

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН),
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 14 июня 2023 г. №17

О присуждении **Сапожниковой Ксении Андреевне** ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических конъюгатов антител» по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия принята к защите 12 апреля 2023 г. (протокол № 12) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), (адрес: ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997), действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Сапожникова Ксения Андреевна, 25 апреля 1994 года рождения. В 2016 году соискатель окончила бакалавриат Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева" по специальности «химическая технология», в 2018 году магистратуру с отличием Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева" по специальности «химическая технология», в 2022 году окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по направлению подготовки «химические науки». В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярного дизайна и синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярного дизайна и синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель - доктор химических наук Коршун Владимир Аркадьевич, заведующий лабораторией молекулярного дизайна и синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Жердев Анатолий Виталиевич, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории иммунобиохимии Федерального исследовательского центра

«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, и **Крылов Вадим Борисович**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, заведующий Лабораторией синтетических гликовакцин Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН) дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук в своем **положительном** отзыве, подписанном ведущим научным сотрудником, кандидатом химических наук, руководителем лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот Чудиновым Александром Васильевичем, и утвержденном Георгиевой Софией Георгиевной, акад. РАН, д.б.н., директором ИМБ РАН, указала, что диссертация Сапожникова Ксении Андреевны «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 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 – биорганическая химия.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 5 работ, из них 5 работ общим объемом 8 печ.л в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы SCOPUS и Web of Science. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы, в которые Сапожникова К.А. внесла основной или существенный вклад:

1. **Sapozhnikova K.A.***, Gulyak E.L.*, Brylev V.A., Misyurin V.A., Oreshkov S.D., Alexeeva A.V., Ryazantsev D.Y., Simonova M.A., Ryabukhina E.V., Popova G.P., Tikhonova N.A., Lyzhko N.A., Barmashov A.E., Misyurin A.V., Ustinov A.V., Alferova V.A., Korshun V.A. Aminoxy click modification of a periodate-oxidized immunoglobulin G: a general approach to antibody–drug conjugates with dye-mediated expeditious stoichiometry control. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (6), 5134 (2023).

2. **Sapozhnikova K.A.***, Gulyak E.L.*, Misyurin V.A., Simonova M.A., Ryabukhina E.V., Alexeeva A.V., Tikhonova N.A., Lyzhko N.A., Popova G.P., Misyurin A.V., Ustinov A.V., Korshun V.A., Alferova V.A., Ryazantsev D.Y., Brylev V.A. Branched linkers for site-specific fluorescent labeling of antibodies. *Molecules*, **28** (1), 425 (2023).

3. **Sapozhnikova K.A.**, Misyurin A.V., Ryazantsev D.Y., Kokin E.A., Finashutina Y.P., Alexeeva A.V., Ivanov I.A., Kocharovskaya M.V., Tikhonova N.A., Popova G.P., Alferova V.A., Ustinov A.V., Korshun V.A., Brylev V.A. Sensitive immunofluorescent detection of the PRAME antigen using a practical antibody conjugation approach. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (23), 12845 (2021).

4. **Сапожникова К.А.**, Мисюрин А.В., Пестов Н.Б., Мелешкина Е.Г., Орешков С.Д., Ганжула Е.П., Михайлова А.С., Коршун В.А., Мисюрин В.А., Брылёв В.А. Детекция белка PRAME на поверхности клеток меланомы с помощью флуоресцентно меченого моноклонального антитела. *Биоорганическая химия*, **47** (6), 775–784 (2021).

5. **Sapozhnikova K.A.**, Slesarchuk N.A., Orlov A.A., Khvatov E.V., Radchenko E.V., Chistov A.A., Ustinov A.V., Palyulin V.A., Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Korshun V.A.,

Brylev V.A. Ramified derivatives of 5-(perylene-3-ylethynyl) uracil-1-acetic acid and their antiviral properties. *RSC Adv.*, 9 (45), 26014–26023 (2019). *авторы внесли равный вклад в работу.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н. Жердева Анатолия Виталиевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1. В литературном обзоре оценка существующего разнообразия подходов модификации антител 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. Такая последовательность изложения не является оптимальной. Следовало более аргументированно оценить исследования предшественников и с учетом ограничений полученных ими результатов обосновать выбор предложенного в диссертации подхода.

2. 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 переменных 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 переменных участках данного антитела.

3. Для введения в белковые молекулы красителя Cyanine3 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.

