

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, **Щекотихин Андрей Егорович**, профессор РАН, доктор химических наук, директор ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе", зав. Лабораторией химической трансформации антибиотиков, 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 РАН, доктор химических наук,
директор ФГБНУ "Научно-исследовательский
институт по изысканию новых антибиотиков
имени Г.Ф. Гаузе", зав. Лабораторией
химической трансформации антибиотиков

А.Е. Щекотихин
24.11.2022

Подпись Щекотихина А.Е. удостоверяю
Учёный секретарь к.х.н.
ФГБНУ "Научно-исследовательский институт
По изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.
Гаузе"



О.В. Кисиль

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	Щекотихин Андрей Егорович
Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация	02.00.03 <input type="checkbox"/> Органическая химия
Ученая степень и отрасль науки	Доктор химических наук
Год защиты диссертации	2009
Ученое звание	Профессор РАН
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"
Занимаемая должность	директор
Почтовый индекс, адрес	119021, г. Москва, Большая Пироговская ул., 11.
Телефон	+7 499 246-99-80
Адрес электронной почты	shchekotikhin@mail.ru

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

1. Buravchenko G.I., Maslov D.A., Alam M.S., Grammatikova N.E., Frolova S.G., Vatlin A.A., Tian X., Ivanov I.V., Bekker O.B., Kryakvin M.A., Dontsova O.A., Danilenko V.N., Zhang T., Shchekotikhin A.E. Synthesis and Characterization of Novel 2-Acyl- 3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-Dioxides as Potential Antimicrobial Agents. // *Pharmaceuticals (Basel)*. - 2022. - 15(2). - 155.
2. Omelchuk O. A., Malyshev V. I., Medvedev M. G., Lysenkova L. N., Belov N. M., Dezhenkova L. G., Grammatikova N. E., Scherbakov A. M., Shchekotikhin A. E. Stereochemistries and Biological Properties of Oligomycin A Diels-Alder Adducts // *J. Org. Chem.* - 2021. - T. 86. - C. 7975-7986.
3. Volodina Yu. L., Tikhomirov A. S., Dezhenkova L. G., Ramonova A. A., Kononova A. V., Kaluzhny D. N., Schols D., Moisenovich M. M., Shchekotikhin A. E., Shtil A. A. Thiophene-2-carboxamide derivatives of anthraquinone: A new potent antitumor chemotype // *Eur. J. Med. Chem.* - 2021. - T. 221. - C. 113521.
4. Buravchenko G.I., Scherbakov A.M., Dezhenkova L.G., Monzote L., Shchekotikhin A.E. Synthesis of 7-amino-6-halogeno-3-phenylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-dioxides: A way forward for targeting hypoxia and drug resistance of cancer cells. // *RSC Advances*. - 2021. - 11(61). - 38782-387954.
5. Litvinova, V. A., Tikhomirov, A. S., Ivanov, I. V., Solovieva S. E., Shchekotikhin A. E. A facile access to 2-substituted naphtho[2,3-g]quinoline-3-carboxylic acid esters via intramolecular cyclization and PyBOP-promoted functionalization // *Tetrahedron* - 2020.-T. 76.-C. 131418.
6. Shchekotikhin, A. E., Treshalina, H. M., Treshchalin, M. I., Pereverzeva, E. R., Isakova, H. B., Tikhomirov, A. S. Experimental Evaluation of Anticancer Efficiency and Acute Toxicity of Anthraquinone for Oral Administration // *Pharmaceuticals* - 2020. - T. 13.-C. 81.
7. Volodina, Yu. L., Dezhenkova, L. G., Tikhomirov, A. S., Tatarskiy, V. V., Kaluzhny, D. N., Moisenovich, A. M., Moisenovich, M. M., Isagulieva, A. K., Shtil, A. A., Tsvetkov, Y. B., Shchekotikhin, A. E. New anthra[2,3-

