ФИО соискателя Крылов Вадим Борисович

Название диссертации ***Галактофуранозилсодержащие олигосахариды: синтез и приложение в иммунохимических исследованиях грибковых и бактериальных патогенов***

Шифр специальности –1.4.9. – биоорганическая химия

Химические науки

Шифр диссертационного совета Д 24.1.092.01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института http://zioc.ru/

25 ноября 2022 года

Дата приема к защите

30 ноября 2022 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК https://vak.minobrnauki.gov.ru

02 декабря 2022 года

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Крылов Вадим Борисович

ГАЛАКТОФУРАНОЗИЛСОДЕРЖАЩИЕ ОЛИГОСАХАРИДЫ: СИНТЕЗ И ПРИЛОЖЕНИЕ В ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ГРИБКОВЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ

1.4.9. – Биоорганическая химия

Диссертация
в виде научного доклада
на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва
2022

Работа выполнена в Лаборатории химии гликоконъюгатов (№52) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (ИОХ РАН).

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ: **Нифантьев Николай Эдуардович,**
чл.-корр. РАН, д.х.н., заведующий Лабораторией №52 ИОХ РАН

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: **Федоров Алексей Юрьевич,**
чл.-корр. РАН, д.х.н., заведующий Кафедрой органической химии Химического факультета Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Щекотихин Андрей Егорович,
профессор РАН, д.х.н., Директор ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе", зав. Лабораторией химической трансформации антибиотиков.

Курочкин Илья Николаевич,
профессор, д.х.н, Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук.

Защита состоится «____» _____ 2023 г. в ___:___ на заседании диссертационного совета Д 24.1.092.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН) по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47.

С текстом научного доклада можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН и на официальном сайте ИОХ РАН (http://zioc.ru); на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российского Федерации по адресу: https://vak.minobrnauki.gov.ru.

Научный доклад разослан «____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 24.1.092.01
доктор химических наук Г.А. Газиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Олигосахариды, содержащие в своем составе углеводные остатки в фуранозной форме (то есть в виде пятичленного цикла) представляют большой интерес для разноплановых гликобиологических исследований. Это связано с тем, что остаток галактофуранозы входит в состав различных биомолекул (гликопротеинов, гликолипидов, полисахаридов), продуцируемых патогенными микроорганизмами, как прокариотами (бактериями), так и эукариотами (грибами, простейшими). Структуры, содержащие галактофуранозу, критически важны для жизнедеятельности и вирулентности этих микроорганизмов. Принципиально важным является и тот факт, что гликаны млекопитающих и человека не содержат остатки галактозы в фуранозной форме. Это делает галактофуранозилсодержащие структуры удобными мишенями для вакцин, как и специфическими маркерами для разработки диагностических тест-систем. Отсутствие галактофуранозы у млекопитающих и человека минимизирует возможность побочных реакций при вакцинации и увеличивает чувствительность и специфичность серологических диагностикумов.

Примерами биомолекул, содержащих в своей структуре остатки галактозы в фуранозной форме, являются: (1) галактоманнан – компонент клеточной стенки грибов рода *Aspergillus*, которые вызывают у больных с ослабленным иммунитетом тяжелое заболевание – инвазивный аспергиллёз легких; (2) галактоксиломаннан – компонент клеточной капсулы гриба *Cryptococcus neoformans,* который является возбудителем криптококкового менингита – опаснейшего заболевания, относящегося к глубоким микозам; (3) галактан I – фрагмент липополисахарида (ЛПС) грамотрицательной бактерии *Klebsiella pneumoniae*, возбудителя трудно поддающихся терапии внутрибольничнх инфекций; (4) дигетерогликан – антигенный полисахарид бактерии *Enterococcus faecalis,* которая отличается высокой скоростью роста антибиотикорезистентности.

С учётом сказанного, олигосахариды, структурно родственные перечисленным полисахаридам (1)-(4), были выбраны в качестве объектов исследований в данном диссертационном исследовании. Данные соединения представляют собой уникальные модели для изучения молекулярных механизмов и топологии связывания олиго- и полисахаридов клеточными рецепторами и защитными белками иммунной системы, распознающими углеводные антигены патогенов. Однако, наличие в структуре целевых полисахаридов замещенных остатков галактозы в фуранозной форме делает химический синтез соответствующих олигосахаридов весьма нетривиальной задачей из-за недостаточной эффективности известных методов.

Существует несколько общепринятых подходов к получению синтетических предшественников углеводных остатков в фуранозной форме, однако в подавляющем числе примеров, данные методики имеют ограниченное применение. В связи с этим традиционные схемы синтеза фуранозидсодержащих олигосахаридов зачастую исходят из стандартных фуранозидных предшественников, которые затем модифицируют в требуемых положениях и вводят в реакции гликозилирования. Данный подход эффективен лишь для получения сравнительно простых олигосахаридов.

В связи с этим весьма важной является разработка новых методов синтеза сложных избирательно защищенных фуранозидных производных в качестве блоков для получения сложных олигосахаридов. Актуальными являются и исследования закономерностей конформационных и иммунохимических свойств галактофуранозилсодержащих олигосахаридов, родственных поверхностным антигенам грибковых и бактериальных патогенов, которые важны в качестве основы при разработке практически востребованных вакцин и диагностикумов.

Целью работы является исследование нового процесса в химии углеводов – пиранозид-фуранозидной перегруппировки (ПФП), протекающей при исчерпывающем сульфатировании полигидроксильных производных углеводов в присутствии сильных кислот, с изучением границ применения ПФП в синтезе сложных галактофуранозилсодержащих олигосахаридов, родственных антигенным полисахаридам грибковых и бактериальных патогенов, а также характеристика конформационных и иммунохимических свойств полученных соединений. Для достижения перечисленных целей были поставлены следующие **задачи**:

1. Установить механизм ПФП, её движущую силу и зависимость от структуры пиранозных субстратов.

2. На основе ПФП разработать методы получения сложных избирательно защищенных галактофуранозидных синтетических блоков для сборки олигосахаридов.

3. С использованием ПФП синтезировать широкую группу разнообразных по строению олигосахаридов, структурно родственных грибковым и бактериальным полисахаридам.

4. Установить основные закономерности пространственного строения фуранозидов и их сульфатированных производных, важные для их реакционной способности и распознавания белковыми рецепторами.

5. С использованием набора синтетических лигандов, родственных грибковым полисахаридам, исследовать профиль углеводной специфичности сывороточных иммуноглобулинов у пациентов с грибковыми инфекциями.

6. Исследовать иммуномодулирующее действие галактофуранозилсодержащих олигосахаридов, а также клеточную экспрессию цитокинов и хемокинов в их присутствии.

7. С использованием наборов модельных олигосахаридов, родственных грибковым антигенным полисахаридам, установить специфичность антител в существующих коммерческих диагностикумах.

8. Синтезировать гликоконъюгатные иммуногены и покрывающие антигены, позволяющие получить и отобрать эффективные диагностические антитела, обладающие требуемой углеводной специфичностью и высокой аффинностью для использования в составе иммуноферментных диагностикумов.

9. Разработать диагностические тест-системы на базе различных физических платформ для определения антиуглеводных антител углеводных антигенов как маркеров грибковых заболеваний.

Научная новизна. 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 создания востребованных вакцин и иммуноферментных диагностикумов.

В результате данной работы проведены систематические синтетические исследования по получению разнообразных олигосахаридов, родственных галактоманнану из *Aspergillus spp.* Ранее были известны лишь единичные синтезы коротких олигосахаридов данного типа. Впервые синтезированы олигосахариды, родственные дигетерогликану *Enterococcus,* точная структура которого даже не была установлена из-за отсутствия соответствующих модельных олигосахаридов. В частности, в данной работе была выяснена конфигурация остатка молочной кислоты в дигетерогликане, которая представляется иммунологически значимым структурным элементом. Соответственно, отсутствовали и данные о конформационных состояниях обсуждаемых бактериальных и грибковых олигосахаридов, их пространственной организации и иммунохимических свойствах.

Настоящая работа стала возможной благодаря открытию ПФП, её механизма и границ применения, что позволило впервые провести препаративный синтез широкого

ряда избирательно модифицированных фуранозных производных, включая D-галактофуранозные, получение которых известными методами является весьма трудоёмким и проблематичным. Применение этого уникального процесса для синтеза целевых структур позволило не только впервые получить столь сложные олигосахариды, но и впервые изучить их физико-химические и иммунобиологические характеристики. Эти результаты впервые сформировали основу для последующего создания диагностикумов и вакцин для практического применения.

Практическая значимость. Изученная в ходе работы ПФП 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. Данный продукт был лицензирован компании «ХЕМА», зарегистрирован в качестве медицинского изделия (МИ РЗН 2019/8791), серийно производится и используется в России и за рубежом.

Методология и методы исследования. Вся экспериментальная работа, изложенная в диссертационной работе, проведена на современном уровне и с соблюдением соответствующих этических норм. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле с использованием автоматизированных хроматографических систем (флэш-хроматограф). Гель-хроматографию свободных олигосахаридов осуществляли на колонке с гелем TSK HW-40(S) или G-15; элюат анализировали с помощью проточного рефрактометра. Спектры ЯМР регистрировали на приборах «Bruker Avance 600», «Bruker AM300». Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации (ESI). Реакции гликозилирования проводили в абсолютных растворителях. Молекулярные сита перед проведением реакции активировали в течение двух часов при температуре 180 °C в вакууме масляного насоса. Все животные эксперименты были одобрены локальной этической комиссией. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим

стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Основные положения, выносимые на защиту:

1) Пиранозид-фуранозидная перегруппировка – новый процесс в химии углеводов: механизм реакции, движущая сила и рамки применимости для различных типов углеводных субстратов.

2) Метод получения избирательно защищенных галактофуранозидных синтетических блоков, основанный на ПФП.

3) Синтез олигосахаридов, структурно родственных грибковым и бактериальным полисахаридам и содержащих в своем составе галактофуранозидные звенья.

4) Результаты исследований пространственного строения и конформационные свойства галактофуранозилсодержащих соединений.

5) Результаты иммунохимических исследований синтетических олигосахаридов, родственных полисахаридам клеточной стенки грибов, и разработка на их основе прототипов диагностических тест-систем, использующих различные физические платформы для детектирования биологического сигнала.

Апробация работы. Результаты работы неоднократно докладывались и обсуждались на разнообразных всероссийских и международных конференциях, где были представлены в виде приглашенных, пленарных и устных докладов, среди которых: Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 24–28 июля 2022 г.), 30-й Международный Углеводный Симпозиум ICS-2022 (Сан-Паулу, Бразилия 10-15 июля 2022), III Школа-конференция молодых ученых «Гликонауки и гликотехнологии для медицины» (Москва, 24 ноября 2021 года), II Школа-конференция молодых ученых «Гликонауки и гликотехнологии для медицины» (Москва, 2 декабря 2020), BioNanoTox 2020 (Ираклион, Греция, 7-8 сентября 2020, Online Congress), I Школа-конференция молодых ученых «Гликонауки и гликотехнологии для медицины» (Москва, 24 сентября 2019), XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (С.-Петербург, 9-13 сентября 2019), 29-й Международный Углеводный Симпозиум ICS-2018 (Лиссабон Португалия, 14-19 июля 2018). 24th International Symposium on Glycoconjugates (Jeju, Корея, 27 августа – 1 сентября 2017).

Публикации по теме научного доклада. Результаты проведенных исследований опубликованы в 45 статьях в рецензируемых журналах, из них 33 стати за период 2013-2022 гг. в журналах из списков Q1 и Q2, индексируемых Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора. Диссертационная работа обобщает результаты теоретических и экспериментальных исследований, проведенных непосредственно автором и в сотрудничестве с коллегами. Личный вклад автора заключается в постановке целей и задач исследований, планировании и постановке экспериментов, анализе полученных данных, обработке и обобщении результатов, установлении закономерностей, формулировке выводов и подготовке рукописей публикаций.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность представленных результатов определяется использованием комплекса современных методов анализа структуры. Строение всех впервые полученных веществ доказано методами ЯМР ^{1}H- ^{13}C-спектроскопии, в том числе с привлечением двухмерных гомо- и гетероядерных экспериментов (COSY, HSQC, ROESY, NOESY, HMBC и др.), а также методами масс-спектрометрии высокого разрешения. Результаты всех иммунобиологических экспериментов воспроизводимы и статистически достоверны. Кроме того, результаты, полученные при выполнении исследований, находятся в поле современных научных представлений о химии и биохимии углеводов, согласуются и дополняют опубликованные в научной литературе данные.

Соответствие паспорту научной специальности. Тема и содержание диссертации соответствуют паспорту специальности 1.4.9. «Биоорганическая химия»: п.1 «Структурно-функциональные и синтетические исследования биологически значимых высокомолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и смешанных биополимеров любых типов)», п.3 «Проблемы нейро- и иммунохимии, связанные с особенностями строения компонентов соответствующих биологических систем».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Научный доклад состоит из четырёх глав. В первой главе описаны результаты исследований нового процесса в химии углеводов – пиранозид-фуранозидной перегруппировки (ПФП), протекающей при исчерпывающем сульфатировании полигидроксильных производных углеводов в присутствии сильных кислот, включающие изучение механизма ПФП, установление стереохимических аспектов данного процесса,

определение областей его применения при использовании разнообразных углеводных субстратов, а также создание на основе ПФП препаративных методов для синтеза избирательно защищенных фуранозидных блоков. Во второй главе описано применение ПФП в синтезе серий олигосахаридов, родственных поверхностным антигенам грибковых и бактериальных патогенов. В третьей главе описаны результаты исследований закономерностей конформационной подвижности и пространственного строения фуранозидов и их сульфатированных производных, важные для реакционной способности и распознавания белковыми рецепторами. Заключительная четвертая глава описывает результаты применения синтезированных олигосахаридных лигандов для проведения иммунохимических исследований и для медицинской диагностики грибковых инфекций.

1. Исследование пиранозид-фуранозидной перегруппировки, протекающей при исчерпывающем сульфатировании полигидроксильных производных углеводов в присутствии сильных кислот

Начальный этап исследования, выносимого на защиту, связан с изучением методов полисульфатирования олигосахаридов, которое проводилось в ходе синтеза соединений, структурно родственных фрагментам природных сульфатированных полисахаридов. Данные соединения представляют интерес благодаря проявляемой ими разнообразной и высокой биологической активности. Например, полианионные гликозаминогликаны (ГАГ) регулируют процессы свертывания крови, воспаления, ангиогенеза, адгезии раковых клеток, вирусного инфицирования и многие другие. Высокосульфатированные полисахариды, выделяемые из морских водорослей и иглокожих (фукоиданы, фукозилированные хондроитинсульфаты) способны мимикрировать естественные цепи ГАГ, тем самым проявляя указанные типы биологической активности [1,2].

Несмотря на практическую значимость, химический синтез высокосульфатированных производных олигосахаридов является весьма нетривиальной задачей. Использование стандартных сульфатирующих реагентов ($Py{\cdot}SO_3$, $Et_3N{\cdot}SO_3$) и традиционных растворителей (Py, ДМФА, MeCN) приводит к образованию лишь частично сульфатированных продуктов, причем повышение температуры и/или использование больших избытков комплексов SO_3 не позволяет достигнуть полноты превращения.

В ходе исследования О-сульфатирования модельных фукоолигосахаридов было обнаружено, что добавление трифторметансульфоновой кислоты (TfOH) в реакционную смесь, содержащую комплекс $Et_3N{\cdot}SO_3$, приводит к резкому увеличению полноты протекания реакции сульфатирования. Однако детальный анализ ЯМР спектров продуктов

реакции позволил выявить новый нетипичный минорный продукт с нехарактерными для пиранозидов химическими сдвигами сигналов и константами спин-спинового взаимодействия [3]. Найдено, что применение более слабой трифторуксусной кислоты (TFA) вместо TfOH позволяет избежать образования данной примеси и приводит к чистым продуктам исчерпывающего сульфатирования самых разнообразных полигидроксильных производных, включая олигосахариды [4]. В последнее время нами также найдено, что данная методика может быть успешно использована для получения олигосахаридов, структурно родственных фрагментам фукозилированных хондроитинсульфатов из морских беспозвоночных, например, олигосахаридов **1** и **2**, показанных на Рисунке 1А. В результате диссертационного исследования были также разработаны специальные фукозил-доноры, обеспечивающие α-стереоизбирательность реакции гликозилирования для получения олигосахаридов данного класса, представляющих интерес в качестве лекарственных агентов разных типов, включая стимуляторы гемопоэза[*].

Детальное исследование строения побочного продукта, образующегося в ходе исчерпывающего O-сульфатирования линейных (1→3)-связанных фукоолигосахаридов **3**, позволило установить, что восстанавливающий α-L-фукопиранозный остаток подвергся трансформации в α-L-фукофуранозное звено с образованием продуктов типа **5** (Рисунок 1Б). Это, в том числе, подтверждалось наличием корреляций в спектре HMBC между атомами H(1) и C(4), а также между атомами H(4) и C(1) соответствующего остатка. Кроме того, пространственная сближенность протонов H(4) и H(1), а также H(4) и H(2), обнаруженная в спектре NOE, дополнительно свидетельствовала об образовании пятичленного цикла (Рисунок 1В) [3].

Моносахаридные остатки в составе сложных молекул способны претерпевать различные химические превращения под действием кислой среды, однако зачастую такого рода превращения неселективны и приводят к сложной смеси продуктов. Тем не менее, в случае исследованного процесса ПФП протекает уникальная и селективная перегруппировка пиранозидного остатка в фуранозидный с сохранением всех O-заместителей и конфигураций атомов в кольце. Данный процесс использован нами в качестве основы нового синтетического подхода для получения избирательно защищенных фуранозидных блоков.

