

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» (МИТХТ им. М.В. Ломоносова)

119571, Москва, проспект Вернадского, д. 86

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Maslov, M. A. Synthesis and transfection activity of novel galactosylated polycationic lipid. / M.A. Maslov, D.A. Medvedeva, D.A. Rapoport, R.N. Serikov, N.G. Morozova, G.A. Serebrennikova, V.V. Vlasov, M.A. Zenkova // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – V. 21. – P. 2937–2940.
2. Ivanova, E. A. Synthesis of bivalent neogalactolipids via modified Staudinger reaction. / E.A. Ivanova, M.A. Maslov, N.G. Morozova, G.A. Serebrennikova, V.V. Chupin // *RSC Adv.* – 2012. – V. 2. – P. 4600–4602.
3. Шмендель, Е. В. Синтез маннозилсодержащего неогликолипида как компонента адресных систем доставки нуклеиновых кислот в антигенпредставляющие клетки. / Е.В. Шмендель, А.А. Тимакова, М.А. Маслов, Н.Г. Морозова, В.В. Чупин // *Известия АН, Серия хим.* – 2012. – №7. – С. 1480–1485.
4. Шмендель, Е. В. Синтез неогликолипидов для применения в невирусных системах доставки генетического материала. / Е.В. Шмендель, М.А. Маслов, Н.Г. Морозова, Г.А. Серебренникова // *Известия АН, Серия хим.* – 2010. – №12. – С. 2225–2233.
5. Иванова, Е. А. Синтез галактозосодержащих болаамфифилов. / Е.А. Иванова, М.А. Маслов, Н.Г. Морозова, Г.А. Серебренникова // *Вестник МИТХТ.* – 2010. – Т. 5. – С. 65–70.
6. Маслов, М. А. Синтез липидных медиаторов для направленной доставки олиго- и полинуклеотидов в гепатоциты. / М.А. Маслов, О.А. Петухова, С.В. Андропова, А.О. Гришаева, Н.Г. Морозова, Г.А. Серебренникова // *Известия АН, Серия хим.* – 2010. – №1. – С. 245–253.
7. Maslov, M. A. Synthesis and delivery activity of new cationic cholesteryl glucosides / M.A. Maslov, N.G. Morozova, E.I. Chizhik, D.A. Rapoport, M.A. Zenkova, G.A. Serebrennikova. // *Carbohydrate Res.* – 2010. – V. 345. – P. 2438–2449.
8. Морозова, Н. Г. Синтез положительно заряженных галактозосодержащих сурфактантов. / Н.Г. Морозова, М.А. Маслов, В.В. Мягченков, Г.А. Серебренникова // *Биоорганическая химия.* – 2010. – Т. 36. – С. 714–720.
9. Лоншаков, Д. В. Синтез глицеролипидных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина и исследование их свойств. / Д.В. Лоншаков, Е.О. Баранова, А.И. Лютик, Н.С. Шастина, В.И. Швец. // *Хим.-фарм. журнал.* – 2010. – Т. 44. – №10. – С. 27–34.
10. Баранова, Е.О. Синтез новых производных димерных аналогов инозитсодержащих фосфолипидов как потенциальных ингибиторов вирусной адсорбции. / Е.О. Баранова,

Т.Ф.Л. Данг, С.В. Еремин, Д.С. Есипов, Н.С. Шастина, В.И. Швец. // *Хим.-фарм. журнал.* – 2011. – Т. 45. – №3. – С. 114–121.