4. 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.

Отзыв официального оппонента к.х.н. Крылова Вадима Борисовича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1) В экспериментальной части (раздел Материалы и Методы) следовало бы кратко добавить информацию об использованном в работе антителе 6H8: 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 антителе?

2) В экспериментальной части диссертационной работы не приводятся аналитические данные для высокомолекулярных конъюгатов антител. Возможно, следовало бы дополнительно охарактеризовать полученные конъюгаты методами высокоэффективной гельпроникающей хроматографии и/или гель-электрофорезом (PAGE) для подтверждения отсутствия агрегации и кросс-сшивки белка.

3) 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?

4) Возможно ли взаимодействие альдегидных групп, полученных при периодатном окислении гликанов антител, с аминокруппами лизинов. Насколько устойчиво окисленное антитело во время выделения на геле?

5) N-Этоксипропилиден-защищенные 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, присутствуют стилистические неточности.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

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.

Имеются небольшие редакторские замечания.

Отзыв на автореферат профессора кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т., Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», доктора биологических наук, **Калининой Елены Валентиновны**. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Отзыв на автореферат д.м.н., заведующего Лабораторией биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, **Покровского Вадима Сергеевича**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

принципиальных замечаний по оформлению автореферата нет, однако есть замечание 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 MMAE было бы желательно снизить концентрации, изученные на культурах клеток Me1-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.

Отзыв на автореферат к.х.н., научного сотрудника кафедры органической химии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», **Мачулкина Алексея Эдуардовича**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

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. 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.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области биоорганической, близкой к тематике работы, которые подтверждены серией их публикаций в ведущих российских и международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы и высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании в результате выполненных соискателем исследований был предложен ряд новых подходов к синтезу конъюгатов антител с флуоресцентными красителями и противоопухолевыми агентами. В частности, впервые показана возможность конъюгации антител с полезной нагрузкой методом оксимного лигирования со снятием защитной группы гидросиламина *in situ*. Также синтезированы новые разветвленные линкеры для получения флуоресцентных конъюгатов антител с повышенной яркостью. Получены оригинальные конъюгаты антитело-лекарство, содержащие в структуре линкера флуоресцентный краситель для контроля стехиометрии; этот подход впервые был применен для синтеза цитотоксических конъюгатов, нацеленных на опухоль-ассоциированный антиген PRAME. Впервые показано, что антиген PRAME перспективен в качестве мишени для создания терапевтических конъюгатов антител.

Теоретическая значимость исследования заключается в следующем: предложен новый подход к мечению окисленных периодатом антител с помощью оксимного лигирования со снятием удалением этоксиэтилиденовой защитной группы с оксиамина *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 доксорубин и монометилауристин Е. Предложен способ контроля стехиометрии конъюгата с помощью флуоресцентного красителя, встроенного в линкер. Показана перспективность белка PRAME в качестве мишени для создания диагностических и терапевтических конъюгатов антител.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики 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 степенью модификации красителя красителем, обладающими повышенной яркостью флуоресценции. Впервые показана возможность создания получения терапевтических конъюгатов антитело-препарат, нацеленных на опухоль-ассоциированный антиген PRAME, для лечения онкологических заболеваний.

Достоверность результатов исследования обеспечивается применением в исследованиях набора современных научных методов. Доказательство структур синтезированных соединений проводилось с помощью полного набора физико-химических методов исследования (одномерная и двухмерная ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения), экспериментальная часть содержит подробное описание всех методов, в приложениях приведены спектры ЯМР для всех новых веществ. Обоснованность выводов диссертации базируется на анализе и обобщении результатов проведенных экспериментов и данных литературных источников по разрабатываемым проблемам, выводы диссертации отвечают поставленной цели и задачам исследования.

Личный вклад соискателя состоит в участии на всех этапах исследовательского процесса, непосредственном участии в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования, получении исходных данных и разработке методов выделения изучаемых соединений, обработке и интерпретации экспериментальных данных, личном участии в апробации результатов работы на научных конгрессах и конференциях, подготовке основных публикаций по теме работы. Экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии, за исключением регистрации спектров ЯМР (Корнилов Ф.Д., лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН) и масс-спектров (Зиганшин Р.Х., группа масс-спектрометрии ИБХ РАН), а также проведения экспериментов по проточной цитометрии, иммуноферментному анализу и определению цитотоксичности конъюгатов антитело-препарат *in vitro* (Рязанцев Д.Ю., Рябухина Е.В., Симонова В.А., ИБХ РАН, Мисюрин В.А. Бармашов А.Е. Финашутина Ю.П., НМИЦ онкоцентр им. Блохина, Алексеева А.В. Тихонова Н.А., Лыжко Н.А., Мисюрин А.В., ООО «Генотехнология»).

