

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Сапожникова Ксения Андреевна

**Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных
и терапевтических конъюгатов антител**

Специальность 1.4.9 - биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель
д.х.н. Владимир Аркадьевич Коршун

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава.1. ОКСИМНОЕ ЛИГИРОВАНИЕ КАК МЕТОД БИОКОНЪЮГАЦИИ. ВВЕДЕНИЕ КАРБОНИЛЬНЫХ ГРУПП В АНТИТЕЛА И ИХ МОДИФИКАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ОКСИМНОГО ЛИГИРОВАНИЯ. (Обзор литературы).....	9
1.1. Биоконъюгация и основные биоортогональные реакции	9
1.2. Оксимное лигирование.....	10
1.3. Катализ оксимного лигирования	12
1.4. Моноклональные антитела и ADC	13
1.5. Методы введения карбонильной группы в антитело	25
1.5.1.Периодатное окисление.....	25
1.5.2.Окисление N-концевых аминокислот	37
1.5.3.Трансаминирование N-концевых аминокислот	38
1.5.4.Ремоделинг гликанов.....	39
1.5.5.Удаление гликанов и лигирование с помощью микробной трансглутаминазы	42
1.5.6.Встраивание аминокислот с биоортогональными функциональными группами....	44
1.5.7.Модификация олигосахаридов	47
1.5.8.Генно-инженерные ферменты	50
1.6. Модификация антител по карбонильным группам	50
Глава 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	54
2.1. Мечение антител флуоресцентными красителями.....	56
2.2. Терапевтические конъюгаты антител.....	81
Глава 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	95
ВЫВОДЫ	129
БЛАГОДАРНОСТИ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131
ПРИЛОЖЕНИЕ	155

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ADCC	– антителозависимая клеточная цитотоксичность (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
ADC	– конъюгат антитела с лекарством (antibody-drug conjugate)
AlfC	– α -L-фукозидаза (α -fucosidase)
BTGase	– бактериальная трансглутаминаза (bacterial transglutaminase)
CDC	– комплементзависимая цитотоксичность (complement-dependent cytotoxicity)
CuAAC	– медь-катализируемое циклоприсоединение азидов и алкинов
DAR	– мольное соотношение лекарства и антитела в конъюгате (drug-antibody ratio)
DCM	– дихлорметан (dichloromethane)
DMC	– 2-хлор-1,3-диметилимидазолия хлорид (1,3-dimethylimidazolium chloride)
DMF	– диметилформамид (dimethylformamide)
DMSO	– диметилсульфоксид (dimethyl sulfoxide)
DOL	– мольное соотношение красителя и антитела в конъюгате (degree of labeling)
Endo-M	– эндогликозидаза M (endoglycosidase M)
Endo-S	– эндогликозидаза S (endoglycosidase S)
EtOAc	– этилацетат (ethyl acetate)
Fc	– концевая часть молекулы иммуноглобулина (fragment crystallizable region)
FDA	– Food and Drug Administration
FGE	– фермент, превращающий цистеин в формилглицин (formylglycine-generating enzyme)
FTase	– фарнезилтрансфераза (farnesyltransferase)
GalA	– β 1,4-галактозидаза (β 1,4-galactosidase)
GalT	– β 1,4-галактозилтрансфераза (β 1,4-galactosyltransferase)
GKPP	– геранилкетон пирофосфат (geranyl ketone pyrophosphate)
GOase	– галактозооксидаза (galactose oxidase)
GlcNAc	– N-ацетилглюкозамин (N-acetylglucosamine)
IEDDA	– реакция Дильса-Альдера с обращёнными электронными требованиями (inverse electron-demand Diels–Alder reaction)
mAbs	– моноклональные антитела (monoclonal antibodies)
MMAE	– монометилауристатин E (monomethyl auristatin E)
MMAF	– монометилауристатин F (monomethyl auristatin F)
MTGase	– микробная трансглутаминаза (microbial transglutaminase)
NHS	– N-гидроксисукцинимид (N-Hydroxysuccinimide)

pAcF	– <i>p</i> -acetylphenylalanine (<i>p</i> -ацетилфенилаланин)
PAMAM	– полиамидоамин (poly(amidoamine))
PBS	– натрий-фосфатный буфер (phosphate-buffered saline)
PLP	– пиридоксаль-5-фосфат
PNGase F	– пептид-N-гликозидаза F (peptide-N-glycosidase F)
PSMA	– простатический специфический мембранный антиген (prostate-specific membrane antigen)
SialT	– α 2,6-сиалилтрансфераза (α 2,6-sialyltransferase)
СПААС	– циклоприсоединение азидов и алкинов, промотируемое напряжением (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition)
ТЕМРО	– (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил
TGase	– трансклутаминаза (transglutaminase)
THF	– тетрагидрофуран (tetrahydrofuran)
UAAs	– неприродные аминокислоты (unnatural amino acids)
WT	– дикий тип (wild type)
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	– иммуноферментный анализ
мРНК	– матричная РНК
ПЭГ	– полиэтиленгликоль
ПЭТ	– позитронная эмиссионная томография
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
тРНК	– транспортная РНК

ВВЕДЕНИЕ

Конъюгаты биомолекул являются мощными инструментами исследования в молекулярной биологии, а также терапевтическими агентами. Для их получения используют разнообразные реакции из арсенала органической химии. Модификация биомолекул осуществляется по определённым функциональным группам. Ключевая реакция сборки конъюгата должна протекать с высоким выходом в водных растворах при физиологической температуре и не должна затрагивать остальные функциональные группы в составе ковалентно соединяемых биомолекул. На рубеже веков были сформулированы требования к таким реакциям, и с тех пор ведётся поиск новых «биоортогональных» реакций и усовершенствование известных методов.

Википедия даёт разумное определение биоконъюгации: «bioconjugation is a chemical strategy to form a stable covalent link between two molecules, at least one of which is a biomolecule».¹ Соответственно, биоконъюгатами можно считать продукты такой стратегии. Что касается определения биомолекулы, то, несмотря на интуитивную понятность, здесь едва ли возможно провести чёткие границы. В широкой трактовке к биомолекулам можно отнести не только индивидуальные органические молекулы, продуцируемые живыми организмами, но и различные биополимеры и супрамолекулярные комплексы. К биомолекулам относят и синтетические аналоги биополимеров, например, олигонуклеотиды. Иногда биомолекулами называют даже синтетические молекулы с выраженной биологической активностью, особенно специфические ингибиторы ферментов.

Разнообразие биоконъюгатов весьма велико; примерами биоконъюгатов являются флуоресцентно меченные биомолекулы (олигонуклеотиды, белки и пептиды, липиды, углеводы, гормоны, токсины), радиотрейсеры (например, для ПЭТ), ПЭГилированные белки, конъюгаты биомолекул с металлохелатами и фотосенсибилизаторами, олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты (строительные блоки для ДНК-наноструктур), антитело-ферментные конъюгаты для ИФА, конъюгаты антитело-ДНК для иммуно-ПЦР, конъюгаты антител с противоопухолевыми агентами (ADC) для иммунотерапии онкологических заболеваний и др. Важнейшей областью применения биоконъюгации является получение вакцин. С помощью биоконъюгатов решают задачи детекции/имиджинга/диагностики, доставки, терапии и контролируемого высвобождения терапевтического препарата.

Наряду с используемыми для сборки конъюгатов биоортогональными реакциями, большое значение имеет линкер, с помощью которого соединяются друг с другом части

конъюгата. В зависимости от типа биоконъюгата и области его использования, к линкеру предъявляются различные требования. В большинстве случаев необходимо, чтобы линкер был гидрофильным, гибким, достаточно протяжённым и не нарушал функциональность соединяемых им молекул. В идеале линкер должен облегчать характеристику конъюгата. Функциональные группы, образующиеся в результате биоортогональных реакций сборки конъюгата, входят в состав линкера. Поэтому проблемы выбора ключевой реакции синтеза биоконъюгата и выбора линкера решают в связи друг с другом.

Областью данного исследования является разработка новых и усовершенствованных линкеров для получения диагностических и терапевтических конъюгатов антител. Из биоортогональных реакций основное место отводится так называемому оксимному лигированию, особенности которого обсуждаются в обзоре литературы.

Основной моделью для применения разрабатываемых линкеров являлось получение флуоресцентных диагностических конъюгатов антител, а также конъюгатов антител с лекарствами (упомянутые выше ADC). Практическое значение разработки ADC-препаратов исключительно велико, поскольку с ними сейчас связаны большие надежды в области терапии онкологических заболеваний. Едва ли следует говорить о важности проблемы борьбы с онкологическими заболеваниями, являющимися в настоящее время одной из основных причин смертности населения планеты.

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 протяжённым и биоразлагаемым; внутри клетки должно происходить высвобождение антибиотика. В работе 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 N-защищённым O-замещённым гидроксиламином. Подход использован также для флуоресцентного мечения антител, которые далее могут применяться в диагностике; например, опухолевых антигенов. Полученные линкеры и стратегии мечения успешно применены к уникальному моноклональному антителу к мембранной форме белка PRAME, которая экспрессируется многими видами опухолевых клеток.

Таким образом, целью работы является разработка линкерных реагентов для модификации антител. Для достижения поставленной цели предполагается решение следующих задач:

1. Дизайн и синтез бифункциональных и полифункциональных линкеров на основе олигоэтиленгликолей и пентаэритрита, в т.ч. содержащих хромофорный/флуоресцентный фрагмент для контроля стехиометрии конъюгации.
2. Отработка методики модификации антител с помощью бифункциональных линкеров посредством реакций оксимного лигирования, медь-катализируемого и некатализируемого (спонтанного) азид-алкинового циклоприсоединения на примере получения флуоресцентно меченых антител.
3. Разработка подходов к синтезу терапевтических конъюгатов антител с помощью полифункциональных линкеров и биоортогональных реакций.

Поскольку основным содержанием работы является сайт-специфическая модификация антител флуоресцентными красителями и цитотоксическим агентом с помощью улучшенного варианта оксимного лигирования, в литературном обзоре рассмотрено приложение метода оксимного лигирования для модификации антител в том варианте, когда карбонильная группа тем или иным способом генерируется на антителе.

Работа выполнена в Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) при взаимодействии с коллегами из других подразделений Института, а также с коллегами из Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина и ООО «Генотехнология».

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Основные результаты получены лично автором или при его непосредственном участии под руководством д.х.н зав. лаб. молекулярного дизайна и синтеза Коршуна В.А. Личный вклад автора в представленной работе заключается в непосредственном участии в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертационной работы. Автор разрабатывал линкеры и методы их синтеза, нарабатывал вещества для изучения их физико-химических характеристик и установления структуры, анализировал данные по физико-химическим характеристикам веществ (интерпретировал масс-спектры, спектры ЯМР), проводил конъюгацию полученных линкерных молекул с антителами, обосновывал полученные результаты, а также участвовал в написании и

подготовке к публикации статей и тезисов докладов на научных конференциях по результатам исследования. Кроме того, в работе были использованы экспериментальные данные, полученные в других лабораториях и в рамках научного сотрудничества с другими организациями: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (В.А. Мисюрин, А.Е. Бармашов, Ю.П. Финашутина), ООО «Генотехнология» (А.В. Алексеева, Н.А. Тихонова, Н.А. Лыжко, А.В. Мисюрин), ИБХ РАН (Д.Ю. Рязанцев, Е.В. Рябухина, М.А. Симонова).

Список статей, опубликованных в рецензируемых журналах по теме диссертации:

1. Sapozhnikova K.A., Gulyak E.L., Brylev V.A., Misyurin V.A., Oreshkov S.D., Alexeeva A.V., Ryazantsev D. Yu., 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. Aminooxy 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) <https://doi.org/10.3390/ijms24065134>

2. Sapozhnikova K.A., Gulyak E.L., Misyurin A.V., 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. Yu. and Brylev V.A. Branched linkers for site-specific fluorescent labeling of antibodies. *Molecules*, 28 (1), 425 (2023) <https://doi.org/10.3390/molecules28010425>

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) <https://doi.org/10.3390/ijms222312845>

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. *Биоорг. химия*, 47 (6), 775–784 (2021) <https://doi.org/10.31857/S013234232105033X>

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) <https://doi.org/10.1039/C9RA06313G>

Глава 1

ОКСИМНОЕ ЛИГИРОВАНИЕ КАК МЕТОД БИОКОНЬЮГАЦИИ.

ВВЕДЕНИЕ КАРБОНИЛЬНЫХ ГРУПП В АНТИТЕЛА И ИХ МОДИФИКАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ОКСИМНОГО ЛИГИРОВАНИЯ

(Обзор литературы)

1.1. Биоконъюгация и основные биоортогональные реакции

Для получения биоконъюгатов используют разнообразные реакции из арсенала органической химии. Модификация биомолекул должна осуществляться по определённым функциональным группам. Ключевая реакция сборки конъюгата должна протекать с высоким выходом в водных растворах при «физиологической» температуре и не должна затрагивать остальные функциональные группы в составе биомолекул или биополимеров. Концепция таких реакций была сформулирована Каролин Бертоцци в начале 2000-х гг на примере модифицированной реакции Штаудингера, в которой образующийся из триарилфосфина и алифатического азида фосфазеновый аддукт реагирует с соседней карбоксиметильной группой, давая амидную связь (Схема 1).^{2,3}

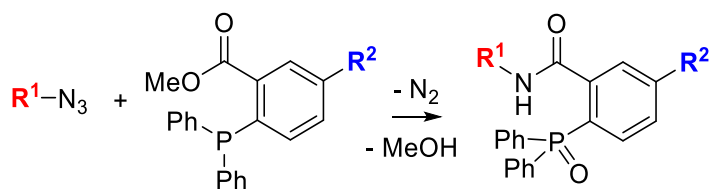


Схема 1. Биоконъюгация с помощью реакции Штаудингера

Вскоре речь пошла о «биоортогональных» функциональных группах,^{4,5} а затем и «биоортогональных» реакциях.⁶ В дальнейшем был разработан целый арсенал таких методов, которые подробно рассмотрены как в ряде монографий по биоконъюгации,^{7–11} так и многочисленных обзорах. Области биоконъюгации посвящены периодические издания *Glycoconjugate Journal* (Springer, с 1984 г.) и *Bioconjugate Chemistry* (ACS, с 1990 г.).

Среди наиболее важных биоортогональных реакций можно назвать тиол-малеимидную реакцию, «бесследное лигирование Штаудингера–Бертоцци»,^{12–16} медь-катализируемую реакцию терминальных алкинов и азидов, CuAAC (copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition),^{17–19} реакцию циклооктинов с азидами, SPAAC (strain-promoted alkyne-azide cycloaddition),^{20–23} реакцию тетразинов с транс-циклооктенами и циклопропенами, IEDDA (inverse electron-demand Diels–Alder),^{24–27} «оксимное лигирование»^{28,29} (Схема 2). Постоянно разрабатываются всё новые биоортогональные

реакции (например, биоконъюгация с помощью реакции Пикте-Шпенглера),³⁰ но лишь со временем становится понятно, какие из них окажутся наиболее удобны для практического применения.

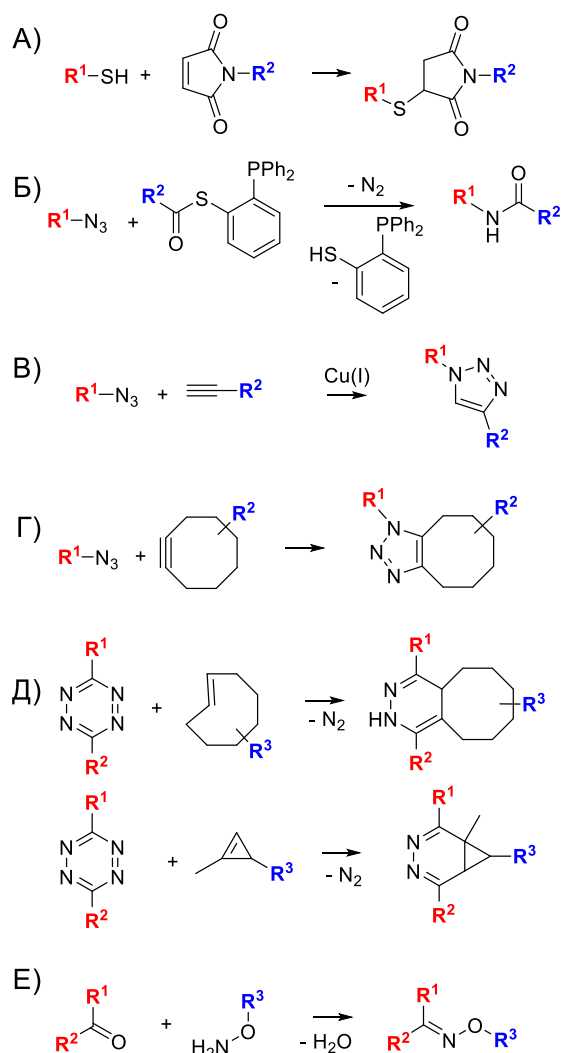


Схема 2. Наиболее популярные биоортогональные реакции. (А) тиол-малеимидная реакция; (Б) бесследное лигирование Штаудингера–Бертоцци; (В) CuAAC; (Г) SPAAC; (Д) IEDDA с *транс*-циклооктенами и циклопропенами; (Е) оксимное лигирование

Биоортогональность – не абсолютное понятие; например, некоторые биомолекулы содержат тиольные, карбонильные и терминальные алкиновые группы, поэтому для них тиол-малеимидная реакция, оксимное лигирование и CuAAC, соответственно, нельзя назвать биоортогональными реакциями. С другой стороны, для некоторых биомолекул даже реакция ацилирования аминогруппы активированным эфиром карбоновой кислоты будет биоортогональным процессом.

1.2. Оксимное лигирование

Оксимное лигирование (Схема 2 Е) – образование основания Шиффа при реакции карбонильных соединений (альдегидов и кетонов) с гидроксиламинами. Такие основания

Шиффа называются оксимами. Для биоконъюгации используют *O*-алкил- или, реже, *O*-арилгидроксиламины. Гидролитическая стабильность оксимов из таких гидроксиламинов превосходит стабильность гидразонов, что объясняют их повышенной устойчивостью к протонированию.³¹ Различные аспекты применения оксимного лигирования для биоконъюгации, особенно вопросы механизма и катализа, рассмотрены в объёмном критическом обзоре 2017 г.²⁸ Значение метода можно проиллюстрировать заключительным предложением из аннотации этого обзора: «хотя образование гидразонов и оксимов традиционно считалось медленной реакцией, разработки последних 5 лет позволили полностью преодолеть это ограничение; в самом деле, этот метод в настоящее время является одной из самых быстрых и универсальных реакций, доступных для конъюгации биомолекул и биоматериалов». Прошедшие с 2017 г. следующие 5 лет подтверждают справедливость оптимизма приведённой цитаты.

Реакция протекает с общим кислотным катализом (Схема 3). Атака карбонильной группы сильным нуклеофилом происходит быстро и не является скоростью-лимитирующей. При значениях $3 < \text{pH} < 7$ катализируемая кислотой дегидратация тетраэдрического интермедиата является скоростью-лимитирующей стадией. В то же время, в сильноокислой среде ($\text{pH} < 3$) реакция снова замедляется из-за смещения равновесия в сторону протонированной формы (Схема 3)²⁸. Для того чтобы эффективно ускорить реакцию образования оксима необходимо найти оптимальное значение pH, которое позволит эффективно катализировать дегидратацию гемаминаля и при этом не приводить к образованию нереакционноспособных протонированных форм нуклеофила. Наиболее эффективное типичное значение pH 4.5. Это затрудняет использование этого метода лигирования в живых системах, так как обычно pH таких сред является нейтральным, а концентрации реагирующих молекул низким.²⁸

Химическая стабильность оксимов обусловлена стерическими и электронными факторами. Конъюгаты, полученные с помощью кетонов, более стабильны, чем с помощью альдегидов. Константы равновесия оксимов в среднем более 10^8 M^{-1} . Константа гидролиза оксимов меньше в 160 раз, чем константа гидролиза гидразонов. Термодинамическая стабильность оксимов возрастает в следующем порядке: ацетон < циклогексанон < фурфурол < бензальдегид < пировиноградная кислота.²⁸

Среди недавних примеров применения оксимного лигирования можно упомянуть флуоресцентное мечение ганглиозидов,³² белков нуклеопоринов,³³ дериватизацию углеводов для масс-спектрометрии,^{34,35} циклизацию пептидов,³⁶ синтез конъюгатов маннана,³⁷ гонадолиберина,³⁸ декстранов,³⁹ рецептора васкулярного эндотелиального фактора роста,⁴⁰ олигосахарид-липидных конъюгатов,⁴¹ углевод-углеводных

конъюгатов,^{42,43} пептид-пептидных конъюгатов,⁴⁴ конъюгатов 5-[¹⁸F]фтор-5-дезоксиглюкозы с пептидами,⁴⁵ конъюгатов даунорубицина с пептидами,⁴⁶ формирование модели липидной мембраны из водорастворимых предшественников.⁴⁷ Применение оксимного лигирования для модификации антител будет рассмотрено ниже.

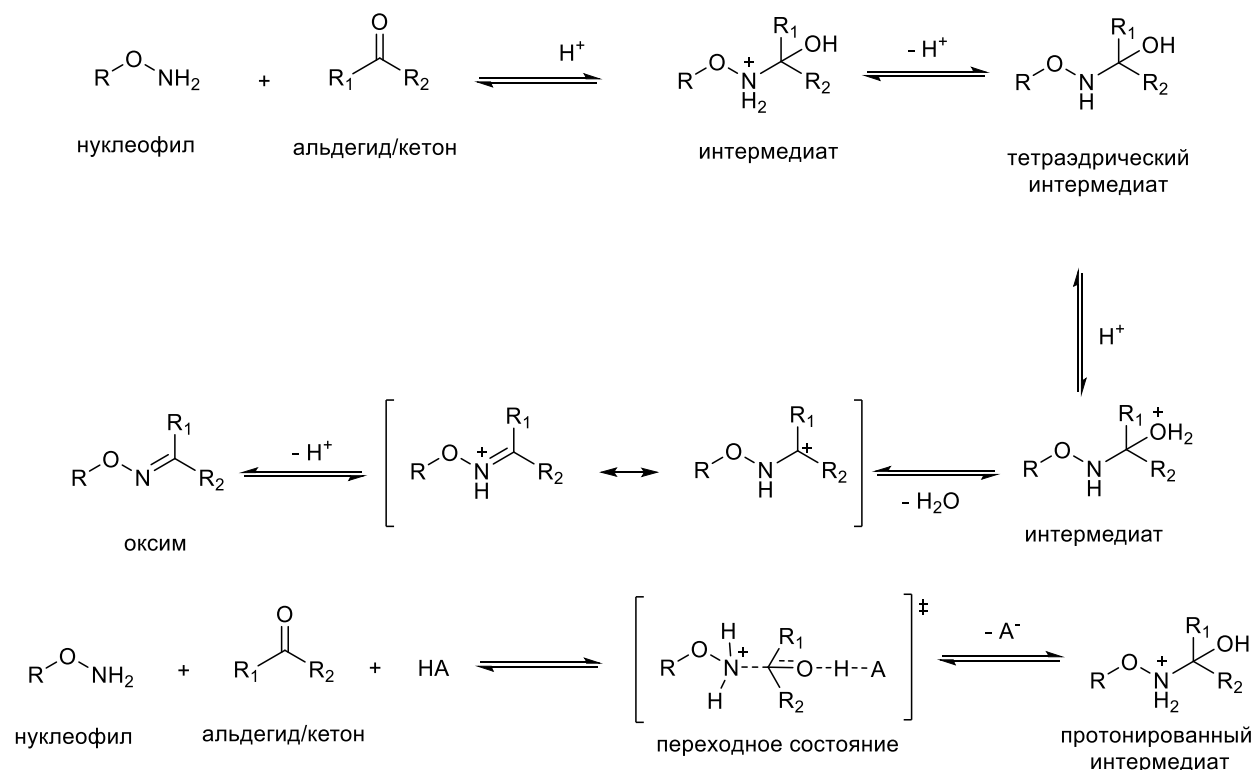


Схема 3. Стандартный механизм образования оксима из карбонильного соединения и алкоксиамина и предполагаемое переходное состояние, приводящее к образованию протонированного интермедиата

1.3. Катализ оксимного лигирования

Образование оксимов протекает с приемлемой скоростью в слабокислой среде (pH 4–5), а при нейтральных значениях pH протекает довольно медленно. Поэтому общий кислотный катализ для этой реакции был известен давно, а затем был обнаружен нуклеофильный катализ анилином **8** (Рис. 1) и различными его производными.²⁸ После 2017 г. было выполнено несколько исследований по катализу оксимного лигирования.

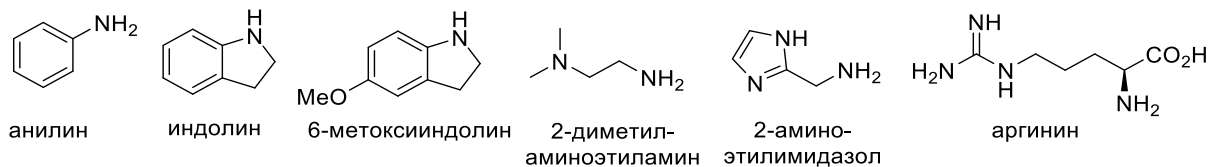


Рис. 1. Катализаторы для реакции оксимного лигирования

На модельной реакции 4-гидроксибензальдегида и ацетона с *o*-метилгидроксиламином в водном растворе было показано, что прибавление в раствор 3М

NaCl увеличивает скорость реакции в несколько раз.⁴⁸ Положительный эффект также получен при катализе анилином (1 мМ). Применимость метода была продемонстрирована на живых клетках; клетки НТС116 30 мин обрабатывали 1 мМ периодатом в PBS при 4 °С, промывали, и проводили реакцию с оксиаминовым производным флуоресцеина в присутствии NaCl или/и анилина. Меченые клетки анализировали с помощью конфокального микроскопа. Метод применили также для получения клеток для анализа с помощью проточной цитометрии (процедура отличалась предварительным трипсинолизом поверхности клеток).

Недавно было показано, что индолин и 6-метоксииндолин (Рис. 1) являются более эффективными катализаторами образования оксима, чем анилин.⁴⁹ Другие исследователи обнаружили, что использование 2-диметиламиноэтиламина и 2-аминометилимидазола (Рис. 1) в буфере позволяет ускорить реакцию при pH 7 в 100 и более раз.⁵⁰ В модельной реакции бензальдегида с *O*-бензилгидроксиламином при pH 7.4 константа скорости второго порядка реакции в фосфатном буфере составляет $0.0213 \pm 0.0013 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, а в присутствии 2-диметиламиноэтиламина и 2-аминометилимидазола – 1.6 ± 0.2 и $2.9 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, соответственно. Эти амины обладают низкой токсичностью, поэтому такой катализ может применяться при проведении реакций на живых клетках. Амины сами по себе могут выступать буферными агентами. Предложен катализ оксимного лигирования в нейтральной среде аргинином (Рис. 1).⁵¹ Дополнительным достоинством аргининового катализа является предохранение белковых субстратов от агрегации.

1.4. Моноклональные антитела и ADC

Моноклональные антитела (monoclonal antibodies, mAbs) (Рис. 2) применяются для терапии обширного круга заболеваний⁵² (онкологические,⁵³ аутоиммунные,⁵⁴ инфекционные⁵⁵). Эти универсальные макромолекулы могут быть сконструированы аффинными к самым различным антигенам и проявлять разнообразные механизмы действия,⁵² оказывая мощный фармакологический эффект.

Концепция доставки цитотоксического агента к раковой клетке с помощью специфического антитела возникла давно, но в реальность воплотилась в 1990 г.: тогда были получены первые ковалентные конъюгаты опухоль-специфичных антител с цитотоксическими агентами – ADC (Рис. 3). Концепция оказалась весьма плодотворной и жизнеспособной; масштаб исследований в этой области постоянно нарастает. Кроме противоопухолевых, появились так же ADC против аутоиммунных заболеваний,^{56,57} противовирусные,⁵⁸ противомикробные,⁵⁹ противогрибковые⁶⁰ и даже

противопаразитарные.⁶¹ По ADC имеется ряд монографий⁶²⁻⁶⁷ и более сотни обзоров, из которых следует упомянуть наиболее важные.⁶⁸⁻⁸²

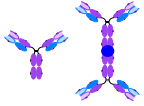
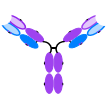
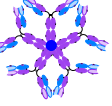
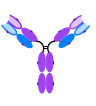
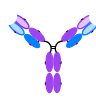
Новые разработки в области белковых дисплеев и генной инженерии расширили возможности модификации иммуноглобулинов для получения терапевтических моноклональных антител и ADC, в т.ч. увеличение аффинности к антигену, модулирование фармакокинетики, регулировка эффекторных свойств, подавление иммуногенности.⁶⁸ Главными подходами к контролю свойств иммуноглобулинов остаются инженерия аминокислотной последовательности и гликозилирования антитела, конструирование конъюгатов прочих биомолекул с IgG, в том числе с использованием линкеров, получение би- и мультивалентных антител. Зачастую внесение единственного изменения оказывает сильное влияние на свойства антитела. Поэтому дизайн потенциального терапевтического агента на основе иммуноглобулинов требует тщательного анализа всех структурных факторов.⁶⁸

Известны пять основных классов иммуноглобулинов млекопитающих: IgA, IgE, IgM, IgG и IgE.⁵² Иммуноглобулины А и G имеют дополнительные изотипы. Все они сильно отличаются друг от друга по структуре, функциям и локализации в организме (Таблица 1). Антитела класса IgG наиболее популярны для терапевтических целей и в частности для конструирования различных флуоресцентных и терапевтических конъюгатов, однако следует отметить, что предпринимались отдельные попытки получения конъюгатов IgM^{83,84} и других типов, но они не нашли широкого применения.⁸⁴

IgG представляют собой белковую молекулу массой около 150 кДа. Схематическая структура типичного полноразмерного моноклонального антитела класса IgG показана на рисунке 2. Иммуноглобулин G - это Y-образная белковая молекула размером около 10 нм и массой около 150 кДа, состоящая из четырех полипептидных цепей. Две более крупные цепи, состоящие из двух доменов примерно по 110 аминокислот каждый, называются тяжелыми цепями. В этих цепях каждый домен соединен с другим гибкой полипептидной цепью, богатой цистеином и пролином – это так называемая петлевая область. Две тяжелые цепи соединены друг с другом в области петли межцепочечными дисульфидными связями (от 2 до 11, в зависимости от подтипа IgG), которые малодоступны для растворителя. Две легкие цепи, состоящие из одного домена, соединены с одним доменом тяжелых цепей аналогичными дисульфидными связями (обычно одна связь между одной тяжелой и одной легкой цепью во всех подтипах IgG), образуя так называемые Fab-фрагменты, которые непосредственно отвечают за связывание с антигеном. Важно отметить, что такая структура обеспечивает исключительную гибкость молекулы антитела, и её сохранение важно в

процессе модификации. Fab-области могут поворачиваться вокруг своей оси, отклоняться в разные стороны на значительный угол, изгибаться, растягиваться и сжиматься, чтобы достичь антигена. Таким образом, угол между Fab-областями модулирует доступность антигена в различных плоскостях пространства, и вмешательство в процесс модификации может снизить аффинность. То же самое относится и к Fc-фрагменту, но в отношении эффекторных свойств, т.е. взаимодействия с иммунной системой, что может быть менее важно при получении флуоресцентно меченых или терапевтических конъюгатов антитело-препарат, в которых антитело играет лишь роль доставки. Однако слишком грубое нарушение эффекторных свойств может закономерно приводить к быстрому удалению конъюгатов антител из кровотока, а также приводить к повышению иммуногенности, чего следует избегать при создании ADC.

Таблица 1. Основные свойства иммуноглобулинов человека

Структура									
	IgA	IgE	IgM	IgG	IgD				
М, кДа	320	200	900	150	180				
Гликозилирование, % от массы	10	12	12	3	13				
Локализация	Интра-васкулярная, выделения	Базофилы, тучные клетки слоны и носовой слизи	Интра-васкулярная	Интра-, экстра-васкулярная	Поверхность лимфоцитов				
Функции	Защита слизистой	Защита от паразитов	Первичный ответ	Вторичный ответ	Неизвестна				
Содержание, % от всех	15%	0.002%	10%	75%	0.2%				
Изотипы	IgA1	IgGA2	-	-	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	-
Распространенность	Плазма 80%	Секрет 35%	-	-	66%	23%	7%	4%	-
Проницаемость плаценты	-	-	-	-	+++	+	+	+-	-
Активация классического пути комплемента	-	-	-	++++	++	+	+++	-	-
Активация альтернативного пути комплемента	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Аффинность к тучным клеткам и базофилам	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
Связывание с Fc рецепторами макрофагов	+	+	+	+	+	-	+	+-	-
Длительность циркуляции в кровотоке, дни	4-7	2-3	5-6	21	21	7	21	2-3	

Условные обозначения: ++++ очень сильно; +++ сильно; ++ умеренно; + слабо; +- очень слабо; - нет. Красным выделена наиболее распространенная изоформа терапевтических моноклональных антител.

Иммуноглобулины G имеют четыре подтипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Подтип IgG1 остается наиболее популярным для разработки ADC благодаря отличной стабильности в кровотоке (~21 день, без агрегации) и способности подключать систему комплемента для усиления терапии. Подтип IgG2 менее эффективно запускает систему комплемента и менее стабилен, поскольку этот подтип может образовывать ковалентные димеры, которые вызывают последующую агрегацию. IgG3 неприменим из-за очень короткого периода полураспада в кровеносной системе (~7 дней). IgG4 может образовывать гибридные, биспецифические антитела, с неидентичными паратопами в их двух Fab-областях, путем обмена одной пары легких и тяжелых цепей с другим IgG4.

На рисунке 2 также показаны функциональные группы антител природного происхождения, доступные для модификации: это N-гликаны, боковые остатки лизинов и других аминокислот, дисульфидные связи. Последние делятся на интерцепочечные (межцепочечные), которые трудно модифицировать, и интрацепочечные, расположенные на поверхности молекулы антитела в количестве 12 штук во всех подтипах IgG. Значительные достижения в области ADC связаны именно с модификацией аминокислот иммуноглобулинов (например, конъюгация эфиров N-гидроксисукцинимиды (NHS-эфиры) по остаткам лизинов или малеимидная конъюгация по остаткам интрацепочечных цистеинов): по состоянию на 2022 год FDA (Food and Drug Administration, USA) одобрено 12 терапевтических конъюгатов моноклональных антител с лекарствами (antibody-drug conjugate, ADC), и все они получены именно упомянутыми методами (Рис. 3).⁸⁵

Однако вышеупомянутые классические подходы имеют существенные недостатки, к которым, например, относится высокая гетерогенность получаемых конъюгатов (Таблица 2) и потенциальное снижение аффинности антител в результате модификации аминогрупп лизина в антигенсвязывающем центре. Всё это объясняет интерес к разработке новых биоортогональных реакций и поиску более селективных и сайт-специфичных подходов к модификации антител. Среди структур ADC, которые были опубликованы и/или находятся в клинических испытаниях, есть и другие варианты модификации антител, в том числе полученные с использованием генной инженерии.

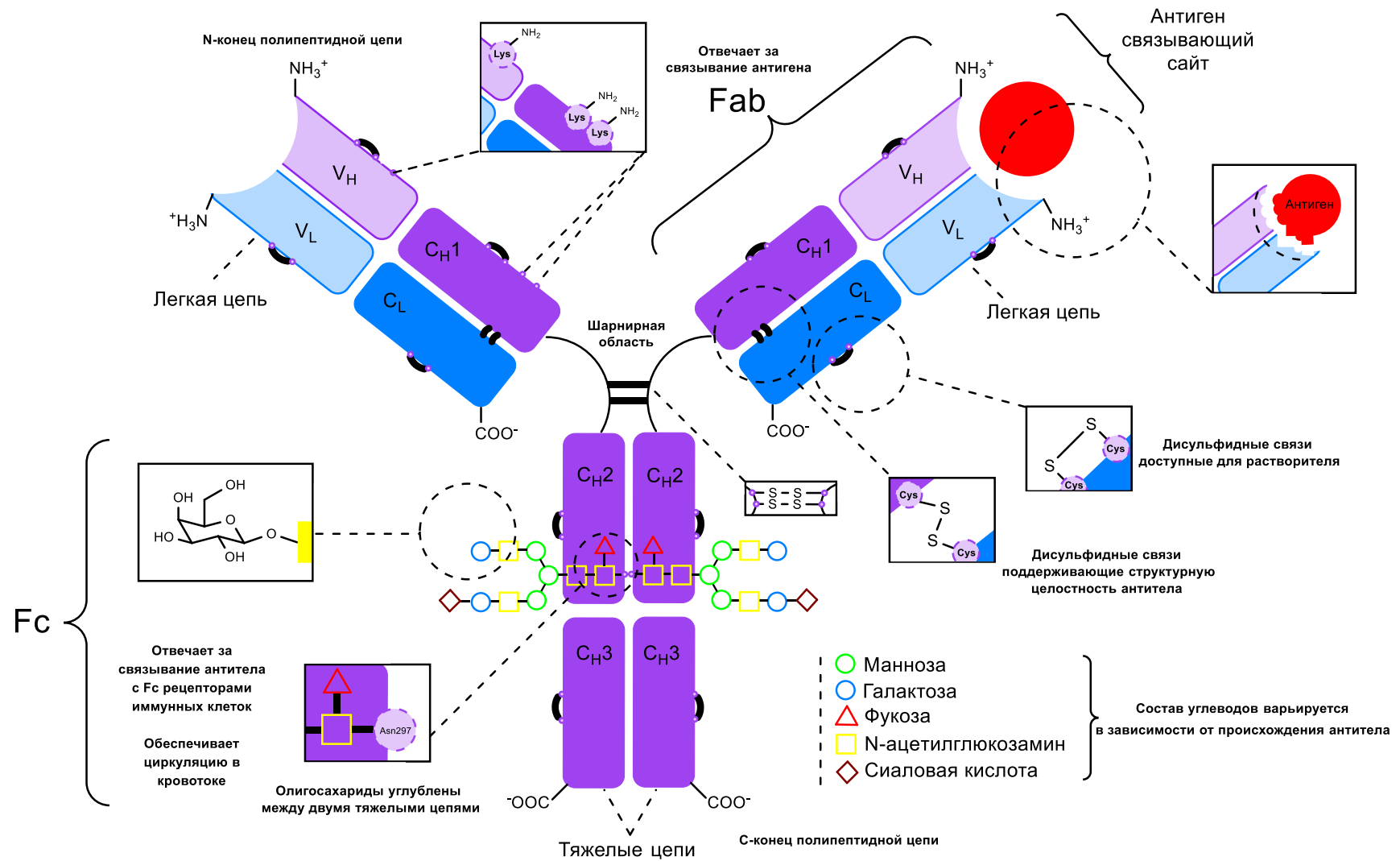


Рис. 2. Особенности строения иммуноглобулина G

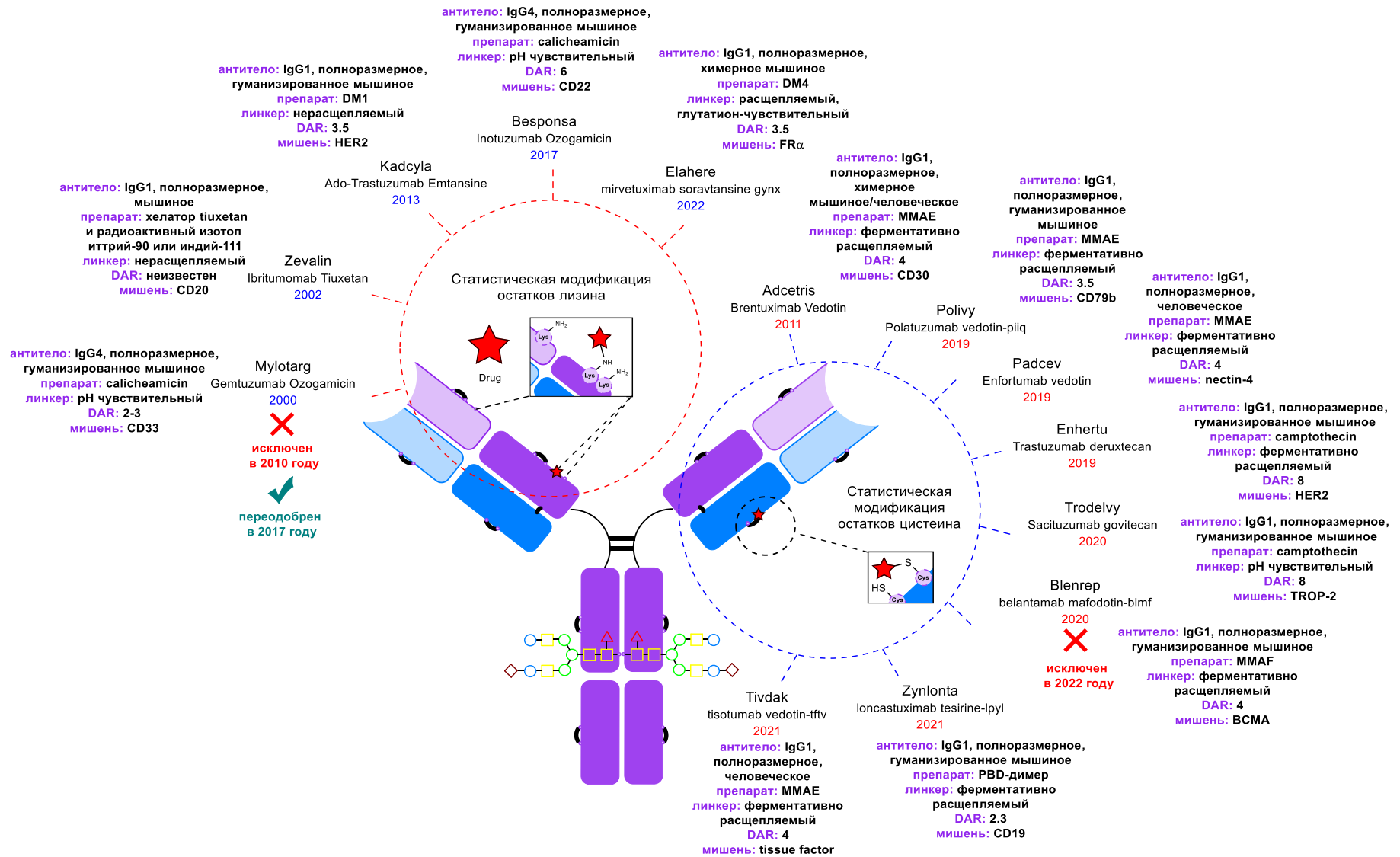
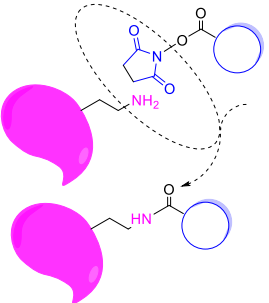
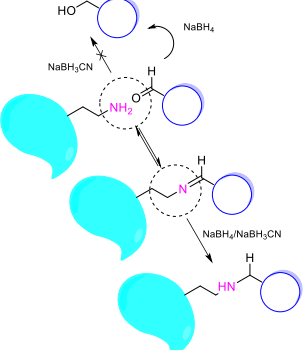
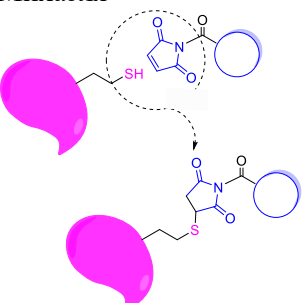
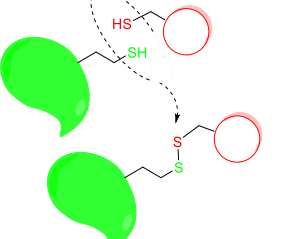
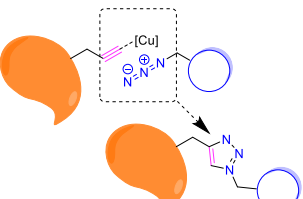


Рис. 3. Одобрены к применению FDA (food and drug administration) конъюгаты антител по состоянию на март 2023 года^{3,86-100}

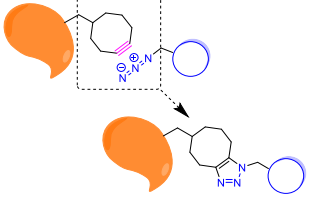
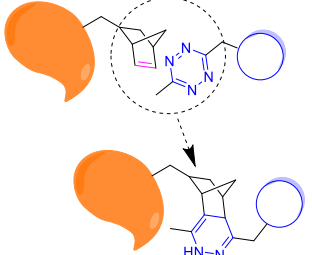
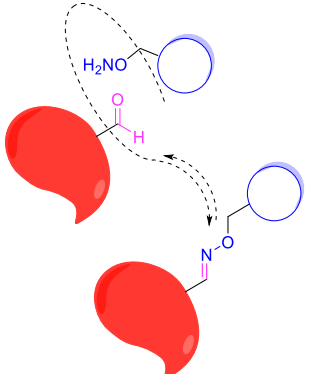
Таблица 2. Основные стратегии химической модификации биомолекул¹⁰¹

Стратегия конъюгации	Достоинства	Недостатки	Селективность
<p>образование амидов</p> 	<p>-простота; -доступность реагентов; -не требуется вмешательства в антитело; -надежность; -хорошо разработанные протоколы;</p>	<p>-очень низкая сайт-специфичность; -побочные реакции; -низкий выход; -чувствительность к воде; -гетерогенные продукты; -возможность потери аффинности антителом;</p>	<p>Высокая</p>
<p>восстановительное аминирование</p> 	<p>-высокая хемоселективность; -простота; -множество способов ввести карбонильную группу в молекулу; -аминогруппы присутствуют в нативных белках;</p>	<p>-медленная кинетика; -низкая сайт-специфичность; -альдегиды потенциально токсичны для живых клеток;</p>	<p>Высокая</p>

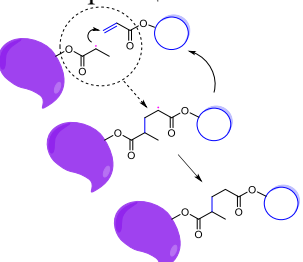
Продолжение таблицы 2. Основные стратегии химической модификации биомолекул¹⁰¹

<p>присоединение по реакции Михаэля</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -высокая скорость реакции; -варьируемая кинетика; -нераспространенность цистеинов в нативных белках увеличивает селективность реакции; -легкость введения цистеиновых групп; -хорошо разработанная методика; 	<ul style="list-style-type: none"> -потенциальная обратимость; -малеимиды подвергаются гидролизу; -тиолы играют важную роль в сохранении структурной целостности белков; -через некоторое время образуются дисульфиды; 	<p>Возможна побочная реакция с аминогруппами</p>
<p>образование дисульфидов</p> 	<p>-простота</p>	<ul style="list-style-type: none"> -низкая скорость; -образуются смешанные или гомодисульфиды; 	<p>Высокая Возможность образования смешанных или гомосульфидов</p>
<p>CuAAC</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -высокая хемоселективность; -реакционноспособные функциональные группы, никогда не встречающиеся в нативных белках; 	<ul style="list-style-type: none"> -медь потенциально токсична для живых клеток; -необходимость введения азидов/алкинов в молекулу; -большие количества катализатора; 	<p>Высочайшая селективность Многие присутствующие в белках функциональные группы хелатируют медь Активированные алкины чувствительны к тиоловым группам</p>

Продолжение таблицы 2. Основные стратегии химической модификации биомолекул¹⁰¹

<p>SPAAC</p> 	<p>-высокая реакционная способность;</p> <p>-не требуется катализатор;</p> <p>-простота;</p> <p>-вариабельность кинетики с помощью структуры циклооктина;</p> <p>-реакционноспособные функциональные группы, никогда не встречающиеся в нативных белках;</p> <p>-низкая токсичность;</p>	<p>-алкины сложно и дорого синтезировать;</p> <p>-высокая гидрофобность циклооктинов;</p> <p>-низкая скорость относительно метода IEDDA;</p> <p>-необходимость ввода алкиновой/азидогруппы в молекулу;</p>	<p>Высокая селективность</p> <p>Циклооктины вступают в побочные реакции с тиолами</p>
<p>IEDDA</p> 	<p>-хорошая скорость;</p> <p>-реакционноспособные функциональные группы, никогда не встречающиеся в нативных белках;</p> <p>-высокая селективность;</p>	<p>-некоторые тетразины нестабильны;</p> <p>-сложность синтеза алкенов;</p> <p>-гидрофобность;</p> <p>-необходимость ввода алкеновой/тетразиновой группы в биомолекулу;</p>	<p>Высокая селективность</p> <p>Циклооктены могут изомеризоваться в присутствии тиолов</p>
<p>образование оксима/гидразона</p> 	<p>-быстрая конъюгация;</p> <p>-гидразины и гидроксилламины не присутствуют в белках;</p> <p>-множество способов ввести карбонильную группу в молекулу;</p>	<p>-низкая стабильность гидразонов;</p> <p>-потенциальная обратимость реакции;</p> <p>-необходимость катализатора для ускорения реакции;</p> <p>-потенциальная токсичность альдегидов для живых клеток;</p>	<p>Гидразоны и оксимы более стабильны, чем основания Шиффа</p>

Продолжение таблицы 2. Основные стратегии химической модификации биомолекул¹⁰¹

<p>свободнорадикальная полимеризация</p> 	<p>-функциональные группы в биомолекулах устойчивы к реакции; -широко используется при разработке биоматериалов; -позволяет осуществлять конъюгацию в процессе создания биоматериала;</p>	<p>-необходимо ввести очень реакционноспособные функциональные группы в биомолекулу; -требуется отсутствие кислорода в реакционной массе; -процесс полимеризации и избыток мономера может быть токсичен; -радикалы токсичны для биомолекул и живых клеток;</p>	<p>Толерантна к большинству функциональных групп; кросс-реактивность с присоединением Михаэля и IEDDA</p>
--	---	--	---

Для преодоления проблем, связанных с иммуногенностью антител, полученных из организмов разных видов, широко применяются рекомбинантные антитела – химерные и гуманизированные. Большинство антител, используемых в одобренных FDA (Рис. 3) терапевтических конъюгатах, являются гуманизированными мышиными антителами (Рис. 4).

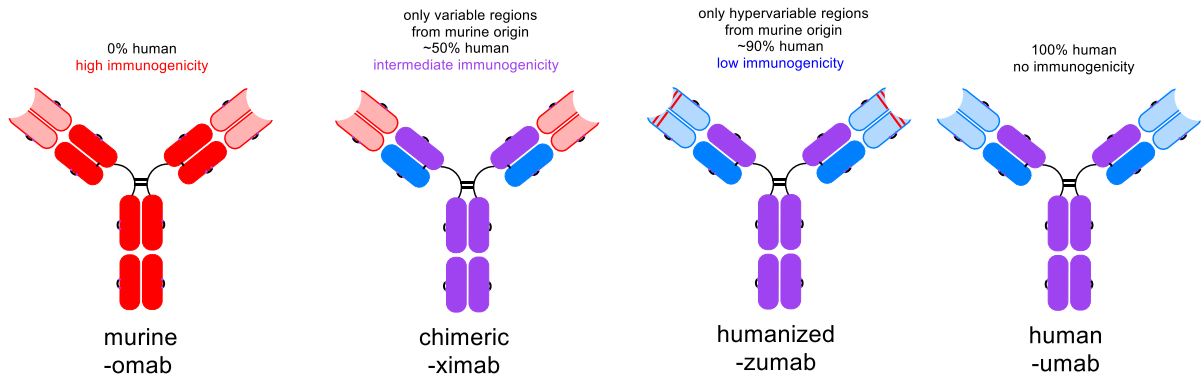


Рис. 4. Типы антител, применяемые для получения конъюгатов

Усилия ученых направлены на получение максимально предсказуемых и гомогенных конъюгатов биомолекул с сохранением функциональности последних. Среди широкого набора биоортогональных реакций большой интерес представляют реакции карбонильной группы. Карбонильная группа (альдегиды и кетоны) 1) не встречается в основных классах биополимеров (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды); 2) может быть сайт-специфически введена в биомолекулы (Рис. 5); 3) подходит для реакций биоортогональной модификации (например, оксимного лигирования, взаимодействия с гидразидами или реакции Пикте-Шпенглера). Карбонильные группы (альдегиды, α -кетоальдегиды, алифатические или арилалкилкетоны) могут быть введены в молекулу иммуноглобулина различными методами (Рис. 5). Мы рассмотрим получение и применение сайт-специфических конъюгатов антител, при синтезе которых используется введение карбонильных групп в молекулу антитела и их дальнейшая модификация с помощью биоортогональных реакций.

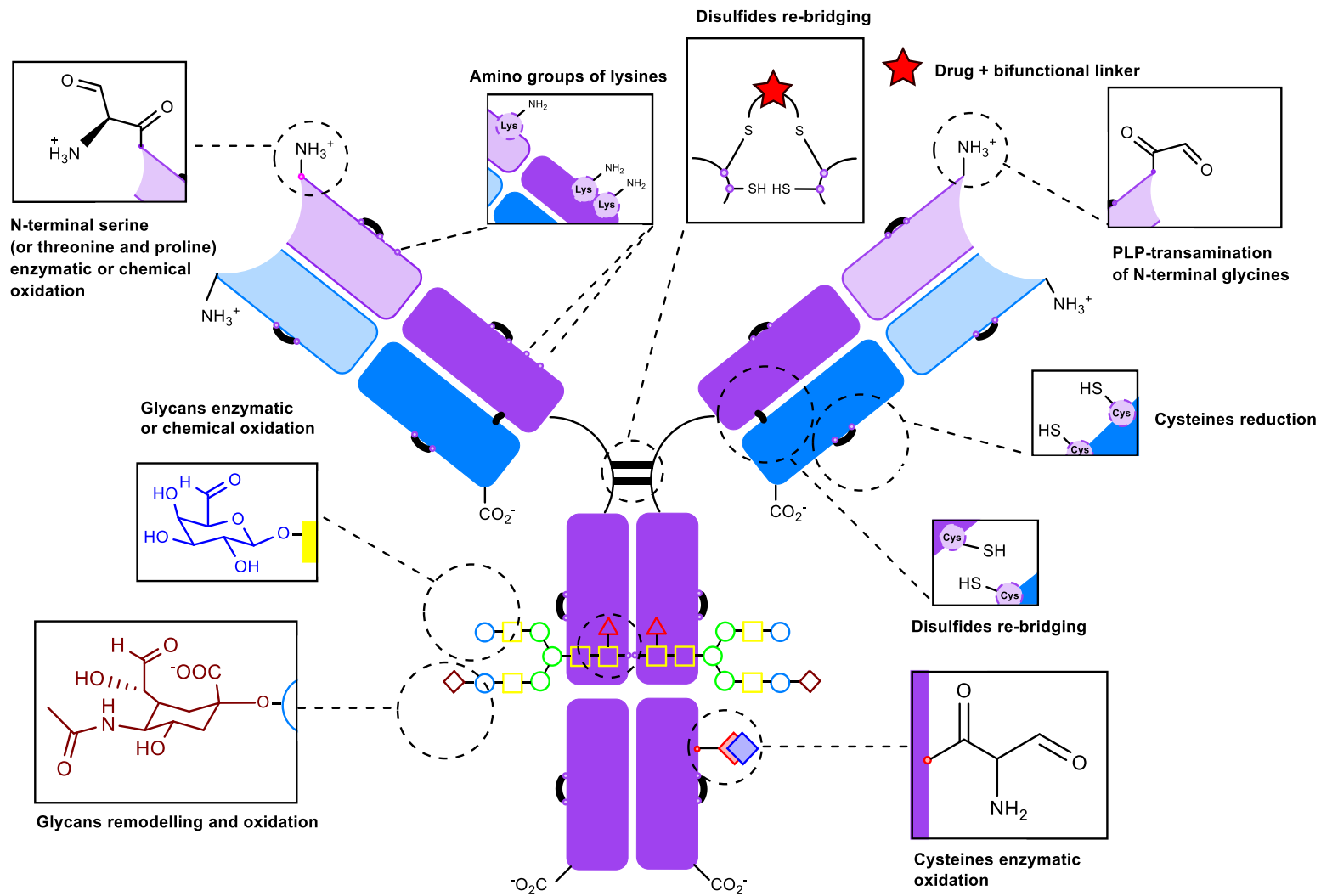


Рис. 5. Методы введения карбонильной группы в антитело без внесения изменения в структуру антитела генно-инженерным путем

1.5. Методы введения карбонильной группы в антитело

В настоящее время известно большое число методов введения карбонильной группы в молекулу антитела. Некоторые из них известны достаточно давно (например, окисление периодатом) и первоначально были разработаны для других целей, но затем были эффективно распространены на иммуноглобулины и другие гликозилированные белки. Некоторые подходы являются относительно новыми (например, генно-инженерное введение аминокислот) и сложными в исполнении. Следует отметить, что многие из подходов связаны друг с другом (например, гликоинженерные методы и окисление периодатом), поэтому их разделение на группы может быть весьма условным.

Мы решили разделить методы на две группы: более общие подходы, использующие только природные особенности антител к модификации, и подходы, вмешивающиеся в структуру антител с помощью генной инженерии, а также все подходы, которые используют мутантные ферменты для работы с антителами.