[*] Данные исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образование РФ (Соглашение № 075-15-2020-777)

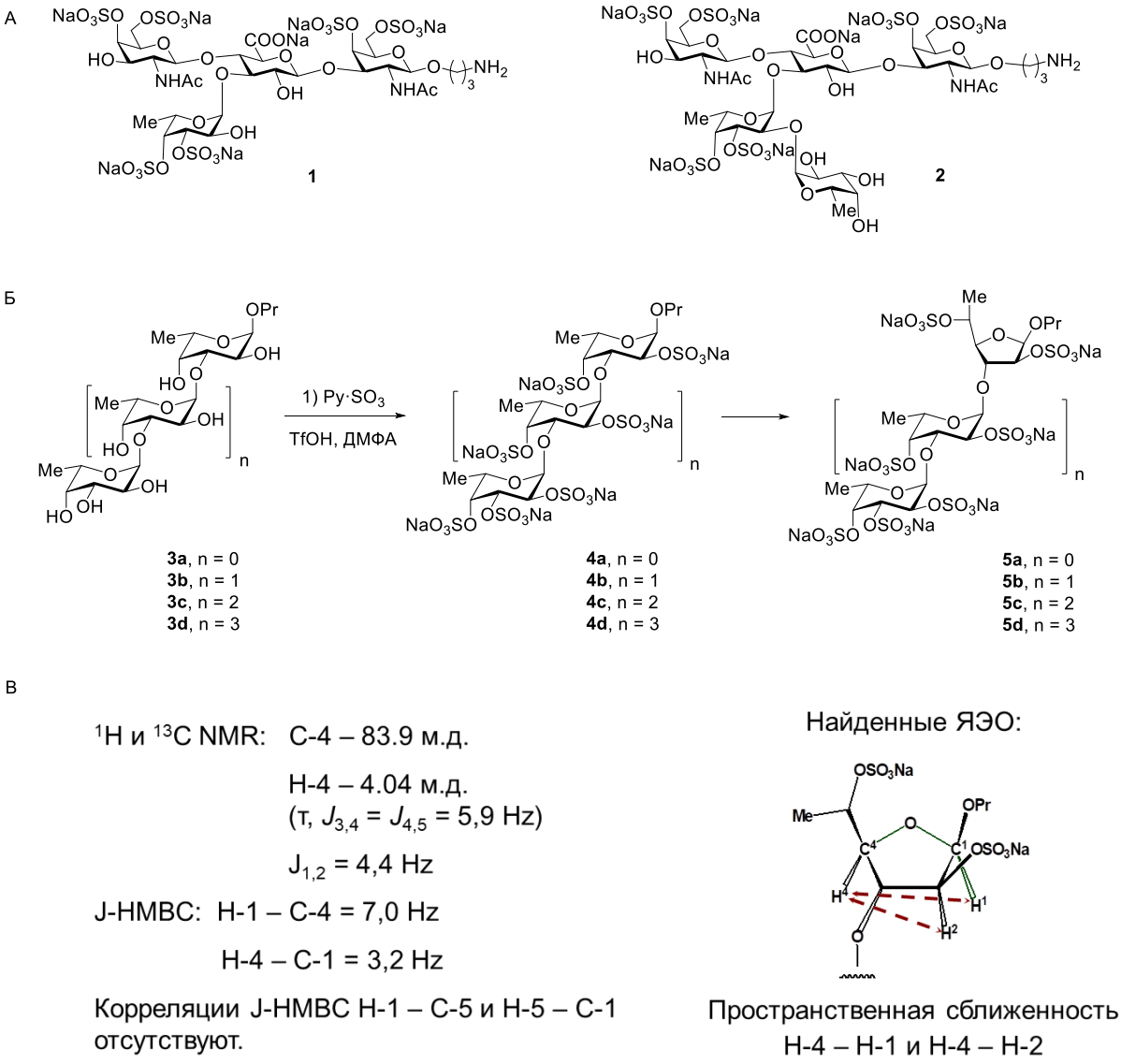
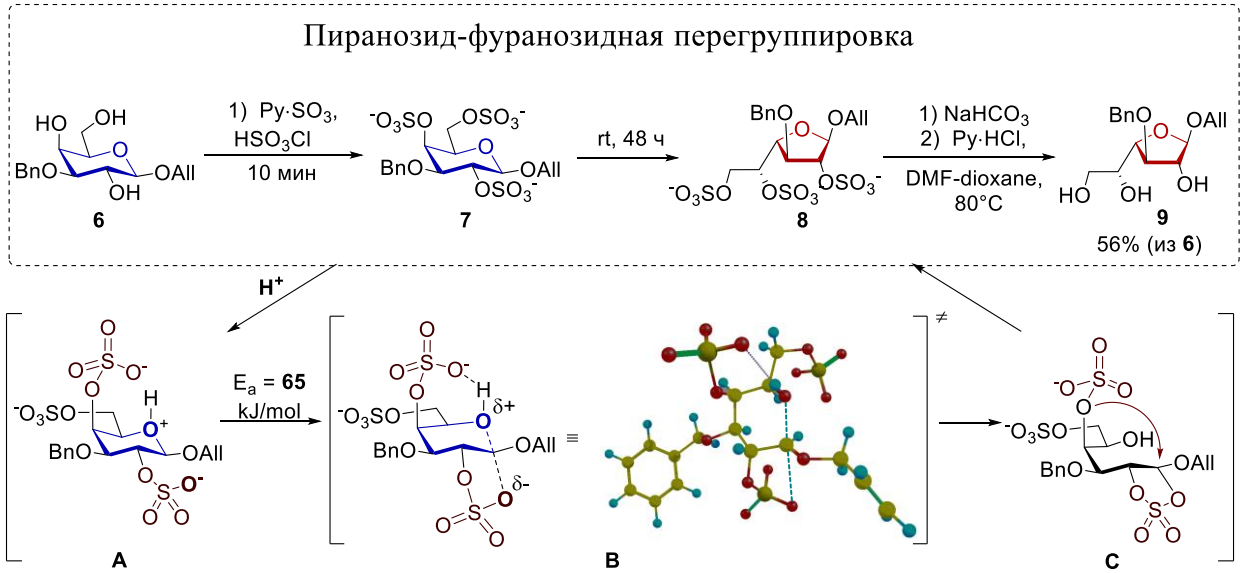


Рисунок 1. (А) Примеры синтезированных полисульфатированных олигосахаридов, родственных фукозилированным хондроитинсульфатам из морских беспозвоночных; (Б) первые примеры обнаруженной ПФП олигосахаридов в условиях исчерпывающего О-сульфатирования в присутствии сильных кислот; (В) данные спектров ЯМР, подтверждающие наличие в структуре соединений типа **5** фукофуранозного остатка.

Для того чтобы сделать перегруппировку пиранозного остатка в фуранозный основным процессом были оптимизированы условия её проведения. В частности, было предложено использовать хлорсульфоновую кислоту (HSO_3Cl) вместо TfOH, также были оптимизированы концентрации и количества реагентов, время и температура реакции [5]. ЯМР-мониторинг продуктов, образующихся из галактозида **6** показал, что на первом этапе реакции быстро (10 минут) образуется исчерпывающе сульфатированный пиранозид **7**, который затем медленно (в течение 48 часов), но практически полностью

перегруппировывается в изомерный фуранозид **8**. Полученный сульфатированный фуранозид **8** был подвергнут сольволитическому десульфатированию с образованием ценного синтетического блока **9** (Рисунок 2) [5].

Мы предположили, что перегруппировка начинается с протонирования атома кислорода пиранозного цикла с образованием промежуточного продукта реакции **A**. Определяющим скорость этапом ПФП является раскрытие пиранозного кольца и образование интермедиата **C**, которое проходит через переходное состояние **B**. Дальнейшая циклизация интермедиата **C**, сопровождаемая переносом сульфата, приводит к получению фуранозида **8**. Геометрия переходного состояния **B**, полученная в расчетах *ab initio*[*], позволяет заключить, что сульфатная группа при O-2 участвует в расщеплении O(5)-C(1)-связи, облегчая этот процесс и способствуя фиксации аномерной конфигурации во время перегруппировки. Сульфатная группа при O-4 также способствует протеканию реакции, стабилизируя O-5 в протонированном состоянии [5,6].



[*] Расчеты проведены к.х.н. А.Г. Гербстом (ИОХ РАН)

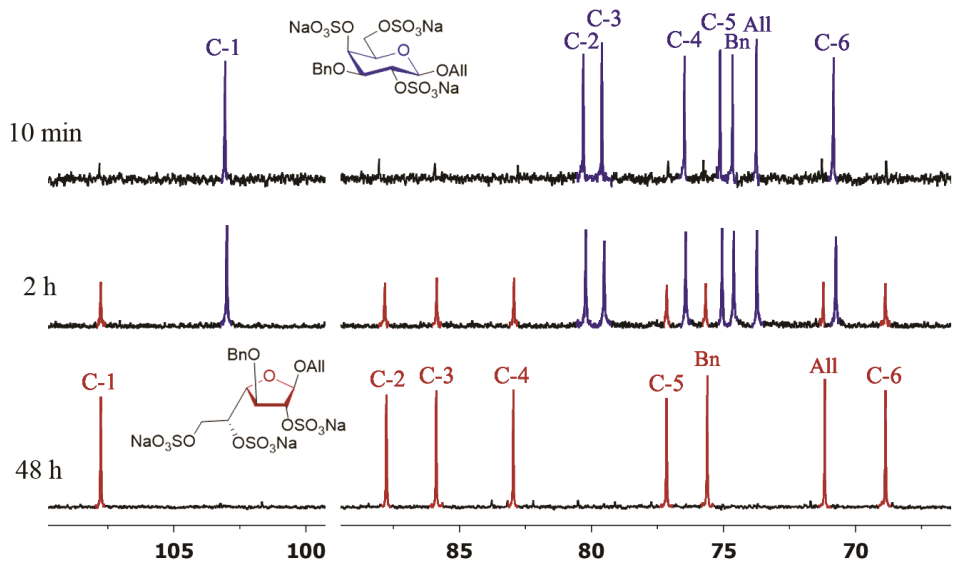


Рисунок 2. Исследование ПФП галактозида **6**, ее предполагаемый механизм и ЯМР-мониторинг продуктов ПФП.

Выяснение областей применения и ограничений ПФП проведено с использованием широкой серии пиранозидных субстратов, которые подвергались превращению в первоначально выбранных условиях: $Py{\cdot}SO_3$, HSO_3Cl, DMF, 20 °C, 48 ч. После завершения ПФП содержание фуранозидов в продуктах реакции анализировалось с использованием спектроскопии ЯМР. Моносахариды с *галакто*-конфигурацией пиранозного цикла и с экваториальной ориентацией аномерного заместителя (β-D-галактозид **10**, β-L-фукозид **11**, α-L-арабинозид **12**) эффективно подвергались трансформации в соответствующие фуранозиды (Схема 1). Моносахариды с *глюко*-конфигураций пиранозного цикла (β-D-глюкозид **13**, β-D-ксилозид **14**, метил β-D-глюкуронид **15** [7]) вступали в ПФП с меньшей скоростью, чем соответствующие *галакто*-производные, а *манно*-производные (как α-, так и β-D-маннопиранозиды **18**, **19**) не подвергались трансформации в фуранозидные производные совсем. Пиранозиды с аксиальной конфигурацией аномерного центра (α-D-галактозид **16** и α-D-глюкозид **17**) не вступали в ПФП. Важно отметить, что введение при O-2 ацильных (см. соединение **20** на схеме 1) или алкильных заместителей приводит к полному блокированию протекания ПФП, что очевидно связано с невозможностью O-сульфатирования второго положения, критически важного для протекания процесса (см. механизм на Рисунке 2) [6].

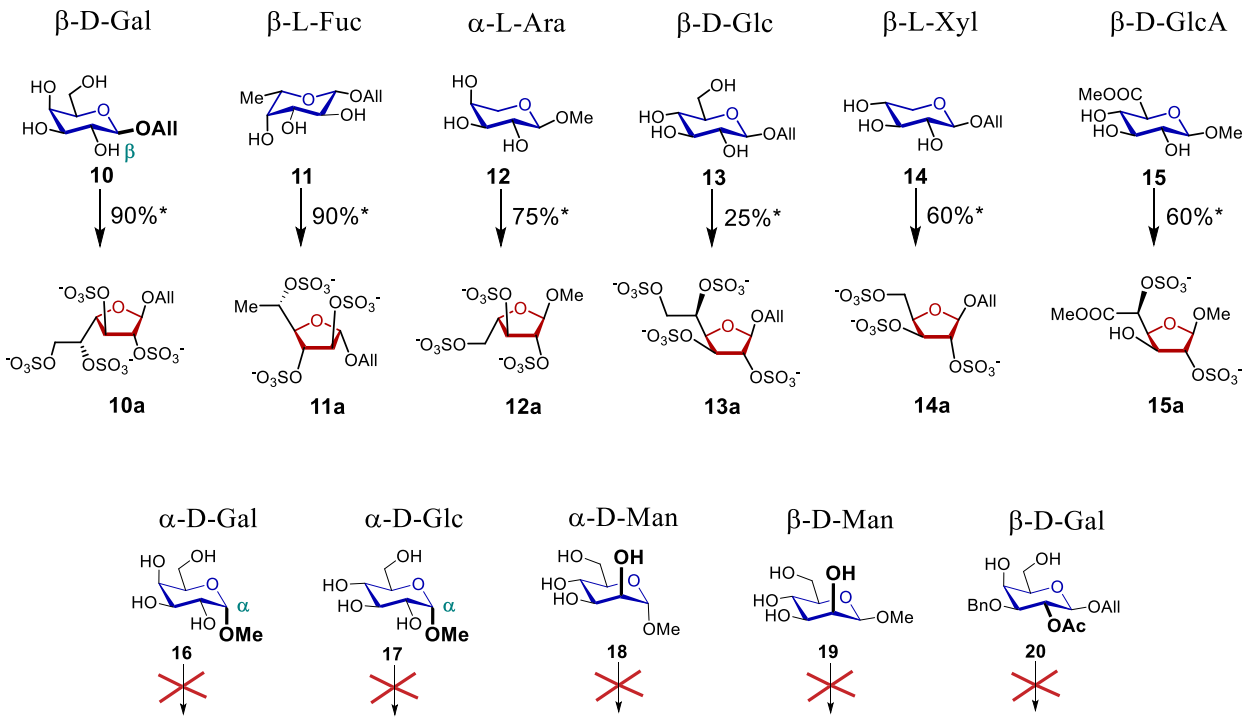


Схема 1. Результаты исследования эффективности ПФП в случае разнообразных моносахаридных производных. Условия реакции: 1) Py·SO_3, HSO_3Cl, DMF, 20 °C, 48 ч; 2) $NaHCO_3$ водн. Выходы определены с помощью спектроскопии ЯМР.

Для объяснения полученных закономерностей были проведены расчеты *ab initio*[*] геометрий переходных состояний и рассчитаны энергии активации лимитирующей стадии ПФП для различных субстратов (Рисунок 3). Так, для β-метил-галактозида энергия активации была ниже (46 кДж/моль), чем для β-метил-глюкозида (72 кДж/моль), для которого и экспериментальная скорость ПФП была существенно ниже. Для пиранозидов, не вступающих в ПФП, энергия активации была существенно выше и составила 92 кДж/моль для β-метил-маннозида **19**, 124 кДж/моль для α-метил-галактозида **16** и 117 кДж/моль для субстрата **20** с заместителем при О-2. Таким образом, полученные теоретические данные об энергии активации лимитирующей стадии ПФП хорошо соотносились с экспериментальными данными по выходу фуранозидного продукта [6].

[*] Расчеты проведены к.х.н. А.Г. Гербстом (ИОХ РАН).

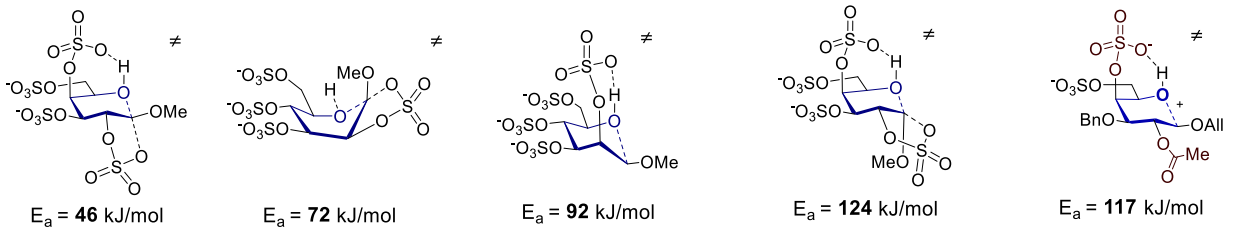


Рисунок 3. Геометрии переходных состояний и рассчитанные энергии активации ПФП для субстратов, различающихся стереохимической конфигурацией моносахаридного кольца.

Традиционно считается, что пиранозная форма является более энергетически выгодной, чем фуранозная, и в состоянии равновесия фуранозиды могут присутствовать лишь в незначительных количествах. Тем не менее, результаты ПФП демонстрируют обратные закономерности: исчерпывающе сульфатированный пиранозид **7** полностью трансформируется в изомерный фуранозид **8** в течение 48 ч (см. Рисунок 2). Для установления движущей силы ПФП были проведены теоретические расчеты пар несульфатированных и исчерпывающе О-сульфатированных модельных моносахаридов, включая распространенные гексозы (глюкоза, галактоза, фукоза) и пентозы (арабиноза и ксилоза) (Рисунок 4). Было показано, что в несульфатированных производных галактозы и глюкозы действительно более выгодными является пиранозиды, однако О-сульфатирование меняет ситуацию *vice versa*. Найдено, что наблюдаемая стабилизация фуранозидной формы при сульфатировании связана с пространственным расталкиванием объемных и заряженных сульфатных групп, которые значительно сильнее удалены друг от друга в фуранозидах чем в пиранозидах. Для маннозидов пиранозиды являются более энергетически выгодными как в несульфатированной, так и в О-сульфатировенной форме, что объясняет невозможность протекания ПФП для субстратов этого типа. Результаты проведенного исследования могут быть использованы для прогнозирования реакционной способности новых субстратов для ПФП [8, 9].

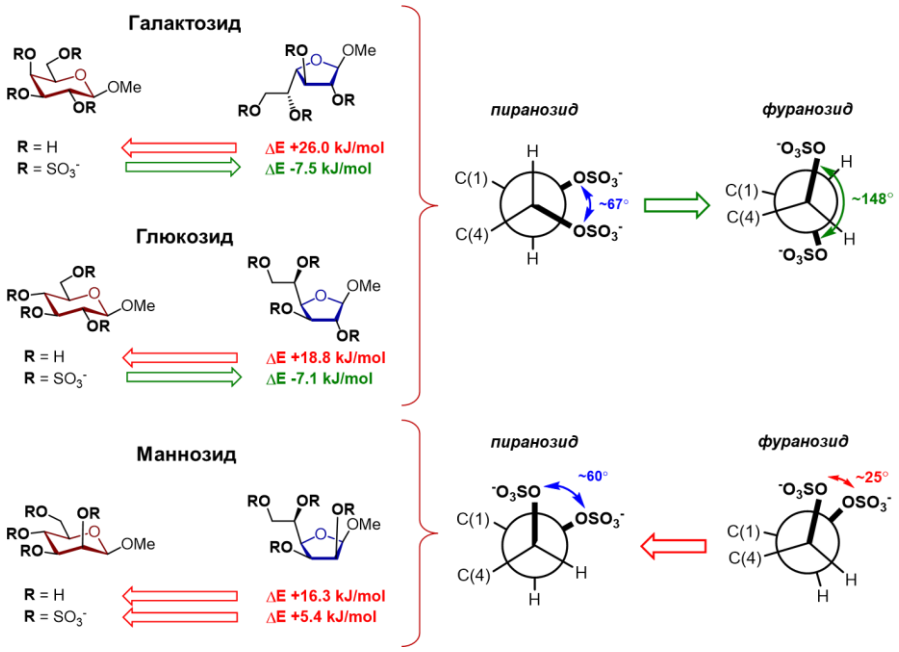


Рисунок 4. Внутримолекулярные расталкивания сульфатных групп - движущая сила ПФП исследованного типа.

Следует отметить, что эффективность ПФП слабо зависит от природы заместителей при О-3 и О-6. Таким образом, самые разнообразные избирательно защищенные пиранозиды могут выступать в качестве субстратов для этой реакции, позволяя получать ценные галактофуранозидные синтетические блоки. В следующем разделе будут подробно рассмотрены примеры препаративного использования ПФП для синтеза разнообразных олигосахаридов, структурно родственных фрагментам антигенных полисахаридов грибковых и бактериальных патогенов.

2. Использование ПФП в синтезе олигосахаридов, родственных антигенным полисахаридам грибковых и бактериальных патогенов

Актуальным направлением для применения синтетических возможностей ПФП является получение олигосахаридов, отвечающих ключевым структурным 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 аспергилез. Компоненты клеточной стенки, и в том числе галактоманнан, играют ключевую роль в патогенезе заболевания, взаимодействуя с иммунной системой хозяина и активируя защитные функции врождённого иммунитета.

Поэтому, галактоманнан является удобным маркером для ранней диагностики аспергиллеза, что крайне важно для своевременной терапии такого рода заболеваний.