	<p>b]furancarboxamides: A role of positioning of the carboxamide moiety in antitumor properties // Eur. J. Med. Chem.-2019.-Т. 165.-С. 31-45.</p> <p>8. Tikhomirov, A. S., Ivanov, I. V., Korolev, A. M., Shchekotikhin, A. E. /β-Hydroxylation of anthraquinone derivatives with benzaldehyde oxime as a source of hydroxyl group // Tetrahedron - 2019.-Т. 75.-С. 130623.</p> <p>9. Tikhomirov A. S., Lin C.-Y., Volodina Yu. L., Dezhenkova L. G., Tatarskiy V. V., Schols D., Shtil A. A., Kaur P., Chueh P. J., Shchekotikhin, A. E. New antitumor anthra[2,3-b]furan-3- carboxamides: Synthesis and structure-activity relationship // Eur. J. Med. Chem. - 2018.- Т. 148. - С. 128-139.</p>
--	---

Профессор РАН, доктор химических наук,
 директор ФГБНУ "Научно-исследовательский
 институт по изысканию новых антибиотиков
 имени Г.Ф. Гаузе", зав. Лабораторией
 химической трансформации антибиотиков

А.Е. Щекотихин
 27.02.2023

Подпись Щекотихина А.Е. удостоверяю
 Учёный секретарь к.х.н.
 ФГБНУ "Научно-исследовательский институт
 По изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.
 Гаузе"



О.В. Кисиль

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

Резкое развитие лекарственной резистентности у возбудителей грибковых и бактериальных инфекций создаёт признанную во всём мире угрозу. Одним из возможных подходов к решению данной проблемы является разработка средств иммунотерапии и иммунопрофилактики инфекционных заболеваний. Углеводные структуры, входящие в состав клеточной стенки патогенных грибов, а также бактериальные полисахариды являются первым компонентом микроорганизма, встречающимся с иммунной системой человека, и во многом модулируют формирование иммунного ответа. Бактериальные и грибковые полисахариды и соответствующие родственные олигосахариды уже сейчас находят применение при создании конъюгированных вакцин второго и третьего поколений.

Однако нетривиальность химического синтеза олигосахаридных лигандов создает определенные трудности при разработке и производстве конъюгированных углеводных вакцин передового уровня - 3-его поколения. Полисахариды микроорганизмов часто содержат в своей структуре особые моносахаридные звенья, синтез и избирательная функционализация которых представляется актуальной и нетривиальной научной задачей. Так галактоза в фуранозной форме является примером моносахаридного звена, широко представленного среди прокариотических и эукариотических патогенных микроорганизмов, но отсутствующего в организме млекопитающих. К сожалению, существующие методы получения галактофуранозилсодержащих олигосахаридов низкоэффективны и неуниверсальны.

Установление особенностей пространственного строения олигосахаридов крайне важно для моделирования взаимодействия гликанов с соответствующими

белковыми рецепторами, антителами и лектинами, а важность объектов исследования для иммунологии подтверждается многочисленными российскими и зарубежными публикациями, направленными на разработку конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридов против возбудителей бактериальных инфекций. В связи со всем вышесказанным, тема диссертационного исследования Крылова В.Б., посвященная галактофуранозилсодержащим олигосахаридам, их синтезу и исследованию иммунобиологических свойств, является крайне актуальной.

Общая структура работы

Рецензируемая работа представлена в форме научного доклада и основные научные результаты диссертации опубликованы 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.

Основное содержание научного доклада состоит из четырёх разделов.

В первом разделе описаны результаты исследования оригинальной реакции превращения пиранозидов в фуранозиды, протекающей при исчерпывающем О-сульфатировании. Данный раздел включает изучение механизма пиранозид-фуранозидной перегруппировки, установление стереохимических аспектов данного процесса, определение областей его применения при использовании разнообразных субстратов, а также создание на его основе препаративных методов для синтеза избирательно защищенных фуранозидных блоков.

Во втором разделе описано применение пиранозид-фуранозидной перегруппировки для синтеза серий олигосахаридов, родственных поверхностным антигенам грибковых и бактериальных патогенов, таких как *Aspergillus fumigatus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Cryptococcus neoformans*.

В третьем разделе описаны результаты исследований закономерностей конформационной подвижности и пространственного строения фуранозидов и их сульфатированных производных, важные для реакционной способности и распознавания белковыми рецепторами.

Заключительный четвертый раздел описывает результаты применения синтезированных олигосахаридных лигандов как для проведения фундаментальных

иммунохимических исследований, так и для практической разработки средств медицинской диагностики грибковых инфекций.