1.5.1. Периодатное окисление

Известно, что иммуноглобулины G содержат 2–3% углеводов по массе (Таблица 1).^{84,102–105} Они существуют в виде разветвленной олигосахаридной цепи, консервативно связанной с остатком аспарагина-297 (Asn297, N297, Рис. 2) в области C_H2 тяжелой цепи Fc фрагмента иммуноглобулина.^{84,106–109} Локализация углеводов на сериновом или треониновом остатке IgG встречается редко.⁸⁴ Кроме того, олигосахариды всегда сильно удалены от антигенсвязывающего центра.¹¹⁰ Таким образом, окисление олигосахаридных фрагментов антител с образованием карбонильных групп представляется перспективным методом предварительной модификации с последующим лигированием молекулы-мишени.¹⁰⁵

Взаимодействия между Fc доменом IgG и Fc рецепторами играют важную роль при формировании иммунного ответа с участием антител, противовоспалительной активности; так же они оказывают влияние на время жизни иммуноглобулина в кровяном русле и на его иммуногенность. Эти взаимодействия регулируются N-гликозилированием Fc-фрагмента.¹¹¹ Обычно углеводный состав иммуноглобулинов ограничен фукозой, маннозой, галактозой, глюкозамином и сиаловой кислотой. Наиболее представлен глюкозамин, наименее – сиаловая кислота и фукоза. Соотношение может варьироваться в

зависимости от вида организма-продуцента (Рис.6).^{96,106,107,112} В клеточных экспрессирующих системах трудно получить антитела, имеющие однородные изоформы гликанов. Это связано с множеством процессов, происходящих в клетке, и активностью таких ферментов, как гликозидазы, гликозилтрансферазы и т.д.¹¹³ Однако к настоящему времени структура гликанов антител хорошо изучена, и имеется несколько обзоров, рассматривающих их структуру, свойства и функции.

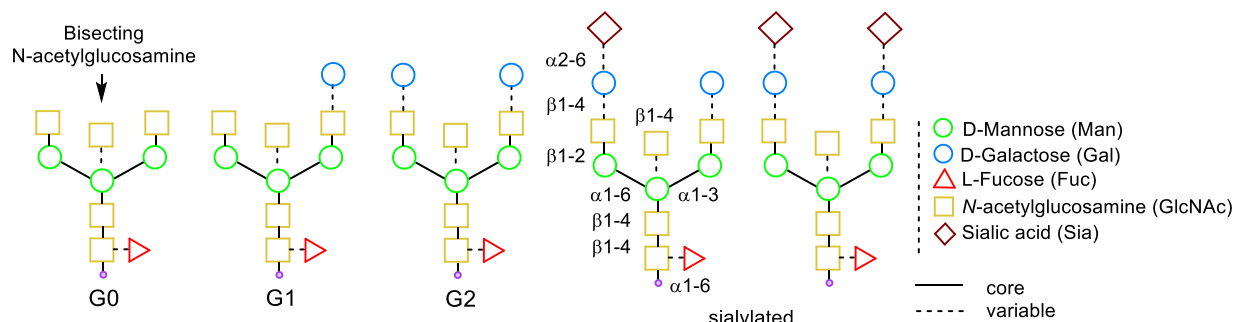


Рис. 6. Основные гликоформы иммуноглобулинов G^{109,114–117}

Углеводный остаток Fc-области иммуноглобулина G человека представляет собой сложный биантенный N-гликан, в котором N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) частично галактозилирован, образуя смесь так называемых гликоформ G0, G1 и G2.^{109,116} G0 не имеет галактозы на терминальных N-ацетилглюкозаминах. Гликоформы G1 и G2 имеют один или два терминальных остатка галактозы (Рис. 6). Некоторые антитела имеют дополнительные терминальные остатки сиаловой кислоты, но человеческие сиалилированы только на 10–15%.^{116,117} Сиаловая кислота играет различную роль в различных процессах в иммунной системе, особенно воспалении.¹¹⁸ Некоторые антитела имеют дополнительные (бисектные) N-ацетилглюкозамины, превращающие их в триантенные. Последние очень важны для антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) – атаки на клетки-мишени агентов иммунной системы, которая запускается при связывании рецепторов лимфоцитов (FcγRs) с константной областью (Fc) антител.¹⁰⁹ Остаток фукозы также вариабелен и очень важен для ADCC.^{115,119}

Существует два способа окисления углеводов в иммуноглобулинах: ферментативный с помощью фермента галактозооксидазы^{43,120,121} и химический с помощью метапериодата натрия NaIO₄ (Рис. 7). Фермент формирует альдегидную группу на C6-атоме терминальной галактозы или N-ацетилгалактозамина. Однако у метода есть существенный недостаток по сравнению с химическим окислением: так как у большинства гликопротеинов

млекопитающих терминальным остатком является сиаловая кислота, то перед обработкой галактозооксидазой требуется дополнительная обработка нейраминидазой для удаления этого терминального остатка. В случае с окислением периодатом натрия никаких дополнительных манипуляций не требуется.^{120,122–125} Эта реакция хорошо себя зарекомендовала на гликопротеинах.¹⁰⁶ Окисление периодатом известно с 1928 года и было разработано Леоном Малапрадом для селективного окисления вицинальных спиртов и β -аминоспиртов.

В случае гликанов окислению подвергаются вицинальные диолы сахаров, причем циклиды окисляются гораздо легче, чем транс-диолы. Так, из перечисленных выше остатков сахаров окислению поддаются только сиаловая кислота, галактоза, фукоза и, в меньшей степени, остатки маннозы. В некоторых сообщениях манноза не подвергалась окислению в наиболее распространенных условиях (10–20 мМ).¹²⁶

Окисление периодатом зависит от многих факторов, включая концентрацию окислителя, pH, температуру и время.¹²⁷ При определенных условиях окисление может затрагивать только остатки сиаловой кислоты, образуя альдегидную группу на ее экзоциклическом атоме C-7, при других условиях затрагивая другие углеводные остатки с близлежащими диолами или вообще нежелательно окисляя чувствительные аминокислоты, такие как триптофан, тирозин и метионин (Рис. 7).¹⁰²

При высоких концентрациях периодата (>50 мМ) легко образуются димеры и появляется возможность образования олигомеров, особенно если pH буфера более щелочной и температура выше), наблюдаются процессы полимеризации антител, образующих между собой основания Шиффа.^{104,127,128} Если в образовании димеров участвуют аминокислоты в центре связывания антигена, это приводит к значительной потере аффинности.¹⁰⁴ Кроме того, возможно так называемое переокисление – процесс, при котором олигосахариды разрушаются и отделяются от антитела.¹⁰² Поскольку одной из их функций является повышение растворимости иммуноглобулина, антитела могут агрегировать после потери олигосахаридных цепей (требуется >100 мМ).^{104,118,129} При высоких концентрациях периодата натрия (>50 мМ) чувствительные аминокислоты также подвергаются деструктивным процессам, что приводит к снижению аффинности¹³⁰ и общей потере стабильности иммуноглобулина. Следует отметить, что некоторые антитела более чувствительны к окислению и очень легко теряют свою способность связываться даже при

низких концентрациях периодата натрия (5–10 мМ).¹²⁷ Это связано с расположением чувствительных к окислению аминокислот в антигенсвязывающем центре. Для таких антител следует выбирать еще более мягкие условия окисления, например, менее 0.5 мМ периодата натрия, охлаждение до 0 °С и более короткое время инкубации.¹²⁷ Длительная инкубация почти полностью снижает аффинность.¹³⁰

Наиболее оптимальные условия для селективного окисления олигосахаридов следующие: концентрация NaIO_4 5–20 мМ, температура 25 °С, ацетатный буфер с рН 5–5.5 в течение 30 мин. Эти условия можно варьировать, получая заданное количество карбонильных групп путем окисления и других доступных сахаров.^{104,127,131}

В литературе описан эксперимент, в котором чувствительность анти-CPA и анти-HRP антител к периодатному окислению была исследована путем инкубирования этих антител в буферных системах с различными концентрациями NaIO_4 в течение различного времени (Рис. 8–10). В результате иммуноглобулины оставались активными после инкубирования с низкими концентрациями периодата (до 10 мМ), непродолжительное время (1 ч) и при низкой температуре (0 °С). Увеличенная концентрация (100 мМ) или продолжительное время инкубирования (16 ч) приводили к снижению аффинности большинства антител (Рис. 8). Аналогично, увеличенная температура во время окисления (от 4 °С до комнатной) так же приводила к быстрой инактивации наиболее чувствительных антител, однако некоторые наиболее стабильные подвиды антител практически не подвергались воздействию (Рис. 10).¹³²

Значение рН, при котором проводится реакция окисления, оказывает влияние на степень окисления антитела.¹³³ Как правило, окисление проводится в буферах в диапазоне значений рН от 3.6 до 7.2. Однако самые оптимальные значения – это рН 5–5.5.^{127,133} С помощью правильно подобранных значений рН легко контролировать степень мечения окисленного антитела. Например, при рН 7, концентрации периодата 10 мМ и времени окисления 30 мин образуется 1 альдегидная группа, при рН 5–6 – 2 группы, при рН 4 – 3 и при рН 3 – 6 сайтов мечения. Увеличение времени реакции на 30–60 мин не оказывает значительного влияния.^{127,133}

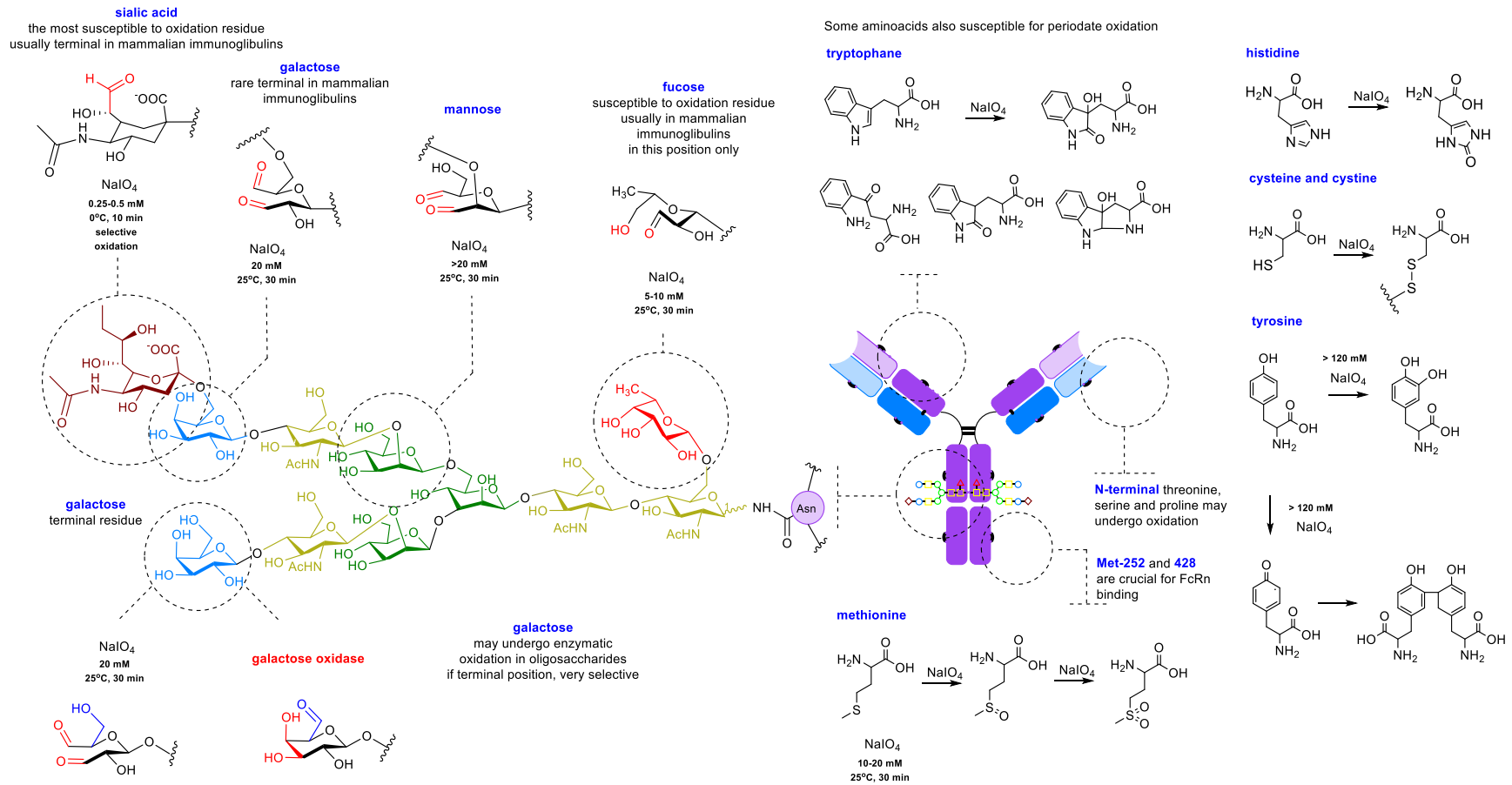


Рис. 7. Окисление гликанов.^{109,134} На рисунке показана одна из наиболее распространенных гликоформ. Теоретически максимально достижимая степень окисления 24–28 карбонильных групп на одно антитело, в зависимости от структуры гликана. Однако модификация альдегидных групп с помощью оксиаминов или гидразидов не приводит к соответствующему числу пригодных для модификации карбонильных групп из-за стерических трудностей и способности гидразидов образовывать циклические соединения с двумя соседними альдегидными группами. Степень мечения обычно составляет от 2 до 10 молекул на антитело.^{102,104,107,108,126,127,130,135–142}

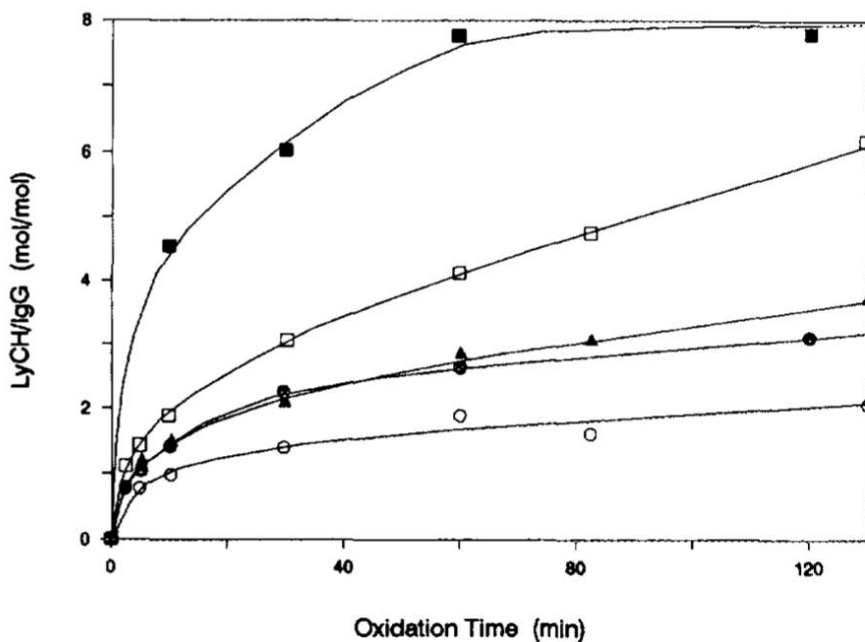


Рис. 8. Степень окисления антитела в зависимости от времени окисления. Черные квадраты – pH 3.0; незакрашенные квадраты – pH 4.0; черные круги – pH 5.0; треугольники – pH 6.0; незакрашенные круги – pH 7.0. Концентрация периодата натрия 10 мМ, комнатная температура.¹³³

При высоких концентрациях периодата натрия чувствительные аминокислоты также подвергаются деструктивным процессам, что приводит к снижению аффинности и в целом к потере стабильности иммуноглобулина.^{83,102,143}

Следует отметить, что при селективном окислении периодатом только остатков сиаловой кислоты используются значительно более низкие концентрации периодата (0.25–0.5 мМ), чем при обычном окислении олигосахаридов (10–20 мМ).¹³³ Окисление остатков метионина,^{102,141} включая остатки Met-252 и Met-428, расположенные в Fc регионе C_H3, близком к месту связывания неонатального рецептора FcRn,¹⁴⁴ может влиять на эффективность связывания с последним.¹²⁹ Частичное окисление (~40%) остатка Met-252 оказывает незначительный эффект на FcRn – уменьшение связывания на 25%. Данный рецептор отвечает за рециркуляцию антитела из лизосом обратно в межклеточное пространство и уменьшение взаимодействия с ним значительно снижает время жизни иммуноглобулина в крови.¹²⁹ Этот процесс происходит следующим образом. После неспецифического захвата клеткой антитело попадает в кислую лизосому, где связывается с неонатальным рецептором при pH < 6 и впоследствии высвобождается неповрежденным

в межклеточное пространство. Там, при повышении рН до нейтральных значений 7.4, антитело высвобождается из рецептора из-за отсутствия связывания. Важно отметить, что в этом процессе антитело защищено от ферментативной деградации в лизосоме благодаря связыванию с FcRn.¹⁴⁴ Нарушение связывания на 60% приводит к 80%-му сокращению времени циркуляции иммуноглобулина.¹³¹ Следует отметить, что при кислых значениях рН риск окисления метионина возрастает. При нейтральных значениях рН окисление Met, Tyr и Trp практически не наблюдается. Компромиссный вариант, наиболее популярный в литературе – рН 5.0–5.5, как упоминалось выше.¹⁰²

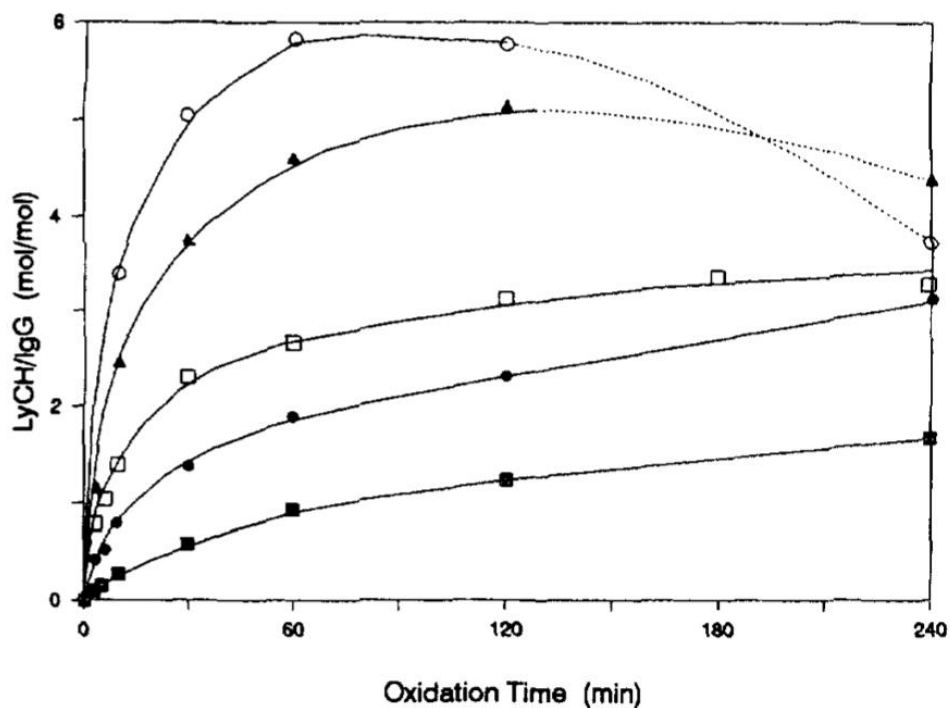


Рис. 9. Степень окисления антитела в зависимости от концентрации периодата натрия. Черные квадраты – 1 мМ; черные круги – 5 мМ; незакрашенные квадраты – 10 мМ; треугольники – 50 мМ; незакрашенные круги – 100 мМ. рН 5.0, комнатная температура¹³³

Температура также в значительной мере влияет на процесс окисления (Рис. 10), но температурные условия следует подбирать индивидуально для каждого антитела. В большинстве источников упоминается либо окисление при комнатной температуре, либо при охлаждении до 0–4 °С.¹²⁷

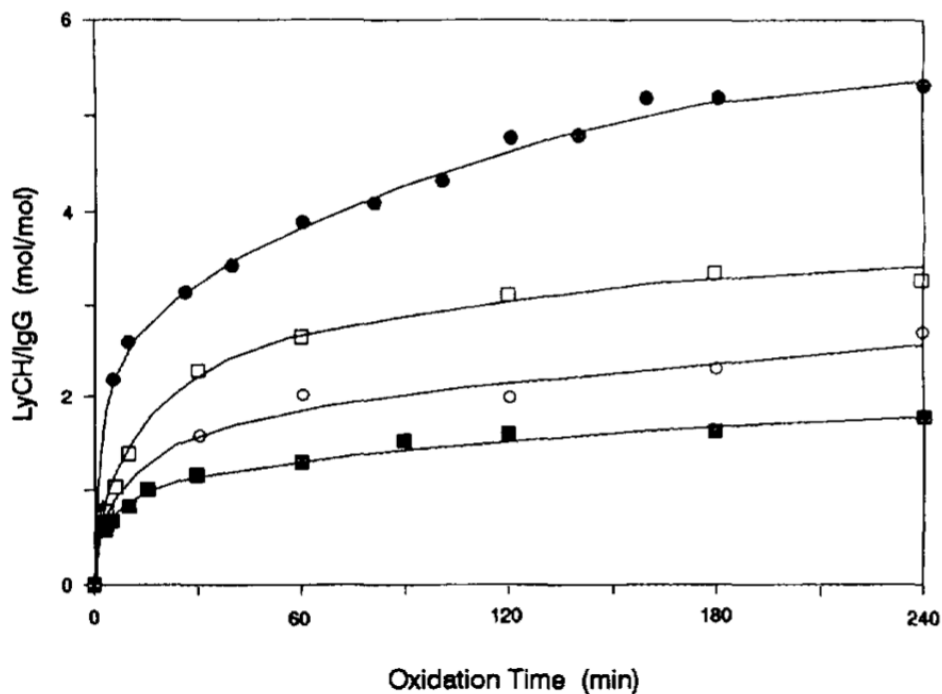


Рис. 10. Степень окисления антитела в зависимости от температуры. Черные квадраты – 4°C; незакрашенные круги – 15°C; незакрашенные квадраты – 25°C; черные круги – 37°C. pH 5.0, концентрация периодата 10 мМ¹³³

Впервые периодатное окисление γ -глобулинов, к которым относятся в том числе и иммуноглобулины, было описано в 1963 году. Оно было проведено с целью изучения строения олигосахаридной цепи антител.¹⁰⁶

Однако периодатное окисление является не только инструментом исследования состава и строения олигосахаридов гликанов. Мягкое окисление углеводов позволяет ввести в молекулу гликозилированного белка карбонильную группу для последующей модификации.¹⁴⁵

В 1973 г. появилась первая работа, продемонстрировавшая возможность такого подхода.¹⁴⁶ Пероксидаза хрена (HRP, имеет в составе 18% углеводов, не влияющих на ферментативную активность белка) была окислена периодатом натрия по углеводным фрагментам с образованием альдегидных групп, а затем было осуществлено лигирование этих альдегидов и аминокрупп иммуноглобулина G через основание Шиффа, которое затем мягко восстановили NaBH_4 . Получившийся стабильный конъюгат полностью сохранил исходную аффинность антитела. Спектрофотометрически так же было

установлено соотношение полезная нагрузка-антитело (иногда лекарство-антитело, drug-antibody ratio, DAR). В отличие от конъюгатов, полученных с помощью иных доступных в то время способов – например, сшивка с помощью глутарового альдегида – значение DAR составило 5–6 молекул пероксидазы на одно антитело.¹⁴⁶

В 1977 году подход был применен непосредственно к антителу. В окисленное периодатом антитело была введена спин-метка – ТЕМРО ((2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил) с целью изучения конформационных изменений в Fc фрагменте иммуноглобулина после связывания с антигеном.¹⁰⁸

Однако введение карбонильной группы в молекулу антитела открывает возможности для создания т.н. иммунотоксических препаратов: иммуноглобулинов, связанных с молекулой лекарства или токсина. В данном случае IgG выступает в качестве агента для селективной доставки препарата к месту действия. Упоминание подобного подхода встречается в 1983 году в связи с получением конъюгата антитела и противоопухолевого препарата даунорубицина и доксорубицина.¹⁰³ Это можно считать первым, простейшим примером терапевтического конъюгата антитела-лекарства (antibody-drug conjugate, ADC).

Авторы выделяют три возможных пути для получения препарата. Иммуноглобулин может быть связан с лекарством с использованием периодатного окисления: а) углеводного остатка лекарства через образование основания Шиффа с аминогруппой иммуноглобулина и последующим восстановлением; б) углеводного остатка иммуноглобулина с последующей конденсацией с аминогруппой лекарства и восстановлением; в) через amino- или карбонилсодержащие молекулы-линкеры. В результате оказалось, что конъюгаты полученные через окисление дауно- и доксорубицина, теряли свою активность *in vitro* и *in vivo*.^{103,147}

Третий путь – конъюгация с использованием молекулы-линкера – может быть применим в том случае, если необходимо разнесение антитела и лекарства в пространстве в силу стерических затруднений.^{103,148} Линкер может быть гомо- или гетерофункциональным (Рис. 11).

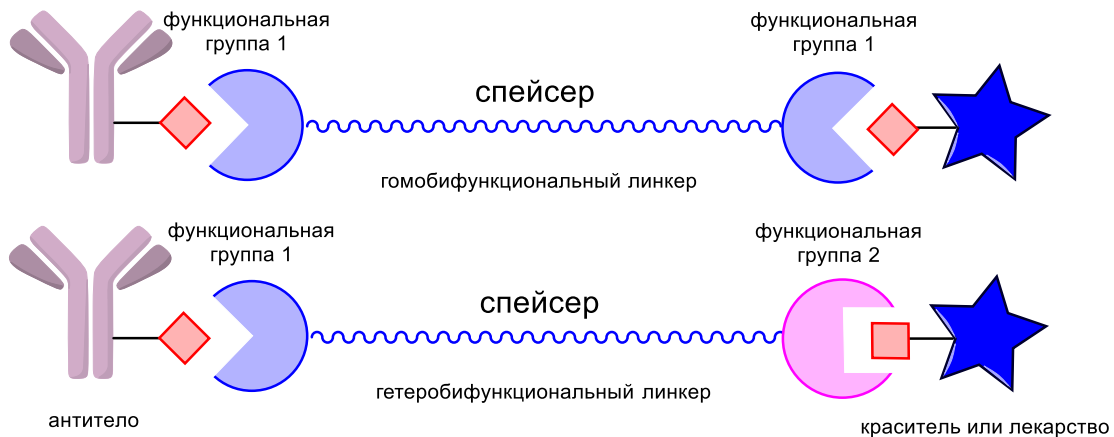


Рис. 11. Гомо- и гетеробифункциональные линкеры для получения конъюгатов

Большинство коммерчески доступных линкеров синтезированы для сшивки с амино- или сульфгидрильными группами, и базируются на основе малеимидов, N-гидроксисукцинимидов (NHS-эфиры), пиридилдисульфидов, α -галогенацетиллов (ацетамидов). Недостатком конъюгации по боковой аминогруппе лизина является низкая сайт-специфичность; в частности, остатки лизина могут находиться в антигенсвязывающих центрах. Остатки же цистеина зачастую задействованы в организации третичной структуры антитела. Другим недостатком подхода является возможность образования полимеров антител, сшитых друг с другом.¹⁴⁸ Исходя из этих соображений, большой интерес представляют линкеры, которые задействуют функциональные группы, несвойственные белкам или хотя бы менее распространенные в их структуре – биоортогональные. Последнее время развитие биортогональной химии идет полным ходом. Например, описаны сшитые с IgG PAMAM-дендримеры, использующие линкер на основе аминокaproновой кислоты, с гидразидной аминогруппой с одной стороны, формирующий стабильный гидразон с окисленным антителом, и с флуоро-нитроароматическим остатком с другой стороны для реакции с нуклеофилами типа аминов.¹⁴⁸

Однако так как в Fc фрагменте аминогруппы присутствуют в большом количестве, этот линкер нельзя в полной мере назвать биоортогональным. Однако разработано большое количество подобных ему, несущих гидразид для взаимодействия с окисленным антителом и какую-либо неприродную функциональную группу – азид или алкин, по которой может быть произведена дальнейшая, исключительно селективная и сайт-специфическая модификация с помощью клик-химии.¹⁴⁸

Несмотря на то, что наибольшее распространение для модификации получил класс антител IgG, существуют примеры применения и других типов, например, IgM⁸³. Последний отличается самой высокой степенью гликозилирования среди иммуноглобулинов – 13%.^{83,84,102,103} Окисление человеческого IgM в течение 4 ч приводило к образованию 35 (!) альдегидных групп, а мышиноного – к 20 группам при окислении в течение 1 ч. Однако такое длительное воздействие периодата натрия может приводить к повреждению чувствительных к окислению аминокислот: метионина, тирозина и триптофана. Наиболее оптимальным является 30-минутное окисление: никакой потери аффинности IgM не было обнаружено, а количество образовавшихся карбонильных групп достаточно для эффективной модификации.^{83,102}

Однако следует отметить, что метод конъюгации через образование основание Шиффа с аминогруппами имеет ряд недостатков. Этот метод требует обязательного восстановления образовавшейся связи с помощью боргидрида натрия или цианборгидрида натрия. Известно, что рКа гидразидов равна приблизительно 2.6, в то время как рКа аминов – 8–9. Реакции с гидразидами и оксиаминами можно проводить в условиях, не слишком подходящих для аминов, а именно при значениях рН около 5–5.5 (Рис. 12).¹³² При такой кислотности среды не происходит полимеризации окисленных антител.¹³² Кроме того, образующиеся гидразоны достаточно стабильны и не требуют восстановления.¹⁰²

Поэтому гидразиды, гидразины, семикарбазиды используются вместо аминов.^{110,149} Например, для биотинилирования окисленных периодатом иммуноглобулинов был использован биотингидразид. В результате был получен конъюгат с полностью сохранённой аффинностью. Методология применена к классам IgG и IgM моноклональных мышинных антител и к человеческим моноклональным IgG. Показана возможность получить поликлональные и моноклональные флуоресцентные антитела, непосредственно меченные красителем – флуоресцеином,^{126,133,150} техасским красным^{126,150} и родамином, без использования пары биотин-авидин и без потери иммунологической активности.^{143,150}

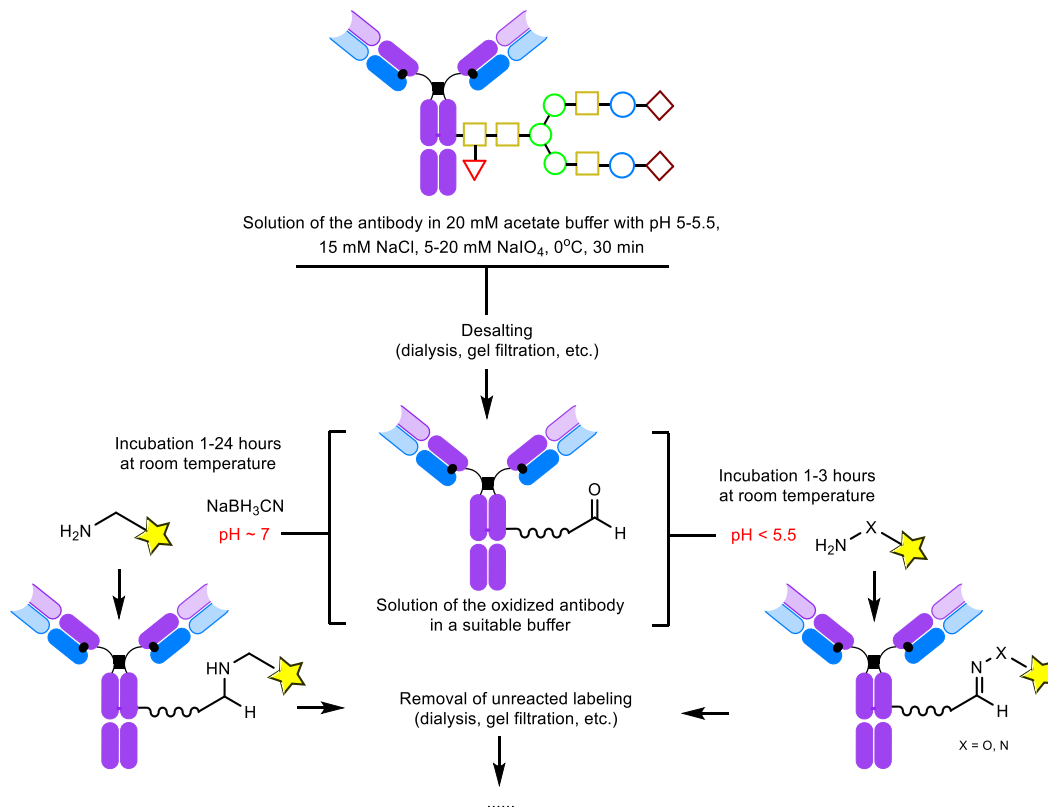


Рис. 12. Схема периодатного окисления и последующего лигирования^{74,102,104,108,110,126,133,151-154}

Следует отметить так же высокую стабильность гидразонов *in vivo*. Их время жизни в кровотоке составляет до 18 ч, чего достаточно для транспорта и накопления в целевой опухолевой ткани.¹²⁶

Другой областью применения периодатного окисления является получение иммунологических матриц для аффинной хроматографии. Благодаря тому, что олигосахаридная цепь находится на Fc фрагменте и удалена от центра связывания антигена, антитело иммобилизуется на подложке ориентированно и сохраняет высокую аффинность. Этого не получается достичь при других способах связывания, например, через аминокгруппы лизина, так как процесс происходит статистически и в результате неудачной ориентации иммуноглобулина относительно подложки центр связывания антигена становится недоступен.^{102,132,149,150,155,156} Следует отметить так же, что для некоторых антител возможна иммобилизация на подложку в варианте *one pot* – окисление и лигирование с гидразидом одновременно.¹⁵⁵

Нахождение олигосахаридных фрагментов между двух тяжелых цепей обеспечивает экранирование конъюгатов от ферментов, циркулирующих в кровяном русле при

исследованиях *in vivo*. При модификации антител радиоактивной меткой ^{125}I было обнаружено, что иммуноконъюгаты полученные с помощью лигирования по окисленным углеводом в среднем в 18 раз более активны *in vivo* в течение суток, чем аналоги, полученные через неселективное мечение лизинов или тирозинов. Последние подвергаются дегалогенированию ферментами, в то время как более 80% меченых по остаткам сахаров остаются интактными, что объясняется возможной недоступностью метки, углубленной между тяжелых цепей антитела.¹¹⁰

Некоторые иммуноглобулины могут интернализироваться внутрь клетки после связывания с антигеном на поверхности мембраны, некоторые не нуждаются в этом механизме для проявления терапевтических свойств.¹²⁶ ADC на основе последних представлены в меньшинстве. Например, антитело к опухолевому поверхностному антигену с фотосенсибилизатором в качестве полезной нагрузки может эффективно ингибировать рост опухоли за счет селективного разрушения ее сосудистой системы.¹²⁶

Для создания этого препарата использовались IgG, в составе олигосахаридной цепи которых присутствовал остаток фукозы вблизи сайта N-гликозилирования. Этот углевод так же имеет цис-диольный фрагмент, подходящий для периодатного окисления и последующего образования стабильного гидразона с молекулой красителя или лекарства – доластатина. На одно антитело приходилось 2 молекулы полезной нагрузки.¹²⁶

1.5.2. Окисление N-концевых аминокислот

Некоторые антитела могут содержать терминальные остатки серина, треонина и пролина на N-конце полипептидных цепей (Рис. 13). Эти аминокислоты могут быть селективно химически окислены до карбонильных соединений. Следует отметить, что скорость окисления β -аминоспиртов, а N-концевые аминокислоты с OH-группой в боковой цепи являются именно такими, в 10^2 – 10^4 раза выше, чем скорость окисления диолов в сахарах. Однако окисление аминосспиртов сильно зависит от значений pH. Так, при кислых значениях среды окисление аминосспиртов сахаров почти полностью подавляется из-за протонирования аминогруппы. Кроме того, при кислых значениях pH возрастает риск окисления метионина, как уже упоминалось выше. При нейтральных значениях pH окисление Met, Tug и Tgr практически не наблюдается.

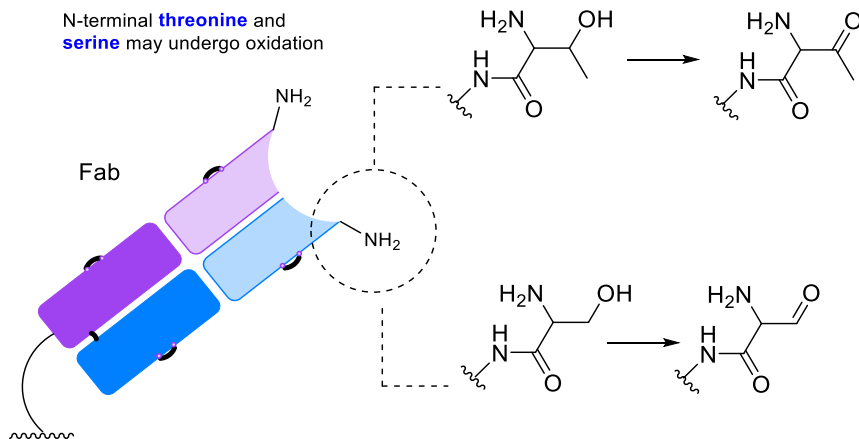


Рис. 13. Схема окисления N-терминальных концов полипептидных цепей¹⁵⁷

Однако чаще всего серин и треонин вводятся на N-конце легкой цепи антитела с помощью генной инженерии, а затем окисляются. Этот подход обсуждается ниже.¹⁵⁷

1.5.3. Трансаминирование N-концевых аминокислот

Существуют также так называемые реакции трансаминирования, которые позволяют вводить карбонильную группу на N-конец практически любого антитела любого происхождения. В реакции участвует пиридоксаль-5-фосфат (PLP) при 37–50°C в водном растворе или его аналоги (Рис. 14).^{158,159} Для селективного окисления антител с генетически модифицированными остатками глутамина, введенными в N-концевую область, также был разработан аналог PLP с лучшей эффективностью – N-метилпиридиний-4-карбоксальдегид бензенсульфонатная соль (соль Рапопорта, RS).¹⁶⁰

Преимуществом метода является селективность – введение карбонила селективно для N-конца, не затрагивая антигенсвязывающий центр. Недостатком является ограниченное количество сайтов модификации (один сайт каждой цепи, 4 сайта для всего антитела) и, следовательно, низкая загрузка целевой цитотоксической молекулы.¹⁵⁸ Так же к минусам можно отнести различную чувствительность концевых аминокислот к трансаминированию.¹⁶¹ Кроме того, реакция трансаминирования лучше всего протекает при нагревании до 50 °С, что практически исключено при работе с антителами. Мечение осуществляется непосредственно в области антигенсвязывающего центра, что также может быть критичным для сохранения аффинности. Однако эксперименты по связыванию меченого антитела с антигеном показали полное сохранение свойств антитела

после введения карбонильной группы и мечения. Аминогруппы боковых цепей лизинов не подвергаются трансаминированию.¹⁵⁸ Тем не менее метод был успешно применен для создания терапевтических фрагментов Fc-антител с лекарственной нагрузкой.¹⁵⁹

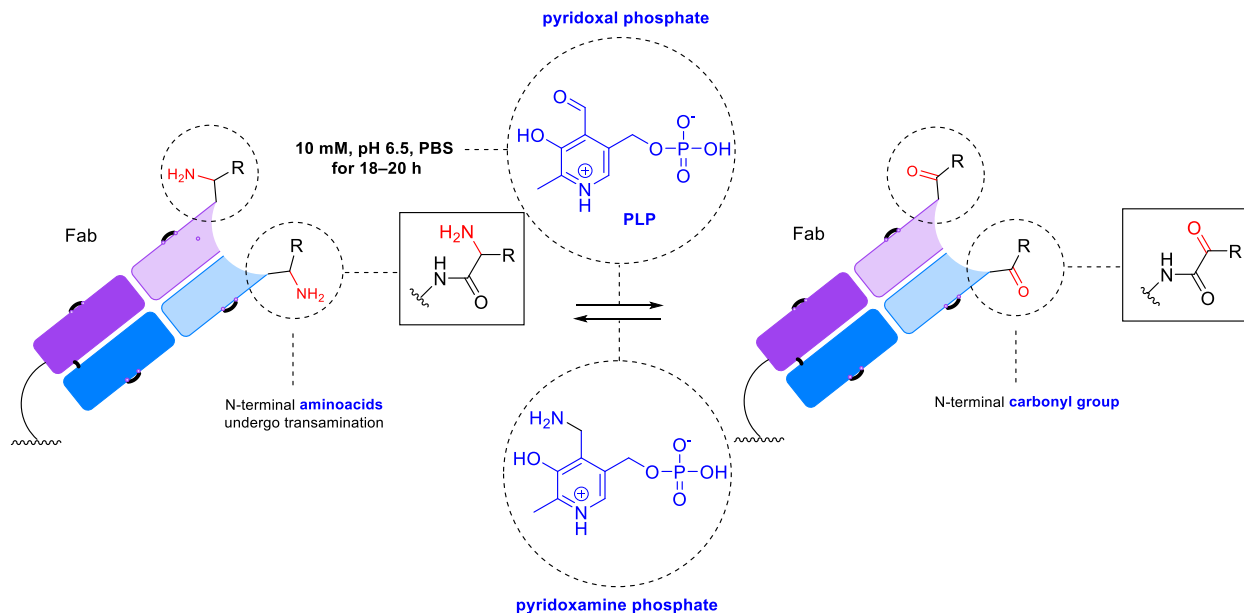


Рис. 14. Схема трансаминирования N-терминальных концов полипептидных цепей с помощью PLP¹⁵⁸

1.5.4. Ремоделинг гликанов

В эту группу методов отнесены методы, позволяющие вводить карбонильную группу в антитело путем изменения состава и структуры гликанов ферментативным способом без дополнительной генной инженерии.

Существует классический и хорошо известный ферментативный способ окисления с использованием фермента галактозооксидазы (Рис. 5, 7, 15), упомянутого выше. Этот фермент образует альдегидную группу на С6-атоме терминальной галактозы или N-ацетилгалактозамина. Однако этот метод имеет существенный недостаток относительно химического окисления: поскольку в гликопротеинах млекопитающих терминальным остатком часто является сиаловая кислота (но у человека в среднем обычно составляет менее 10–15%,^{116,117} перед обработкой галактозооксидазой требуется дополнительная обработка нейраминидазой для удаления этого терминального остатка. В случае окисления периодатом натрия дополнительных манипуляций не требуется.¹⁰²

В качестве альтернативы может быть использована посттрансляционная инженерия гликанов, расположенных на остатке аспарагина Asn-297 между двумя тяжелыми цепями

Fc-фрагмента. Она включает ферментативное введение остатков сиаловой кислоты с последующим их мягким окислением метапериодатом натрия (0.25–0.5 мМ) до карбонильных групп (Рис. 15).^{107,129}

Одним из существенных преимуществ метода является то, что сиаловая кислота окисляется в очень мягких условиях. Например, при концентрациях менее 1 мМ не наблюдается значительной потери связывания (менее 15%) с рецептором FcRn из-за окисления метионина для терапевтического антитела трастузумаба. При концентрациях более 4 мМ наблюдается 40%-ная потеря связывания.¹²⁹ Более детальный анализ антитела трастузумаба, окисленного при 1 мМ периодата показал, что наиболее важными остатками метионина для связывания с FcRn являются ~30% Met-252 и <10% Met-428. Чувствительность антител к окислению, как упоминалось выше, зависит от аминокислотного состава и структуры и может варьироваться.¹²⁹

Метод привлекателен благодаря очень мягкому окислению <0.5 мМ периодата натрия для селективного окисления сиаловой кислоты. В этих условиях практически отсутствует нежелательное окисление аминокислот, особенно метионина, что важно для времени циркуляции антитела. Кроме того, при селективном окислении остатков сиаловой кислоты антитела не теряют стабильности и не склонны к агрегации, для трастузумаба агрегация наблюдалась при чуть более жестких условиях (7.5 мМ периодата).¹²⁹ Если исходное нативное антитело не имеет остатков сиаловой кислоты в качестве терминального углевода олигосахаридов Fc-цепи и бедного галактозой и фукозой основного скелета, его можно использовать для получения конъюгатов с хорошей гомогенностью.^{107,129}

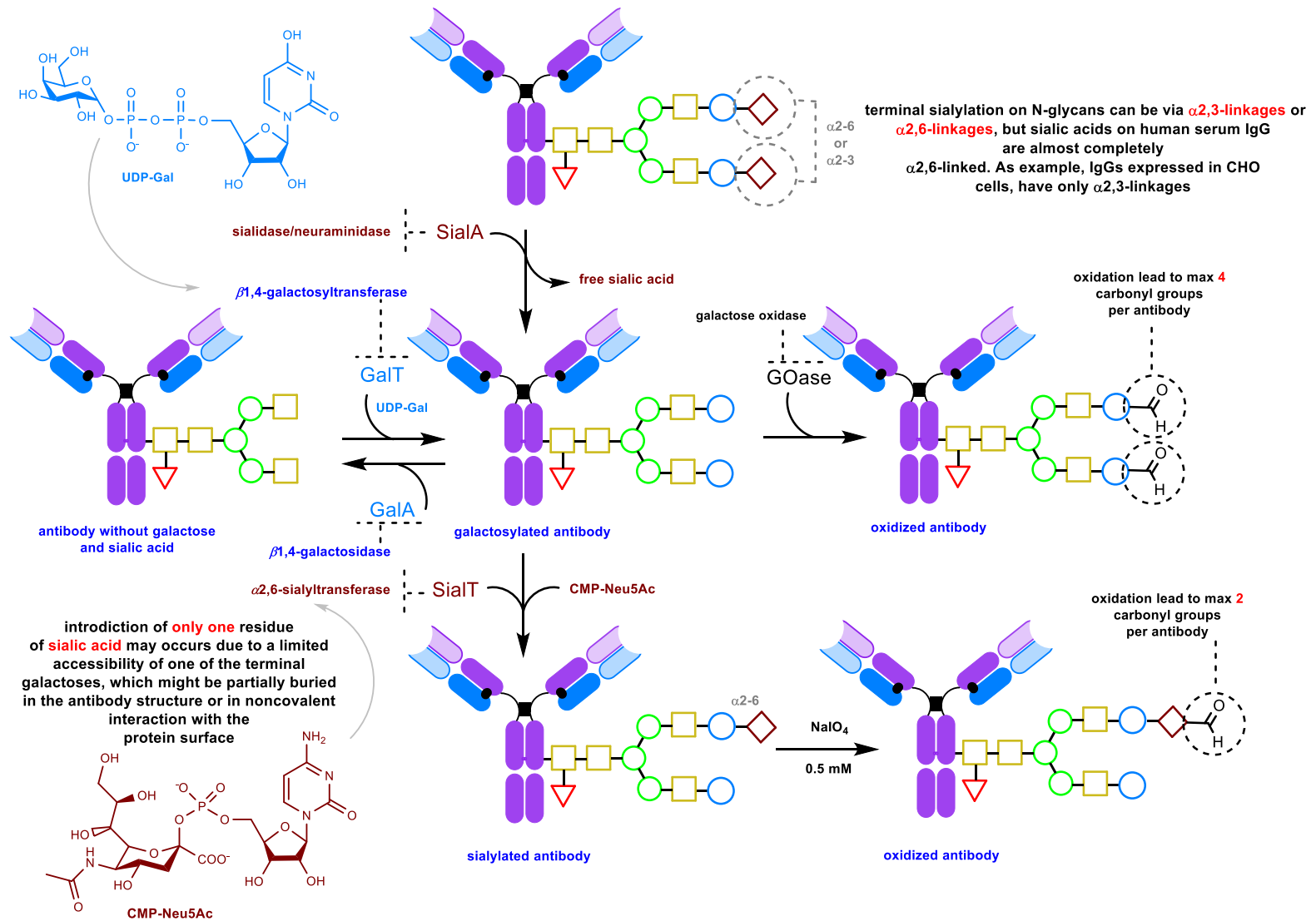


Рис. 15. Посттрансляционная ферментативная инженерия гликанов^{102,116,129,162-164}

1.5.5. Удаление гликанов и лигирование с помощью микробной трансглутаминазы

Существует также ряд методов, которые не вводят непосредственно карбонильную группу в молекулу антитела, но, тем не менее, вовлекают гликаны. К таким методам относится использование микробной трансглутаминазы (MTGase, VTGase).¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Микробная трансглутаминаза относится к ферментам семейства трансглутаминаз (TGase, EC 2.3.2.13), которые катализируют образование стабильной ковалентной связи между боковой цепью глутамина и аминогруппой лизина с образованием аммиака.^{165,168} Эти ферменты широко используются в биотехнологии для модификации белков, но исследований по модификации ими антител мало.^{165,165,167-173}

Следует отметить, что MTGase позволяет метить глутаминсодержащими линкерами лизиновые боковые группы в антителах, которые имеют принципиально сходные недостатки по сравнению с известным статистическим маркированием лизинами с помощью NHS-эфиров.¹⁶⁵

Гораздо более интересным с точки зрения гомогенности и сайт-специфичности является мечение боковых групп глутамина, аминокислоты, которая ранее не могла быть модифицирована в иммуноглобулинах, с использованием MTGase и аминокислотных линкеров (Рис. 16).¹⁶⁷⁻¹⁷³

Микробная трансглутаминаза избирательно лигирует аминокислотный линкер или оксиаминолинкер¹⁷⁵ к глутамину Q295.¹⁶⁷ Для эффективной работы MTGase гликаны должны быть удалены из Fc-фрагмента. Это может быть реализовано с помощью других ферментов, таких как пептид-N-гликозидаза F (PNGase F),¹⁶⁷ или могут быть использованы генетически сконструированные антитела без гликанов.^{168,168,171} Последний подход требует мутагенеза – замены аспарагина N297, где локализованы олигосахариды антитела, на глутамин N297Q (4 сайта для дальнейшей модификации в антителе, Q295 и Q297¹⁷¹ в каждой тяжелой цепи в области Fc) или аланин N297A (2 сайта для дальнейшей модификации в антителе, Q295 только в каждой тяжелой цепи в области Fc).^{169,171} В этом подходе вмешательство в структуру антитела позволяет пропустить этап ферментативного удаления N-гликанов с аспарагина N297, который необходим для последующей работы микробной трансглутаминазы.^{169,171}

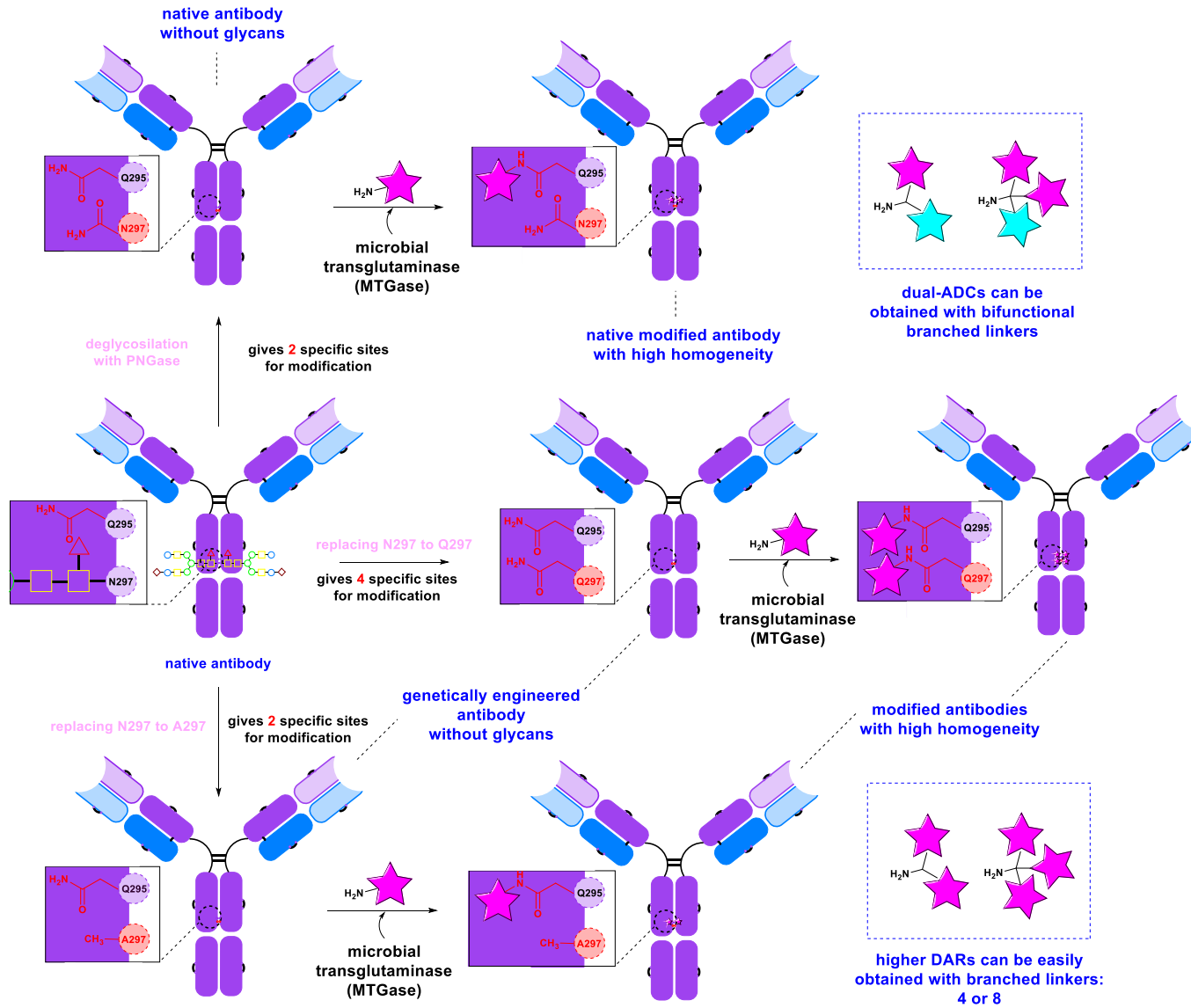


Рис. 16. Мечение антител с помощью MTGase^{167,169,171,172,174}

Метод требует нескольких ферментативных стадий¹⁶⁷ или генной инженерии,¹⁷¹ но, тем не менее, позволяет конъюгировать антитела как с линейными, так и с очень громоздкими разветвленными линкерами, увеличивая нагрузку на одно антитело до 8 молекул.^{169–171} Как и большинство ферментативных или генно-инженерных методов, этот метод дает конъюгаты с очень высокой однородностью.^{169,172,172,174}

С помощью этого подхода также удастся получить двойные ADC с двумя разными препаратами или красителями. Для этого используются разветвленные линкеры с двумя различными функциональными группами и с первичной аминогруппой для лигирования к антителу с помощью микробной трансглутаминазы (Рис. 16).^{169,171}

1.5.6. Встраивание аминокислот с биоортогональными функциональными группами

Более сложным методом введения карбонильной группы в молекулу антитела является использование модифицированных аминокислот.¹⁷⁶ Неприродные аминокислоты (UAAs), содержащие карбонильную группу, могут быть включены в антитело в строго определенных местах с помощью генной инженерии. Существует два основных подхода к получению таких генно-инженерных антител: клеточный метод (Рис. 17) и бесклеточный метод. Подробному рассмотрению особенностей этих методов посвящено несколько обзоров.^{177,178} Мы кратко рассмотрим только клеточный метод получения антител с UAAs, так как он более широко используется на практике и более разработан.

В целом, процесс начинается с распознавания антикодоном тРНК кодона в мРНК в рибосоме. Обычно UAA кодируется в мРНК нонсенс-кодоном, часто янтарным или UAG в зависимости от клеток.¹⁷⁷ Заряженная UAA ортогональная тРНК способна распознать этот кодон и включить UAA в растущую полипептидную цепь. Мутантные тРНК-синтетазы (RS) избирательно ацилируют неестественной аминокислотой только соответствующую ортогональную тРНК. Селективность пары тРНК/RS должна быть очень высокой. Мутантные RS/тРНК гены антител вводятся в клетки *E. coli* с помощью плазмид или в клетки млекопитающих с помощью векторов.^{178–182}

В случае клеточного метода получения генно-инженерных антител важно, чтобы аминокислота, содержащая карбонильную группу, могла пересекать клеточную мембрану и накапливаться в цитозоле. Неприродная аминокислота просто добавляется в среду клеточной культуры.

