

Директору Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
органической химии им. Н.Д.
Зелинского Российской академии
наук, председателю
Диссертационного совета 24.1.092.01
действительному члену РАН Егорову
Михаилу Петровичу

Я, **Федоров Алексей Юрьевич**, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, заведующий Кафедрой органической химии Химического факультета Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, согласен быть официальным оппонентом диссертационной работы **Крылова Вадима Борисовича** «Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: синтез и приложение в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов», представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия в Диссертационный совет 24.1.092.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук.
Я согласен на обработку моих персональных данных.

Профессор, член-корреспондент РАН,
заведующий Кафедрой органической химии
Химического факультета Национального
исследовательского Нижегородского
государственного университета им. Н.И.
Лобачевского

А.Ю. Федоров
24.11.2022

Подпись А.Ю. Федорова заверяю,
Ученый Секретарь
ННГУ им. Н.И. Лобачевского



Черноморская Л.Ю.

Сведения об официальном оппоненте
 по диссертационной работе **Крылова Вадима Борисовича**
«Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: синтез и приложение в
иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов»,
 представленной на соискание ученой степени доктора химических наук
 по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия в Диссертационный совет
 24.1.092.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
 Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

Фамилия, имя, отчество оппонента	Федоров Алексей Юрьевич
Шифр и наименование специальности, по которой защита диссертация	02.00.03 - Органическая химия
Ученая степень и отрасль науки	Доктор химических наук
Год защиты диссертации	2008
Ученое звание	Профессор, член-корреспондент РАН
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ)
Занимаемая должность	Заведующий кафедрой органической химии химического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского
Почтовый индекс, адрес	603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, корпус №5
Телефон	+7 (831) 4623232
Адрес электронной почты	afedorovnn@yandex.ru

Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации за последние 5 лет (не более 15 публикаций)

1. Otvagin V. F. et al. Conjugates of porphyrinoid-based photosensitizers with cytotoxic drugs: current progress and future directions toward selective photodynamic therapy / V.F. Otvagin, N.S. Kuzmina, E.S. Kudriashova, A.V. Nyuchev, A.E. Gavryushin, **A.Y. Fedorov** //Journal of Medicinal Chemistry. – 2022. – Т. 65. – №. 3. – С. 1695-1734. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01953>
2. Stein A. et al. B-nor-methylene colchicinoid PT-100 selectively induces apoptosis in multidrug-resistant human cancer cells via an intrinsic pathway in a caspase-independent manner / A. Stein, P. Hilken Née Thomopoulou, C. Frias, S.M. Hopff, P. Varela, N. Wilke, A. Mariappan, J.-M. Neudörfl, A.Y. Fedorov, J. Gopalakrishnan, B. Gigant, A. Prokop, H.-G. Schmalz //ACS omega. – 2022. – Т. 7. – №. 3. – С. 2591-2603. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04659>
3. Shchegravina E. S. et al. Discovery of dihydrofuranoalcolchicinoids-highly potent antimetabolic agents with low acute toxicity / E.S. Shchegravina, E.V. Svirshchevskaya, S. Combes, D. Allegro, P. Barbier, B. Gigant, P.F. Varela, A.E. Gavryushin, D.A. Kobanova, A.E. Shchekotikhin, **A.Y. Fedorov** //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – Т. 207. – С. 112724. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112724>
4. Gracheva I. A. et al. Colchicine alkaloids and synthetic analogues: current progress and perspectives / I.A. Gracheva, E.S. Shchegravina, H.-G. Schmalz, I.P. Beletskaya, **A.Y. Fedorov** //Journal of medicinal chemistry. – 2020. – Т. 63. – №. 19. – С. 10618-10651. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00222>