11. Шастина, Н.С. Липидная стратегия повышения биодоступности нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ. / Н.С. Шастина, Е.О. Баранова, Л.Н. Дьякова, Д.В. Лоншаков, В.И. Швец. // *Вестник МИТХТ.* – 2011. – Т. 6. – №2. – С. 71–80.
12. Шастина, Н.С. Синтез и исследование свойств новых липофильных конъюгатов 3'-азидо-3'-дезокситимидина, содержащих функциональные фосфорные связи. / Н.С. Шастина, Т.Ю. Мальцева, Л.Н. Дьякова, О.А. Лобач, М.С. Чатаева, Д.Н. Носик, В.И. Швец. // *Биоорганическая химия.* – 2013. – Т. 39. – № 2. – С. 184–193.
13. Возняк, Д. Ф. Первичные фотопроцессы в диадах на основе индокарбоцианиновых красителей и хлорина еб. / Д.Ф. Возняк, Г.В. Захарова, А.К. Чибисов, М.А. Грин, О.В. Харитоновна, К.О. Семенихин, А.Ф. Миронов. // *Химия высоких энергий.* – 2010. – Т. 44. – № 1. – С. 33–38.
14. Panchenko, P. A. Spectroscopical study of bacteriopurpurinimide-naphthalimide conjugates for fluorescent diagnostics and photodynamic therapy. / P.A. Panchenko, A.N. Sergeeva, O.A. Fedorova, V.V. Fedorov, M.A. Grin, R.I. Rechetnikov, A.E. Schelkunova, A.F. Mironov, G. Jonusauskas. // *Journal of Photochemistry and Photobiology.* – 2014. – V. 133. – P. 140–144.

Сайт: www.mitht.ru

Адрес электронной почты: mitht@mitht.ru

тел. (495) 936-82-06

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-инновационной
деятельности МИТХТ им. М.В. Ломоносова,
д.х.н., проф.



24 ноября

В.В. Фомичев

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОТЗЫВ

ведущей организации
на диссертационную работу

Винниковой А.Н. «Синтез аналогов бактериального ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия.

Полисахариды и углеводсодержащие биополимеры, как и другие компоненты клетки, представляют интерес не только с точки зрения понимания структурной организации живой материи, но и для поиска метаболизируемых биологически активных соединений медицинского назначения, обладающих селективностью действия и низкой токсичностью. Углеводсодержащие биополимеры оказывают решающее влияние на ряд процессов, протекающих в клетке и на ее поверхности. Вместе с белками они ответственны за специфическое взаимное узнавание клеток и их последующее взаимодействие. Обнаружено их участие в развитии злокачественных опухолей, т.к. некоторые углеводсодержащие лиганды на поверхности больной клетки способствуют ее закреплению на определенном участке ткани, где и развиваются метастазы. Особого внимания заслуживают микробные полисахариды, поскольку специфическая биологическая активность некоторых их представителей определяет иммунологические характеристики микробных клеток и их взаимосвязь с окружающей средой. Познание метаболизма бактериальных полисахаридов открывает пути к поиску молекулярных мишеней при разработке новых терапевтических агентов для борьбы с бактериальной инфекцией. Этот подход обеспечит нацеленность их действия и снижение побочных эффектов.

Прогресс исследований, направленных на раскрытие метаболизма бактериальных полисахаридов, всецело зависит от наличия молекулярного инструментария, позволяющего отслеживать различные этапы биосинтеза полисахаридных цепей. В последние годы широкое развитие получили работы, направленные на визуализацию стадий инициации и пролонгирования за счет введения фотоактивных меток в молекулы предшественников углеводной цепи гликопротеинов, гликолипидов и полисахаридов. При этом фотоактивные метки должны обеспечивать высокую чувствительность обнаружения и минимально влиять на эффективность изучаемой ферментативной реакции.

Диссертационная работа Винниковой А.Н. посвящена синтезу ряда фотоактивно меченых аналогов ундекапренилфосфатов (УФОС) – инициаторов биосинтеза полисахаридных цепей – и ундекапренилдифосфатсахаров (УДФС), ответственных за продолжение процесса биосинтеза. В качестве переменных структурных параметров рассматривалось строение фотоактивной метки и липидного фрагмента. Полученные соединения прошли опробацию в экспериментах по биосинтезу полисахаридных цепей в

присутствии радиоактивно меченых углеводных субстратов для оценки их пригодности при изучении процесса биосинтеза.

Диссертационная работа Винниковой А.Н. состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка сокращений и списка литературы объемом в 124 ссылки.