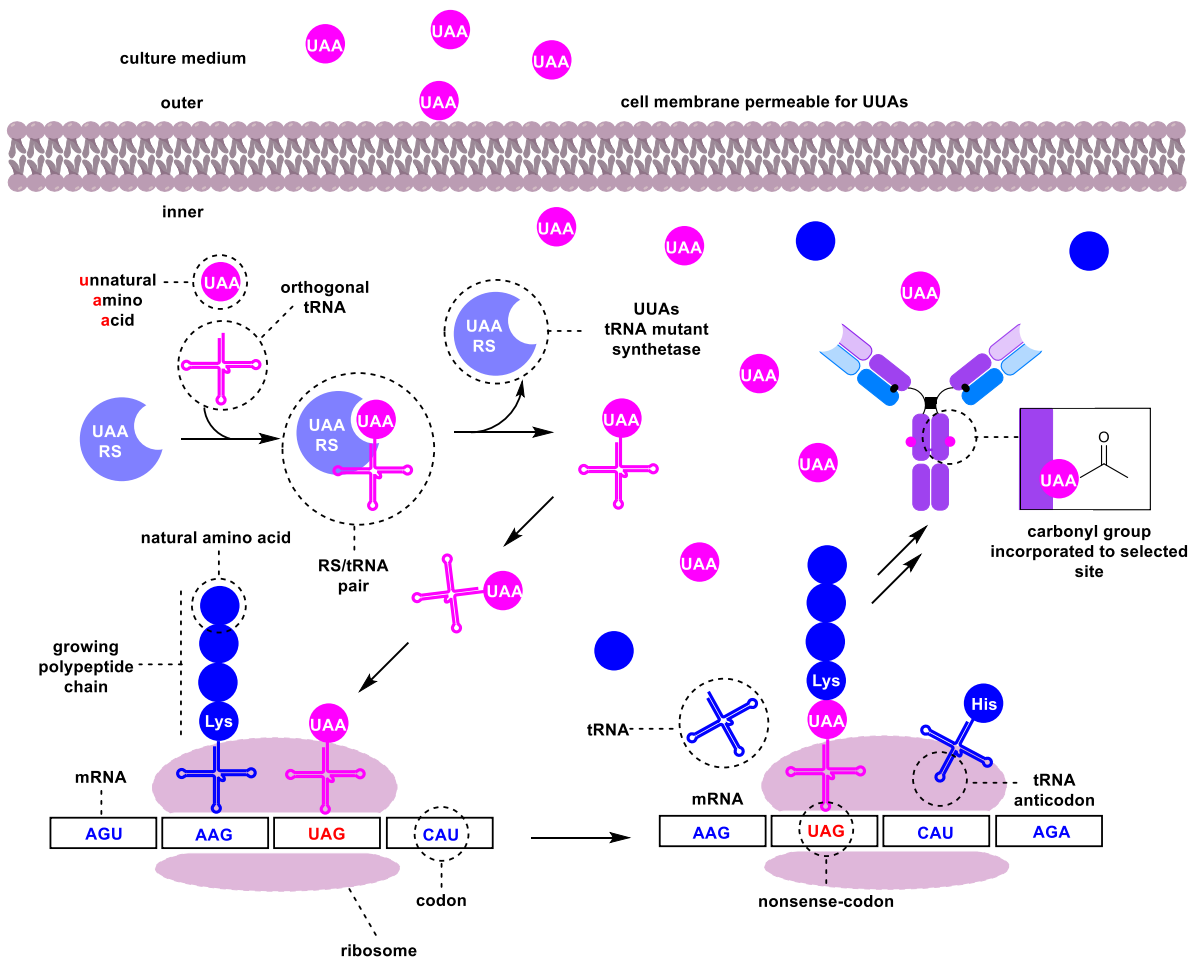


Рис. 17. Упрощенная схема процесса инкорпорации неприродных аминокислот (UAAs) в антитело^{176,178,179}

Для введения карбонильной группы обычно используется *p*-ацетилфенилаланин pAcF, но существуют и другие аналоги (Рис. 18)¹⁷⁸.

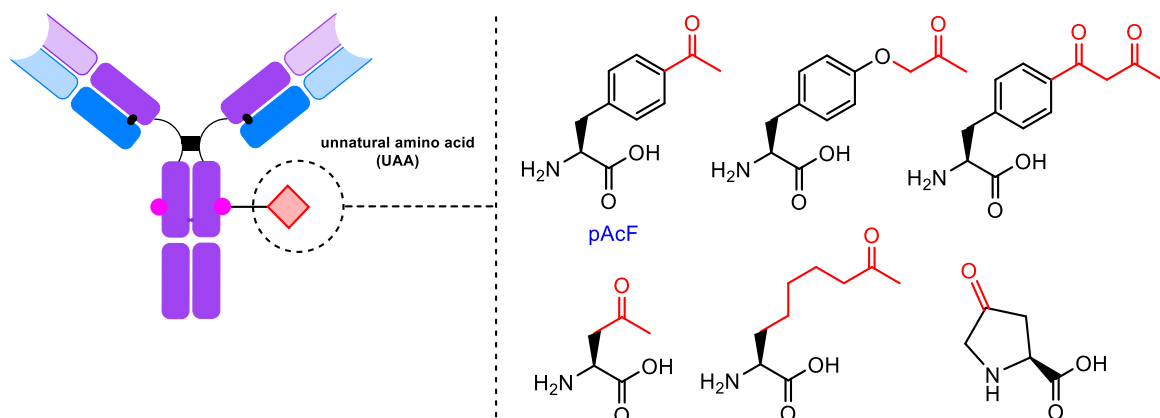


Рис. 18. Примеры неприродных аминокислот, содержащих карбонильную группу^{36,177,180,183–190}

В качестве примера, мутантный анти-HER2 иммуноглобулин с pAcF был получен в *Escherichia coli* с янтарным нонсенс-кодоном TAG с ортогональной супрессорной парой аминоксил-тРНК синтетаза/тРНК, полученной из *Methanococcus jannaschii*.^{184–186,188,191–194}

Также был разработан метод введения неприродных аминокислот с защищенной α -оксоальдегидной группой с последующим деблокированием (Рис. 19),^{195–197} а так же мягкое окисление терминального N-фенилглицина кислородом воздуха в нейтральной среде.^{44,187}

Существует так же подход, использующий введение природных аминокислот с последующей модификацией до карбонильной группы – например, ферментативная модификация цистеина до формилглицина (Рис. 20)^{30,198–201} или химическое окисление N-концевых серина,^{157,202–206} треонина и пролина,²⁰⁷ как описано ранее (Рис. 13).

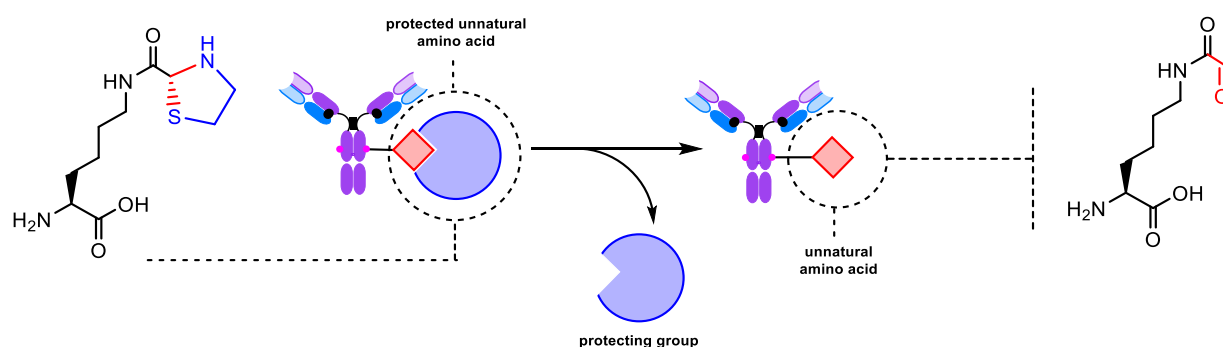


Рис. 19. Защищенные генно-инженерные аминокислоты с защищенной α -оксоальдегидной группой^{195–197}

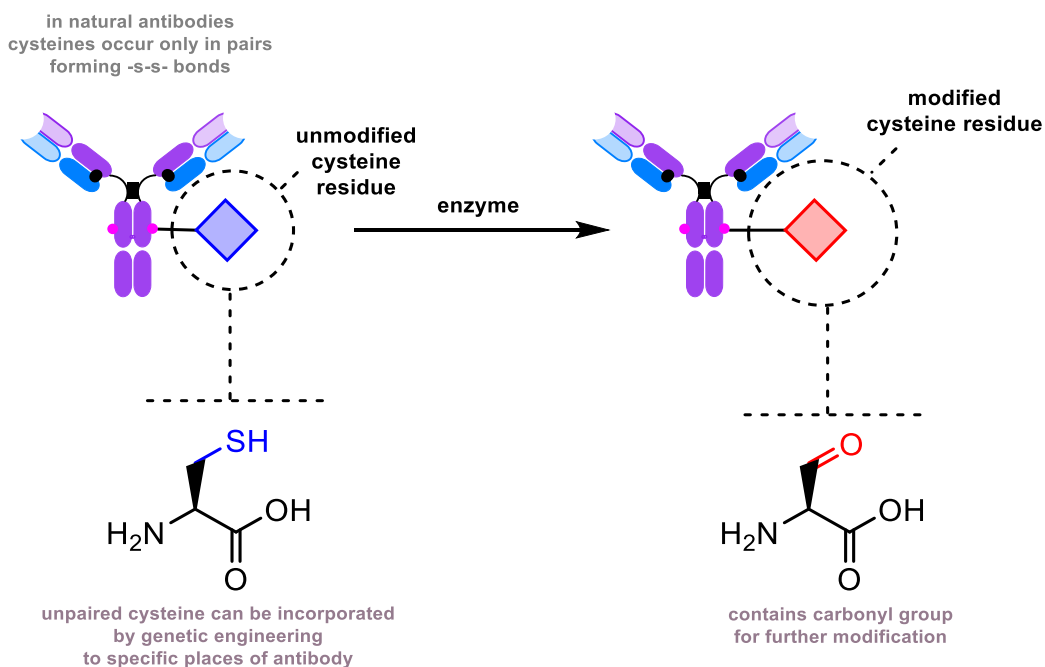


Рис. 20. Ферментативное окисление введенного генно-инженерным путем цистеина^{30,198–201}

Несмотря на высокую гомогенность получаемых препаратов, метод имеет существенные недостатки: он требует инженерии аминокислотной последовательности

антитела и последующего биотехнологического производства целевого белка, что в свою очередь требует оптимизации клеточной культуры и т.д. Это делает подход трудоемким и дорогостоящим.^{101,129}

1.5.7. Модификация олигосахаридов

Инженерия гликозилирования Fc-фрагмента антитела является хорошей стратегией для повышения безопасности и эффективности терапевтических IgG-антител. Как упоминалось выше, гликаны во многом определяют эффекторные свойства антитела, такие как ADCC (антитело-опосредованная цитотоксичность) и CDC (комплемент-опосредованная цитотоксичность).^{109,115} Таким образом, манипулируя гликанами, следует ожидать изменения этих свойств. Помимо периодатного окисления гликанов и классического ремоделирования с помощью природных ферментов, существует также ряд методов посттрансляционной модификации с использованием мутантных ферментов, таких как мутантная β 1,4-галактозилтрансфераза¹³¹ и эндогликозидаза EndoS.¹⁰⁷ Эти ферменты позволяют вводить в гликаны неприродные сахара (для введения карбонильной группы обычно используют кето-галактозу)¹³¹ с целевой функциональной группой или модифицировать структуру гликанов с последующим окислением периодатом.¹⁰⁷ В настоящее время набор таких групп широк, но в данном обзоре будут рассмотрены только подходы, связанные с введением карбонильных групп.¹³¹

Широко распространенным подходом является введение реакционноспособной кето-галактозы в антитело с помощью мутантной β 1,4-галактозилтрансферазы (Рис. 21). Этот подход позволяет вводить большее количество молекул полезной нагрузки – 4 против 1.6 при введении остатков сиаловой кислоты, описанных выше.¹³¹

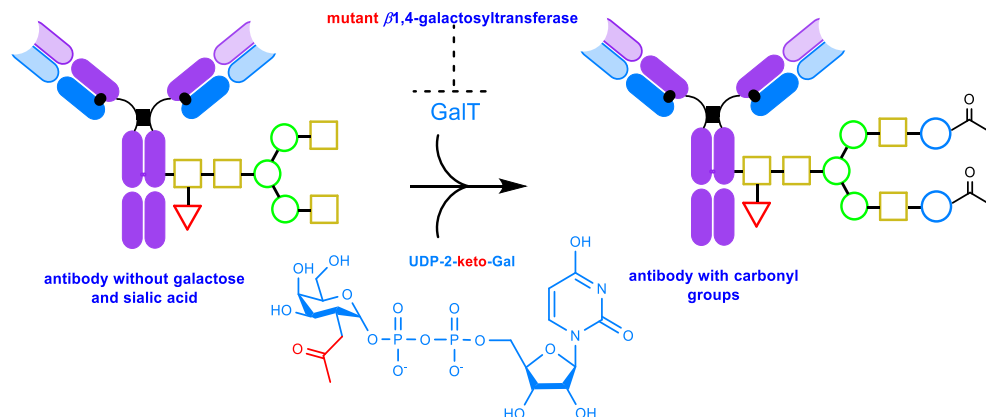


Рис. 21. Посттрансляционная ферментативная инженерия гликанов^{107,131}

Альтернативный метод: хемоферментный синтез гликоинженерных IgG – gsADCs с полезной нагрузкой (Рис. 22).^{107,111,208,209} С использованием мутантной гликозидазы Endo-S D233Q и неприродных N-гликановых оксазолинов в качестве субстрата карбонильные группы также могут быть введены с помощью периодатного окисления для последующего оксимного лигирования.¹¹¹ Различные подходы к образованию N-гликановых оксазолинов рассмотрены в обзоре.²¹⁰

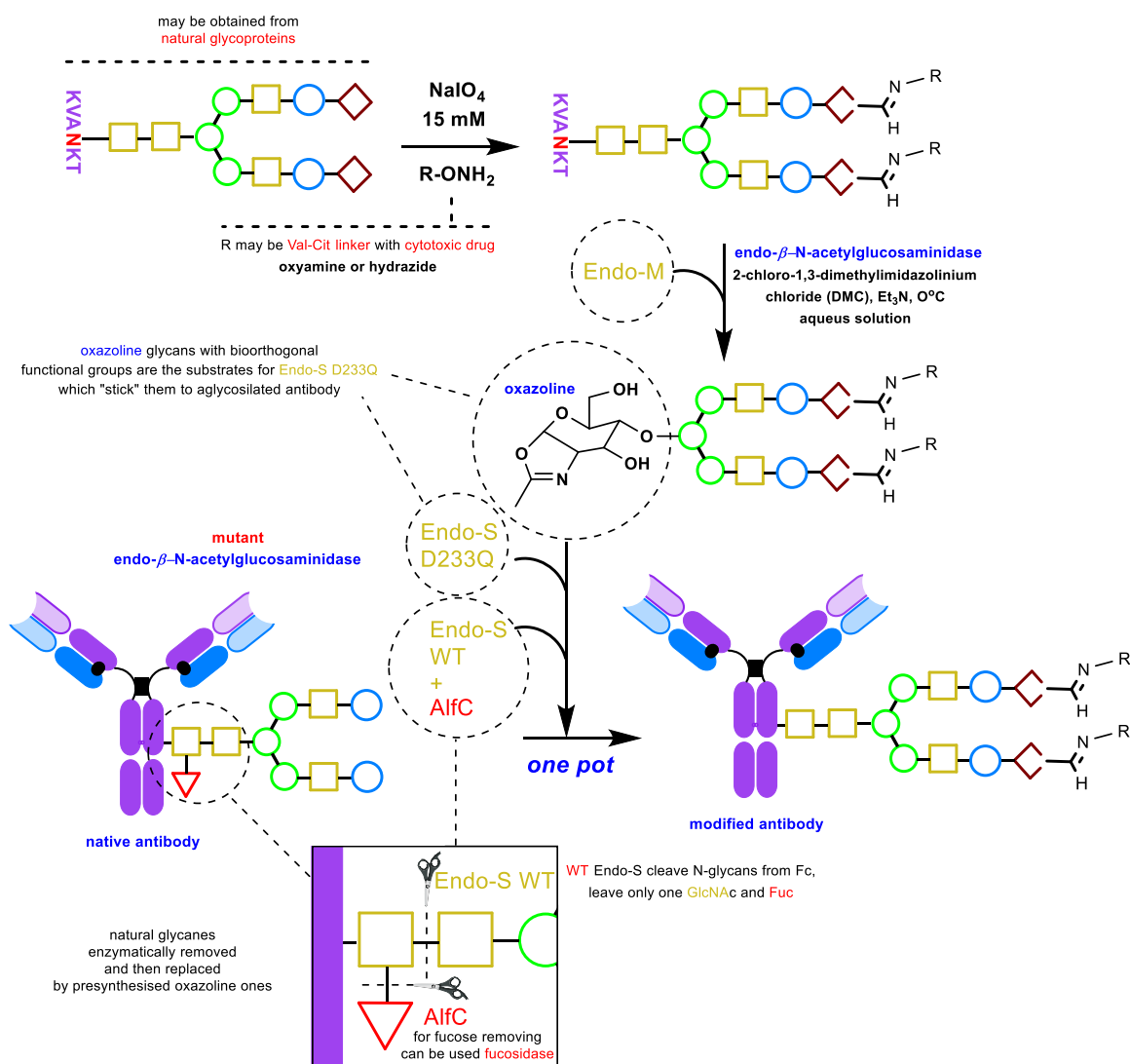


Рис. 22. Посттрансляционная модификация гликанов^{107,111,131,208}

После этой ферментативной процедуры на гликопротеинах остаётся лишь GlcNAc (Рис. 22). Далее другой фермент, мутантная эндогликозидаза, также известная как гликосинтаза, лишённая гидролитической активности, но обладающая высокой способностью к трансгликозилированию, используется для присоединения предварительно

синтезированного оксазолина N-гликана с соответствующей биоортогональной функциональной группой (например, карбонильной). Этот гликан был присоединен к участку GlcNAc антитела, предварительно агликозилированного WT-ферментом, как описано выше. Если требуется афукозилирование, на этапе агликозилирования можно дополнительно использовать фукозидазу AlfC из *Lactobacillus casei* (Рис. 22).²¹² Вся эта процедура быть выполнена в один этап.¹¹¹

Эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза из *Streptococcus pyogenes* (Endo-S) – хорошо известный эндогликозидазный фермент,^{212–216} который распознает N-гликаны на Fc фрагменте IgG и который давно используется для ремоделирования гликанов антител. Его субстратами является широкий спектр гликанов. В настоящее время получено большое количество мутантных вариантов фермента, которые позволяют присоединять к антителу даже богатые маннозой и сложные гликаны. В качестве примера можно привести Endo-S2^{208,209} или Endo-S D233Q.¹¹¹ В настоящее время метод гликановой инженерии с использованием мутантной глюкозаминидазы является предметом большого количества обзоров.^{217–220}

Субстратом для мутанта Endo-S D233Q являются производные оксазолинового гликана (Рис. 22). Они могут быть получены one pot из природных гликопептидов, таких как сиалилгликопептид яичного желтка (SGP), с помощью эндогликозидазы Endo-M из *Mucor hiemalis* и последовательного образования оксазолина в водном растворе в присутствии 2-хлор-1,3-диметилимидазолиний хлорида (DMC).¹¹¹

Присоединение карбонильной группы к гликанам может быть осуществлено с помощью периодатного окисления (15 мМ NaIO₄, фосфатный буфер, pH 7.0), однако перед модификацией оксазолином необходимо последующее лигирование оксима.¹¹¹ Окисление гликанов и оксимное лигирование можно проводить таким же образом после сборки гликанов и антитела, но с меньшей концентрацией периодата.²²¹

Интересным примером, демонстрирующим широкие возможности генной инженерии, является ремоделирование гликанов, при котором полностью исключается использование природных ферментов, вместо этого используется мутант Endo-S D233Q и генно-инженерное антитело, содержащее карбонильную группу, которая в свою очередь получается ферментативным окислением генетически включенного вместо N297 цистеина с помощью FGE до формилглицина, как описано выше (Рис. 23).²²²

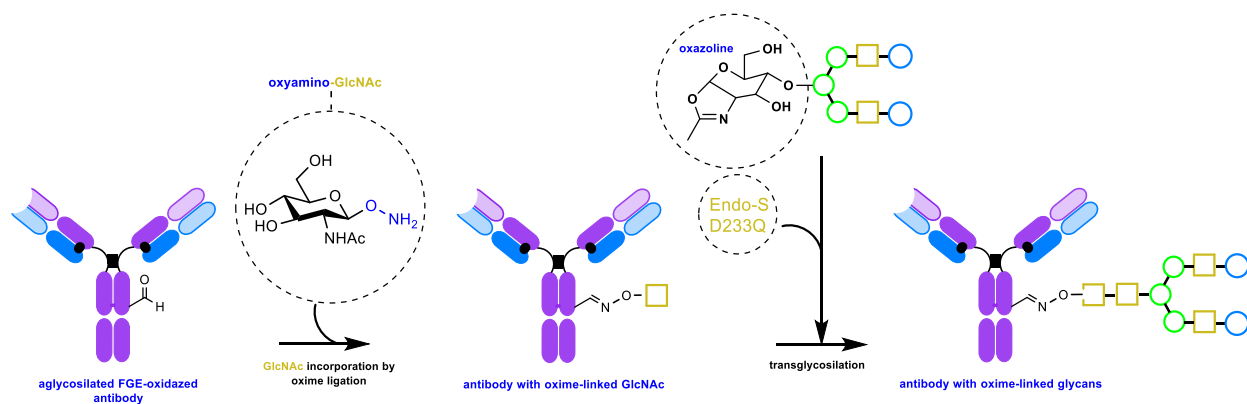


Рис. 23. Посттрансляционная ферментативная инженерия гликанов в сочетании с генной инженерией антител²²²

1.5.8. Генноинженерные ферменты

В настоящее время известно несколько примеров введения карбонильной группы с помощью ферментов.^{223,224} Эти методы чрезвычайно громоздки. В первом случае в С-конец легкой цепи антитела путем генной инженерии вводится гибкий глициновый линкер (G7) и специальный мотив CaaX (Cys-Val-Ile-Met), способный распознавать фермент фарнезилтрансферазу (FTase, EC 2.5.1.58). Затем он используется для присоединения пирофосфата геранилкетона, содержащего карбонильную группу, к антителу (Рис. 24).^{223,224} Метод очень сайт-специфичен, поскольку пренилирование осуществляется строго в соответствии с последовательностью, которую распознает фермент. Два фрагмента с карбонильной группой могут быть введены в одну молекулу антитела. В процессе модификации не наблюдается повреждающего действия на антитело; сайт модификации локализован на расстоянии от центра связывания антигена, поэтому не происходит снижения аффинности. Однако введение дополнительных аминокислотных последовательностей в молекулу антитела накладывает определенные ограничения на метод.^{223,224}

1.6. Модификация антител по карбонильным группам

Карбонильная группа в составе антитела открывает широкий путь для дальнейших модификаций с помощью оксимного лигирования. Самым простым и доступным вариантом является лигирование по карбонильной группе иммуноглобулина гидрофильного протяженного линкера (Рис.25), несущего биоортогональную функциональную группу, например, азид^{111,125,225,226} или циклооктин,^{111,226} алкин,¹¹¹ или даже снова оксиамин.¹⁸¹

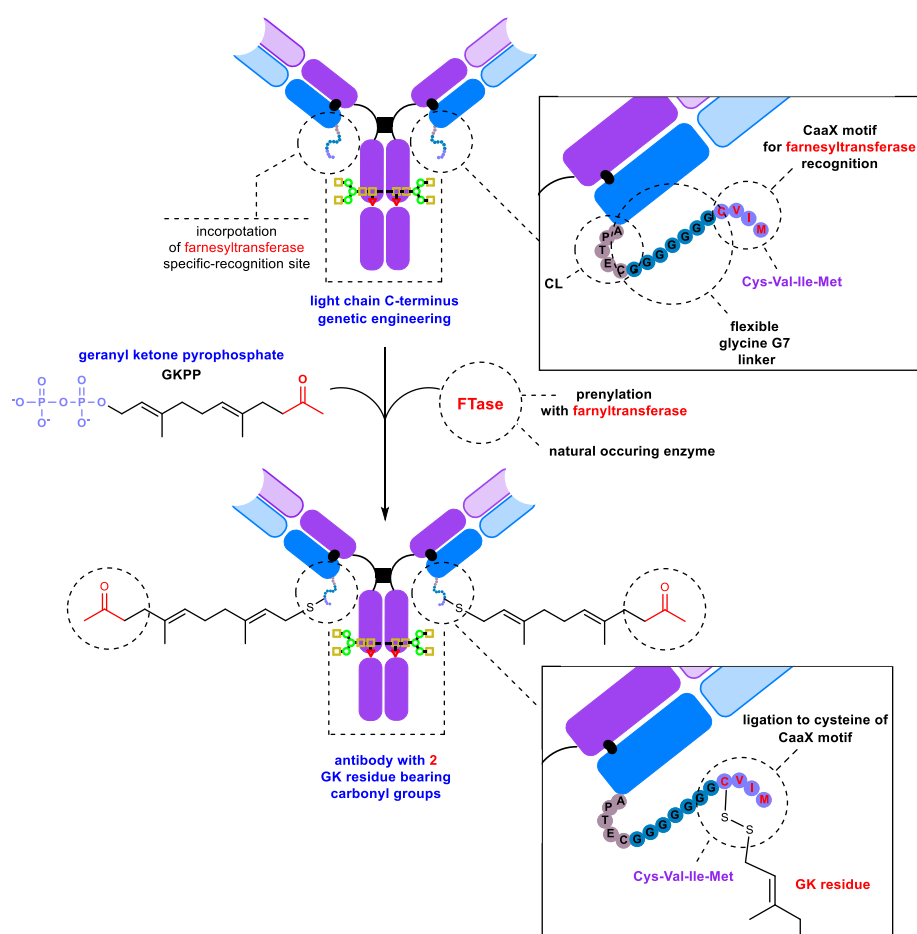


Рис. 24. Введение карбонильной группы в антитело с использованием фарнезилтрансферазы (FTase)^{223,224}

Такая модификация позволяет проводить дальнейшую модификацию красителем или цитотоксическим препаратом, избегая стерических затруднений и снижения растворимости получаемого конъюгата последовательно шаг за шагом (Рис. 26).

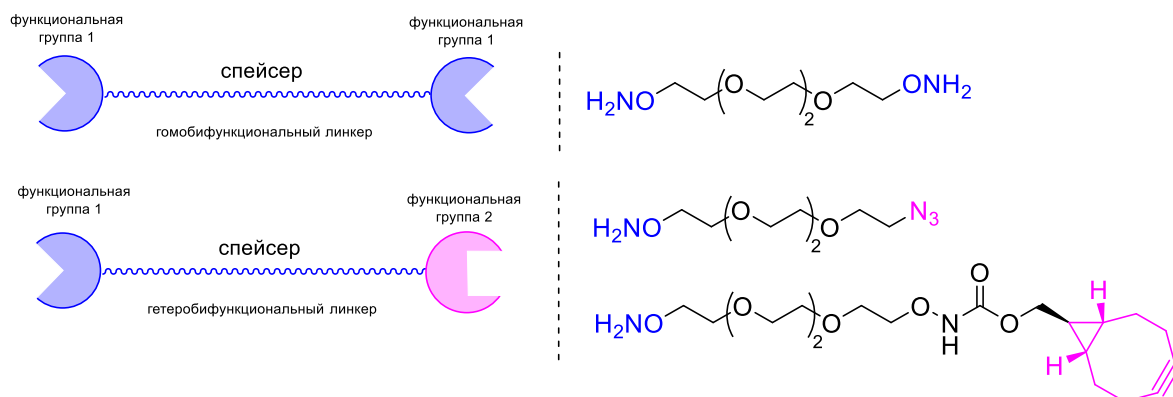


Рис. 25. Примеры бифункциональных оксаминовых линкеров

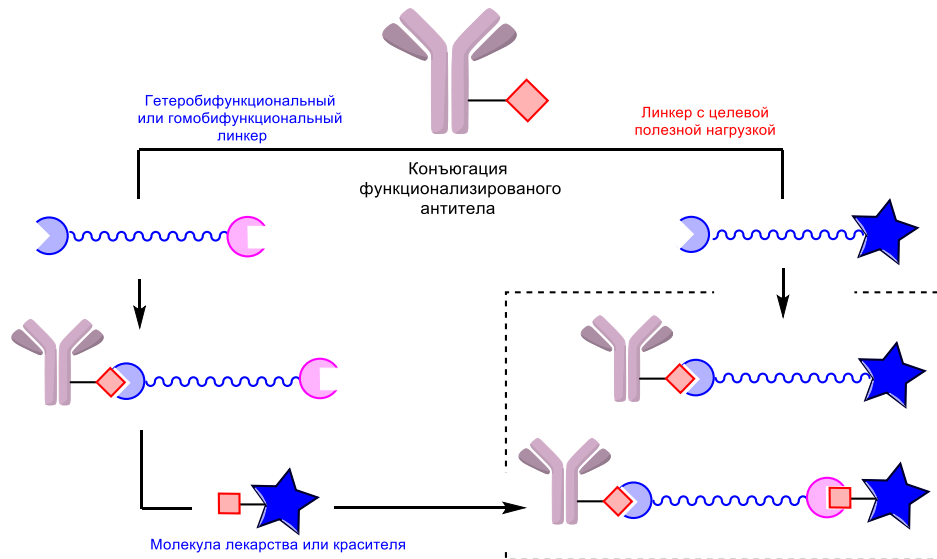


Рис. 26. Два подхода модификации антител по карбонильным группам с помощью линкерных молекул. Слева: последовательная сборка. Справа: лигирование «в один шаг» по функциональным группам антитела.

С другой стороны, карбонильная группа открывает возможность лигирования целевой молекулы непосредственно на антитело в один шаг, без дополнительных процедур (Рис.26, 27).

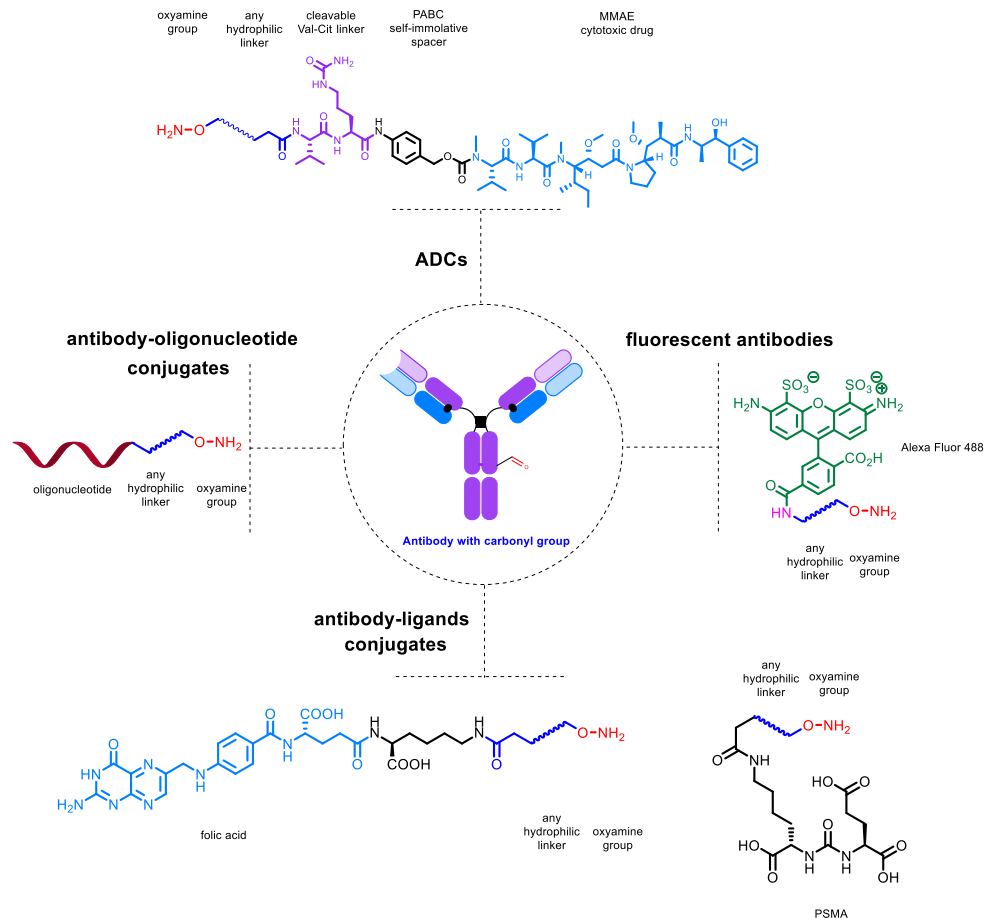


Рис. 27. Примеры конъюгатов, полученного по стратегии присоединения к молекуле антитела линкера с полезной нагрузкой в один шаг с помощью оксимного лигирования.

Таким образом получены конъюгаты антитела с красителями^{186,199,226} с цитотоксическими препаратами, например, из группы монометилауристатинов^{131,191,194,224,227} с фолиевой кислотой,²²⁸ PSMA-лигандом,¹⁹³ агонистами LXR,²²⁹ пирролобензодиазепинами²²³ и другими малыми молекулами. Существует так же множество конъюгатов антител с олигонуклеотидами.^{184,185,192,230}

Таким образом, оксимное лигирование является достаточно удобной биоортогональной реакцией, применимой в том числе для модификации антител с целью получения ADC.

Глава 2

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белок PRAME (*Preferentially expressed antigen in melanoma, CT130, MAPE, OIP-4, OIP4*),^{231,232} относящийся к раково-тестикулярным антигенам, сверхэкспрессируется при ряде онкологических заболеваний.²³³ Впервые этот белок был обнаружен в 1997 году Н. Ikeda и соавторами в клетках миеломы.²³² Согласно медицинской базе публикационных данных PubMed, интерес к PRAME непрерывно растет: с 1997 по 2023 год опубликовано около 500 статей, упоминающих этот опухолевый антиген (Рис. 28). При этом в первые 3 месяца 2023 года было опубликовано 32 статьи, демонстрирующие исключительную важность PRAME в качестве маркера злокачественного процесса при развитии солидных опухолей: шейки матки,²³⁴ эндометрия,²³⁵ мочевого пузыря,²³⁶ гортани,²³⁷ меланомах,^{238–249} в том числе и меланоме глаза,²⁵⁰ остеосаркоме,²⁵¹ синовиальной саркоме,²⁵² опухолях головы и шеи,²⁵³ груди.²⁵⁴ Ранее было также показано, что PRAME экспрессируется при онкологических заболеваниях крови.^{255–258}

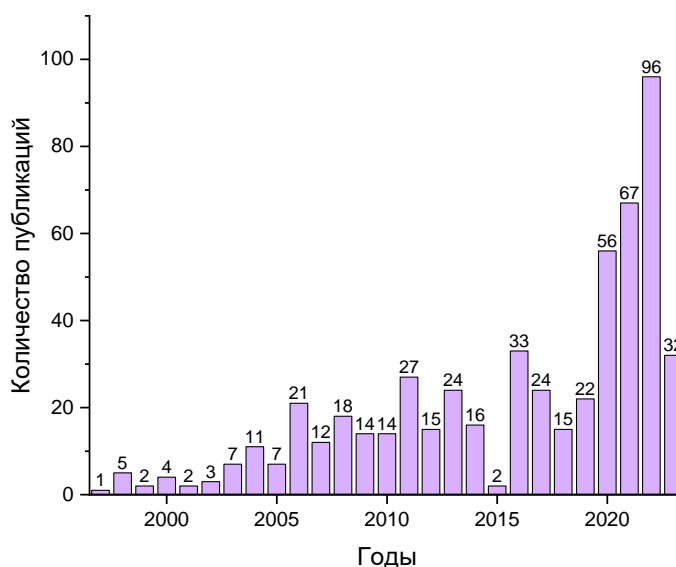


Рис. 28. Число публикаций в системе PubMed, связанных с опухолевым антигеном PRAME

Наиболее часто PRAME-положительны меланомы (91%), карциномы легкого (78%), аденокарциномы (46%), почечные карциномы (41%), саркомы (39%), в том числе карциномы головы и шеи (39%) и острые лейкозы (33%).²³²

Кроме того, что этот белок является перспективным маркером для диагностики злокачественного процесса в тканях,²⁵⁹ он пригоден для оценки дальнейшего течения болезни и выбора противоопухолевой терапии, так как при многих видах рака его экспрессия коррелирует с дальнейшим прогнозом, например, при детских,^{260,261} и взрослых острых миелоидных и лимфобластных лейкозах (ОМЛ и ОЛЛ),²⁵⁵ и хронических

миелоидных лейкозах (ХМЛ),²⁶² а также раке легкого,^{263,264} и рака молочной железы (РМЖ).²⁵⁴ Также рост экспрессии PRAME наблюдается при начале развития рецидива заболевания, еще до появления клинических признаков, что может быть полезно для его экстренного купирования.^{261,265}

В нормальных тканях экспрессия PRAME наблюдается в незначительном количестве только в тканях семенников и еще на меньшем уровне в тканях эндометрия.²³² Роль белка в этих тканях недостаточно ясна, однако предполагается, что белок участвует в регуляции передачи сигнала в рецепторах ретиноевой кислоты.²⁶⁶ Недавно также было показано структурное сходство PRAME с рецепторами TLR и его участие в различных иммунных процессах, а также индукция его экспрессии INF- γ .²⁶⁷ В этой статье высказывается предположение, что PRAME может быть сенсором внутриклеточной инфекции. Его быстрая экспрессия и деградация делает его не детектируемым в нормальных соматических клетках. Однако исходя из того, что хроническое воспаление часто присутствует при патогенезе многих опухолевых заболеваний, например, лимфом и лейкозов, авторы предполагают, что постоянная активность провоспалительных клеточных путей может приводить к оверэкспрессии PRAME. Авторы указывают, что в промоторе найдены регуляторные элементы, подчиняющиеся NFKB, IRFs и STAT.²⁶⁷ Также в 2023 году показана связь PRAME и пары Wnt/ β -катенин в опухолевой трансформации при развитии рака шейки матки.²³⁴

Однако в норме белок PRAME не экспрессируется на мембране клетки и преимущественно находится в цитозоле и в небольшом количестве в ядре, в то время как при развитии патологии, наблюдается увеличение его количества в ядре и появление на мембране клетки.^{262,268,269} Таким образом достоверно подтвержденное наличие PRAME на мембране является важным индикатором развития онкологического процесса в клетке.²⁵⁶⁻²⁵⁹ Наличие белка PRAME наблюдалось на поверхности лейкозных клеток K562,^{256,260-262} что позволило предположить возможность использования PRAME в качестве мишени для иммунотерапии.^{257-259,270} Также было показано, что PRAME присутствует на мембране других клеточных линий, например, острого моноцитарного лейкоза THP-1²⁶⁸ и солидных опухолей, например, меланомы mel P,²³² рака легких A549.²⁶⁴ Поскольку экспрессия PRAME не ограничивается лейкозами, наблюдение за его экспрессией в клетках солидных опухолей позволит разрабатывать новые препараты также и для этих заболеваний.^{233,259} Недавно появилось сообщение о разработке CAR-T терапии на основе PRAME.²⁷¹

В литературе описано несколько попыток получить моноклональное антитело к мембранной форме белка PRAME.^{268,269} Коллегами из Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина (В.А. Мисюрин, А.Е. Бармашов,

Ю.П. Финашутина) совместно с ООО «Генотехнология» (А.В. Алексеева, Н.А. Тихонова, Н.А. Лыжко, А.В. Мисюрин) была выделена мембранная форма PRAME и получено несколько уникальных моноклональных антител изоформы IgG1 к различным эпитопам, мышинных 5D3 и 6H8, так и гуманизированных hu5D3 и hu6H8.^{272,273} Подобное антитело может быть использовано как для детекции этого белка, так и для разработки терапевтических препаратов в случае, если PRAME способен к интернализации после связывания с антителом. В литературе есть сообщения, подтверждающие интернализуемость такого комплекса.²⁶⁸

2.1. Мечение антител флуоресцентными красителями

В первую очередь представляет интерес прямая детекция связывания антитела с PRAME, что возможно с помощью проточной цитометрии, если антитела содержат флуоресцентную метку. Существуют примеры окрашивания мембран клеток K562 с помощью PRAME-распознающих антител²⁶⁸. Однако все эти исследования выполнены с помощью вторичных флуоресцентных антител к интактным анти-PRAME первичным антителам. Для проточного цитометра подобная конструкция является громоздкой.

Поэтому возникла необходимость разработки надежной процедуры флуоресцентного мечения моноклонального антитела, сохраняющей его аффинность к PRAME. При синтезе флуоресцентного конъюгата существует ряд определяющих его финальные свойства условий: сайт конъюгации с антителом, биоортогональность применяемых реакций, природа линкера и красителя, а также степень мечения (число молекул полезной нагрузки, degree of labeling – DOL или drug-antibody ratio – DAR) (Рис. 29).

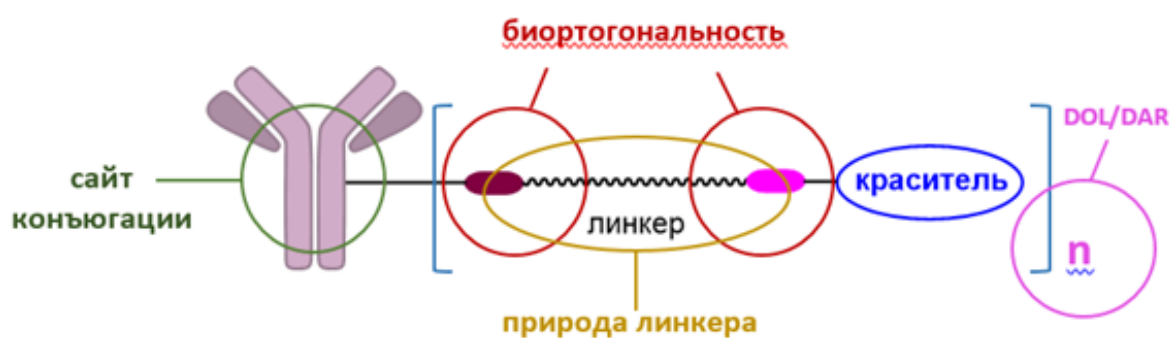


Рис. 29. Общая схема конъюгата антитела и его важнейшие особенности. Свойства конъюгата определяются сайтом конъюгации, биоортогональностью применяемых при синтезе реакций, природой линкера, а также степенью мечения (DOL, degree of labeling; DAR, drug-antibody ratio).

В настоящее время разработано большое количество методов, позволяющих проводить конъюгацию антител и флуоресцентных красителей.²⁷⁴ Наиболее распространенным является мечение по боковым группам аминокислоты лизина²⁷⁵ с помощью NHS-эфиров коммерчески доступных красителей, а также мечение по

предварительно восстановленным интра-²⁷⁶ и интерцепочечным²⁷⁷ дисульфидам малеимидами. Однако эти методы имеют недостатки, основным из которых является получение гетерогенных конъюгатов^{278,279} и непредсказуемое распределение участков мечения в антителе. Последнее может приводить к существенному снижению аффинности и стабильности антитела.²⁷⁹ В связи с этим существует запрос на альтернативные сайт-специфические подходы к мечению антител.

Периодатное окисление гликанов иммуноглобулина давно известно и представляет интерес для сайт-специфической модификации, поскольку гликаны присоединены к тяжелой цепи вдали от антигенсвязывающего участка (см. Обзор литературы). Последующая модификация образующихся альдегидных групп может быть осуществлена реакцией с бифункциональным или полифункциональным линкером, содержащим оксиаминовую группу. Такой метод позволяет вводить в антитело биоортогональные функциональные группы, по которым можно проводить дальнейшую модификацию антитела подходящим производным флуоресцентного красителя.

Таким образом, для флуоресцентного мечения был выбран подход, связанный с модификацией углеводного фрагмента антитела. Данный способ обладает несколькими преимуществами по сравнению с широко используемыми реакциями модификации аминокислотных и тиольных групп антител. Кроме углеводного сайта, другие фрагменты антител не окисляются и не меняют своих функций. Как отмечалось выше, сайт гликозилирования находится в отдалении от узнающего антиген сайта, в Fc-фрагменте. Таким образом, конъюгация антител с низкомолекулярными соединениями через углеводный участок не должна оказывать значительного влияния на аффинность антитела к антигену. Для выбора наиболее оптимальных условий периодатного окисления, а именно температуры, концентрации окислителя и времени проведения реакции, мышинные антитела к мембранной форме белка PRAME 6H8, переданные коллегами из НМИЦ Н.Н. Блохина, были подвергнуты модификации при различных условиях (Рис. 30).

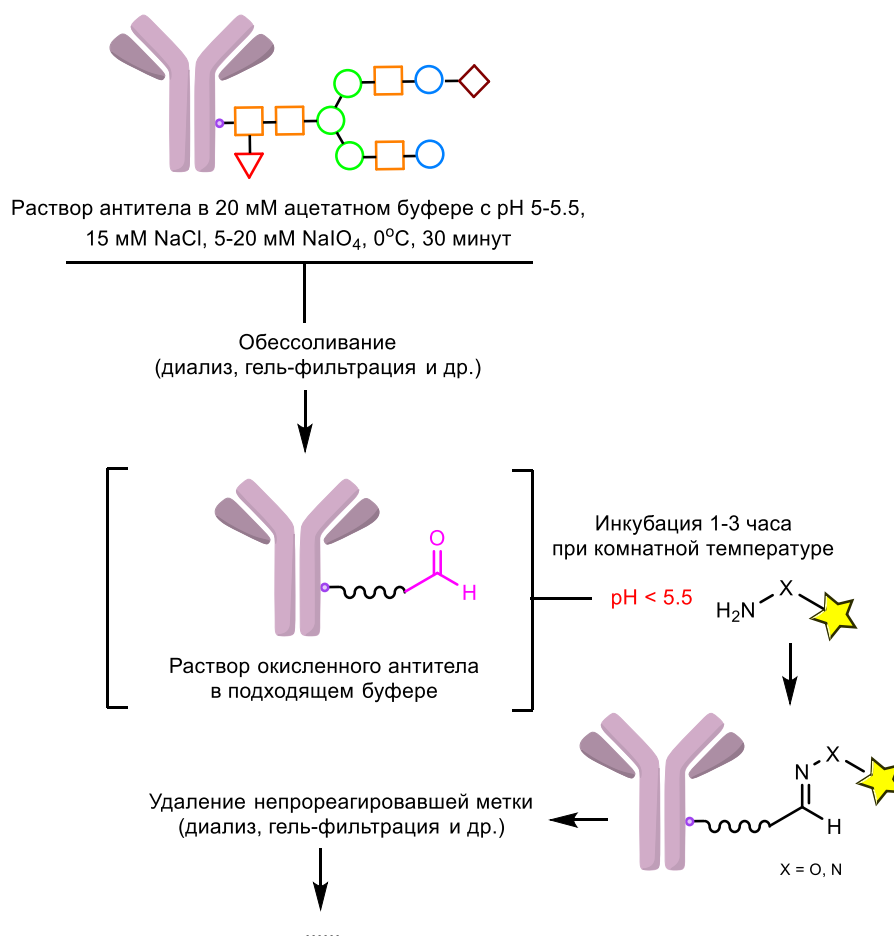


Рис. 30. Общая схема окисления периодатом и дальнейшее лигирование по карбонильным группам антитела

Антитело 6Н8 окисляли при двух различных концентрациях периодата, 5 мМ и 20 мМ, при комнатной температуре и при 0 °С (Рис. 31). В качестве буфера был выбран 20 мМ ацетат с pH 5.0 и 150 мМ NaCl. Во всех случаях реакция продолжалась в течение 30 мин. После этого избыток периодата гасили 20%-ным раствором глицерина в воде. Антитела очищали гель-фильтрацией, а затем инкубировали с семикарбазидом в течение 60 мин в ацетатном буфере при pH 5.0. Модифицированные антитела анализировались методом ИФА.¹ Было обнаружено, что в случае антитела 6Н8 концентрация периодата в диапазоне 5–20 мМ не оказывала существенного влияния на аффинность. Аналогично, температура реакции также не оказывала существенного влияния, и во всех случаях антитело сохраняло свою аффинность. Основываясь на полученных данных, мы выбрали концентрацию периодата натрия 20 мМ, комнатную температуру, инкубацию в течение 30 мин и ацетатный буфер с pH 5.0 для получения антител с карбонильными группами, пригодных для дальнейшей модификации с целью получения флуоресцентных конъюгатов.

¹ ИФА выполнен М.А. Симоновой (Лаборатория молекулярной диагностики ИБХ РАН)

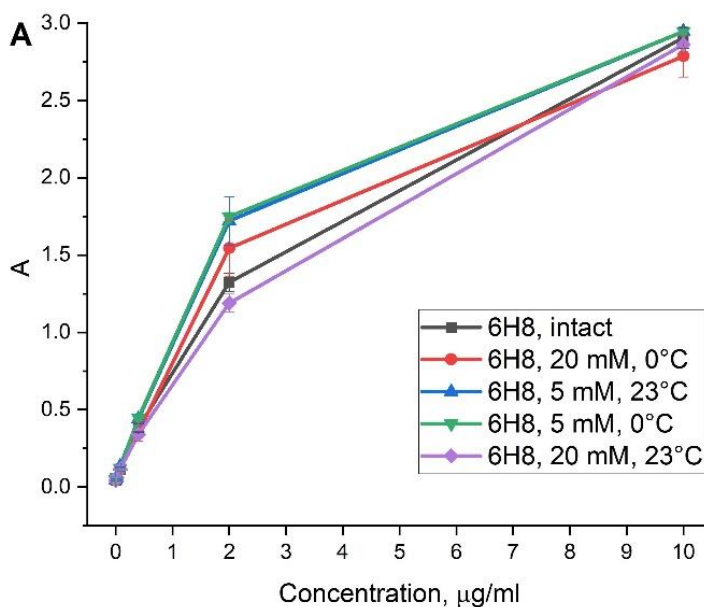


Рис. 31. ИФА окисленных антител 6H8 к опухолевому антигену PRAME. Окисление проводилось при различных концентрациях периодата натрия NaIO_4 (5 и 20 мМ); различных температурах (0 и 23 °С); в течение 30 мин. После окончания реакции все антитела были обработаны семикарбазидом (2 мМ, рН 5.0, 60 мин, 23°С) для превращения реакционноспособных альдегидных групп в гидразиды.

После окисления углеводной части иммуноглобулина периодатом его последовательно обрабатывали бифункциональным азидо-оксиаминовым реагентом **3** и алкиновым производным сульфированного цианинового красителя sCu3 **4** в условиях биоортогональной клик-реакции (Схема 4). Этот подход основан на широко используемых методах: модификации карбонильных соединений *O*-алкилгидроксиламинами и Cu(I)-катализируемом циклоприсоединении терминальных алкинов к азидам.

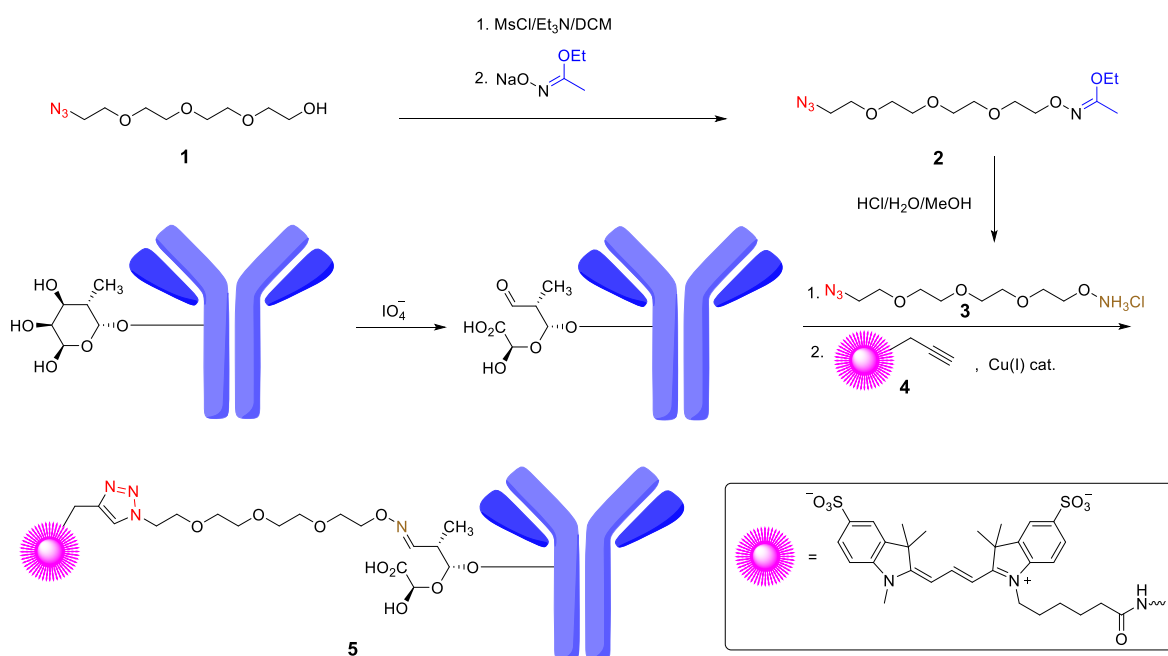


Схема 4. Получение флуоресцентно меченого антитела. Схематически изображено окисление L-фукозы в альдегидо-кислоту.

Синтез азидо-оксиаминового реагента **3** осуществляли из известного²⁸⁰ азидоспирта **1** с использованием этоксиэтилиденовой защитной группы для гидроксилamina (Схема 4). Ранее в превращении вещества **1** в реагент **2** защищенный гидроксилamin использовали *трет*-бутоксикарбонильную и фталимидную защитные группы; мы нашли, что более удобной защитой является этоксиэтилиденовая группа. Алкилирование этил-*N*-гидроксиацетимидата натрия мезилатами спиртов с последующим деблокированием является удобным методом получения соответствующих *O*-алкилгидроксиламинов.²⁸¹ Проведение реакции в смеси *трет*-бутанола и изопропанола (1:1) позволило получить защищенное производное **2** с хорошим выходом (при проведении реакции в метаноле наблюдалось образование значительных количеств продукта алкилирования метанола). Обработка соединения **2** соляной кислотой в метаноле с последующим упариванием приводила к бифункциональному соединению **3** (в виде гидрохлорида) с высоким выходом.

Очищенное окисленное антитело затем может вступать в реакцию с оксиамином **3**, также в слабокислых условиях (рН 5.0). Реакция соединения **3** с карбонильными группами моноклонального антитела протекает достаточно быстро (1 ч) и приводит к образованию модифицированного антитела **5**, несущего в своем составе азидные группы, связанные ковалентно посредством тетраэтиленгликольного гидрофильного линкера с сайтом гликозилирования.

Очищенное гель-фильтрацией азидированное антитело затем вводилось в Cu(I)-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения с алкиновым производным сульфированного красителя СуЗ **4**. Для снижения неспецифического связывания был использован гидрофильный водорастворимый лиганд ТНРТА, образующий комплекс с медью(I) и легко отделяющийся гель-фильтрацией. Образующееся СуЗ-меченое антитело удобно выделять на сефадексе G-50, поскольку оно окрашено и протекание хроматографии легко визуализируется.

Дальнейший анализ конъюгата производился спектрофотометрически.²⁸² Для этого был получен спектр поглощения в УФ и видимой области. Поскольку на одну молекулу антитела после конъюгации приходилось несколько молекул красителя, то эти красители начинали между собой взаимодействовать из-за близкого расположения и образовывать *H*-агрегаты.²⁸³ Такие взаимодействия отражались на форме спектра поглощения в области 550 нм. При этом агрегации антител не наблюдалось и раствор конъюгата оставался стабильным длительное время. Для получения правильной формы пика поглощения красителя в составе конъюгата был подобран буфер, содержащий 10% додецилсульфата. Такое решение позволило разрушить внутримолекулярные агрегаты красителей и восстановить правильную форму спектров поглощения в области 550 нм (Рис. 32). Далее

по соотношению интенсивности поглощения на максимумах и молярных коэффициентов поглощения была определена нагрузка N красителя **4** на одну молекулу антитела (DOL), которая составила 6. Далее меченные антитела были проверены на сохранность аффинности и способности эффективно окрашивать клетки PRAME-экспрессирующих меланомных линий.

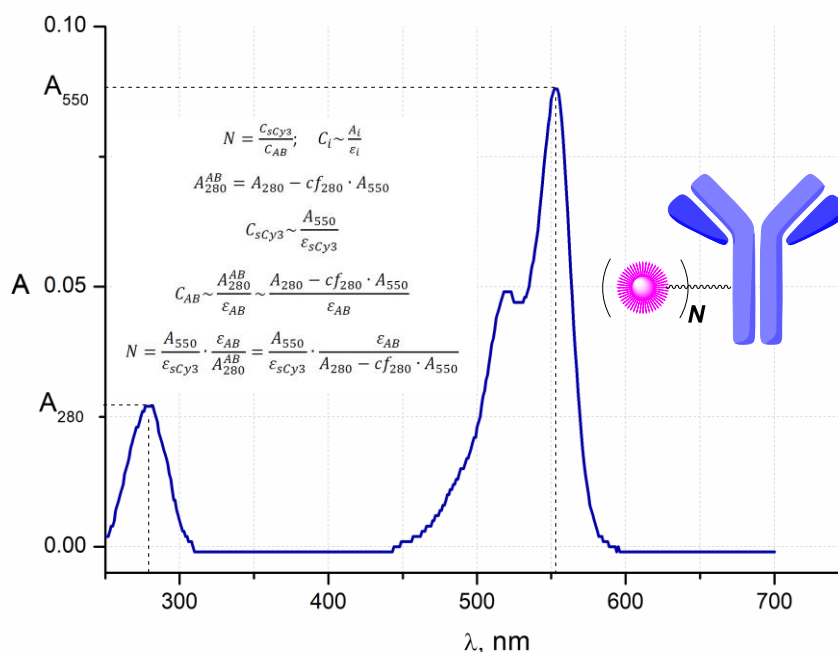


Рис. 32. Спектр поглощения конъюгата антитела с сульфированным красителем Cu3 и определение стехиометрии (нагрузки, N) модификации антитела красителем

Для определения способности антител бН8, меченых красителем сульфо- Cu3 , распознавать белок PRAME, использовались клетки линии K562. Как было упомянуто выше, эта клеточная линия экспрессирует мембранную форму белка PRAME,^{256,260–262} так же как и клеточная линия меланомы mel P.²³² Кроме того, коллеги из НМИЦ им. Блохина дополнительно определили, что в исследуемых линиях ген PRAME был стабильно активен, и его уровень экспрессии находился в диапазоне от 6000% до 7000% в клетках линии K562 и от 6000 до 7500% в клетках линии mel P. Таким образом, клетки могли быть использованы для определения уровня экспрессии белка PRAME.