5. Sazanova E. S. et al. Alcolchicinoids bearing a Michael acceptor fragment for possible irreversible binding of tubulin / E.S. Sazanova, I.A. Gracheva, D. Allegro, P. Barbier, S. Combes, E.V. Svirshchevskaya, A.Y. Fedorov //RSC Medicinal Chemistry. – 2020. – T. 11. – №. 6. – C. 696-706.
<https://doi.org/10.1039/D0MD00060D>
6. Otvagin V. F. et al. Water-soluble chlorin/arylaminquinazoline conjugate for photodynamic and targeted therapy / V.F. Otvagin, N.S. Kuzmina, L.V. Krylova, A.B. Volovetsky, A.V. Nyuchev, A.E. Gavryushin, I.N. Meshkov, Y.G. Gorbunova, Y.V. Romanenko, O.I. Koifman, I.V. Balalaeva, A.Y. Fedorov //Journal of Medicinal Chemistry. – 2019. – T. 62. – №. 24. – C. 11182-11193.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01294>
7. Sitnikov N. S. et al. Design and Synthesis of New Protease-Triggered CO-Releasing Peptide–Metal-Complex Conjugates / N.S. Sitnikov, Y.B. Malysheva, **A.Y. Fedorov**, H.-G. Schmalz //European Journal of Organic Chemistry. – 2019. – T. 2019. – №. 40. – C. 6830-6837.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201901206>
8. Shchegravina E. S. et al. Phospholipidic colchicinoids as promising prodrugs incorporated into enzyme-responsive liposomes: chemical, biophysical, and enzymological aspects / E.S. Shchegravina, D.S. Tretiakova, A.S. Alekseeva, T.R. Galimzyanov, Y.N. Utkin, Y.A. Ermakov, E.V. Svirshchevskaya, V.V. Negrebetsky, N.Y. Karpechenko, V.P. Chernikov, N.R. Onishchenko, E.L. Vodovozova, **A.Y. Fedorov**, I.A. Boldyrev //Bioconjugate Chemistry. – 2019. – T. 30. – №. 4. – C. 1098-1113.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00051>

9. Hoffer L. et al. Integrated strategy for lead optimization based on fragment growing: the diversity-oriented-target-focused-synthesis approach / L. Hoffer, Y.V. Voitovich, B. Raux, K. Carrasco, C. Muller, **A.Y. Fedorov**, C. Derviaux, A. Amouric, S. Betzi, D. Horvath, A. Varnek, Y. Collette, S. Combes, P. Roche, X. Morelli //Journal of medicinal chemistry. – 2018. – Т. 61. – №. 13. – С. 5719-5732.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00653>

10. Otvagin V. F. et al. Synthesis and biological evaluation of new water-soluble photoactive chlorin conjugate for targeted delivery / V.F. Otvagin, A.V. Nyuchev, N.S. Kuzmina, I.D. Grishin, A.E. Gavryushin, Y.V. Romanenko, O.I. Koifman, D.V. Belykh, N.N. Peskova, N.Y. Shilyagina, I.V. Balalaeva, **A.Y. Fedorov** //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – Т. 144. – С. 740-750.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.062>

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, заведующий Кафедрой органической химии Химического факультета Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

А.Ю. Федоров
27.02.2023

Подпись А.Ю. Федорова заверяю
Ученый Секретарь
ННГУ им. Н.И. Лобачевского



Черноморская Л.Ю.

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Крылова Вадима Борисовича** на тему **«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, оформленную в виде научного доклада.

Актуальность темы исследования

Углеводы играют одну из ключевых ролей в клеточном сигналинге, распознавании и коммуникации клеток с внеклеточными компонентами и друг с другом, а также являются неотъемлемыми участниками в пост-трансляционных модификациях белковых структур [A. F. Costa et al., *Trends Cancer* **2020**, 6, 757]. В отличие от других биополимеров – белков или нуклеиновых кислот – углеводы могут иметь нелинейную структуру. Их ветвление происходит за счет наличия нескольких гидроксильных групп, при асимметрических атомах углерода, что существенно увеличивает разнообразие возможных структур. Эта многовариантность еще больше возрастает для восстанавливающих гексозных фрагментов, способных существовать в состоянии динамического равновесия в виде пиранозной, фуранозной и ациклической форм.

