

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН

14 июня 2023 года

Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата химических наук

Сапожниковой Ксении Андреевны

«Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических
конъюгатов антител»

по специальности 1.4.9. – биоорганическая химия

Москва, 2023 г.

СТЕНОГРАММА
Заседания диссертационного совета Д.24.1.037.01 при ИБХ РАН
14 июня 2023 года

Заместитель председателя диссертационного совета
доктор физико-математических наук Р.Г. Ефремов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 5.

Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
Д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Ефремов Р.Г.:

Коллеги, переходим к защите диссертации, основные результаты по которой будут представлены Сапожниковой Ксенией Андреевной. Тема ее диссертационной работы «Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических конъюгатов антител». Работа на соискание степени кандидата химических наук, работа по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия. Научный руководитель, доктор химических наук, Коршун Владимир Аркадьевич. Официальные оппоненты: Жердев Анатолий Виталиевич, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук, Крылов Вадим Борисович, доктор химических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией синтетических гликовакцин Института органической химии имени Зелинского Российской академии наук. Ведущая организация Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук. Владимир Александрович, озвучьте пожалуйста материалы дела.

Олейников В.А.:

Да, материалы дела. Сапожникова Ксения Андреевна, Российская Федерация. В 2016-м году окончила бакалавриат Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российский химико-технологический университет имени Менделеева, специальность химическая технология. В 2018-м году окончила магистратуру, с отличием, это опять же тот же университет имени Дмитрия Ивановича Менделеева, по специальности химическая технология. В 2022-году окончила аспирантуру нашего института. Кандидатский экзамен она сдала по специальности биоорганическая химия с оценкой «отлично». 2018-2020 годы работала в должности лаборанта, с 20-го года в должности м.н.с., младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярного дизайна и синтеза нашего института. Работа выполнена в лаборатории молекулярного дизайна и синтеза ИБХ РАН. Научный руководитель, как было уже сказано, Владимир Аркадьевич Коршун, руководитель лаборатории. По теме диссертации опубликовано пять статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите, реферат диссертации размещены на сайте ВАК 13 апреля 2023 года, т.е. вовремя, и все необходимые документы в деле есть.

Ефремов Р.Г.:

Уважаемые коллеги, есть ли вопросы по озвученным материалам личного дела? Вопросов нет. Тогда, Ксения Андреевна, пожалуйста изложите основные положения вашей диссертационной работы. Регламент 20 минут.

Сапожникова К.А.:

(излагает основные положения диссертационной работы)

Ефремов Р.Г.:

Спасибо! Так, вопросы, пожалуйста, коллеги. Да, пожалуйста.

Дзантиев Б.Б.:

Ксения Андреевна, во-первых, спасибо, интересная работа.

Ефремов Р.Г.:

Борис Борисович, к микрофону, да, пожалуйста.

Дзантиев Б.Б.:

Спасибо, очень интересная работа. Но у меня такое ощущение, наверняка вы это тоже знаете, наверняка это отражено в вашем обзоре диссертации, что таких работ было много и вот пик их активности приходился даже не на наш век, скорее на конец прошлого века, вот иммунотоксины и так далее, и так далее. Есть, как вы правильно говорите, коммерчески реализованные препараты, количество статей измеряется, наверное, сотнями на эту тему, да, вы это прекрасно знаете, написав обзор к диссертации, да. Так вот у меня вопрос первый, да, что вы считаете новизной в этой в этой вашей работе? Иммунотоксин к конкретному опухолевому белку? Или что-то другое? А второй вопрос более конкретный, да, вот вы говорите, что вы знаете, что присоединилось 3 молекулы, 5 молекул, 14 молекул, как вы это определяете? По флуоресценции, по другим каким-то параметрам? Потому что на самом деле, вот объективно, выйти на эту цифру не так просто.

Сапожникова К.А.:

Я сначала отвечу на первый вопрос.

Дзантиев Б.Б.:

Да.

Сапожникова К.А.:

Я считаю, что в моей работе новизной является периодатного окисления, которое вы верно заметили, давно очень известно, однако это один пунктов новизны. Однако несмотря на то, что это давно известно, ADC на основе периодатного окисления никто никогда не делал. Есть только одна единственная работа, где совершались какие-то попытки сделать ADC, но они не стали это развивать. Мы решили попробовать, почему бы и не использовать хороший известный метод и применить его по-новому. Вторым элементом новизны является то, что опухолевый белок PRAME несмотря на то, что к нему есть высокий интерес, я смотрела статьи касательно белка PRAME, и каждый год примерно утраивается количество публикаций, связанных с ним, в том числе в области иммунофенотипирования и прочих клинических приложений. Нам показалось интересным исследовать этот белок на предмет возможности создать на нем оригинальный препарат типа ADC, конъюгата антитела с цитотоксическим препаратом, потому что к белку PRAME еще никто никогда не пытался получить ADC.

Дзантиев Б.Б.:

Спасибо, интересно. А вот про количество меток на молекуле антитела?

Сапожникова К.А.:

Да. Это второй вопрос, сейчас я отвечу. Мы определяли степень мечения, как мы уже показали, сейчас, вот здесь.

(показывает слайды презентации)

С помощью спектрофотометра, мы метили антитело, затем выделяли его с помощью гель-фильтрации, и затем смотрели, что у нас получилось. Здесь видим оптические свойства. Мы видим, как поглощает антитело на 280 нм, и мы знаем, как поглощает краситель на 550 нм, так же мы знаем разные коэффициенты коррекции, которые нам необходимы. С помощью простого математического уравнения мы считаем

соотношение между поглощением краски, поглощением антитела и вычисляем степень мечения.

Дзантиев Б.Б.:

Примерно с какой точностью вы считаете? Например, четырнадцать плюс минус примерно сколько?

Сапожникова К.А.:

Мы предполагаем, что относительно точно.

Дзантиев Б.Б.:

Спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Да, Владимир Александрович, конечно.

Олейников В.А.:

Да, если можно, я в дополнение. Это у вас статистические данные, то есть у вас может быть на одном антителе 17, а на другом 9, или у вас точно везде будет 14?

Сапожникова К.А.:

Мы надеемся, что у нас везде будет 14, но предполагать точно мы не можем. Скорее это будет зависеть от того, какие гликаны на антителе находятся. У нас не гомогенный конъюгат. Гомогенный конъюгат, это конъюгат у которого на каждом антителе в растворе будет строго известное количество молекул нагрузки, например, два. А у нас не гомогенный конъюгат в строгом понимании этого слова, а сайт специфический, то есть мы знаем, где конкретно они находятся, но не знаем сколько молекул полезной нагрузки на отдельно взятом антителе. Это чуть лучше, чем мечение по лизинам, потому что, если мы метим по лизинам, мы не знаем, где они, и они могут оказаться не там, где надо, например, в центре связывания антигена. У нас в центре связывания антигена никогда не окажется полезной нагрузки.

Олейников В.А.:

Можно я задам еще один вопрос.

Ефремов Р.Г.:

Да, конечно.