С химической точки зрения галактоманнан представляет собой сложный гетерополисахарид, в котором главная цепь, построенная из α-(1→2)-/α-(1→6)-связанных маннопиранозных остатков, несет боковые олигогалактофуранозидные цепи. Они присоединяются к главной цепи через β-(1→3)- или β-(1→6)-гликозидные связи и могут содержать в своем составе разное число β-D-галактофуранозных остатков (от 1-го до 10), соединенных через межзвеньевые (1→5)-связи, а в некоторых случаях точечно через (1→6)-связи. Строение природного галактоманнана сильно варьируется в зависимости от вида и штамма продуцента и, кроме того, зависит от состава питательной среды и условий культивирования. Все это приводит к невозможности стандартизации природного галактоманнана и затрудняет гликобиологические исследования с его использованием. В связи с этим синтетические олигосахариды строго определенного строения, отвечающие отдельным структурным фрагментам галактоманнана, являются уникальными инструментами для исследования его биологической роли.

Для получения гетероолигосахаридов **26** и **27**, отвечающих иммунодоминантным фрагментам природного галактоманнана, была осуществлена препаративная трансформация 3,6-дибензилированного аллил-галактозида **21** в соответствующий 3,6-дибензилированный фуранозид **22** в условиях ПФП (Схема 2). Моносахарид **22** являлся ключевым синтетическим предшественником фуранозидного остатка во всех целевых соединениях. Так, региоизбирательная расстановка защитных групп и модификация агликона в соединение **22** позволили получить дисахаридный гликозил-донор **25**, содержащий временную монохлорацетильную защитную группу при О-5. С использованием дисахарида **25** и маннозидных акцепторов **23** и **24**, содержащих свободные гидроксильные группы при О-3 и О-6 соответственно, осуществлялось последовательное удлинение олигосахаридной цепи с образованием три-, пента- и гептасахаридов, которые были подвергнуты тотальному деблокированию с образованием целевых олигосахаридов серий **26**, **27** [10, 11].

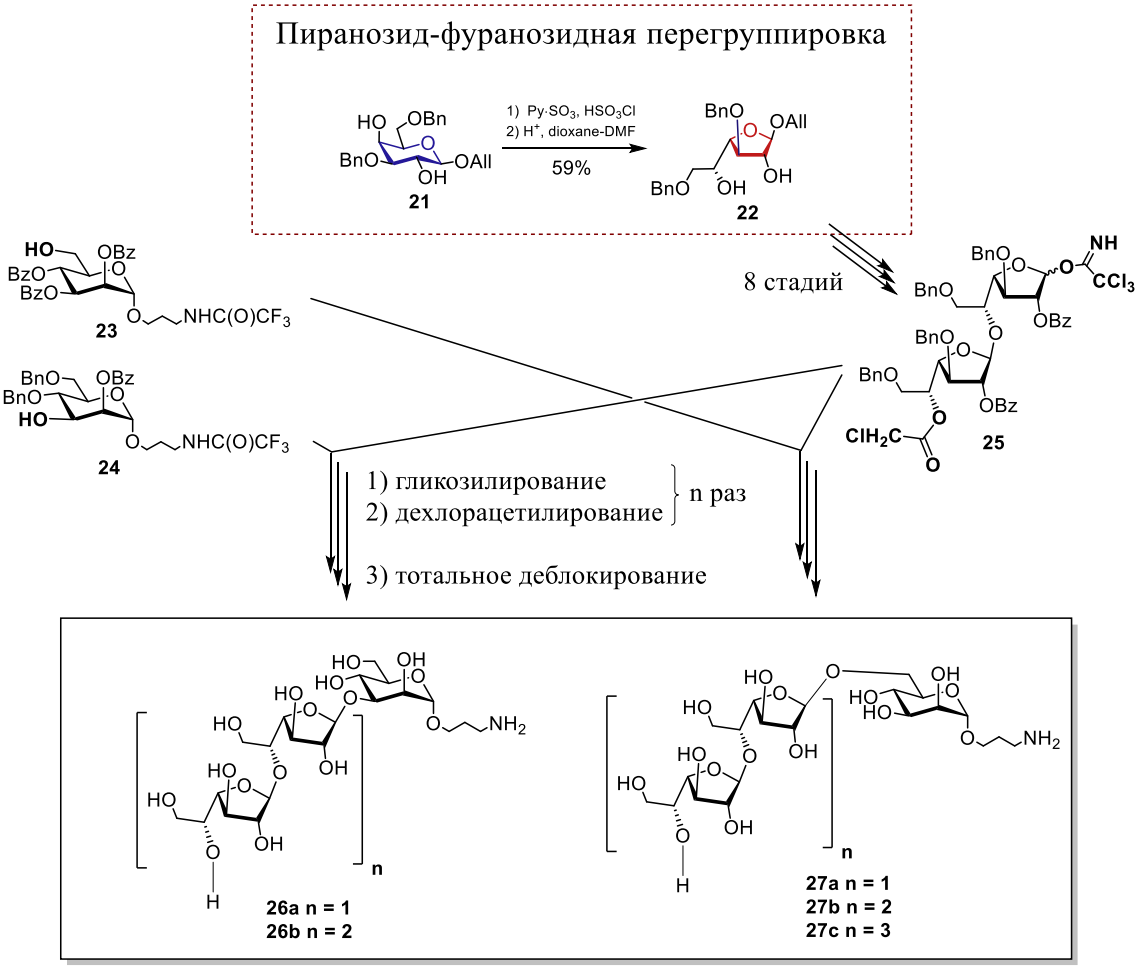


Схема 2. Синтез серий олигосахаридов **26** и **27**, родственных галактоманнану гриба *Aspergillus fumigatus*.

Присутствие в природном галактоманнане как β-(1→5)-, так и β-(1→6)-связей между остатками галактофуранозы инициировало разработку альтернативной схемы сборки рассматриваемых олигосахаридов, которая бы позволила получать оба типа связей исходя из одних и тех же предшественников. Как и в случае описанного выше подхода, в основе синтетической схемы лежит ПФП, однако в качестве ее субстрата был использован другой моносахарид **28**. Его перегруппировка протекала эффективнее, чем субстрата **21**, приводя к избирательно защищенному фуранозиду **29** с выходом 72% (Схема 3). Бензоилирование всех гидроксильных групп в фуранозиде **29** позволило получить полностью защищенное соединение **30**, селективное деблокирование которого в зависимости от условий приводило либо к 6-ОН (**31**), либо 5-ОН-производным (**32**). Так, удаление Fmoc-защиты под действием морфолина в ДМФА приводило к высвобождению гидроксильной группы при С-6. При удалении Fmoc-защиты под действием пирролидина в CH_2Cl_2 проводилась и количественная (О5→О6)-миграция бензоильной группы, приводящая к высвобождению

OH-группы при C6. Для сборки целевых углеводных последовательностей, исходя из моносахаридных блоков **32** и **33**, был синтезирован (1→5)-связанный дисахаридный гликозил-донор **34**, который использовался совместно с моносахаридным акцептором **23** для получения целевых структур (см. получение пентасахарида **37** на Схеме 3) [12].

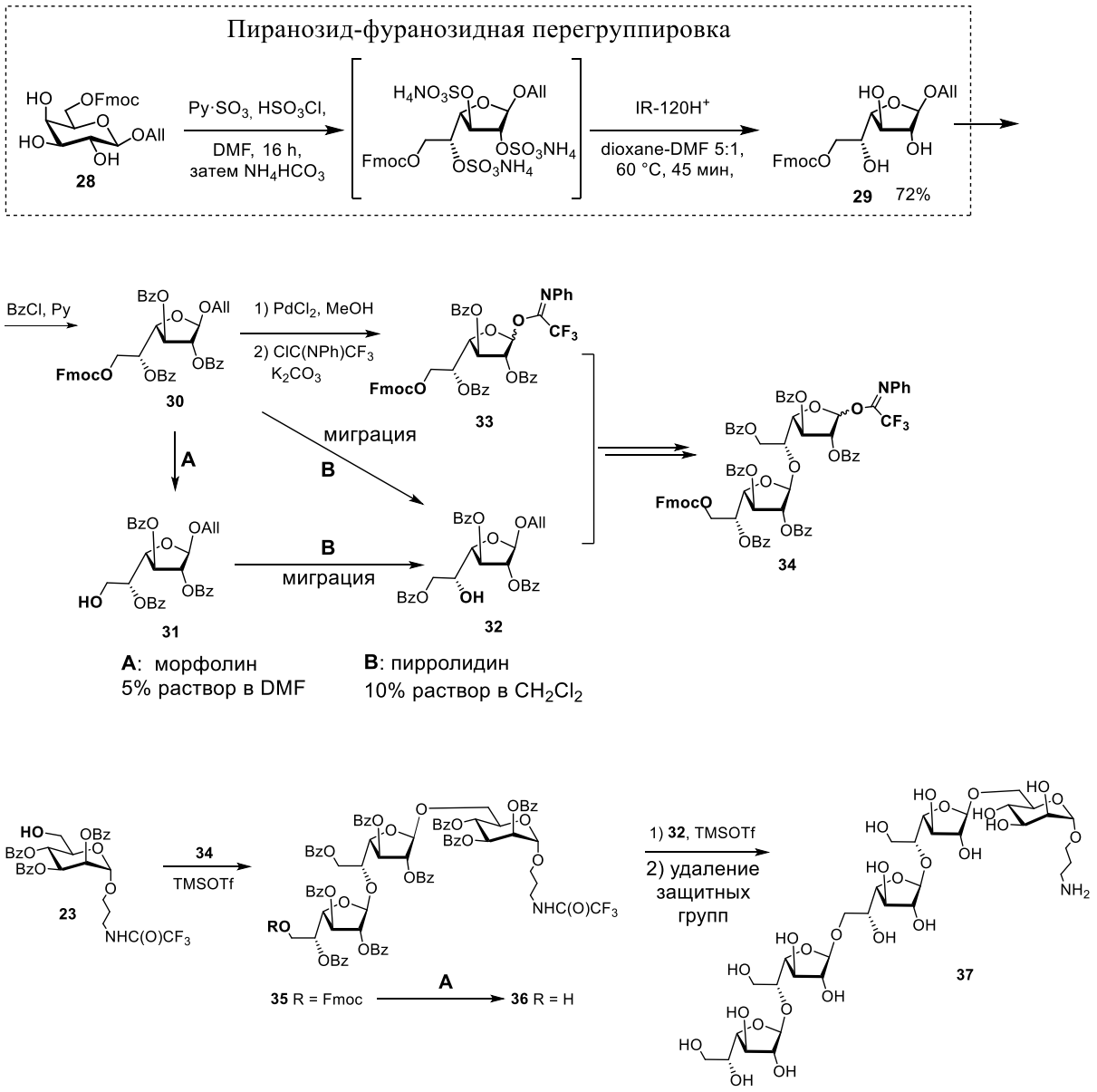


Схема 3. Альтернативная схема синтеза олигосахаридов, родственных галактоманнану плесневого гриба *Aspergillus fumigatus,* основанная на контролируемой (O5→O6)-миграции бензоила.

С использованием описанных выше химических подходов была получена обширная библиотека синтетических олигосахаридов, структурно родственных различным

фрагментам галактоманнана *Aspergillus fumigatus.* Данные модельные соединения позволили обобщить структурные и спектральные (ЯМР) данные для такого рода полисахаридов и выявить «сигналы репортеры» – характеристические кросс-пики, позволяющие определить в природном полисахариде наличие или отсутствие определенных структурных мотивов. Использование полученных модельных олигосахаридов для иммунохимических исследований изложено в заключительной четвертой части данного научного доклада [13].

Другим практически значимым объектом данного исследования является полисахарид галактан I, входящий в состав О-цепи ЛПС большинства антибиотикорезистентных штаммов бактерии *Klebsiella pneumonia*. Эта бактерия является широко распространённым возбудителем больничных и внебольничных пневмоний, бактериемии, инфекций мочевых путей и входит в перечень патогенов группы «ESKAPE», представляющих наибольшую опасность для человечества в связи с растущей антибиотикорезистентностью. Среди патогенов этой группы именно *K. pneumoniae* является лидером по скорости приобретения устойчивости к новым передовым антибактериальным препаратам.

Поверхностные полисахариды *K. pneumonia,* и, в частности, галактан I, вызывают особенный интерес в связи с возможной разработкой альтернативных иммунологических методов борьбы с этой бактерией. Галактан I построен из чередующихся остатков α-D-галактопиранозы и β-D-галактофуранозы, связанных между собой (1→3)-гликозидными связями. Эффективный синтез олигосахаридов, родственных галактану I и необходимых в качестве моделей для гликобиологических исследований, стал возможен благодаря использованию ПФП.

Реализованная схема синтеза ди-, тетра- и гексасахаридов серии **42**, родственных фрагментам галактана I ЛПС *K. pneumonia* включала ПФП избирательно защищенного предшественника **38** в фуранозидную форму **39** (схема 4). Следует отметить, что кислотолабильная п-метоксибензильная группа оказалась стабильной в условиях кислотнопромотируемого сульфатирования и последующего сольволитического десульфатирования, что ещё раз свидетельствует о широких возможностях применения ПФП. Фуранозид **39** и пиранозид **40** были использованы в качестве предшественников для получения ключевого дисахаридного блока **41**, отвечающего повторяющемуся звену галактана I. Повторение стадий гликозилирования и удаления п-метоксибензильной защиты позволило получить олигосахариды различной длины, которые были переведены в целевые соединения **42** после удаления всех защитных групп [14].

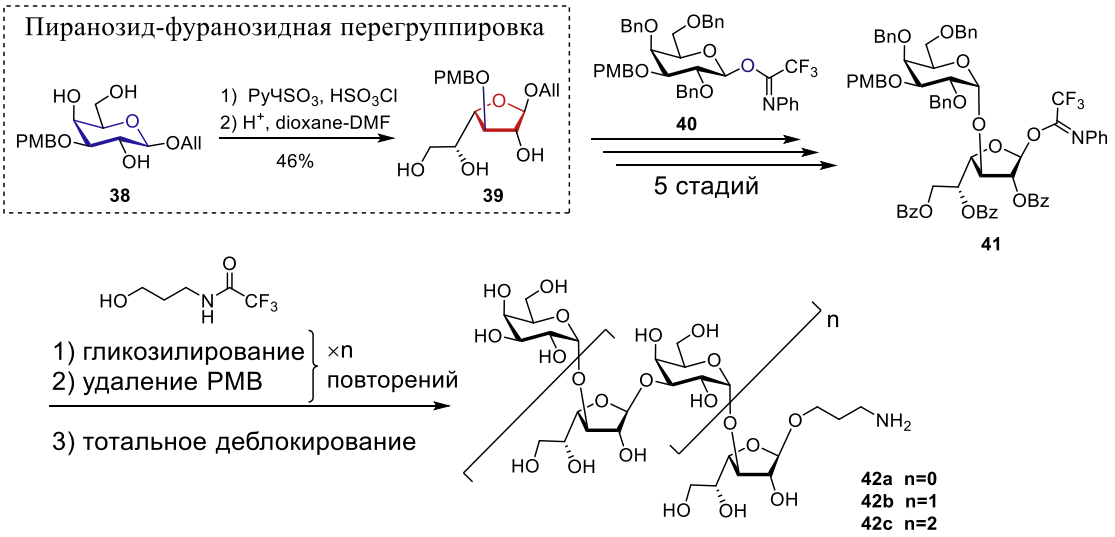


Схема 4. Синтез ди-, тетра- и гексасахаридов серии **42**, родственных фрагментам галактана I ЛПС *K. pneumonia*.

Альтернативная схема синтеза тетрасахарида **42b**, родственного фрагменту галактана I ЛПС *K. pneumonia*, была основана на использовании дисахаридов в качестве субстратов для ПФП (Схема 5). Так, восстанавливающий галактопиранозный остаток в избирательно защищенных дисахаридах **43** и **46** подвергался трансформации в фуранозную форму с сохранением всех О-защитных групп и конфигураций атомов углерода в кольце. В дальнейшем исходя из дисахаридов **44** и **47** были получены гликозил-акцептор **45** и гликозил-донор **48** соответственно. Их сочетание по схеме [2+2] и удаление всех защитных групп в продукте гликозилирования приводили к целевому тетрасахариду **42b**. Данная схема, в отличие от описанной выше (см. Схему 4), позволяет более эффективно получать тетрасахарид **42b**, однако не предназначена для дальнейшего удлинения цепи и с получением более крупных олигосахаридов [15].

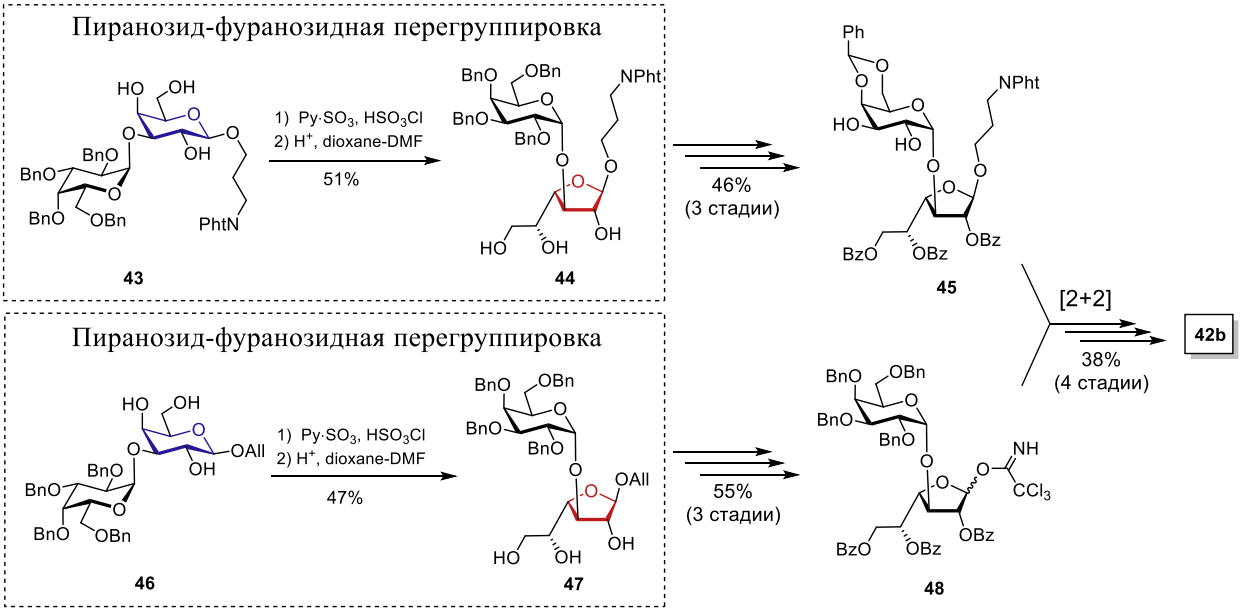


Схема 5. Альтернативная схема синтеза тетрасахарида **42b**, родственного фрагменту галактана I ЛПС *K. pneumonia*, с использованием дисахаридных субстратов.

Синтезированные таким образом олигосахариды, родственные фрагментам галактана I, были использованы в качестве антигенов для скрининга антител в сыворотках крови животных, иммунизированных препаратами из различных штаммов *K. pneumonia* [14]. Кроме того, полученные олигосахаридные модели использовались для установления новой лектиновой функции человеческого лизоцима, что будет подробно рассмотрено в следующей части данного научного доклада.

Детальное исследование структурных и иммунобиологических свойств полисахарида дигетерогликана, являющегося поверхностным антигеном наиболее опасных серотипов *Enterococcus faecalis*, требует использования соответствующих модельных соединений, эффективный синтез которых стал возможен благодаря ПФП. До настоящего исследования даже точная конфигурация остатка молочной кислоты в природном полисахариде оставалась невыясненной, что делало невозможным изучение молекулярных механизмов иммунного ответа при заражении данной бактерией [16].