Литературный обзор диссертации знакомит с современным состоянием научных исследований по синтезу фотоактивных аналогов изопреноидов и использованию их при анализе биохимических превращений клеточных биополимеров с помощью флуоресцентной микроскопии, методов резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) и фотореактивного зондирования. Это находит применение при изучении механизма посттрансляционного пренилирования белков – онкопротеинов суперсемейства Ras для выявления возможностей его ингибирования с целью создания противоопухолевых препаратов. Другой областью использования фотоактивных изопреноидов является познание деталей биосинтеза гликоконъюгатов грамположительных и грамотрицательных бактерий для разработки новых антибиотических агентов. В зависимости от типа фотоактивной метки литературный обзор разбит на три части, в каждой из которых обсуждаются работы по синтезу линейных изопреноидов с флуоресцентной, хромофорной и фотоактивируемой метками.

Систематические исследования по синтезу флуоресцентно меченых изопреноидов начались в 90-ые годы. К настоящему времени получен ряд изопреноидных производных, содержащих флуоресцентные метки различной природы. Моноциклическая антралиловая фотоактивная группа вводилась как по карбоксильной, так и по аминокислотной в ω -положение гераниола, фэрнезола, геранилгераниола. 2-Аминопиридиниевая моноциклическая метка использовалась для модификации долихилфосфата и доступной смеси полусинтетических рацемических терпенолов. Среди бициклических упомянуты 7-гидрокси-8-метил-4-трифторметилкумариновая, 1-аминонафталиновая, 4-хлор-7-нитробензофуразановая и дансильная метки для посадки на гераниол, нерол, фэрнезол, геранилгераниол, долихилфосфат. Эти флуоресцентно меченые субстраты нашли применение при исследовании мутантных форм Ras-белков (2-аминопиридиниевая), для характеристики ундекаприлирофосфатсахаров *E. coli* (7-гидрокси-8-метил-4-трифторметилкумариновая), для изучения структуры и особенностей взаимодействия маннозилтрансферазы, а также топологии фермент-субстратного комплекса из *Sacharomyces cerevisiae* с помощью метода FRET (1-аминонафталиновая). 4-Хлор-7-нитробензофуразановые производные применялись для наблюдения за их локализацией и взаимодействием с Ras-белками *in vivo* в клетках эпидермоидной карциномы человека. Особенности проникновения пренилфосфатов сквозь мембрану опухолевых клеток лейкемии RPMI-8402 изучались при посредстве метилантралилатной и дансильной меток. Дансильная метка также участвовала при измерении активности трансгликозидаз из клеток *Clostridium difficile* и *E. coli*.

Отдельного внимания заслуживает использование флуоресцентно меченых изопреноидов для ферментативного пренилирования белков с целью изучения их функционирования как *in vitro*, так и в живой клетке. В этом случае задействовали поляядерные красители Alexa Fluor 488, TAMRA и Texas Red.

Хромофорные метки представлены производными бензола и анилина, включающими различные заместители (OH-, Hal-, CH₃-, NH₂-, NO₂-группы). Модификация ими многих изопреноидов позволила оценить влияние строения гидрофобных заместителей на биологическую активность белкового феромона, продуцируемого грибами *Saccharomyces cerevisiae*, способствовала изучению путей ингибирования фэрнезилгеранилгеранилтрансфераз – участников биосинтеза полисахаридов, а также скваленсинтазы, которая вовлечена в биосинтез холестерина. Грамотрицательные бактерии *Bacteriodes fragilis* и *Campylobacter jejuni* дополняют

перечень микробиологических объектов, биосинтез гликоконъюгатов которых изучался с помощью нитроанилиновых меток.

Особое положение занимают фотоактивируемые метки, которые лишь под воздействием УФ-облучения трансформируются в фотоактивные структуры с привлечением близрасположенных групп атомов изучаемых биополимеров, что позволяет оценить строение последних.

Фотоактивируемыми группами являются diazoэфир, арилазиды, диазирины, бензофенон. На этом основан метод фотореактивного зондирования. С его помощью проводилось изучение распределения долихоллов и долихилфосфатов в эндоплазматическом ретикулуме *Arhaebacteria* и взаимодействия этих липидов со специфическими белками, изучение активных центров фарнезилтрансферазы дрожжей и геранилгеранилтрансферазы человека, изучение процесса пальмитоилирования – разновидности посттрансляционной модификации Ras-белков.

Таким образом, представленный в литературном обзоре материал содержит подробную информацию о синтезе и направлениях использования фотоактивно меченых изопреноидов, обеспечивающих детектирование участников биохимических превращений биополимеров и наблюдение за их взаимодействием.