Научная новизна работы не вызывает сомнений. Прежде всего, в диссертационном исследовании Крылова В.Б. впервые открыт и детально исследован новый процесс в химии углеводов – пиранозид-фуранозидная перегруппировка. В кислых условиях углеводные субстраты способны претерпевать целый ряд превращений: разрыв гликозидных связей, аномеризацию, сужение и расширение углеводного цикла. В результате сочетания всех этих реакций всегда образуется сложная смесь продуктов. Перевод же субстрата в полисульфатированную форму приводит к сочетанию благоприятных термодинамических и кинетических факторов кардинально увеличивающему селективность процесса. Данная реакция не имеет близких аналогий среди химических превращений. Известные примеры каталитической трансформации О-гликозидов из пиранозной формы в фуранозную низкоэффективны, и фуранозид присутствует в равновесии лишь в небольшом количестве. Примером подобного процесса может служить образование нуклеозиддифосфатов моносахаридов в фуранозной форме под действием специальных ферментов мутаз, но это лишь отдаленно напоминает исследованный химический процесс.

Именно благодаря открытой реакции стали возможны систематические синтезы целых библиотек олигосахаридов, содержащих галактофуранозный остаток и отвечающих иммунодетерминантным фрагментам полисахаридов таких патогенов как *Aspergillus fumigatus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Cryptococcus neoformans*. Ранее были известны лишь единичные синтезы коротких олигосахаридов данного типа.

Из-за трудности химического синтеза целевой группы олигосахаридов исследование их физико-химических и иммунобиологических характеристик ранее проводилось недостаточно широко, хотя это и представляет большой фундаментальный и практический интерес для выяснения молекулярно-биологических и структурных характеристик обсуждаемых углеводных антигенов, а также для создания востребованных вакцин и иммуноферментных диагностикумов.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Открытая и изученная автором диссертационного исследования пиранозид-фуранозидная перегруппировка практически востребована для синтеза широчайшего ряда практически значимых углеводных структур, родственных бактериальным и грибковым антигенным полисахаридам. Разработанные синтетические подходы существенно упрощают получение такого рода соединений, что, в свою очередь, делает возможными исследования молекулярных механизмов взаимодействия клеток патогена с иммунной системой хозяина и открывает пути для разработки противоинфекционных вакцин и диагностикумов для обнаружения инфекционных поражений и защиты от них.

Так, с использованием впервые синтезированных в рамках данной работы олигосахаридов, родственных галактоманнану из *Aspergillus fumigatus*, а также полученных и отобранных гомологичных антител был создан диагностический набор GalMAg-ИФА для определения опасного грибкового заболевания инвазивного аспергиллеза, который зарегистрирован в качестве медицинского изделия, производится и продается в России и за рубежом.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа Крылова В.Б. несомненно имеет фундаментальное значение 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.

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 квартилям. 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.

Замечания и вопросы.

По работе Крылова В.Б. имеется ряд замечаний, носящих рекомендательный и дискуссионный характер:

1) Хотя концепция механизма пиранозид-фуранозидной перегруппировки, предложенная автором, в целом понятна, однако в описанном варианте остался ряд не отвеченных вопросов. Так, в работе остался не раскрыт путь, как линейный интермедиат **С** превращается в фуранозное производное **8**? Очевидно, что в предложенном варианте, циклизация будет определяться нуклеофильностью группы, атакующей аномерный атом углевода, но нуклеофильность сульфатной группой в положении 4 будет существенно ниже, чем у гидроксигруппы в положении 5. Возможно этой атаке предшествует миграция сульфатной группы из положения 4 на свободную группу в положении 5.

2) Автор описывает действия пиранозид-фуранозидной перегруппировки только на примере синтетических субстратов. Можно ли использовать условия кислотнотромотируемого сульфатирования для модификации поли- и олигосахаридов, выделенных из природных источников? Не менее важно оценить возможности открытой пиранозид-фуранозидной перегруппировки нах другие классах биоорганических соединений, например для нуклеозидов или производных антибиотиков.

3) Не совсем понятно как автор оценивал выход реакции по данным ЯМР (с. 13-14).

4) Автором не объяснена причина стереоселективности образования продукта **50c**. Так, лактиды **50a** и **50b**, отличающиеся конфигурацией остатка молочной

кислоты образуются с близким выходами (29 и 37%), в то время как лактон **50c**, являющийся их региоизомером, образуется столько с *S*-конфигурацией остатка молочной кислоты (24%).