Олейников В.А.:

Да, и еще один вопрос. У вас вот это все схематично, очень красиво нарисовано, а вот вы пытались объемно показать, допустим антитело, и объемно показать молекулу полезной нагрузки? Вот с этой меткой насколько они сопоставляются по размеру по объему?

Сапожникова К.А.:

Мы знаем, что антитело весит примерно 140 кДа. Это примерно, в среднем. Мы знаем, что у нас нагрузки весят от 400 Да, до 1000, и до 2000 Да в зависимости от того сколько там молекул нагрузки. Разветвленные больше весят. Мы думаем, что это очень небольшой процент от антитела.

Олейников В.А.:

То есть антитело маленькое, а нагрузка большая?

Сапожникова К.А.:

Антитело большое.

Олейников В.А.:

Может нагрузка мешать антителу выполнять свои функции?

Сапожникова К.А.:

Мы думаем, что антитело большое, а нагрузка маленькая.

Ефремов Р.Г.:

Да.

Олейников В.А.:

А, все-таки. Понятно, спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Ну, кстати, у меня к этому же вопрос. Ну, немножко с другой стороны. Вы просто говорите, что вот есть линкер, с ним удобно работать, вы можете полностью контролировать процесс, химические реакции. Но про структуру линкера ничего не говорите, потому что не может ли оказаться так, что вся ваша навеска, она будет каким-то образом взаимодействовать с поверхностью антитела и мешать ему, как бы менять его свойства. Это будет приводить к изменению спектральных свойств хромофоров, которые вы там поместили. Потому что, тем более, когда их несколько, к вопросу опять предыдущему. Насколько точно вы можете оценить вот эту вот степень мечения, потому что у вас там могут спектральные характеристики флуоресцентные и поглощения меняться в зависимости от микроокружения хромофоров, за которыми вы следите.

Сапожникова К.А.:

Да.

Ефремов Р.Г.:

Как вы эту проблему решали? Потому что проблема дизайна линкеров очень сложная и до сих пор не решена, потому что специально проводят люди работы, пробуя разной длины, разного состава эти линкеры, потому что есть линкеры, которые сами по себе структурируются и таким образом мешают вам решить задачу, на которую вы рассчитываете. Обычно стараются сделать так чтобы линкер как можно дальше уводил нагрузку от как бы основы, чтобы не помешать работать антителу, например. В данном случае антителу, да. Как вы решали проблему?

Сапожникова К.А.:

Да, я поняла вопрос. Мы изначально предполагаем, что гликаны очень удалены от интересующего нас участка антитела, то есть антигенсвязывающего. Кроме того, гликаны находятся между двух тяжёлых цепей, в такой выемке, и если мы вешаем туда нагрузку, то мы предполагаем, что она будет где-то там. Чтобы решить проблему взаимодействия непосредственно антитела и красителей, двух красителей с нарушением оптических свойств, да, мы решили эту проблему. Мне нужен дополнительный слайд, и я вам сейчас покажу как.

(показывает дополнительный слайд презентации)

Вот. Сейчас. Вот. Для того чтобы точно убедиться, что мы все учитываем, мы сначала синтезировали низкомолекулярный конъюгат: два цианина третий и пятый. Он внизу на слайде - соединение 55. Затем изучили его оптические свойства, т.е. как он себя ведет вообще. Потом сделали такой же конъюгат с антителом, а также промежуточный только с цианином, и изучили их свойства. Изучили то, как красители себя ведут, потому что на самом деле цианин третий и цианин пятый у них соотношение не такое как ожидалось на самом деле. Действительно есть какие-то взаимодействия между ними, о которых мы не знаем, так как это уже дополнительная работа, она сюда не входит, мы просто изучили как это будет, изучили соотношение цианинов, и затем использовали эти особенности при вычислении степени мечения.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо! Так, коллеги, пожалуйста, вопросы. Сергей Кириакович, к микрофону только.

Завриев С.К.:

Ладно. У меня вопрос такой, такое любопытство просто. Вот если вам в принципе трудно оценить сколько может сесть молекул на один конъюгат, на одно антитело или на одну молекулу белка, вот вы говорите, вы так рассчитывали это, так приблизительно, четырнадцать получается. Вот вы не пробовали, например, нанести этот белок на форец и модифицированный белок, и в зависимости от того, какая молекулярная масса получается на фореце, можно же в принципе грубо оценить минимальные и максимальные количества молекул, которые присоединяются к нему. Вот лигандов, которые присоединяются, это было бы и наглядно, и наверно как-то помогло бы, так сказать, оценить степень мечения.

Сапожникова К.А.:

Да.

Завриев С.К.:

Я видел у вас мелькнул какой-то слайд с форецом.

Сапожникова К.А.:

Да. Я вам сейчас его покажу.

Завриев С.К.:

Да.

Сапожникова К.А.:

Вот он.

(показывает дополнительный слайд).

Мы делали электрофорец, мы не внесли их фотографии просто в основной текст, но мы делали. Вот мы делали форецы соответственно восстанавливающий, когда две цепи отдельно идут. Мы видим тяжелую цепь и легкую цепь и видим, что они действительно расходятся после мечения. Однако это не настолько информативно, потому что маленькая очень разница между нагрузкой и между антителом, в том смысле, что маленькая очень нагрузка и большое антитело, то есть маленькая очень разница масс между меченым и не меченым антителом, чтобы прямо вот наверняка сказать.

Завриев С.К.:

То есть это недостаточно да?

Сапожникова К.А.:

Да.

Завриев С.К.:

То есть число четырнадцать — это недостаточно по молекулярной массе, все равно очень мало по сравнению с молекулярной массой белка? Да?

Сапожникова К.А.:

Вот здесь мало, но можно увидеть только то, что мечение есть и что меченые и немеченые цепи расходятся.

Завриев С.К.:

А вот линкер, который присоединяется в комплексе, все вместе, это сколько приблизительно молекулярный вес?

Сапожникова К.А.:

Это около тысячи или даже около двух дальтон, если разветвленный.

Завриев С.К.:

Если около тысячи или около двух, значит это двадцать тысяч приблизительно, да? И в электрофорезе разницы нет? Я думаю, что разница должна видна быть все-таки. Двадцать тысяч это если хорошо поставить электрофорез... Может быть вам сконцентрировать внимание на условиях постановки фореа и я думаю это можно будет довести до результата.

Сапожникова К.А.:

Проблема просто в том, что там, где большая степень мечения, где была степень мечения двадцать один, про которую вы говорите, это красители, при использовании больших тяжелых длинных линкеров это не получается.

Завриев С.К.:

Что это?

Сапожникова К.А.:

Большая степень мечения. Получается где-то около двух.

Завриев С.К.:

Понятно.

Сапожникова К.А.:

Я думаю, что это связано со стерическими затруднениями.

Завриев С.К.:

Если около двух, то там и считать нечего.

Сапожникова К.А.:

Да. Мы видим это на фореа.

Завриев С.К.:

Спасибо!

Ефремов Р.Г.:

Так, Николай Владимирович, пожалуйста.

