

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Алферовой Веры Александровны, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия

Одной из приоритетных проблем современной медицины является возникновение резистентности патогенных микроорганизмов к антибиотикам, применяемым в клинике. Это, среди прочего, приводит к развитию так называемых госпитальных (нозокомиальных) инфекций, смертность от которых уже сейчас находится на высоком уровне. В этой ситуации создание антимикробных агентов принципиально новых типов (с точки зрения структуры и механизма действия) является актуальной задачей, находящейся на стыке органической, биоорганической и медицинской химии.

Помимо высокопроизводительного скрининга библиотек синтетических молекул, важнейшим подходом к решению этой задачи остается поиск новых противомикробных соединений природного происхождения. Особенно перспективными в этом отношении являются метаболиты, продуцируемые бактериями. Их молекулы могут содержать совершенно новые структурные мотивы, не встречающиеся в известных природных и синтетических соединениях. В дальнейшем структура этих молекул может быть химически “доработана” и использована для создания полусинтетических антибиотиков нового поколения.

Диссертационная работа Алферовой В.А. выполнена в этой чрезвычайно актуальной области. Соискателем получены и исследованы перспективные антибиотики (циклические пептиды и 20- и 36-членные макролиды), продуцируемые некоторыми бактериями из рода стрептомицетов. Для этого были идентифицированы фракции культуральной жидкости, проявляющие антибиотическую активность, проведено трудоемкое выделение из них индивидуальных соединений, установлена их структура с использованием комплекса спектральных и химических методов, исследована и проанализирована активность полученных природных соединений на различных патогенных штаммах, предложены пути их биосинтеза и механизмы действия.

Диссертация состоит из четырех завершенных проектов по теме работы, рассмотрению каждого из которых отведен отдельный раздел главы “Обсуждение результатов”. В первом разделе описано установление структуры кристалломицина, антибиотика, выделенного более 60 лет назад из штамма *Actinomyces violaceoniger*.

ВЭЖХ-анализ кристалломицина показал, что он состоит из двух соединений, которые были успешно разделены хроматографически. Исследование их структуры с помощью различных методик двумерного ЯМР в совокупности с данными масс-спектрометрии высокого разрешения показало, что эти два компонента кристалломицина являются известными антибиотиками аспартоцинами В и С. Тем не менее, на основании проведенных детальных спектральных исследований удалось получить новые данные о конформерии этих антибиотиков в растворе, а также исследовать их противомикробную активность по отдельности.

Второй раздел диссертации посвящен выделению и характеристике активных веществ, продуцируемых штаммом *Streptomyces hygroscopicus* и обладающих выраженной антифунгальной активностью. Автором было установлено, что эти соединения, названные астолидами А и В, являются новыми представителями нафтохиноновых полиольных макролидов. Эти соединения оказались структурно родственны деплелидам и недавно описанным антибиотикам РМ100117 и РМ100118. Детальный анализ спектров NOESY и ROESY позволил установить относительную конфигурацию практически всех стереоцентров в астолидах. Было установлено, что астолиды проявляют высокую антифунгальную активность в отношении грибов и дрожжей.

В третьем разделе Алферовой В. А. рассмотрено исследование макролидов семейства ирумамицина из противогрибковой фракции экстракта *Streptomyces sp.* ИНА-Ас-5812. Два из трех хроматографически разделенных соединений оказались известными 20-членными макролидами ирумамицином и его близким аналогом Х14952В, не содержащим эпоксидного цикла. Третий (минорный) компонент экстракта оказался ранее не известным изомером ирумамицина, отличающимся от последнего размером цикла (18 вместо 20). Соответствие этих соединений предлагаемым структурам подтверждено на основе глубокого анализа данных двумерных спектров ЯМР. При этом диссертантом была установлена конфигурация стереоцентров С-3, С-7, С-23 и С-24, не определённая в предыдущих исследованиях ирумамицина. Интересно, что антифунгальные свойства изоирумамицина существенно менее выражены, чем у ирумамицина. *In silico* анализ биосинтетического генного кластера позволил установить предполагаемые пути биосинтеза макролидов семейства ирумамицина.