Для получения модельных соединений **53-R** и **53-S** необходимых для установления конфигурации остатка молочной кислоты в дигетерогликане, проводили региоизбирательное 3-О-алкилирование галактопиранозида **49** через промежуточное образование оловоорганического интермедиата (Схема 6). Полученные в результате лактоны **50a**, **50b** и **50c** были разделены хроматографически, а затем спектрально (при

регистрации ядерных эффектов Оверхаузера в спектрах ЯМР) были однозначно установлены конфигурации атомов С2 в остатках молочной кислоты.

Раскрытие лактонов **50a**, **50b** и **50c** под действием метилата натрия в метаноле приводило к изомерным продуктам **51a** и **51b**, которые подвергались ПФП с образованием соединений **52a** и **52b** с R- и S-конфигурацией остатков молочной кислоты, соответственно. Последующее омыление под действием метилата натрия в метаноле позволило получить требуемые модельные моносахариды **53-R** и **53-S**, с помощью которых была однозначно подтверждена R-конфигурация в остатках молочной кислоты в бактериальном дигетерогликане [16], а также исследованы особенности конформационного строения данного фрагмента, что будет подробно рассмотрено в следующей части данного научного доклада.

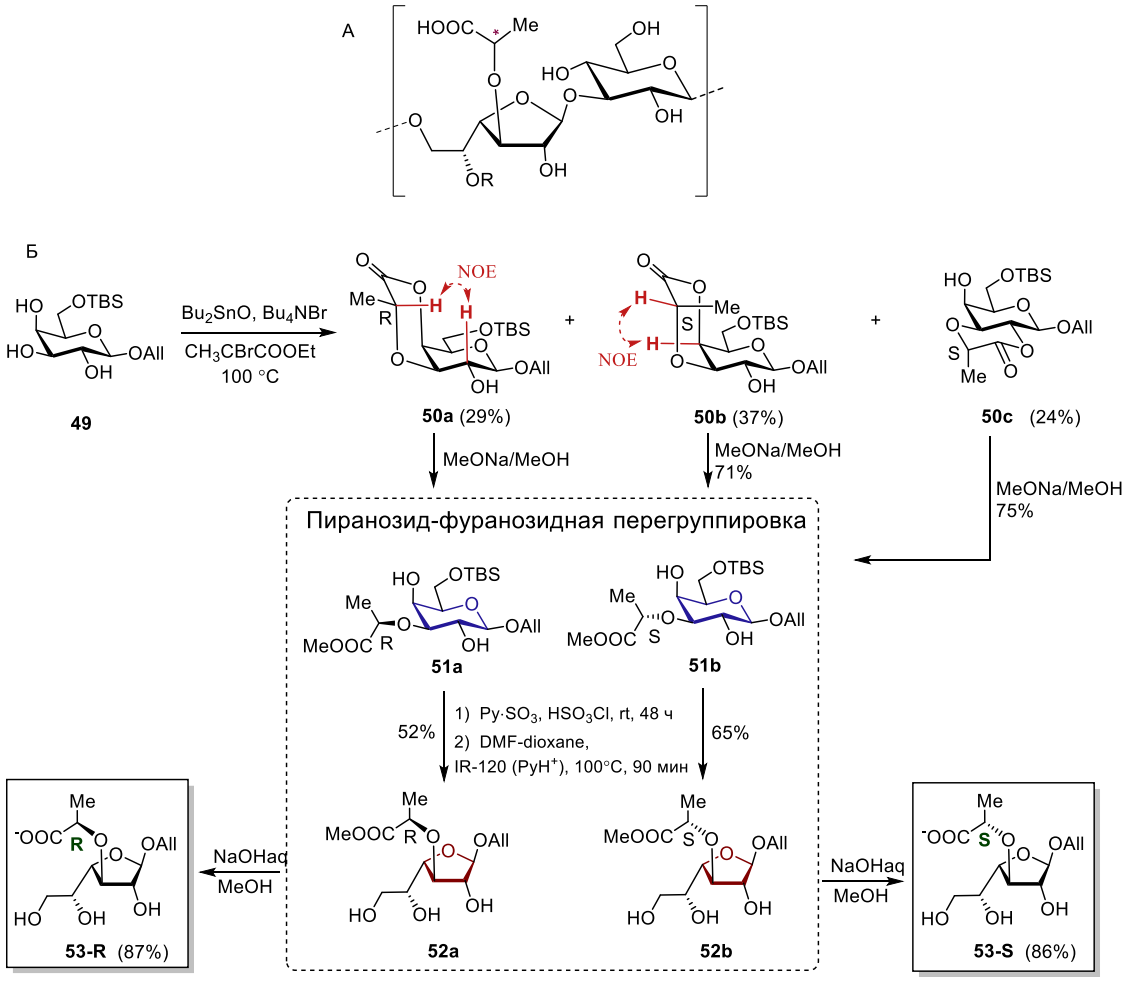


Схема 6. (А) Структура дигетерогликана *E. faecalis*. Звездой отмечен С2 в остатке молочной кислоты, конфигурация которого была неизвестна до настоящего исследования. (Б) Синтез модельных моносахаридов **53-R** и **53-S** необходимых для установления конфигурации молочной кислоты в дигетерогликане из *E. faecalis*.

На следующем этапе диссертационного исследования был осуществлен синтез модельного дисахарида **59**, содержащего остаток R-молочной кислоты, как в природном полисахариде. Для этого моносахарид **51a** подвергали ПФП, однако вместо сольволитического десульфатирования проводили ацетолиз сульфатированного фуранозида **54** под действием системы Ac_2O-AcOH-H_2SO_4 с образованием продукта **55**, который затем переводили в гликозил-донор **56** (Схема 7). Сочетание гликозил-акцептора **57** и гликозил-донора **56** при промотировании TMSOTf приводило к дисахариду **58**, который затем деблокировали с образованием целевого соединения **59**.

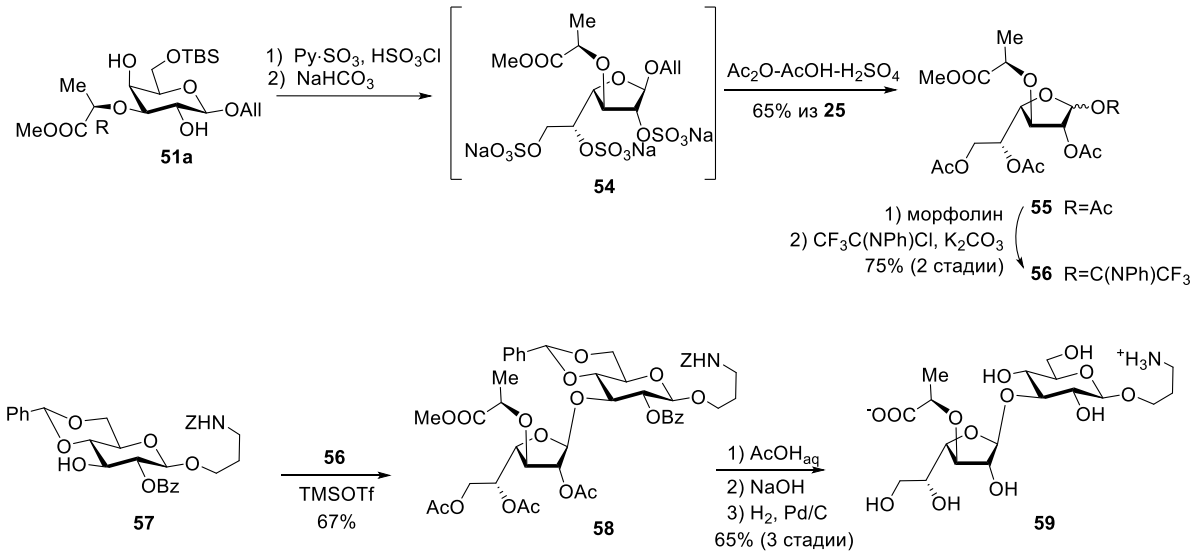


Схема 7. Синтез дисахарида **59**, родственного дигетерогликану *E. faecalis*.

С использованием разработанных синтетических подходов были получены линейные олигосахариды, отвечающие главной цепи дигетерогликана *E. faecalis* без остатка молочной кислоты. Универсальный галактофуранозидный предшественник **33**, который уже был ранее использован для получения олигосахаридов, родственных галактоманнану *Aspergillus* (схема 3), вводили в реакцию с глюкозил-акцептором **60** в результате чего с выходом 95% был получен дисахаридный блок **61** (Схема 8). Последовательность стадий гликозилирования этим блоком и удаления Fmoc-защиты в условиях, исключающих миграцию бензоата (см. выше), позволила синтезировать ди-, тетра-, гекса- и октасахариды, которые после удаления защитных групп были переведены в целевые соединения серии **62** [17].

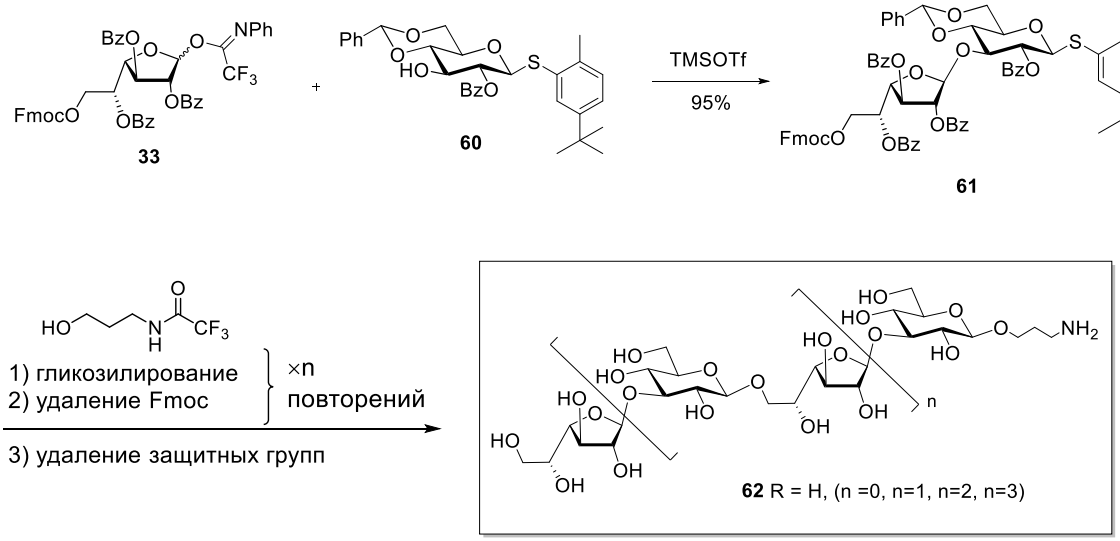


Схема 8. Синтез олигосахаридных лигандов серии **52**, родственных дигетерогликану *E. faecalis.*

Разработанные синтетические подходы были использованы для получения разветвленного олигосахарида, родственного фрагменту галактоксиломаннана *Cryptococcus neoformans* (Схема 9). Так, гликозилирование триола **64** донором **63** приводило к легко разделимой смеси β-(1→2)- и β-(1→3)-связанных дисахаридов, а также к 2,3-дизамещенному продукту, удаление защитных групп в которых приводило к целевым олигосахаридам **65-67**, необходимым для моделирования пространственной структуры и конформационного поведения галактоксиломаннана *C. neoformans* [18].

Область ПФП для препаративного получения синтетических блоков не ограничивается исключительно производными галактозы. Так данная реакция была успешно использована на фукопиранозном субстрате **68** в ходе реализации полного синтеза разветвленного фрагмента **71** полисахарида фукоидана из бурой водоросли *Chordaria flagelliformis*. Важно отметить, что фукофуранозидный донор **70**, полученный из продукта перегруппировки **69** содержит временную бензоильную группу, которая необходима для последующего региоселективного введения сульфата, а также обеспечивает требуемую α-стереоселективность реакции гликозилирования (Схема 10). Получение данного блока альтернативными методами является крайне нетривиальной задачей [19].

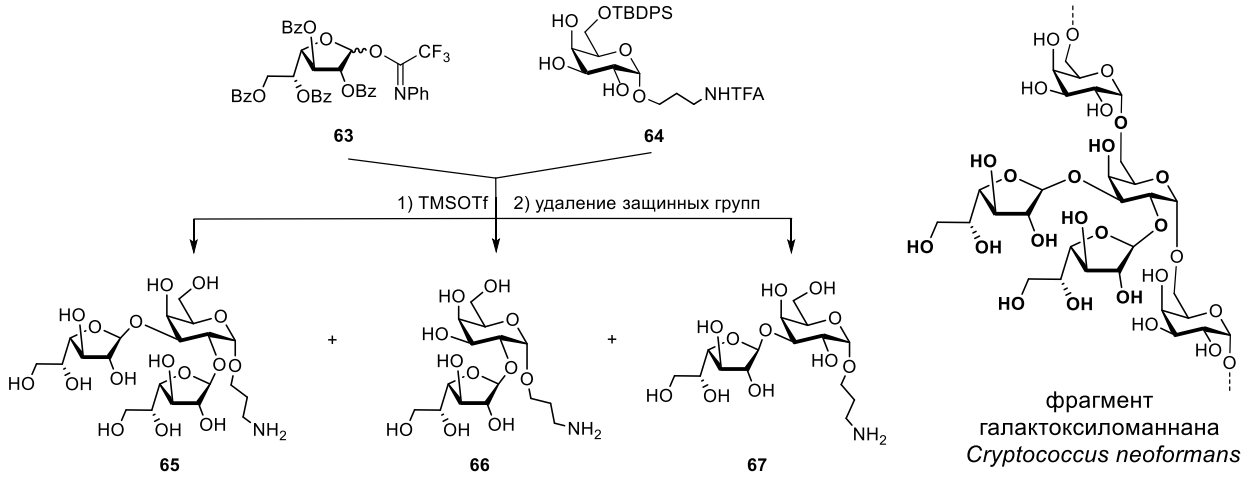


Схема 9. Синтез олигосахаридов, родственных разветвленному фрагменту галактоксиломаннана *C. neoformans*.

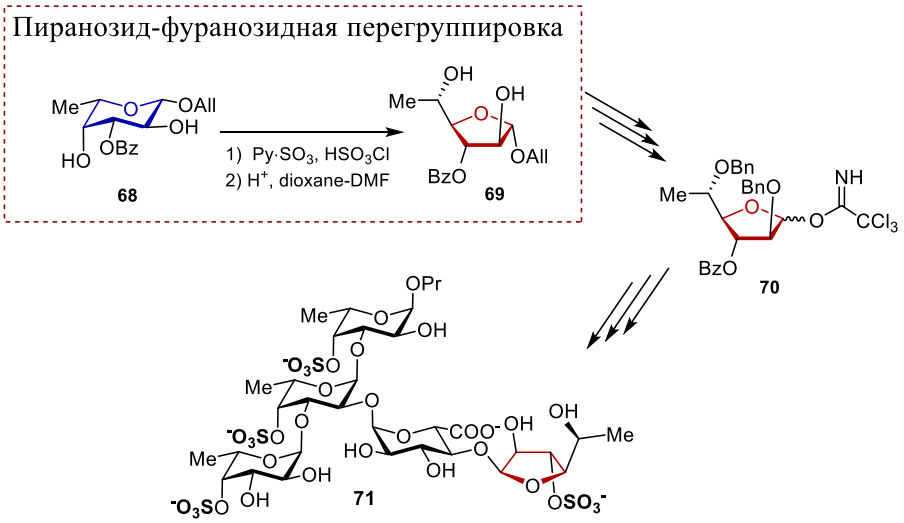


Схема 10. Применение ПФП в полном синтезе пентасахарида **71**, родственного фрагменту фукоидана из бурой водоросли *C. flagelliformis*.

Таким образом, успешное применение ПФП для препаративного синтеза самых разнообразных олигосахаридов надежно подтверждает ее практическое значение. Данная реакция открыла простой путь к получению избирательно замещенных фуранозидных предшественников, труднодоступных с использованием известных методов, и заняла важное место в современном арсенале синтетических методов химии углеводов.

3. Исследование пространственного строения и конформационный анализ фуранозидов и их замещенных производных[*]

Все соединения, синтезированные в ходе данной работы, были детально исследованы с использованием спектроскопии ^{1}H и ^{13}C ЯМР, а также методик 2D корреляционной спектроскопии (COSY, ROESY, TOCSY, HMQC, HMBC и другие) для подтверждения структуры, выявления особенностей их спектральных характеристик, а также моделирования их пространственного строения. Фуранозил-пиранозидная связь является распространенным структурным элементом для широкого круга биологически значимых полисахаридов, в том числе и для синтезированных в ходе работы олигосахаридных фрагментов галактоманнана *A. fumigatus,* фрагментов ЛПС *K. pneumoniae*, дигетерогликана *E. faecalis* и других.

Исследование особенностей спектров ЯМР и конформационный анализ таких полисахаридов был осуществлен с использованием синтезированных в предыдущей части модельных дисахаридов. Было проведено моделирование геометрии связей между фуранозидным и пиранозидным остатками и расчет спектральных ЯМР характеристик, таких как ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО) и эффекты гликозилирования ($\Delta\delta$) на ядрах ^{13}C. Теоретически рассчитанные значения $\Delta\delta$ хорошо коррелировали с экспериментально измеренными величинами. Было показано, что для дисахаридов, не содержащих глюкозный остаток, характерны конформеры с небольшими значениями торсионных углов φ и ψ. С другой стороны, для соединений, содержащих глюкопиранозный остаток, ключевой вклад в наблюдаемые ЯМР эффекты вносит минорный инвертированный конформер с углом ψ близким к 180° (см. Рисунок 5) [20].

[*] Теоретические расчеты проведены к.х.н. А.Г. Гербстом (ИОХ РАН).

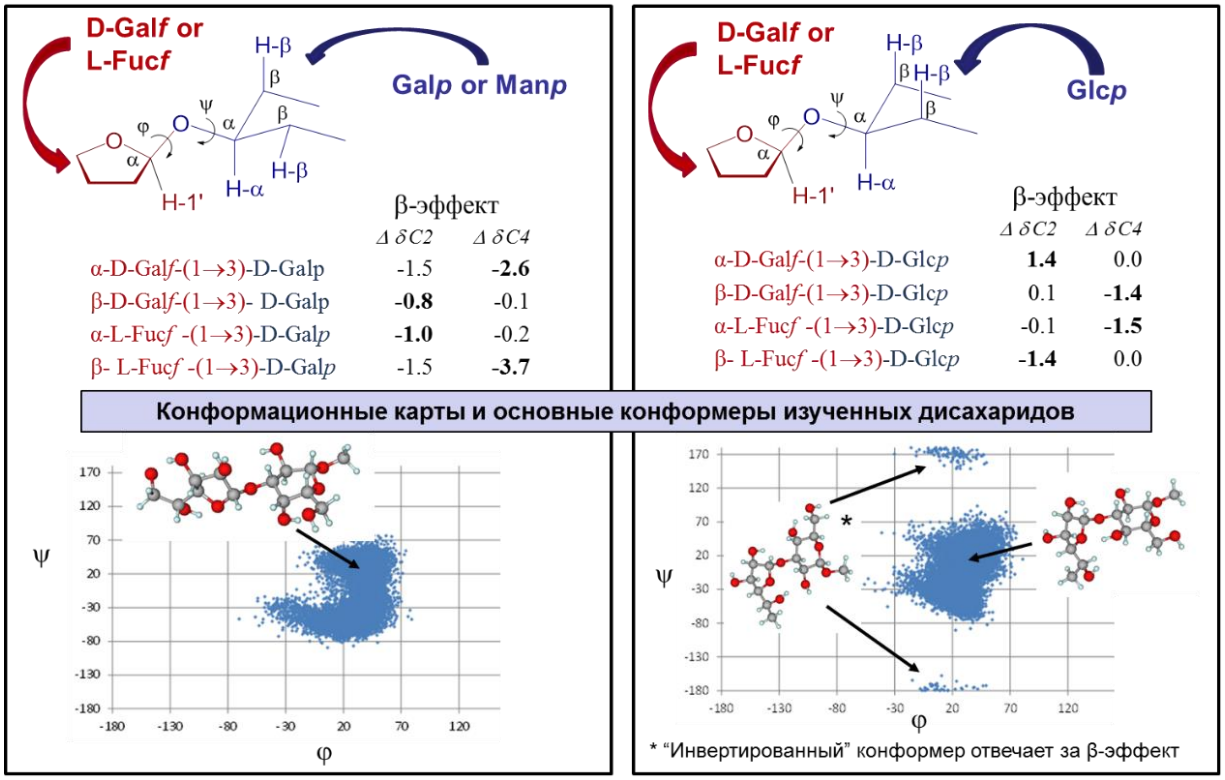


Рисунок 5. Эффекты гликозилирования в спектрах ЯМР и их объяснение с использованием методов конформационного анализа и квантовых расчётов.