Бовин Н.В.:

У меня вопрос о будущем, наверное, вы уже замахнулись на следующий этап, на *in vivo*? А вопрос такой, как у вас стабильность оксимов *in vivo*? Ведь *in vivo*, в клетке, вообще в организме, может быть очень высокая концентрация альдегидов и кетонов. Вы не ставили модельный эксперимент, не доходя до *in vivo*, а *in vitro*? Можно смоделировать насколько стабильными будут эти оксимные конъюгаты в присутствии высоких концентраций альдегидов и кетонов?

Сапожникова К.А.:

Не делали, но мы предполагаем, исходя из литературных данных, что оксимная связь довольно стабильна, стабильнее, чем между гидразонами связь, за счет стабилизации кислородом. Мы предполагаем, что она скорее всего будет устойчива.

Бовин Н.В.:

Спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Да, пожалуйста.

Ямпольский И.В.:

Скажите пожалуйста, вот вы структурно все-таки исследовали вот эти ваши конъюгаты? Где они вот у вас там, мечение два среднее или два с половиной, это вот в одних и тех же местах или в разных?

Сапожникова К.А.:

Структурно, в смысле, где конкретно на поверхности антитела находится метка?

Ямпольский И.В.:

Да.

Сапожникова К.А.:

Мы никак это не проверяли пока, мы просто предполагаем, что при окислении у нас получаются альдегидные группы только на гликанах, потому что по литературным данным их вроде бы как не должно появляться в других местах.

Ямпольский И.В.:

Да. Это понятно.

Сапожникова К.А.:

У нас лигирование происходит только там, потому как других карбонильных групп у нас нет.

Ямпольский И.В.:

Ну, а вот требования, вот к гомогенности этих препаратов, вот они какие, вы знаете их?

Сапожникова К.А.:

Гомогенность — это однозначно хорошо.

Ямпольский И.В.:

Нет, вот именно медицинские требования. Вы разрабатываете это как для медицинского применения, должны ли они быть все гомогенны или там достаточно чтобы средняя была какая-то величина, вот как у вас степень мечения?

Сапожникова К.А.:

Судя потому, что FDA одобрила меченные по лизинам, статистически меченные по лизинам конъюгаты, видимо достаточно какой-то воспроизводимой средней степени мечения.

Ямпольский И.В.:

Вот это я и хотел знать. То есть такие препараты реально проходят через их сито, да?

Сапожникова К.А.:

Да, они проходят, они одобрены, они работают, но, конечно, надо стремиться к созданию как можно более гомогенных конъюгатов. Мы над этим в будущем планируем работать.

Ямпольский И.В.:

Понятно, спасибо. А вот еще вопрос у меня. Вот на 32 слайде, да. Вот вы взяли в 1000 раз более активный цитотоксический агент, да и говорите, что вот теперь он заработал, а не может быть что у вас там одна тысячная нагрузки отвалилась? Есть контроль какой-то?

Сапожникова К.А.:

Мы думаем, что это вряд ли возможно, потому что у нас на отрицательном контроле мы видим никакой активности нет.

Ямпольский И.В.:

Отрицательный контроль – это что?

Сапожникова К.А.:

(Показывает слайд)

Это вот это.

Это мышинная карцинома, у которой нет PRAME вообще. Мы видим, что здесь конъюгат не работает вообще.

Ямпольский И.В.:

Да.

Сапожникова К.А.:

Поэтому мы видим, здесь есть какая-то специфичность, потому что на PRAME положительных линиях мы видим, что у нас есть эффект.

Ямпольский И.В.:

Я понял, согласен. Спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Так. Коллеги, вопросов похоже больше нет. Спасибо, пока тогда отдохните.

Сапожникова К.А.:

Спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Слово вашему руководителю. Владимир Аркадьевич, пожалуйста. О соискателе скажите нам.

Коршун В.А.:

Уважаемые коллеги, Ксения Андреевна пришла в нашу лабораторию очень давно. Во времена раннего студенчества, и конечно в процессе работы столкнулась со многими трудностями: неопределенность, допустим, с микрошефами, смена тематики... То есть пока выкристаллизовалось направление. Но ее интеллект, критическое мышление, настойчивость, трудолюбие, позволили все трудности эти преодолеть. Потом был получен грант под эту тему: РНФ и аспирантский грант РФФИ. В общем сейчас направление вполне сложилось и в общем у нас имеется, я считаю, исследователь квалифицированный, который способен дальше все это очень хорошо развивать, и она участвует в различных коллаборациях, и это привело к публикации только в этом году пяти статей. И вот сейчас продолжают буквально каждую неделю появляться все новые и новые результаты, которые нельзя было сюда включить, но в общем у нас имеются разнообразные виды сотрудничества, и Ксения плодотворно в них работает. Я считаю, что дальше все будет хорошо, но проблемы тоже будут, потому что снова надо бороться за получение какого-то финансирования для этой работы и стремиться хорошо это публиковать, но все качества Ксении, которые у нее есть, я думаю, позволят нам это все сделать, спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Коллеги, есть вопросы к руководителю? Нет вопросов? Тогда Владимир Александрович, пожалуйста, отзывы.

Олейников В.А.:

Так, ну опять же начинаем с заключения, *заключения организации, где была выполнена работа*. Это наш институт, институт биоорганической химии.

Название, аспирантура, работа в лаборатории молекулярного дизайна и синтеза. Окончание Российского химико-технологического университета имени Менделеева. Тема диссертационной работы последней редакцией утверждена на заседании ученого совета ИБХ РАН 29 марта 2023 года. Рассмотрена на соответствующем семинаре отдела. И следующее заключение. Ну во-первых актуальность. Наиболее интересной моделью для применения разрабатываемых линкеров являлось получение конъюгатов антител с лекарствами (терапевтические конъюгаты антител, ADC). Практическое значение разработки таких препаратов исключительно велико, поскольку с ними сейчас связаны большие надежды в области терапии онкологических заболеваний. Это определяет соответственно актуальность работы. Новизна. Методы получения ADC-препаратов разнообразны, но наиболее трудными задачами являются контроль стехиометрии и сохранение аффинности антитела. Линкер, соединяющий антитело с противоопухолевым антибиотиком (цитотоксическим агентом), должен быть гидрофильным, достаточно протяженным и биоразлагаемым; внутри клетки должно