Серия экспериментов на проточном цитометре² показала, что антитела связывались с цитоплазмой более чем 98% пермеабелизованных клеток (Рис. 33). Эти же антитела были использованы для окрашивания цитоплазмы клеток mel P, причем связывание также было зафиксировано с цитоплазмой более 98% клеток (Рис. 34). Таким образом, антитела сохранили способность связываться с нативным белком PRAME, находящимся в цитоплазме клеток. Клетки мышинной меланомы не окрашивались.

² Выполнены коллегами в НМИЦ им. Блохина

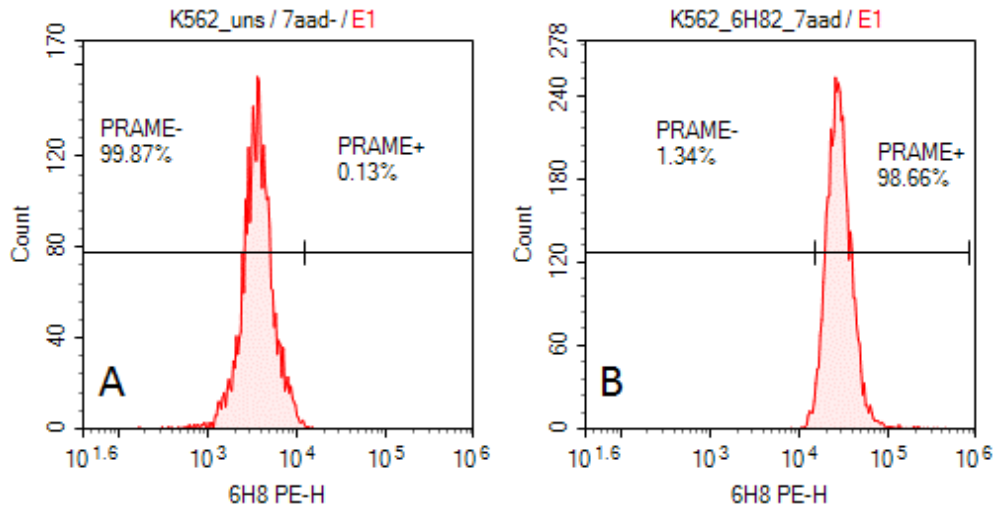


Рис. 33. Пример окрашивания клеток K562 антителом 6H8, меченым сульфo-Су. А – неокрашенные клетки, В – окрашенные клетки

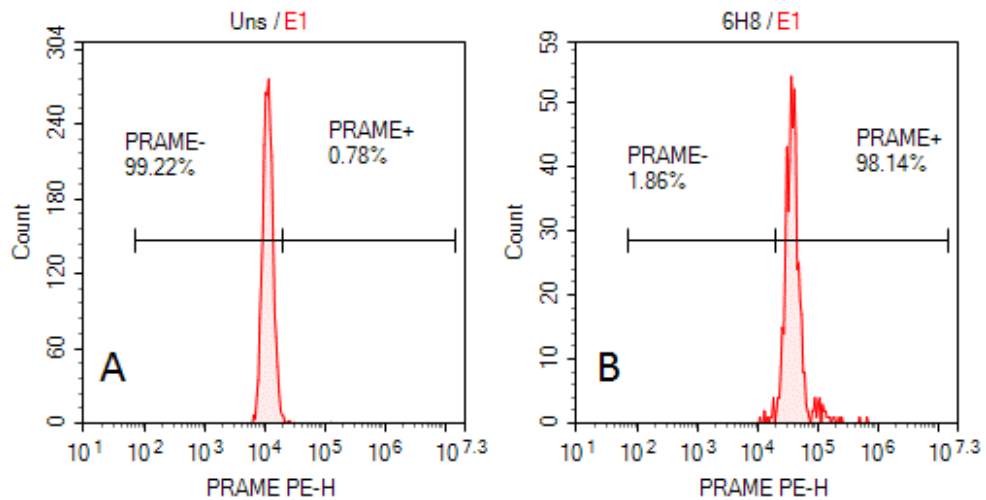


Рис. 34. Пример окрашивания клеток mel P антителом 6H8, меченым сульфo-Су. А – неокрашенные клетки, В – окрашенные клетки

Антитела 6H8, меченые сульфo-Су₃, связывались с поверхностью клеток K562 и mel P. Интенсивность связывания была очень низкая, и практически не визуализировалась на скейтерограммах, однако связывание было доказано по изменению интенсивности флуоресценции клеток, выраженной в безразмерных единицах (Рис. 35).

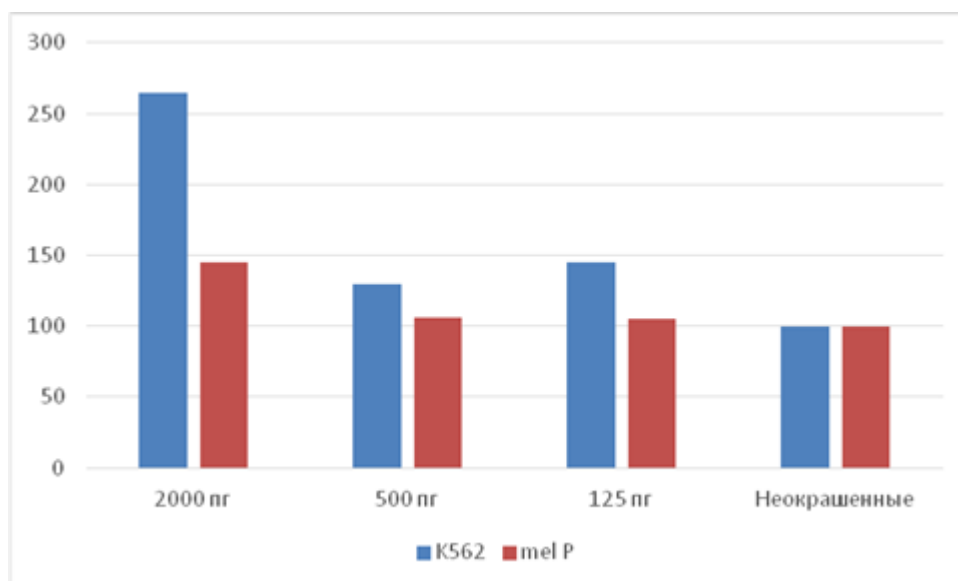


Рис. 35. Интенсивность флуоресценции клеток K562 и mel P, окрашенных антителом 6H8, меченым сульфо-СуЗ. Антитело добавлено в концентрациях 2000, 500 и 125 пг на пробу

Интенсивность окрашивания снижалась при разведении антител. Таким образом, антитела связываются с поверхностью PRAME-экспрессирующих клеток линий K562 и mel P, что свидетельствует о наличии белка PRAME на мембране данных клеток.

Дополнительно была определена интенсивность флуоресценции CD20-экспрессирующих клеток хронического В-клеточного лимфоидного лейкоза, окрашенных антителами, распознающими CD20. Аномальность этих клеток была доказана при их окраске антителами к антигенам CD22, CD19, CD5 и CD23, так также антителами к легкой цепи иммуноглобулина.²⁸⁴ Интенсивность флуоресценции неокрашенных лейкозных В-клеток составила 183 ед. Окрашенные лимфоциты обладали интенсивностью флуоресценции на уровне 261 ед. Это позволяет сделать вывод, что известный антиген CD20, использующийся в качестве мишени, обладает сопоставимым с PRAME уровнем экспрессии на клеточной мембране. Это подтверждают литературные данные.²⁶⁹

Таким образом, впервые получены данные, подтверждающие наличие белка PRAME на поверхности клеток метастатической меланомы. Мембранная локализация характерна для всех клеток популяции. При этом количество белка на каждой из клеток всегда небольшое. Подобный уровень экспрессии характерен, например, для антигена CD23 на поверхности активированных В-лимфоцитов. Столь низкий уровень экспрессии PRAME объясняет трудности его обнаружения в данном клеточном компартменте, в то время как наблюдений наличия этого белка в цитоплазме гораздо больше.

Была обнаружена еще одна особенность, которую нужно учитывать при определении поверхностной локализации PRAME – возможность принять цитоплазматический белок за мембранный. Это может произойти в случае повреждения мембраны погибших клеток во

время центрифугирования при пробоподготовке. В этом случае цитоплазма, богатая белком PRAME, окрашивается, и такие клетки имеют очень сильный сигнал (Рис. 36).

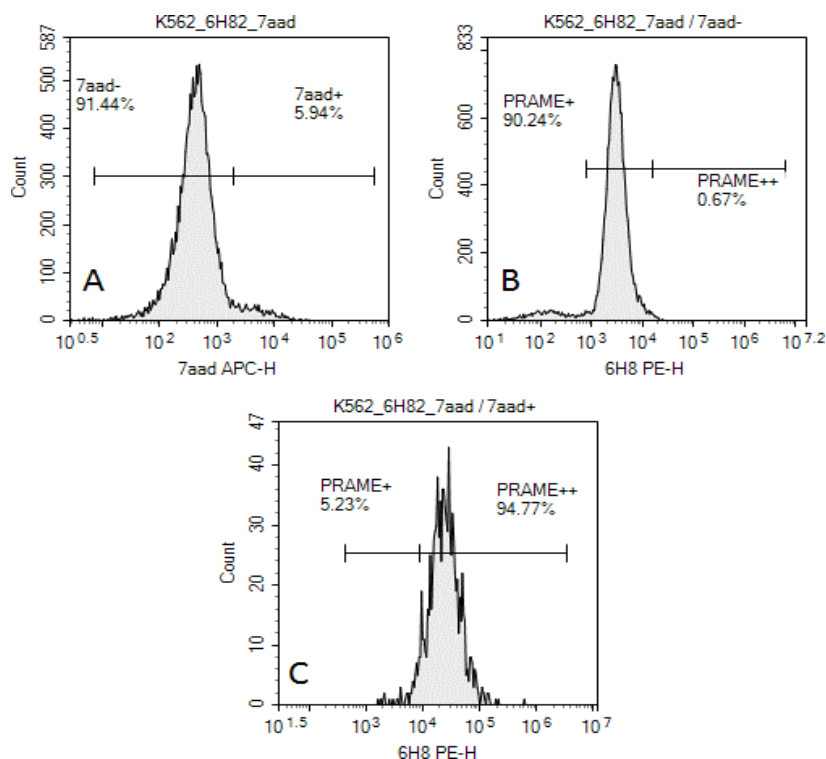


Рис. 36. Интенсивность флуоресценции клеток K562, окрашенных антителом 6H8, меченым сульфо-Су3. А – окраска клеток 7aad, В – окраска 7aad-негативных клеток антителом 6H8, С – окраска 7aad-позитивных клеток антителом 6H8

Избежать подобного можно при использовании ДНК-тропных интеркалирующих красителей. В данном исследовании использовался краситель 7-aad, пик эмиссии которого отличался от пика сульфо-Су3. Применение 7-aad показало, что действительно, все клетки, обладающие сильным сигналом при окрашивании сульфо-Су3, окрашивались 7-aad, что свидетельствует о проницаемости их мембран и опосредованного этим окрашивания цитоплазматического белка PRAME. Таким образом, при оценке активности PRAME на поверхности опухолевых клеток следует всегда использовать интеркалирующий краситель для исключения ложноположительного сигнала.

Проблема может быть также решена посредством создания антител, распознающих только мембранную форму белка PRAME, но не цитоплазматическую. Примером такого решения служит антиген CD3, который мембранная экспрессия которого выявляется клоном антител НТ3а. При этом НТ3а не связывается с цитоплазматической детерминантой CD3, которая может быть выявлена другим клоном – UCHL1. На настоящий момент, однако, неизвестно, каким образом лишенный трансмембранного домена PRAME

удерживается на клеточной мембране, и невозможно определить последовательности белка, к которым можно разработать антитела для выявления мембранной локализации.

Мембранная локализация PRAME при меланоме открывает возможность по разработке нового подхода иммунотерапии данного заболевания. Поскольку PRAME не представлен в нормальных соматических клетках, но присутствует на клетках меланомы, он может специфически распознаваться лекарственным антителом. Само антитело будет привлекать молекулы системы комплимента либо киллерных клеток, что вызовет лизис клеток меланомы.^{273,285}

Далее мы обнаружили, что этоксиэтилиденная защитная группа может быть удалена в слабокислом буфере (значения pH 4.5 и менее) приемлемом для антител. Это позволило нам получить ранее недоступные красители – более яркие и стабильные спектральные аналоги флуоресцеина – Alexa488 и BDP-FL, функционализированные защищенной оксиаминовой группой. Свободный оксиамин в составе молекулы, будучи очень реакционноспособным, даже в виде соли разрушает ядро красителя, в то время как те же самые краски, несущие защищенный оксиамин, хранятся сколь угодно долго как в растворе, так и в сухом виде. При инкубировании в кислых буферах происходит быстрое деблокирование оксиамина и последующее лигирование с карбонилами окисленных антител (Рис. 37).

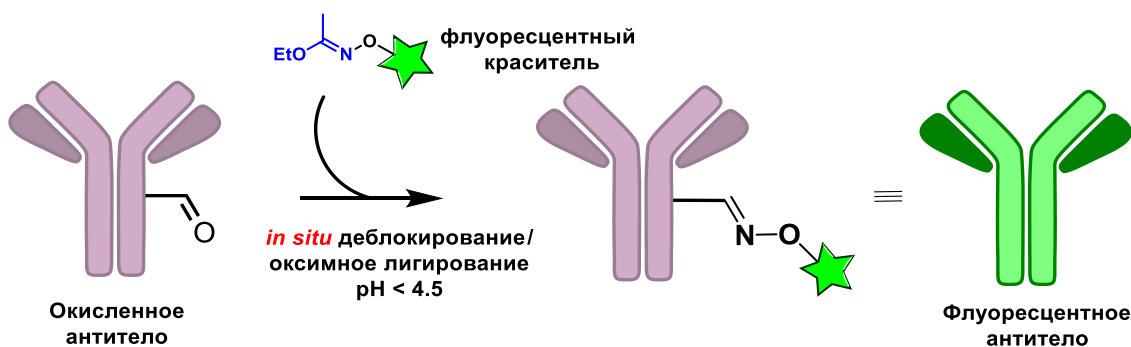


Рис. 37. Методология подхода деблокирования защищенного оксиамина *in situ* и последующего лигирования по карбонилам окисленных антител

Кроме того, этоксиэтилиденная защитная группа устойчива при большинстве условий, кроме кислых значений pH, что открывает возможности по дальнейшей функционализации молекулы (Схема 5).

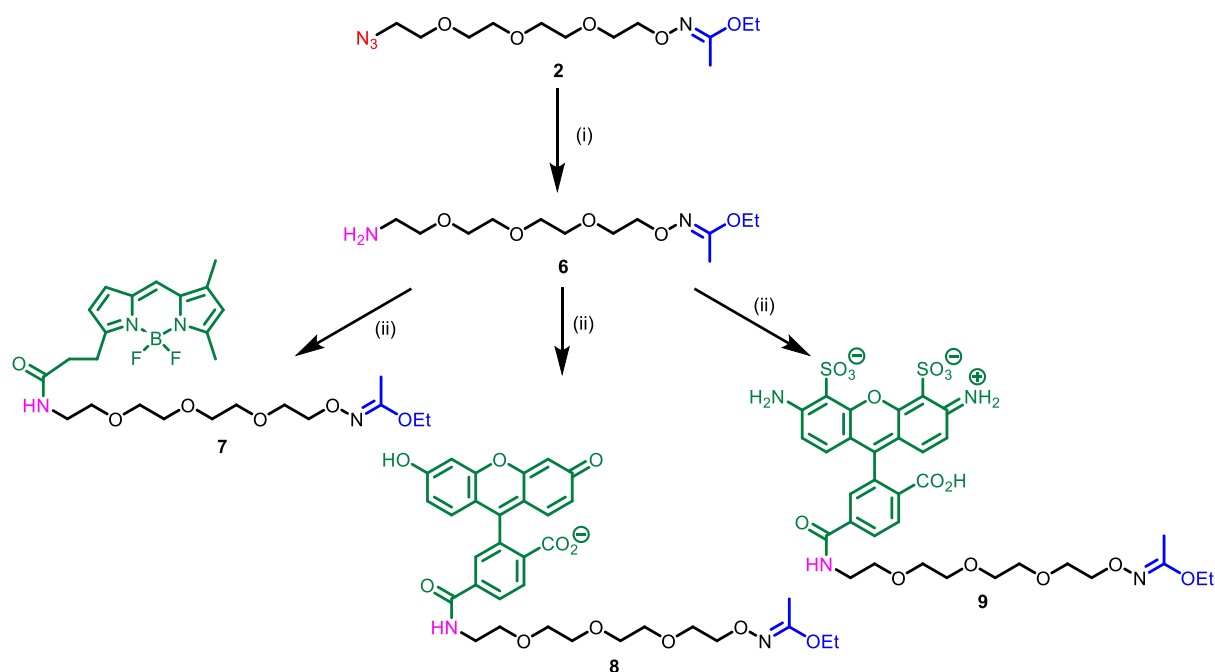


Схема 5. Синтез этоксиэтилиден-защищенных оксиаминовых производных флуоресцентных красителей. Реагенты и условия: (i) PPh₃, THF, 2 ч, далее H₂O; (ii) краситель NHS-эфир, DMF, DIPEA, 0 °C

Бифункциональный линкер **2** был далее использован в качестве исходного соединения. С помощью селективного восстановления трифенилфосфином был получен бифункциональный реагент **6**, содержащий аминогруппу и защищенный оксиамин. Далее его аминогруппа была проацилирована N-оксисукцинимидными эфирами (NHS-эфиры) целевых красителей – BODIPY FL (BDP-FL), 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) и Alexa488 (AF488). В результате были получены защищенные оксиаминовые производные **7–9** (Схема 5). При попытке деблокировать оксиаминовую группу и получить красители со свободным оксиамином происходило быстрое разрушение хромофора. При этом защищенные производные были устойчивы.

Далее полученными красителями были промодифицированы моноклональные анти-PRAME антитела. Мечение проводилось в точности по описанному выше протоколу, за исключением буфера, в котором проводилось непосредственно оксимное лигирование. В ходе экспериментов было установлено, что наилучший буфер для эффективного деблокирования красителя *in situ* и последующей реакции оксиамина с карбонилем антитела, это 20 мМ цитратный буфер с pH 3.0–3.5 и 150 мМ NaCl. В таких условиях лигирование полностью протекает за 2 ч. Видимых следов агрегации иммуноглобулинов не наблюдалось.

Степень мечения антитела красителем была определена по спектрам поглощения. Для FAM-конъюгата она составила 4, для BDP-Fl – 2 и для Alexa488 – 2.5 молекулы

красителя на одно антитело. Максимумы поглощения (Рис. 38А) флуоресцентных антител находятся на тех же длинах волн, что и у исходных красителей FAM и AF488 (520 нм), и BDP-FL (509 нм). Флуоресценция также сохранена (Рис. 38В).

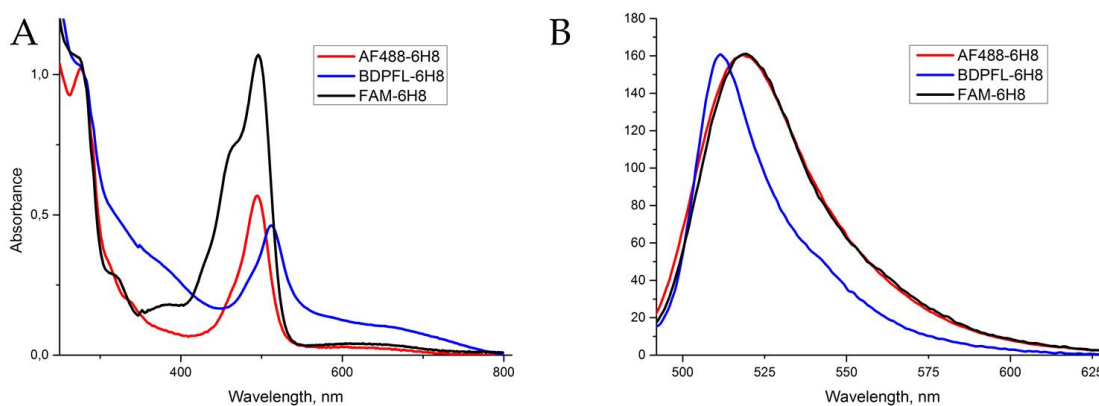


Рис. 38. А) Нормализованные спектры поглощения флуоресцентно меченных антител; В) Нормализованные спектры флуоресценции меченных красителями антител ($\lambda_{ex} = 484$ nm)

Таким образом, данный метод *in situ* мечения окисленных антител красителями в кислых буферах позволяет получить конъюгаты с полезной нагрузкой 2–4 молекулы на антитело. При этом флуоресцентные красители полностью сохраняют свои оптические свойства в этих условиях (Рис. 38 А и В).

Для детекции с помощью проточной цитометрии были использованы две PRAME-положительные клеточные линии K562 и АМО-1. Клетки были окрашены флуоресцентно меченными антителами и протестированы (Рис. 39).

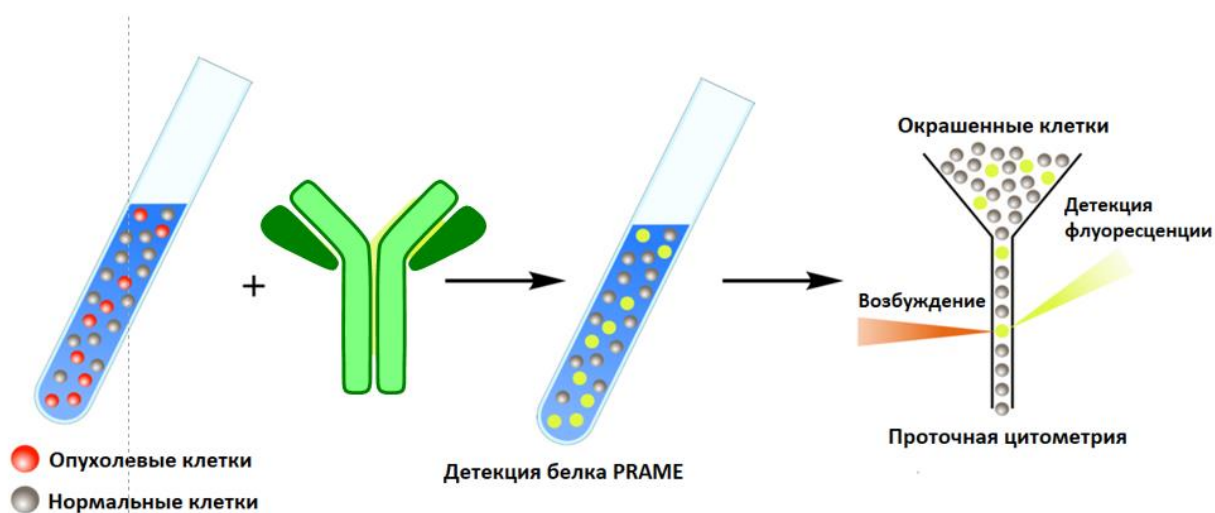


Рис. 39. Детекция PRAME с помощью проточного цитометра

Данные проточной цитометрии показали, что клетки этих линий, окрашенные флуоресцентными антителами, дают значительно более сильный сигнал, чем клетки, окрашенные изотипическим контролем (Рис. 40).

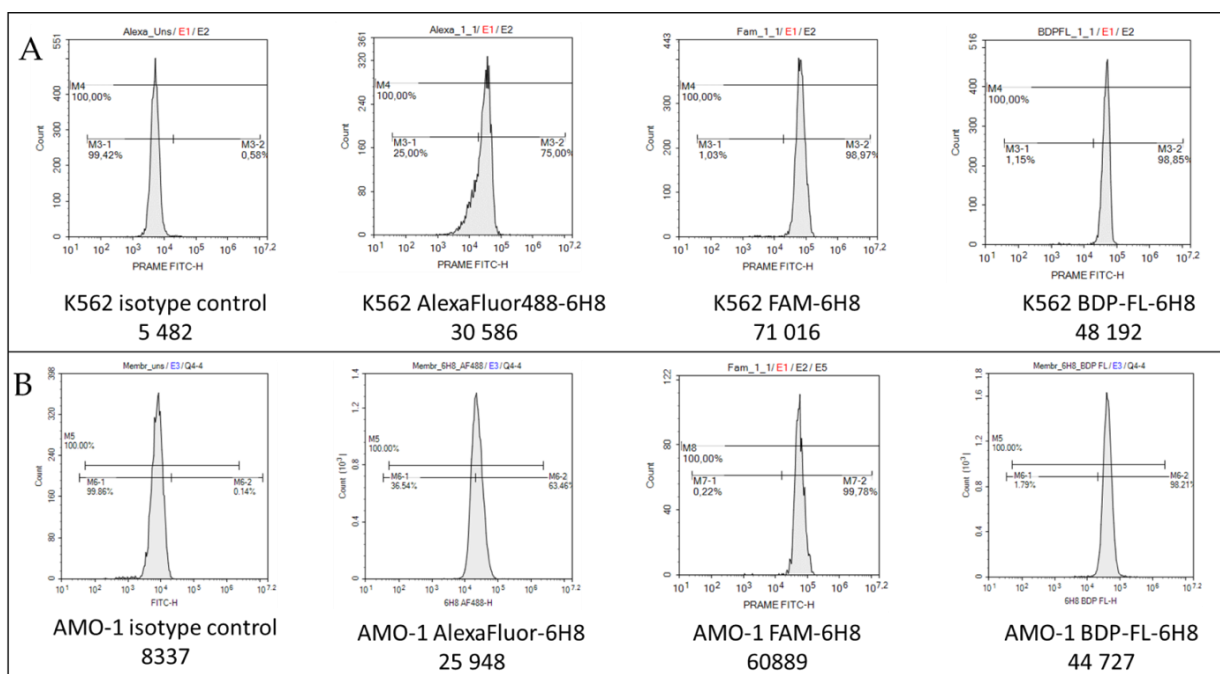


Рис. 40. Проточная цитометрия клеточных линий K562 (A) и AMO-1 (B)

Уровень экспрессии белка PRAME в клеточных линиях K562 и AMO-1 составляет примерно $1393 \pm 83\%$ и $414 \pm 29\%$ относительно белка ABL,²⁸⁶ соответственно. Исследования активности PRAME в клеточной линии AMO-1, модели множественной миеломы, ранее не проводились. Она была выбрана коллегами из НМИЦ им. Блохина по причине высокой частоты случаев экспрессии PRAME клетками множественной миеломы.²⁸⁷ Это может являться хорошим диагностическим подходом.

Активность гена PRAME и интенсивность окрашивания мембраны клеток AMO-1 оказалась ниже, чем у клеток K562 (Рис. 40). Это было ожидаемо, так как уровень мРНК PRAME и количество белка находятся в прямой зависимости: чем меньше мРНК, тем меньше зрелого белка.^{265,267}

Наиболее высокая интенсивность окраски была получена с помощью антител, меченных BDP-FL и FAM красителями. Поэтому для дальнейших экспериментов были отобраны FAM-антитела. Были проведены исследования на образцах костного мозга пациентов с онкогематологическими заболеваниями.³ Бластные клетки пациентов с острой

³ Выполнены коллегами в НМИЦ им. Блохина

миелоидной лейкемией были успешно окрашены флуоресцентными антителами (Таблица 3).

Таблица 3. Окрашивание клеток костного мозга больных острой миелоидной лейкемией; данные представлены в единицах средней флуоресцентной интенсивности

Пациент	Уровень экспрессии гена (<i>ABL</i>) (% относительно <i>ABL</i>)	Флуоресценция бластных клеток		Флуоресценция лимфоцитов	
		Изотипический контроль	7	Изотипический контроль	7
M2	255	324	6872	113	124
M4-53	13	352	580	1453	1428
M4-40	378	295	8656	1135	1156

В результате обнаружено, что бластные клетки пациентов с более высоким уровнем экспрессии PRAME окрашивались более интенсивно. В то же время, флуоресценция лимфоцитов в изучаемых образцах не изменилась. Не было обнаружено изменений во флуоресценции клеток у пациентов в ремиссии и тех пациентов, у которых бластные клетки имели нормальный иммунофенотип.

Затем было решено получить более высоконагруженные конъюгаты антител с красителями на основе разветвленных линкеров. Предполагалось, что подобные флуоресцентные антитела к белку PRAME, экспрессия которого на мембране клеток не велика, позволит улучшить его детекцию с помощью проточного цитометра.

Для получения таких антител мы также использовали периодатное окисление и последующее оксимное лигирование с целью введения азидогрупп в антитело, с дальнейшей модификацией красителями с помощью промотируемой напряжением цикла реакцией циклоприсоединения (SPAAC)²⁸⁸ вместо медь-катализируемой реакции циклоприсоединения (CuAAC). SPAAC был выбран, так как он с меньшей вероятностью нарушит аффинность антитела по сравнению с катализируемым медью азид-алкиновым циклоприсоединением (CuAAC).²⁰

Этот подход позволил нам получить сайт-специфически модифицированные флуоресцентные антитела с контролируемой стехиометрией. В частности, использование бифункциональных реакционноспособных производных красителей и разветвляющих реагентов позволило получить конъюгаты с повышенной степенью мечения. Для проверки гипотезы об усилении сигнала за счет большей нагруженности антитела красителем, было решено сравнить их с линейными бифункциональными реагентами аналогичной структуры. Поскольку наиболее распространенные лазерные каналы совместимы с

красителями FAM, Cy3 и Cy5, были выбраны эти три красителя для модельных конъюгатов (Рис. 41).

В качестве исходного материала для создания новых бифункциональных разветвленных ядер был использован ранее полученный триазид **23** на основе пентаэритрита²⁸⁹ (Схема 6 А). Синтез начался с получения ключевого мезилата **24**, который был синтезирован из спирта **23** с помощью мезилхлорида и соответствующего основания. Далее мы получили защищенный этоксиэтилиденовой защитной группой оксиамин **25** из мезилата **22** и натриевой соли этил-*N*-гидроксиацетимидата²⁸¹ в соответствии с ранее описанным методом (Схема 4).

Как было описано ранее, защитная группа может быть удалена в кислом буфере при рН 3–4.5, после чего происходит мгновенное лигирование с карбонильной группой антител. Это удобный метод для красителей, нестабильных в присутствии свободной оксиаминогруппы, например, флуоресцеина. Следует отметить, однако, что длительная инкубация антител при значениях рН 3 или ниже может привести к снижению аффинности.

В связи с этим мы обнаружили, что оптимальное значение рН для деблокирования/оксимного лигирования *in situ* составляет 4.0. При таком рН деблокирование оксиамина и последующее лигирование происходит без существенного нарушения целостности антитела. При достаточном избытке красителя (~100 экв.) и времени инкубации около 1 ч можно достичь степени модификации (DOL) антитела 2–4.

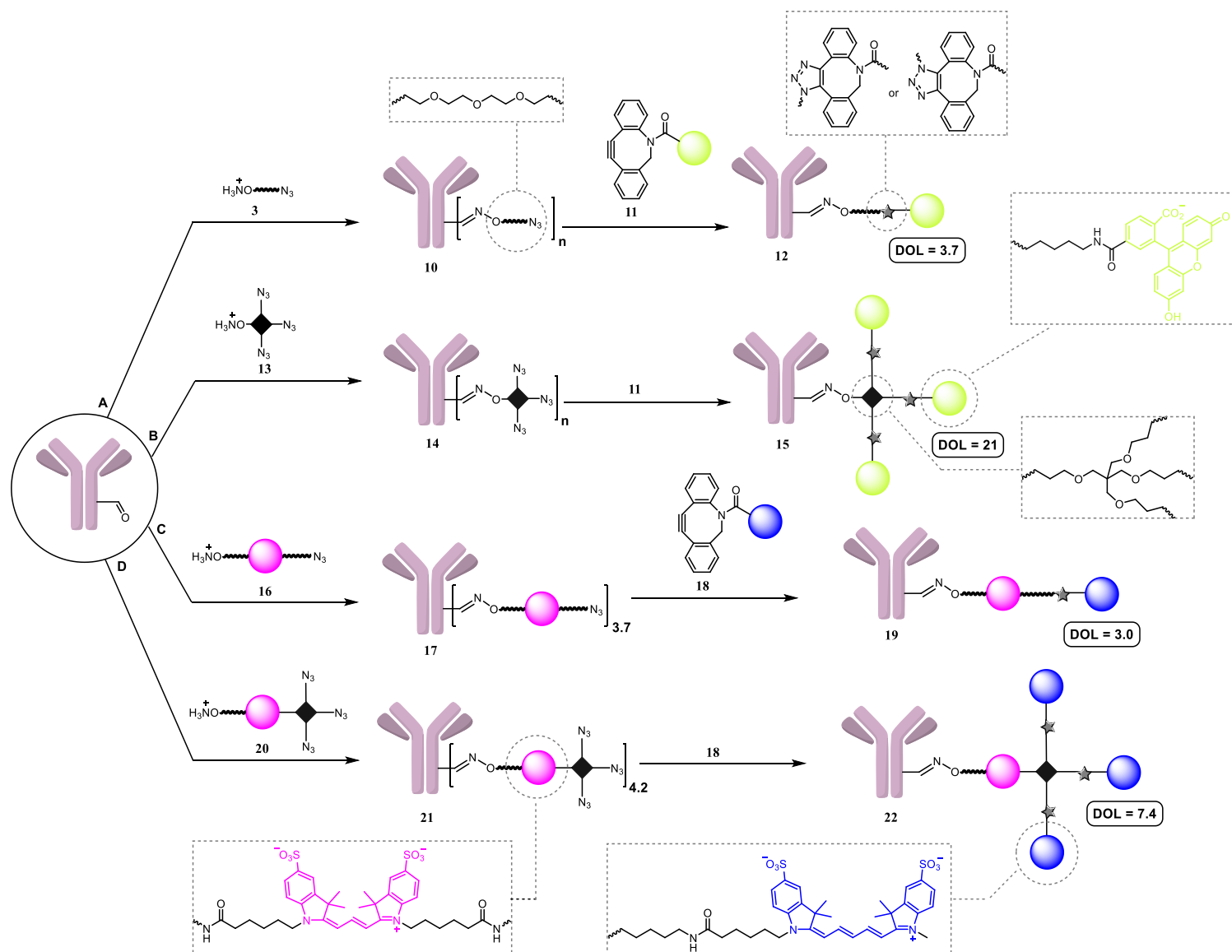


Рис. 41. Общая схема получения флуоресцентных конъюгатов с увеличенной нагрузкой

С другой стороны, многие красители могут переносить присутствие протонированной/свободной аминоокси-группы в течение некоторого периода времени. Если такие красители используются для мечения, то возможна инкубация антитела при более основном pH. Подходящим буфером для оксимного лигирования является ацетатный буфер с pH 5.0. При таком значении pH окисление периодатом протекает наилучшим образом, а побочная реакция образования оснований Шиффа карбонильных групп с остатками лизина подавляется. В отличие от образования оснований Шиффа, которое лучше протекает в слабощелочной среде, реакции оксимного лигирования лучше всего протекают в кислых условиях. Учитывая это, мы также получили деблокированное разветвленное производное **13** из **25** путем инкубации в метанольном растворе HCl (схема 6 А).

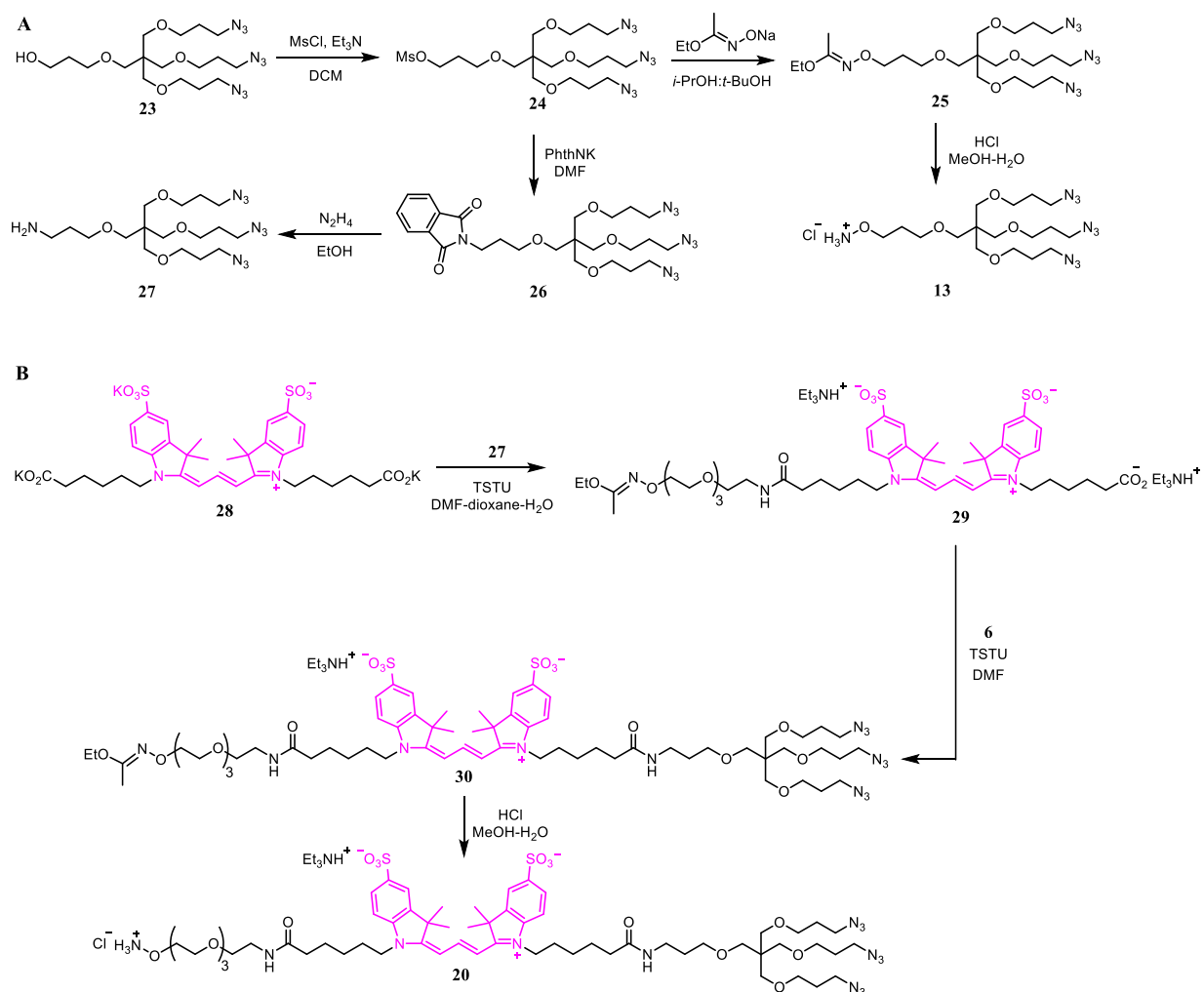


Схема 6. Получение разветвленных линкеров

Из мезилата **24** мы получили другой разветвленный бифункциональный линкер **27** с аминогруппой вместо оксиаминогруппы. Для этого мезилат **24** был превращен во фталимид **26**, после чего деблокирован гидразином (схема 6, А). Бифункциональный линкер **27** сам по себе может быть интересен для различных применений. В нашем случае он был соединен с производным сульфо- Cu3 **28** с получением бифункционального флуоресцентного линкера **20** (схема 6, В).

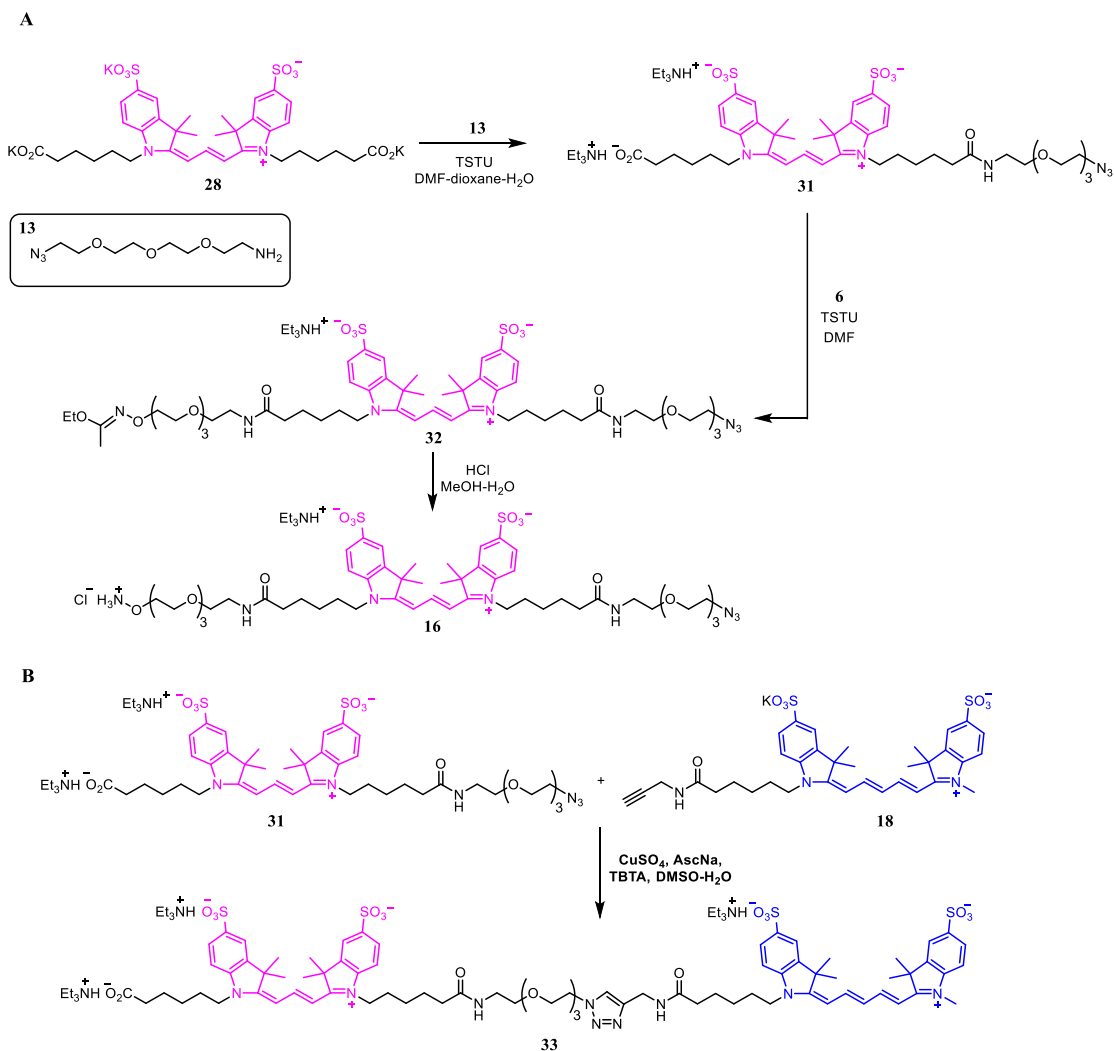


Схема 7. Получение бифункционального линкера с красителем и модельного конъюгата красителей Cu3 и Cu5

Превращение **28** в **31** проводилось с использованием конденсирующего реагента TSTU в тройной системе растворителей DMF–1,4-диоксан– H_2O . Эта комбинация растворителей была выбрана для улучшения растворимости соли **28**. Сначала был получен продукт моноконденсации **29** в формате десимметризации (синтезирована смесь моно- и

бис-продуктов и разделена колоночной хроматографией). Затем он прореагировал с реагентом **6** с получением **30** (схема 6 В). Кислотная депротекция дала свободный оксиаминовый вариант **20** флуоресцентного линкера **30**, аналогичным образом получен линкер **16** (Схема 7 А).

Сначала мы получили антитела, меченные разветвленным реагентом **13** (Схема 6 А, В). Для сравнения мы также получили антитело, меченное линейным линкером **3**, по отработанной нами методике. Полученные конъюгаты были очищены и введены в реакцию с флуоресцеиновым производным дибензоциклооктина (DBCO) **11**, которое подходит для реакции клика с азидами в биомолекулах, и получением линейных и разветвленных FAM-конъюгатов **12** и **15**. Аналогичным образом мы получили конъюгаты **17** и **21** с флуоресцентными линкерами **16** и **20**, соответственно (Схема 6 С, D). Затем они были модифицированы сульфо-Сy5-DBCO красителем **18**. Из-за гидрофобности групп DBCO конечные конъюгаты проявляли нестабильность и были склонны к агрегации в PBS. Чтобы преодолеть эту проблему, мы использовали 0.01% Tween 80 в PBS в качестве стабилизатора для линейных конъюгатов (**12**, **19**) и 0.05% Tween 80 для разветвленных (**19**, **22**). Было установлено, что в присутствии Tween 80 конъюгаты остаются стабильными в течение как минимум недели при +4 °С.

Стехиометрия конъюгатов красителей была определена методом UV-Vis спектрофотометрии с использованием молярных коэффициентов поглощения, перечисленных в Таблице 4.

Таблица 4. Молярные коэффициенты поглощения

	$\epsilon_{280}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{max long wave}}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
6H8	2.10×10^5	-
FAM-DBCO	2.17×10^4	7.40×10^4
sCy3	9.72×10^3	1.62×10^5
sCy5-DBCO	1.08×10^4	2.71×10^5

Степень модификации конъюгатов **10** и **14** не могла быть измерена этим методом, поэтому ее оценивали косвенно, измеряя DOL их флуоресцеиновых производных **12** и **15**. Несколько удивительно, что, хотя **10** и **14** были синтезированы практически в одинаковых условиях, **14** оказался сильнее модифицированным, что привело к образованию конъюгата **15** с DOL не менее 21 по сравнению с его линейным аналогом **12** (DOL = 3.7) (Рис. 42 А и В).

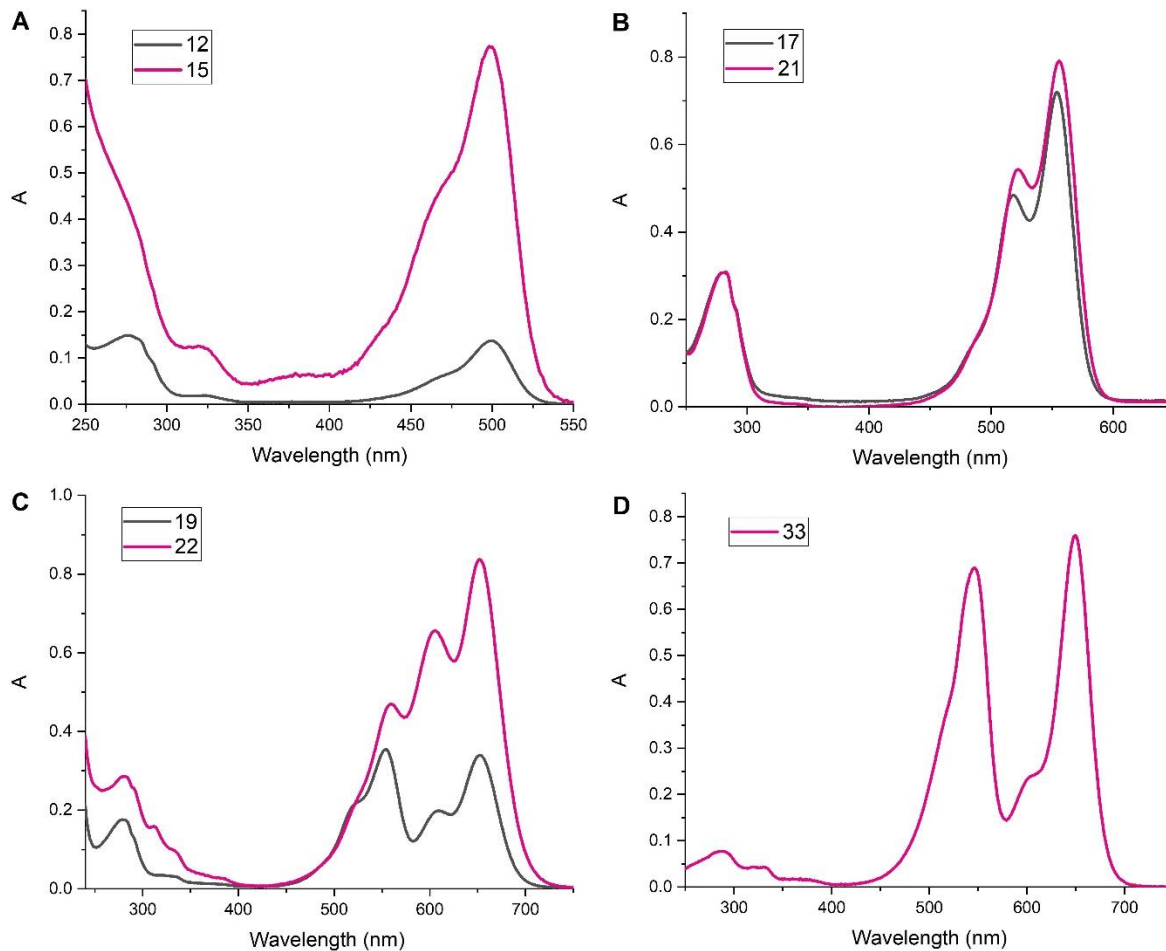


Рис. 42. (A-C) UV-Vis спектры FAM-конъюгатов (**12-15**) и sCy3-sCy5 (**19-22**) антитела 6H8, нормализованных по концентрации антитела. (D) Спектр поглощения конъюгата sCy3-sCy5 **33**

Напротив, конъюгаты **17** и **21**, синтезированные в аналогичных условиях, имеют сравнимую степень модификации (Рис. 41 C и D), которую можно измерить напрямую, что позволяет предположить, что они лучше подходят для контролируемого введения азидных функциональных групп в антитела. Чтобы получить стандарт 100% выхода в реакции клика двух красителей, мы синтезировали низкомолекулярный конъюгат sCy3-sCy5 **33** (Схема 7 B) и измерили соотношение поглощения sCy3/sCy5 на их максимумах (Рис. 42D). Несколько удивительно, что значение (0.91) оказалось намного выше ожидаемого ($[\epsilon_{548} \text{ sCy3} + \epsilon_{548} \text{ sCy5}] / \epsilon_{646} \text{ sCy5} = (1.62 \times 10^5 + 1.20 \times 10^4) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} / (2.71 \times 10^5) \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 0.64$). Эти данные были использованы для оценки степени модификации **17** с помощью sCy5-DBCO, которая протекала с 82% выходом, давая конъюгат **19** с DOL 3.0. В аналогичных условиях разветвленный конъюгат **21** дал конъюгат **22**, который обладал более высокой DOL 7.4 по данным sCy5 (Рис. 42C).

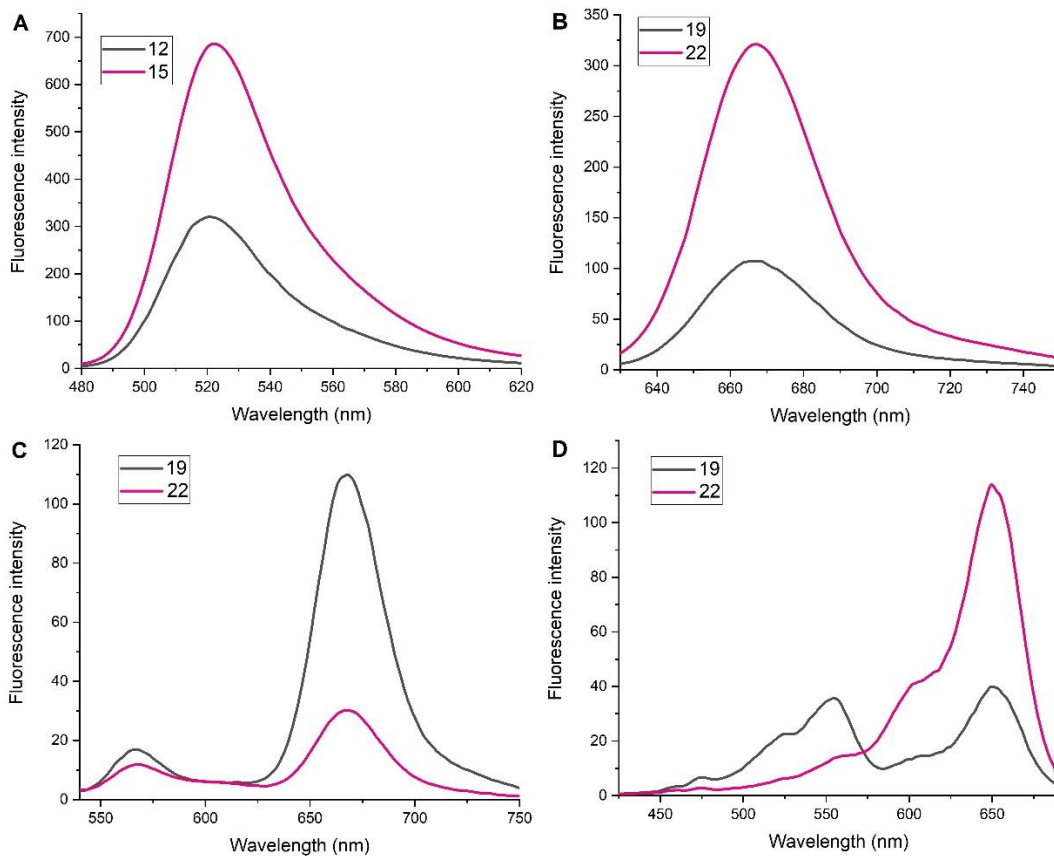


Рис. 43. Спектры флуоресценции конъюгатов БН8, нормализованные по концентрации антитела (А) Спектр эмиссии **12** и **15**, длина возбуждения 460 нм. (В) Спектр эмиссии **19** и **22**, длина волны возбуждения 610 нм. (С) Спектр эмиссии **19** и **22**, длина волны возбуждения 520 нм. (D) Спектр возбуждения **19** и **22**, длина волны поглощения 710 нм

Для оценки флуоресцентных свойств меченых антител были записаны спектры эмиссии флуоресценции четырех конечных конъюгатов. Хотя разветвленный конъюгат **15** демонстрировал более высокую интенсивность флуоресценции по сравнению с конъюгатом **12** (Рис. 43А); примерно двукратное увеличение было не пропорционально более чем пятикратной разнице в DOL (21 против 3.7). Это несоответствие можно объяснить самотушением флуоресцеина из-за того, что флуорофоры находятся в непосредственной близости друг от друга. Напротив, разница в интенсивности флуоресценции в конъюгатах **19** и **22** была полностью пропорциональна разнице в степени мечения, что указывает на отсутствие самотушения (Рис. 43В). Отчасти это может быть связано с более длинным линкером, соединяющим фрагменты красителя с ядром в **22** по сравнению с **15** (Рис. 41).

Для дополнительного подтверждения структуры конъюгатов **19** и **22** мы изучили эффект FRET в паре sCu3-sCu5 (Рисунок 43 C,D). Перенос энергии наблюдался в обоих конъюгатах; любопытно, что он оказался более эффективным в **19** по сравнению с **22**, несмотря на меньшее количество фрагментов sCu5 на один sCu3.

Также с помощью ИФА было проверено сохранение аффинности у всех конъюгатов. Было показано, что сродство к антигену в основном не нарушено (Рис. 44).

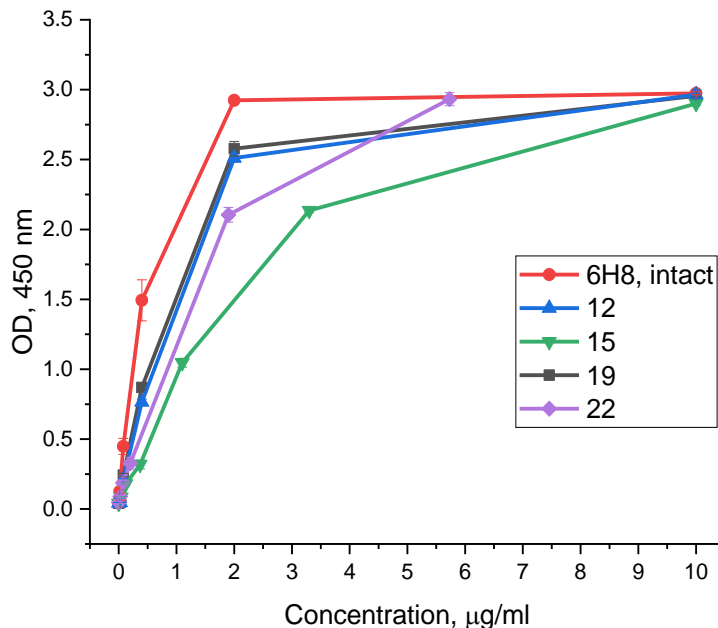


Рис. 44. ИФА флуоресцентных конъюгатов. Сохранение аффинности линейных конъюгатов **12** и **19** и разветвленных конъюгатов **15** и **22** к рекомбинантному белку PRAME

Флуоресцентные конъюгаты затем были протестированы на линиях клеток, заведомо экспрессирующих мембранную форму PRAME (линии THP-1, K562, MelP и WI-38 со сверхэкспрессией PRAME²⁷³) с помощью проточной цитометрии.⁴ Определяли медианную интенсивность флуоресценции окрашенных клеток, а неокрашенные клетки использовали в качестве контроля (Рис. 45–48). Полученные данные обобщены в Таблице 5.