Не только конформации межзвеньевых связей, но и пространственное строение самих моносахаридных звеньев вносит существенный вклад в общую геометрию углеводной цепи. Было отмечено, что исчерпывающее О-сульфатирование моносахаридных остатков кардинальным образом меняет внутриостаточные константы спин-спинового взаимодействия в спектрах ЯМР. В связи с этим были детально изучены конформационные изменения пиранозного цикла, наблюдаемые при исчерпывающем сульфатировании. В результате проведенных конформационных исследований, основанных на комплексе спектрального и теоретического анализа, было показано, что сполна сульфатированные пиранозидные производные в ряде случаев, например, глюкозные и ксилозные производные (Рисунок 6), находятся в необычном искаженном конформационном состоянии. Данные результаты имеют принципиальное значение для моделирования механизма ПФП. Особенности пространственного строения сульфатированных пиранозидов определяют необычную реакционную способность субстратов [21,22].

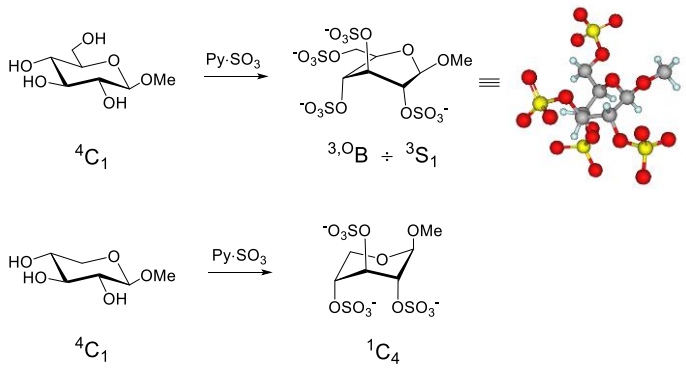


Рисунок 6. Конформационные изменения пиранозного цикла, наблюдаемые при исчерпывающем сульфатировании.

Фуранозиды являются значительно более конформационно подвижными, чем соответствующие пиранозиды. В связи с этим конформационные изменения, вызванные исчерпывающим сульфатированием, в них более выражены. С использованием методов компьютерного моделирования, а также спектральных методик ЯМР (J-resolved HMBC, NOESY) был проведен конформационный анализ основных моносахаридов в фуранозной форме (Рисунок 7). Проведенное конформационное исследование включало как анализ конформации 5-членного фуранозного цикла, так и анализ пространственной ориентации боковой цепи. Во всех случаях было показано, что при сульфатировании происходит смена основного конформера, что приводит к принципиальным изменениям вицинальных констант спин-спинового взаимодействия в спектре ЯМР [22,23].

Для выяснения особенностей 3D-строения фуранозил-содержащих олигосахаридов, влияющих на их иммунологические свойства, проведены теоретические исследования конформационной подвижности галактофуранозильных остатков в составе более сложных молекул: олигосахаридов и О-лактильных производных. Найдено, что для адекватного описания конформационного равновесия необходимо использование метода DFT с дисперсионной поправкой. Было показано, что в моносахаридах, модифицированных остатком молочной кислоты, вращение данного остатка может вызывать конформационные переходы в фуранозидном кольце (Рисунок 8), чего обычно не наблюдается в пиранозидных структурах. Анализ оптимизированных структур методом Natural Bond Orbitals (NBO) позволил предположить, что этот эффект может быть связан с так называемым 1,3-*син*-диаксиальным расталкиванием неподеленных электронных пар на атомах кислорода О-3 и О-1. Так же был проведен квантово-механический расчет ЯМР констант экранирования ^{1}H фуранозидных колец. Выяснилось, что, в отличие от пиранозидов, константы экранирования в фуранозидах слабо меняются в зависимости от конформации пиранозного цикла [24].

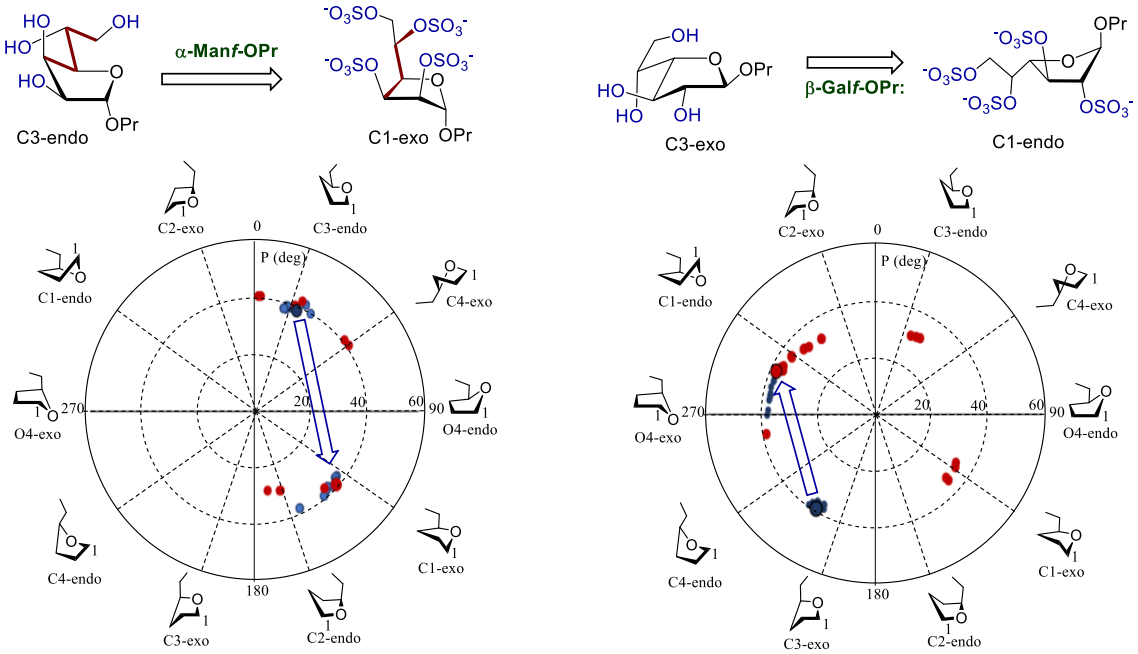


Рисунок 7. Конформационные изменения, вызванные исчерпывающим сульфатированием в фуранозидах. Стрелкой показано смещение основного конформера при сульфатировании на диаграмме псевдовращения, отражающей конформацию 5-членного цикла. Синие точки на диаграмме псевдовращения обозначают конформации несульфатированных фуранозидов, красные точки – сульфатированных.

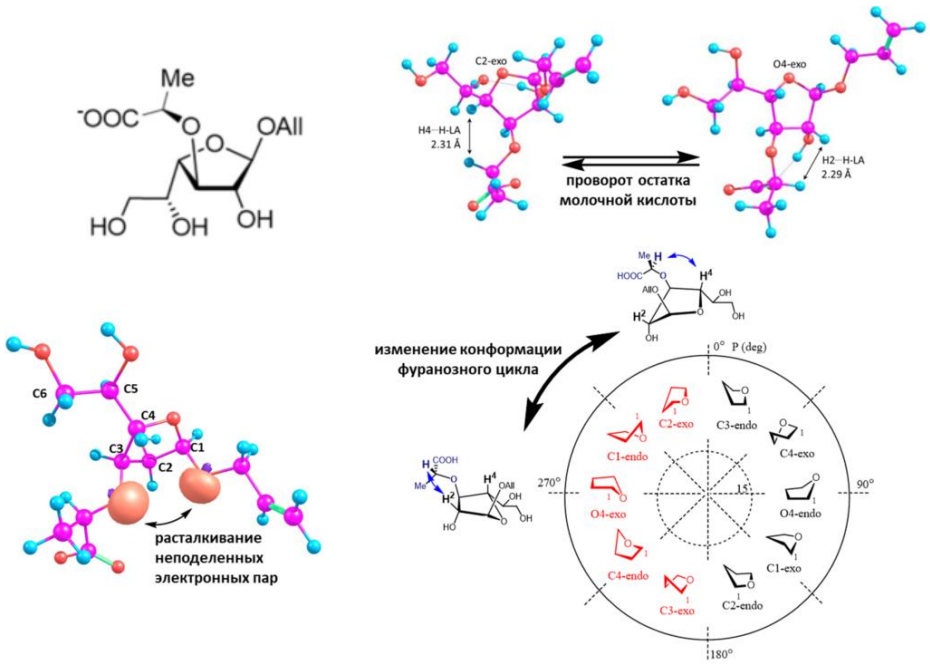


Рисунок 8. Изучение конформационной подвижности фуранозидных циклов в модельных соединениях, родственных дигетерогликану *E. faecalis*.

С использованием полученных модельных олигосахаридов был проведен детальный структурный и конформационный анализ разветвленного фрагмента галактоксиломаннана *C. neoformans*. В результате проведенных теоретических и экспериментальных исследований были оптимизированы методики проведения конформационного анализа для фуранозидсодержащих олигосахаридов. Проведенное таким образом изучение конформации гликозидных связей с участием галактофуранозидных звеньев в сочетании с измерением КССВ ^{1}H-^{1}H и ^{13}C-^{1}H позволило выявить полный набор конформеров фуранозидных колец и установить их содержание в равновесной смеси (Рисунок 9). Рассчитанные химические сдвиги ^{13}C ЯМР соответствовали экспериментальным, что подтверждает правильность полученных результатов [18].

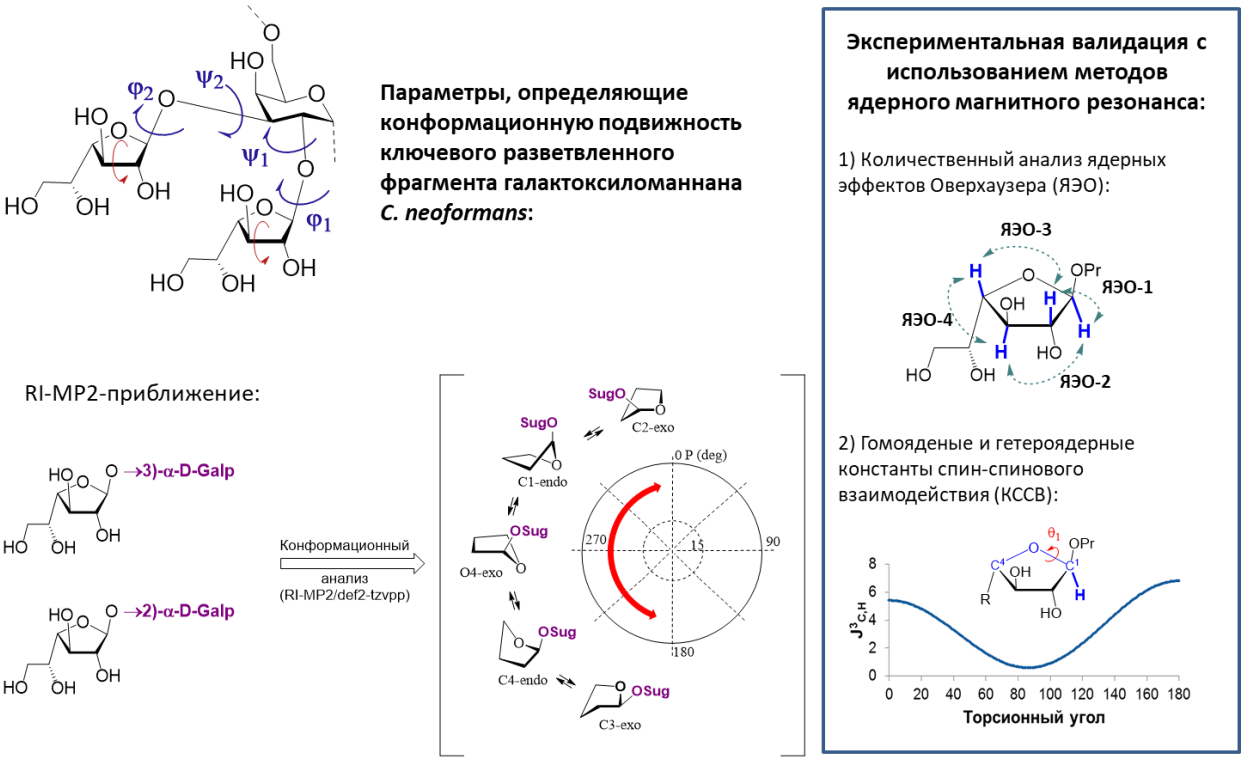


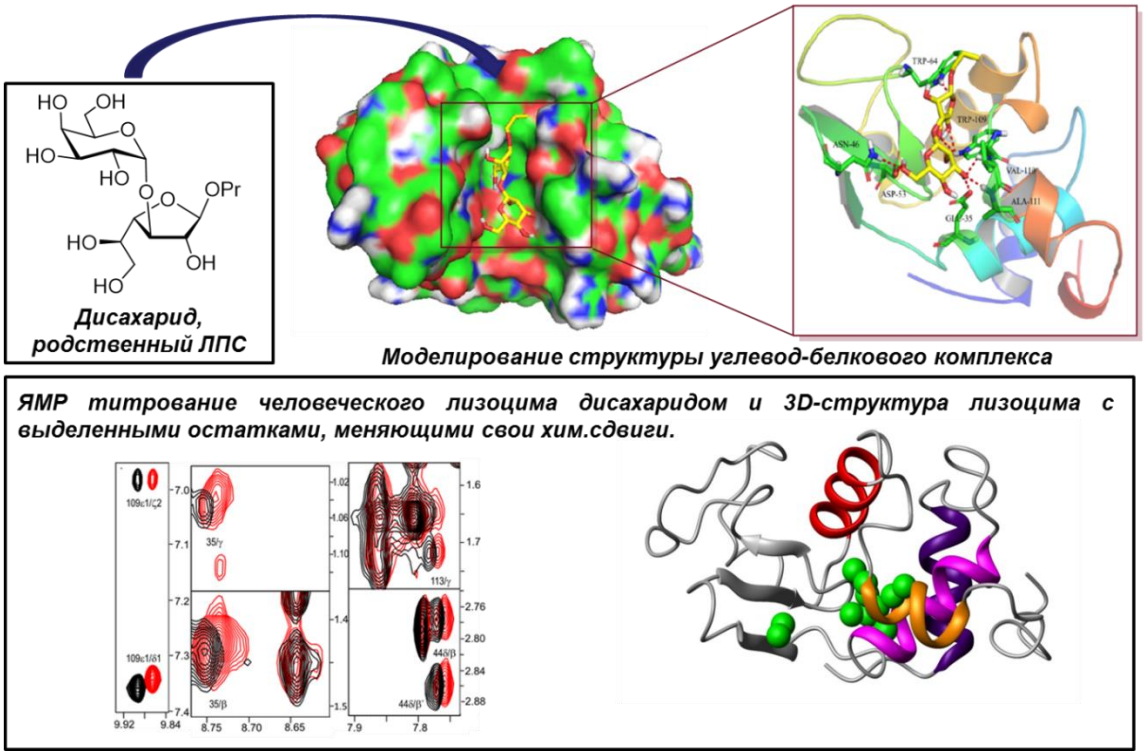
Рисунок 9. Конформационный и ЯМР анализ ключевого разветвленного фрагмента галактоксиломаннана *C. neoformans.*

Синтезированные в работе модельные олигосахариды, родственные О-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 первом этапе было

* В сотрудничестве с проф. А. Шайдих и проф. Х.-К. Зиберт (Университет Киля, Германия).

изучено распознавание лизоцимом дисахарида (Рисунок 10), отвечающего структуре повторяющегося звена О-цепи ЛПС *K. pneumoniae*. Для этого были проведены специальные ЯМР-эксперименты (ЯМР-титрование) для установления пространственного взаимодействия синтетического дисахарида и лизоцима в растворе. Специфическое изменение химических сдвигов ЯМР сигналов определенных аминокислот в присутствии дисахарида и последующее молекулярное моделирование позволили построить теоретическую трехмерную модель углевод-белкового взаимодействия дисахарида с лизоцимом человека (Рисунок 10).

Взаимодействие лизоцима с тетрасахаридом, отвечающим уже двум повторяющимся звеньям О-цепи ЛПС *K. pneumoniae* O1, было подтверждено с помощью дифракции рентгеновского излучения на монокристалле комплекса тетрасахарида и лизоцима (Рисунок 10). Отметим, что трехмерная модель полученного комплекса была разрешена с высокой точностью и соответствовала данным, полученным для комплекса в растворе методами ЯМР. Открытый новый механизм защитного действия лизоцима позволяет создавать новые терапевтические подходы для лечения бактериальных заболеваний [25].



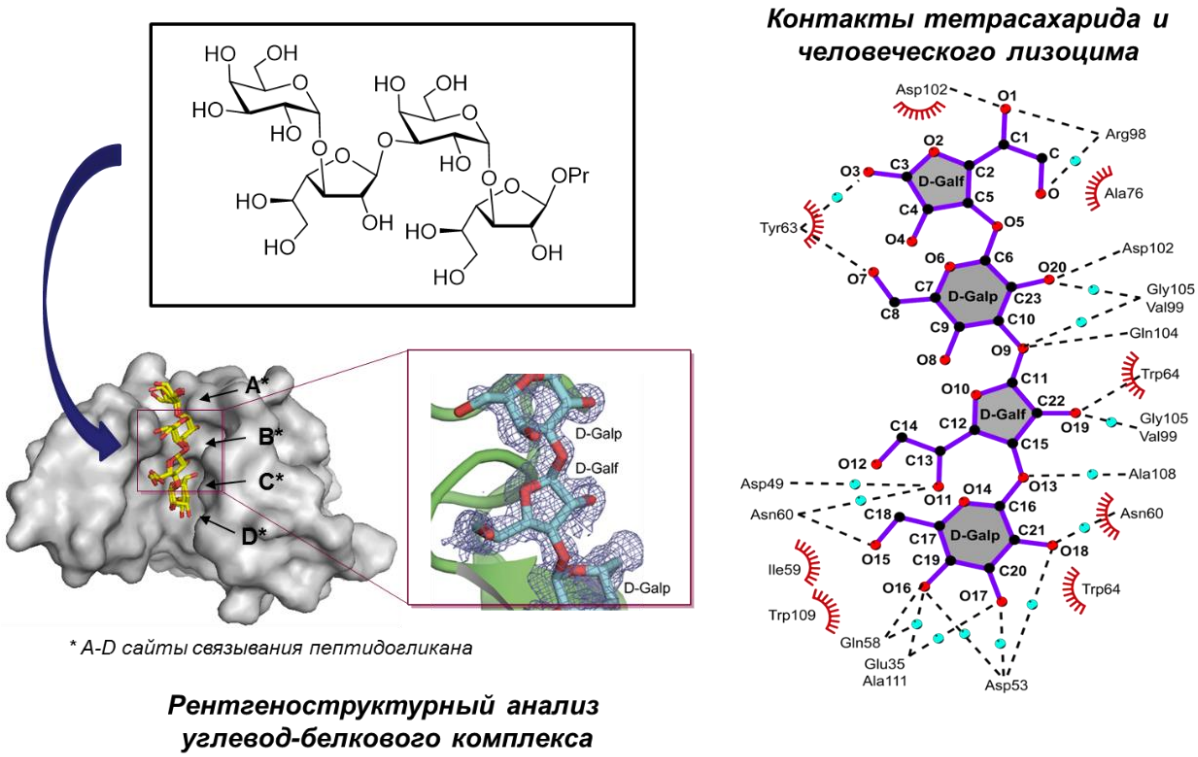


Рисунок 10. Обнаружение взаимодействия олигосахаридов, отвечающих О-цепи ЛПС *K. pneumoniae,* с лизоцимом.