В клетках млекопитающих присутствуют 9 основных моносахаридов, из которых построена большая часть наших олиго- и полисахаридов: *D*-глюкоза, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, *D*-галактоза, *N*-ацетил-*D*-галактозамин, *D*-манноза, *D*-ксилоза, *L*-фукоза, глюкуроновая кислота и *N*-ацетилнейраминовая кислота, относящаяся к сиаловым кислотам [P. Sosicka et al., *Biochemistry* **2020**, 59, 3064]. Большинство из этих соединений могут быть, как получены из экзогенных источников, используя транспортеры семейства SLC2A, так и быть синтезированы *de novo* исходя из глюкозы. При этом разнообразие природных моносахаридов далеко не исчерпывается девятью «человеческими» углеводами. Например, галактоза в фуранозной форме, входящая в состав гликопротеинов, гликолипидов и полисахаридов у патогенных бактерий, грибов и простейших не входит в состав гликанов человека и млекопитающих. Это делает галактофуранозил-содержащие структуры удобными мишенями для вакцин и специфическими маркерами для разработки диагностических тест-систем для таких социально-значимых заболеваний как инвазивный аспергиллез легких, криптококковый менингит, а также для терапии внутрибольничных инфекций, вызываемых грамотрицательной бактерией *Klebsiella pneumoniae*. Отсутствие галактофуранозы у

млекопитающих и человека минимизирует возможность побочных реакций при вакцинации и увеличивает чувствительность и специфичность диагностикумов.

Создание гликоконъюгированных вакцин и диагностикумов для вышеуказанных заболеваний требует проведения синтеза библиотек олигосахаридов, содержащих галактофуранозильные фрагменты, что является нетривиальной задачей ввиду отсутствия необходимого набора синтетических методов. В связи с этим, рецензируемая работа В. Б. Крылова, посвященная разработке синтетических методов для синтеза сложных галактофуранозилсодержащих олигосахаридов, изучению их конфигурационных особенностей и конформационной динамики, исследования их иммуномодулирующего действия, а также созданию иммуноферментных диагностикумов и прототипов аналитических тест-систем для определения углеводных маркеров грибковых заболеваний, несомненно, является актуальной задачей.

Научная новизна.

В ходе выполнения своего исследования В. Б. Крылов получил ценные научные результаты. Эти результаты можно условно отнести к нескольким «научным сюжетам»:

- 1) Разработка нового синтетического метода для получения галактофуранозидных строительных блоков; синтез олигосахаридов, структурно родственных грибковым и бактериальным полисахаридам, содержащих в своем составе галактофуранозидные звенья.
- 2) Исследование пространственного строения и конформационной динамики галактофуранозил-содержащих производных.
- 3) Иммунохимические исследования синтезированных полисахаридов, содержащих галактофуранозидные звенья и создание на их основе прототипов диагностических тест-систем.

В первой части работы при исследовании реакций исчерпывающего сульфатирования углеводов в присутствии сильных кислот была обнаружена селективная изомеризация пиранозидов в фуранозные формы соответствующих углеводов (пиранозид-фуранозная перегруппировка или ПФП) с сохранением конфигураций при асимметрических атомах углерода и О-заместителей. На достаточно большой серии пиранозных субстратов установлены границы применения и ограничения открытой ПФП. Показано, что моносахариды с галакто- и глюко-конфигурациями пиранозных циклов и с экваториальным расположением аномерного заместителя в условиях ПФП приводят к соответствующим фуранозам с хорошими – высокими выходами. Напротив манно-производные, а также пиранозиды с аксиальной конфигурацией аномерного центра не

подвергаются пиранозид-фуранозным трансформациям. Эти исследования, наряду с квантово-химическими расчетами позволили предложить возможный механизм ПФП, предполагающий в качестве ключевых стадий протонирование фуранозного кислорода с последующим образованием пятичленного диалкилсульфата, сопровождающимся раскрытием пиранозного цикла, с последующей рециклизацией. Также удалось объяснить почему, как правило, термодинамически более стабильная пиранозная форма превращается в фуранозную.

На следующем этапе, ПФП была эффективно применена для препаративного синтеза библиотек олигосахаридов, родственных антигенным полисахаридам грибковых и бактериальных патогенов, таким как галактоманнану *A. fumigatus*, O-цепи ЛПС *K. pneumoniae*, дигетерогликану *E. faecalis*, галактоксиломаннану *C. neoformans*. Эти патогены вызывают смертельные заболевания – инвазивный аспергилез, больничные и внебольничные пневмонии с высокой степенью антибиотикорезистентностью. Считаю, что выполнение этого сложнейшего синтетического фрагмента диссертации потребовала виртуозного владения методами тонкого органического синтеза.

