



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32. ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

26.05.2013 № _____
На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН)
акад. РАН, д.б.н., Георгиева С.Г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию **Сапожниковой Ксении Андреевны** «Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических конъюгатов антител», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности: 1.4.9 – биоорганическая химия.

Актуальность исследования

Диссертационная работа Сапожниковой Ксении Андреевны посвящена разработке линкеров для сайт-специфической биоконъюгации антител с индикаторными и биологически активными соединениями. Выбранная автором тематика, несомненно, представляет собой значительный научный интерес. Получение конъюгатов антител с функционально значимыми молекулярными структурами с сохранением специфичности и аффинности антител представляет собой ключевой аспект биоконъюгации и является актуальным направлением биоорганической химии. Биоконъюгаты антител используются для решения биохимических и биомедицинских задач в научных исследованиях с перспективой широкого применения в медицинской практике.

Цели и задачи исследования

Целью работы Сапожниковой К. А. является разработка линкерных реагентов для сайт-специфической модификации антител. Для достижения поставленных целей решен ряд задач. Сконструированы и синтезированы водорастворимые бифункциональные и полифункциональные линкеры на основе олигоэтиленгликолей и пентаэритрита. Для контроля стехиометрии конъюгации в линкеры вводили хромофорный/флуоресцентный фрагмент. Отработаны методики модификации антител с помощью бифункциональных линкеров реакций оксимного лигирования, медь-катализируемого и промотируемого напряжением цикла азид-алкинового циклоприсоединения. С применением синтезированных полифункциональных линкеров и биоортогональных реакций получены терапевтические конъюгаты антител и продемонстрирована их функциональность.

Научная новизна результатов

По результатам диссертационной работы Сапожниковой К.А. предложен новый подход к сайт-специфическому мечению антител. Антитела предварительно, в мягких условиях, окисляли периодатом с образованием альдегидных групп в углеводной части Fc-фрагмента. Затем по полученным альдегидным группам проводили связывание с O-замещенным линкерным фрагментом, оксимное лигирование. Затем ортогональной реакцией в мягких условиях дополнительные реактивные группы линкера связывали с функционально значимыми молекулярными структурами. При этом не затрагивались аминокислотные остатки Fab-фрагмента, ответственные за аффинное связывание антител.

Предложены методы синтеза ряда O-замещенных гидроксиламинов с ортогональными реактивными группами для независимого и контролируемого связывания линкеров с антителами и с функционально значимыми молекулярными структурами, красителями, лекарственными препаратами и т.д.

Предложены подходы к сборке терапевтических конъюгатов антитело-препарат, содержащих в структуре цианиновый краситель, расщепляемый линкер и цитотоксичные препараты доксорубин и монометилауристин Е.

Предложен способ контроля стехиометрии конъюгатов с применением флуоресцентного красителя, встроенного в линкер.

Впервые показано, что конъюгаты антител с цитотоксическими препаратами, доксорубином и монометилауристином Е, нацеленные на специфический белок PRAME, вызывают гибель опухолевых клеток, экспрессирующих PRAME на мембране.

Практическая значимость результатов

Разработанный Сапожниковой К. А. метод конъюгирования позволил получить диагностические флуоресцентно-меченые антитела к мембранному белку PRAME с высокой яркостью флуоресценции, пригодные для иммунотипирования больных лейкозами и меланомой.

С использованием синтезированных линкеров продемонстрирована возможность создания конъюгатов антител с терапевтическими цитотоксичными препаратами, нацеленными на опухоль-ассоциированный антиген PRAME, с перспективой применения для лечения онкологических заболеваний.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Разработанные в диссертационной работе Сапожниковой К. А. линкерные реагенты могут найти применение для синтеза конъюгатов антител с молекулярными структурами различного назначения в организациях медико-биологического профиля. К таким организациям можно отнести Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАН, Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Непосредственно антитела к мембранному белку PRAME, конъюгированные с цитотоксическими препаратами доксорубицином и монометилауристатином E, помимо Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России, могут найти применение в Московском научно-исследовательском онкологическом институте имени П. А. Герцена Минздрава России.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Сапожниковой К. А. представляет собой завершенное исследование и состоит из списка сокращений, введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей и списка литературы. Основная часть работы изложена на 197 страницах, включает 56 рисунков, 15 схем и 5 таблиц. Кроме того, приведены 47 приложений. Список цитируемой литературы включает 292 наименования.

Во введении автор обосновывает актуальность и новизну выбранной темы, обозначает практическую значимость данной работы, а также формулирует цель и задачи исследования.