Так, фотоактивно меченые изопреноиды являются незаменимым инструментом при исследовании процессов биосинтеза гликоконъюгатов грамположительных и грамотрицательных бактерий на стадии инициации в качестве субстрата для ундекаprenилпирофосфатсинтазы.

Серьезным препятствием на пути решения этих вопросов является доступность природных изопреноидов, что связано со сложностью выделения их из природных источников в достаточных количествах. Поэтому перед диссертанткой была поставлена задача замены природных интермедиатов биосинтеза полисахаридов на более доступные функциональные аналоги среди природных и синтетических соединений. Причем здесь нельзя рассчитывать на общие рекомендации по природе фотоактивной метки в силу отличий в структурных предпочтениях ферментов подобного действия из разных микроорганизмов.

Синтез намеченных соединений ввиду их полифункциональности представлял непростую задачу. Введение фотоактивной метки в липид осуществлялось в несколько стадий при максимальной оптимизации каждой из них. Для некоторых приходилось поступаться выходом, чтобы достичь избирательности химических превращений. При фосфорилировании меченых спиртов диссертантка взяла на вооружение хорошо зарекомендовавшую себя систему реагентов $CCl_3CN-Bu_4NH_2PO_4$, разработанную ранее учеными ИОХ РАН для подобных превращений. Выделение и очистку конечных продуктов также осложняла их амфифильная природа. Биологическая активность полученных меченых аналогов УФОС и УДФС изучалась на модельных ферментативных системах при использовании радиоактивных (^{14}C) доноров моносахаридов.

При планировании эксперимента по синтезу фотоактивно меченых производных УФОС и УДФС диссертанткой был учтен предшествующий опыт своей лаборатории и других зарубежных научных школ. В поисках природного аналога выбор пал на морапренол – нативную смесь полипренолов из листьев шелковицы *Morus nigra*, одним из основных компонентов которой является ундекапренол, незначительно отличающийся от бактериального соотношением *транс*- и *цис*-изопреновых звеньев в олигоизопреновой цепи. Меткой для него послужила небольшая хромофорная фенокси-группа, которая позволяет детектировать содержащие ее соединения в специфической области УФ-поглощения (по совокупности данных 190 – 220 нм).

Оценка функциональной активности полученной смеси меченых полиизопренилфосфатов проводилась в реакции иницирования сборки повторяющегося звена O-антигенных полисахаридов цитоплазматических мембран грамотрицательных бактерий *S. Arizona* серогруппа 0:59 и *Aeromonas hydrophila* АН-1. Зоны радио- и

флуоресцентной активностей на хроматограммах совпадали, что свидетельствует о включении меченых морапренилфосфатов в ферментативную реакцию. Было показано, что ферментативная активность UDPGlcAc:полипренилфосфат-GlcNAc-фосфотрансферазы составила около 50% и 66% от контроля (морапренилфосфат) для ферментов из этих бактерий. Подобный уровень активности считается приемлемым для модельных ферментативных систем.

На следующем этапе диссертант обращается к синтетическому аналогу полиизопренола – насыщенному ундеканолу и снабжает его уже флуоресцентной антраценовой меткой, варьируя способ присоединения ее к молекуле спирта (карбамоильный или оксиметильный спейсеры). Упрощение химической структуры спиртовой составляющей привело к сокращению количества стадий синтеза флуоресцентномеченого ундецилфосфата и многократному увеличению его выхода (в случае оксиметильного спейсера). На модельной ферментативной системе (галактозилфосфаттрансфераза из *S. newport*) продемонстрирована способность обоих меченых ундецилфосфатов инициировать процесс биосинтеза углеводной цепи, о чем свидетельствует совпадение зон радио- и флуоресцентной активностей на хроматограммах.