5) Неясна причина стабильности 1C_4 конформации сульфатированной β -D-ксилопиранозы (рис.6) – очевидно, что четыре заместителя в аксильном положении и стерические напряжения должны сильнее дестабилизировать такую конформацию сильнее, чем 4C_1 .

6) Из приведенных синтетических схем можно заключить, что ряд защитных групп успешно выдерживает пиранозид-фуранозидную перегруппировку (All, Bn, Vz, Fmoc и другие), в то время как другие (например, *t*-бутилдиметилсилил (TBS) на схеме 6) отщепляются. В научном докладе имело бы смысл явно перечислить, какие защитные группы допустимо использовать для ПФП, а какие нет.

7) Не ясно как подбиралась нагрузка антигенных фрагментов на носитель (BSA), а также спейсерная группа. Так при получении антител 7B8 и 8G4 вводилось 10 олигосахаридных остатков на одну молекулу белка с использованием квадратной кислоты (рис. 13) в качестве спейсера, в то время как для получения вакцинного препарата от *E. faecalis* (рис. 17) вводились 18 остатков олигосахаридов без спейсерной группы. Как контролировалось количество введенных олигосахаридных цепей.

8) Утверждение автором «Создание прототипа вакцинного препарата против бактерии *E. Faecalis*» сомнительно, из-за ограниченности применения на человеке конъюгированных вакцин с использованием в качестве носителя бычьего сывороточного альбумина (BSA). Воздействие BSA на человека широко распространено (из-за пищи и лекарственных препаратов), поэтому примерно 50% населения имеет антитела к BSA. Это приведет к большому количеству нежелательных побочных эффектов при использовании вакцины на основе BSA.

9) Из текста непонятно от каких пациентов были отобраны образцы PBMC при исследовании антигенной и иммуномодулирующей активности галактоманнанов; нет сравнения с контрольной группой (здоровые волонтеры). Также непонятен выбор автором специфических цитокинов (IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, TNF- α) и хемокинов (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 и CXCL1), тогда как общеизвестно, что состоятельность специфического иммунного ответа у гематологических больных оценивается по

количеству лимфоцитов, способных к синтезу IL-10, IL-4, IL-17A, INF- γ , в ответ на различные рекомбинантные антигены *A. Fumigatus*. Для больных инвазивным аспергилезом характерно достоверное увеличение *Aspergillus*-специфических T-клеток, продуцирующих IL-10, и меньше синтезирующих INF- γ по сравнению с результатами, полученными у здоровых людей. Так же следует отметить, что применение для медицинской диагностики ELISpot анализа более информативно чем применение иммуноферментных ELISA тест-систем.

10) Имеются также ряд незначительных замечаний по оформлению научного доклада: стилистические («омыление по действию метилата натрия»), пунктуационные ошибки и неточности (PyHSO_3), совместно используются аббревиатуры на английском и русском языках (NOE и ЯЭО, DMF и ДМФА), однако указанные замечания (пожелания) не снижают научную ценность и значимость представленной работы, а также положительную общую оценку диссертации в форме научного доклада.

Результаты исследования могут быть использованы в Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева, Институте тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова при МИРЭА (Российский Технологический Университет) и других химических центрах страны. Результаты иммунохимических исследований будут востребованы в таких специализированных центрах как Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи и других.

Представленную диссертационную работу Крылова В.Б. можно квалифицировать как научное достижение, заключающееся в разработке нового эффективного метода синтеза востребованных для разработки вакцин и иммуноферментных диагностикумов галактофуранозилсодержащих соединений. Диссертационная работа, оформленную 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:

Профессор РАН, доктор химических наук,
Директор ФГБНУ "Научно-исследовательский институт
По изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"
Заведующий кафедрой органической химии
ФГБОУ ВО "Российский химико-технологический
Университет имени Д.И. Менделеева"



Щекотихин Андрей Егорович

"20" февраля 2023 г.

Контактные данные:

Тел.: 8 (499) 245-37-53

E-mail: shchekotikhin@mail.ru

Специальность, по которой официальным
оппонентом защищена диссертация:

02.00.03 – "Органическая химия"

Адрес официального места работы:

119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

Подпись Щекотихина А.Е. удостоверяю

Учёный секретарь к.х.н.

ФГБНУ "Научно-исследовательский институт

По изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"



Кисиль О.В.