⁴ Эксперименты проводились Д.Ю. Рязанцевым (Лаборатория молекулярной диагностики ИБХ РАН) и Е.В. Рябухиной (Лаборатория химии липидов ИБХ РАН)

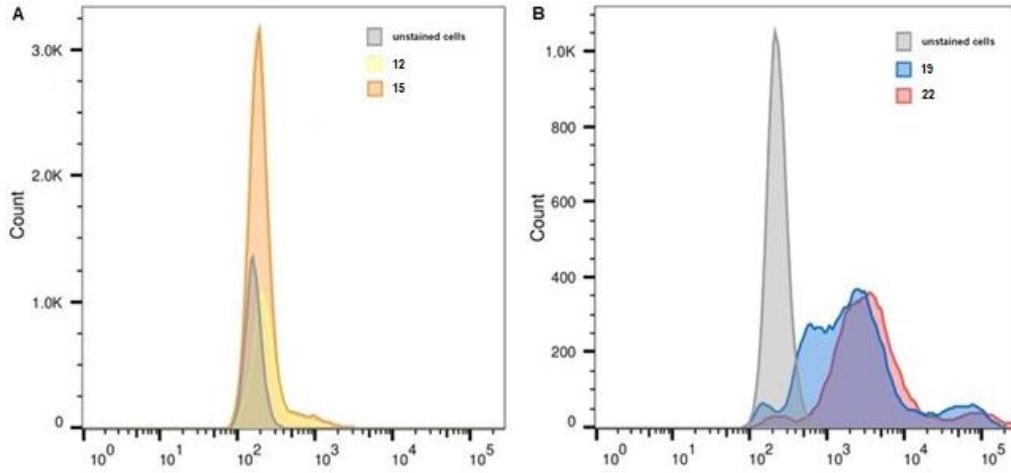


Рис. 45. Окрашивание клеток K562. (A) FITC канал (флуоресцеиновый). (B) APC канал (sCy5)

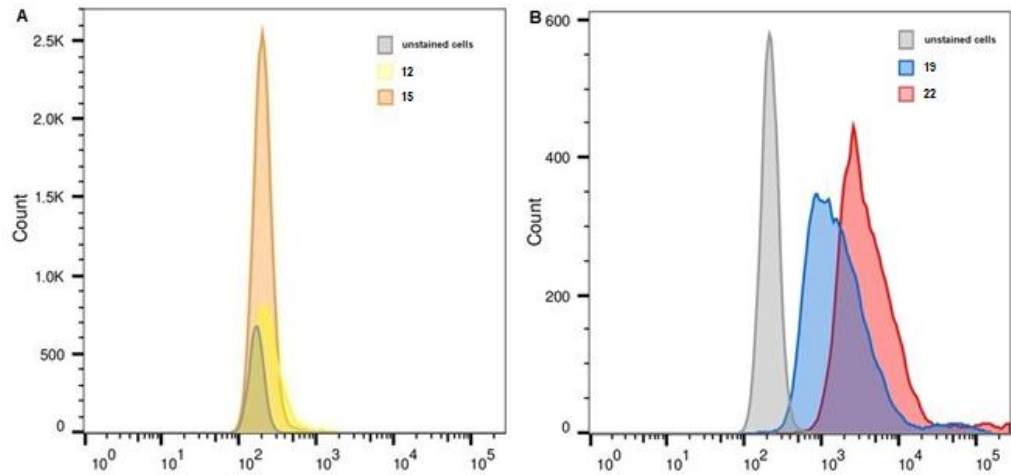


Рис. 46. Окрашивание клеток THP-1. (A) FITC канал (флуоресцеиновый). (B) APC канал (sCy5)

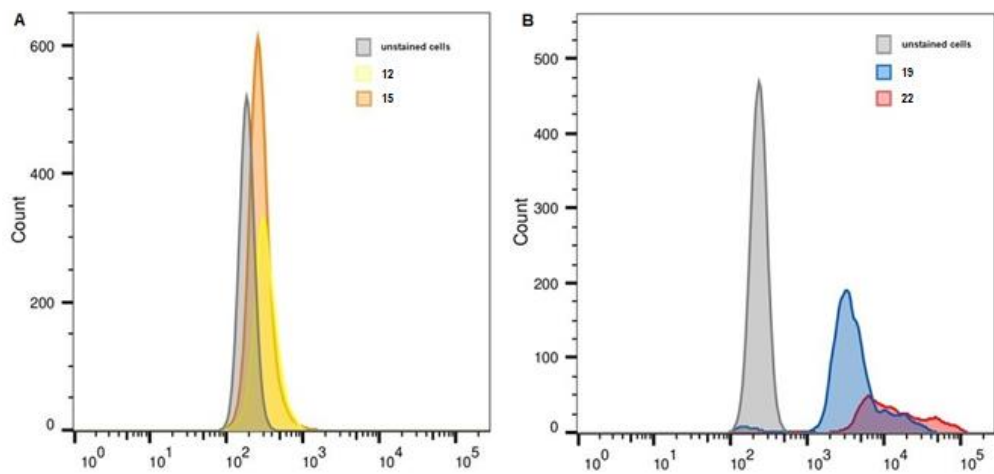


Рис. 47. Окрашивание клеток mel P. (A) FITC канал (флуоресцеиновый). (B) APC канал (sCy5)

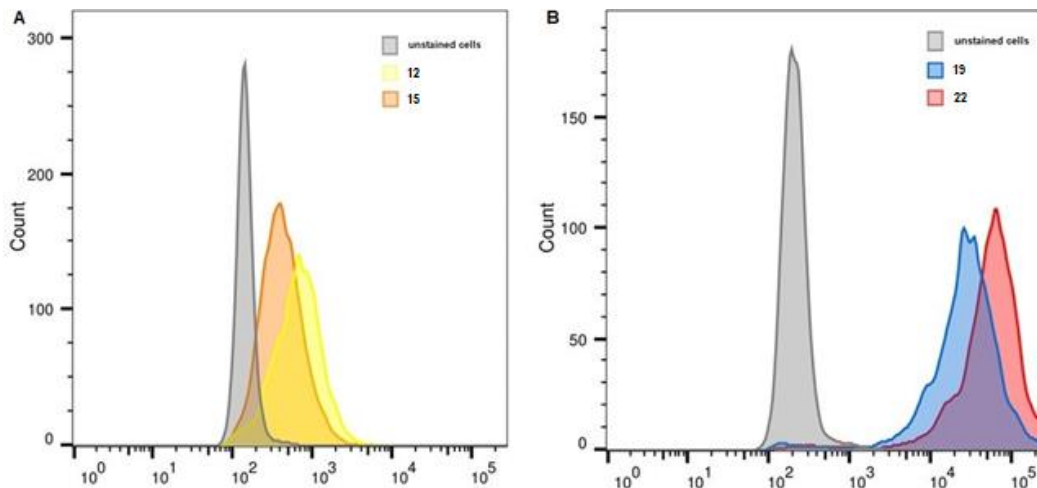


Рис. 48. Окрашивание клеток WI-38 PRAME+. (А) FITC канал (флуоресцеиновый). (В) APC канал (sCy5)

Таблица 5. Медианная интенсивность флуоресценции

	Неокрашенные, FITC	22	24	Неокрашенные, APC	27	29
К-562	161	219	192	226	1956	3223
THP-1	170	234	203	216	1447	3384
MelP	186	316	267	234	3521	10,477
WI-38 PRAME+	148	676	404	208	27267	56987

Для конъюгатов **12** и **15** на основе флуоресцеина флуоресценция регистрировалась в канале FITC. Для линий К-562, THP-1 и MelP разница между окрашенными клетками и контролем была незначительной, а достаточная флуоресценция наблюдалась только для PRAME-экспрессирующего WI-38 (Рисунок 45А). Разветвленный конъюгат **15** оказался хуже, чем его линейный аналог **12** (Таблица 5), что, вероятно, обусловлено сочетанием нескольких факторов: (1) самотушение флуоресцеина и (2) более низкая аффинность **15** по сравнению с **12** (Рис. 44). Следует также отметить, что для конъюгатов с высоким значением нагрузки красителя средняя DOL связанной с клетками фракции может быть ниже, чем у свободного конъюгата, поскольку аффинность обычно обратно коррелирует с DOL; в этом случае флуоресценция окрашенных клеток оказывается ниже ожидаемой.

В случае конъюгатов **19** и **22** была зарегистрирована достаточная флуоресценция для всех клеточных линий в канале APC. В отличие от того, что наблюдалось для антител, меченных флуоресцеином, разветвленный конъюгат **22** неизменно работал лучше, чем **19**, давая интенсивность флуоресценции клеток в 1.6–3 раза выше (Таблица 5). В данном случае более высокий DOL успешно трансформировался в повышенную флуоресценцию

клеток благодаря отсутствию самозатухания у **22** и небольшой разнице в аффинности **19** и **22**.

Эти результаты показывают, что мечение антител к белку PRAME флуоресцентными красителями проходит успешно и они могут быть использованы в диагностических целях для иммунофенотипирования клеток костного мозга больных острой миелоидной лейкемией. Данные о наличии белка PRAME на поверхности лейкозных клеток могут быть использованы для планирования PRAME-специфической терапии.

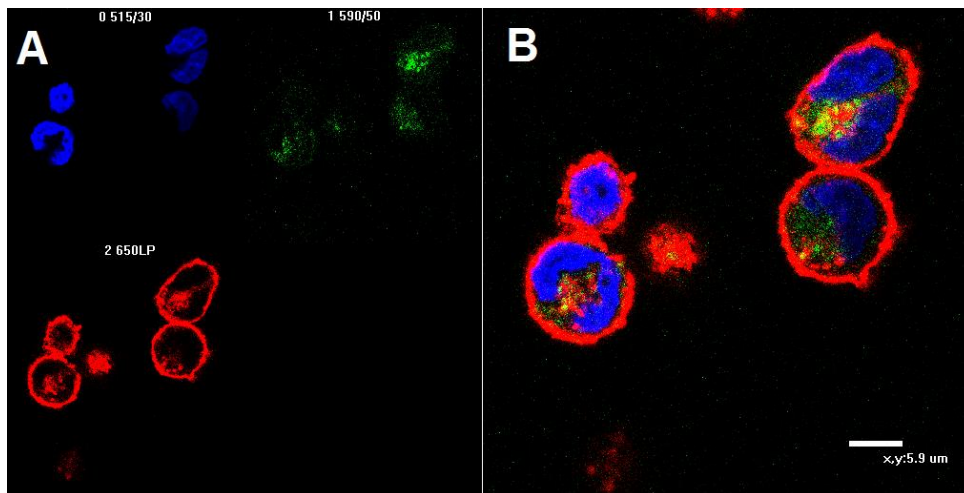


Рис. 49. Конфокальная микроскопия линии клеток K562, окрашенных AF488-мечеными антителами к белку PRAME, съемка в индивидуальных каналах (А), сложение (В)

Для изучения связывания флуоресцентно меченых антител с антигеном PRAME была проведена конфокальная микроскопия PRAME-положительной линии клеток K562 (Рис. 49).⁵ Мечение антителами было проведено на живых клетках при 37°C. Затем они были зафиксированы параформальдегидом для предотвращения пермеабилзации и связывания AF488-меченых антител с внутриклеточной формой белка PRAME. Мембрана и ядро были окрашены красителями PKA26 и DAPI, соответственно.

Инкубация клеток K562 с флуоресцентными антителами к PRAME дала слабое окрашивание мембраны клеток и гораздо более интенсивное цитоплазмы. С учетом того, что инкубация проводилась при 37°C на живых клетках не менее 1 ч, можно предположить, что антитела подверглись интернализации с помощью некоего механизма эндоцитоза. Следовательно, белок PRAME может служить также перспективной мишенью для

⁵ Эксперимент проводился Д.Ю. Рязанцевым (Лаборатория молекулярной диагностики ИБХ РАН)

разработки терапевтических конъюгатов антител, так как он способен к интернализации после связывания с антителом, как и было предположено ранее в литературе.^{268,269}

Известно, что количество белков на поверхности клеток может быть различным. Чем больше это количество, тем более эффективным будет использование терапевтических антител. Было установлено,²⁹⁰ что количество антигена CD19 на поверхности В-клеток составляет в приблизительно $1.9 \cdot 10^6$ на клетку. Минимальное количество антигена, достаточное для развития иммунного ответа при помощи немодифицированных антител, составляет около $1 \cdot 10^4$ на клетку, а для коротких антител, связывающих Т-лимфоциты с клетками-мишенями, составляет около $1 \cdot 10^3$ на клетку. Чтобы показать перспективность использования PRAME в качестве мишени необходимо установить типичное количество данного белка, находящегося на мембране клеток. Согласно нашим наблюдениям, это количество небольшое, что может быть ограничением для разработки методов PRAME-направленной терапии. С другой стороны, значительное количество белка-мишени на поверхности клетки также может создавать трудности, поскольку каждая клетка будет захватывать очень много антител, что потребует применения большой концентрации препарата.²⁹¹

Обнадеживающим результатом стало определение активности CD20 на поверхности лейкозных клеток больного В-клеточным хроническим лимфоидным лейкозом. Оказалось, что активность PRAME и CD20 на опухолевых клетках наблюдается на сопоставимом уровне²⁶⁹. Поскольку CD20 – известная мишень для эффективного препарата ритуксимаб и других, более продвинутых антител, возможно, что подобного эффекта можно добиться при использовании анти-PRAME-антител.

2.2. Терапевтические конъюгаты антител

Терапевтические конъюгаты антител (antibody–drug conjugates, ADCs) сочетают в себе специфичность антител и высокую активность низкомолекулярных лекарственных средств. Несмотря на простоту концепции, разработка подобного препарата является очень сложной. В настоящее время существует множество стратегий и подходов к решению этой задачи.

Известно, что линкер и сайт его конъюгации с антителом оказывают значительное влияние на стабильность ADC в кровотоке, на способность селективно связываться с

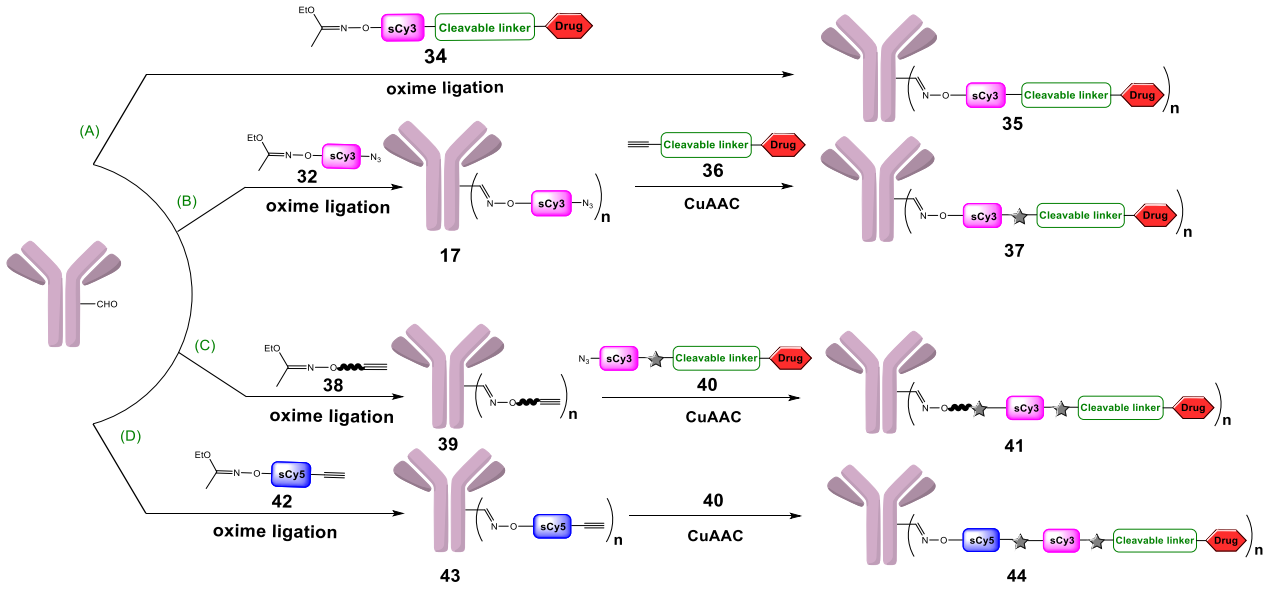
мишенью и высвободить молекулу лекарства. Также способ конъюгации может значительно менять фармакологические показатели целевого ADC.

В ходе экспериментов с флуоресцентно мечеными антителами к PRAME, полученными с помощью оксимного лигирования по окисленным остаткам гликанов, не было отмечено какого-либо снижения аффинности. Поэтому в качестве метода конъюгации к антителу было также выбрано оксимное лигирование в соответствии с разработанными ранее протоколами. В качестве оксиамин-содержащего линкера использовались бифункциональные сульфонианиновые красители, модифицированные гидрофильными гибкими производными тетраэтиленгликоля. Внедрение красителя в молекулу линкера позволяет легко и быстро провести контроль стехиометрии получаемого конъюгата с помощью спектрофотометрии. В качестве модельного препарата-цитотоксика был выбран доксорубицин.

Основные варианты сборки конъюгата представлены на схеме 8.

Подход А. Наиболее простым и очевидным подходом является синтез всей целевой молекулы, содержащей функциональную группу для конъюгации с антителом (этоксиприлиден-защищенный оксиамин), краситель для контроля стехиометрии (сульфоцианин **32**, $sCu3$), цитотоксический препарат (доксорубицин) и расщепляемый катепсиновый линкер (Val-Cit-PAVA). Подобный реагент **34**, как предполагалось, будет способен реагировать с карбонильной группой окисленного антитела, давая модельный ADC (Схема 10).

Стехиометрия конъюгата может быть установлена спектрофотометрически: благодаря наличию фрагмента красителя можно будет точно установить, сколько именно фрагментов доксорубицина находится на одной молекуле антитела, сравнивая поглощение IgG в области 280 нм (ϵ 210 000 $M^{-1}cm^{-1}$) и поглощение $sCu3$ в области 548 нм (ϵ 162 000 $M^{-1}cm^{-1}$). Таким образом предполагалось, что в кислом буфере этоксиприлиденовая защитная группа удаляется *in situ* и позволяет свободной оксиаминовой группе прореагировать с карбонильными группами антитела, образуя целевой конъюгат.



Структуры составных частей линкера:

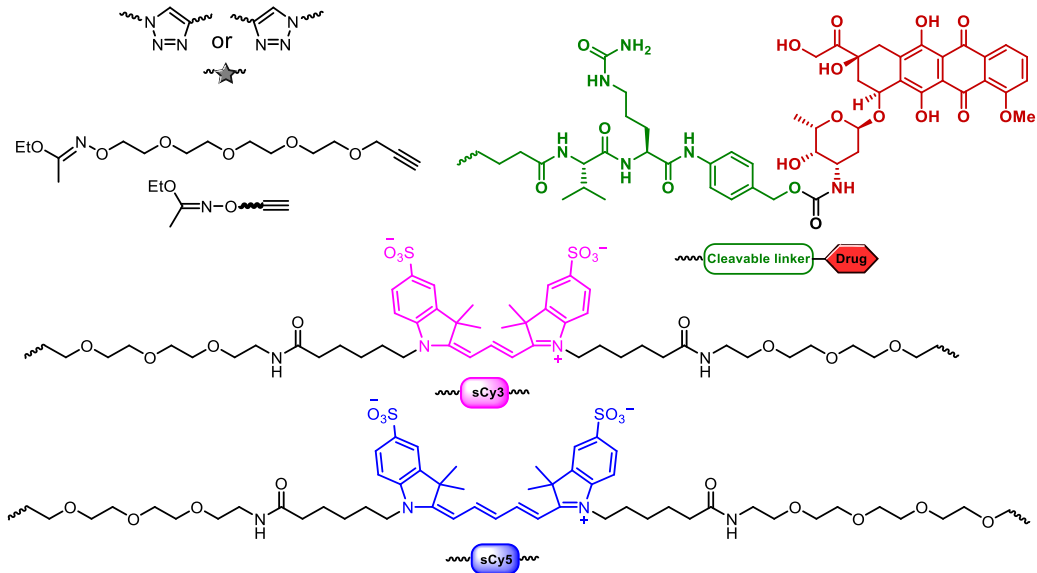


Схема 8. Подходы к сборке ADC с использованием оксимного лигирования окисленного IgG и флуоресцентных линкеров на основе сульфонианиновых красителей

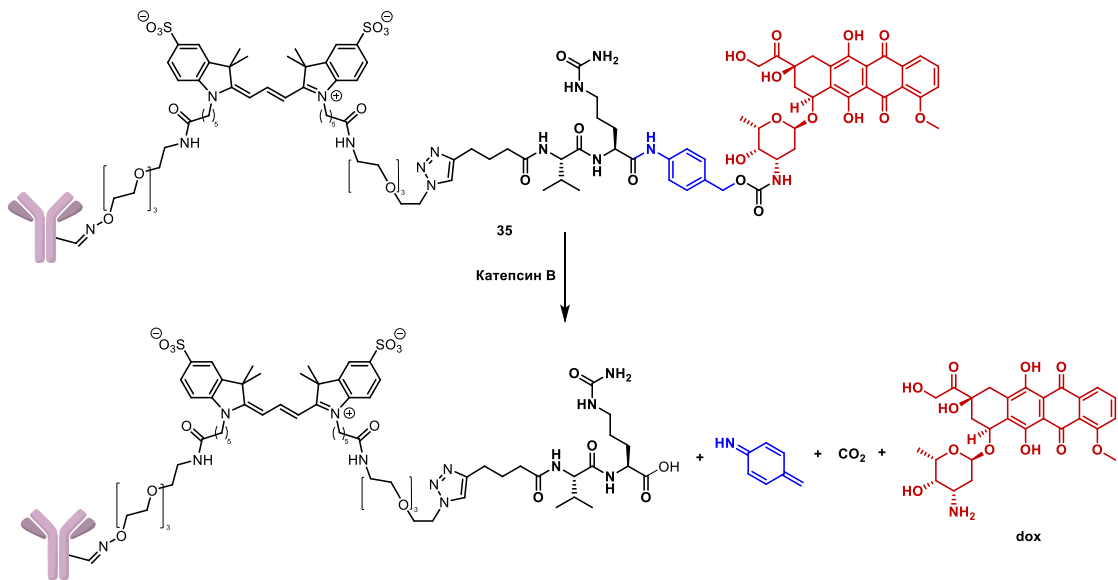


Схема 9. Расщепление линкера Val-Cit-АВА катепсином В

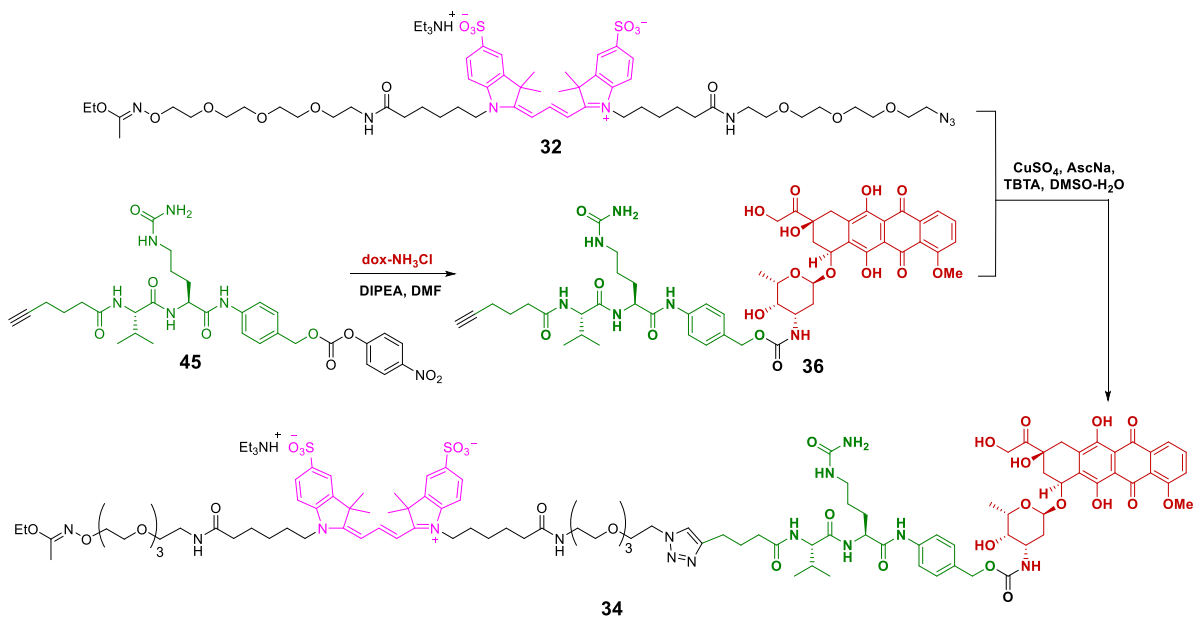


Схема 10. Синтез sCu₃-Val-Cit-АВА-доксорубицинового конъюгата 34

Однако здесь возникли трудности, так как молекула доксорубина также имеет карбонильную группу. Предположение, что альдегидная группа на молекуле антитела значительно более реакционноспособна, чем кетоновая на доксорубине, не оправдалось. В процессе инкубации в кислом буфере помимо лигирования на антитело происходило

лигирование свободных молекул низкомолекулярного конъюгата **34** друг на друга с образованием олигомеров (Схема 11). Эти олигомеры легко отделялись гель-фильтрацией, но их образование приводило к резкому снижению эффективности оксимного лигирования полезной нагрузки с антителом и к невозможности получить соотношение лекарство-антитело (drug-antibody ratio, DAR) более 0.29. Несмотря на то, что в данном случае подход не оправдал ожиданий, он может оказаться эффективным в случае для лекарственных молекул, не содержащих карбонильной группы (продемонстрировано далее).

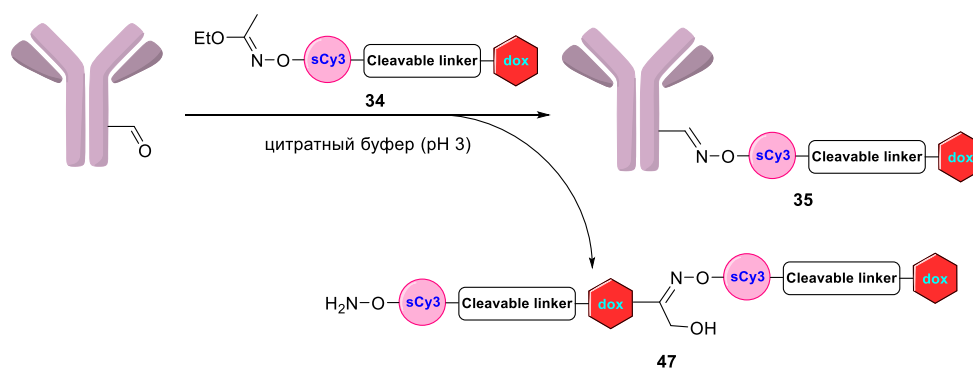


Схема 11. Побочная реакция в процессе получения конъюгата по пути А

Подход В. С целью устранить недостатки подхода А, молекула, которую планировалось лигировать на антитело, была «разбита» на две части: бифункциональную краску и фрагмент линкер-цитотоксический препарат. Сначала было произведено лигирование бифункциональной краски и окисленного антитела через оксимное лигирование, как описано выше. Этот этап не вызывал трудностей и позволил получить функционализированное азидогруппами антитело с известной стехиометрией (определена спектрофотометрически). Далее предполагалось провести «слепое» мечение этого антитела фрагментом линкер-цитотоксик с помощью медь-катализируемой реакции азид-алкин (CuAAC). В данном случае карбонильная группа доксорубина не должна была негативно повлиять. Конечно, по причине того, что доксорубин слабо поглощает ($\epsilon_{480} 20\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), не представлялось возможным спектрофотометрически определить выход этой реакции и нагрузку на антитело. Для грубой оценки DAR была проведена модельная реакция с красителем sCy5 и меченным sCy3 антителом (Схема 12) (Рис. 50).

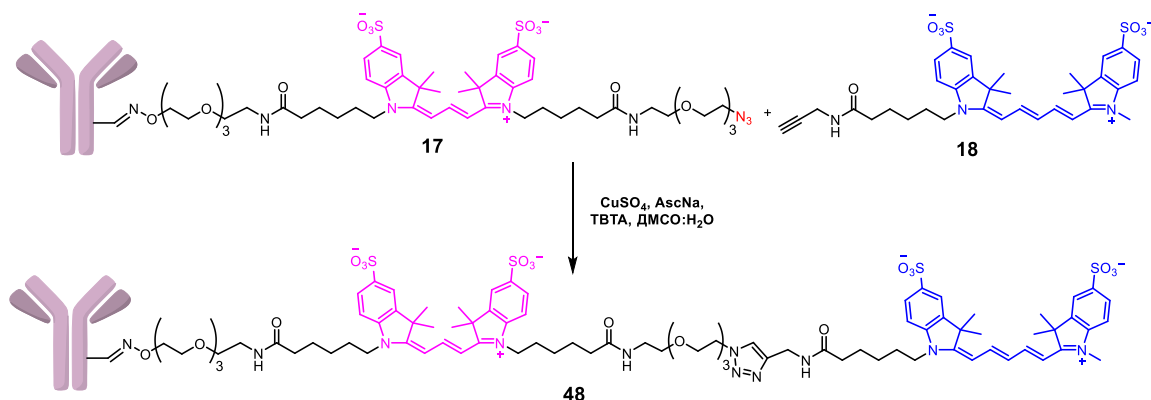


Схема 12. Модельный конъюгат sCu3 и sCu5 для оценки выхода клик-реакции на антителе

Другой проблемой явилась низкая растворимость реагента **36** в воде. Это сделало работу с ним в условиях приемлемых для биомолекул трудной. Для растворения соединения **36** необходимо добавлять значительные количества ДМСО (более 30%), приводящие к повреждению иммуноглобулинов и значительной агрегации. Таким образом этот подход не является оптимальным для синтеза ADC.

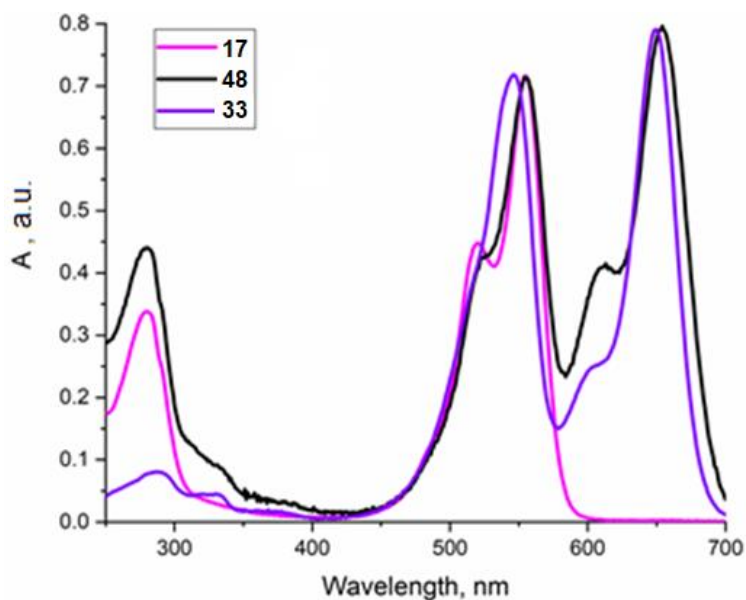


Рис. 50. Спектр UV/Vis конъюгатов БН8 **17** и **48** в сравнении с низкомолекулярным конъюгатом sCu3-sCu5 **33** в водном растворе

Подход С. Для увеличения растворимости модифицирующего реагента и обеспечения контроля стехиометрии, был синтезирован реагент **40**, более растворимый в воде благодаря гидрофильной природе красителя sCu3. Окисленные антитела были

лигированы с оксиамин содержащим алкиновым линкером **38** в условиях, описанных выше. В данном случае контроля стехиометрии на этом этапе не было и точное количество введенных в антитело алкиновых групп оставалось неизвестным. Однако как показали предыдущие эксперименты, оксимное лигирование протекает эффективно. Далее алкиновое антитело было промодифицировано реагентом **40** с помощью клик реакции CuAAC. Получившийся конъюгат может быть оценен спектрофотометрически. Нагрузка лекарственного препарата на антитело оказалась около 1. Таким образом метод оказался приемлемым и позволил получить ADC с известной стехиометрией и умеренным значением DAR (Схема 13).

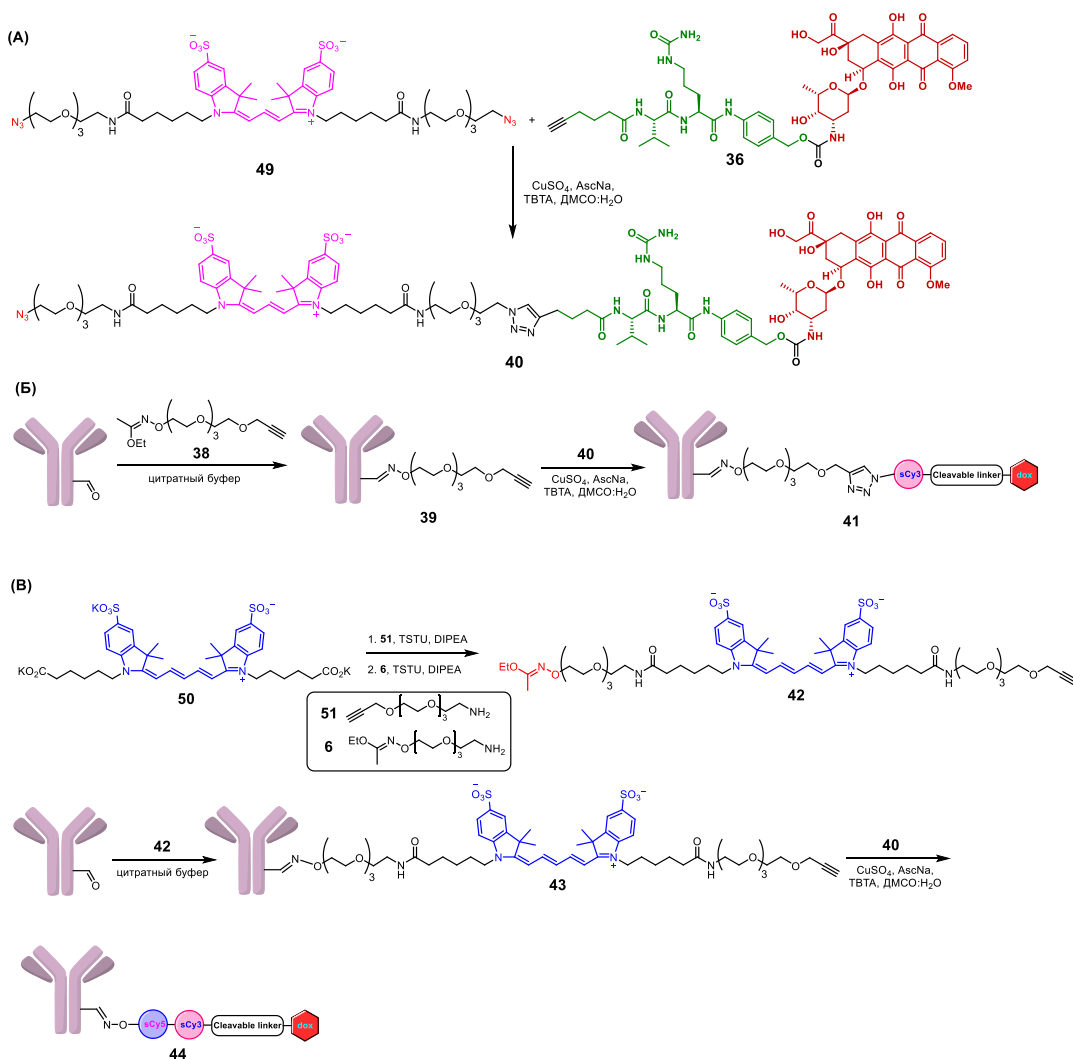


Схема 13. А) Синтез азидного реагента **40**. Б) Синтез конъюгата **41** по подходу С. В) Синтез конъюгата **44** по подходу D

Подход D. Несмотря на то, что подход C позволил получить конъюгат со всеми желаемыми параметрами, с его помощью не удалось получить DAR выше единицы. Процедура была изменена с использованием реагента **42** ($\epsilon_{646} 271\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), который бы позволил проконтролировать модификацию антитела алкином. Таким образом, появилась возможность провести процесс сборки целевого конъюгата постадийно, с полным контролем стехиометрии на каждом этапе. В результате модификации антитела красителем, был получен конъюгат **43** с DAR около 2 (Рис. 51). Последующая клик реакция с реагентом **40** сделала возможным получить конъюгат **44** с практически эквивалентным поглощением двух красителей sCu3 и sCu5, что означает количественное протекание клик реакции. Однако DAR был незначительно выше, чем у предыдущего подхода, около 2.

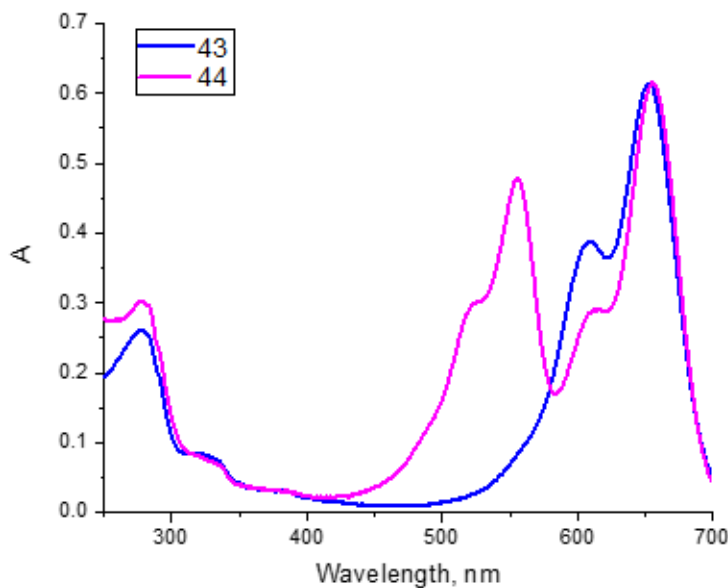


Рис. 51. UV/Vis спектр поглощения промежуточного конъюгата **43** и ADC **44** в буфере PBS

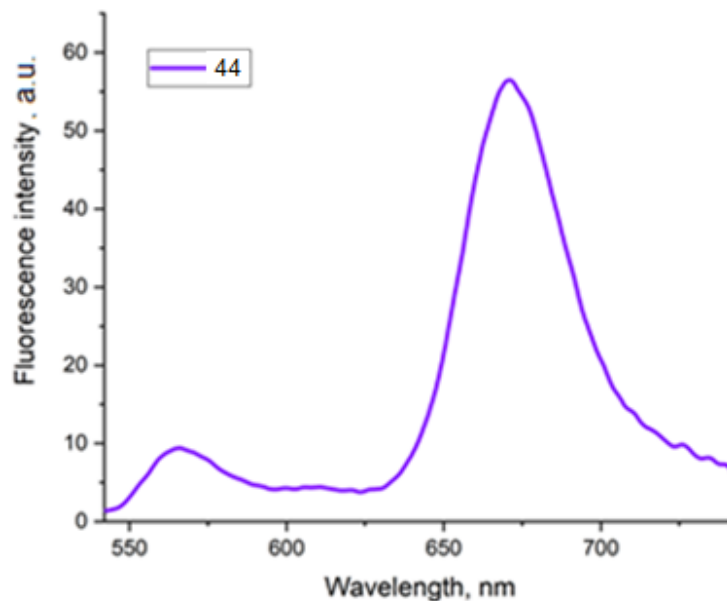


Рис. 52. Спектр флуоресценции конъюгата **44** (спектр эмиссии, длина волны возбуждения 520 нм)

Таким образом, несомненным достоинством подхода является прекрасный контроль стехиометрии на каждом этапе сборки и чуть более высокие значения DAR, однако все еще довольно умеренные. Линкерные реагенты **42** и **40**, несмотря на свою сложность, позволяют получить ADC из любого моноклонального антитела, имеющего гликаны.

Однако было решено также получить конъюгаты, содержащие более активный препарат, такой как монометиладельтин Е (ММАЕ). Это цитотоксическое вещество обладает в 1000 раз более низкими характерными значениями IC_{50} – 1 нМ против 1 мкМ для доксорубина, и действует как ингибитор сборки микротрубочек. В отличие от доксорубина, он не имеет в структуре карбонильной группы, и его конъюгат может быть получен в одну стадию по первому подходу А.

Для получения такого конъюгата ранее описанный в литературе линкер с ММАЕ был соединен с защищенным оксиамином sCu3 **32** (Схема 14).

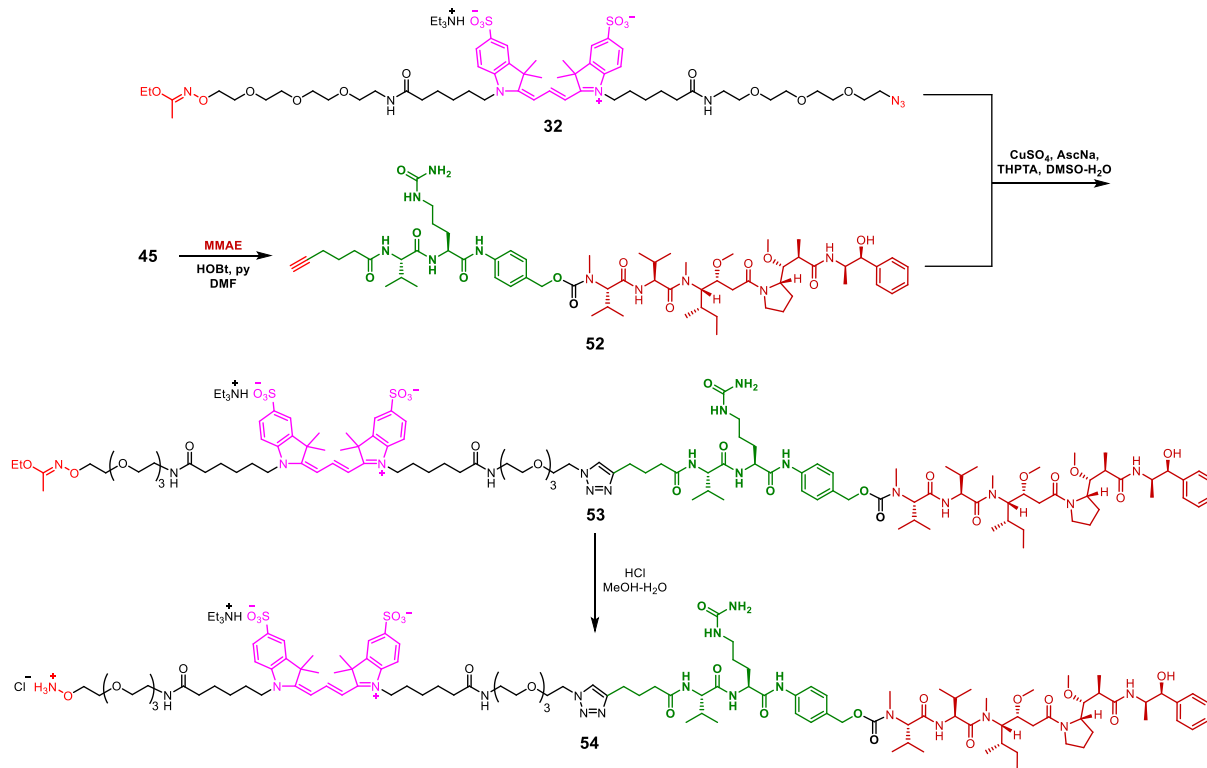


Схема 14. Синтез линкера с MMAE 54

Следует отметить, что деблокирование оксиамина в кислых водных буферах происходит значительно медленнее, что означает, что для получения конъюгата с достаточным DAR в реакции лигирования с окисленным антителом необходимо использовать большой избыток защищенного оксиаминового производного цитотоксического препарата. Чтобы уменьшить число эквивалентов полезной нагрузки, необходимой для конъюгации, и облегчить последующую очистку, этоксиэтилиденовая защитная группа была предварительно удалена в смеси метанола и HCl. Реакция завершилась в течение нескольких минут, в результате чего образовался деблокированный линкер 54. После его инкубации с окисленным антителом бН8 был получен конъюгат 55 с MMAE с DAR 3.0 (Схема 15, Рис. 53).

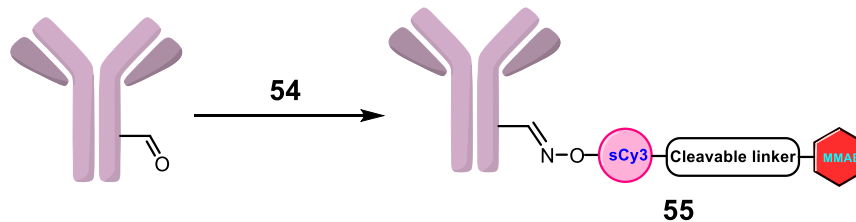


Схема 15. Синтез конъюгата антитела бН8 с линкером 54

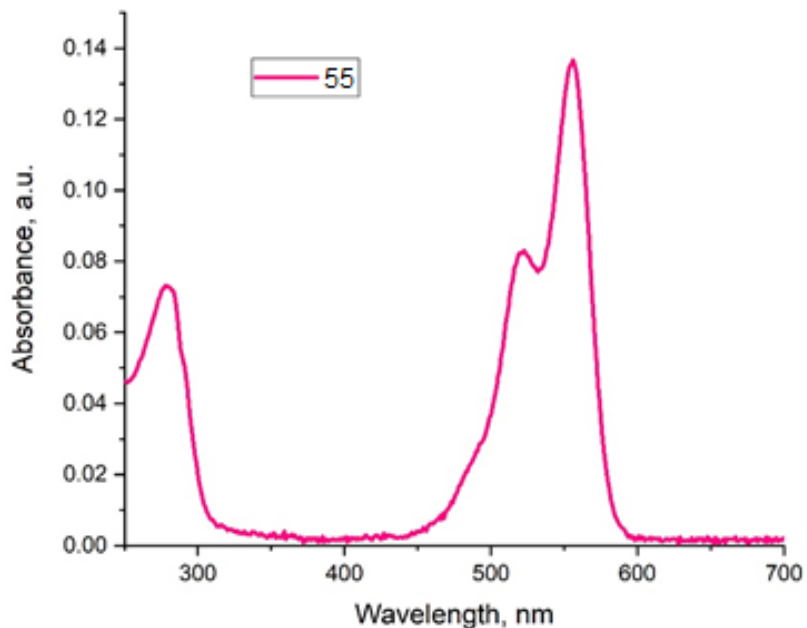


Рис. 53. UV/Vis спектр конъюгата 55

Также был проведен анализ ИФА с использованием иммобилизованного рекомбинантного белка PRAME для определения влияния модификации на аффинность антител 6H8. Было обнаружено, что оксимное лигирование, дающее конъюгаты 43 и 55, не ухудшает связывание антигена, в то время как последующая CuAAC-реакция, использованная для сборки ADC 44, приводит к некоторому снижению аффинности (Рис. 54).

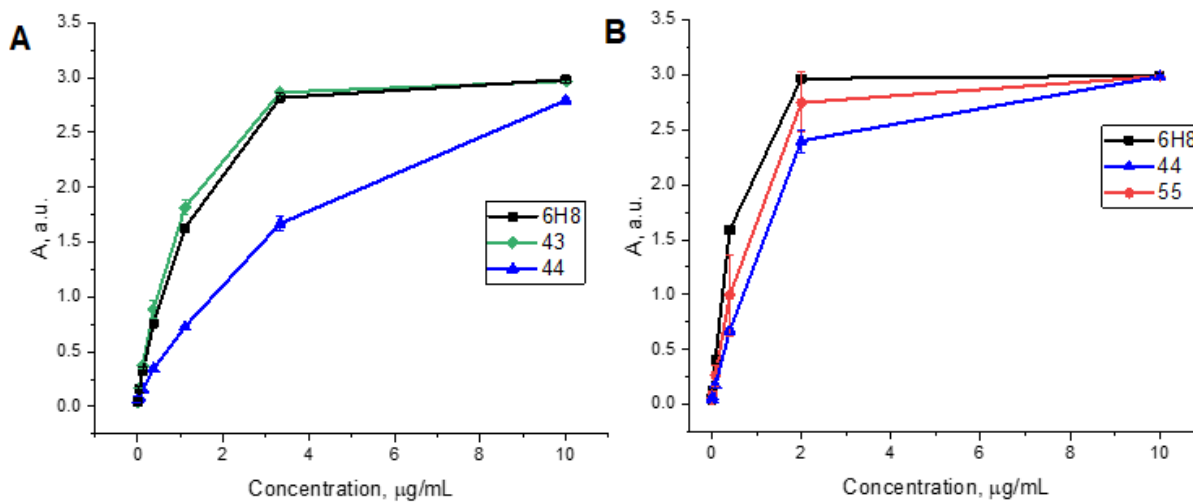


Рис. 54. ИФА анализ конъюгатов 43, 44 и 55

Цитотоксический эффект ADC **44** и **55** был проверен в МТТ-анализе на PRAME-экспрессирующих раковых клеточных линиях mel P и THP-1 и PRAME-отрицательной отменяющей клеточной линии CT26 (Рис. 55–57).⁶ Мы выбрали только те положительные клеточные линии, которые, как известно, экспрессируют мембранную форму белка; в PRAME-отрицательной клеточной линии антиген, включая его цитозольную форму, отсутствует. Для исследования цитотоксичности были использованы ADC **44** с DAR 1.8 и ADC **55** с DAR 2.1.

Mel P, клеточная линия меланомы человека, содержит мембранную форму PRAME в достаточно большом количестве. В МТТ анализе жизнеспособность клеток, обработанных конъюгатом **55** на основе ММАЕ, значительно снизилась ($IC_{50} = 47$ нМ), тогда как немодифицированное антитело 6H8 не проявило токсичности (Рисунок 28А). Кроме того, мы проверили цитотоксичность свободного ММАЕ и конъюгата sCu3-ММАЕ **54** ($IC_{50} < 15.6$ нМ для обоих). Конъюгат **54** проявил меньшую цитотоксичность по сравнению с ММАЕ (рис. 55 А), что, вероятно, связано с его меньшей способностью проникать через клеточную мембрану из-за заряженного цианинового фрагмента молекулы.

Напротив, обработка клеток конъюгатом доксорубина **44** в концентрации до 500 нМ не привела к гибели клеток, в то время как IC_{50} свободного доксорубина была определена на уровне 0.17 мкМ. Конъюгат доксорубин-краситель **40** не проявлял токсических эффектов в протестированных концентрациях из-за добавленного заряда (Рисунок 55 В).

⁶ Эксперименты проводились Д.Ю. Рязанцевым (Лаборатория молекулярной диагностики ИБХ РАН) и Е.В. Рябухиной (Лаборатория химии липидов ИБХ РАН)

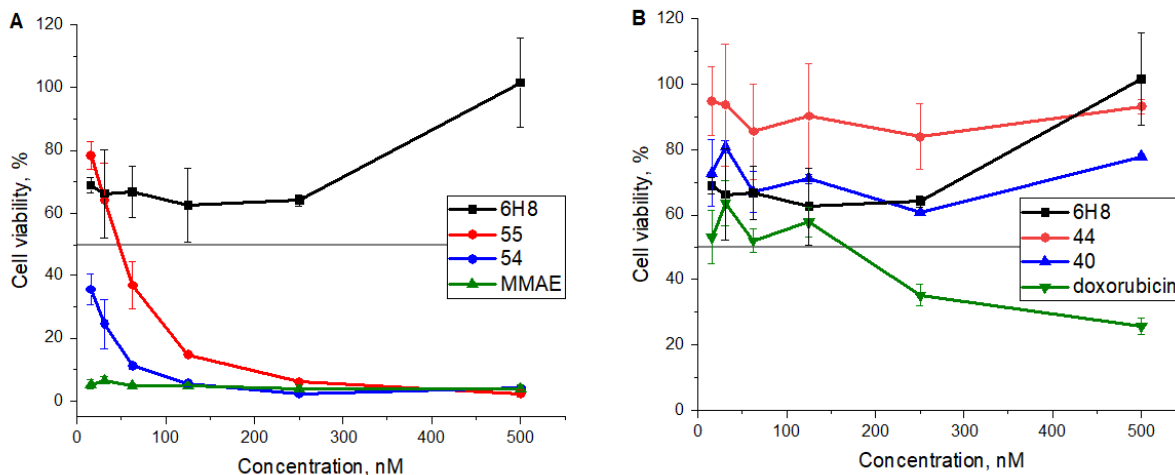


Рис. 55. МТТ анализ выживаемости PRAME(+) клеточной линии mel P, спустя 72 ч инкубации с (А) **54**, **55**, свободным MMAE и интактным антителом 6H8; (В) **40**, **44**, свободным доксорубицином и интактным антителом 6H8

Аналогичные эффекты наблюдались в случае линии PRAME (+) ТНР-1. Заметное снижение жизнеспособности клеток наблюдалось для конъюгатов **55** ($IC_{50} = 46$ нМ) и **54** ($IC_{50} = 33$ нМ), а также свободного MMAE ($IC_{50} < 15.6$ нМ) (рис. 56 А). Конъюгаты **44** и **40** на основе доксорубицина оказались неэффективными, в то время как свободный доксорубицин проявил довольно сильную цитотоксичность ($IC_{50} = 44$ нМ) (Рис. 56 В).

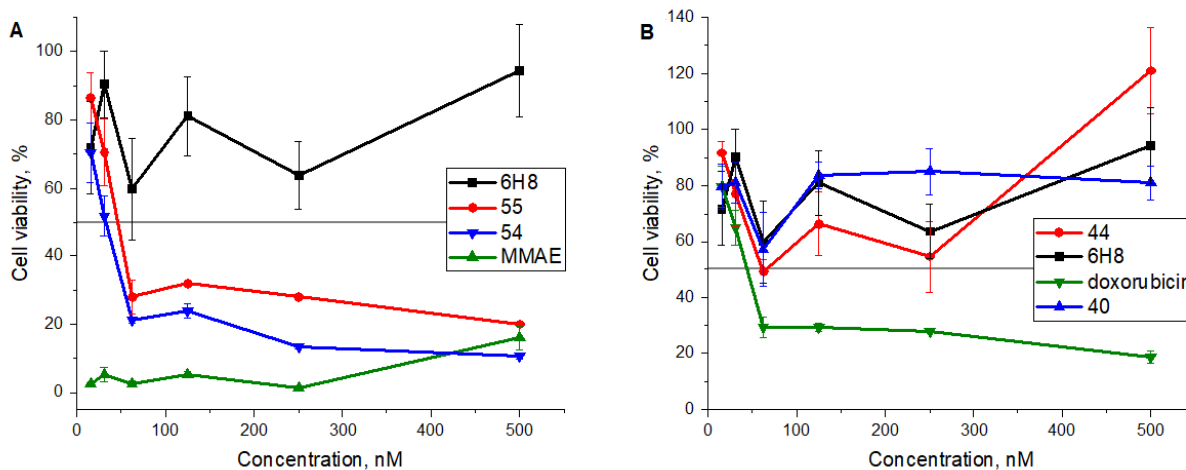


Рис. 56. МТТ анализ выживаемости PRAME(+) клеточной линии ТНР-1, спустя 72 ч инкубации с (А) **54**, **55**, свободным MMAE и интактным антителом 6H8; (В) **40**, **44**, свободным доксорубицином и интактным антителом 6H8

В случае клеточной линии мышинной колоректальной карциномы СТ26 (Рис. 57 А,В), которая не экспрессирует PRAME в мембранной или цитозольной форме, не наблюдалось снижения жизнеспособности после обработки конъюгатом **55** (Рисунок 2.2.7А) или **44**

(Рис. 57 В). В этом случае цитотоксичность проявляли только MMAE ($IC_{50} = 22.4$ нМ), доксорубицин ($IC_{50} = 0.19$ мкМ) и конъюгат **54** (0.49 мкМ).