Логическим продолжением диссертационной работы было получение неизопреноидных флуоресцентных аналогов бактериальных ундекапренилдифосфатсахаров и изучение их субстратной активности в ферментативных реакциях пролонгирования углеводной цепи. В качестве липидной составляющей для их синтеза был использован ундеканол, который, как было показано в предыдущей части диссертации, обладает способностью инициировать процесс биосинтеза. Флуоресцентной меткой послужила антраценовая группа, встраиваемая в молекулу липида посредством оксиметиленовой «ножки». Углеводная компонента представлена остатками галактозы и N-ацетилгалактозамина. Все промежуточные и, тем более, целевые вещества обладают высокой амфифильностью, что неизбежно влекло за собой большие потери при выделении и очистке, несмотря на применение эффективных ионообменной и обращенно-фазовой хроматографий. Субстратная способность полученных меченых УДФС была установлена на модельных реакциях сборки O-антигенов ряда граммотрицательных организмов - *S. newport* (перенос остатка маннозы под действием маннозилтрансферазы), *E. coli* 0157 (перенос остатка глюкозы под действием глюкозилтрансферазы и *E. coli* 05 (перенос остатка галактозы под действием галактозилтрансферазы) совмещением радиоактивных и флуоресцирующих зон на хроматограммах.

На завершающем этапе проводилось изучение влияния длины липидного фрагмента на субстратную активность неизопреноидных аналогов ундекапренилдифосфатсахаров в ферментативных реакциях наращивания углеводной цепи на примере алкилдифосфатгалактозы. Было получено 4 соединения, длина алкильного фрагмента в которых варьировалась от 2 до 16 метиленовых звеньев (этил, гексил, ундецил и гексадецил), которые вводились в ферментативные реакции с маннозилтрансферазой из граммотрицательной бактерии *S. newport* в присутствии радиоактивного углеводного донора GDP-[¹⁴C]Man. Субстратная активность оценивалась по уровню радиоактивности зон на ТСХ, совмещающих флуоресцентную и радиоактивную активности. Оказалось, что способность служить субстратом уменьшается от наиболее протяженного липидного фрагмента (C16) к наименьшему (C2) более, чем в два раза.

Таким образом, диссертация Винниковой А.Н. представляет комплексное научное исследование, охватывающее синтез ряда фотоактивно меченых аналогов изопреноидов и дальнейшее изучение их субстратной активности в ферментативных реакциях инициации и сборки полисахаридных цепей. В своей работе диссертантка продемонстрировала глубокие теоретические знания и успешное приложение их к конкретным практическим задачам. Использование современных синтетических, физико-химических и

биохимических методических подходов обеспечило высокую достоверность полученных результатов.

В качестве замечания следует отметить, что диссертанткой не для всех ферментативных реакций приводится субстрактная активность тестируемых соединений. Однако, указанные недостатки не носят принципиального характера и не снижают благоприятного впечатления от представленной работы.

Диссертация выполнена на высоком научном уровне с применением современных методов исследования. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, выводы сформулированы четко и обосновано. Автореферат и опубликованные печатные работы адекватно отражают основное содержание диссертации.

Результаты, полученные диссертантом, могут быть использованы в Московском государственном Университете тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Институте органической химии РАН им. Н.Д. Зелинского, Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Университете Куинс (Queens University, Kingston, Canada).

По области исследования данная диссертация соответствует п. 3 (развитие рациональных путей синтеза сложных молекул) паспорта специальности 02.00.03 «Органическая химия», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук.

Диссертационная работа Винниковой А.Н. по поставленным задачам, уровню их решения, объему, актуальности и научной новизне безусловно удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842), т.к. вносит существенный вклад в развитие отечественных исследований в области гликобиологии, направленных на изучение механизмов биосинтеза гликоконъюгатов с целью дальнейшей разработки терапевтических средств для лечения патологических процессов в организме человека, а ее автор – Винникова А.Н. заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности **02.00.03 – Органическая химия.**

Диссертационная работа Винниковой А.Н. обсуждена на заседании кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского МИТХТ им. М.В. Ломоносова, протокол № 5 от 7 ноября 2014 г.

Зав. кафедрой Химии и технологии
Биологически активных соединений
им. Н.А. Преображенского, проф., д.х.н.
(02.00.10 Биоорганическая химия), проф.

 Миронов А.Ф.

Доц. кафедры Химии и технологии
Биологически активных соединений
им. Н.А. Преображенского, к.х.н.
(02.00.10 Биоорганическая химия), ст.н.с.

 Морозова Н.Г.