Во второй части работы с применением спектроскопии ЯМР (корреляции COSY, ROESY, TOCSY, HMQC, HMBC, NOESY и другие), а также квантово-химических расчетов было исследовано пространственное строение и проведен конформационный анализ синтезированных фуранозидных производных. Было проведено моделирование геометрии связей между фуранозными и пиранозными остатками. Изучены изменения классических конформационных состояний пиранозного цикла, происходящие при исчерпывающем сульфатировании, что, в конечном итоге, является движущей силой ПФП. Проведены исследования конформационной подвижности галактофуранозильных остатков в составе более сложных молекул: олигосахаридов и O-лактильных производных, что позволило выявить полный набор конформеров фуранозидных колец и установить их содержание в равновесной смеси.

Синтезированные в работе олигосахариды, родственные O-цепи ЛПС бактерии *K. pneumoniae*, были использованы для исследования лектиновой активности лизоцима человека, позволяющей этому защитному белку иммунной системы распознавать клеточные стенки грамотрицательных бактерий. На основе экспериментальных данных - ЯМР-спектроскопии в растворах и изучения монокристалла комплекса олигосахарида с лизоцимом с помощью метода PCA, а также теоретических подходов построена трехмерная модель углевод-белкового взаимодействия дисахарида с лизоцимом человека. Предложенная модель позволяет эффективно оценивать взаимодействия лизоцима с различными низкомолекулярными олигосахаридными лигандами.

И, наконец, в третьей части работы исследованы иммунохимические свойства библиотек олигосахаридных лигандов, соответствующих иммунодетерминантным фрагментам основных полисахаридов стенки грибковых патогенов (галактоманнан *Aspergillus*, маннан *Candida*, α -(1→3)-глюкан *Aspergillus*, и других). Были определены углеводные эпитопы в составе полисахаридов клеточной стенки грибов, ответственные за формирование иммунного ответа. Установлено, что профиль цитокинового ответа макрофагов, обработанных гликоконъюгатами, был преимущественно провоспалительного типа Th1 со значительным увеличением высвобождения TNF α , IL-6 и IL-12. Это показывает, 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 BSA-конъюгата пентасахарида **27b**, родственного галактоманнану *A. fumigatus*, а также набора биотинилированных олигосахаридов, используемых в качестве покрывающих антигенов, были получены два высокоспецифичных моноклональных антитела, которые способны специфически распознавать галактоманнан, продуцируемый *A. fumigatus*. Это позволило создать иммуоферментный диагностикум для определения галактоманнанового маркера инвазивного аспергиллеза, который в настоящее время серийно производится в РФ и за рубежом. Наряду с этим был создан прототип чувствительного оптического наносенсора, для обнаружения галактоманнана.

Был также успешно проведен анализ углеводной специфичности моно- и/или поликлональных антител против галактозаминогалактана *Aspergillus fumigatus* для детектирования инвазивного аспергиллеза, против маннана *Candida* для выявления инвазивного кандидоза, а также на антитела 5H5 и 3G11, распознающие грибковый β -(1→3)-глюкан.

Еще одним результатом диссертации является создание прототипа вакцины против бактерии *E. faecalis*, в виде конъюгата специфических олигосахаридных лигандов, содержащих β -D-галактопиранозильные фрагменты с белком-носителем. Обнаружен протективный эффект генерируемых антител в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, что делает выбранные структуры перспективными вакцинными лигандами, индуцирующими экспрессию антител, для защиты от трудноизлечимых госпитальных инфекций.

Достоверность полученных результатов

Результаты рецензируемой работы сомнений не вызывают, поскольку получены на основе квалифицированного применения современных методов органического синтеза и

физико-химического исследования: спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии высокого разрешения, РСА, современных биохимических подходов, а также методов квантовой химии. Полученные результаты обсуждены с использованием новых данных современной химической литературы.

Практическая значимость

В диссертации предложен и развит новый препаративный метод органической химии - пиранозид-фуранозная перегруппировка, позволяющая с высокими – хорошими выходами получать фуранозные формы углеводов из соответствующих пираноз с сохранением конфигураций асимметрических центров и О-заместителей. Создан иммуноферментный диагностикум для определения галактоманнанового маркера инвазивного аспергилеза, который в настоящее время серийно производится в РФ и за рубежом. Разработан прототип наносенсора, для обнаружения галактоманнана. Создан прототип вакцины против бактерии *E. faecalis*.

