссертационной работы посвящен исследованию пространственного строения и конформационному анализу фуранозидов и их замещенных производных.

Было установлено, что необычная реакционная способность полностью сульфатированных пиранозидов, приводящая к их перегруппировке в фуранозиды, обусловлена их необычной искаженной конформацией. Изучена конформационная подвижность фуранозидных циклов в модельных соединениях, родственных дигетерогликану *E. faecalis*. С использованием полученных модельных олигосахаридов был проведен детальный структурный и конформационный анализ разветвленного фрагмента галактоксиломаннана *C. neoformans*. На примере ди- и тетрасахаридов, моделирующих звено O-антигена липополисахаридов *K.*

pneumoniae специальными методами спектроскопии ЯМР (ЯМР-титрование) и РСА, была изучена способность лизоцима человека распознавать клеточные стенки грамотрицательных бактерий. Экспериментально в растворе и кристалле было установлено, что лизоцим человека образует прочный комплекс с модельными ди- и тетрасахаридами.

Биологический раздел диссертационной работы посвящен исследованию иммунохимических свойств синтезированных олигосахаридов и их применению для медицинской диагностики.

Большая библиотека синтетических олигосахаридов, моделирующих участки полисахаридов стенки ряда грибковых патогенов, была использована для определения их эпитопов. Определяя титры антител у больных теми или иными заболеваниями, были найдены олигосахариды, обладающие диагностическим потенциалом выявления этих заболеваний. Так, например, олигосахариды с двумя остатками галактофуранозы, связанными через (1→5) связь (лиганды **2, 8 и 9**), вызывали повышение титра антител у пациентов с аллергическим бронхолегочным аспергиллёзом (АВРА) и хроническим легочным аспергиллёзом (СРА). С этой же целью выявления среди синтезированных олигосахаридов соединений, моделирующих эпитопы полисахаридов стенки грибковых патогенов, была изучена их способность вызывать продуцирование цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови и повышать фагоцитарную активность мышиных макрофагов линии RAW264.7. В результате были отобраны олигосахариды с наилучшими диагностическими характеристиками для выявления хронического и аллергического бронхолегочного аспергиллёза. Проведенные исследования также показали, что цепи, построенные из β -(1→5)-связанных галактофуранозных остатков, являются сильными антигенами и мощными иммуномодулирующими факторами, активирующими механизмы врожденного иммунитета за счет взаимодействия с рецепторами, распознающими патоген-ассоциированные паттерны.

С помощью антител у синтезированных олигосахаридов, моделирующих участки галактозаминогалактана *Aspergillus fumigatus*, был выявлен иммунодоминантный эпитоп, построенный из двух остатков *N*-ацетилглюкозамина, соединенных α -(1→4)-связью, который представляет особый интерес в качестве альтернативного антигенного маркера для детектирования инвазивного аспергиллёза.

С использованием набора синтезированных олигосахаридов исследована специфичность антитела EB-A2 из зарубежного коммерческого диагностического набора Platelia™ *Aspergillus* для обнаружения галактоманна *Aspergillus*, найдены ошибки в ранее описанных структурах распознаваемых эпитопов и определены возможные причины ложноположительных и ложноотрицательных результатов. А далее, с использованием гликоконъюгата с бычьим сывороточным альбумином одного из синтезированных олигосахаридов, моделирующих фрагмент галактоманна *A. Fumigatus*, были получены два высокоспецифичных мышиных моноклональных антитела 7B8 и 8G4, способные специфически распознавать галактоманнан, продуцируемый *A. Fumigatus*. Было продемонстрировано, что эти антитела лишены недостатков, обнаруженных диссертантом у антитела EB-A2 коммерческого набора Platelia™ *Aspergillus*.

С использованием полученного антитела 7B8 и гликоконъюгата упомянутого выше галактоманнанового тетрасахарида с флуоресцеином **были созданы диагностикум** и на его основе **тест-система** «GalMAg-ИФА» для обнаружения галактоманнанового маркера инвазивного аспергиллёза. Эта тест-система, представляющая собой 96-луночный планшет с диагностикумом, была лицензирована компанией «ХЕМА», зарегистрирована в качестве

медицинского изделия (МИ РЗН 2019/8791), серийно производится и используется в России и за рубежом. А далее с использованием этого диагностикума была создана **оригинальная установка** для обнаружения галактоманнана *Aspergillus*, основой которой является оптический наносенсор. По своим характеристикам установка опережает другие тест-системы и, самое главное, удобна для проведения анализа в условиях стационара.