происходить высвобождение антибиотика. В работе впервые предложено контролировать стехиометрию конъюгата с помощью введения в состав линкера флуоресцентных красителей, которые количественно детектируются по электронным спектрам поглощения. Разработан усовершенствованный метод оксимного лигирования, в котором реакцию карбонильного соединения проводят *in situ* с защищённым гидроксиламином. Подход использован также для флуоресцентного мечения антител, которые далее могут применяться в диагностике. Впервые показана применимость опухолевого антигена PRAME для создания конъюгата с цитотоксическим препаратом. Теоретическая и практическая значимость работы. Ну, теоретическая, во-первых, заключается в следующем: предложен новый подход к мечению окисленных периодатом антител с помощью оксимного лигирования со снятием защитной группы с оксиамины *in situ*. Предложен метод синтеза разветвленных линкеров для синтеза конъюгатов антител с увеличенной нагрузкой. Предложен ряд подходов к сборке терапевтических конъюгатов антитело-препарат, содержащих в структуре цианиновый краситель, расщепляемый линкер и препараты доксорубицин и монометилауристин Е. Предложен способ контроля стехиометрии конъюгата с помощью флуоресцентного красителя, встроенного в линкер. Впервые показано, что конъюгаты антитело-препарат, нацеленные на белок PRAME, вызывают гибель клеток, экспрессирующих PRAME на мембране. Практическая значимость данной работы заключается в следующем: с помощью разработанного подхода к мечению были получены диагностические флуоресцентные антитела к мембранному белку PRAME, позволяющие проводить иммунотипирование больных лейкозами и меланомой. Также были получены диагностические флуоресцентные антитела с увеличенной нагрузкой красителя, обладающими повышенной яркостью флуоресценции. Впервые показана возможность создания терапевтических конъюгатов антитело-препарат, нацеленных на опухолеассоциированный антиген PRAME, для лечения онкологических заболеваний.

Степень достоверности. Полностью достоверно, так как проводили исследование самыми современными методами, с использованием ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и прочее, прочее. Личное участие. Основные результаты получены лично автором или при его непосредственном участии. Соответствие специальности, ну подтверждается, что диссертационная работа соответствует заявленной специальности 1.4.9 – биоорганическая химия в отрасли наук химические науки. Ну, и соответственно, материалы диссертационной работы достаточно полно опубликованы, это пять статей в рецензируемых научных журналах. Здесь перечисляются эти самые статьи. Ну, и далее, заключение, что данная диссертация рекомендуется к защите на соискание ученой степени, ну секретарь заседания Михура подписала и утверждено заключение зам. директора нашего института Иваном Витальевичем Смирновым.

Это что касается заключения организации, теперь переходим к *отзыву ведущей организации*.

Ведущей организацией является Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта. Ну опять же, актуальность проблемы подчеркивается, цели и задачи исследования, научная новизна результата, по результатам диссертационной работы, Сапожниковой предложен новый подход к сайт-специфическому мечению антител. Предложены методы синтеза ряда О-замещенных гидроксиламинов с ортогональными реактивными группами для независимого и контролируемого связывания линкеров с антителами. Предложены подходы к сборке терапевтических конъюгатов антитело-препарат, содержащих в структуре цианиновый краситель, расщепляемый линкер и препараты доксорубицин и монометилауристин Е. Предложен способ контроля стехиометрии конъюгатов с применением флуоресцентного красителя, встроенного в линкер.

Впервые показано, что конъюгаты антител с цитотоксическими препаратами, доксорубицином и монометилауристатином E, нацеленные на специфический белок PRAME, вызывают гибель опухолевых клеток, экспрессирующих на мембране этот самый белок. Практическая значимость этой работы подчеркивается. Перечислены организации, в которых рекомендуется использование результатов. По поводу структуры и объема это представляет собой завершённое исследование, состоит из списка сокращений, введение, литобзор и так далее... Основная часть работы изложена на 197 страницах, включает много рисунков, схем и таблиц. Кроме того, приведены 47 приложений. Список цитируемой литературы включает 292. Ну далее введение, соответственно обзор, экспериментальные данные о которых тут услышали в докладе. Вот. Теперь важный момент, замечания и комментарии. Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Известно, что для терапевтических антител крайне важны аффинность и специфичность к молекулярной мишени. 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) дана без расшифровки, что затрудняет восприятие текста. На с.53 не дана расшифровка аббревиатуры LXR. Ну и заключение. Полностью диссертация соответствует утвержденным положениям ВАКа, перечислены все эти положения. Автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. биорганическая химия. Работа рассмотрена на межлабораторном коллоквиуме лаборатории биологических микрочипов, лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот и лаборатории молекулярной диагностики ИМБ РАН, то есть объединенный был семинар. Соответственно заключение было принято и подписано единогласно, ведущий научный сотрудник кандидат химических наук руководитель лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот и лаборатории молекулярной диагностики ИМБ РАН Чудинов Александр Васильевич. Ну и соответственно утверждено заключение директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук акад. РАН, д.б.н., Георгиевой С.Г.

Ну были замечания.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Да, Ксения Андреевна, пожалуйста ответьте на замечания в отзыве ведущей организации.

Сапожникова К.А.:

В отзыве задавался вопрос о том, как модификация влияет на сохранение аффинности и свойств антитела, мы изучили этот вопрос, я покажу дополнительный слайд. *(показывает дополнительный слайд).*

Мы изучили эти свойства, то, как влияет окисление и то, как на них влияет модификация, с помощью ИФА. Здесь показано интактное антитело, которое затем было окислено, а затем оно было проинкубировано с семикарбазидом, то есть чтобы забить альдегиды, и после этого мы проверяли такое антитело, то есть такое антитело, которое не содержит никаких объемных флуоресцентных меток. Ничего такого крупного, что

могло бы мешать. Затем мы проверяли антитела на сохранение аффинности. Мы видим, что у нас с учетом отклонений аффинность сохраняется после периодатного окисления, то есть эта модификация не оказывает значительного влияния на аффинность антитела. Так же мы проверяли различные наши флуоресцентные линкеры и то, как они влияют на аффинность, и мы видим, что даже если она и снижается, то не критично. Таким образом вот мы можем сказать, что это мечение не оказывает значительного влияния на сохранение аффинности антитела. Соответственно на Fc фрагменте значительного влияния на эти свойства не оказывается.

Ефремов Р.Г.:

Так, были еще технические замечания.

Сапожникова К.А.:

Да, я согласна со всеми опечатками.

Ефремов Р.Г.:

Да, опечатки, ну очень хорошо. Владимир Александрович продолжим, пожалуйста.

Олейников В.А.:

Да, письменные отзывы.

Ефремов Р.Г.:

Да.

Олейников В.А.:

Письменные *отзывы на автореферат*. Их три, они у меня в руках. Ну опять же они положительные полностью. Ну подчеркивается, что использованы разнообразные современные методы, написан хорошим языком автореферат, по материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из которых 5 опубликованы в рецензируемых научных журналах. Да, принципиальных замечаний по оформлению автореферата нет, однако есть замечания по представлению данных на рис. 16, 17, 18: было бы целесообразно каждую кривую начинать от 100% в точке нулевой концентрации действующего вещества (поскольку из рисунка не ясно, какая точка принята за 100% выживаемость клеток), а так же для ММАЕ было бы желательно снизить концентрации, изученные на культурах клеток Mel-P и TNP1, чтобы можно было рассчитать IC₅₀. Учитывая довольно значительные и разнонаправленные изломы кривых, возможно, было бы целесообразно представить данные в виде отдельных точек и аппроксимирующих кривых.

Ну а далее соответственно, подчеркивается, что работа хорошая, что соответствует, автор заслуживает, значит это подписано зав. лабораторией биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФНБУ НМИЦ онкологии имени Блохина. Это значит, первый отзыв с небольшим замечаниям. Теперь дальше.