В результате описанной выше работы была создана база для комплексного исследования связывания лизоцима с различными низкомолекулярными олигосахаридными лигандами. С помощью ЯМР спектроскопии, докинга, а также микроскопии высокого разрешения были получены результаты по ингибированию образования амилойдных комплексов с участием лизоцима человека [26].

4. Исследованием иммунохимических свойств синтетических олигосахаридов и их применение для медицинской диагностики

Разработанные в рамках диссертационного исследования оригинальные подходы к стерео- и регионаправленному синтезу олигосахаридов [27], структурно родственных основным типам углеводных антигенов клеточной стенки наиболее клинически значимых грибковых патогенов, сделали возможным проведение комплексных гликобиологических исследований этих полисахаридов. Так на основе синтезированных олигосахаридов, и полученных ранее в лаборатории серий олигосахаридов, отвечающих другим типам грибковых полисахаридов (см. ниже), были сформированы тематические библиотеки лигандов, отвечающих определенным иммунодетерминантным фрагментам (антигенным факторам) основных полисахаридов стенки грибковых патогенов (галактоманнан

Aspergillus, маннан *Candida*, α-(1→3)-глюкан *Aspergillus*, β-(1→3)-глюкан, хитин, хитозан и других). Использование этой библиотеки олигосахаридов для определения специфичности антител и изучения способности стимулировать экспрессию цитокинов и хемокинов рассмотрены в автообзоре [28].

Пример тематической библиотеки биотинилированных олигосахаридов, родственных иммунодоминантным фрагментам галактоманнана, приведен на рисунке 11. Именно эти олигосахариды были использованы для отработки методологии применения химически синтезированных олигосахаридов для определения углеводных эпитопов в составе полисахаридов клеточной стенки грибов, ответственных за формирование иммунного ответа.* Так, олигосахариды с двумя остатками галактофуранозы, связанными через (1→5) связь (лиганды **2**, **8** и **9**), выявляли повышенные титры антител у пациентов с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АВРА) и хроническим легочным аспергилезом (CPA), (Рисунок 10). Лиганд **13** имел наибольшее значение площади под ROC-кривой (AUC) и обладал соответственно наибольшим диагностическим потенциалом выявления АВРА и CPA. Природа связи между остатками галактофуранозы и маннозы [либо β-(1→3) связь для лигандов **9** и **12**, либо β-(1→6) связь для лигандов **8** и **10**] не влияла на уровень распознавания антител [29].

* Иммунобиологические исследования проведены в сотрудничестве с лабораторией проф. Ж.П. Латже (институт Пастера, Париж, Франция).

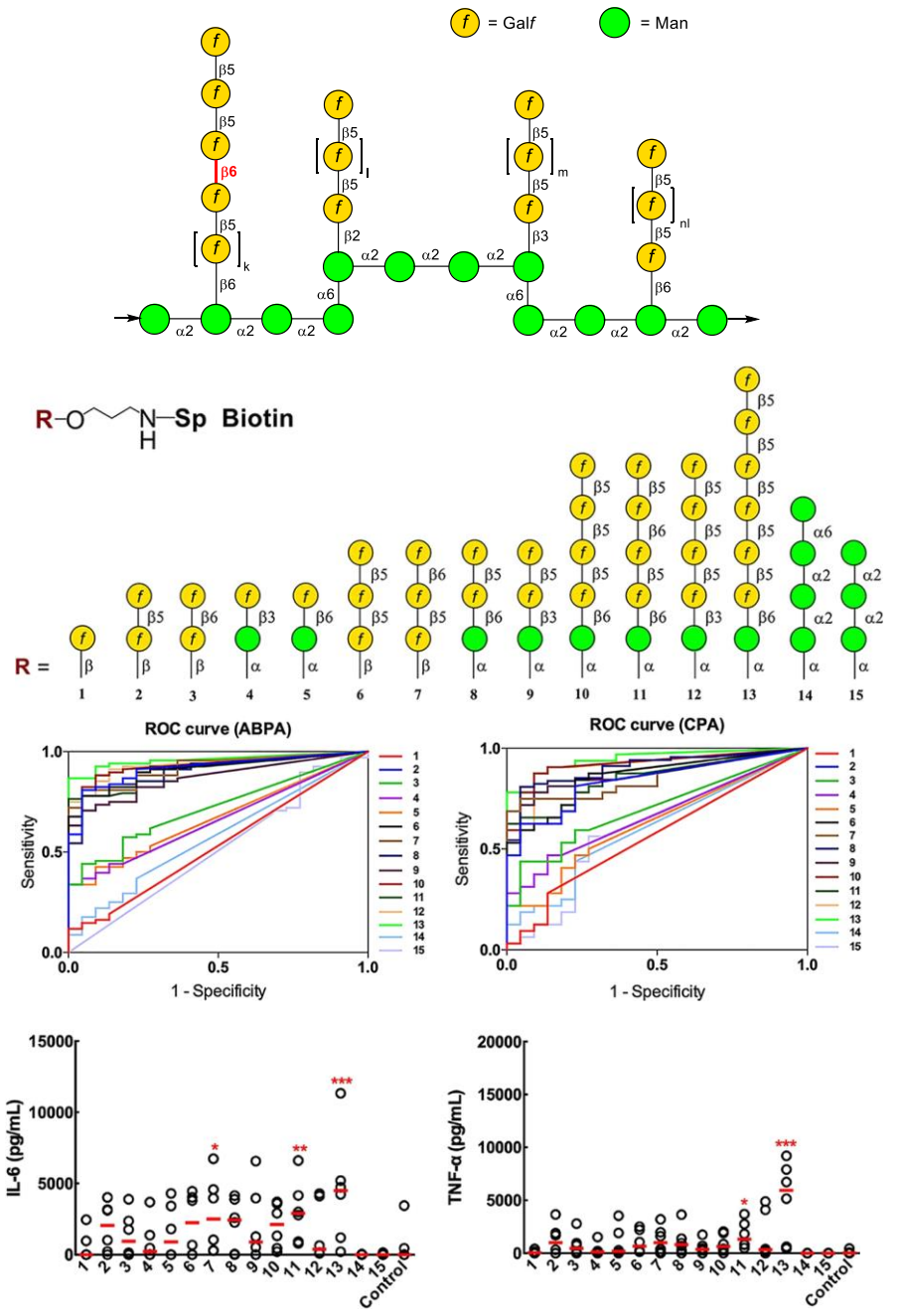


Рисунок 11. Обобщенная структура галактоманнана *Aspergillus*, и тематическая библиотека биотинилированных олигосахаридов, родственных его иммунодоминантным фрагментам. Углеводные остатки представлены с использованием международной символьной номенклатуры гликанов. ROC-кривые, демонстрирующие диагностический потенциал синтетических лигандов **1-15** для выявления аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA) и хронического легочного аспергилеза (CPA), индуцированная олигосахаридами продукция интерликина 6 (IL-6) и фактора некроза опухоли α (TNF-α) мононуклеарными клетками периферической крови (PBMCs).

Индуцированная олигосахаридами продукция специфических цитокинов (IL-1β, IL-1Ra, IL-6, TNF-α) и хемокинов (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 и CXCL1) мононуклеарными клетками периферической крови (PBMCs) определялась количественно с использованием специальных тестов (см. в качестве примера продукцию IL-6 и TNF-α на рисунке 11). Как и в случае исследования антител, лиганды только с одним остатком галактофуранозы (лиганды **1**, **4**, **5**) и олигоманнозиды (лиганды **14** и **15**) не индуцировали продукцию цитокинов и хемокинов. Сравнительный анализ активности изомерных трисахаридов (**8** и **10**) и пентасахаридов (**9** и **12**) показал, что природа химической связи между маннозой и галактофуранозой значительно влияет на выработку цитокинов и хемокинов в отличие от данных по продукции антител.

Аналогичные результаты были получены с использованием мышиных макрофагов линии RAW264.7,[*] которые являются удобной *in vitro* моделью для изучения врожденного иммунитета. Иммунобиологические исследования выявили существенное влияние синтетических олигосахаридов на пролиферацию, экспрессию цитокинов, а также фагоцитарную активность клеток RAW 264.7. Профиль цитокинового ответа макрофагов, обработанных гликоконъюгатами, был преимущественно провоспалительного типа Th1 со значительным увеличением высвобождения TNFα, IL-6 и IL-12. Таким образом, было показано иммуномодулирующее действие синтетических лигандов, родственных галактоманнану *Aspergillus*, на данную клеточную линию [30].

Таким образом, проведенные исследования 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.

Учитывая возрастающую опасность грибковых инфекций и необходимость совершенствования существующих методов диагностики, в рамках данной диссертационной работы проводились исследования, направленные на выяснение на молекулярном уровне причин наблюдаемых ложных результатов двух основных на мировом рынке коммерческих тест-систем, а также на разработку новых диагностикумов, лишенных этих недостатков. Углеводная специфичность диагностических антител является ключевым фактором, определяющим природу ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

[*] В сотрудничестве с Др. Э. Пауловичевой (Институт химии Словацкой академии наук, Словакия).

В частности, тест, используемый в клинической практике для обнаружения галактоманнана *Aspergillus,* имеет ряд ограничений, среди которых отмечается наличие значительного числа ложноположительных результатов. Анализ специфичности антитела EB-A2, используемого в диагностическом наборе сэндвичевого типа Platelia™ Aspergillus, с помощью набора олигосахаридов, структурно родственных галактоманнану *Aspergillus fumigatus*, позволил достоверно определить углеводную специфичность и размер эпитопа этого моноклонального антитела. Оказалось, что минимальным олигосахаридом, который распознаёт антитело EB-A2 является не тетрасахарид Galf-β-(1→5)-Galf-β-(1→5)-Galf-β-(1→5)-Galf-β, а лишь дисахарид β-D-Galf-(1→5)-β-D-Galf-, причём даже в составе цепей содержащих чередующиеся β-(1→5)- и β-(1→6)-гликозидные связи (Рисунок 12). Этот результат может объяснить возникновение ложноположительных сигналов из-за присутствия вышеупомянутых эпитопов не только у галактоманнана *A. fumigatus*, но и в полисахаридах других бактерий и грибов и прежде всего у бифидобактерий нормальной микрофлоры человека[31].

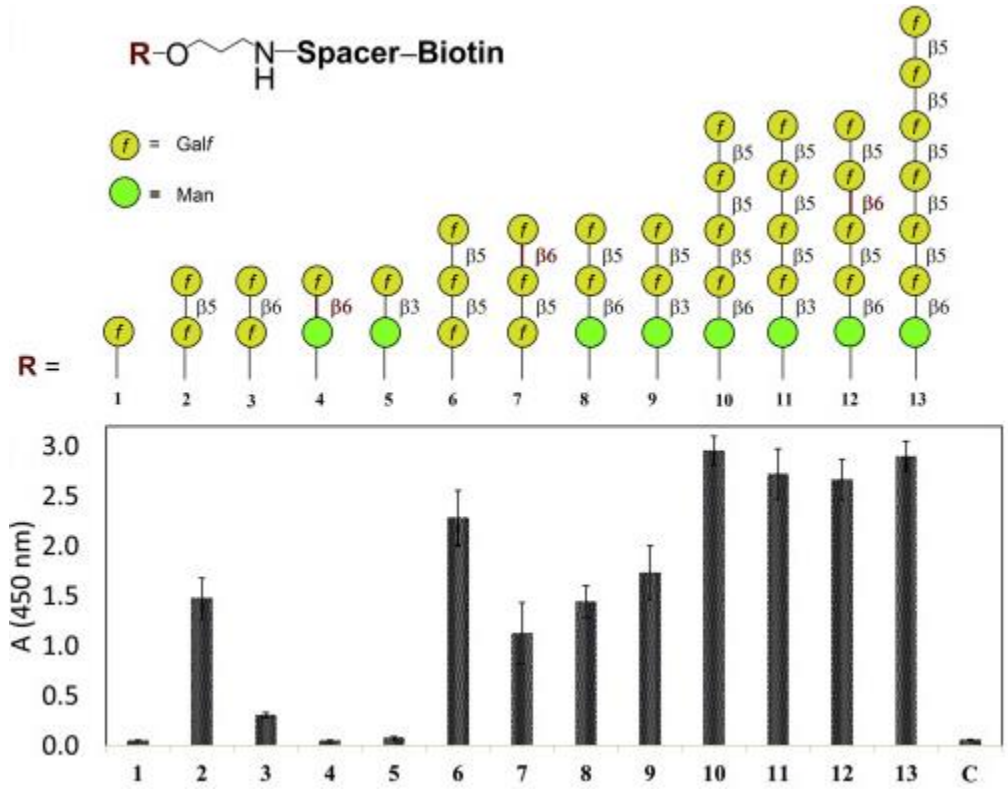


Рисунок 12. Исследование олигосахаридной специфичности моноклонального антитела EB-A2 с использованием тематической библиотеки олигосахаридных лигандов, представляющих ключевые структурные элементы галактоманнана *A. fumigatus*.

Синтезированы гликоконъюгатные иммуногены и покрывающие антигены были использованы для получения и отбора высокоаффинных моноклональных антител с требуемой углеводной специфичностью. Так благодаря BSA-конъюгату специально отобранного пентасахарида **27b** (см. синтез на схеме 2), родственного галактоманнану *A. fumigatus,* а также набора биотинилированных олигосахаридов, используемых в качестве покрывающих антигенов, были получены два высокоспецифичных моноклональных антитела (Рисунок 13),* которые способны специфически распознавать галактоманнан, продуцируемый *A. fumigatus* [32]. Данные антитела были охарактеризованы с использованием всего комплекса современных методов, включая поверхностный плазмонный резонанс, и иммуноферментный анализ на панели синтетических олигосахаридов. Кроме того, была изучена способность данных антител связываться с поверхностью клеток различных грибковых и бактериальных возбудителей, в результате чего была продемонстрирована высокая избирательность по отношению к виду *A. fumigatus*. Данное антитело лишено недостатков, которые отмечались для антитела EB-A2, используемого в коммерческом наборе (см. выше).

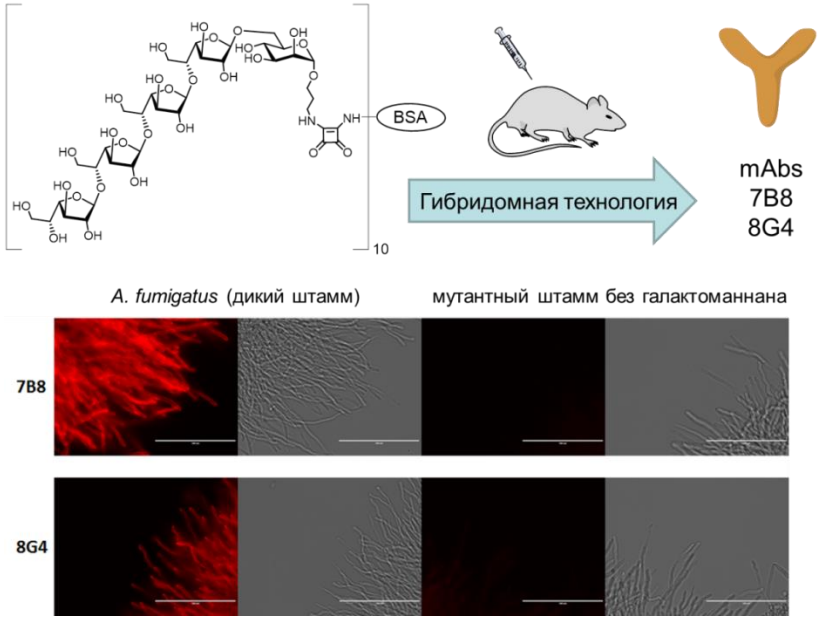


Рисунок 13. Схема получения моноклональных антител 7B8 и 8G4 с использованием синтетического иммуногена и их взаимодействие с природным галактоманнаном на поверхности клеток *A. fumigatus,* исследованное методами иммунофлюоресцентной микроскопии.

* Антитела получены в сотрудничестве с проф. Н.В. Тикуновой, к.б.н. А.Л. Матвеевым и коллективом Лаборатории молекулярной микробиологии ИХБиФМ СО РАН (Новосибирск)

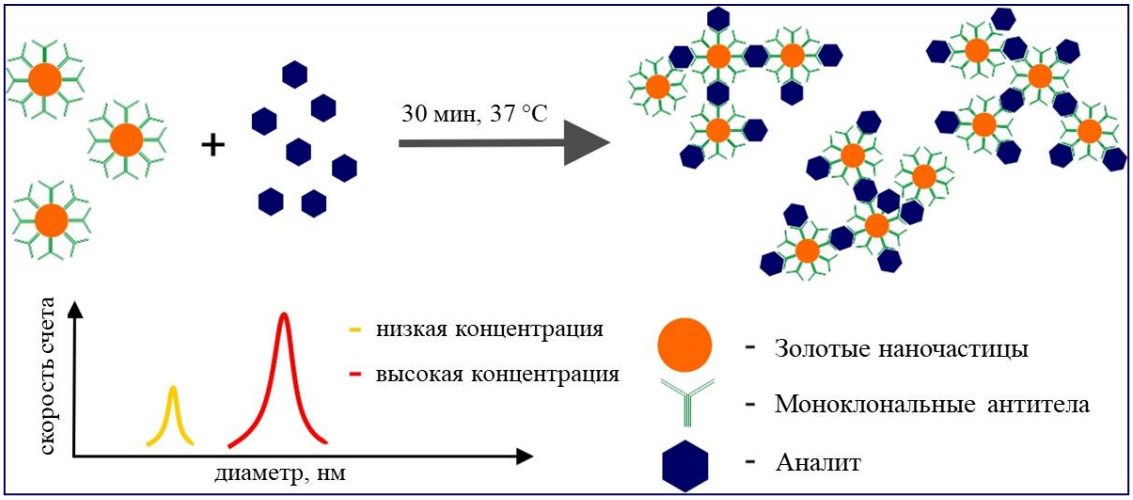
В связи с острой потребностью в тест-системах для определения грибкового поражения в рамках диссертационного исследования проводились работы по созданию прототипов тест-систем на базе различных физических платформ (см. Рисунок 14). Так был создан прототип сэндвичего диагностикума на основе синтетического миметика галактоманна и антитела 7B8. Было показано, что созданная тест-система обладает более высокой чувствительностью, что было показано при использовании референсных сывороток, и обладает большей специфичностью. Данный продукт был лицензирован компании «ХЕМА», зарегистрирован в качестве медицинского изделия (МИ РЗН 2019/8791), серийно производится и используется в России и за рубежом. Таким образом, был осуществлен полный цикл разработки диагностикума, включающий выбор и синтез антигенного олигосахарида, получение иммуногенов и покрывающих антигенов, генерацию специфичных моноклональных антител и их характеристику, сборку тест-системы, её клиническую апробацию, регистрацию, организацию производства и вывод продукта на рынок.