Из серии синтезированных олигомерных дигетерогликанов типа *Galf-Glcp* и *Glcp-Galf* после оценки их иммунореактивности с помощью сгенерированных антител были отобраны два олигосахарида, которые были конъюгированы с бычьим сывороточным альбумином. С помощью полученных гликоконъюгатов в экспериментах *in vivo* были получены поликлональные антитела, которые опосредовали опсонофагоцитарное уничтожение *in vitro* различных инкапсулированных штаммов *E. faecalis*. Таким образом, упомянутые гликоконъюгаты являются первыми синтетическими структурами, описанными для получения антител, нацеленных на инкапсулированные штаммы *E. faecalis*, и, следовательно, являются многообещающими кандидатами для разработки строго определенной **энтерококковой гликоконъюгированной вакцины**.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа В.Б.Крылова является одной из немногих диссертационных работ, которая имеет не только **несомненное фундаментальное значение, но и РЕАЛЬНУЮ практическую значимость**.

Диссертационная работа В.Б.Крылова соответствует заявленной специальности, так как её тематика соответствует направлениям исследований, перечисленным в паспорте научной специальности 1.4.9 «Биоорганическая химия», а именно: (а) структурно-функциональные и синтетические исследования биологически значимых высокомолекулярных соединений (поли- и олигосахариды); (б) проблемы иммунохимии, связанные с особенностями строения компонентов соответствующих биологических систем; (в) низкомолекулярные биорегуляторы; синтетические биологически активные вещества. Кроме того, диссертационная работа соответствует перечисленным в паспорте «Биоорганическая химия» смежным специальностям 1.4.3 «Органическая химия» и 1.4.16 «Медицинская химия».

Замечания по диссертационной работе

В диссертации отсутствует описание (хотя бы в общем виде) синтеза больших серий олигосахаридов, схематично изображенных на рисунках 11, 12, 15, 16.

Хотелось бы видеть на стр. 37 сравнение результатов экспериментов по определению титра антител и содержания специфических цитокинов и хемокинов для одних и тех же синтезированных олигосахаридов.

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных на их основе выводов не вызывает сомнений. Материалы диссертационной работы В.Б.Крылова полностью представлены в 45 статьях, опубликованных в высокорейтинговых научных журналах, 33 из которых относятся к первому и второму кварталам.

Заключение

Диссертационная работа **Вадима Борисовича Крылова** является актуальной, цельной, законченной научно-квалификационной работой, результаты которой можно квалифицировать как **крупные достижения в области биоорганической, органической и медицинской химии**. Открыта пиранозид-фуранозидная перегруппировка, которая безусловно займет одно из первых мест в современном арсенале синтетических методов химии углеводов; синтезированные с её

помощью библиотеки олигосахаридов позволили сгенерировать моноклональные антитела к нескольким бактериальным и грибковым патогенам; созданы диагностикум и на его основе тест-система «GalMAg-ИФА» для обнаружения галактоманнанового маркера инвазивного аспергилллёза, которая серийно производится и используется в России и за рубежом; синтезированы гликоконъюгаты, являющиеся многообещающими кандидатами для разработки энтерококковой гликоконъюгированной вакцины.

Работа выполнена на высоком профессиональном уровне. Цель работы достигнута, а соответствующие ей задачи полностью выполнены. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. По актуальности поставленных задач, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная **Вадимом Борисовичем Крыловым**, полностью соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с актуальными изменениями, включая постановление Правительства РФ от 26 сентября 2022 г. №1690), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор **Вадим Борисович Крылов** заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 «Биоорганическая химия».

Исх. № 10

20 февраля 2023 г.

Катаев Владимир Евгеньевич,

доктор химических наук (специальность 1.4.3 – Органическая химия), профессор (специальность 1.4.3 – Органическая химия), главный научный сотрудник лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений Института органической и физической химии им. А. Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

E-mail: kataev57@yandex.ru

тел. (843) 273-93-65

Почтовый адрес: 420088, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Академика Арбузова, 8, ИОФХ им. А.Е.Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН

Факс: (843) 273-18-72

Телефон: +7(843) 273-93-65

E-mail: arbuzov@iopc.ru

<http://www.iopc.ru>