Отзыв положительный полностью, но вот тут тоже есть некая зацепка. К автореферату имеется несколько незначительных замечаний, и тут текст на половину страницы. авторами в качестве одной из ключевых задач при синтезе конъюгатов был контроль стехиометрии конъюгации. Для анализа данного показателя используется оценка спектров поглощения и флуоресценции полученных конъюгатов. При этом в литературных данных существуют и другие стандартные методы оценки данного показателя, например, масс-спектрометрия. Было бы целесообразно сравнить показатели

DAR (соотношение лекарство-антитело), полученные разными методами. Тем более, что на примере конъюгатов, несущих несколько флуоресцентных меток наблюдаются эффекты отличные от ожидаемого, для которых автор, к сожалению, не даёт объяснения: «Несколько удивительно, что значение (0.91) оказалось намного выше ожидаемого, ну и тут перечисляются, значит, красители, которые были присоединены и конкретные совершенно цифры. Также авторами был показан и исследован FRET эффект на таких системах, что также может приводить к искаженной оценке реального показателя DAR, при отсутствии чёткой количественной оценки вклада данного эффекта. В ряде случаев использованы не самые стилистически удачные, в том числе жаргонные формулировки: «...избыток периодата *гасили* 20%-ным раствором...», «...те же самые *краски*, несущие...», «...Кислотная *депротекция*...», «... интернализации с помощью *некоего* механизма эндоцитоза ...», «... бифункциональную *краску* ...». Однако описанные замечания нисколько не умаляют достоинства данной работы и опять же, все это, так сказать, идет в положительную область. Подписано, к.х.н., научным сотрудником кафедры органической химии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Мачулкиным Алексеем Эдуардовичем. Вот и значит так это подписано.

Третий отзыв на автореферт, он, к счастью, без замечаний без всяких. Практическое значение, выводы очень обоснованы. Профессор кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т., Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», доктор биологических наук, Калинина Елена Валентиновна. Как раз по специальности биохимия.

Все.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Ксения Андреевна, в двух отзывах на автореферат были замечания, пожалуйста, ответьте на них.

Сапожникова К.А.:

Я согласна с первым замечанием по поводу наших МТТ графиков. Действительно стоило сделать по-другому, сейчас я покажу суть замечания.

(показывает слайд)

Действительно стоило сделать точки и аппроксимирующую кривую, но мы решили сохранить данные такими, какими они получились. А следующее замечание, касательно использования различных методов масс-спектрометрии, ВЭЖХ для оценки степени мечения, это известные методы, но масс-спектрометрия белков, особенно антител, это задача нетривиальная и требует дополнительных значительных усилий. Пока мы не смогли этого добиться, но в будущем мы планируем получить такие данные и сравнить их с нашими. Еще было замечание по поводу оценки стехиометрии и эффектов цианинов третьего и пятого. Вот как раз этот слайд он отлично отвечает на этот вопрос.

(показывает слайд)

Для того чтобы оценить взаимодействие между цианином третьим и пятым спектрофотометрически, мы сделали, как раз, низкомолекулярный конъюгат, как я уже ранее сказала, и конъюгат такой же с антителом, и изучили, соответственно соотношение между поглощением цианина третьего и пятого. Оно действительно

отличается от ожидаемого в большую сторону и объясняется неким эффектом, изучение которого – отдельная интересная задача. Со всеми опечатками я согласна. С использованием жаргонных выражений тоже. Это действительно справедливое замечание, спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Уважаемые коллеги, тогда мы переходим к заслушиванию отзывов официальных оппонентов. Жердев Анатолий Виталиевич, пожалуйста.

Жердев А.В.: *(излагает отзыв, отзыв положительный)*

Уважаемый председатель, уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги! Спасибо за предоставленную возможность познакомиться с результатами исследования, спасибо за интересную дискуссию, и с учетом уже прозвучавших слов и комментариев, я с позволения не буду строго следовать канве бумажного отзыва, а ограничусь общей позицией. Тераностика. Совершенно замечательная область, в которой эффективно применяются подходы биологии, подходы химии для решения медицинских задач, потому что тераностика реализует очень простую идею: интегрировать направленный транспорт фармпрепарата в пораженные органы и ткани организма и после этого транспорта обеспечить токсическое или иное терапевтическое воздействие. Казалось бы, после того, как эта идея прозвучала, должны были бы сказать: спасибо за идею, мы знаем, как ее решать, потому что эффективный транспортер на сегодняшний день — это по-прежнему антитела, а как конъюгировать антитела с разными биомолекулами, разработки по этому поводу существуют уже на протяжении двух поколений как минимум. Но оказалось, что на самом деле не так просто и несмотря на такой, казалось бы, оптимизм, что вот есть методики синтеза и есть аналитические реагенты, есть иммуноферментная диагностика, иммунофлуоресцентные реагенты, как только речь идет о переходе к *in vivo* применению все становится намного сложнее, потому как к препаратам предъявляется значительный длинный ряд требований, которые они должны выполнять в конкурентной среде с разработками разных коммерческих производителей. Это и эффективная доставка, и минимальное неспецифическое связывание в нецелевых органах и тканях, это стабильность структуры антитела в то время пока оно циркулирует по организму, движется к точке своей локализации, это эффективная нагрузка, это возможность управляемого высвобождения реагента и с этим то и связано, что при всех понятных сложностях внедрения медицинской разработки в практику движение таких тераностических препаратов антител идет уже на протяжении двадцати лет и по-прежнему открыт вопрос о том, какие методические подходы наиболее эффективны. Как видно из представленного соискателем слайда, речь не идет о том, что для разных антител к онкомаркерам применяют один и тот же подход синтеза, пытаются варьировать разные диалоги, пытаются найти как обеспечить наиболее эффективный, практически востребованный препарат. В этом отношении диссертационная работа занимает определенную интересную нишу, интегрирующую локализацию сайтов пришивки в углеводной части с эффективными методами ортогональной химии и клик химии. Ну важное отличие важное достоинство этого инструментария как раз в управляемости синтеза и направленности модификационного воздействия, ну и замечательный аргумент в пользу актуальности исследования, это не только статистика, известная всем, работ по этим подходам, ну и нобелевская премия по химии 2022 года присужденная как раз за эти разработки. И вот, найдя вот такую нишу для своих работ, диссертант выполнил весьма внушительное по объему исследование. Я не буду повторять всю канву работы, все варианты, которые реализованы и охарактеризованы, отмечу, что работы включали как