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. Насколько точно можно быть уверенным в том, что цитотоксический препарат ММАЕ в составе линкера не присутствует в свободном виде в препарате и не оказывает токсического действия на клетки?
2. Какие молекулярные массы у линкеров с флуоресцентными красителями и цитотоксическими препаратами? Возможно ли с помощью электрофореза определить степень мечения антитела?
3. Каковы размеры антитела и линкеры? Пытались ли вы представить их с помощью 3D модели, чтобы понять, не будет ли линкер негативно влиять на свойства антитела?
4. Как измерялась степень мечения? Насколько она была точной? Как учитывались разнообразные эффекты при взаимодействии антитела и красителя, а также другого красителя?
5. Возможно ли применение в клинической практике гетерогенных конъюгатов антител с цитотоксическим препаратом?
6. В чем состоит новизна работы? Это новый опухолевый антиген как мишень для конъюгатов или что-то иное?

Соискатель Сапожникова К.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1. О специфичности действия конъюгатов антител с монометилауристатином E на клеточные линии, экспрессирующие на мембране белок PRAME, можно судить по результатам тестов МТТ. В ходе экспериментов на PRAME-положительных клеточных линиях наблюдалось значительное снижение жизнеспособности клеток (IC_{50} около 49 нМ), в то время как на PRAME-отрицательной клеточной линии не наблюдалось снижения жизнеспособности. Это свидетельствует о селективном действии именно конъюгатов антител, а не примеси свободного линкера с цитотоксическим препаратом.
2. Молекулярные массы флуоресцентных красителей варьируются в интервале 400-800 Да, что является недостаточно большой массой для определения мечения с помощью электрофореза. Однако линкеры для получения терапевтических конъюгатов антител, содержащие флуоресцентный краситель, расщепляемый фрагмент и цитотоксический препарат ММАЕ, имеют молекулярную массу порядка 1000-2000 Да. При конъюгации с антителом таких линкеров можно увидеть мечение с помощью электрофореза.
3. Мы не делали 3D моделирование. Антитело представляет собой белок массой 150 кДа с характерным размером 10 нм, в то время как линкеры имеют значительно меньшую массу и размеры, 1-2 кДа, флуоресцентные красители – сотни Да. Кроме того, гликаны антитела находятся между двумя тяжелыми цепями антитела, удалены от центра связывания антигена. Исходя из всего вышперечисленного, предполагается, что модификация не будет оказывать значительного влияния на структуру антитела и его свойства.
4. Степень мечения конъюгатов измерялась с помощью спектрофотометрии, путем вычисления соотношения поглощения антитела и красителя на соответствующих длинах волн, с учетом коэффициентов коррекции. Для учета различных эффектов, связанных с взаимодействием флуорофора и поверхности антитела, а также взаимодействием двух

различных флуорофоров (сульфо-цианин 3 и сульфо-цианин 5), были синтезированы модельные конъюгаты: низкомолекулярный (сульфо-цианин 3 и сульфо-цианин 5), а также антитело, меченное сульфо-цианином 3 и сульфо-цианином 5.

5. Да, возможно, так как все одобренные FDA к применению в клинике терапевтические конъюгаты антител получены с использованием статистического мечения по лизинам или цистеинам.

6. Главной новизной работы является использование периодатного окисления для синтеза конъюгатов антитело-препарат. До настоящей работы существовала лишь одна публикация, использующая данный подход. Так же новизной является использование в качестве мишени белка PRAME.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Сапожниковой К.А. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой имеют важное значение для развития биорганической химии, биохимии и биомедицины. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Сапожниковой Ксении Андреевны «Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических конъюгатов антител», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. – биорганическая химия, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690).

На заседании 14 июня 2023 г. диссертационный совет принял решение за разработку новых подходов к синтезу флуоресцентных конъюгатов антител и противоопухолевых конъюгатов антитело-препарат присудить Сапожниковой Ксении Андреевне ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 5 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9. – Биорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя
диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н.

14 июня 2023 г.



Ефремов Роман Гербертович

Олейников Владимир Александрович