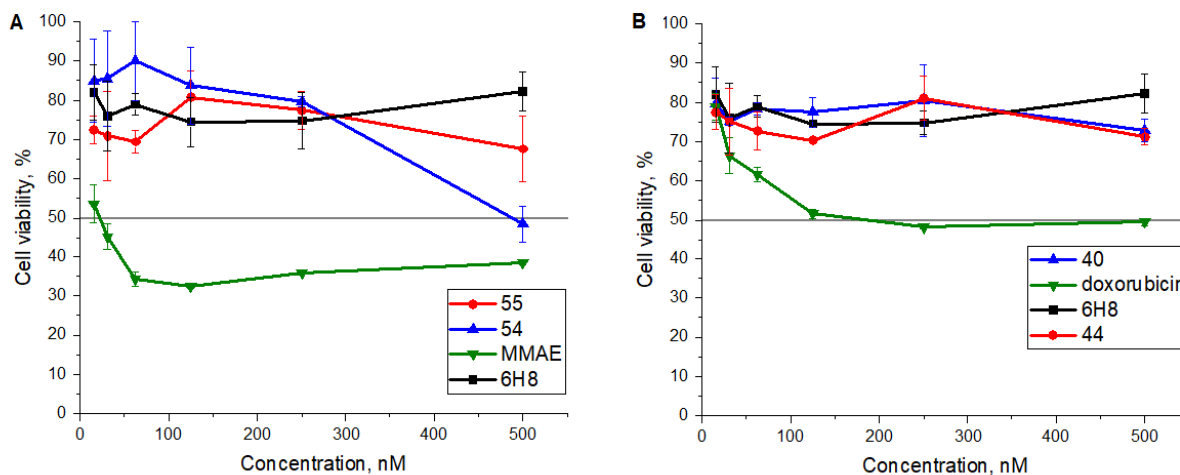


Рис. 57. МТТ анализ выживаемости PRAME(-) клеточной линии СТ26, спустя 72 ч инкубации с (А) **54**, **55**, свободным MMAE и интактным антителом 6H8; (В) **40**, **44**, свободным доксорубицином и интактным антителом 6H8

Таким образом, мы наблюдали специфическую активность конъюгата **55** против PRAME-положительных клеток при наномолярных концентрациях. Этот результат согласуется с ранее описанными ADC на основе MMAE к другим опухолевым антигенам. Важно отметить, что конъюгат доксорубицина **44** не проявлял активности против этих клеточных линий при концентрациях до 0.5 мкМ. Исходя из того, что конъюгаты **55** и **44** имели сопоставимые значения аффинности и DAR, можно сделать вывод, что отсутствие цитотоксического эффекта связано с тем, что доксорубицин недостаточно токсичен для использования в препаратах анти-PRAME ADC.

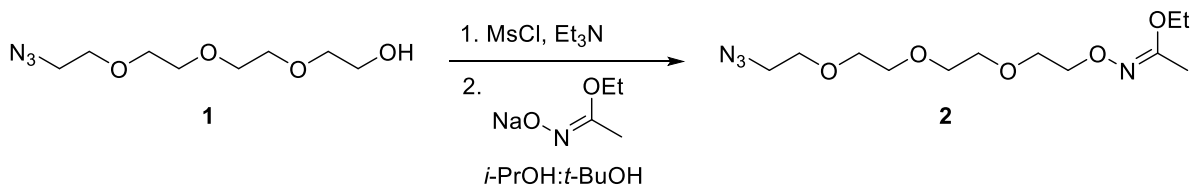
Глава 3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

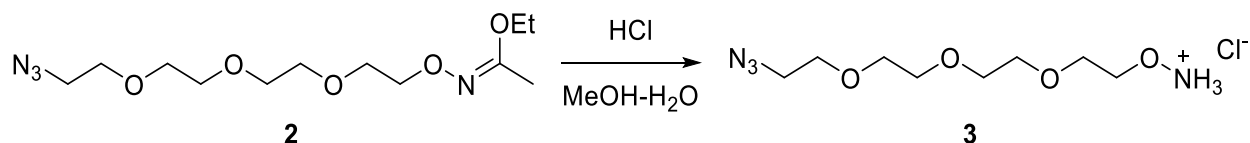
Материалы и методы

Диметилформамид (DMF) очищали перегонкой с бензолом и водой, затем вакуумной перегонкой над СаН₂, хранили над молекулярными ситами 3Å. Дихлорметан (DCM) и метанол (MeOH) очищали перегонкой, диметилсульфоксид (DMSO) перегоняли в вакууме и хранили над молекулярными ситами 3Å. Диэтиловый эфир и триэтиламин очищали перегонкой над КОН, тетрагидрофуран (THF) перегоняли над алюмогидридом лития. Протекание реакций контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), проводимой на 0.20 мм силикагелевых пластинах DC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) с использованием УФ для визуализации и щелочного водного раствора КМnО₄ и нагрева для проявления. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60, размер частиц 0.040–0.063 мм (Merck, Германия). Для гель-фильтрации использовали сефадекс G-10 Fine и G-50 Fine (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) и Bio-Gel P-100 (Bio-Rad, США), а также колонки NAP-5 и NAP-10 (Cytiva, США). Спектры ЯМР регистрировали на приборах Varian Inova 300 МГц (Varian, США) и Bruker Avance 700 и 800 МГц (Bruker, США), химические сдвиги корректировали с использованием остаточного растворителя в качестве внутреннего стандарта [для CDCl₃: ¹H, δ 7.26 м.д. и ¹³C, δ 77.16 м.д.; для DMSO-*d*₆: ¹H, δ 2.50 м.д. и ¹³C, δ 39.52 м.д.]. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на масс-спектрометре Thermo Scientific Orbitrap Exactive (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием ESI (ионизация электрораспылением). Спектры оптического поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 100 UV-Visible (Agilent Technologies, США). Спектры флуоресценции регистрировались на флуориметре PerkinElmer LS55 (PerkinElmer, США). Измерение оптической плотности растворов в планшетных лунках производили на микропланшетном ридере Packard SpectraCount BS10000 (PerkinElmer, США). Проточную цитометрию проводили на приборе ACEA NovoCyte (ACEA Biosciences, США).

Методики синтеза

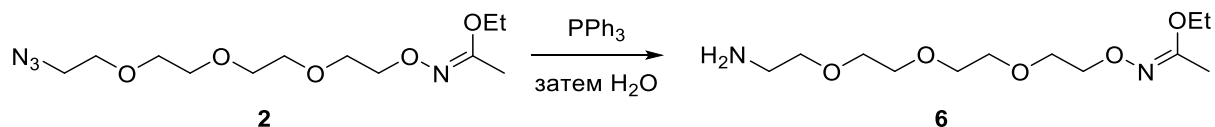


Имидат 2. Мезилхлорид (54 мг, 0.47 ммоль) был по каплям добавлен к смеси исходного спирта **1** (200 мг, 0.43 ммоль) и триэтиламина (120 мкл, 0.86 ммоль) в сухом DCM (10 мл). Ход реакции контролировали по ТСХ. После полной конверсии исходного спирта реакционная масса была упарена, перерастворена в THF (15 мл) и отфильтрована через целлюлозный фильтр. После упаривания растворителя целевое вещество было получено в виде желтоватого масла (521 мг, 0.43 ммоль). Оно было растворено в смеси изопропилового и *трет*-бутилового спирта (1:1 об/об, 20 мл), затем к полученной смеси порциями прибавляли натриевую соль этил *N*-гидроксиацетимидата (269 мг, 2.15 ммоль) при постоянном перемешивании. Реакционную массу кипятили с обратным холодильником до полной конверсии исходного мезилата (контроль по ТСХ). Затем осадок мезилата натрия отфильтровали, растворитель упарили при пониженном давлении. Целевое вещество выделили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Бесцветное масло; выход 105 мг (80%). R_f 0.4 (силикагель, 5% MeOH в DCM), ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): δ 4.00–3.93 (м, 4H), 3.64–3.59 (м, 4H), 3.77–3.57 (м, 8H), 3.43–3.39 (м, 2H), 1.89 (с, 3H), 1.23 (т, $J = 7.5$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): δ 162.2, 72.9, 70.4, 70.34, 70.31, 70.2, 69.7, 69.0, 62.3, 60.5, 14.7, 13.9. HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 305.1819; найдено 305.1816.



Оксиаминоазид 3. Исходное соединение **2** (500 мг, 1.5 ммоль) растворили в метаноле (20 мл), При комнатной температуре к раствору прикапали 37% раствор соляной кислоты (350 мкл, 4.1 ммоль), После окончания реакции раствор упарили при пониженном давлении, получив бесцветное масло (355 мг; 92%). R_f 0.47 (силикагель, 20% MeOH в EtOAc). ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): δ 11.04 (уш. с, 3H), 4.16–4.13 (м, 4H), 3.65–3.58 (м,

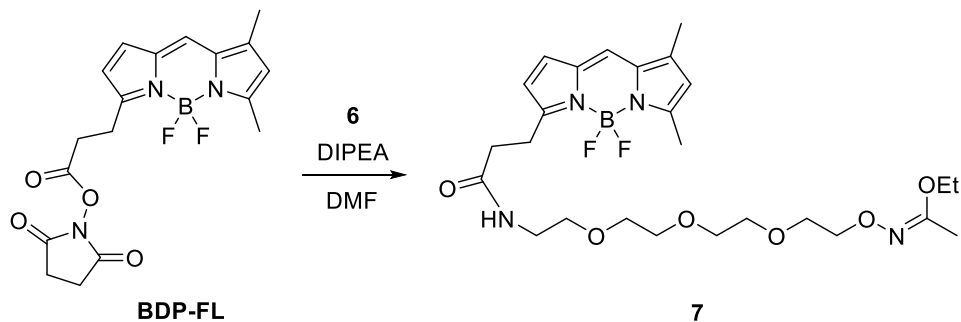
8H), 3.41–3.38 (м, 4H). ^{13}C ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): δ 74.0, 70.3, 70.23, 70.20, 70.17, 69.7, 68.2, 50.5. HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 235.1401; найдено 235.1390.



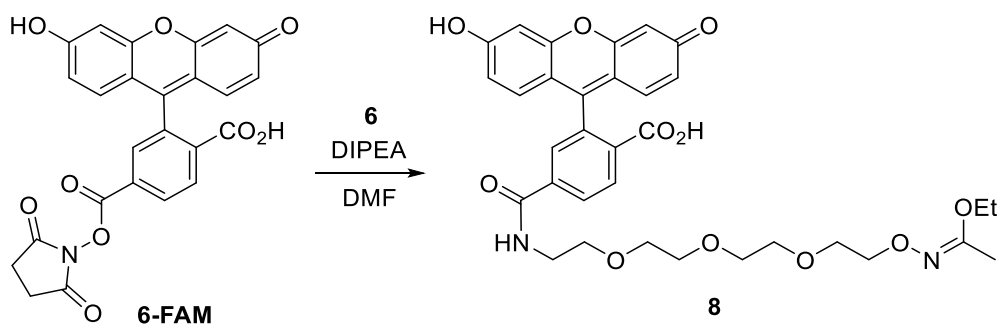
Имидат 6. К раствору этил N-(11-азидо-3,6,9-триоксаундецилокси)ацетимидата **2** (532 мг, 1.75 ммоль) в сухом ТГФ (15 мл) добавили трифенилфосфин (550 мг, 2.1 ммоль) одной порцией, перемешивали в течение 2 ч. Затем добавили воду (500 мкл), и реакционную смесь кипятили до тех пор, пока не исчез промежуточный продукт – фосфазен (контроль по ТСХ, 5% метанола в DCM, R_f фосфазена 0,7). После упаривания растворителя при пониженном давлении проводили хроматографию на силикагеле ($\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}/\text{DCM}$, градиент Et_3N от 0 до 5%). Соединение **6** было получено в виде желтоватого масла, выход 423 мг (87%). R_f 0.42 (силикагель, 5% MeOH/5% $\text{Et}_3\text{N}/\text{DCM}$). ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): 3.98–3.91 (м, 4H), 3.61–3.47 (м, 12H), 3.36 (т, $J = 5.6$ Гц, 2H), 2.65 (т, $J = 5.8$ Гц, 2H), 1.87 (с, 3H), 1.21 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): 178.9, 162.2, 73.3, 72.8, 70.4, 70.31, 70.28, 70.1, 69.0, 62.3, 14.7, 13.9. HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 279.1920, найдено 279.1923.

Общая методика I: синтез этоксиэтилидензащищенных оксиаминовых производных красителей

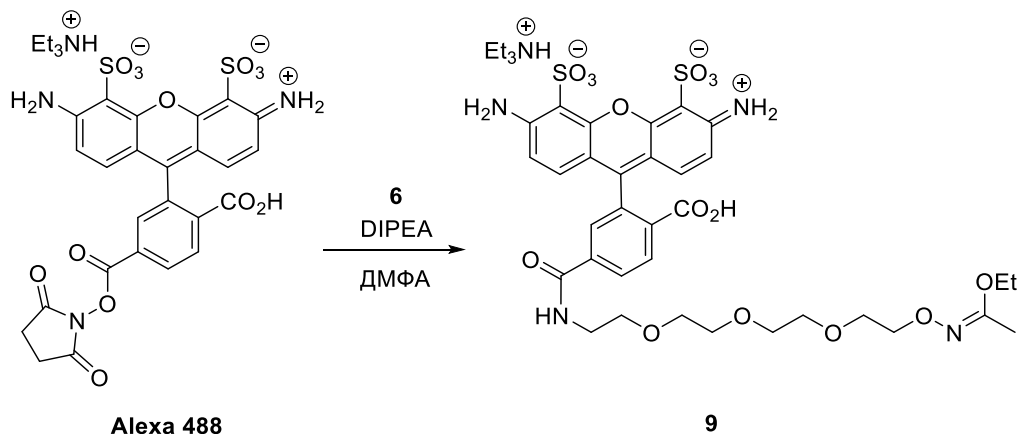
Амин **6** (22.2 мг; 0.08 ммоль) был добавлен при перемешивании к раствору N-гидроксисукцинимидного эфира красителя (0.07 ммоль) в сухом DMF (15 мл) при 0 °С. Затем в реакцию по каплям добавили DIPEA (36.5 мкл, 0.21 ммоль). Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. После расходования исходного N-гидроксисукцинимидного эфира реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. целевой продукт выделяли колоночной хроматографией.



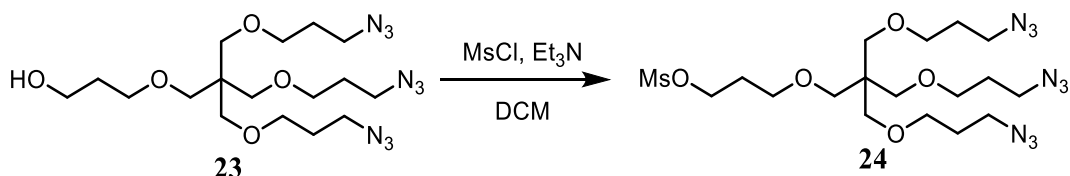
BDP оксиамин 7. Продукт был очищен колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте 0→5% EtOH в DCM. Соединение **7** было получено в виде темно-оранжевого масла, выход 25.9 мг (67%). R_f 0.45 (силикагель, 5% EtOH в DCM). ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): 7.95 (с, 1H), 7.09 (с, 1H), 6.36 (с, 1H), 6.29 (с, 1H), 3.96–3.92 (м, 2H), 3.63–3.47 (м, 12H), 3.25–3.21 (м, 2H), 3.12–3.06 (м, 2H), 2.48–2.44 (м, 5H), 2.25 (с, 3H), 1.86–1.83 (м, 2H), 1.80–1.73 (м, 2H), 1.22–1.17 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): 179.9, 171.4, 162.2, 159.6, 158.4, 144.5, 133.5, 132.8, 132.0, 129.2, 125.7, 120.7, 117.1, 72.8, 72.5, 70.2, 69.6, 69.0, 62.3, 51.7, 34.2, 29.5, 24.5, 14.9, 13.9, 11.4. HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 553.3003, найдено 553.3015.



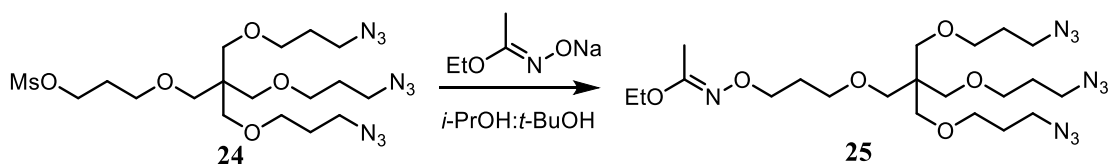
FAM оксиамин 8. Продукт был очищен колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте 0→5% EtOH в DCM. Соединение **8** было получено в виде желтого масла, выход 26.7 мг (60%). R_f 0.5 (силикагель, 5% EtOH в DCM). ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): 10.13 (уш с, 1H), 8.69 (т, $J = 6.3$ Гц, 1H), 8.18 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H), 8.08 (д, $J = 8.7$ Гц, 1H), 7.69 (с, 1H), 6.71 (м, 2H), 6.61–6.56 (м, 4H), 3.94 (кв, $J = 7.6$ Гц, 2H), 3.92–3.88 (м, 2H), 3.57–3.53 (м, 3H), 3.51–3.44 (м, 12H), 1.85 (с, 3H), 1.20 (т, $J = 7.6$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO-}d_6$): 173.2, 168.5, 165.1, 162.2, 160.1, 153.2, 152.4, 141.1, 129.9, 129.6, 128.7, 125.3, 122.8, 113.2, 109.7, 102.8, 83.9, 72.8, 70.30, 70.25, 70.21, 70.16, 70.0, 69.1, 68.9, 62.3, 25.7, 15.6, 14.8, 14.7, 14.4, 13.9. HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{11}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 637.2392, найдено 637.2397.



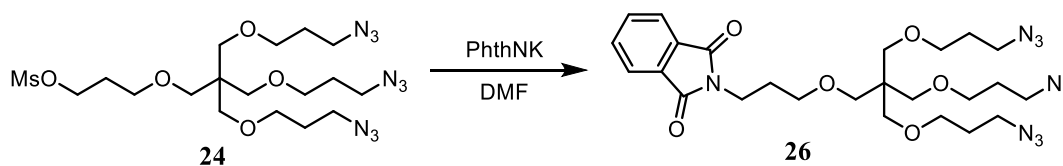
Алеха оксиамин 9. Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле. градиентное элюирование 0→25% EtOH в DCM. Соединение **9** было получено в виде темно-красного порошка. Выход 44.5 мг (80%). R_f 0.36 (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 56:40:3:1). MS (ESI) вычислено для C₃₃H₃₇N₄O₁₅S₂⁻ [M]⁻ 793.2, найдено 793.2.



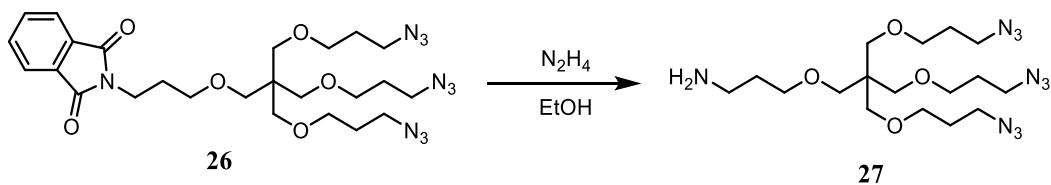
Мезилат 23. Раствор спирта **23**²⁸⁹ (190 мг, 0.43 ммоль) в DCM (4.0 мл) охладили до 0 °С; добавили Et₃N (87 мг, 0.117 мл, 0.86 ммоль), а затем по каплям мезилхлорид (74 мг, 0.050 мл, 0.64 ммоль). Реакционную смесь нагрели до 23 °С и перемешивали в течение 1 ч. Затем растворитель удалили при пониженном давлении, к остатку добавили THF (5 мл), в результате чего образовался бесцветный осадок. Осадок был отделен фильтрованием, фильтрат был сконцентрирован при пониженном давлении. Полученное масло очищали колоночной хроматографией (силикагель, гексан–EtOAc, 10:1→5:1→2,5:1). Мезилат **23** был получен в виде бесцветного масла (202 мг, 90%). R_f 0.40 (силикагель, гексан–EtOAc, 1:1). ¹H ЯМР (700 МГц, CDCl₃) δ 4.32 (т, J = 6.3 Гц, 2H), 3.50 (т, J = 5.8 Гц, 2H), 3.46 (т, J = 5.9 Гц, 6H), 3.39–3.34 (м, 14H), 3.01 (с, 3H), 1.99 (квint, J = 6.1 Гц, 2H), 1.82 (квint, J = 6.3 Гц, 6H). ¹³C ЯМР (176 МГц, CDCl₃) δ 69.9, 69.8, 68.1, 67.3, 66.7, 48.6, 45.5, 37.4, 29.6, 29.2. HRMS (ESI) вычислено для C₁₈H₃₆N₉O₇S⁺ [M+H]⁺ 522.2453; найдено 522.2452.



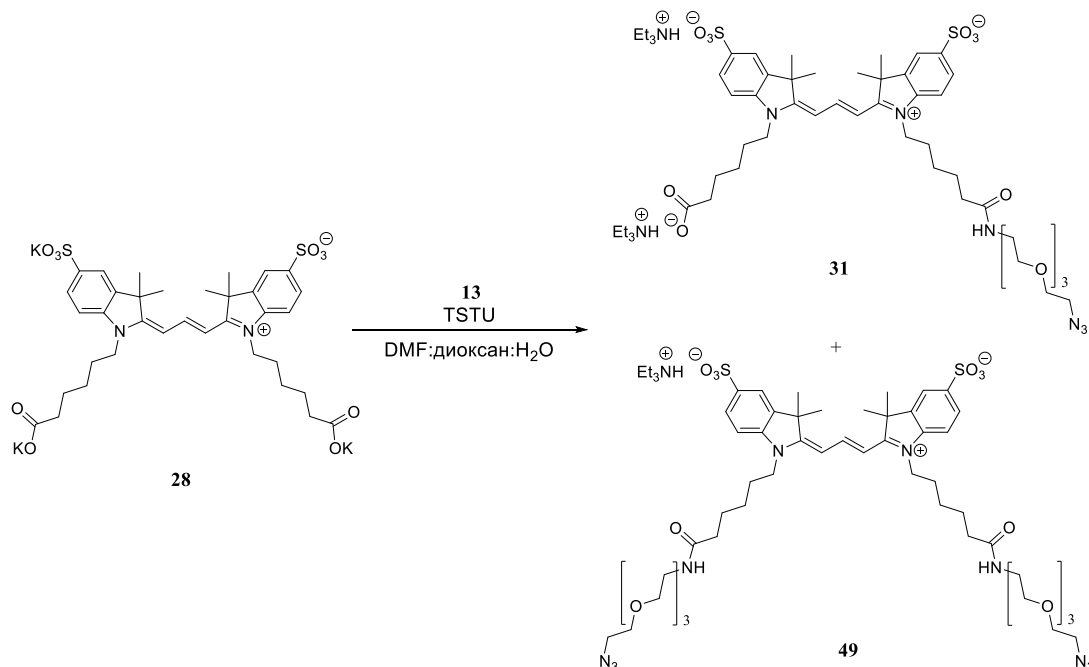
Имидат 25. Мезилат **24** (90 мг, 0.17 ммоль) был растворен в смеси *t*-BuOH и *i*-PrOH (1 мл. 1:1 об/об). Прибавили натриевую соль этил-*N*-гидроксиацетимидата (79 мг. 0.63 ммоль), реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2.5 ч. Затем смесь охладил до 23 °С, разбавили EtOAc (10 мл) и отфильтровали через пористый фильтр. Растворитель упарили при пониженном давлении, полученный остаток очищали колоночной хроматографией (силикагель, гексан–EtOAc, 15:1→10:1). Получен имидат **25** в виде бесцветного масла (60 мг, 66%). R_f 0.52 (силикагель, гексан–EtOAc, 2:1). ^1H ЯМР (700 МГц, CDCl_3) δ 4.01 (кв, $J = 7.1$ Гц, 2H), 3.95 (т, $J = 6.4$ Гц, 2H), 3.46 (т, $J = 5.9$ Гц, 8H), 3.40–3.33 (м, 14H), 1.92 (с, 3H), 1.87 (квинт, $J = 6.4$ Гц, 2H), 1.85–1.80 (м, 6H), 1.27 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3) δ 162.3, 70.7, 69.9, 69.8, 68.5, 68.1, 62.2, 48.7, 45.6, 29.4, 29.2, 14.5, 13.7. HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_{10}\text{O}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 529.3205; найдено 529.3204.



Фталиимид 26. Мезилат **24** (101 мг, 0.20 ммоль) был растворен в DMF (2 мл). Добавили фталиимид калия (51 мг, 0.28 ммоль), реакционную смесь перемешивали при 90 °С в течение 2 ч. Затем смесь охладил до 23 °С, DMF удалили при пониженном давлении (температура водяной бани – 60 °С), и полученный остаток суспендировали в EtOAc (10 мл) и отфильтровали через целит, промывая EtOAc. Растворитель из фильтрата (EtOAc вместе с остаточным DMF) был удален при пониженном давлении; полученный остаток был очищен колоночной хроматографией (силикагель, гексан–EtOAc, 6:1). Получили фталиимид **26** в виде бесцветного масла (102 мг, 92%). R_f 0.34 (силикагель, гексан–EtOAc, 2:1). ^1H ЯМР (700 МГц, CDCl_3) δ 7.86–7.83 (м, 2H), 7.73–7.69 (м, 2H), 3.77 (каж. т, $J = 7.1$ Гц, 2H), 3.47–3.42 (м, 8H), 3.39–3.32 (м, 4H), 1.94 (каж. квинт, $J = 6.6$ Гц, 2H), 1.82 (каж. квинт, $J = 6.4$ Гц, 6H). ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3) δ 168.5, 134.0, 132.40, 123.3, 70.0, 69.9, 69.0, 68.0, 48.7, 45.5, 35.8, 29.2, 28.9. HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_{10}\text{O}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 573.2892; найдено 573.2890.

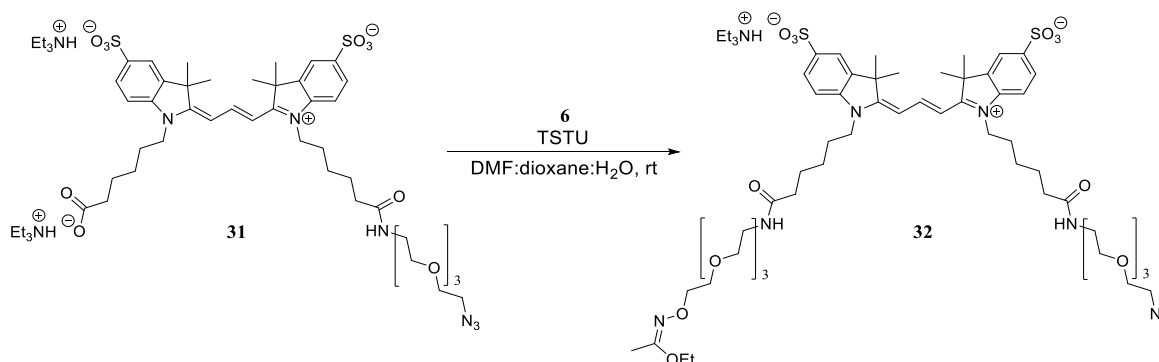


Амин 27. Фталимид **26** (78 мг, 0.136 ммоль) был растворен в EtOH (5 мл). К раствору прибавили $N_2H_4 \cdot H_2O$ (136 мг, 0.133 мл, 2.72 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 60 °С в течение 1 ч. Затем смесь охладили до 23 °С, растворитель упарили при пониженном давлении. Полученный твёрдый остаток суспендировали в Et₂O (10 мл) и отфильтровали через целит, промывая Et₂O. Фильтрат сконцентрировали при пониженном давлении, полученный остаток очистили колоночной хроматографией (силикагель, DCM–MeOH–Et₃N, 20:1:0→10:1:0→20:1:0.2); амина **27** был получен в виде бесцветного масла (32 мг, 53%). R_f 0.17 (силикагель, DCM–MeOH–Et₃N, 5:1:0.06). ¹H ЯМР (700 МГц, CDCl₃) δ 3.49–3.45 (м, 8H), 3.38–3.35 (м, 14H), 2.81 (т, $J = 6.6$ Гц, 2H), 1.82 (м, $J = 6.3$ Гц, 6H), 1.71 (квинт, $J = 6.3$ Гц, 2H). ¹³C ЯМР (176 МГц, CDCl₃) δ 70.1, 70.0, 69.9, 68.1, 48.7, 45.5, 40.0, 33.1, 29.2. HRMS (ESI) вычислено для C₁₇H₃₅N₁₀O₄⁺ [M+H]⁺ 443.2837; найдено 443.2836.

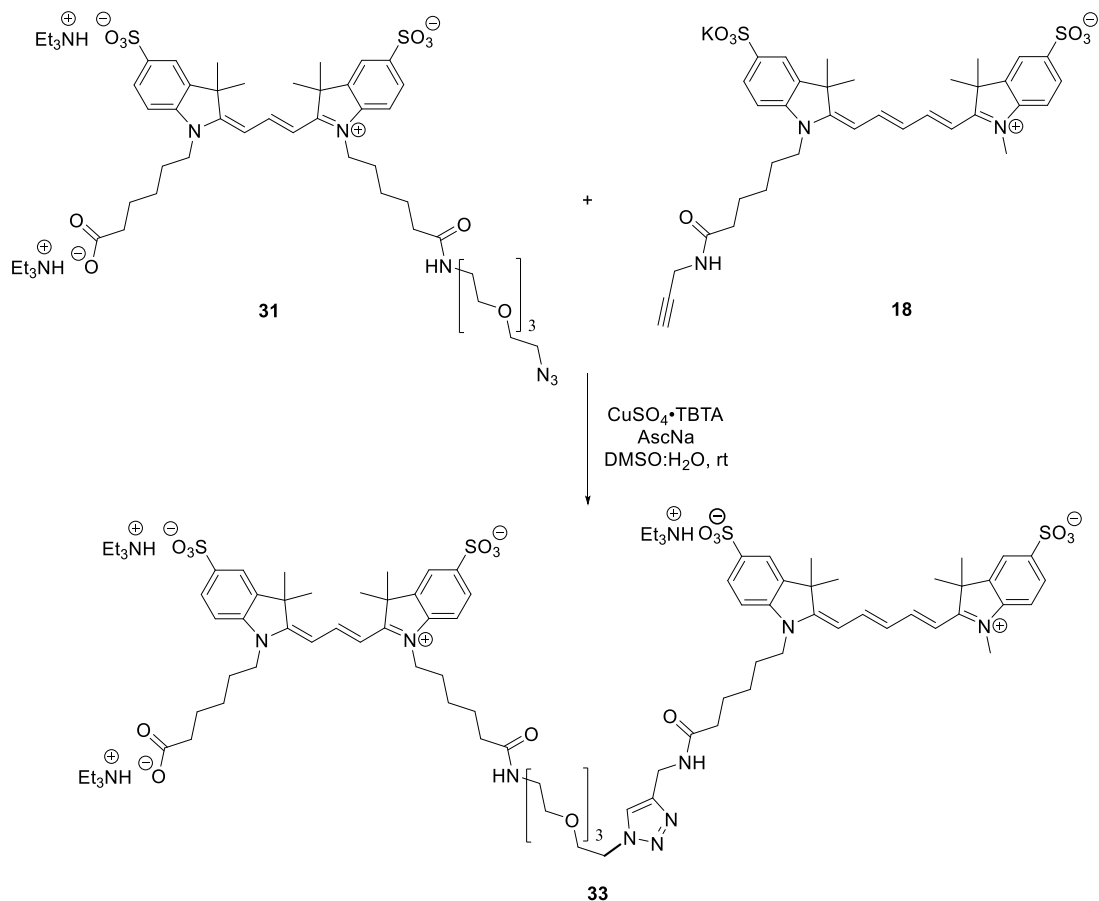


Азиды 31 и 49. К раствору соли **28** (244 мг, 0.294 ммоль) и DIPEA (76 мг, 0.102 мл, 0.136 ммоль) в смеси DMF–1,4-диоксан–H₂O (2:2:1 об/об/об; 6.6 мл) по каплям добавляли раствор TSTU (106 мг, 0.353 ммоль) в смеси DMF–1,4-диоксан–H₂O (2:2:1 об/об/об; 6.6

мл). Реакцию перемешивали при 23 °С в течение 3 ч, затем по каплям добавили раствор аминоазида **13** (96 мг, 0.440 ммоль) в смеси DMF–1,4-диоксан–H₂O (2:2:1 об/об/об; 6.6 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч, после чего её концентрировали при пониженном давлении, пока её объем не уменьшился до 8 мл. Затем смесь по каплям при перемешивании добавили к EtOAc (80 мл), в процессе прибавления образовывался аморфный красно-фиолетовый осадок. Полученную смесь профильтровали через целит, осадок промыли EtOAc, высушили, смыли с фильтра метанолом (150 мл) и сконцентрировали при пониженном давлении. Полученную смесь очистили колоночной хроматографией (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 283:17.5:2:3→184:17.5:2:2→85:17.5:2:1), затем растворили в H₂O и очистили на колонке с сефадексом G-10. Полученный раствор пропустили через колонку со смолой Dowex 50WX4 в Et₃NH⁺-форме и сконцентрировали при пониженном давлении. Моноазид **31** был получен в виде красно-фиолетового аморфного твердого вещества (170 мг, 52%). $R_f = 0.25$ (DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 85:15:1:4); ¹H ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.36 (т, $J = 13.4$ Гц, 1H), 7.80 (м, 3H), 7.68 (дт, $J = 8.2, 1.6$ Гц, 2H), 7.39 (дд, $J = 8.3, 4.5$ Гц, 2H), 6.52 (дд, $J = 13.4, 7.4$ Гц, 2H), 4.12 (кв, $J = 8.1$ Гц, 4H), 3.58 (каж. т, $J = 5.0$ Гц, 2H), 3.55–3.46 (м, 8H), 3.39–3.35 (м, 4H), 3.17 (кв, $J = 5.9$ Гц, 2H), 3.07 (кв, $J = 7.3$ Гц, 6H), 2.21 (т, $J = 7.2$ Гц, 2H), 2.07 (т, $J = 7.3$ Гц, 2H), 1.78–1.67 (м, 4H), 1.71 (с, 12H), 1.60–1.53 (м, 4H), 1.45–1.33 (м, 4H), 1.17 (т, $J = 7.3$ Гц, 9H). ¹³C ЯМР (201 МГц, DMSO-*d*₆) δ 174.3, 174.2, 172.0, 149.9, 145.89, 145.87, 141.79, 141.76, 140.06, 140.04, 126.2, 119.8, 110.7, 102.9, 69.74, 69.72, 69.6, 69.5, 69.2, 69.1, 50.0, 48.9, 45.8, 43.8, 38.4, 35.0, 33.4, 27.39, 27.37, 26.8, 26.7, 25.7, 25.6, 24.9, 24.2, 8.7. HRMS (ESI) вычислено для C₄₃H₅₈N₆O₁₂S₂²⁻ [M–Et₃NH–H]²⁻ 457.1783, найдено 457.1785. Диазид **49** был получен в виде красно-фиолетового аморфного твердого вещества (50 мг, 14%). $R_f = 0.51$ (DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 85:15:1:4); ¹H ЯМР (700 МГц, CDCl₃) δ 9.99 (уш. с, 1 H), 8.39 (т, $J = 13.3$ Гц, 1H), 7.97–7.91 (м, 4H), 7.12 (д, $J = 8.3$ Гц, 2H), 6.80 (т, $J = 5.6$ Гц, 2H), 6.48 (д, $J = 13.3$ Гц, 2H), 4.14–4.02 (м, 4H), 3.67–3.56 (м, 20H), 3.52 (т, $J = 5.6$ Гц, 4H), 3.38 (кв, $J = 5.6$ Гц, 4H), 3.35 (т, $J = 5.0$ Гц, 4H), 3.20 (кв, $J = 7.3$ Гц, 6H), 2.20 (т, $J = 7.4$ Гц, 4H), 1.86–1.77 (м, 4H), 1.72–1.66 (м, 4H), 1.70 (с, 12H), 1.52–1.44 (м, 4H), 1.37 (т, $J = 7.3$ Гц, 9H). ¹³C ЯМР (201 МГц, CDCl₃) δ 174.9, 173.2, 150.9, 144.4, 142.6, 140.3, 127.5, 120.7, 110.7, 103.8, 70.7, 70.7, 70.6, 70.3, 70.1, 69.8, 50.8, 49.5, 46.6, 44.7, 39.2, 36.1, 28.2, 27.3, 26.4, 25.3, 9.0. HRMS (ESI): вычислено для C₅₁H₇₅N₁₀O₁₄S₂⁻ [M–Et₃NH]⁻ 1115.4911, найдено 1115.4912.



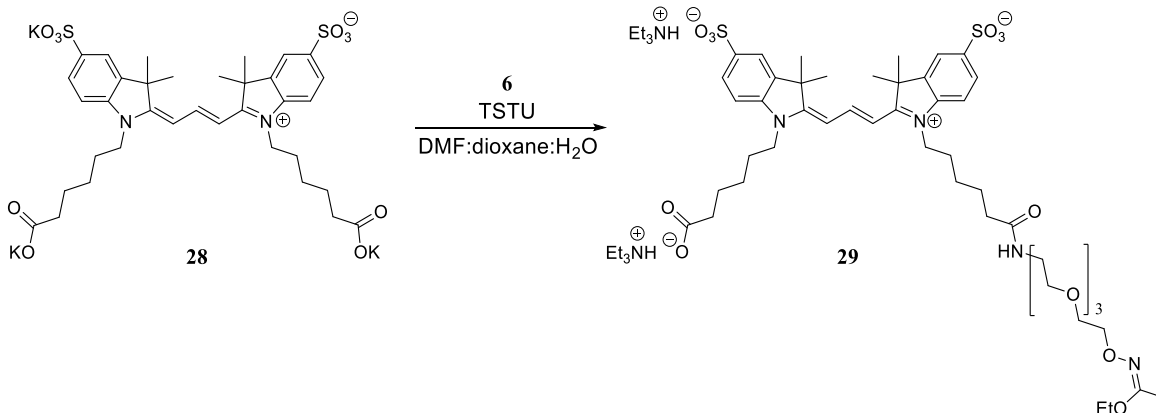
Оксиамин 32. К раствору **31** (108 мг, 0.096 ммоль) и DIPEA (33 мг, 44 мкл, 0.25 ммоль) в DMF (2.0 мл) прибавили TSTU (40 мг, 0.13 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, затем добавили раствор амина **6** (37 мг, 0.13 ммоль) в DMF (0.30 мл). Реакцию перемешивали в течение 18 ч, затем смесь по каплям при перемешивании добавляли к EtOAc (25 мл), в процессе прибавления образовывался аморфный красно-фиолетовый осадок. Полученную смесь профильтровали через целит, осадок промыли EtOAc, высушили, элюировали MeOH (50 мл) и сконцентрировали. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 283:17.5:2:3→184:17.5:2:2), затем растворили в H₂O и очистили на колонке с сефадексом G-10. Полученный раствор пропустили через колонку со смолой Dowex 50WX4 в Et₃NH⁺-форме и сконцентрировали при пониженном давлении. Целевое соединение **32** было получено в виде темно-пурпурного аморфного твердого вещества (46 мг, 37%). *R_f* 0.51 (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 85:15:1:4. ¹H ЯМР (700 МГц, CDCl₃) δ 9.96 (уш. с, 1H), 8.38 (т, *J* = 13.3 Гц, 1H), 7.98–7.88 (м, 4H), 7.11 (дд, *J* = 8.4, 3.8 Гц, 2H), 6.76 (кв, *J* = 6.1 Гц, 2H), 6.46 (д, *J* = 13.3 Гц, 2H), 4.16–4.03 (м, 4H), 4.00 (т, *J* = 4.9 Гц, 2H), 3.96 (кв, *J* = 7.1 Гц, 2H), 3.66 (т, *J* = 4.9 Гц, 2H), 3.65–3.55 (м, 18H), 3.52 (т, *J* = 5.6 Гц, 4H), 3.38 (кв, *J* = 5.6 Гц, 4H), 3.35 (т, *J* = 5.1 Гц, 2H), 3.25–3.15 (м, 6H), 2.20 (т, *J* = 7.3 Гц, 4H), 1.89 (с, 3H), 1.86–1.75 (м, 4H), 1.75–1.59 (м, 4H), 1.69 (с, 12H), 1.51–1.43 (м, 4H), 1.37 (т, *J* = 7.3 Гц, 9H), 1.22 (т, *J* = 7.1 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (201 МГц, CDCl₃) δ 174.9, 174.8, 173.2, 173.1, 162.7, 150.9, 144.43, 144.40, 142.6, 140.3, 127.5, 120.7, 110.7, 110.6, 103.74, 103.71, 72.82, 70.70, 70.66, 70.62, 70.60, 70.59, 70.3, 70.2, 70.1, 69.79, 69.77, 69.5, 62.3, 50.8, 49.5, 46.6, 44.7, 39.2, 36.02, 36.00, 28.2, 27.3, 26.4, 25.23, 25.21, 14.5, 13.8, 8.9. HRMS (ESI) вычислено для C₅₅H₈₃N₈O₁₆S₂⁻ [M–Et₃NH]⁻ 1175.5374; найдено 1175.5375.



Конъюгат 33.

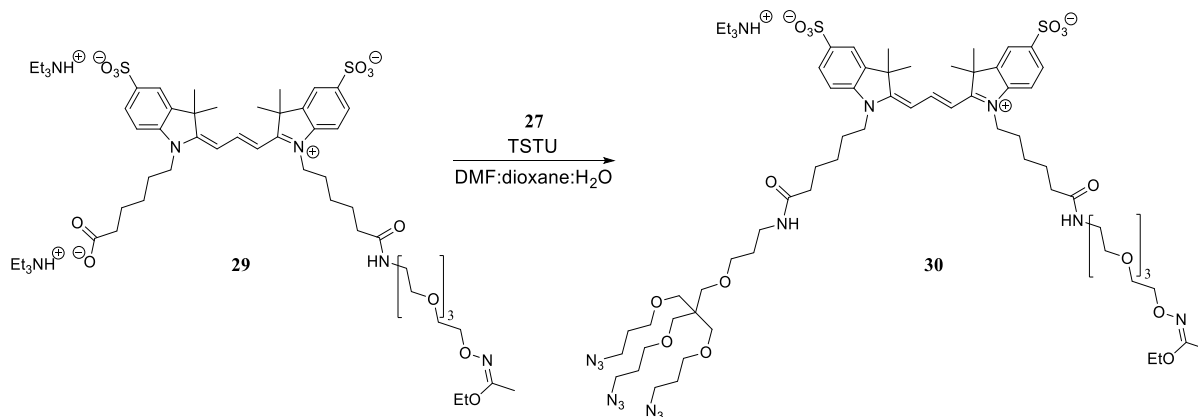
В полипропиленовой микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 мл с завинчивающейся крышкой исходные соединения **31** (3.0 мг, 2.9 мкмоль) и **18** (2.0 мг, 2.8 мкмоль) были растворены в сухом DMSO (300 мкл). Прибавили аскорбиновую кислоту (284 мМ в H₂O, 49 мкл, 13.9 мкмоль) и раствор, содержащий CuSO₄ и TBTA (DMSO–H₂O 11:10, 10 мМ CuSO₄, 11 мМ TBTA, 279 мкл, 2.8 мкмоль CuSO₄), и реакционную смесь перемешивали на орбитальном шейкере при 23 °С в течение 3 ч. Затем смесь вылили в 8.4 мл EtOAc, в результате чего получилась двухфазная смесь. Слои были разделены центрифугированием и декантацией. Водный слой промыли 8.4 мл EtOAc, в результате чего образовался темно-фиолетовый осадок. Осадок промыли 8.4 мл EtOAc при действии ультразвука, отделили центрифугированием, высушили в вакууме и очистили колоночной хроматографией (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 185:17.5:2:2→270:35:4:3→355:52.5:6:4). Конъюгат **33** был получен в виде темно-фиолетового твердого вещества (3.0 мг, 59%). *R_f* 0.33 (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N,

60:40:2:1). HRMS (ESI) вычислено для $C_{78}H_{99}N_9O_{19}S_4^{2-}$ $[M-3Et_3NH+H]^{2-}$ 796.7976; найдено 796.7979.



Имидат 29. Раствор TSTU (106 мг, 0.353 ммоль) в смеси DMF–1,4-диоксан–H₂O (2:2:1 v/v/v, 5 мл) добавляли по каплям в течение 1.5 ч к раствору соли **28** (240 мг, 0.289 ммоль) и DIPEA (76 мг, 0.103 мл, 0.588 ммоль) в смеси DMF–1,4-диоксан–H₂O (2:2:1 об/об/об, 12.5 мл). Реакционную смесь перемешивали при 23 °С в течение 100 мин, затем добавили раствор амина **6** (122 мг, 0.440 ммоль) в смеси DMF–1,4-диоксан–H₂O (2:2:1 об/об/об, 10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч, после чего ее сконцентрировали до 11 мл и по каплям при перемешивании добавили к EtOAc (110 мл). Получившийся красно-фиолетовый осадок отфильтровали на целите, промыли EtOAc, высушили и элюировали MeOH (150 мл), полученный иетанольный раствор сконцентрировали. Полученную смесь очищали колоночной хроматографией (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 283:17.5:2:3→184:17.5:2:2→85:17.5:2:1), затем растворили в H₂O и очистили на колонке с сефадексом G-10. Полученный раствор пропустили через колонку со смолой Dowex 50WX4 в Et₃NH⁺-форме и сконцентрировали при пониженном давлении. Имидат **29** был получен в виде темно-фиолетового аморфного твердого вещества (180 мг, 53%). *R_f* 0.16 (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 85:17.5:2:1). ¹H ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.36 (т, *J* = 13.4 Гц, 1H), 7.83–7.79 (м, 3H), 7.68 (дт, *J* = 8.2, 1.4 Гц, 2H), 7.40 (дд, *J* = 8.3, 4.7 Гц, 2H), 6.53 (дд, *J* = 13.4, 7.9 Гц, 2H), 4.12 (кв, *J* = 8.3 Гц, 4H), 3.93 (кв, *J* = 7.0 Гц, 2H), 3.91 (каж. т, *J* = 4.9 Гц, 2H), 3.57 (каж. т, *J* = 4.9 Гц, 2H), 3.51–3.45 (м, 8H), 3.37 (т, *J* = 6.0 Гц, 2H), 3.17 (кв, *J* = 5.9 Гц, 2H), 3.03 (кв, *J* = 7.3 Гц, 9H), 2.21 (т, *J* = 7.2 Гц, 2H), 2.07 (т, *J* = 7.4 Гц, 2H), 1.85 (с, 3H), 1.77–1.66 (м, 16H), 1.59–1.52 (м, 4H), 1.44–1.34 (м, 4H), 1.19 (т, *J* = 7.0 Гц, 3H), 1.16 (т, *J* = 7.3 Гц, 14H). ¹³C ЯМР (201 МГц, DMSO-*d*₆) δ 174.3, 174.2,

172.0, 161.7, 149.9, 145.79, 145.77, 141.84, 141.80, 140.08, 140.06, 126.2, 119.8, 110.7, 103.0, 72.3, 69.8, 69.74, 69.70, 69.5, 69.1, 68.4, 61.8, 48.9, 45.7, 43.8, 38.4, 35.0, 33.5, 27.40, 27.38, 26.8, 26.7, 25.7, 25.6, 24.9, 24.2, 14.2, 13.4, 8.8. HRMS (ESI) вычислено для $C_{47}H_{66}N_4O_{14}S_2^{2-}$ $[M-2Et_3NH]^2-$ 487.2014; найдено 487.2022.

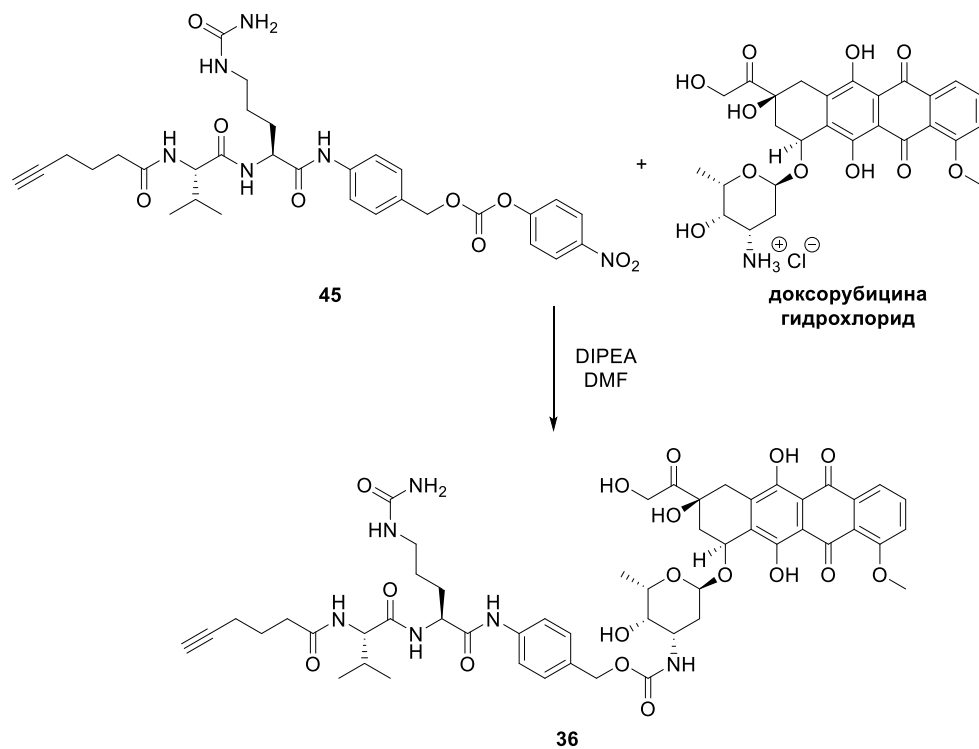


Триазид 30. К раствору **29** (27 мг, 0.023 ммоль) и DIPEA (7.2 мг, 9.7 мкл, 0.056 ммоль) в DMF (0.36 мл) добавили TSTU (8.3 мг, 0.027 ммоль), Реакционную смесь перемешивали в течение 50 мин, затем добавили раствор амина **27** (12 мг, 0.027 ммоль) в DMF (0.20 мл), Реакцию перемешивали в течение 17 ч, затем смесь по каплям при перемешивании добавляли к Et_2O (10 мл), в процессе чего образовывался аморфный красно-фиолетовый осадок, Полученную смесь пропустили через целит, осадок промыли Et_2O , высушили, элюировали MeOH (20 мл) и сконцентрировали, Полученный остаток очистили колоночной хроматографией (силикагель, DCM–MeOH– H_2O – Et_3N , 283:17.5:2:3→184:17.5:2:2), затем растворили в H_2O и очистили на колонке с сефадексом G-10. Полученный раствор пропустили через колонку со смолой Dowex 50WX4 в Et_3NH^+ -форме и сконцентрировали при пониженном давлении. Целевое соединение **30** было получено в виде красно-фиолетового аморфного твердого вещества (28 мг, 81%). R_f 0.21 (силикагель, DCM–MeOH– H_2O – Et_3N , 85:17.5:2:1). 1H ЯМР (700 МГц, $CDCl_3$) δ 10.65 (уш. с, 1H), 8.38 (т, $J = 13.2$ Гц, 1H), 7.98–7.88 (м, 4H), 7.11 (дд, $J = 8.3, 6.6$ Гц, 2H), 6.82 (дт, $J = 27.1, 5.6$ Гц, 2H), 6.47 (д, $J = 13.4$ Гц, 2H), 4.12–4.04 (м, 4H), 4.00 (каж. т, $J = 4.9$ Гц, 2H), 3.96 (кв, $J = 7.1$ Гц, 2H), 3.67 (каж. т, $J = 4.9$ Гц, 2H), 3.64–3.57 (м, 8H), 3.53 (т, $J = 5.6$ Гц, 2H), 3.45–3.41 (м, 6H), 3.41–3.37 (м, 4H), 3.35–3.31 (м, 14H), 3.26 (кв, $J = 6.6$ Гц, 2H), 3.17 (квд, $J = 7.2, 3.1$ Гц, 9H), 2.21 (т, $J = 7.4$ Гц, 4H), 1.90 (с, 3H), 1.85–1.76 (м, 10H), 1.74 (квинт, $J = 6.8$ Гц, 2H), 1.71–1.65 (м, 16H), 1.53–1.44 (м, 4H), 1.38 (т, $J = 7.3$ Гц, 14H), 1.23 (т, $J =$

7.1 Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (201 МГц, CDCl_3) δ 174.8, 173.1, 173.0, 162.8, 150.9, 144.40, 144.37, 142.6, 140.3, 127.6, 120.7, 110.7, 103.8, 72.9, 70.7, 70.63, 70.61, 70.3, 70.0, 69.9, 69.82, 69.80, 69.5, 68.0, 62.3, 49.52, 49.50, 48.6, 46.4, 45.5, 44.73, 44.66, 39.2, 37.5, 36.2, 36.0, 29.6, 29.1, 28.2, 27.3, 27.2, 26.5, 26.4, 25.4, 25.2, 14.5, 13.9, 9.0. HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{64}\text{H}_{99}\text{N}_{14}\text{O}_{17}\text{S}_2^-$ $[\text{M}-\text{Et}_3\text{NH}]^-$ 1399.6760; найдено 1399.6739.

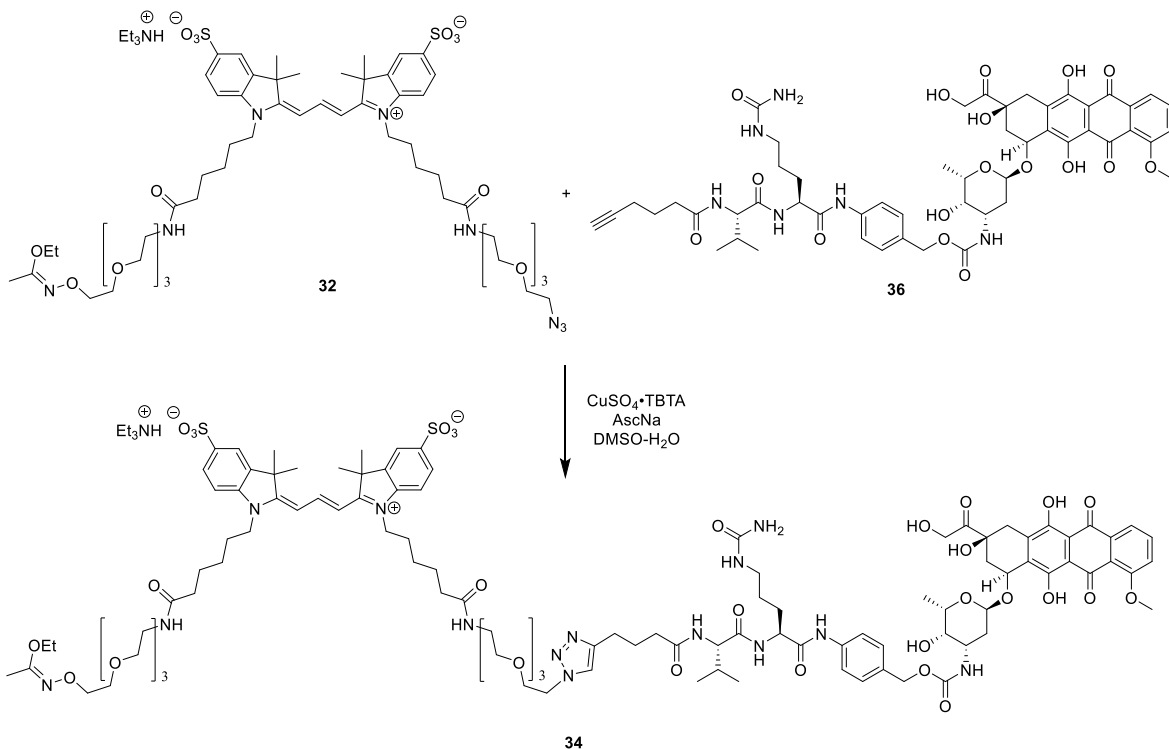
Общая методика II: снятие этоксиэтилиденной защитной группы с оксиаминов

В 2 мл полипропиленовой микроцентрифужной пробирке к раствору 5 мг защищенного оксиамина в MeOH (1.0 мл) добавляли раствор HCl в MeOH–H₂O (0.10 мл, 1.2 М, 12:1 v/v). Смесь перемешивали и выдерживали в течение 5 мин при 23 °С. После того, как реакция завершалась согласно ТСХ, реакционную смесь переносили в колбу и концентрировали при пониженном давлении. Остаток соупаривали с MeOH (2×2 мл) и DCM (2 мл), затем сушили в вакууме масляного насоса. Полученные соли оксиаминов использовали без дополнительной очистки. Таким образом были синтезированы соединения **13**, **16** и **20**.