традиционные химико-синтетические исследования с характеристикой полученных препаратов, так и продвижение к оценке биологического действия. Ну в этом отношении как раз важно было не уронить доклад совсем в химию и максимально представить весь спектр, все направление разработок, ну вынужденно при такой фокусировке доклада и объективно большому массиву данных, где-то результаты, ну особенно при чтении полной диссертации, оказывались для меня скомканными, когда говорится, что из сравнения девяти синтезированных препаратов видно, мы при периодатном окислении варьировали несколько параметров и в результате этого установили. То есть там, где обычный диссертант растянул бы историю на десять или пятнадцать страниц, это все фактически оказалось за рамками диссертации отражено в статьях, в приложениях к статьям, но является доказательной основой для того, чтобы убедительно работать именно с теми реагентами, которые диссертант предлагает и эффективность которых он показал. В целом полученный массив данных, кроме конкретных знаний по химическому синтезу, по конкретным полученным препаратам, на мой взгляд формирует некую освоенную до того пустошь в разработках биоконъюгатов и терапевтических препаратов, и, относительно вот этой освоенной территории, есть самые разные направления развития этого и применение разработанных подходов для других видов терапевтических антител. Это и рассмотрение особенностей конъюгирования антител с другими терапевтическими агентами, это и продвижение уже накопленного опыта к дальнейшим точкам, к дальнейшей *in vivo* характеристике, где многое еще предстоит интересного узнать, в том числе структурного, о предлагаемых молекулах. Вынужденно при большом объеме работ при большом объеме диссертации возникают вопросы и замечания. Во введении и в обзоре литературы диссертант дает краткую общую характеристику биоконъюгатов, после чего переходит к рассмотрению оксимного лигирования, на котором и было сфокусировано проведенное исследование. Оценка существующего разнообразия подходов смещена во вторую половину литературного обзора, начинается с очень информативной, но не обсуждаемой таблицы 2, после которой дается содержательная характеристика подходов, появившихся на протяжении последних десятилетий. По мнению рецензента, такая последовательность изложения не является оптимальной. Исходя из общей постановки задач модификации иммуноглобулинов и сформулированных требований к продуктам этой модификации, можно было бы более аргументированно оценить исследования предшественников и с учетом ограничений полученных ими результатов обосновать выбор предложенного в диссертации подхода. Для распространенных коммерческих реагентов, модифицирующих лизиновые остатки иммуноглобулинов (в частности, обеспечивающих биотинилирование белков), в ряде работ подтверждена возможность проведения такой модификации без утраты или значимого снижения аффинности по отношению к антигену. Соответственно риски такой обработки для новых препаратов антител в значительной степени связаны с особенностями их варибельных участков, входящих в активный центр антитела или примыкающих к нему. С учетом этого при рассмотрении модификации моноклонального антитела, специфичного к PRAME, было бы полезно учитывать, какие реакционноспособные аминокислотные остатки имеются в варибельных участках данного антитела. Для введения в белковые молекулы красителя Cyapine3 имеется его коммерчески доступное реакционноспособное производное - активированный N-гидроксисукцимидный эфир. Экспериментальное сравнение продуктов традиционной и предлагаемой диссертантом сайт-специфичной модификации было бы наглядной иллюстрацией преимуществ разработанного подхода. В качестве обобщающей оценки полученных препаратов антител, модифицированных флуорофорами, была бы полезна сводная таблица, отражающая нагрузку флуорофора на одну молекулу IgG в каждом варианте и, по необходимости, другие значимые

параметры. Это позволило бы аргументированно выбирать оптимальные препараты. Сейчас информация о составе синтезированных продуктов распределена по тексту главы 2, что затрудняет доказательные выводы о сравнительной эффективности различных реализованных подходов.

Спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо большое. Ксения Андреевна, пожалуйста, защищайтесь.

Сапожникова К.А.:

Хотелось бы поблагодарить Анатолия Виталиевича за отзыв на мою работу и за полезные комментарии. По поводу первого замечания, относительно моего литературного обзора, я хочу сказать, полностью согласна с замечаниями, могу сказать в свое оправдание что я так построила литературный обзор исходя из того, что в настоящее время существует очень большое количество разнообразных интересных способов модификации антител, и в своем литературном обзоре я хотела рассмотреть их все, чтобы выбрать самый лучший, самый доступный из существующих на данный момент для нас. Со вторым замечанием по поводу того, что... Второе замечание касалось антитела и того, что в литературном обзоре я мало уделила ему внимания. Так же и в обсуждении результатов. Это антитело мы взяли у коллег из онкоцентра Блохина. Это моноклональное антитело, как мышинное, так есть и гуманизованное. Оно было получено из асцита мышей, если речь идет о мышинном, с которым мы преимущественно работали. Соответственно, гуманизованное они делали рекомбинантным образом. На самом деле я не сильно вникала в их работу, потому что, это не наша сфера деятельности, мы получили готовое антитело от коллег. Однако мне известен сиквенс этого антитела, и я хочу показать, из каких последовательностей оно состоит.

(показывает дополнительные слайды)

Вот. Из чего состоит его вариабельная часть, чтобы оценить, как повлияет модификация. Вот. На этом слайде мы видим, соответственно, вариабельные области антитела 6H8, и мы видим, что только в одной области, в вариабельной части тяжелой цепи мы видим наличие аминокислоты, которая может при окислении быть повреждена. Это метионин, он находится на самом краю петли. Так же здесь есть лизин, который так же может быть испорчен, если мы будем использовать модификацию NHS-эффирами, которые действительно коммерчески широко доступны. Однако для того, чтобы оценить, как наши модификации, как вообще при окислении это влияет на антитело, мы использовали метод ИФА, мы видим, как я уже ранее сказала, что эта модификация не приводит к значительному падению аффинности: она приемлема. Сразу я отвечу на замечание по поводу коммерческого эфира сульфо-Су3. Этот коммерческий реагент он действительно доступен, и он нам доступен, однако нас мало интересовало мечение по лизинам, потому что мы стремились создать конъюгат который будет сайт-специфическим. Может он не будет в полной мере гомогенен, но он будет создан сайт-специфическим. В то время как мечение NHS-эффирами всегда приводит к разнообразному набору очень гетерогенных конъюгатов, плюс после этого невозможно предсказать, какие именно лизины будут помечены, с какой он будет нагрузкой. Снижение аффинности в случае мечения NHS-эффирами очень сильно зависит от того, какой избыток реагента вы возьмете и от того, какой состав антитела, какие аминокислоты в его составе, сколько лизинов. Это очень непредсказуемо, и мы решили не испытывать такие конъюгаты, и не сравнивать их с нашими, потому что нас в большей мере интересовало сохраняется ли после нашего мечения аффинность относительно интактного антитела. И между конъюгатами с разной степенью нагрузки.

Поэтому, собственно, мы и не стали добавлять в исследование NHS-эфиры, однако я согласна, что возможно стоило бы их добавить все-таки для большей ясности картины. И последнее замечание было связано с... Забыла. А, да, сравнение в таблице. Я согласна, что мне стоило свести все данные в одну таблицу, но я этого не сделала в диссертации, и сделала так, как я это поняла, сейчас.

(показывает дополнительный слайд)

Я привела в этой таблице все флуоресцентные конъюгаты и, соответственно, изотипический контроль. Так же результаты этих конъюгатов после испытаний на проточном цитометре, на PRAME положительных линиях, так же приведены степени мечения. Я надеюсь, что таблица улучшила понимание экспериментальных данных, в частности свойств полученных нами флуоресцентных конъюгатов.