Пожалуй, наибольший интерес представляет четвертый раздел диссертации, в котором описано два принципиально новых липогликопептида из культуральной жидкости штамма *Streptomyces sp.* ИНА-Ас-5812 ВКПМ Ас1980. Эти соединения, названные гауземицинами А и В, проявляют высокую активность против узкого спектра

грамположительных бактерий и имеют необычный механизм действия. Гауземицины А и В обладают высокой структурной новизной, например, наличием в циклическом пептиде редких непротеиногенных аминокислот (2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановой кислоты, флуоресцентного 4-хлор-кинурина) и D-аминокислот, гликозилированием остатка тирозина арабинозой, наличием большого экзоциклического фрагмента. Предложен путь биосинтеза этих новых антибиотиков на основе данных полногеномного секвенирования штамма-продуцента и *in silico* анализа биосинтетических генных кластеров с экспериментальным подтверждением ключевых этапов биосинтеза. Структурная новизна и отличающийся от известных аналогов механизм антибактериального действия позволяют отнести гауземицины к новому типу пептидных антибиотиков.

Таким образом, диссертационная работа Алферовой В.А., несомненно, **имеет высокую степень научной новизны**. Автором обнаружен ряд природных антимикробных соединений, принципиально отличающихся от ближайших аналогов по структуре, биологическому профилю, механизму действия и путям биосинтеза (гауземицины А и В, изоирумамицин). В тех случаях, когда выделенные соединения оказались идентичны описанным ранее в литературе, исследования автора позволили получить новые данные об их стереохимии, конформерии и биологической активности (в том числе, закономерности структура-свойство). **Прикладная значимость** исследования обеспечивается перспективными фармакологическими профилями некоторых из полученных соединений (высокой избирательностью к некоторым видам микроорганизмов одновременно с низкой цитотоксичностью).

Выполненная работа представляет собой комплексное междисциплинарное исследование, реализация которого была бы невозможна без привлечения целого ряда специалистов и коллабораторов (в частности, ими проводились съемка спектров ЯМР, масс-спектрометрические измерения, культивирование микроорганизмов, эксперименты по определению биологической активности, секвенирование генома). При этом Алферова В.А. непосредственно участвовала в постановке цели и задач диссертационного исследования (вместе с научным руководителем), ею проведены работы по выделению и очистке биологически активных соединений, синтезу и модификации изучаемых соединений, выполнена интерпретация физико-химических данных для установления структуры, обобщение и сравнение с литературными данными о биологической активности выделенных соединений, биоинформатический анализ полногеномных последовательностей штаммов-продуцентов антибиотиков, работы по флуоресцентной

микроскопии. Таким образом, роль и вклад Алферовой В.А. являются определяющими в данной работе.

Диссертация Алферовой В.А. оформлена в соответствии со стандартными требованиями к кандидатским диссертациям. Она построена традиционным образом и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 327 источников. Материал диссертационной работы изложен на 178 страницах. Дополнительная информация представлена в виде приложений (39 страниц), относящихся в первую очередь к детализации спектральных исследований.

Во введении к диссертации обоснованы актуальность, новизна и значимость темы исследования, а также степень ее разработанности, сформулированы цель и решаемые задачи. Литературный обзор посвящен обобщению литературных данных о семействах природных соединений, родственных тем, которые были выделены и исследованы в данной диссертационной работе. В частности, в нем рассмотрены анионные макроциклические липопептидные антибиотики (глава 1), антифунгальные 20-членные макролиды (глава 2) и нафтохиноновые неполиеновые макролиды с большим размером цикла (глава 3). Ознакомление с литературным обзором позволяет лучше осмыслить суть проведенных автором исследований и оценить их новизну. В экспериментальной части подробно описаны методики выделения обсуждаемых природных соединений, их физико-химические и спектральные характеристики, приведены условия и технические параметры съемки спектров, методики химического анализа, дериватизации и расщепления описываемых соединений. Кроме того, описаны протоколы, по которым проводились исследования антимикробной активности, секвенирование штаммов и анализ генома, приведены ссылки на соответствующую литературу. Представленные в работе **положения и выводы обоснованы, подтверждены соответствующим экспериментальным материалом и не вызывают сомнений.**

По теме диссертации опубликовано 7 научных статей в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (в том числе в авторитетных зарубежных журналах *Angewandte Chemie*, *Amino Acids*, *MedChemComm*), два патента РФ, а также представлено двенадцать докладов на российских и международных научных конференциях. **Печатные работы и автореферат в полной мере отражают содержание диссертации.**

Как и любая диссертация, работа Алферовой В.А. не лишена недостатков. При ее прочтении возник ряд вопросов, требующих комментария автора. Основные из них перечислены ниже:

- 1) Во введении к разделу 2.1 сказано, что антибиотик “кристалломицин” получил свое название благодаря способности кристаллизоваться из этанола. Не проводил ли автор попыток получить монокристаллы, пригодные для РСА, с соединений, входящих в состав “кристалломицина”?
- 2) При рассмотрении структуры Cryst-2 делается вывод о его идентичности известному липопептиду аспартоцину В, в том числе на основе сравнения их спектров HSQC. Однако, из наложения полученного и литературного спектров, представленное в Приложении 1, видно несовпадение кросс-пиков в некоторых областях (даже без учета возможного смещения сигналов из-за разных условий съемки). Например, в спектре Cryst-2 присутствует кросс-пик при ~ 2.5 м.д./38 м.д. и ~ 4.1 м.д./40 м.д., которых нет в аспартоцине В. Чем можно объяснить эти несоответствия?
- 3) Для некоторых из выделенных антибиотиков отмечается зависимость антимикробной активности от наличия ионов кальция (например, для компонентов кристалломицина). Не пытался ли автор снимать ЯМР спектры в присутствии солей кальция, чтобы выявить возможное комплексообразование в этой системе?
- 4) В ВЭЖХ смеси гауземицинов, показанной на Рисунке 62, пики удваиваются. Автор объясняет это “наличием различных конформеров, взаимопревращение которых затруднено”. Данные ЯМР (стр. 118) подтверждают наличие конформеров с похожим соотношением у гауземицина А, однако обменный процесс характеризуется временем 0.1 с. Можно ли при таком малом времени взаимопревращения ожидать разделения конформеров на ВЭЖХ?
- 5) В гауземицинах А и В не удалось установить конфигурацию стереоцентров в остатках 2-амино-4-гидрокси-4-фенилбутановой кислоты и β -гидроксиглутаминовой кислоты из-за их нестабильности в условиях гидролиза пептидных связей и отсутствием характеристических кросс-пиков в спектрах NOESY. Остаются ли какие-то возможности определить стереоконфигурации этих остатков? Можно ли это сделать биосинтетически путем введения соответствующих аминокислот с заведомо известной абсолютной конфигурацией при культивировании *Streptomyces sp.* ИНА-Ас-5812?

- 6) В последние годы успешно развивается использование DFT расчетов спектров ЯМР ^{13}C и констант спин-спинового расщепления для установления структуры и стереохимии довольно сложных природных соединений (например, *Acc. Chem. Res.* **2020**, 53, 1922). Не рассматривал ли диссертант возможности этого подхода для своих задач?
- 7) В тексте диссертации стоило больше сказать о спектральных подтверждениях структуры изоирумамицина. В некоторых разделах, посвященных доказательству структуры на основе двумерных спектров ЯМР, графический материал представлен чересчур компактно. Часто обсуждение, представленное на нескольких страницах текста, сопровождается всего одной схемой, состоящей из нескольких блоков. Это осложняет понимание материала, поскольку постоянно необходимо обращаться к рисунку, расположенному несколькими страницами ранее.
- 8) В тексте диссертации нередки опечатки и некорректные выражения, например: “антибиотиков” (стр. 9), “содениений” (стр. 11), “был определена” (стр. 12), “метболитов” (стр. 12), “маролактамизации” (стр. 23), “семеитсва” (стр. 54), “устананвливается” (стр. 67), “прядка” (стр. 67), “(log ϵ) 05 (4.26)” (стр. 74), “протонная связь” (стр. 78), “взаимодействие между протонами ^{23}N и ^{23}N ” (стр. 87), “частично двойной связи” (стр. 119), “Рис. 70F” (стр. 121).

Эти замечания несколько затрудняют ознакомление с диссертацией, но не влияют на общее положительное впечатление от работы и не затрагивают ее положения и выводы.

Подводя итог, хотелось бы отметить, что представленная работа **выполнена на высоком уровне** с использованием современных методов разделения и установления структуры сложных органических молекул в сочетании с методами изучения их биологической активности, биосинтеза и механизма действия. Работа, безусловно, **вносит весомый вклад в развитие химии природных соединений, понимание механизмов их биологической активности и биосинтеза, а также в разработку новых антибиотических агентов.**

Таким образом, по актуальности, новизне и значимости полученных результатов, уровню решения научной задачи, практической ценности полученных результатов диссертация Алферовой В.А. **отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата химических наук** (в том числе п. 9) "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями,

внесенными Постановлениями Правительства РФ: от 21 апреля 2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650, от 20.03.2021 г. № 426, от 11 сентября 2021 г. № 1539), а её автор Алферова Вера Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией органических и металл-органических азот-кислородных систем
ФГБУН Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
(ИОХ РАН)

доктор химических наук, доцент

Сухоруков Алексей Юрьевич

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.: +7 (499)-135-53-29

E-mail: sukhorukov@ioc.ac.ru

Подпись Сухорукова А.Ю. удостоверяю
К.х.н., ученый секретарь ученого совета ИОХ РАН



Коршевец И. К.

17 марта 2022 г.