Литературный обзор посвящен рассмотрению существующих на текущий момент времени способов введения карбонильной группы в молекулу иммуноглобулина, а также конъюгатов таких функционализированных антител с соответствующими оксиаминовыми производными. В литературном обзоре так же рассмотрены особенности оксимного лигирования, механизм реакции, различные катализаторы, применимые к биомолекулам. Обзор, таким образом, состоит из трех частей: первая часть посвящена непосредственно оксимному лигированию, вторая

способам введения карбонильных групп в антитела, третья – описанным в литературе конъюгатам антител, полученным с помощью оксимного лигирования. Стоит отметить, что обзор литературы написан грамотно, квалифицированно, читается с интересом. Автор допустил некоторые стилистические неточности, но они не влияют на общее благоприятное впечатление.

Следующая глава диссертации посвящена обсуждению собственных результатов и является логическим продолжением обзора литературы. Она начинается с небольшого введения, посвященного опухолевому белку PRAME и перспективности его применения в качестве мишени для конъюгатов антител. Последующая глава описывает разработку стратегии для получения флуоресцентных конъюгатов антител к PRAME с помощью периодатного окисления и последующего оксимного лигирования. В этой главе рассмотрен синтез соответствующих линкеров, окисление и конъюгация иммуноглобулинов, а также оценка стехиометрии получившихся конъюгатов и их спектральные свойства. Кроме того, в испытаниях *in vitro* с помощью проточной цитометрии показана перспективность полученных флуоресцентных антител к опухолевому белку PRAME в качестве диагностического инструмента.

Во второй главе обсуждения результатов закономерно рассмотрено получение терапевтических конъюгатов антител к белку PRAME с использованием аналогичной стратегии мечения. Показан химический синтез соответствующих линкеров, оценка свойств полученных конъюгатов, в частности, соотношение лекарство-антитело, а также показано, что полученные конъюгаты антител с расщепляемым линкером и цитотоксическим препаратом MMAE активны в наномолярных концентрациях в испытаниях *in vitro* на клеточных линиях, доказанно экспрессирующих мембранную форму PRAME, и не активны на PRAME негативных линиях.

Материал, изложенный в этой главе, полностью отражает весь ход проделанной работы и выводы по диссертации.

Экспериментальная часть содержит подробное описание синтезов всех химических соединений, а также конъюгатов антител. Применение и умелое использование современных и традиционных методов выделения, идентификации и анализа (^1H , ^{13}C ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и др.) обеспечивает высокую степень достоверности полученных данных.

Выводы, изложенные автором, обоснованы, соответствуют результатам исследования, поставленной цели и задачам, вынесенным на защиту, полученные результаты не вызывают сомнения.

Материалы, приведенные автором в приложениях, дополняют экспериментальную часть и позволяют убедиться в достоверности приведенных данных.

Резюмируя, можно сказать, что диссертация Сапожниковой К. А. выполнена на хорошем

методическом уровне.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Основные научные результаты диссертационной работы адекватно отражены в публикациях автора по теме работы, в том числе в пяти научных статьях, опубликованных в уважаемых отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, а также в 11 тезисах всероссийских и международных конференций.

Замечания и комментарии

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Известно, что для терапевтических антител крайне важны аффинность и специфичность взаимодействия с молекулярной мишенью. Из обсуждения результатов неясно, как на них влияет предложенная соискателем модификация гликозидной части Fc-фрагмента.

В главе «Обсуждение результатов» значительное внимание уделено функциям белка PRAME. Эти данные следовало включить в обзор литературы, т. к. они имеют теоретический характер.

Редакторские замечания: на с. 65 опечатка – система комплемента названа «системой комплимента». На с. 44 аббревиатура UAA (unnatural amino acid) приведена без расшифровки, что затрудняет восприятие текста. На с. 53 не приведена расшифровка аббревиатуры LXR.

Заключение

Таким образом, диссертация Ксении Андреевны Сапожниковой «Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических конъюгатов антител» представляет собой законченную научно-квалификационную работу и соответствует всем требованиям «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, внесенными Постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Межлабораторный коллоквиум лаборатории биологических микрочипов, лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот и лаборатории молекулярной диагностики ИМБ РАН считает, что диссертационная работа Сапожниковой Ксении Андреевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и рекомендует ее к защите по специальности 1.4.9 - «Биоорганическая химия».

Заключение принято по результатам проведения объединенного коллоквиума лаборатории

биологических микрочипов, лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот и лаборатории молекулярной диагностики ИМБ РАН.

Присутствовало на заседании 24 чел. Результаты голосования: «за» - 24 чел., «против» - 0, «воздержалось» - 0, протокол (явочный лист) от «19» мая 2023г.

Ведущий научный сотрудник,
кандидат химических наук,
руководитель лаборатории нуклеотид-
модифицированных нуклеиновых
кислот ИМБ РАН
Чудинов Александр Васильевич



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)
Почтовый адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ИМБ РАН
Рабочий телефон: 8-499-135-98-00
e-mail: chud@immb.ru

Подпись Чудинова А.В. удостоверяю,
Ученый секретарь ИМБ РАН,
к.в.н. Бочаров Александр Анатольевич