Кроме иммуноферментной тест-системы на основе 96-луночного планшета в рамках диссертационной работы были изучены возможности применения систем на основе поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа[*] с использованием моноклонального антитела 7B8 [33], электрохимического сенсора на основе органического полевого транзистора с электролитным затвором [34],[†] а также тест-системы на основе динамического светорассеяния наночастицами [35],[‡] покрытыми антителами. Созданный в результате диссертационного исследования прототип оптического наносенсора для обнаружения галактоманнана опережает по своим характеристикам другие тест-системы и удобен для практического проведения анализа в условиях стационара (Рисунок 14).

[*] В сотрудничестве с проф. С.А. Ерёминым и сотр. (Кафедра химической энзимологии Химического факультета МГУ).

[†] В сотрудничестве с чл.-корр. РАН С.А. Пономаренко и сотр. (Лаборатория функциональных материалов для органической электроники и фотоники, ИСПМ РАН).

[‡] В сотрудничестве с проф. А.Д. Левиным и сотр. (Лаборатория оптико-спектральных приборов, ВНИИОФИ).



Наименование характеристики	Величина
Время анализа для 10 образцов	100 мин
Предел обнаружения по среднему гидродинамическому диаметры	3,1 нг/мл
Предел обнаружения по скорости счета	0,6 нг/мл

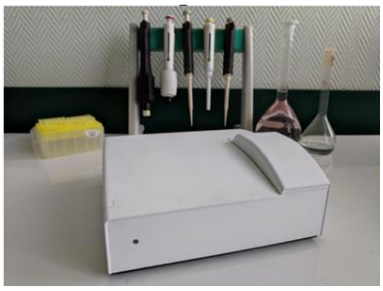


Рисунок 14. Сэндвичевый диагностикум «GalMAg-ИФА» для обнаружения галактоманнанового маркера инвазивного аспергиллёза и оптический наносенсор для анализа галактоманнана *Aspergillus*.

Разработанные методы исследования иммунохимических свойств олигосахаридов, родственных галактоманнану, были успешно применены и для исследования олигосахаридов, структурно родственных другим типам полисахаридов *Aspergillus fumigatus* как галактозаминогалактан [36] и α-(1→3)-глюкан [37], а также маннану клеточной стенки *Candida* [38].

Анализ углеводной специфичности антител против галактозаминогалактана *Aspergillus fumigatus* был осуществлен с использованием имеющихся в лаборатории олигосахаридных лигандов, отвечающих иммунодетерминантным фрагментам данного полисахарида. Было показано, что антитела G8-8, C22-3 и H6-4 распознают минимальный фрагмент, построенный из трех остатков N-ацетилглюкозамина (Рисунок 15) [36]. Данный эпитоп представляет особый интерес в качестве альтернативного антигенного маркера для детектирования инвазивного аспергиллеза.

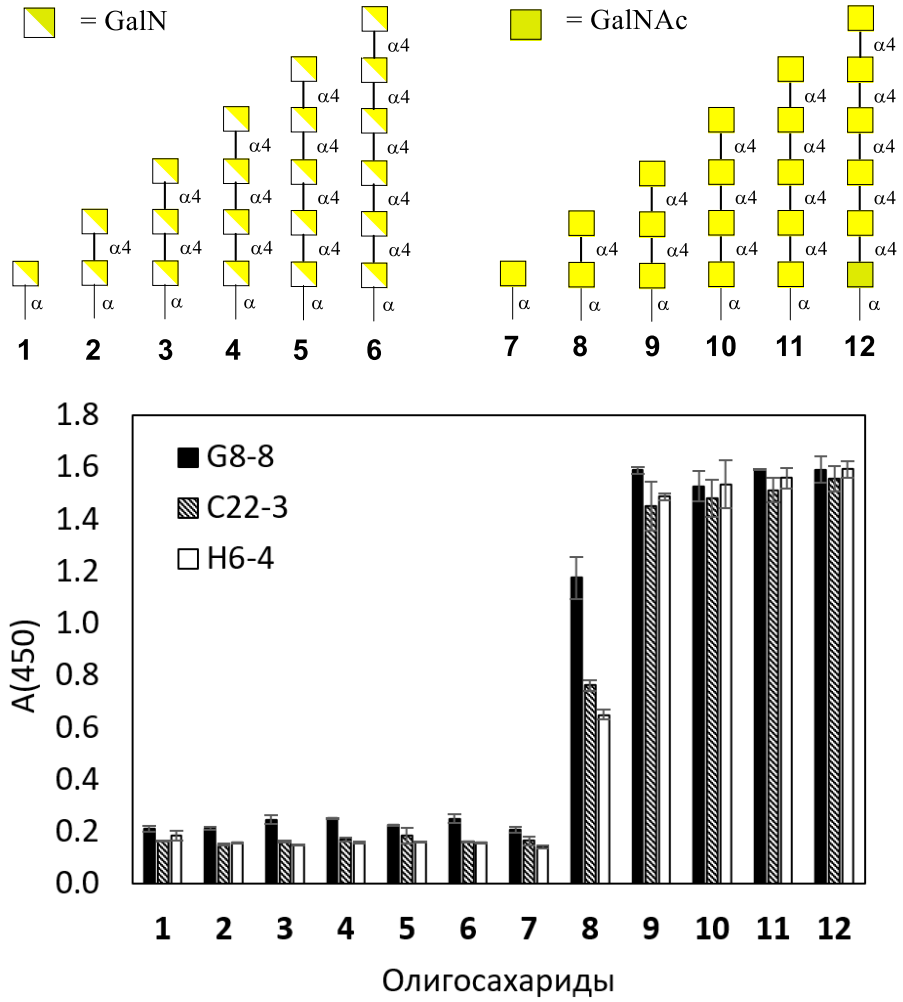


Рисунок 15. Исследование углеводной специфичности моноклональных антител G8-8, C22-3, H6-4 против галактозаминогалактана *A. fumigatus* [36] с использованием тематической библиотеки родственных олигосахаридных лигандов.

Библиотеки синтетических олигосахаридов были использованы для выяснения специфичности и других антител, как аффинно очищенных поликлональных [39-41], так и моноклональных [42]. В частности, было исследовано моноклональное антитело EBCA-1, используемое в коммерческом сэндвичевом иммуноферментном диагностикуме Platelia™

Candida Ag plus для обнаружения маннана *Candida*, циркулирующего в образцах сыворотки крови и используемого для диагностики инвазивного кандидоза. Для определения углеводной специфичности антитела EBCA-1 была использована панель биотинилированных олигосахаридов, структурно родственных различным фрагментам маннана *Candida*. В результате было показано, что EBCA-1 распознает трисахарид β-Man-(1→2)-α-Man-(1→2)-α-Man (лиганд **12** на Рисунке 16), а не гомо-α-(1→2)-связанный пентаманнозид (лиганд **5**), как сообщалось ранее. Полученные результаты объясняют наблюдаемые ложноотрицательные результаты, так как данный олигосахарид продуцируется в достаточном для определения количестве далеко не всеми видами и штаммами *Candida* [42].

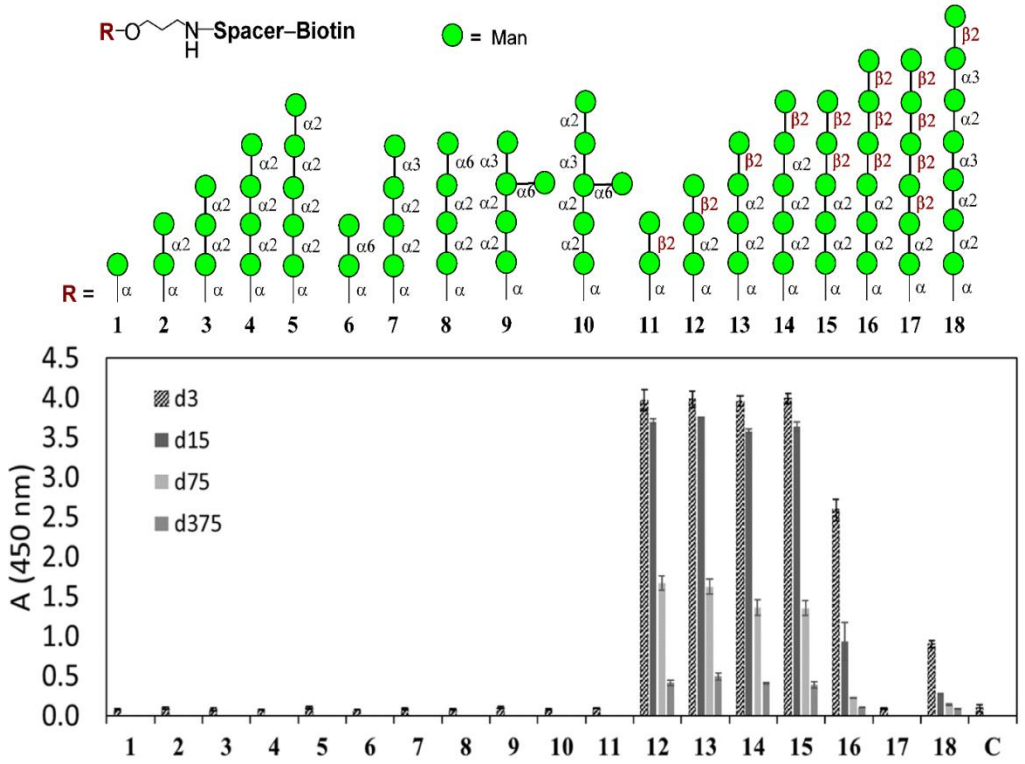


Рисунок 16. Исследование углеводной специфичности моноклонального антитела EBCA-1 с использованием тематической библиотеки олигосахаридных лигандов, представляющих ключевые структурные элементы маннана *C. albicans* (показаны результаты с использованием 3-, 15-, 75- и 375-кратных разведений EBCA-1).

Разработанные в рамках диссертационной работы подходы были использованы для генерации и характеристики моноклональных антител, против разных типов олигосахаридов. В частности исследованы антитела AP3 распознающего эпитоп из шести

β-(1→5)-связанных галактофуранозных остатков [43], антитела 5H5 и 3G11, распознающие грибковый β-(1→3)-глюкан [44]. Возможности использования олигосахаридов, родственных фрагментам полисахаридных антигенов клеточной стенки грибов, для создания конъюгированных вакцин для иммунопрофилактики грибковых инфекций суммированы в обзоре [45].

Результатом диссертационного исследования является также серия гликоконъюгатных иммуногенов, исследованных в качестве вакцинных прототипов. В частности, синтезирован прототип востребованной вакцины против бактерии *E. faecalis*, представляющей серьезную угрозу в качестве возбудителя трудноизлечимых госпитальных инфекций. Синтезированные олигосахаридные лиганды (см. Схему 8), конъюгированные с белком-носителем (БСА), были исследованы в качестве иммуногенов в экспериментах на лабораторных кроликах. Показанный протективный эффект генерируемых антител в экспериментах *in vitro* и *in vivo* делает выбранные структуры перспективными вакцинными лигандами, индуцирующими экспрессию антител, защищающих от инкапсулированных штаммов *E. faecalis* [17] (Рисунок 17).

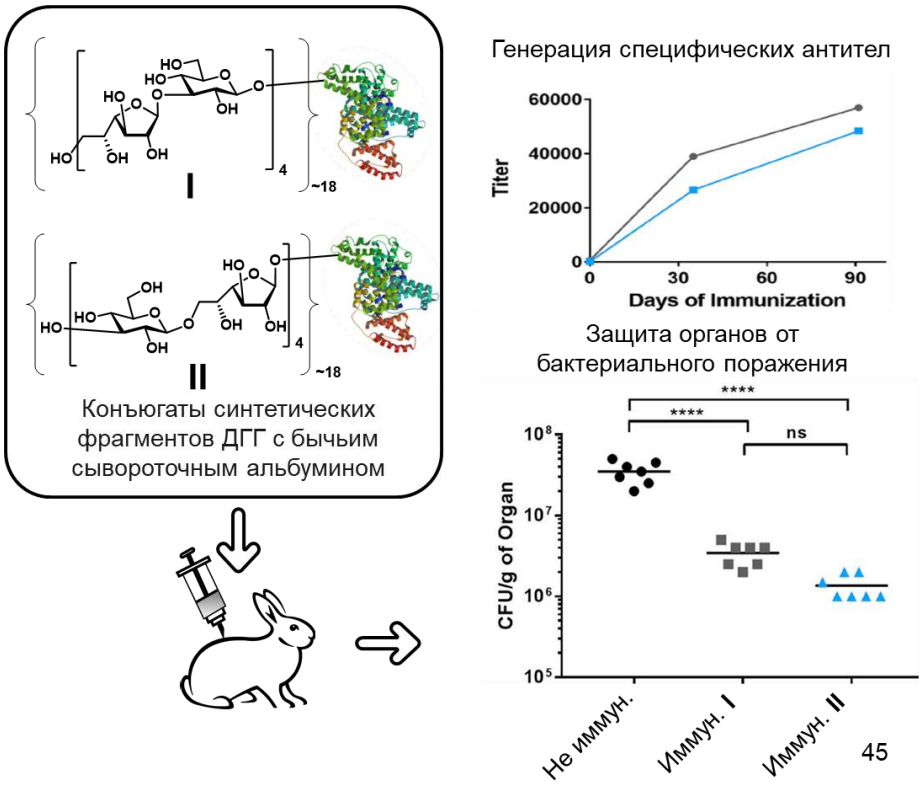


Рисунок 17. Создание прототипа вакцинного препарата против бактерии *E. faecalis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

1. Открыт новый процесс в химии углеводов, пиранозид-фуранозидная перегруппировка (ПФП), протекающая при кислотнопромотируемом исчерпывающем О-сульфатировании; установлен механизм, движущая сила и рамки применимости этого процесса.

2. С использованием ПФП синтезирована широкая группа разнообразных по строению олигосахаридов, структурно родственных грибковым и бактериальным полисахаридам: галактоманнану *A. fumigatus*, О-цепи ЛПС *K. pneumoniae*, дигетерогликану *E. faecalis*, галактоксиломаннану *C. neoformans*.

3. Исследовано пространственное строение и конформационная подвижность фуранозидных циклов и показаны принципиальные изменения геометрии моносахаридов, вызванные введением сульфатов и других заместителей; полученные данные использованы для моделирования углевод-белкового взаимодействия и открытия лектиновой функции лизоцима человека.

4. С использованием набора синтетических лигандов, родственных грибковым полисахаридам, исследован профиль углеводной специфичности антител у пациентов с грибковыми инфекциями; отобраны олигосахаридные лиганды с наилучшими диагностическими характеристиками для выявления хронического и аллергического бронхолегочного аспергиллеза.

5. С использованием набора синтетических олигосахаридов исследовано их иммуномодулирующее действие и способность индуцировать клеточную экспрессию цитокинов и хемокинов, определяющих выделение активных форм кислорода.

6. С использованием набора синтетических олигосахаридов, повторно исследована углеводная специфичность антител из двух зарубежных коммерческих диагностических наборов, найдены ошибки в ранее описанных структурах распознаваемых эпитопов и определены возможные причины ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

7. Синтезированы гликоконъюгатные иммуногены и покрывающие антигены, с помощью которых были получены и отобраны эффективные диагностические антитела, обладающие требуемой углеводной специфичностью и высокой аффинностью для использования в составе иммуноферментных диагностикумов.

8. С использованием синтезированных гликоконъюгатов был создан сэндвичевый иммуноферментный диагностикум GalMAg-ИФА для определения галактоманнанового

маркера инвазивного аспергиллеза; таким образом, был осуществлен полный цикл разработки диагностикума, включающий выбор и синтез антигенных олигосахаридов, получение иммуногенов и покрывающих антигенов, генерацию специфичных моноклональных антител, сборку тест-системы, клиническую апробацию, регистрацию, организацию производства и вывод продукта на рынок.

9. Созданы прототипы аналитических тест-систем для определения углеводных маркеров грибковых заболеваний, основанные на электрохимическом и оптическом методах детектирования.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основные научные результаты диссертации опубликованы в следующих статьях:

1. Ustyuzhanina, N.E.Influence of fucoidans on hemostatic system / N. E. Ustyuzhanina, N. A. Ushakova, K. A. Zyuzina, M. I. Bilan, A. L. Elizarova, O. V. Somonova, A. V. Madzhuga, **V. B. Krylov**, M. E. Preobrazhenskaya, A. I. Usov, M. V. Kiselevskiy, N. E. Nifantiev // Marine Drugs. – 2013. – V. 11. – P. 2444–2458. http://doi.org/10.3390/md11072444. – **Q1 (2013)***
2. Ustyuzhanina, N.E. Fucoidans as a platform for new anticoagulant drugs discovery / N. E. Ustyuzhanina, N. A. Ushakova, M. E. Preobrazhenskaya, M. I. Bilan, E. A. Tsvetkova, **V. B. Krylov**, N. A. Anisimova, M. V. Kiselevskiy, N. V. Krukovskaya, N. E. Nifantiev // Pure and Applied Chemistry. – 2014. – V. 86. – P. 1365–1375. http://doi.org/10.1515/pac-2014-0404. – **Q2 (2014)***
3. **Krylov, V.B.** Acid-promoted synthesis of per-O-sulfated fucooligosaccharides related to fucoidan fragments / **V. B. Krylov**, Z. M. Kaskova, D. Z. Vinnitskiy, N. E. Ustyuzhanina, A. A. Grachev, A. O. Chizhov, N. E. Nifantiev // Carbohydrate Research. – 2011. – V. 346. – P. 540–550. http://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.005.
4. **Krylov, V.B.** Efficient acid-promoted per-O-sulfation of organic polyols / **V. B. Krylov**, N. E. Ustyuzhanina, A. A. Grachev N. E. Nifantiev // Tetrahedron Letters. – 2008. – V. 49. – P. 5877–5879. http://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.07.135.
5. **Krylov, V.B.** Pyranoside-*into*-furanoside rearrangement: new reaction in carbohydrate chemistry and its application in oligosaccharide synthesis / **V. B. Krylov**, D. A. Argunov, D. Z. Vinnitskiy, S. A. Verkhnyatskaya, A. G. Gerbst, N. E. Ustyuzhanina, A. S. Dmitrenok, J. Huebner, O. Holst, H.-C. Siebert, N. E. Nifantiev // Chemistry – A European Journal. – 2014. V. 20. – P. 16516–16522. http://doi.org/10.1002/chem.201405083. – **Q1 (2014)***

6. **Krylov, V.B.** The pyranoside-*into*-furanoside rearrangement of alkyl glycosides: scope and limitations / V. B. Krylov, D. A. Argunov, D. Z. Vinnitskiy, A. G. Gerbst, N. E. Ustyuzhanina, A. S. Dmitrenok, N. E. Nifantiev // Synlett. – 2016. – V. 27. – P. 1659–1664. http://doi.org/10.1055/s-0035-1561595. – **Q2 (2016)***
7. **Krylov, V.B.** Pyranoside-into-furanoside rearrangement of D-glucuronopyranoside derivatives / **V.B. Krylov**, D.A. Argunov, N.E. Nifantiev // Mendeleev Communications. – 2016. – V. 26. – P. 483–484. http://doi.org/10.1016/j.mencom.2016.11.007.
8. Gerbst, A.G. Driving force of the pyranoside-*into*-furanoside rearrangement / A. G. Gerbst, **V. B. Krylov**, D. A. Argunov, A. S. Dmitrenok, N. E. Nifantiev // ACS Omega. – 2019. – V. 4. – P. 1139–1143. http://doi.org/10.1021/acsomega.8b03274. – **Q1 (2019)***
9. Gerbst, A.G. Application of computational methods for the studies of carbohydrate reactivity / A.G. Gerbst, **V.B. Krylov**, N.E. Nifantiev // Carbohydrate Chemistry: Chemical and Biological Approaches. The Royal Society of Chemistry. – 2021. – V. 44. – P. 151–169. http://doi.org/10.1039/9781788013864-00151.
10. **Krylov, V.B.** Preparative synthesis of selectively substituted 1,6-anhydro-α-D-galactofuranose derivatives/ **V.B. Krylov**, D.A. Argunov, N.E. Nifantiev // Mendeleev Communications. – 2014. – V. 6. – P. 336–337. http://doi.org/10.1016/j.mencom.2014.11.006.
11. Argunov, D.A. Convergent synthesis of isomeric heterosaccharides related to the fragments of galactomannan from *Aspergillus fumigatus* / D.A. Argunov, **V.B. Krylov**, N.E. Nifantiev // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2015. – V. 13. – P. 3255–3267. http://doi.org/10.1039/C4OB02634A. – **Q1 (2015)***.
12. Argunov, D.A. The Use of Pyranoside-*into*-Furanoside Rearrangement and Controlled O(5)→O(6) Benzoyl Migration as the Basis of a Synthetic Strategy To Assemble (1→5)- and (1→6)-Linked Galactofuranosyl Chains / D.A. Argunov, **V.B. Krylov**, N.E. Nifantiev // Organic Letters. – 2016. – V. 18. – P. 5504–5507. http://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b02735. **Q1 (2016)***.
13. **Krylov, V.B.** Synthesis of oligosaccharides related to galactomannans from *Aspergillus fumigatus* and their NMR spectral data / **V.B. Krylov**, D.A. Argunov, A.S. Solovev, M.I. Petruk, A.G. Gerbst, A.S. Dmitrenok, A.S. Shashkov, J.-P. Latgé, N.E. Nifantiev // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2018. – V. 16. – P. 1188–1199. http://doi.org/10.1039/C7OB02734F. – **Q1 (2018)***.
14. Argunov, D.A. Convergent synthesis of oligosaccharides structurally related to galactan I and galactan II of *Klebsiella pneumoniae* and their use in screening of antibody specificity

/ D. A. Argunov, A. S. Trostianetskaia, **V. B. Krylov**, E. A. Kurbatova, N. E. Nifantiev // European Journal of Organic Chemistry. – 2019. – V. 2019. – P. 4226–4232. http://doi.org/10.1002/ejoc.201900389 – **Q2 (2019)***.