Ефремов Р.Г.:

Анатолий Виталиевич, вы удовлетворены ответами?

Жердев А.В.:

Да.

Ефремов Р.Г.:

Все, спасибо. Так, пожалуйста, тогда Крылов Вадим Борисович.

Крылов В.Б.: *(излагает отзыв, отзыв положительный)*

Уважаемый председатель диссертационного совета, уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги! Забегая вперед, я хочу сказать, что работа Ксении Андреевны мне очень понравилась. Я с удовольствием ее прочитал и ознакомился в деталях с материалами. Прежде всего, что касается актуальности исследования. Актуальность не вызывает никаких сомнений, так как онкологические заболевания — это такой бич и такое испытание для современной науки и медицины. Как бы столпом лечения онкологических заболеваний является химиотерапия. Ну, прежде всего цитостатики, низкомолекулярные соединения и такой подход, который как бы лежит на поверхности, заключается в том, что давайте мы возьмем антитело, которое будет таргетировать данный цитотоксический препарат в локализацию онкологического процесса. Но здесь возникает много разных подводных камней. Дело в том, что этот конъюгат уже представляет из себя высокомолекулярное соединение и со всеми вытекающими отсюда особенностями, в частности с особенностями связанными с интернализацией препарата. Да, действительно, как уже много обсуждалось, существует несколько зарегистрированных препаратов, которые все сделаны на основе статистического алкилирования лизинов или метионинов. Но, что происходит в данном случае? В данном случае мы имеем очень гетерогенную смесь. И непросто эта модификация может влиять на антигенсвязывающие свойства, но и так же модификация, которая затрагивает Fc фрагмент, и модификация которая затрагивает эффекторные эпитопы антитела, они могут влиять на интернализацию и на процесс ресорбции антитела, что на самом деле представляет очень большую проблему и вот как раз в работе Ксении Андреевны использован подход, заключающийся в сайт-направленной модификации по гликозилированному сайту, который находится довольно удаленно от рецепторных частей фрагмента, ближе к основной части антитела. Таким образом решается проблема, во-первых, сайт-специфического присоединения, а во-вторых, для того, чтобы обеспечить необходимую нагрузку мы можем получать высокоразветвленные структуры. Таким образом, диссертационная работа крайне актуальна и находится в струе современных представлений. Научная и практическая

новизна не вызывает никаких сомнений, я, пожалуй, детально останавливаться не буду, все подробно написано в отзыве, скажу только что химические и биологическое направления, в плане химического, это прежде всего развитие методологии, всестороннее развитие методологии синтеза полифункциональных линкеров и методика конъюгации с белком, и фишкой данного направления является использование защищенных оксимов, которые деблокируются именно в процессе конъюгации.

Диссертация построена по классической схеме, введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть, выводы. Отдельно хочу отметить, что обзор литературы содержит очень много исключительно актуальных ссылок и в частности, данные, приведенные в обзоре, они включают самые последние работы, опубликованные в марте 2023 года. Вот. Ну, конечно, когда мы имеем такую масштабную и интересную работу, возникает ряд вопросов, которые носят скорее рекомендательный или как бы повод для дискуссии. В экспериментальной части (раздел Материалы и Методы) следовало бы кратко добавить информацию об использованном в работе антители 6Н8: способе получения (например, наработка в асците или выделение из супернатанта клеточной культуры) и основных характеристиках. Так как использованный в работе метод конъюгации основан на периодатном окислении углеводов, можно ли охарактеризовать содержание гликанов в исходном антители? В экспериментальной части диссертационной работы не приводятся аналитические данные для высокомолекулярных конъюгатов антители. Возможно, следовало бы дополнительно охарактеризовать полученные конъюгаты методами высокоэффективной гель-проникающей хроматографии и/или гель-электрофорезом (PAGE) для подтверждения отсутствия агрегации и кросс-сшивки белка. В диссертации приведены спектры очень сложных соединений (например, HSQC спектр соединения 53 на стр. 196). Возможно, следовало привести полное отнесение сигналов на спектре для подтверждения чистоты? Возможно ли взаимодействие альдегидных групп, полученных при периодатном окислении гликанов антители, с аминокетонами лизинов. Насколько устойчиво окисленное антители во время выделения на геле? N-Этоксипиперидин-защитные оксиаминовые производные характеризовались и вводились в реакционную смесь в виде раствора в ДМСО. Насколько устойчивы данные соединения в воде, и какая эффективность конъюгации (выход по лиганду) для данных соединений в зависимости от используемого избытка оксиаминового производного?

Имеются незначительные замечания по оформлению диссертации и автореферата (на Схеме 1 автореферата и Схеме 4 диссертации опечатка в структуре L-фукозы, на Рис. 7 диссертации неточность в продукте окисления остатка L-фукозы (должен быть диальдегид), на Схеме 11 автореферата структура соединения 45 не приведена), присутствуют стилистические неточности. Однако указанные замечания (пожелания) не снижают научную ценность и значимость представленной работы, а также положительную общую оценку представленной диссертации. Спасибо!

Ефремов Р.Г.:

Спасибо! Ксения Андреевна, пожалуйста, отвечайте на вопросы.

Сапожникова К.А.:

Я хотела бы поблагодарить Вадима Борисовича за высказанные комментарии по работе. Я согласна, что мне стоило указать происхождение антители и способы его наработки в экспериментальной части. Я согласна с указанными опечатками, хочу дать комментарий по поводу характеристики полученных высокомолекулярных конъюгатов. Мы характеризовали их с помощью электрофореза, изучали то, как у нас происходит мечение и собственно, наличие самого конъюгата с помощью метода электрофореза.

Наличие кросс-сшивок и наличие агрегатов, но мы не стали вставлять это в экспериментальную часть, картинку форезов, поэтому я согласна с этим замечанием, но на дополнительном слайде я хочу продемонстрировать несколько фотографий гелей, чтобы показать, что у нас нет никаких агрегатов, никаких кросс-сшивок, что можно увидеть, собственно, на картинках форезов.

(показывает дополнительный слайд)

Далее, по поводу того, что окисленное антители может реагировать с другим антители по лизинам, по аминок группам остатков лизина в других антителях. Это так, они действительно могут реагировать, однако окисное лигирование, в отличие от образования оснований Шиффа, протекает в слабых условиях, то есть при pH примерно 5. В это время лизины протонированы, поэтому они не могут вступать в реакцию с карбонильными группами. Наоборот, для того, чтобы образовать основание Шиффа следует брать более щелочной буфер, чего мы избегали, поэтому у нас не наблюдалось никаких кросс-сшивок, так как мы всегда с окисленными антителями всегда работали в слабых буферах во избежание как раз образования оснований Шиффа. Далее, по поводу характеристики соединений с помощью двумерных спектров. Я сделала соотношение, так как его нет в диссертационной работе, это связано со сложностью структуры. Мы видим картинку, видим ароматическую область, видим алифатическую. Мы можем наблюдать незначительное количество примесей растворителей, в остальных соединениях отличаются чистотой. Со всеми замечаниями и комментариями по опечаткам я согласна.