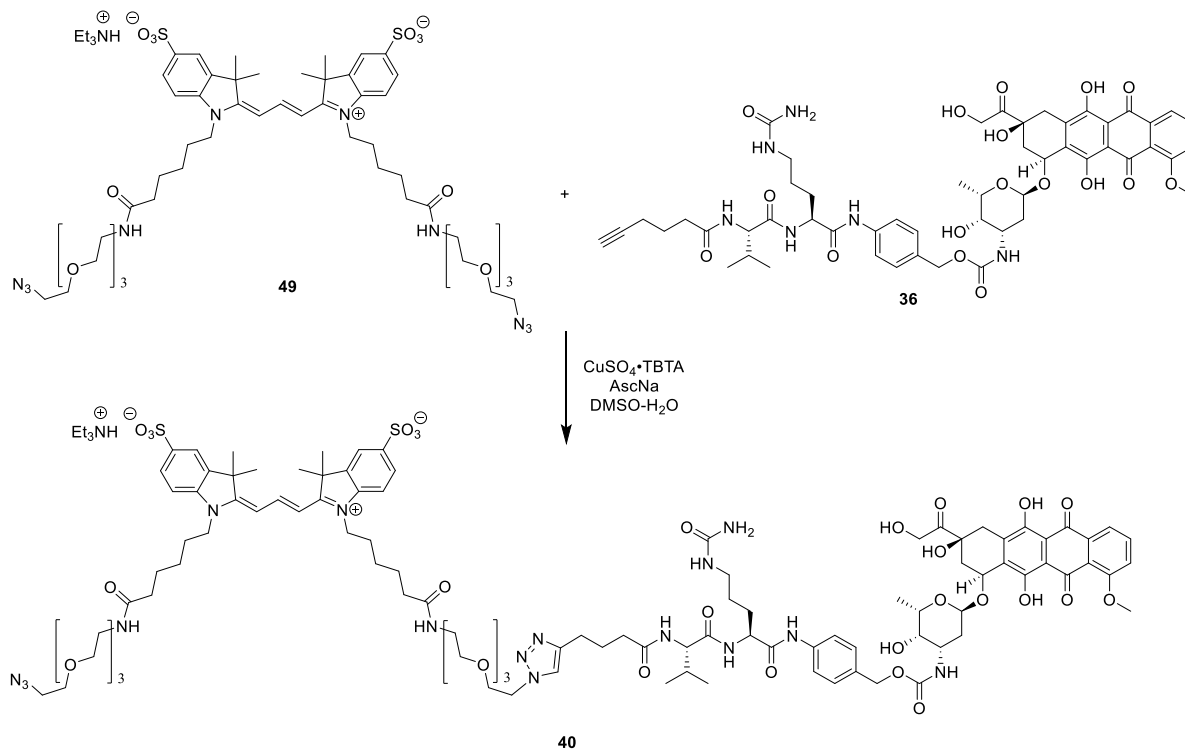
Конъюгат 36. В полипропиленовой микроцентрифужной пробирке объёмом 1.5 мл к раствору карбоната **45** (13.7 мг, 0.0215 ммоль) в сухом DMF (215 мкл) добавили гидрохлорид доксорубина (16.0 мг, 0.0276 ммоль, 1.3 ммоль). Затем добавили DIPEA (4.5 мг, 6.0 мкл, 0.0345 ммоль), пробирку продули аргоном, и раствор энергично

перемешивали до растворения большей части гидрохлорида доксорубина. Реакционную смесь перемешивали на орбитальном шейкере при 23 °С в течение 15 ч, затем разбавили EtOAc (2,8 мл), и образовавшийся красный осадок отделили центрифугированием. Осадок промывали EtOAc с помощью соникации и центрифугирования (2×2.8 мл). Этилацетатные супернатанты охлаждали при –18 °С в течение 30 мин, после чего образовавшийся дополнительный осадок отделяли центрифугированием. Объединенный осадок был очищен с помощью колоночной хроматографии (силикагель, DCM:MeOH, 20:1→10:1→5:1), конъюгат **36** был получен в виде темно-красного твердого вещества (10.4 мг, 46%). R_f 0.40 (силикагель, DCM–MeOH, 5:1). ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6) δ 14.05 (с, 1H), 13.29 (с, 1H), 9.92 (с, 1H), 8.04 (д, $J = 7.6$ Гц, 1H), 7.96–7.90 (м, 2H), 7.84 (д, $J = 8.6$ Гц, 1H), 7.67 (дд, $J = 7.4, 2.3$ Гц, 1H), 7.55 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H), 7.24 (д, $J = 8.1$ Гц, 2H), 6.79 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H), 5.94 (т, $J = 6.2$ Гц, 1H), 5.45 (с, 1H), 5.37 (с, 2H), 5.22 (д, $J = 3.7$ Гц, 1H), 4.97 (каж. т, $J = 4.6$ Гц, 1H), 4.89 (с, 2H), 4.81 (т, $J = 5.9$ Гц, 1H), 4.67 (д, $J = 5.7$ Гц, 1H), 4.57 (д, $J = 6.1$ Гц, 2H), 4.38–4.34 (м, 1H), 4.18 (дд, $J = 8.6, 6.8$ Гц, 1H), 4.16–4.13 (м, 1H), 4.00 (с, 3H), 3.75–3.69 (м, 1H), 3.44 (м, 1H), 3.04–2.96 (м, 3H), 2.96–2.89 (м, 1H), 2.76 (т, $J = 2.7$ Гц, 1H), 2.26 (дкв, $J = 17.0, 7.2$ Гц, 2H), 2.20 (дм, $J = 14.3$ Гц, 1H), 2.17–2.11 (м, 3H), 1.97 (каж. секстет, $J = 6.8$ Гц, 1H), 1.84 (тд, $J = 13.0, 4.0$ Гц, 1H), 1.71–1.62 (м, 3H), 1.61–1.53 (м, 1H), 1.48 (дд, $J = 12.3, 4.5$ Гц, 1H), 1.46–1.38 (м, 1H), 1.38–1.31 (м, 1H), 1.12 (д, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.85 (д, $J = 6.8$ Гц, 3H), 0.82 (д, $J = 6.8$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (176 МГц, DMSO- d_6) δ 213.8, 186.2, 186.1, 171.8, 171.2, 170.5, 160.7, 158.9, 156.0, 155.3, 154.5, 138.5, 136.0, 135.3, 134.4, 133.9, 131.8, 128.4, 119.8, 119.5, 118.9, 118.8, 110.6, 110.4, 100.3, 84.1, 74.9, 71.3, 69.7, 68.0, 66.7, 64.9, 63.7, 57.8, 56.5, 53.1, 47.1, 38.5, 36.4, 34.0, 32.0, 30.3, 29.8, 29.2, 26.7, 24.4, 19.2, 18.1, 17.4, 17.0. HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{52}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_{17}^+$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 1043.4244, найдено 1043.4246.



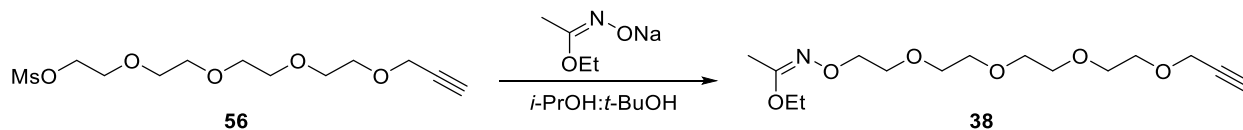
Конъюгат 34. В 1.5 мл полипропиленовой микроцентрифужной пробирке цианин **14** (7.4 мг, 5.8 мкмоль) и конъюгат **36** (6.1 мг, 5.8 мкмоль) были растворены в сухом DMSO (578 мкл). Добавили аскорбат натрия (284 мМ в H_2O , 102 мкл, 28.9 мкмоль), и раствор дегазировали, барботируя через него аргон в течение 1 мин. Затем добавили раствор, содержащий CuSO_4 и TBTA ($\text{DMSO-H}_2\text{O}$ 11:10, 10 мМ CuSO_4 , 11 мМ TBTA, 580 мкл, 5.8 мкмоль CuSO_4), пробирку продули аргоном, реакционную смесь перемешивали на орбитальном шейкере при 23 °С в течение 23 ч. После этого смесь выливали в 11.5 мл EtOAc , в результате чего получалась двухфазная смесь. Слои были разделены путем декантации и центрифугирования. Водный слой промыли еще 11.5 мл EtOAc , в результате чего образовался темно-фиолетовый осадок. Осадок промывали 11.5 мл EtOAc , отделяли центрифугированием, сушили в вакууме и очищали колоночной хроматографией (силикагель, $\text{DCM-MeOH-H}_2\text{O-Et}_3\text{N}$, 283:17.5:2:3→184:17.5:2:2→85:17.5:2:1), затем растворили в H_2O и очистили на колонке с сефадексом G-10. Полученный раствор пропустили через колонку со смолой Dowex 50WX4 в Et_3NH^+ -форме и сконцентрировали при пониженном давлении. Конъюгат **34** (7.0 мг, 52%) был получен в виде красно-фиолетового твердого вещества. $R_f = 0.44$ (силикагель, $\text{DCM:MeOH:H}_2\text{O:Et}_3\text{N}$, 85:15:1:4); ^1H ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ 14.03 (с, 1H), 13.27 (уш. с, 1H), 9.92 (с, 1H), 8.35 (т, $J = 13.4$ Гц, 1H), 8.06 (д, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.93–7.86 (м, 2H), 7.83 (д, $J = 8.5$ Гц, 1H), 7.82–7.77 (м, 5H),

7.68 (дт, $J = 8.1, 1.9$ Гц, 2H), 7.66–7.63 (м, 1H), 7.55 (д, $J = 8.0$ Гц, 2H), 7.39 (д, $J = 8.4$ Гц, 2H), 7.23 (д, $J = 8.1$ Гц, 2H), 6.79 (д, $J = 8.1$ Гц, 1H), 6.51 (д, $J = 13.2$ Гц, 2H), 6.01–5.95 (м, 1H), 5.45 (с, 1H), 5.39 (с, 2H), 5.22 (д, $J = 3.3$ Гц, 1H), 4.95 (каж. т, $J = 4.4$ Гц, 1H), 4.88 (с, 2H), 4.82 (уш. с, 1H), 4.68 (д, $J = 5.9$ Гц, 1H), 4.57 (с, 2H), 4.44 (т, $J = 5.3$ Гц, 2H), 4.36 (кв, $J = 7.7$ Гц, 1H), 4.20 (каж. т, $J = 7.7$ Гц, 1H), 4.15 (кв, $J = 6.6$ Гц, 1H), 4.13–4.06 (м, 4H), 3.98 (с, 3H), 3.93 (кв, $J = 7.0$ Гц, 2H), 3.91 (каж. т, $J = 4.9$ Гц, 2H), 3.77 (т, $J = 5.4$ Гц, 2H), 3.74–3.69 (м, 1H), 3.57 (каж. т, $J = 4.9$ Гц, 2H), 3.51–3.46 (м, 9H), 3.46–3.43 (м, 8H), 3.38–3.34 (м, 6H), 3.18–3.13 (м, 4H), 3.08–3.01 (м, 10 H), 3.01–2.96 (м, 3H), 2.95–2.89 (м, 1H), 2.58 (дд, $J = 8.8, 6.4$ Гц, 2H), 2.28–2.17 (м, 3H), 2.12 (дд, $J = 14.1, 5.9$ Гц, 1H), 2.09–2.03 (м, 4H), 1.97 (каж. секстет, $J = 6.7$ Гц, 1H), 1.85 (с, 3H), 1.83–1.77 (м, 3H), 1.75–1.65 (м, 17H), 1.62–1.51 (м, 5H), 1.48 (дм, $J = 11.4$ Гц, 1H), 1.46–1.40 (м, 1H), 1.40–1.32 (м, 5H), 1.19 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H), 1.16 (т, $J = 7.2$ Гц, 15H), 1.12 (д, $J = 6.5$ Гц, 3H), 0.85 (д, $J = 6.7$ Гц, 3H), 0.82 (д, $J = 6.8$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (201 МГц, DMSO- d_6) δ 213.7, 186.6, 186.5, 174.2, 172.1, 172.0, 171.2, 170.5, 161.6, 160.8, 158.8, 156.1, 155.3, 154.5, 149.9, 146.3, 145.83, 145.78, 141.8, 140.1, 138.5, 136.2, 135.6, 134.7, 134.1, 131.7, 128.5, 126.2, 122.1, 120.1, 119.83, 119.76, 119.0, 118.9, 110.8, 110.7, 102.9, 100.2, 75.0, 72.3, 69.8, 69.74, 69.69, 69.64, 69.56, 69.53, 69.50, 69.1, 68.7, 68.4, 68.0, 66.7, 64.9, 63.6, 61.8, 57.6, 56.6, 53.1, 49.1, 48.9, 47.1, 45.7, 43.8, 38.5, 38.4, 36.7, 35.0, 34.6, 32.1, 30.3, 29.8, 29.2, 27.4, 26.7, 25.73, 25.71, 25.4, 24.9, 24.6, 19.2, 18.1, 17.0, 14.2, 13.4, 8.8. HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{107}\text{H}_{144}\text{N}_{14}\text{O}_{33}\text{S}_2^{2-}$ $[\text{M}-\text{Et}_3\text{NH}-\text{H}]^{2-}$ 1108.4736, найдено 1108.4763.



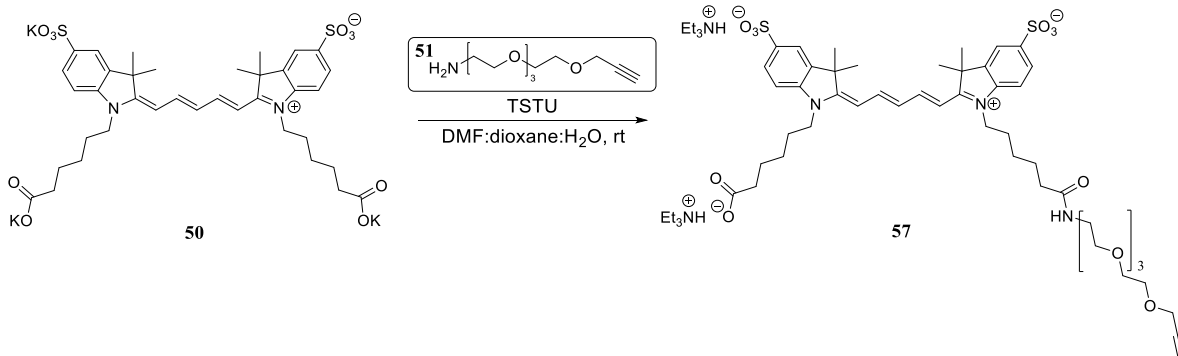
Конъюгат 40. В полипропиленовой микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 мл цианин **49** (6.6 мг, 5.4 мкмоль) растворяли в сухом DMSO (200 мкл) и добавляли аскорбат натрия (284 мМ в H_2O , 38 мкл, 11 мкмоль). В отдельной пробирке конъюгат **36** (2.3 мг, 2.2 мкмоль) растворяли в сухом DMSO (100 мкл), и 20 мкл этого раствора добавляли к реакционной смеси. Затем добавили раствор, содержащий CuSO_4 и TBTA ($\text{DMSO-H}_2\text{O}$ 11:10, 10 мМ CuSO_4 , 11 мМ TBTA, 217 мкл, 2.2 мкмоль CuSO_4), реакционную смесь перемешивали на орбитальном шейкере при 23 °С в течение 1 ч. ТСХ-анализ показал полную конверсию **16**, и в реакцию добавили еще 20 мкл его раствора в DMSO. Через 20 мин порциями добавили остальную часть раствора (6×10 мкл) в течение 20 мин. Через 30 мин смесь вылили в 6.4 мл EtOAc , в результате чего получилась двухфазная смесь. Слои были разделены путем декантации и центрифугирования. Водный слой промыли еще 6.4 мл EtOAc , в результате чего образовался красно-фиолетовый осадок. Осадок промыли 6,4 мл EtOAc , отделили центрифугированием, высушили в вакууме и очистили колоночной хроматографией (силикагель, $\text{DCM-MeOH-H}_2\text{O-Et}_3\text{N}$, 283–17.5–2–3→184–17.5–2–2), затем растворили в H_2O и очистили на колонке с сефадексом G-10. Полученный раствор пропустили через колонку со смолой Dowex 50WX4 в Et_3NH^+ -форме и сконцентрировали при пониженном давлении. Конъюгат **40** (2.2 мг, 44%) был получен в виде красно-фиолетового твердого вещества. R_f 0.40 (силикагель, $\text{DCM-MeOH-H}_2\text{O-Et}_3\text{N}$, 85:15:1:4);

^1H ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ 14.02 (с, 1H), 13.27 (с, 1H), 9.92 (с, 1H), 9.23 (уш. с, 1H), 8.35 (т, $J = 13.4$ Гц, 1H), 8.06 (д, $J = 7.6$ Гц, 1H), 7.94–7.88 (м, 2H), 7.83 (д, $J = 8.5$ Гц, 1H), 7.82–7.76 (м, 5H), 7.68 (дт, $J = 8.2, 1.9$ Гц, 2H), 7.67–7.63 (м, 1H), 7.55 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H), 7.39 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H), 7.23 (д, $J = 8.2$ Гц, 2H), 6.79 (д, $J = 8.0$ Гц, 1H), 6.51 (д, $J = 13.3$ Гц, 2H), 5.98 (т, $J = 5.6$ Гц, 1H), 5.44 (с, 1H), 5.39 (с, 2H), 5.22 (д, $J = 3.6$ Гц, 1H), 4.95 (каж. т, $J = 4.6$ Гц, 1H), 4.89 (АВКВ, $\Delta\delta_{\text{AB}} = 0.00, J_{\text{AB}} = 13.0$ Гц, 2H), 4.82 (т, $J = 5.9$ Гц, 1H), 4.68 (д, $J = 5.6$ Гц, 1H), 4.57 (д, $J = 5.8$ Гц, 2H), 4.44 (т, $J = 5.3$ Гц, 2H), 4.37 (каж. кв, $J = 7.7$ Гц, 1H), 4.20 (дд, $J = 8.5, 6.7$ Гц, 1H), 4.15 (кв, $J = 6.7$ Гц, 1H), 4.11 (уш. т, $J = 6.9$ Гц, 4H), 3.98 (с, 3H), 3.77 (т, $J = 5.3$ Гц, 2H), 3.75–3.69 (м, 1H), 3.58 (каж. т, $J = 5.0$ Гц, 2H), 3.55–3.47 (м, 10H), 3.47–3.42 (м, 7H), 3.39–3.34 (м, 6H), 3.16 (каж. квинт, $J = 5.9$ Гц, 4H), 3.08 (кв, $J = 7.3$ Гц, 9H), 3.03–2.95 (м, 3H), 2.95–2.89 (м, 1H), 2.58 (дд, $J = 8.8, 6.5$ Гц, 2H), 2.28–2.17 (м, 3H), 2.12 (дд, $J = 14.2, 5.6$ Гц, 1H), 2.07 (т, $J = 7.3$ Гц, 2H), 2.06 (т, $J = 7.4$ Гц, 2H), 1.97 (каж. секстет, $J = 6.7$ Гц, 1H), 1.87–1.77 (м, 3H), 1.76–1.64 (м, 17H), 1.62–1.52 (м, 5H), 1.48 (дд, $J = 11.8, 3.7$ Гц, 1H), 1.46–1.40 (м, 1H), 1.36 (с, 7H), 1.18 (т, $J = 7.3$ Гц, 14H), 1.12 (д, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.85 (д, $J = 6.8$ Гц, 3H), 0.83 (д, $J = 6.8$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (201 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ 213.7, 186.6, 186.5, 174.2, 172.1, 171.95, 171.94, 171.2, 170.5, 160.8, 158.8, 156.1, 155.3, 154.5, 149.9, 146.3, 145.84, 145.79, 141.80, 141.78, 140.1, 138.5, 136.2, 135.6, 134.7, 134.1, 131.7, 128.5, 126.2, 122.1, 120.1, 119.84, 119.75, 119.0, 118.9, 110.8, 110.7, 102.9, 100.2, 75.0, 69.8, 69.74, 69.72, 69.64, 69.57, 69.51, 69.50, 69.2, 69.113, 69.105, 68.7, 68.0, 66.7, 64.9, 63.6, 57.64, 56.58, 53.1, 50.0, 49.1, 48.9, 47.1, 45.7, 43.8, 38.5, 38.4, 36.7, 35.0, 34.6, 32.1, 30.3, 29.8, 29.2, 27.4, 26.7, 25.7, 25.4, 24.9, 24.6, 19.2, 18.1, 17.0, 8.6. HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{103}\text{H}_{136}\text{N}_{16}\text{O}_{31}\text{S}_2^{2-}$ $[\text{M}-\text{Et}_3\text{NH}-\text{H}]^{2-}$ 1078.4505, найдено 1078.4528.



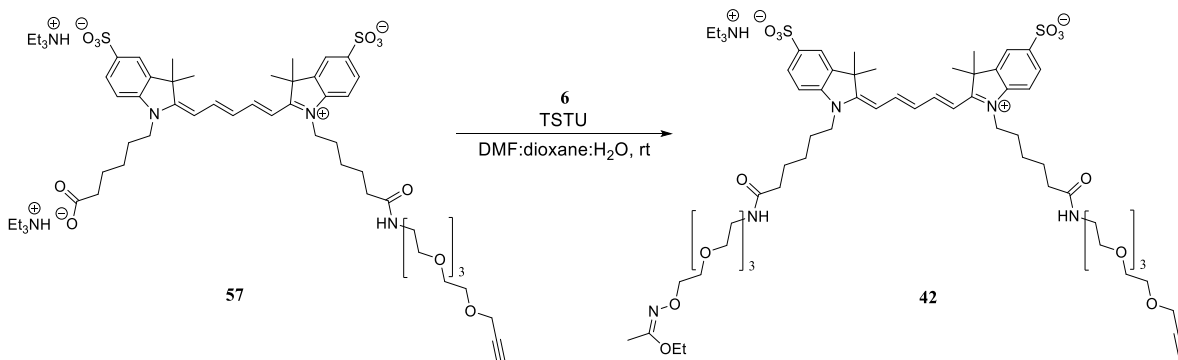
Имидат 38. Мезилат **56**²⁹² (1.60 г, 5.16 ммоль) растворили в смеси *i*-PrOH и *t*-BuOH (1:1 об/об, 240 мл), порциями добавили натриевую соль этил N-гидроксиацетимидата (3.23 г, 25.8 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч, затем охладили до 23 °С. Образовавшийся осадок отфильтровали, растворитель упарили при пониженном давлении. Остаток очистили колоночной хроматографией (силикагель, DCM:MeOH, 50:1). Имидат **38** был получен в виде бесцветного масла (600 мг, 37%). R_f 0.40 (DCM–MeOH, 20:1); ^1H ЯМР (700 МГц, CDCl_3) δ 4.19 (д, $J = 2.4$ Гц, 2H), 4.03 (каж. т, $J = 4.9$ Гц, 1H), 3.99

(кв, $J = 7.0$ Гц, 2H), 3.71–3.63 (м, 14H), 2.41 (т, $J = 2.4$ Гц, 1H), 1.93 (с, 1H), 1.25 (т, $J = 7.1$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (176 МГц, CDCl_3) δ 162.8, 79.8, 74.6, 72.9, 70.79, 70.78, 70.74, 70.72, 70.6, 69.6, 69.3, 62.3, 58.5, 14.5, 13.9. HRMS (ESI): вычислено для $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{NO}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318.1911, найдено 318.1912.



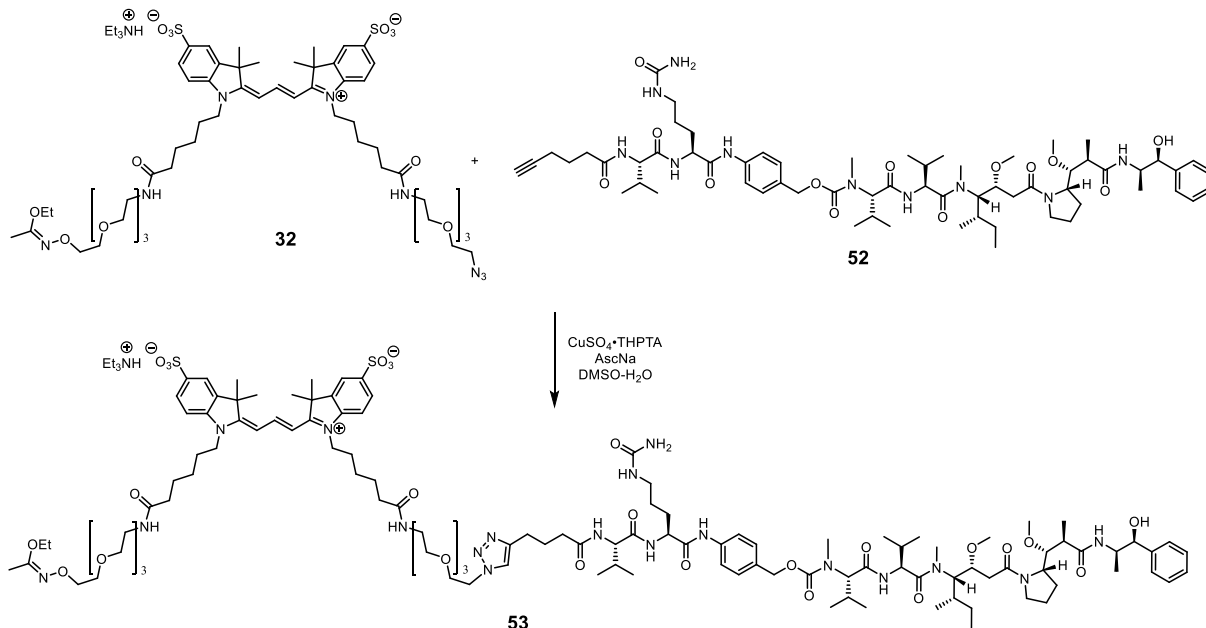
Алкин 57. Раствор TSTU (104 мг, 0.346 ммоль) в смеси DMF:1,4-диоксан:H₂O (2:2:1 об/об/об; 6.4 мл) добавляли по каплям к раствору соли **50** (246 мг, 0.287 ммоль) и DIPEA (74 мг, 100 мкл, 0.575 ммоль) в DMF–1,4-диоксан–H₂O (2:2:1 об/об/об; 6.4 мл). Реакцию перемешивали при 23 °С в течение 1 ч, затем по каплям добавили раствор аминоалкина **51**²⁹² (100 мг, 0.433 ммоль) в DMF–1,4-диоксан–H₂O (2:2:1 об/об/об; 6.4 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2.5 ч, после чего ее концентрировали при пониженном давлении, пока объем не уменьшился до 8 мл. Затем смесь по каплям при перемешивании добавили к EtOAc (80 мл), в результате чего образовался аморфный синий осадок. Полученную смесь профильтровали через целит, осадок промыли EtOAc, высушили, элюировали MeOH (150 мл) и сконцентрировали. Полученный остаток очистили колоночной хроматографией (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 283:17.5:2:3→184:17.5:2:2→85:17.5:2:1), затем растворили в H₂O и очистили на колонке с сефадексом G-10. Полученный раствор пропустили через колонку со смолой Dowex 50WX4 в Et₃NH⁺-форме и сконцентрировали при пониженном давлении. Алкин **57** был получен в виде тёмно-синего аморфного твердого вещества (142 мг, 43%). R_f 0.26 (DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 85:15:1:4); ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.35 (т, $J = 13.0$ Гц, 2H), 7.83–7.79 (м, 3H), 7.64 (дд, $J = 8.1, 1.6$ Гц, 2H), 7.32 (дд, $J = 8.3, 5.1$ Гц, 2H), 6.60 (т, $J = 12.3$ Гц, 1H), 6.30 (дд, $J = 13.8, 4.4$ Гц, 2H), 4.11–4.04 (м, 4H), 3.55–3.46 (м, 16H), 3.39 (т, $J = 2.4$ Гц, 1H), 3.37 (т, $J = 6.0$ Гц, 2H), 3.17 (кв, $J = 5.9$ Гц, 2H), 3.05 (кв, $J = 7.2$ Гц, 12H), 2.13 (т, $J = 7.3$ Гц, 2H), 2.06 (т, $J = 7.3$ Гц, 2H), 1.73–1.65 (м, 16H), 1.53 (квинт, $J = 7.4$ Гц, 4H), 1.40–1.30 (м, 4H), 1.17 (т, $J = 7.2$ Гц, 18H). ^{13}C ЯМР (201 МГц, DMSO-*d*₆) δ 174.3, 172.98, 172.96, 171.9, 154.2, 145.28,

145.25, 141.95, 141.93, 140.48, 140.46, 135.2, 126.0, 125.9, 119.9, 116.2, 110.1, 103.5, 103.4, 80.3, 77.0, 71.0, 69.72, 69.69, 69.53, 69.46, 69.1, 69.0, 68.5, 57.5, 48.9, 45.7, 43.42, 43.38, 38.4, 35.0, 33.5, 27.1, 26.6, 25.7, 25.6, 24.8, 24.2, 8.8. HRMS (ESI): вычислено для $C_{48}H_{63}N_3O_{13}S_2^{-2}$ $[M-2Et_3NH]^2-$ 476.6907, найдено 476.6909.



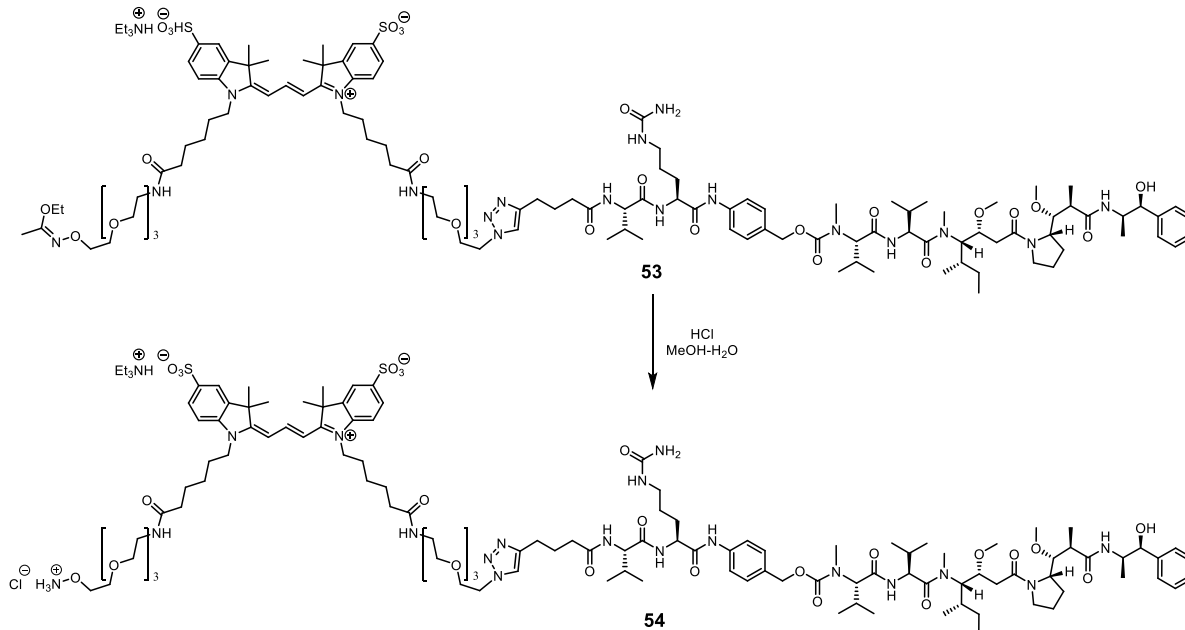
Имидат 42. К раствору вещества **57** (81 мг, 0.070 ммоль) и DIPEA (23 мг, 31 мкл, 0.18 ммоль) в DMF (1.4 мл) добавили TSTU (28 мг, 0.094 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, затем добавили раствор амина **6** (29 мг, 0.10 ммоль) в DMF (0.30 мл). Реакцию перемешивали в течение 2 ч, затем смесь по каплям при перемешивании добавили к EtOAc (20 мл), в результате чего образовался аморфный синий осадок. Полученную смесь профильтровали через целит, осадок промыли EtOAc, высушили, элюировали MeOH (50 мл) и сконцентрировали. Полученный остаток очистили колоночной хроматографией (DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 283:17.5:2:3→184:17.5:2:2), затем растворили в H₂O и очистили на колонке с сефадексом G-10. Полученный раствор пропустили через колонку со смолой Dowex 50WX4 в Et₃NH⁺-форме и сконцентрировали при пониженном давлении. Соединение **42** было получено в виде тёмно-синего аморфного твердого вещества (49 мг, 53%). *R_f* 0.25 (DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 85:17.5:2:1); ¹H ЯМР (700 МГц, CDCl₃) δ 10.15 (с, 1H), 7.97–7.87 (м, 6H), 7.08 (дд, *J* = 8.4, 4.0 Гц, 2H), 6.72–6.66 (м, 1H), 6.66–6.57 (м, 2H), 6.60 (т, *J* = 11.4 Гц, 1H), 6.11 (д, *J* = 13.4 Гц, 2H), 4.17 (д, *J* = 2.4 Гц, 1H), 4.01 (каж. т, *J* = 8.1 Гц, 2H), 4.00–3.95 (м, 4H), 3.97 (кв, *J* = 7.0 Гц, 2H), 3.69–3.66 (м, 4H), 3.66–3.56 (м, 18H), 3.53 (т, *J* = 5.5 Гц, 4H), 3.40 (кв, *J* = 5.5 Гц, 4H), 3.20 (кв, *J* = 7.4 Гц, 6H), 2.45 (т, *J* = 2.4 Гц, 1H), 2.21 (каж. т, *J* = 7.2 Гц, 4H), 1.90 (с, 3H), 1.82–1.73 (м, 4H), 1.80–1.72 (м, 4H), 1.75 (с, 12H), 1.45 (т, *J* = 7.3 Гц, 9H), 1.24 (т, *J* = 7.1 Гц, 2H). ¹³C ЯМР (176 МГц, CDCl₃) δ 173.5, 173.0, 172.9, 162.7, 153.6, 144.2, 142.6, 140.7, 127.3, 120.7, 117.2, 110.2, 103.8, 79.7, 74.8, 72.8, 70.61, 70.58, 70.5, 70.4, 70.2, 69.8, 69.4, 69.2, 62.2, 58.4, 49.5, 46.6,

44.5, 39.2, 36.0, 28.1, 27.1, 26.6, 25.1, 14.5, 13.8, 8.9. HRMS (ESI): вычислено для $C_{60}H_{88}N_5O_{17}S_2^- [M-Et_3NH]^+$ 1214.5622, найдено 1214.5635.



Конъюгат 53. В 1.5 мл полипропиленовой микроцентрифужной пробирке с завинчивающейся крышкой цианин **32** (2.9 мг, 2.3 мкмоль) и соединение **52** (2.3 мг, 1.9 мкмоль) были растворены в сухом DMSO (300 мкл). Добавили водный раствор комплекса $CuSO_4-THPTA$ 1:1 (0.099 мМ, 9.5 мкл, 0.95 мкмоль), затем аскорбат натрия (404 мМ в H_2O , 24 мкл, 9.5 мкмоль). Реакционную перемешивали на орбитальном шейкере, через 30 мин ТСХ показала низкую конверсию, и в реакционную смесь был дополнительно добавлен аскорбат натрия (404 мМ в H_2O , 24 мкл, 9.5 мкмоль). Через 10 минут, ТСХ показала значительную конверсию; добавили еще аскорбата натрия (404 мМ в H_2O , 24 мкл, 9.5 мкмоль), и реакцию перемешивали на орбитальном шейкере при 23 °С в течение 20 ч. После этого продукт был осажден путем обработки 100 мкл алиquot реакционной смеси 1.80 мл $EtOAc$ и центрифугирования. Полученный остаток повторно растворили в 50 мкл DMSO и осадили 1.80 мл $EtOAc$. Осадок промыли 1.80 мл $EtOAc$, высушили на воздухе и растворили в 1 мл смеси $DCM-MeOH$ 4:1 (об/об), образовался мутный красно-фиолетового раствора. Бледно-розовый осадок (аскорбат натрия, окрашенный продуктом) был отделен центрифугированием, и раствор был нанесен на силикагелевую колонку. Смесь очистили колоночной хроматографией (силикагель, $DCM-MeOH-H_2O-Et_3N$, 283:17.5:2:3 \rightarrow 184:17.5:2:2), полученный продукт растворили в H_2O и очистили на колонке Sephadex G10.

Полученный раствор пропустили через колонку Dowex 50WX4 в Et_3NH^+ -форме и концентрировали. Соединение **53** (1.9 мг, 40%) было получено в виде красно-фиолетового твердого вещества. R_f 0.48 (силикагель, $\text{DCM-MeOH-H}_2\text{O-Et}_3\text{N}$, 85:15:1:4). ^1H ЯМР (700 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.98–9.91 (м, 1H), 8.36 (т, $J = 13.4$ Гц, 1H), 8.28–8.21 (м, 0.4H), 8.08 (д, $J = 7.5$ Гц, 1H), 8.02–7.95 (м, 0.4H), 7.88–7.76 (м, 6H), 7.68 (ддд, $J = 8.1, 2.7, 1.6$ Гц, 2H), 7.61–7.55 (м, 2.5H), 7.39 (д, $J = 8.3$ Гц, 2H), 7.35–7.23 (м, 6H), 7.19–7.13 (м, 1H), 6.51 (д, $J = 13.4$ Гц, 2H), 6.01–5.94 (м, 1H), 5.42–5.36 (м, 2.5H), 5.32 (д, $J = 4.9$ Гц, 0.5H), 5.13–4.93 (м, 2H), 4.73 (уш. с, 0.5H), 4.63 (уш. с, 0.4H), 4.49 (т, $J = 5.4$ Гц, 1H), 4.44 (т, $J = 5.3$ Гц, 2H), 4.46–4.36 (м, 2H), 4.36–4.30 (м, 1.6H), 4.26 (дд, $J = 19.9, 10.8$ Гц, 1H), 4.21 (дд, $J = 8.6, 6.7$ Гц, 1H), 4.11 (уш. т, $J = 7.5$ Гц, 4H), 4.09–4.05 (м, 1H), 4.04–3.95 (м, 2H), 3.93 (кв, $J = 7.0$ Гц, 2H), 3.92–3.90 (м, 2H), 3.77 (т, $J = 5.4$ Гц, 2H), 3.80–3.76 (м, 0.5H), 3.63–3.53 (м, 3H), 3.52–3.41 (м, 20H), 3.38–3.34 (м, 3H), 3.24 (с, 2H), 3.23 (с, 2H), 3.20 (с, 2H), 3.19–3.14 (м, 8H), 3.11 (с, 2H), 3.06 (уш. кв, $J = 7.3$ Гц, 9H), 3.03–2.90 (м, 2H), 2.89–2.82 (м, 3H), 2.60–2.57 (м, 2H), 2.31–2.17 (м, 3H), 2.15–2.03 (м, 2H), 2.07 (т, $J = 7.3$ Гц, 2H), 2.06 (т, $J = 7.3$ Гц, 2H), 2.02–1.92 (м, 2H), 1.85 (с, 3H), 1.83–1.77 (м, 4H), 1.77–1.65 (м, 19H), 1.63–1.40 (м, 8H), 1.40–1.27 (м, 6H), 1.19 (т, $J = 7.1$ Гц, 3H), 1.17 (т, $J = 7.3$ Гц, 13H), 1.06 (т, $J = 7.0$ Гц, 4H), 1.05–0.97 (м, 6H), 0.90–0.71 (м, 25H). HRMS (ESI) вычислено для $\text{C}_{119}\text{H}_{186}\text{N}_{18}\text{O}_{29}\text{S}_2^{2+}$ $[\text{M-Et}_3\text{N}+2\text{H}]^{2+}$ 1197.6532, найдено 1197.6523.

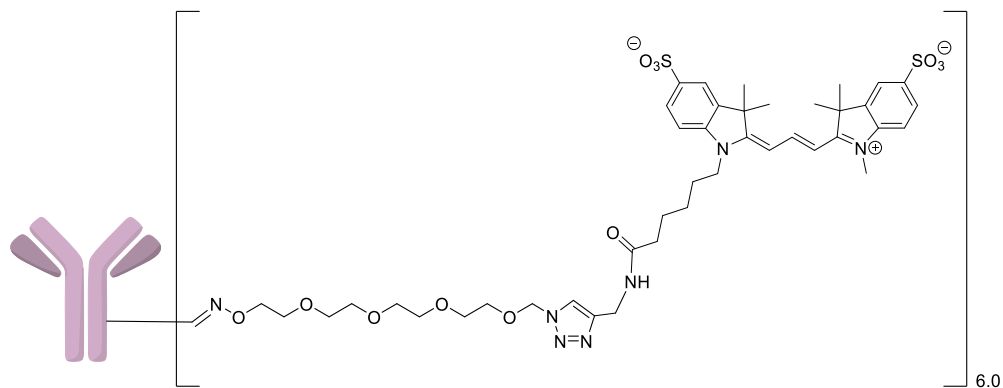


Конъюгат 54. В полипропиленовой микроцентрифужной пробирке объемом 2 мл к раствору 0.5 мг конъюгата **53** в MeOH (50 мкл) добавили раствор HCl в MeOH-H₂O (5.5 мкл, 0.12 M, 99:1 v/v). Реакционную смесь перемешивали на орбитальном шейкере в течение 10 мин при 23 °C, после чего продукт был осажден добавлением 1.80 мл Et₂O. После центрифугирования и промывки 1.80 мл Et₂O продукт был высушен в вакууме масляного насоса и использован в дальнейших реакциях без дополнительной очистки. *R_f* 0.39 (силикагель, DCM–MeOH–H₂O–Et₃N, 85:15:1:4). HRMS (ESI) вычислено для C₁₁₅H₁₈₀N₁₈O₂₈S₂²⁺ [M+2H]²⁺ 1162.6322, найдено 1162.6324.

Синтез конъюгатов антител

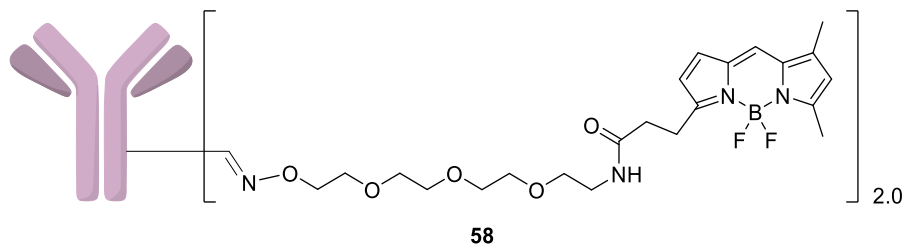
Общая методика III: синтез конъюгатов антител с помощью оксимного лигирования со снятием этоксиэтилиденовой защитной группы *in situ*. К 200 мкл раствора антитела бН8 в 20 мМ ацетатном буфере (рН 5.0, 150 мМ NaCl) добавляли 12 мкл 360 мМ водного раствора NaIO₄. Смесь перемешивали на орбитальном шейкере в течение 40 мин при 23 °С в темноте, затем прибавляли 12 мкл раствора глицерина (20 масс. % в воде), перемешивали, антитело выделяли на колонке с сефадексом G-50, уравновешенной в 100 мМ цитратном буфере (рН 3.0, 150 мМ NaCl); объем целевой фракции – 500 мкл. Количество вещества окисленного антитела измерялось спектрофотометрически, затем к раствору антитела прибавляли 20 эквивалентов защищенного оксиамиона (5–20 мкл раствора в DMSO), реакцию перемешивали на орбитальном шейкере в течение 1 ч при 23 °С, после чего конъюгат очищали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенной в PBS (рН 7.4); объем целевой фракции – 1000 мкл. Выход и степень мечения конъюгата определяли спектрофотометрически.

Общая методика IV: синтез конъюгатов антител с помощью оксимного лигирования с использованием солей оксиаминов. К 200 мкл раствора антитела бН8 в 20 мМ ацетатном буфере (рН 5.0, 150 мМ NaCl) прибавляли водный раствор NaIO₄ (12 мкл, 360 мМ). Смесь перемешивали на орбитальном шейкере в течение 30 мин при 23 °С в темноте, затем добавляли глицерин (12 мкл, 20 масс. % в воде), и окисленное антитело немедленно очищали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенной в 20 мМ ацетатном буфере, содержащем Tween 80 (рН 5.0, 150 мМ NaCl, 0.01 об. % Tween 80). Концентрацию окисленного антитела измеряли спектрофотометрически, сразу после этого к окисленному антителу добавляли оксиаминовую соль (раствор в DMSO). Реакционную смесь перемешивали на орбитальном шейкере в течение 1 ч при 23 °С, после чего конъюгат очищали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенной в PBST (рН 7.4, 0.01 или 0.05 об. % Tween 80). Выход и стехиометрию конъюгата определяли спектрофотометрически.

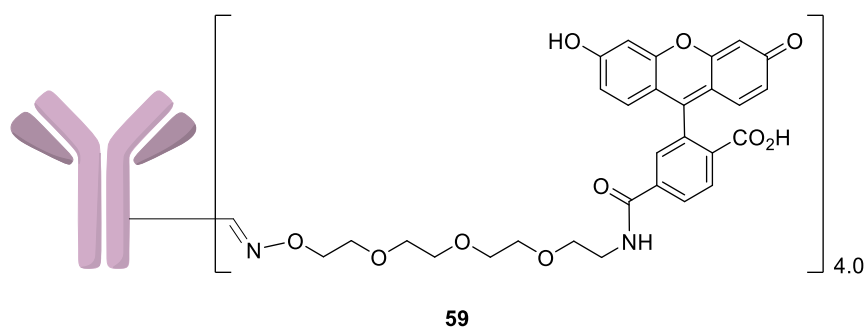


Конъюгат 5. Раствор антитела 6Н8 (0.50 мл, концентрация 1.7 мг/мл) перевели в ацетатный буфер (20 мМ, 150 мМ NaCl, pH 5.0) с помощью гель-фильтрации на колонке NAP-5 по стандартному протоколу производителя, Получен раствор антитела 6Н8 (700 мкл) с концентрацией 0.83 мг/мл, К этому раствору добавили 100 мкл 160 мМ раствора NaIO₄, Начальная концентрация периодата натрия в реакционной смеси составила 20 мМ, начальная концентрация антитела составила 0.73 мг/мл. Окисление углеводной части антитела проводили в темноте при комнатной температуре в течение 40 мин. Затем остановили реакцию добавлением 100 мкл 20% водного раствора глицерина. Полученную реакционную смесь (900 мкл) нанесли на гель-фильтрационную колонку NAP-10 и провели обессоливание по стандартному протоколу в ацетатном буфере (20 мМ, 150 мМ NaCl, pH 5.0). Получен раствор окисленного моноклонального антитела (1.1 мл, концентрация 0.47 мг/мл). К аликвоте раствора окисленного антитела (370 мкл) добавили 70 мМ водный раствор реагента **3** (0.7 мкл). В реакционной смеси начальная концентрация окисленного антитела составляла 3 мкМ, начальная концентрация оксиамины **3** составляла 150 мкМ. Реакционную смесь выдержали 1 ч при комнатной температуре в темноте, нанесли на гель-фильтрационную колонку с сефадексом G-50 и элюировали полученный конъюгат PBS. К полученному раствору азидированного антитела добавили 50-кратный избыток (40 нмоль) алкинового производного сульфированного красителя Су3 **4**. Проводили медь-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения в присутствии 0.5 мМ эквимольной каталитической смеси CuSO₄-ТНРТА и 5 мМ аскорбиновой кислоты в течение 3 ч. Реакционную смесь очистили от избытка красителя **4** и низкомолекулярных соединений на сефадексе G-50 в PBS, собирая окрашенную высокомолекулярную фракцию. Концентрацию полученного конъюгата и стехиометрию

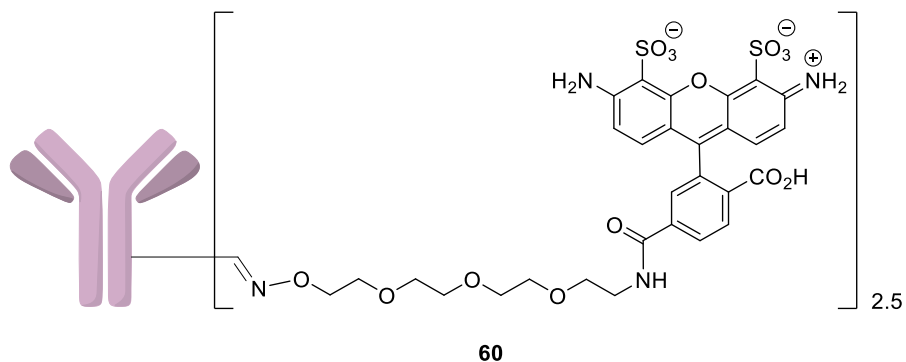
(нагрузку красителя на одну молекулу антитела) определяли спектрофотометрически по соотношению поглощений при 280 нм и 550 нм. Спектры поглощения регистрировали в PBS, содержащем 10% додецилсульфата натрия. Степень мечения антитела составила 6.0.



Конъюгат 58. Антитело 6Н8 было модифицировано реагентом **7** в соответствии с видоизмененной общей методикой III: время периодатного окисления составило 1 ч., оксимное лигирование проводилось в 20 мМ ацетатном буфере (рН 3.6, 150 мМ NaCl). Получен конъюгат со средней степенью мечения 2.0.

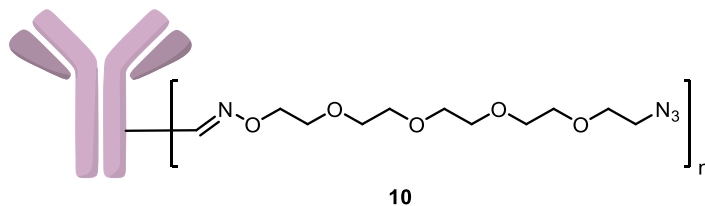


Конъюгат 59. Антитело 6Н8 было модифицировано реагентом **8** в соответствии с видоизмененной общей методикой III: время периодатного окисления составило 1 ч., оксимное лигирование проводилось в 20 мМ ацетатном буфере (рН 3.6, 150 мМ NaCl). Получен конъюгат со средней степенью мечения 4.0.



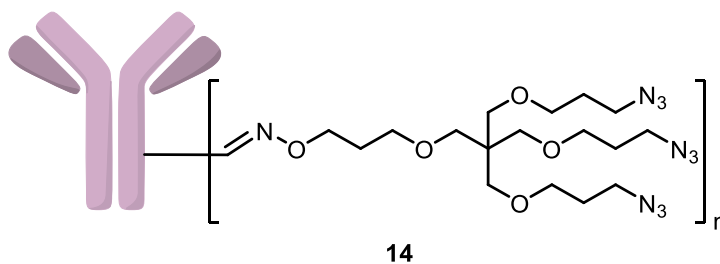
Конъюгат 60. Антитело 6Н8 было модифицировано реагентом **9** в соответствии с видоизмененной общей методикой III: время периодатного окисления составило 1 ч.,

оксимное лигирование проводилось в 20 мМ ацетатном буфере (pH 3.6, 150 мМ NaCl).
Получен конъюгат со средней степенью мечения 2.5.



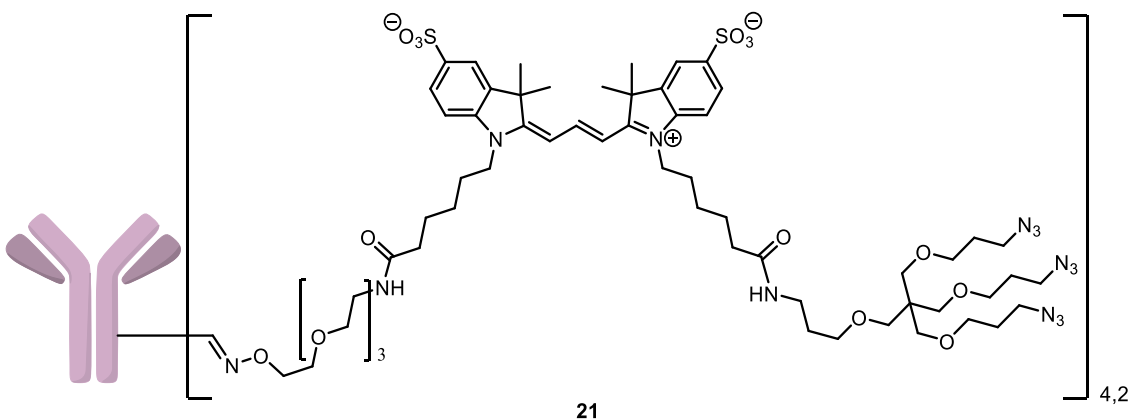
Конъюгат 10

В соответствии с общей методикой IV (буфер для очистки: 0.01% PBST) бН8 (0.40 мг, 2.7 нмоль) модифицировали реагентом **3** (20 мМ в DMSO, 2.0 мкл, 40 нмоль). Получено 0.15 мг (1.0 нмоль, 37%) конъюгата **10**.



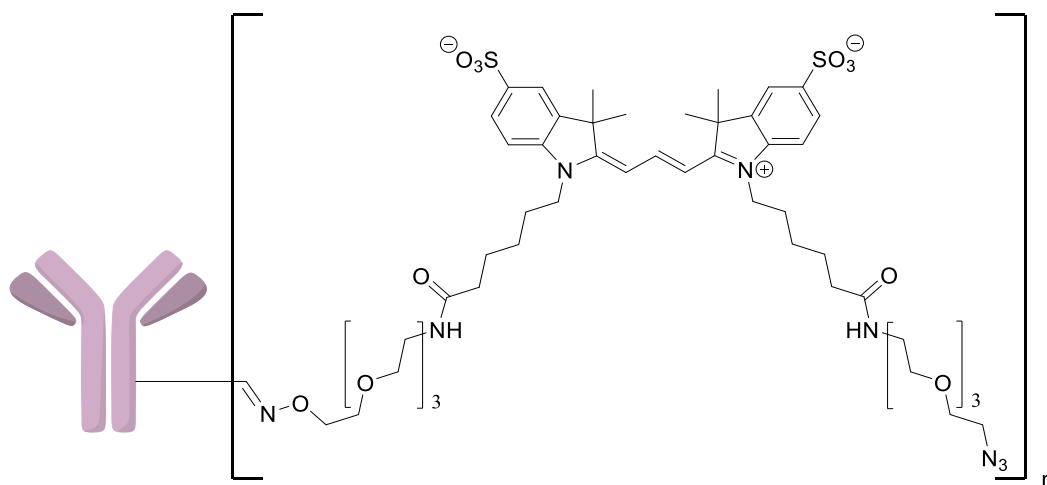
Конъюгат 14

В соответствии с модифицированной общей методикой IV (оксимное лигирование проводили в ацетатном буфере, содержащем 0.05 об. % Tween 80, буфер для очистки: 0.05% PBST) бН8 (0.18 мг, 1.2 нмоль) модифицировали реагентом **13** (20 мМ в DMSO, 1.0 мкл, 20 нмоль). Получено 0.062 мг (0.41 нмоль, 34%) конъюгата **14**.



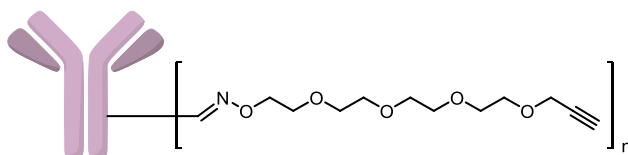
Конъюгат 21

В соответствии с модифицированной общей методикой IV (оксимное лигирование проводили в ацетатном буфере, содержащем 0.05 об. % Tween 80, буфер для очистки: 0.05% PBST) 6H8 (0.18 мг, 1.2 нмоль) модифицировали реагентом **20** (6.1 мМ в DMSO, 1.1 мкл, 6.7 нмоль). Получено 0.11 мг (0.73 нмоль, 61%) конъюгата **21** со средней степенью модификации 4.2.



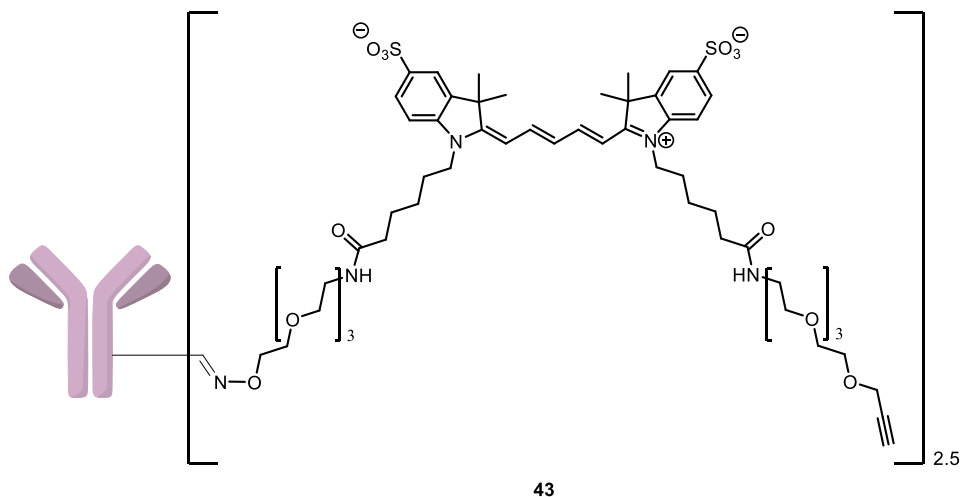
17

Конъюгат 17. Конъюгат был получен по двум методикам. В соответствии с общей методикой III антитело 6H8 (1.50 мг, 10.0 нмоль) было модифицировано реагентом **32**. Получено 0.49 мг (3.3 нмоль, 33%) конъюгата **17** со средней степенью мечения 3.2. В соответствии с общей методикой IV (буфер для очистки: 0.01% PBST), антитело 6H8 (0.40 мг, 2.7 нмоль) модифицировали реагентом **16** (5.0 мМ в DMSO, 4.0 мкл, 20 нмоль). Получено 0.11 мг (0.73 нмоль, 28%) конъюгата **17** со средней степенью мечения 3.7.