15. Verkhnyatskaya, S.A. Pyranoside-*into*-furanoside rearrangement of 4-pentenyl glycosides in the synthesis of a tetrasaccharide-related to galactan I of *Klebsiella pneumoniae* / S.A. Verkhnyatskaya, **V.B. Krylov**, N.E. Nifantiev // European Journal of Organic Chemistry. – 2017. – V. 2017. – P. 710–718. http://doi.org/10.1002/ejoc.201601413. – **Q2 (2017)***.
16. **Krylov, V.B.** Definitive structural assessment of enterococcal diheteroglycan / **V. B. Krylov**, A. G. Gerbst, D. A. Argunov, A. S. Dmitrenok, A. S. Shashkov, Z. Kaczynski, J. Huebner, O. Holst, N. E. Nifantiev // Chemistry – A European Journal. – 2015. – V. 21. – P. 1749–1754. http://doi.org/10.1002/chem.201405857. – **Q1 (2015)***.
17. Laverde, D. Synthetic oligomers mimicking capsular polysaccharide diheteroglycan are potential vaccine candidates against encapsulated enterococcal infections / D. Laverde, F. Romero-Saavedra, D. A. Argunov, J. Enotarpi, **V. B. Krylov**, E. Kalfopoulou, C. Martini, R. Torelli, G. A. van der Marel, M. Sanguinetti, J. D. C. Codée, N. E. Nifantiev, J. Huebner // ACS Infectious Diseases. – 2020. – V. 6. – P. 1816–1826. http://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00063. – **Q1 (2020)***.
18. Dorokhova, V.S. Synthesis and conformational analysis of vicinally branched trisaccharide β-D-Galf-(1→2)-[β-D-Galf-(1→3)-]-α-D-Galp from *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan / V. S. Dorokhova, A. G. Gerbst, B. S. Komarova, J. O. Previato, L. M. Previato, A. S. Dmitrenok, A. S. Shashkov, **V. B. Krylov**, N. E. Nifantiev // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2021. – V. 19. – P. 2923–2931. http://doi.org/10.1039/D0OB02071K. – **Q1 (2021)***.
19. Vinnitskiy, D.Z. The synthesis of heterosaccharides related to the fucoidan from *Chordaria flagelliformis* bearing an α-L-fucofuranosyl unit / D. Z. Vinnitskiy, **V. B. Krylov**, N. E. Ustyuzhanina, A. S. Dmitrenok and N. E. Nifantiev // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2016. – V. 14. – P. 598–611. http://doi.org/10.1039/C5OB02040A. – **Q1 (2016)***.
20. Gerbst, A.G. ^{13}C-NMR glycosylation effects in (1→3)-linked furanosyl-pyranosides / A. G. Gerbst, **V. B. Krylov**, D. Z. Vinnitskiy, A. S. Dmitrenok, A. S. Shashkov, N. E. Nifantiev // Carbohydrate Research. – 2015. – V. 417. – P. 1–10. http://doi.org/10.1016/j.carres.2015.08.014.
21. Gerbst, A.G. Ring distortion in pyranosides caused by per-O-sulfation / A. G. Gerbst, **V. B. Krylov**, D. A. Argunov, A. S. Solovev, A. S. Dmitrenok, A. S. Shashkov, N. E. Nifantiev

// Carbohydrate Research. – 2016. – V. 436. – P. 20–24. http://doi.org/10.1016/j.carres.2016.10.011.

22. Gerbst, A.G. Conformational changes in common monosaccharides caused by per-O-sulfation / A.G. Gerbst, **V.B. Krylov**, N.E. Nifantiev // Pure and Applied Chemistry. – 2019. – V. 91. – P. 1223–1229. http://doi.org/10.1515/pac-2018-1212. – **Q2 (2019)***
23. Gerbst, A.G. Influence of per-O-sulfation upon the conformation behaviour of common furanosides / A. G. Gerbst, **V. B. Krylov**, D. A. Argunov, M. I. Petruk, A. S. Solovev, A. S. Dmitrenok, N. E. Nifantiev // Beilstein Journal of Organic Chemistry. – 2019. – V. 15. – P. 685–694. – http://doi.org/10.3762/bjoc.15.63. – **Q2 (2019)***.
24. Gerbst, A.G. Computational and NMR conformational analysis of galactofuranoside cycles presented in bacterial and fungal polysaccharide antigens / A.G. Gerbst, **V.B. Krylov**, N.E. Nifantiev // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2021. – V. 8. – 719396. http://doi.org/10.3389/fmolb.2021.719396. – **Q1 (2021)***.
25. Zhang, R. Lysozyme's lectin-like characteristics facilitates its immune defense function / R. Zhang, L. Wu, T. Eckert, M. Burg-Roderfeld, M. A. Rojas-Macias, T. Lütteke, **V. B. Krylov**, D. A. Argunov, A. Datta, P. Markart, N. E. Nifantiev // Quarterly Reviews of Biophysics. – 2017. – V. 50. – P. e9. http://doi.org/10.1017/S0033583517000075. – **Q1 (2017)***.
26. Zhang R. Nanomedical relevance of the intermolecular interaction dynamics-examples from lysozymes and insulins / R. Zhang, N. Zhang, M. Mohri, L. Wu, T. Eckert, **V. B. Krylov**, A. Antosova, S. Ponikova, Z. Bednarikova, P. Markart, A. Günther, B. Norden, M. Billeter, R. Schauer, A. J. Scheidig, B. N. Ratha, A. Bhunia, K. Hesse, M. A. Enani, J. Steinmeyer, A. K. Petridis, T. Kozar, Z. Gazova, N. E. Nifantiev, H.-C. Siebert// ACS Omega. – 2019. – V. 4 – P. 4206–4220. http://doi.org/10.1021/acsomega.8b02471. **Q1 (2019)***.
27. **Krylov, V.B.** Recent advances in the synthesis of fungal antigenic oligosaccharides / **V. B. Krylov**, L. Paulovičová, E. Paulovičová, Y. E. Tsvetkov, N. E. Nifantiev // Pure and Applied Chemistry. – 2017. – V. 89. – P. 885–898. http://doi.org/10.1515/pac-2016-1011. **Q2 (2017)***.
28. **Krylov, V.B.** Synthetic oligosaccharides mimicking fungal cell wall polysaccharides / **V.B. Krylov**, N.E. Nifantiev // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2020. – V. 425. – P. 1–16. http://doi.org/10.1007/82_2019_187.
29. Wong S.S.W. Potential of chemically synthesized oligosaccharides to define the carbohydrate moieties of the fungal cell wall responsible for the human immune response,

using *Aspergillus fumigatus* galactomannan as a model / S. S. W. Wong, **V. B. Krylov**, D. A. Argunov, A. A. Karelin, J.-P. Bouchara, T. Fontaine, J.-P. Latgé, N. E. Nifantiev // mSphere. – 2020. – V. 5. – P. e5:e00688-19. http://doi.org/10.1128/mSphere.00688-19. **Q1 (2020)***.

30. Paulovičová, E. Immunobiological activity of synthetically prepared immunodominant galactomannosides structurally mimicking *Aspergillus galactomannan* / E. Paulovičová, L. Paulovičová, M. Hrubiško, **V. B. Krylov**, D. A. Argunov and N. E. Nifantiev // Frontiers in Immunology. – 2017. – V. 8. – P. 1273. http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01273. – **Q1 (2017)***.
31. **Krylov, V.B.** Reinvestigation of carbohydrate specificity of EB-A2 monoclonal antibody used in the immune detection of *Aspergillus fumigatus* galactomannan / **V. B. Krylov**, A. S. Solovev, D. A. Argunov, J.-P. Latgé and N. E. Nifantiev // Heliyon. – 2019. – V. 5. – P. e01173. http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01173. **Q1 (2019)***.
32. Matveev, A.L. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan / A. L. Matveev, **V. B. Krylov**, L. A. Emelyanova, A. S. Solovev, Y. A. Khlusevich, I. K. Baykov, T. Fontaine, J.-P. Latgé, N. V. Tikunova, N. E. Nifantiev // PloS One. – 2018. – V. 13. – P. e0193938. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0193938. – **Q1 (2019)***.
33. **Крылов, В.Б.** Возможности поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения галактоманнана *Aspergillus fumigatus* / **В.Б. Крылов**, М.И. Петрук, М.Р. Каримова, Л.И. Мухаметова, А.Л. Матвеев, Н.В. Тикунова, С.А. Еремин, Н.Э. Нифантьев/ Известия Академии наук. Серия химическая. – 2019 – С. 2365-2369. http://doi.org/10.1007/s11172-019-2713-y.
34. Poimanova, E.Y. Biorecognition layer based on biotin-containing [1] benzothieno [3, 2-b][1] benzothiophene derivative for biosensing by electrolyte-gated organic field-effect transistors / E. Y. Poimanova, P. A. Shaposhnik, D. S. Anisimov, E. G. Zavyalova, A. A. Trul, M. S. Skorotetcky, O. V. Borshchev, D. Z. Vinnitskiy, M. S. Polinskaya, **V. B. Krylov**, N. E. Nifantiev, S.A. Ponomarenko // ACS applied materials & interfaces – 2022. – V. 14. – P. 16462–16476. https://doi.org/10.1021/acsami.1c24109. – **Q1 (2022)***.
35. Alenichev, M.K. Nano-biosensor based on the combined use of the dynamic and static light scattering for *Aspergillus galactomannan* analysis / M. K. Alenichev, A. D. Levin, A. A. Yushina, E. S. Kostrikina, Y. S. Lebedin, I. P. Andreeva, V. G. Grigorenko, **V. B. Krylov**, N. E. Nifantiev // Sensing and Bio-Sensing Research – 2022. – V. 35. – P. 100475. http://doi.org/10.1016/j.sbsr.2022.100475 – **Q2 (2022)*.**

36. Kazakova, E.D. Biotinylated oligo-α-(1→ 4)-D-galactosamines and their N-acetylated derivatives: α-stereoselective synthesis and immunology application / E. D. Kazakova, D. V. Yashunsky, **V. B. Krylov**, J.-P. Bouchara, M. Cornet, I. Valsecchi, T. Fontaine, J.-P. Latge and N. E. Nifantiev // Journal of the American Chemical Society. – 2020. – V. 142. – P. 1175–1179. http://doi.org/10.1021/jacs.9b11703. **Q1 (2020)***.

37. Komarova, B.S. Chemical synthesis and application of biotinylated oligo-α-(1→3)-D-glucosides to study the antibody and cytokine response against the cell wall α-(1→3)-D-glucan of *Aspergillus fumigatus* / B. S. Komarova, S. S. W. Wong, M. V. Orekhova, Y. E. Tsvetkov, **V. B. Krylov**, A. Beauvais, J.-P. Bouchara, J. F. Kearney, V. Aimanianda, J.-P. Latgé, N. E. Nifantiev // Journal of Organic Chemistry. – 2018. – V. 83. – P. 12965–12976. http://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01142. **Q1 (2018)***.

38. Paulovičová, E. Importance of *Candida* antigenic factors: structure-driven immunomodulation properties of synthetically prepared mannooligosaccharides in RAW264.7 macrophages / E. Paulovičová, L. Paulovičová, P. Farkaš, A. A. Karelin, Y. E. Tsvetkov, **V. B. Krylov**, N. E. Nifantiev // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2019. – V. 9. – P. 378. http://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00378. – **Q1 (2019)***.

39. **Крылов, В.Б.** Углеводная специфичность антител против *Aspergillus fumigatus*. Исследование с использованием библиотеки синтетических микоантигенов / **В.Б. Крылов,** М.И. Петрук, И.В. Григорьев, Ю.С. Лебедин, Н.И. Глушко, Е.В. Халдеева, Д.А. Аргунов, Е.А. Хатунцева, М.В. Топлишек, Б.С. Комарова, А.А. Карелин, О.Н. Юдина, В.М. Меньшов, Д.В. Яшунский, Ю.Е. Цветков, Н.Э. Нифантьев // Биоорганическая химия. – 2018. – Т. 44. – С. 78-86. http://doi.org/10.7868/S0132342318010086.

40. **Крылов, В.Б.** Исследование углеводной специфичности антител против препаратов условно патогенных грибов рода *Aspergillus* / В.Б. Крылов, М.И. Петрук, Н.И. Глушко, Е.В. Халдеева, В.Л. Мокеева, Е.Н. Биланенко, Ю.С. Лебедин, С.А. Ерёмин, Н.Э. Нифантьев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – С. 525-531. http://doi.org/10.1134/S0555109918050094.

41. **Крылов, В.Б.** Углеводная специфичность антител против препаратов дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida krusei* / В.Б. Крылов, М.И. Петрук, А.А. Карелин, Д.В. Яшунский, Ю.Е. Цветков, Н.И. Глушко, Е.В. Халдеева, В.Л. Мокеева, Е.Н. Биланенко, Ю.С. Лебедин, С.А. Ерёмин, Н.Э. Нифантьев // Прикладная

биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. С. – 614-618**.** http://doi.org/10.1134/S0555109918060107.

42. **Krylov, V.B.** Reinvestigation of carbohydrate specificity of EBCA-1 monoclonal antibody used for the detection of *Candida* mannan / **V. B. Krylov**, A. S. Solovev, I. A. Puchkin, D. V. Yashunsky, A. V. Antonets, O. Y. Kutsevalova, N. E. Nifantiev // Journal of Fungi – 2021. V. 7 – P. 504. http://doi.org/10.3390/jof7070504 – **Q1 (2021)**.
43. Schubert, M. Monoclonal antibody AP3 binds galactomannan antigens displayed by the pathogens *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* and *A. parasiticus* / M. Schubert, S. Xue, F. Ebel, A. Vaggelas, **V. Krylov**, N. Nifantiev, I. Chudobova, S. Schillberg and G. Nölke // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2019. – V. 9. – P. 234. http://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00234. **Q1 (2019)***.
44. Matveev, A.L. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognizing β-(1→3)-D-glucan antigen / A. L. Matveev, **V. B. Krylov**, Y. A. Khlusevich, I. K. Baykov, D. V. Yashunsky, L. A. Emelyanova, Y. E. Tsvetkov, A. A. Karelin, A. V. Bardashova, S. S. W. Wong, V. Aimanianda, J.-P. Latgé, N. V. Tikunova and N. E. Nifantiev // PloS One. – 2019. – V. 14. P. e0215535. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0215535. **Q1 (2019)***.
45. **Krylov, V.B.** Synthetic carbohydrate based anti-fungal vaccines / **V.B. Krylov**, N.E. Nifantiev // Drug Discovery Today: Technologies. – 2020. – V. 35-36. – P. 35–43. https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2020.11.002. **Q1 (2020)***.

* 33 публикаций в журналах первого и второго квартилей (Q1, Q2) за последние 10 лет

Благодарности

Автор выражает благодарность научному консультанту чл.-корр. РАН, Н.Э. Нифантьеву за интересную научную тематику и создание продуктивной творческой атмосферы в лаборатории, к.х.н. Н.Е. Устюжаниной за ценный опыт и практические советы по работе с сульфатированными олигосахаридами, в том числе на первых этапах открытия пиранозид-фуранозидной перегруппировки; моему бывшему аспиранту к.х.н. Д.А. Аргунову за помощь в проведении олигосахаридного синтеза; проф. А.С. Шашкову, к.х.н. А.С. Дмитренку, к.х.н. А.О. Чижову, к.х.н. А.Г. Гербсту за плодотворное сотрудничество в области структурных и конформационных исследований углеводных соединений. Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам, аспирантам и

студентам лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН за всестороннюю поддержку при работе над диссертацией.

Автор выражает благодарность проф. Е.А. Курбатовой и коллективу Лаборатории терапевтических вакцин НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова за плодотворное сотрудничество и постановку *in vivo* экспериментов; проф. Н.В. Тикуновой, к.б.н. А.Л. Матвееву и коллективу Лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск) за совместные работы по генерации моноклональных антител; проф. С.А. Еремину (МГУ), проф. А.Д. Левину (ВНИИОФИ), чл.-корр. РАН С.А. Пономаренко (ИСПМ РАН) за продолжающееся плодотворное сотрудничество по разработке диагностических тест-систем на базе различных физических платформ; акад. Н.Е. Кушлинскому (РОНЦ), чл.-корр. РАН С.В. Сидоренко (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России), к.б.н. О.Ю. Куцеваловой (НМИЦ онкологии) за совместные работы по исследованию профиля диагностических антител в клинических образцах сывороток пациентов. Автор выражает благодарность зарубежным коллективам, возглавляемым: проф. Ж.П. Латже (институт Пастера, Париж, Франция), проф. Й. Хюбнер (Университет Мюнхена, Германия), проф. А. Шайдих и проф. Х.-К. Зиберт (Университет Киля, Германия), проф. Х. Х. Барберо и проф. А.Арда (Университет Бильбао, Испания), Й. Коде (Университет Лейдена, Нидерланды), др. Э. Пауловичева (Институт химии Словацкой академии наук, Словакия) за гликобиологическое сотрудничество с использованием синтезированных нами олигосахаридов и гликоконъюгатов. Автор выражает благодарность компаниям «ХЕМА», «Р-ФАРМ» интересное сотрудничество и всестороннюю поддержку проводимых исследований, а также Российскому научному фонду и Министерство высшего образования и науки РФ за финансовую поддержку соответствующих частей проведенных исследований.