Замечания

Работа В. Б. Крылова выполнена на высоком экспериментальном уровне, тщательно оформлена, изложена четко и аргументировано. Имеются вопросы, носящие дискуссионный характер:

1. Можно ли сформулировать кратко и схематично критерии возможности протекания ПФП?
2. В каких средах проводилось экспериментальное исследование стереохимии и конформационных превращений фуранозидов и их замещенных производных и в каких концентрациях? Как будут коррелировать заселенности конформационных состояний, полученные в диссертации с таковыми *in vivo*?
3. При определении углеводных эпитопов, ответственных за формирование иммунного ответа, в тематических библиотеках использовались, в подавляющем большинстве, линейные олигосахариды, тогда как полисахариды грибковых и бактериальных патогенов имеют разветвленное строение. Какова надежность выбранных таким образом эпитопов, особенно с учетом того, что автору данной работы пришлось корректировать углеводную специфичность антител из двух зарубежных коммерческих тест-систем? Каковы граничные условия достоверности при выборе этилопа по размеру, разветвленности и другим критериям?
4. С развитием грибкового или бактериального заболевания, в результате его лечения или по мере мутации возбудителя могут меняться профили гликопротеиновых

рецепторов. Можно ли как-то прогнозировать изменения, происходящие с рецепторами и своевременно разрабатывать новые системы их выявления и таргетирования? Каков прогноз о «долголетии», разрабатываемых в диссертации прототипов вакцин и тест-систем и на чем он основан?

5. В иммунологической части работы хотелось бы увидеть более наглядные подписи к иллюстративному материалу и его более подробное описание.

Очевидно, что указанные вопросы не принципиальны и не могут повлиять на общую высокую оценку работы и тем более не ставят под сомнение ценность полученных в ней результатов.

Заключение

Представленную диссертационную работу Крылова В.Б. можно квалифицировать как научное достижение, заключающееся в новых научно обоснованных решениях по синтезу галактофуранозилсодержащих олигосахаридов, их применению в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов, созданию тест-систем, а также прототипов углеводных вакцин. Полученные соискателем экспериментальные данные достоверны, выводы носят обобщающий характер. Основное содержание работы отражено в 45 статьях в рецензируемых журналах, из них 33 статьи за период 2013-2022 гг. в журналах из списков Q1 и Q2, индексируемых Scopus и Web of Science. По теме работы опубликовано 6 обзоров в специализированных научных журналах. Публикации автора подтверждают его высокий профессиональный уровень. Результаты работы были доложены на международных и всероссийских конференциях, конгрессах и симпозиумах.

Многие положения диссертационного исследования могут найти применение в университетских учебных курсах по химии, результаты могут быть рекомендованы для применения в научных организациях, в которых изучаются методы получения и применение органических соединений: в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского, Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Институте биохимии им. А.Н. Баха, а также в учебных курсах Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева и других ВУЗов.

Диссертационная работа, оформленная в виде научного доклада, по новизне, практической значимости, достоверности результатов и обоснованности выводов удовлетворяет всем требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней»

(утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426), а её автор Крылов Вадим Борисович заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия.

Официальный оппонент,
Заведующий кафедрой органической химии
Химического факультета
Национального исследовательского
Нижегородского государственного
университета им. Н.И. Лобачевского
д.х.н., профессор РАН, заместитель
проректора по научной работе ННГУ им.
Н.И. Лобачевского

Федоров А.Ю.
27 февраля 2023 г.

Специальность, по которой официальным
оппонентом защищена диссертация:
02.00.03 – «органическая химия».

Контактные данные:
Тел.: +7-910-872-3870
E-mail: afedorovnn@yandex.ru
Адрес официального места работы:
603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина 23,
ННГУ им. Н.И. Лобачевского, к. 2

Подпись Федорова А.Ю. удостоверяю
к.соц.н., ученый секретарь
Федерального государственного
автономного образовательного
учреждения высшего образования
«Национальный исследовательский
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»



Черноморская Л.Ю.