Ефремов Р.Г.:

Вадим Борисович, вы удовлетворены ответами?

Крылов В.Б.:

Да.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо! Так, коллеги, тогда мы переходим к общей дискуссии. Пожалуйста, Сергей Михайлович.

Деев С.М.:

Дорогие коллеги, ну, буду кратко, работа многоплановая. Опечатки есть, вот даже на этой картинке, обратите внимание, Ксения, у вас под крайней левой картинкой должно быть reducing conditions восстанавливающие условия, человеку, работающему с антителями мне сразу это режет глаз, так что опечатки есть. Но, по сути, значит, вот Николай Владимирович по предыдущей диссертации выступал и говорил, что непонятно, про что она, здесь все поняли, работа по биоорганической химии, вот, в чем ее перспектива, в чем ее ценность. Значит, создание конъюгатов антители и, в частности, иммунотоксинов, когда токсический компонент. Это восходит к 70-м годам прошлого века, был такой великий Айра Пастан, который предложил, значит, создание конъюгатов антители с привязкой всякой химии-органики. К сожалению, никогда не получит нобелевскую премию, потому что четверо пациентов умерли. Когда начали работать с антителями, тогда были мышинные моноклональные антители и некие токсины. Вот, в то же время это область очень важная очень перспективная, несмотря на то, что появилась большая, великолепная генная инженерия, революционные успехи генной инженерии позволяют сейчас создать не только антители, но и их миметики, которые в ряде случаев лучше антители, и это здорово, но есть огромное количество полученных хороших антители, которые хорошо узнают онкомаркеры на поверхности раковых клеток, и есть

огромное количество пациентов, людей, которые умирают каждый день, сейчас рак на втором месте по смертности, наверное на первом месте кардиопроблемы, я думаю, что рак скоро обгонит, значит и выйдет на первое место по смертности, потому что население планеты стареет, сейчас каждый имеет шанс, счастливый шанс дожить до своего рака и людей надо лечить здесь и сейчас. Конечно будут созданы генно-инженерные препараты, но на каждый такой препарат уходит не один десяток лет, а вот антитела сейчас существуют, они есть, и вот если применить те разработки, которые были сделаны в данной диссертационной работе, а именно сайт-специфическое связывание антител для создания именно терапевтических, я не думаю, что стоит тут особенно стараться насчет флуоресцентных меток, там можно с мышинными, не так страшно, сколько аминокрупп мы повредим, и может быть упадет эффективность диагностическая, но там за счет количества можно всю эту иммунохимию разделить. А вот когда мы *in vivo* работаем и надо спасти конкретного человека, то вот разработанные в данной работе подходы по сайт-специфическому присоединению токсинов, но наверно не стоило брать доксорубицин, уж очень слабый препарат, но вот мощные, очень мощные токсины, которые нужно доставить в нужное время и в нужное место, в нужном количестве, это вот та перспектива данной работы, которую я оцениваю очень высоко. Наш институт биоорганической химии и я рад, что такая работа по биоорганической химии проведена, она имеет перспективу для конкретных уже созданных и имеющихся на имеющихся даже на коммерческом рынке антител и их терапевтический потенциал может быть усилен добавлением к ним цитотоксиков и цитостатиков, поэтому однозначно поддерживаю данную работу, оцениваю ее высоко, призываю всех голосовать за. Спасибо!

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Сергей Михайлович! Так, Николай Владимирович, пожалуйста.

Бовин Н.В.:

Для того, чтобы написать хорошие или очень хорошие стихи, совершенно не нужно изобретать новых слов. Так и здесь, по поводу дискуссии о новизне. Здесь были использованы хорошо проверенные методы конъюгирования, хорошо проверенные, хорошо изученные, всем известные химические синтоны, и в результате получились очень хорошие качественные стихи. А второй момент, вызывавший сегодня дискуссию, касается гетерогенности при конъюгировании с гликанами, с окисленными гликанами. Совершенно справедливые были вопросы и замечания, но надо иметь в виду, что, если этот конъюгат с этими антителами, направленный к этому данному антигену, пройдет, и окажет очень хороший эффект *in vivo*, то следующим ходом, я предсказываю, будет модификация этих моноклональных антител. Они будут нарабатываться в какой-то модифицированной гибридоме, где будут сделаны так, там либо будет две сиаловые кислоты, т.е. на каждой из антенн будет сиаловая кислота, или не будет ни одной сиаловой кислоты, будут две терминальные галактозы. Тогда гетерогенность по гликану пропадет, тогда вопрос этот сам по себе отпадет. Это на перспективу не проблема. И я голосую за эту работу, она мне очень понравилась, и я ее наблюдал с момента, когда она была предложена аспиранту, и потом, по мере отчетов этого аспиранта. Я читал саму диссертацию, все замечательно я поддерживаю и других призываю поддерживать.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Есть еще желающие поучаствовать в дискуссии? Но уже тут, по-моему, все сказано. Спасибо. Тогда Ксения Андреевна, пожалуйста, заключительное слово ваше.

Сапожникова К.А.:

Я хотела бы высказать благодарность своим коллегам за помощь при создании моей работы, в частности, Владимиру Аркадьевичу Коршуну за руководство моей диссертационной работой, так же своих коллег из нашей лаборатории молекулярного дизайна и синтеза, Брылева В.А., Алферову В.А., Гуляка Е.Л. А также коллег из других подразделений, Рязанцева Д.Ю., Рябухину Е. В., Симонову М.А. Кроме того, выражаю благодарность коллегам из онкоцентра им. Блохина Мисюрину В.А., Бармашову А.Е., Финашутиной Ю.П. и коллегам из ООО «Генотехнология» Мисюрину А.В.Алексеевой А.В., Тихоновой Н.А., Лыжко Н.А. за возможность работать с антителом к такой интересной мишени как PRAME. Благодарю всех за сотрудничество и помощь в работе! Спасибо!

(Далее объявляется перерыв на голосование. Проходит тайное голосование)

Ефремов Р.Г.:

Коллеги, пока идет подсчет голосов, давайте, если у кого-то есть замечания, по проектам заключений.

(Проходит обсуждение проекта заключения совета. Бовин Н.В. и Лебедев Ю.Б. предлагают внести небольшие коррективы в некоторые формулировки. С учетом этого диссертационный совет единогласно принимает заключение.)

Ефремов Р.Г.:

Владимир Александрович, огласите пожалуйста результаты голосования тайного.

Олейников В.А.:

Счетная комиссия выполнила свою работу. Защита Сапожниковой Ксении Андреевны на соискание степени кандидата химических наук. Присутствовало на заседании - 20 членов диссертационного совета, роздано - 20 бюллетеней, оказалось в урне - 20 бюллетеней, «за» - 20, «против» и не действительных нет.

(Проходит утверждение результатов работы счетной комиссии. Результаты работы счетной комиссии утверждены единогласно)

Ефремов Р.Г.:

Спасибо! Поздравляем! Спасибо всем присутствующим! Заседание объявляю закрытым.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.- м.н. Р.Г. Ефремов

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.- м.н. В.А. Олейников