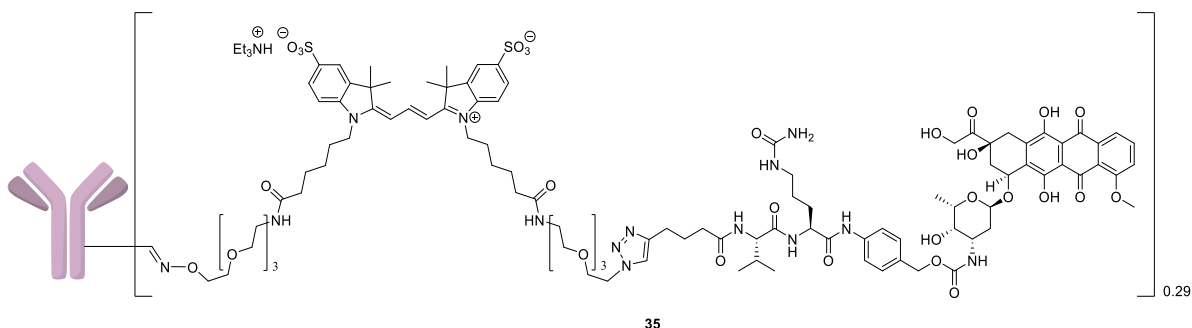


39

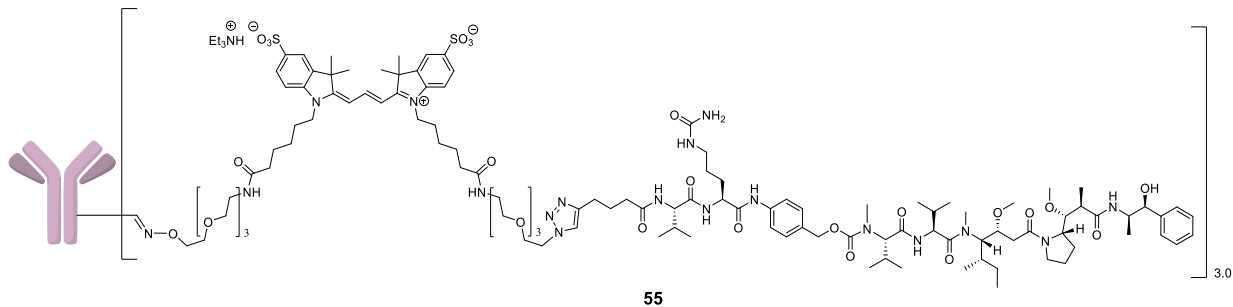
Конъюгат 39. В соответствии с общей методикой III антитело 6H8 (0.90 мг, 6.0 нмоль) было модифицировано реагентом **38**. Получено 0.46 мг (3.1 нмоль, 51%) конъюгата.



Конъюгат 43. В соответствии с общей методикой III антитело бН8 (1.07 мг, 7.1 нмоль) было модифицировано реагентом **42**. Получено 0.25 мг (1.7 нмоль, 23%) конъюгата со средней степенью мечения 2.5.



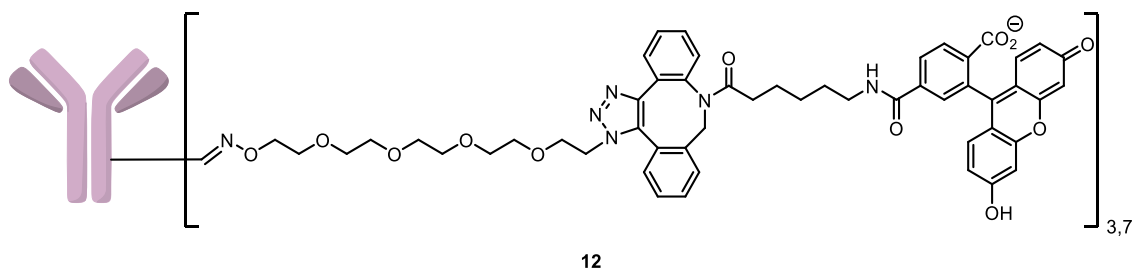
Конъюгат 35. Антитело бН8 (1.79 мг, 11.9 нмоль) было модифицировано реагентом **34** в соответствии с видоизменённой общей методикой III: реагент **34** добавляли в количестве 4 эквивалентов порциями по 0.5 экв каждые 10 мин (общее время реакции – 80 мин). Получено 0.54 мг (3.6 нмоль, 30%) конъюгата со средней степенью мечения 0.29.



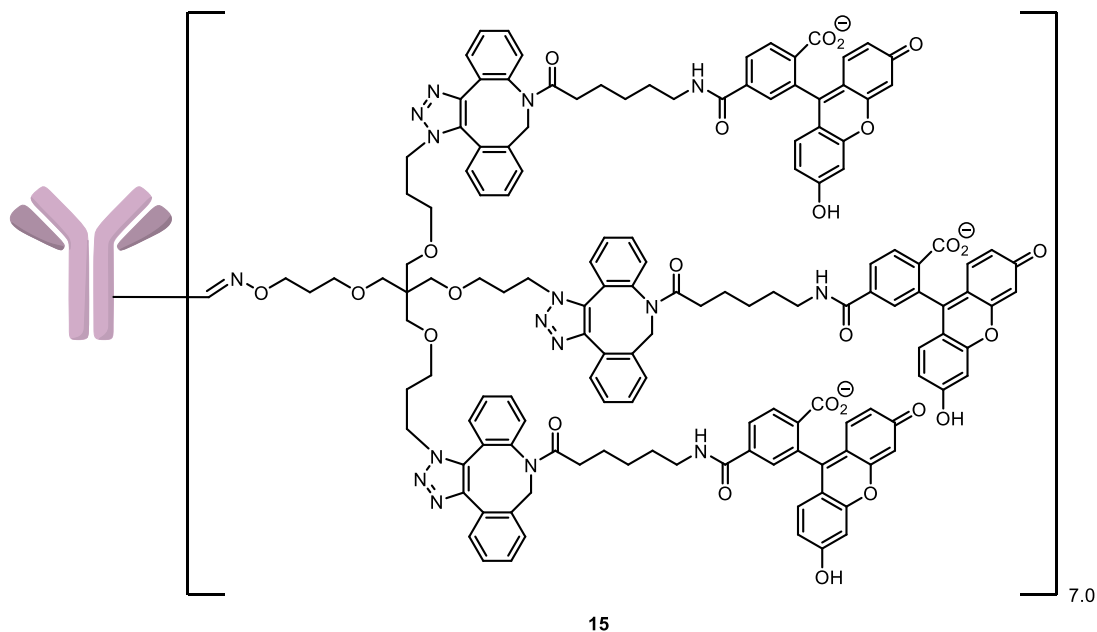
Конъюгат 55. Антитело бН8 (1.09 мг, 7.25 нмоль) модифицировали в соответствии с изменённой общей методикой IV: после окисления антитело переводили в 20 мМ

ацетатный буфер (pH 5.0, 150 mM NaCl) и обрабатывали реагентом **54** (38.1 нмоль). Очистку проводили в PBS. Было получено 0.64 мг (4.3 нмоль, 59%) конъюгата **55** со средней степенью мечения 3.0.

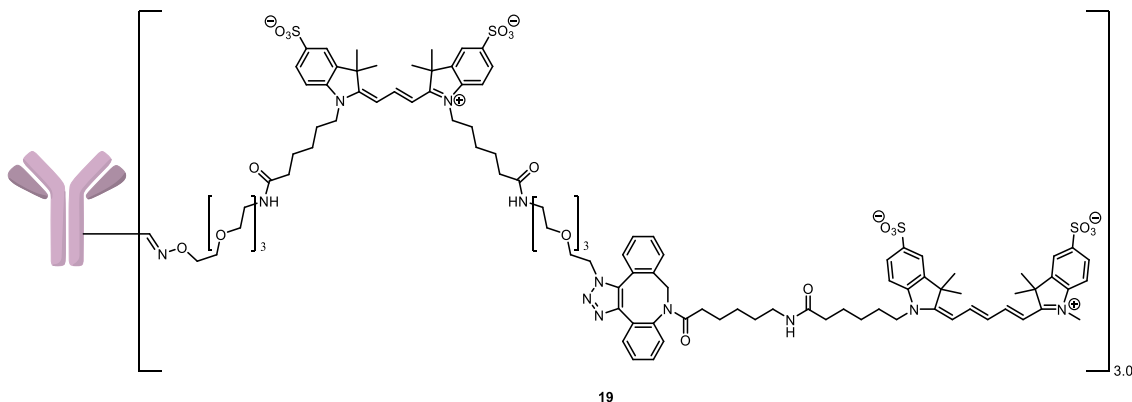
Общая методика V: синтез конъюгатов антител посредством азид-алкинового циклоприсоединения. промотируемого напряжением (SPAAC). Раствор азидабензоциклооктинового производного красителя в DMSO добавляли к раствору конъюгата 6H8 в 200 мкл PBST (pH 7.4, 0.01 или 0.05 об. % Tween 80). Смесь перемешивали на орбитальном шейкере в течение 2 ч при 23 °С, после чего полученный конъюгат очищали на колонке с сефадексом G-50, уравновешенной в PBST (pH 7.4, 0.01 или 0.05 об. % Tween 80). Выход и степень мечения конъюгата определяли спектрофотометрически.



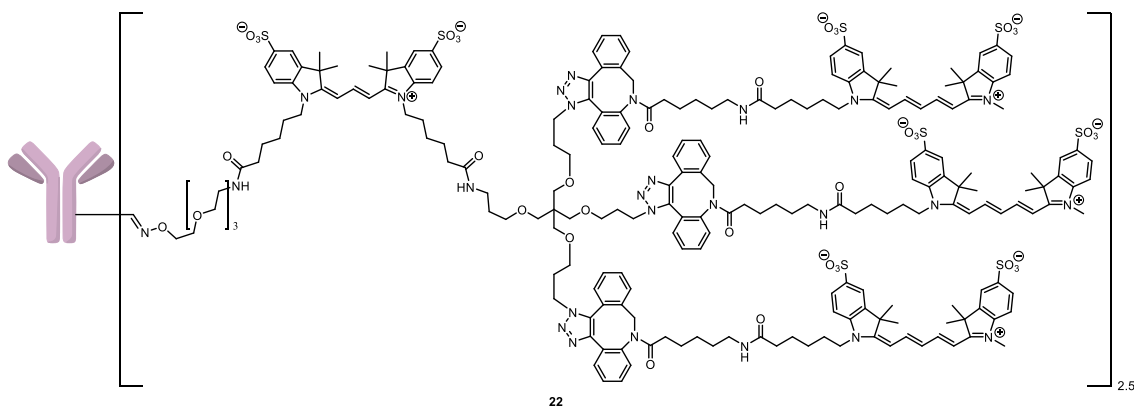
Конъюгат 12. Конъюгат **10** (0.15 мг, 1.0 нмоль) обрабатывали реагентом **11** (6.2 мМ в DMSO, 16.5 мкл, 102 нмоль) в соответствии с общей методикой V (буфер для очистки: 0.01% PBST). Получено 0.075 мг (0.49 нмоль, 49%) конъюгата **12** со средней степенью мечения 3.7.



Конъюгат 15. Конъюгат **14** (0.053 мг, 0.35 нмоль) обрабатывали реагентом **11** (11.1 мМ в DMSO, 14.5 мкл, 161 нмоль) в соответствии с общей методикой V (буфер для очистки: 0.05% PBST). Из-за высокой степени мечения конъюгата **15** невозможно определить его точное количество и степень мечения. В предположении, что реакция была количественной, было получено 0.053 мг (100%) конъюгата **15** со средней степенью мечения 21 (7.0 в расчёте на линкер с тремя флуорофорами).



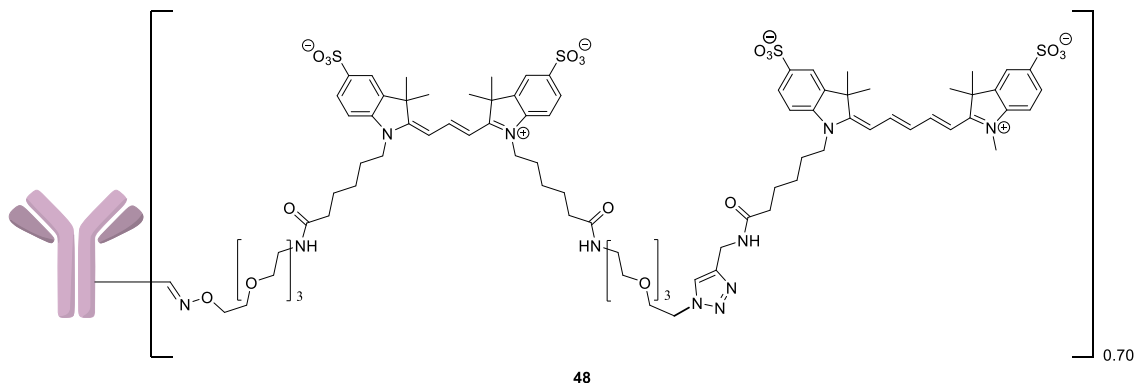
Конъюгат 19. Конъюгат **17** (степень мечения 3.7, 0.11 мг, 0.73 нмоль) обрабатывали реагентом **18** (1.78 мМ в DMSO, 7.0 мкл, 12.5 нмоль) в соответствии с общей методикой V (буфер для очистки: 0.01% PBST). Получено 0.081 мг (0.54 нмоль, 74%) конъюгата **19** со средней степенью мечения 3.0 (измерено по sCu5).



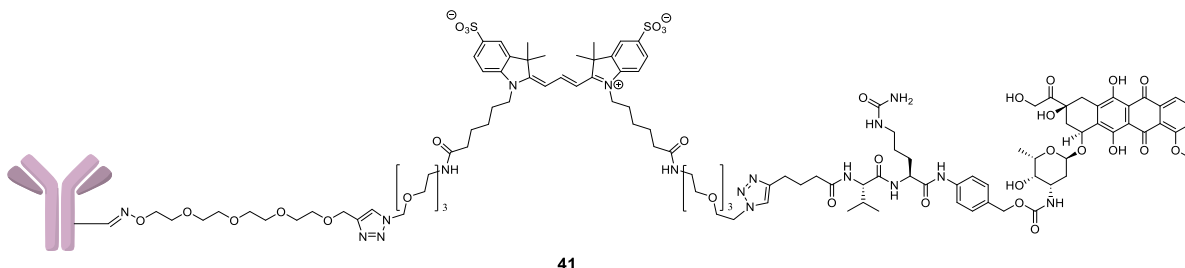
Конъюгат 22. Конъюгат **21** (0.044 мг, 0.29 нмоль) обрабатывали реагентом **18** (17 мМ в DMSO, 11 мкл, 187 нмоль) в соответствии с общей методикой V (буфер для очистки: 0.05% PBST). Получено 0.031 мг (0.21 нмоль, 70%) конъюгата **22** со средней степенью мечения 7.4 по sCu5 (2.5 в расчете на линкер с тремя флуорофорами).

Общая методика VI: синтез конъюгатов антител с помощью медь(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения

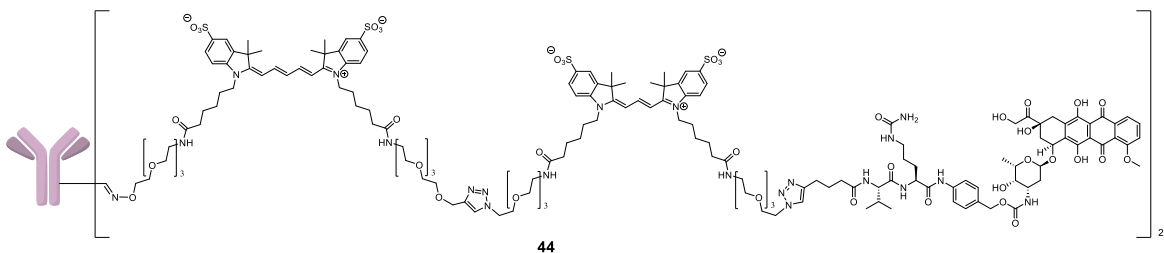
В полипропиленовой микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 мл смешивали раствор CuSO₄ и THPTA в PBS (10.5 мкл, 1.1 мМ CuSO₄, 5.5 мМ THPTA), раствор низкомолекулярного компонента (алкина или азиды) в DMSO (14.5 мкл, реагент **10** – 0.39 мМ, реагент **15** – 1.15 мМ) и водный раствор аскорбата натрия (6 мкл, 100 мМ). Реакционную смесь перемешивали на орбитальном шейкере в течение 15 мин, затем прибавляли 200 мкл раствора антитела в PBS, перемешивали в течение 1 ч. Конъюгат очищали на колонке с сорбентом Bio-Gel P-100, уравновешенной в PBS (рН 7.4); объем целевой фракции – 500 мкл. Выход и степень мечения конъюгата определяли спектрофотометрически.



Конъюгат 48. В соответствии с общей методикой VI конъюгат **17** (62 мкг, 0.41 нмоль) со степенью мечения 0.70 был модифицирован реагентом **18**. Получено 23 мкг (0.15 нмоль, 37%) конъюгата, выход модификации количественный (по соотношению sCu3 и sCu5).



Конъюгат 41. В соответствии с общей методикой VI конъюгат **39** (77 мкг, 0.51 нмоль) был модифицирован реагентом **40**. Получено 22 мкг (0.15 нмоль, 29%) конъюгата, степень модификации, измеренная по sCu3, составила 1.0.



Конъюгат 44. В соответствии с общей методикой VI конъюгат **43** (20 мкг, 0.13 нмоль) был модифицирован реагентом **40**. Получено 9.1 мкг (0.059 нмоль, 46%) конъюгата, выход модификации составил 78%, общая степень модификации составила 2.5.

Иммуноферментный анализ

На 96-луночный планшет для ИФА был сорбирован рекомбинантный белок PRAME в концентрации 100 нг в 100 мкл PBS на лунку. Лунки планшета были трижды промыты PBST, после чего антитело 6H8 и его конъюгаты (100 мкл на лунку в PBS с 1% BSA) были добавлены в различных концентрациях в двух повторениях. После инкубации на орбитальном шейкере в течение 1 ч при 23 °С и трех промывок PBST в лунки добавляли антимышьиные Fc-специфические антитела, сконъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (100 мкл на лунку в PBS с 1% BSA). После инкубации на орбитальном шейкере в течение 1 ч при 23 °С и трехкратной промывки PBST добавляли раствор дихлорида орто-фенилендиамина (OPD) (100 мкл на лунку). Реакцию останавливали добавлением 10% серной кислоты, измеряли оптическую плотность на 490 нм.

Проточная цитометрия

Для окрашивания мечеными антителами использовали клеточные линии THP-1, K562, MeIP и WI-38 со сверхэкспрессией PRAME. Перед окрашиванием клетки отмывали от культуральной среды PBS с 1% BSA. После промывки клетки суспендировали в PBS с 1% BSA до концентрации приблизительно 500000 на мл. Окрашивание проводили в образцах по 100 мкл клеточной суспензии, содержащих 1 мкг конъюгата антитела. Инкубацию проводили в течение 15 мин в темноте. После этого несвязавшиеся антитела отмывали PBS с 1% BSA. На проточном цитометре флуоресценцию регистрировали в каналах FITC (для флуоресцеина, $\lambda_{ex} = 488$ нм, детектор 530/30) и APC (для sCy5, $\lambda_{ex} = 640$ нм, детектор 675/30).

МТТ-тест

Клетки культивировали в 96-луночных планшетах (3000 клеток на лунку) с сериями разведений конъюгатов **44** и **55**, антитела 6H8, гидрохлорида доксорубина, ММАЕ и конъюгатов **40** и **54** в стандартных условиях в течение 72 ч. После этого добавляли раствор бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, после чего среду удаляли, осадок формазана растворяли в ДМСО. Оптическую плотность (OD) измеряли на 540 нм, жизнеспособность клеток рассчитывали следующим образом:

$$(OD_{\text{обработанных клеток}} - OD_{\text{пустой лунки}}) / (OD_{\text{контрольных клеток}} - OD_{\text{пустой лунки}}) \times 100\%.$$

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы бифункциональные линкерные реагенты на основе тетраэтиленгликоля и пентаэритрита для сайт-специфической модификации антител (иммуноглобулина G). В состав линкера введены гидрофильные цианиновые красители для спектрофотометрического определения степени модификации.
2. Получены N-этоксиэтилиден-защищённые оксиаминовые производные флуоресцентных красителей. Предложен метод модификации окисленных периодатом антител N-защищёнными оксиаминами с удалением этоксиэтилиденной защитной группы *in situ*. С его помощью были получены флуоресцентные антитела к опухолевому белку PRAME и применены для детекции антигена на поверхности опухолевых клеток.
3. Разработан подход к синтезу конъюгатов антитело-препарат путем комбинирования периодатного окисления гликанов антител и оксимного лигирования. Метод был применён к антителам к опухолевому белку PRAME. Показано, что белок PRAME может быть использован в качестве мишени для конъюгатов антитело-препарат.

БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь автор выражает благодарность Коршуну В.А. за руководство диссертационной работой, а также Гуляку Е.Л., Брылёву В.А. и Алфёровой В.А. за помощь и поддержку.

Автор благодарен сотрудникам НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (В.А. Мисюрин, А.Е. Бармашов, Ю.П. Финашутина), ООО «Генотехнология» (А.В. Алексеева, Н.А. Тихонова, Н.А. Лыжко, А.В. Мисюрин) за предоставленное антитело к опухолевому антигену PRAME, а также выполнение экспериментов по проточной цитометрии, ИБХ РАН (Д.Ю. Рязанцев, Е.В. Рябухина, М.А. Симонова) за проведение экспериментов по проточной цитометрии, иммуноферментному анализу и тестам на активность полученных терапевтических конъюгатов антител *in vitro*.

Кроме того, автор благодарит И.В. Михуру за помощь в подготовке диссертации к защите, О.А. Донцову, А.Г. Габимова и всех сотрудников Отдела функционирования живых систем ИБХ РАН за полезные замечания в процессе выполнения работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ¹ <https://en.wikipedia.org/wiki/Bioconjugation>.
- ² Saxon, E.; Bertozzi, C.R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **2000**, 287 (5460), 2007–2010. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>.
- ³ Prescher, J.A.; Dube, D.H.; Bertozzi, C.R. Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature* **2004**, 430 (7002), 873–877. <https://doi.org/10.1038/nature02791>.
- ⁴ Vocadlo, D.J.; Hang, H.C.; Kim, E.-J.; Hanover, J.A.; Bertozzi, C.R. A chemical approach for identifying *O*-GlcNAc-modified proteins in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100 (16), 9116–9121. <https://doi.org/10.1073/pnas.1632821100>.
- ⁵ Hang, H.C.; Yu, C.; Pratt, M.R.; Bertozzi, C.R. Probing glycosyltransferase activities with the Staudinger ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (1), 6–7. <https://doi.org/10.1021/ja037692m>.
- ⁶ Prescher, J.A.; Bertozzi, C.R. Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1 (1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>.
- ⁷ Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*, Third edition; Elsevier/AP: London ; Waltham, MA, 2013. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>
- ⁸ *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications*; Narain, R., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2014. <https://doi.org/10.1002/9781118775882>.
- ⁹ *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry*; Vrabel, M., Carell, T., Eds.; *Top. Curr. Chem. Coll.*; Springer International Publishing: Cham, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29686-9>.
- ¹⁰ W. Russ Algar, Philip E. Dawson, Igor L. Medintz. Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions: Concepts and Applications, Volume 1. **2017**. <https://www.wiley.com/en-us/Chemoselective+and+Bioorthogonal+Ligation+Reactions:+Concepts+and+Applications-p-9783527334360>
- ¹¹ *Bioconjugation: Methods and Protocols*; Massa, S., Devoogdt, N., Eds.; *Meth. Mol. Biol.*; Springer New York: New York, NY, 2019; Vol. 2033. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9654-4>.
- ¹² Bednarek, C.; Wehl, I.; Jung, N.; Schepers, U.; Bräse, S. The Staudinger ligation. *Chem. Rev.* **2020**, 120 (10), 4301–4354. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00665>.
- ¹³ Saxon, E.; Armstrong, J.I.; Bertozzi, C.R. A “traceless” Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. *Org. Lett.* **2000**, 2 (14), 2141–2143. <https://doi.org/10.1021/ol006054v>.
- ¹⁴ Soellner, M.B.; Nilsson, B.L.; Raines, R.T. Reaction mechanism and kinetics of the traceless Staudinger ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (27), 8820–8828. <https://doi.org/10.1021/ja060484k>.
- ¹⁵ Tam, A.; Soellner, M.B.; Raines, R.T. Water-soluble phosphinothiols for traceless Staudinger ligation and integration with expressed protein ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (37), 11421–11430. <https://doi.org/10.1021/ja073204p>.

- ¹⁶ McGrath, N.A.; Raines, R.T. Chemoselectivity in chemical biology: acyl transfer reactions with sulfur and selenium. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 752–761. <https://doi.org/10.1021/ar200081s>.
- ¹⁷ Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- ¹⁸ Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- ¹⁹ Meldal, M.; Tornøe, C.W. Cu-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015. <https://doi.org/10.1021/cr0783479>.
- ²⁰ Agard, N.J.; Prescher, J.A.; Bertozzi, C.R. A Strain-promoted [3+2] azide–alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
- ²¹ Jewett, J.C.; Bertozzi, C.R. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1272. <https://doi.org/10.1039/b901970g>.
- ²² Codelli, J.A.; Baskin, J.M.; Agard, N.J.; Bertozzi, C.R. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (34), 11486–11493. <https://doi.org/10.1021/ja803086r>.
- ²³ Agard, N.J.; Baskin, J.M.; Prescher, J.A.; Lo, A.; Bertozzi, C.R. A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (10), 644–648. <https://doi.org/10.1021/cb6003228>.
- ²⁴ Devaraj, N.K.; Weissleder, R. Biomedical applications of tetrazine cycloadditions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 816–827. <https://doi.org/10.1021/ar200037t>.
- ²⁵ Blackman, M.L.; Royzen, M.; Fox, J.M. Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels–Alder reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519. <https://doi.org/10.1021/ja8053805>.
- ²⁶ Devaraj, N.K.; Upadhyay, R.; Haun, J.B.; Hilderbrand, S.A.; Weissleder, R. Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/*trans*-cyclooctene cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 7013–7016. <https://doi.org/10.1002/anie.200903233>.
- ²⁷ Liu, F.; Paton, R.S.; Kim, S.; Liang, Y.; Houk, K.N. Diels–Alder reactivities of strained and unstrained cycloalkenes with normal and inverse-electron-demand dienes: activation barriers and distortion/interaction analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (41), 15642–15649. <https://doi.org/10.1021/ja408437u>.
- ²⁸ Kölmel, D.K.; Kool, E.T. Oximes and hydrazones in bioconjugation: mechanism and catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>.
- ²⁹ Pifferi, C.; Daskhan, G.C.; Fiore, M.; Shiao, T.C.; Roy, R.; Renaudet, O. Aminoxyolated carbohydrates: synthesis and applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 9839–9873. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00733>.

- ³⁰ Pomplun, S.; Mohamed, M.Y. H.; Oelschlaegel, T.; Wellner, C.; Bergmann, F. Efficient Pictet-Spengler bioconjugation with *N*-substituted pyrrolyl alanine derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (11), 3542–3547. <https://doi.org/10.1002/anie.201814200>.
- ³¹ Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7523–7526. <https://doi.org/10.1002/anie.200802651>.
- ³² Strakova, K.; Soleimanpour, S.; Diez-Castellnou, M.; Sakai, N.; Matile, S. Ganglioside-selective mechanosensitive fluorescent membrane probes. *Helv. Chim. Acta* **2018**, *101* (5), e1800019. <https://doi.org/10.1002/hlca.201800019>.
- ³³ Tan, P. S.; Lemke, E. A. Probing differential binding mechanisms of phenylalanine-glycine-rich nucleoporins by single-molecule FRET. In: *Meth. Enzymol.*; Elsevier, 2018; Vol. 611, pp 327–346. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.08.034>.
- ³⁴ Wang, S.-L.; Wang, Y.; Wu, L.; Cai, Y.-Y.; Wang, Z.-C.; Alolga, R. N.; Qi, L.-W.; Li, B.; Huang, F.-Q. Paired derivatization approach with H/D-labeled hydroxylamine reagents for sensitive and accurate analysis of monosaccharides by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (8), 3590–3599. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04924>.
- ³⁵ Xu, S.; Zheng, J.; Xiao, H.; Wu, R. Simultaneously identifying and distinguishing glycoproteins with O-GlcNAc and O-GalNAc (the Tn antigen) in human cancer cells. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (7), 3343–3351. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05438>.
- ³⁶ Palei, S.; Becher, K.S.; Nienberg, C.; Jose, J.; Mootz, H.D. Bacterial cell-surface display of semisynthetic cyclic peptides. *ChemBioChem.* **2019**, *20* (1), 72–77. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800552>
- ³⁷ Bartheldyová, E.; Turánek Knotigová, P.; Zachová, K.; Mašek, J.; Kulich, P.; Effenberg, R.; Zyka, D.; Hubatka, F.; Kotouček, J.; Čelechovská, H.; Héžová, R.; Tomečková, A.; Mašková, E.; Fojtíková, M.; Macaulay, S.; Bystrický, P.; Paulovičová, L.; Paulovičová, E.; Drož, L.; Ledvina, M.; Raška, M.; Turánek, J. N-Oxy lipid-based click chemistry for orthogonal coupling of mannan onto nanoliposomes prepared by microfluidic mixing: synthesis of lipids, characterisation of mannan-coated nanoliposomes and in vitro stimulation of dendritic cells. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *207*, 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.121>.
- ³⁸ Vrettos, E.I.; Karampelas, T.; Sayyad, N.; Kougioumtzi, A.; Syed, N.; Crook, T.; Murphy, C.; Tamvakopoulos, C.; Tzakos, A.G. Development of programmable gemcitabine-GnRH prodrugs bearing linker controllable “click” oxime bond tethers and preclinical evaluation against prostate cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *211*, 113018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113018>.
- ³⁹ Dai, S.; Liu, S.; Li, C.; Zhou, Z.; Wu, Z. Site-selective modification of exendin 4 with variable molecular weight dextrans by oxime-ligation chemistry for improving type 2 diabetic treatment. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *249*, 116864. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116864>.
- ⁴⁰ De Rosa, L.; Di Stasi, R.; Longhitano, L.; D’Andrea, L. D. Labeling of VEGFR1D2 through oxime ligation. *Bioorg. Chem.* **2019**, *91*, 103160. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103160>.

- ⁴¹ Liu, Y.; Palma, A.S.; Feizi, T.; Chai, W. Insights into glucan polysaccharide recognition using glucooligosaccharide microarrays with oxime-linked neoglycolipid probes. In: *Meth. Enzymol.*; Elsevier, 2018; Vol. 598, pp 139–167. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.09.001>.
- ⁴² Kleski, K.A.; Shi, M.; Lohman, M.; Hymel, G.T.; Gattoji, V.K.; Andreana, P.R. Synthesis of an aminooxy derivative of the GM3 antigen and its application in oxime ligation. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (24), 16207–16217. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c00320>.
- ⁴³ Matthey, A.P.; Birmingham, W.R.; Both, P.; Kress, N.; Huang, K.; van Munster, J.M.; Bulmer, G.S.; Parmeggiani, F.; Voglmeir, J.; Martinez, J.E.R.; Turner, N.J.; Flitsch, S.L. Selective oxidation of *N*-glycolylneuraminic acid using an engineered galactose oxidase variant. *ACS Catal.* **2019**, *9* (9), 8208–8212. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b02873>.
- ⁴⁴ Guthrie, Q.A.E.; Young, H.A.; Proulx, C. Ketoxime peptide ligations: oxidative couplings of alkoxyamines to *N*-aryl peptides. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (41), 9506–9512. <https://doi.org/10.1039/C9SC04028E>.
- ⁴⁵ Feni, L.; Omrane, M.; Fischer, M.; Zlatopolskiy, B.; Neumaier, B.; Neundorf, I. Convenient Preparation of ¹⁸F-labeled peptide probes for potential claudin-4 PET imaging. *Pharmaceuticals* **2017**, *10* (4), 99. <https://doi.org/10.3390/ph10040099>.
- ⁴⁶ Feni, L.; Parente, S.; Robert, C.; Gazzola, S.; Arosio, D.; Piarulli, U.; Neundorf, I. Kiss and run: promoting effective and targeted cellular uptake of a drug delivery vehicle composed of an integrin-targeting diketopiperazine peptidomimetic and a cell-penetrating peptide. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (7), 2011–2022. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00292>.
- ⁴⁷ Flores, J.; Brea, R. J.; Lamas, A.; Fracassi, A.; Salvador-Castell, M.; Xu, C.; Baiz, C. R.; Sinha, S. K.; Devaraj, N. K. Rapid and sequential dual oxime ligation enables *de novo* formation of functional synthetic membranes from water-soluble precursors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61* (29), e202200549. <https://doi.org/10.1002/anie.202200549>.
- ⁴⁸ Wang, S.; Nawale, G.N.; Kadekar, S.; Oommen, O.P.; Jena, N.K.; Chakraborty, S.; Hilborn, J.; Varghese, O.P. Saline accelerates oxime reaction with aldehyde and keto substrates at physiological pH. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 2193. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20735-0>.
- ⁴⁹ Zhou, Y.; Piergentili, I.; Hong, J.; van der Helm, M.P.; Macchione, M.; Li, Y.; Eelkema, R.; Luo, S. Indoline catalyzed acylhydrazone/oxime condensation under neutral aqueous conditions. *Org. Lett.* **2020**, *22* (15), 6035–6040. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c02128>.
- ⁵⁰ Larsen, D.; Kietrys, A.M.; Clark, S.A.; Park, H.S.; Ekebergh, A.; Kool, E.T. Exceptionally rapid oxime and hydrazone formation promoted by catalytic amine buffers with low toxicity. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (23), 5252–5259. <https://doi.org/10.1039/C8SC01082J>.
- ⁵¹ Ollivier, N.; Agouridas, V.; Snella, B.; Desmet, R.; Drobecq, H.; Vicogne, J.; Melnyk, O. Catalysis of hydrazone and oxime peptide ligation by arginine. *Org. Lett.* **2020**, *22* (21), 8608–8612. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03195>.
- ⁵² Zinn, S.; Vazquez-Lombardi, R.; Zimmermann, C.; Sapra, P.; Jeremut, L.; Christ, D. Advances in antibody-based therapy in oncology. *Nat. Cancer* **2023**, *4* (2), 165–180. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00516-z>.

- ⁵³ Zahavi, D.; Weiner, L. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Antibodies* **2020**, *9* (3), 34. <https://doi.org/10.3390/antib9030034>.
- ⁵⁴ Bruno, V.; Battaglia, G.; Nicoletti, F. The advent of monoclonal antibodies in the treatment of chronic autoimmune diseases. *Neurol. Sci.* **2011**, *31* (S3), 283–288. <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0382-6>.
- ⁵⁵ Grace, P.S.; Gunn, B.M.; Lu, L.L. Engineering the supernatural: monoclonal antibodies for challenging infectious diseases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2022**, *78*, 102818. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102818>.
- ⁵⁶ Dragovich, P.S. Antibody–drug conjugates for immunology. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (6), 4496–4499. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00339>.
- ⁵⁷ Hobson, A.D.; McPherson, M.J.; Hayes, M.E.; Goess, C.; Li, X.; Zhou, J.; Wang, Z.; Yu, Y.; Yang, J.; Sun, L.; Zhang, Q.; Qu, P.; Yang, S.; Hernandez, A.; Bryant, S. H.; Mathieu, S.L.; Bischoff, A.K.; Fitzgibbons, J.; Santora, L.C.; Wang, L.; Wang, L.; Fettis, M.M.; Li, X.; Marvin, C.C.; Wang, Z.; Patel, M.V.; Schmidt, D.L.; Li, T.; Randolph, J.T.; Henry, R.F.; Graff, C.; Tian, Y.; Aguirre, A.L.; Shrestha, A. Discovery of ABBV-3373, an anti-TNF glucocorticoid receptor modulator immunology antibody drug conjugate. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (23), 15893–15934. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01579>.
- ⁵⁸ Sadraeian, M.; da Cruz, E.F.; Boyle, R.W.; Bahou, C.; Chudasama, V.; Janini, L.M.R.; Diaz, R.S.; Guimarães, F.E.G. Photoinduced photosensitizer–antibody conjugates kill HIV env-expressing cells, also inactivating HIV. *ACS Omega* **2021**, *6* (25), 16524–16534. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01721>.
- ⁵⁹ Lehar, S.M.; Pillow, T.; Xu, M.; Staben, L.; Kajihara, K.K.; Vandlen, R.; DePalatis, L.; Raab, H.; Hazenbos, W.L.; Hiroshi Morisaki, J.; Kim, J.; Park, S.; Darwish, M.; Lee, B.-C.; Hernandez, H.; Loyet, K. M.; Lupardus, P.; Fong, R.; Yan, D.; Chalouni, C.; Luis, E.; Khalfin, Y.; Plise, E.; Cheong, J.; Lyssikatos, J.P.; Strandh, M.; Koefoed, K.; Andersen, P.S.; Flygare, J.A.; Wah Tan, M.; Brown, E.J.; Mariathasan, S. Novel antibody–antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature* **2015**, *527* (7578), 323–328. <https://doi.org/10.1038/nature16057>.
- ⁶⁰ Ouf, S.A.; Gomha, S.M.; Eweis, M.; Ouf, A.S.; Sharawy, I.A.A.; Alharbi, S.A. Antidermatophytic activity of some newly synthesized arylhydrazonothiazoles conjugated with monoclonal antibody. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 20863. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77829-x>.
- ⁶¹ MacGregor, P.; Gonzalez-Munoz, A.L.; Jobe, F.; Taylor, M.C.; Rust, S.; Sandercock, A.M.; Macleod, O.J.S.; Van Bocxlaer, K.; Francisco, A.F.; D’Hooge, F.; Tiberghien, A.; Barry, C. S.; Howard, P.; Higgins, M.K.; Vaughan, T.J.; Minter, R.; Carrington, M. A single dose of antibody–drug conjugate cures a stage 1 model of African trypanosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13* (5), e0007373. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007373>.
- ⁶² *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins: From Pre-Clinical Development to Therapeutic Applications*; Phillips, G. L., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5456-4>.

- ⁶³ *Antibody-Drug Conjugates: The 21st Century Magic Bullets for Cancer*; Wang, J., Shen, W.-C., Zaro, J. L., Eds.; *AAPS Adv. Pharm. Sci. Series*; Springer International Publishing: Cham, 2015; Vol. 17. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13081-1>.
- ⁶⁴ *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; *Meth. Mol. Biol.*; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 1045. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-541-5>.
- ⁶⁵ *Next Generation Antibody Drug Conjugates (ADCs) and Immunotoxins*; Grawunder, U., Barth, S., Eds.; *Milestones in Drug Therapy*; Springer International Publishing: Cham, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46877-8>.
- ⁶⁶ *Antibody-Drug Conjugates: Methods and Protocols*; Tumej, L.N., Ed.; *Meth. Mol. Biol.*; Springer US: New York, NY, 2020; Vol. 2078. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9929-3>.
- ⁶⁷ Pysz, I.; Jackson, P.J.M.; Thurston, D.E. Introduction to antibody–drug conjugates (ADCs). In: *Cytotoxic Payloads for Antibody–Drug Conjugates*; Thurston, D. E., Jackson, P. J. M., Eds.; RSC, **2019**; 1–30. <https://doi.org/10.1039/9781788012898-00001>.
- ⁶⁸ Arlotta, K.J.; Owen, S.C. Antibody and antibody derivatives as cancer therapeutics. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2019**, *11* (5). <https://doi.org/10.1002/wnan.1556>.
- ⁶⁹ Schrama, D.; Reisfeld, R. A.; Becker, J. C. Antibody Targeted Drugs as Cancer Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (2), 147–159. <https://doi.org/10.1038/nrd1957>.
- ⁷⁰ Alley, S.C.; Okeley, N.M.; Senter, P.D. Antibody–drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (4), 529–537. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.170>.
- ⁷¹ Nicolaou, K.C.; Rigol, S. The role of organic synthesis in the emergence and development of antibody–drug conjugates as targeted cancer therapies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (33), 11206–11241. <https://doi.org/10.1002/anie.201903498>.
- ⁷² Bargh, J.D.; Isidro-Llobet, A.; Parker, J.S.; Spring, D.R. Cleavable linkers in antibody–drug conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (16), 4361–4374. <https://doi.org/10.1039/C8CS00676H>.
- ⁷³ Kang, M.S.; Kong, T.W.S.; Khoo, J.Y.X.; Loh, T.-P. Recent developments in chemical conjugation strategies targeting native amino acids in proteins and their applications in antibody–drug conjugates. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (41), 13613–13647. <https://doi.org/10.1039/D1SC02973H>.
- ⁷⁴ Walsh, S.J.; Bargh, J.D.; Dannheim, F.M.; Hanby, A.R.; Seki, H.; Counsell, A.J.; Ou, X.; Fowler, E.; Ashman, N.; Takada, Y.; Isidro-Llobet, A.; Parker, J.S.; Carroll, J.S.; Spring, D.R. Site-selective modification strategies in antibody–drug conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (2), 1305–1353. <https://doi.org/10.1039/D0CS00310G>.
- ⁷⁵ Jin, S.; Sun, Y.; Liang, X.; Gu, X.; Ning, J.; Xu, Y.; Chen, S.; Pan, L. Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Sign. Transduct. Target Ther.* **2022**, *7* (1), 39. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00868-x>.
- ⁷⁶ Fu, Z.; Li, S.; Han, S.; Shi, C.; Zhang, Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Sign. Transduct. Target Ther.* **2022**, *7* (1), 93. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00947-7>.

- ⁷⁷ Sievers, E.L.; Senter, P.D. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64* (1), 15–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050311-201823>.
- ⁷⁸ Kumar, A.; White, J.; James Christie, R.; Dimasi, N.; Gao, C. Antibody-drug conjugates. In: *Annu. Rep. Med. Chem.*; Elsevier, 2017; Vol. 50, pp 441–480. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2017.08.002>.
- ⁷⁹ Chari, R.V.J.; Miller, M.L.; Widdison, W.C. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (15), 3796–3827. <https://doi.org/10.1002/anie.201307628>.
- ⁸⁰ Firer, M.A.; Luboshits, G. Antibody-drug-conjugate therapy for hematological cancers: matching cell biology with clinical benefit. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31* (44), 2100032. <https://doi.org/10.1002/adfm.202100032>.
- ⁸¹ Chudasama, V.; Maruani, A.; Caddick, S. Recent advances in the construction of antibody–drug conjugates. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (2), 114–119. <https://doi.org/10.1038/nchem.2415>.
- ⁸² Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (5), 315–337. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>.
- ⁸³ Ming-Ming Chua; Sao-Tah Fan; Karush, F. Attachment of immunoglobulin to liposomal membrane via protein carbohydrate. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *800* (3), 291–300. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(84\)90408-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(84)90408-2).
- ⁸⁴ Nezlin, R.S.; Sykulev, Y.K. Structural studies of immunoglobulins spin-labeled at the carbohydrate moiety. *Mol. Immunol.* **1982**, *19* (3), 347–356. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(82\)90200-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(82)90200-0).
- ⁸⁵ Tong, J.T.W.; Harris, P.W.R.; Brimble, M.A.; Kaviani, I. An insight into FDA approved antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Molecules* **2021**, *26* (19), 5847. <https://doi.org/10.3390/molecules26195847>.
- ⁸⁶ Breij, E.C.W.; de Goeij, B.E.C.G.; Verploegen, S.; Schuurhuis, D.H.; Amirhosravi, A.; Francis, J.; Miller, V. B.; Houtkamp, M.; Bleeker, W. K.; Satijn, D.; Parren, P. W. H. I. An antibody–drug conjugate that targets tissue factor exhibits potent therapeutic activity against a broad range of solid tumors. *Canc. Research* **2014**, *74* (4), 1214–1226. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2440>.
- ⁸⁷ Francisco, J.A.; Cervený, C.G.; Meyer, D.L.; Mixan, B.J.; Klussman, K.; Chace, D.F.; Rejniak, S.X.; Gordon, K.A.; DeBlanc, R.; Toki, B.E.; Law, C.-L.; Doronina, S.O.; Siegall, C.B.; Senter, P.D.; Wahl, A.F. CAC10-VcMMAE, an Anti-CD30–monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* **2003**, *102* (4), 1458–1465. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0039>.
- ⁸⁸ Gualberto, A. Brentuximab vedotin (SGN-35), an antibody–drug conjugate for the treatment of CD30-positive malignancies. *Exp. Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21* (2), 205–216. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.641532>
- ⁸⁹ Katz, J.; Janik, J.E.; Younes, A. Brentuximab vedotin (SGN-35). *Clin. Canc. Res.* **2011**, *17* (20), 6428–6436. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0488>.

- ⁹⁰ DiJoseph, J.F.; Armellino, D.C.; Boghaert, E.R.; Khandke, K.; Dougher, M.M.; Sridharan, L.; Kunz, A.; Hamann, P. R.; Gorovits, B.; Udata, C.; Moran, J.K.; Popplewell, A.G.; Stephens, S.; Frost, P.; Damle, N.K. Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood* **2004**, *103* (5), 1807–1814. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2466>.
- ⁹¹ Patel, K.C.; Hageman, K.; Cooper, M.R. Ado-trastuzumab emtansine for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2–positive metastatic breast cancer. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **2014**, *71*(1), 537–548. <https://doi.org/10.2146/ajhp130342>.
- ⁹² Stadtmauer, E.A. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* **2002**, *4* (5), 375–380. <https://doi.org/10.1007/s11912-002-0030-2>.
- ⁹³ Tennvall, J.; Fischer, M.; Bischof Delaloye, A.; Bombardieri, E.; Bodei, L.; Giammarile, F.; Lassmann, M.; Oyen, W.; Brans, B. EANM procedure guideline for radio-immunotherapy for B-cell lymphoma with ⁹⁰Y-radiolabelled ibritumomab tiuxetan (Zevalin). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34* (4), 616–622. <https://doi.org/10.1007/s00259-007-0372-y>.
- ⁹⁴ Milenic, D.E.; Brady, E.D.; Brechbiel, M.W. Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (6), 488–499. <https://doi.org/10.1038/nrd1413>.
- ⁹⁵ Deeks, E.D. Polatuzumab vedotin: first global approval. *Drugs* **2019**, *79* (13), 1467–1475. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01175-0>.
- ⁹⁶ Wu, K.-L.; Yu, C.; Lee, C.; Zuo, C.; Ball, Z. T.; Xiao, H. Precision modification of native antibodies. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32* (9), 1947–1959. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00342>.
- ⁹⁷ Cardillo, T.M.; Govindan, S.V.; Sharkey, R.M.; Trisal, P.; Arrojo, R.; Liu, D.; Rossi, E.A.; Chang, C.-H.; Goldenberg, D.M. Sacituzumab govitecan (IMMU-132), an anti-trop-2/SN-38 antibody–drug conjugate: characterization and efficacy in pancreatic, gastric, and other cancers. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (5), 919–931. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00223>.
- ⁹⁸ Weiss, J.; Glode, A.; Messersmith, W.A.; Diamond, J. Sacituzumab govitecan: breakthrough targeted therapy for triple-negative breast cancer. *Exp. Rev. Anticanc. Ther.* **2019**, *19* (8), 673–679. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1654378>.
- ⁹⁹ Gunnoo, S.B.; Madder, A. Bioconjugation – using selective chemistry to enhance the properties of proteins and peptides as therapeutics and carriers. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (34), 8002–8013. <https://doi.org/10.1039/C6OB00808A>.
- ¹⁰⁰ Wang, K.; Wei, G.; Liu, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp. Hematol. Oncol.* **2012**, *1* (1), 36. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-36>.
- ¹⁰¹ Spicer, C.D.; Pashuck, E.T.; Stevens, M.M. Achieving controlled biomolecule–biomaterial conjugation. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (16), 7702–7743. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00253>.
- ¹⁰² O’Shannessy, D.J.; Quarles, R.H. Labeling of the oligosaccharide moieties of immunoglobulins. *J. Immunol. Meth.* **1987**, *99* (2), 153–161. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90120-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90120-7).

- ¹⁰³ Ghose, T.I.; Huntley Blair, A.; Kulkarni, P.N. Preparation of antibody-linked cytotoxic agents. In: *Meth. Enzymol.*; Elsevier, 1983; Vol. 93, pp 280–333. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(83\)93050-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(83)93050-1).
- ¹⁰⁴ Abraham, R.; Moller, D.; Gabel, D.; Senter, P.; Hellström, I.; Hellström, K.E. The influence of periodate oxidation on monoclonal antibody avidity and immunoreactivity. *J. Immunol. Meth.* **1991**, *144* (1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90233-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90233-6).
- ¹⁰⁵ O’Shannessy, D.J.; Dobersen, M.J.; Quarles, R.H. A novel procedure for labeling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties. *Immunol. Lett.* **1984**, *8* (5), 273–277. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(84\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0165-2478(84)90008-7).
- ¹⁰⁶ Rothfus, J.A.; Smith, E.L. Glycopeptides. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238* (4), 1402–1410. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81196-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81196-6).
- ¹⁰⁷ Qasba, P.K. Glycans of antibodies as a specific site for drug conjugation using glycosyltransferases. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (11), 2170–2175. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00173>.
- ¹⁰⁸ Willan, K.J.; Golding, B.; Givol, D.; Dwek, R.A. Specific spin labelling of the Fc region of immunoglobulins. *FEBS Lett.* **1977**, *80* (1), 133–136. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80423-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80423-7).
- ¹⁰⁹ Umaña, P.; Jean-Mairet, J.; Moudry, R.; Amstutz, H.; Bailey, J.E. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (2), 176–180. <https://doi.org/10.1038/6179>.
- ¹¹⁰ Rodwell, J.D.; Alvarez, V.L.; Lee, C.; Lopes, A.D.; Goers, J.W.; King, H.D.; Powsner, H.J.; McKearn, T.J. Site-specific covalent modification of monoclonal antibodies: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83* (8), 2632–2636. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2632>.
- ¹¹¹ Tang, F.; Wang, L.-X.; Huang, W. Chemoenzymatic synthesis of glycoengineered IgG antibodies and glycosite-specific antibody–drug conjugates. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (8), 1702–1721. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.058>.
- ¹¹² Leviatan Ben-Arye, S.; Schneider, C.; Yu, H.; Bashir, S.; Chen, X.; von Gunten, S.; Padler-Karavani, V. Differential recognition of diet-derived Neu5Gc-neoantigens on glycan microarrays by carbohydrate-specific pooled human IgG and IgA antibodies. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (5), 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00273>.
- ¹¹³ Kuroguchi, M.; Mori, M.; Osumi, K.; Tojino, M.; Sugawara, S.; Takashima, S.; Hirose, Y.; Tsukimura, W.; Mizuno, M.; Amano, J.; Matsuda, A.; Tomita, M.; Takayanagi, A.; Shoda, S.-I.; Shirai, T. Glycoengineered monoclonal antibodies with homogeneous glycan (M3, G0, G2, and A2) using a chemoenzymatic approach have different affinities for FcγRIIIa and variable antibody-dependent cellular cytotoxicity activities. *PLoS One* **2015**, *10* (7), e0132848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132848>.
- ¹¹⁴ Lim, S. I. Site-specific bioconjugation and self-assembly technologies for multi-functional biologics: on the road to the clinic. *Drug Discov. Today* **2020**, *25* (1), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.10.002>.

- ¹¹⁵ Shields, R.L.; Lai, J.; Keck, R.; O'Connell, L.Y.; Hong, K.; Meng, Y.G.; Weikert, S.H.A.; Presta, L.G. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (30), 26733–26740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202069200>.
- ¹¹⁶ Qasba, P.K. Correction to glycans of antibodies as a specific site for drug conjugation using glycosyltransferases. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (1), 264–264. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00658>.
- ¹¹⁷ Vattepu, R.; Sneed, S.L.; Anthony, R.M. Sialylation as an important regulator of antibody function. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 818736. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.818736>.
- ¹¹⁸ Varki, A.; Gagneux, P. Multifarious roles of sialic acids in immunity: roles of sialic acids in immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2012**, *1253* (1), 16–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x>.
- ¹¹⁹ Yamane-Ohnuki, N.; Kinoshita, S.; Inoue-Urakubo, M.; Kusunoki, M.; Iida, S.; Nakano, R.; Wakitani, M.; Niwa, R.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Shitara, K.; Satoh, M. Establishment of FUT8 knockout chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87* (5), 614–622. <https://doi.org/10.1002/bit.20151>.
- ¹²⁰ Abbina, S.; Siren, E.M.; Moon, H.; Kizhakkedathu, J. Surface engineering for cell-based therapies: techniques for manipulating mammalian cell surfaces. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4* (11), 3658–3677. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00514>.
- ¹²¹ Hunter, C.D.; Guo, T.; Daskhan, G.; Richards, M.R.; Cairo, C.W. Synthetic strategies for modified glycosphingolipids and their design as probes. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (17), 8188–8241. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00070>.
- ¹²² Wilchek, M.; Bayer, E.A. Labeling glycoconjugates with hydrazide reagents. In: *Meth. Enzymol.*; Elsevier, 1987; Vol. 138, pp 429–442. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)38037-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)38037-1).
- ¹²³ O'Shannessy, D.J. Hydrazido-derivatized supports in affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **1990**, *510*, 13–21. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93734-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93734-3).
- ¹²⁴ Whited, J.; Zhang, X.; Nie, H.; Wang, D.; Li, Y.; Sun, X.-L. Recent chemical biology approaches for profiling cell surface sialylation status. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (9), 2364–2374. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00456>.
- ¹²⁵ Dong, X.; Obermeyer, A.C.; Olsen, B.D. Three-dimensional ordered antibody Arrays through self-assembly of antibody–polymer conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (5), 1273–1277. <https://doi.org/10.1002/anie.201607085>.
- ¹²⁶ Zuberbühler, K.; Casi, G.; Bernardes, G.J.L.; Neri, D. Fucose-specific conjugation of hydrazide derivatives to a vascular-targeting monoclonal antibody in IgG format. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (56), 7100. <https://doi.org/10.1039/c2cc32412a>.
- ¹²⁷ Wolfe, C.A.C.; Hage, D.S. Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate. *Anal. Biochem.* **1995**, *231* (1), 123–130. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1511>.
- ¹²⁸ Kurth, M.; Pelegrin, A.; Rose, K.; Offord, R.E.; Pochon, S.; Mach, J.P.; Buchegger, F. Site-specific conjugation of a radioiodinated phenethylamine derivative to a monoclonal antibody

- results in increased radioactivity localization in tumor. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (9), 1255–1261. <https://doi.org/10.1021/jm00061a017>.
- ¹²⁹ Zhou, Q.; Stefano, J.E.; Manning, C.; Kyazike, J.; Chen, B.; Gianolio, D. A.; Park, A.; Busch, M.; Bird, J.; Zheng, X.; Simonds-Mannes, H.; Kim, J.; Gregory, R. C.; Miller, R. J.; Brondyk, W.H.; Dhal, P.K.; Pan, C.Q. Site-specific antibody–drug conjugation through glycoengineering. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (3), 510–520. <https://doi.org/10.1021/bc400505q>.
- ¹³⁰ Andersen, B.R.; Abele, D.C.; Vannier, W.E. Effects of mild periodate oxidation on antibodies. *J. Immunol.* **1966**, *97* (6), 913–924. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.97.6.913>.
- ¹³¹ Zhu, Z.; Ramakrishnan, B.; Li, J.; Wang, Y.; Feng, Y.; Prabakaran, P.; Colantonio, S.; Dyba, M. A.; Qasba, P.K.; Dimitrov, D.S. Site-specific antibody-drug conjugation through an engineered glycotransferase and a chemically reactive sugar. *mAbs* **2014**, *6* (5), 1190–1200. <https://doi.org/10.4161/mabs.29889>.
- ¹³² Fleminger, G.; Hadas, E.; Wolf, T.; Solomon, B. Oriented immobilization of periodateoxidized monoclonal antibodies on amino and hydrazide derivatives of eupergit C. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *23* (2), 123–137. <https://doi.org/10.1007/BF02798382>.
- ¹³³ Kozlov, I.A.; Melnyk, P.C.; Stromsborg, K.E.; Chee, M.S.; Barker, D.L.; Zhao, C. Efficient strategies for the conjugation of oligonucleotides to antibodies enabling highly sensitive protein detection. *Biopolymers* **2004**, *73* (5), 621–630. <https://doi.org/10.1002/bip.20009>.
- ¹³⁴ Xue, T.; Sheng, A.; Mao, D.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Zhang, J. DNAzyme-based colorimetric assay and its application for lipopolysaccharide analysis assisted by oxime chemistry. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *189*, 113379. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113379>.
- ¹³⁵ Inglis, A.S.; Rivett, D.E.; McMahon, D.T. W. The identification of tryptophan residues in proteins as oxidised derivatives during amino acid sequence determinations. *FEBS Lett.* **1979**, *104* (1), 115–118. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81095-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81095-9).
- ¹³⁶ Clamp, J.; Hough, L. The periodate oxidation of amino acids with reference to studies on glycoproteins. *Biochem. J.* **1965**, *94* (1), 17–24. <https://doi.org/10.1042/bj0940017>.
- ¹³⁷ Robinson, G.M.; Smyth, M.R. Simultaneous determination of products and intermediates of L-dopa oxidation using capillary electrophoresis with diode-array detection. *Analyst* **1997**, *122* (8), 797–802. <https://doi.org/10.1039/a701844d>.
- ¹³⁸ Hsuan, J.J. The cross-linking of tyrosine residues in apo-ovotransferrin by treatment with periodate anions. *Biochem. J.* **1987**, *247* (2), 467–473. <https://doi.org/10.1042/bj2470467>.
- ¹³⁹ Stadtman, E.R. Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. In: *Meth. Enzymol.* Elsevier, 1995; Vol. 258, pp 379–393. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)58057-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)58057-3).
- ¹⁴⁰ Burzio, L.A. Reactivity of peptidyl-tyrosine to hydroxylation and cross-linking. *Prot. Sci.* **2001**, *10* (4), 735–740. <https://doi.org/10.1110/ps.44201>.
- ¹⁴¹ Yamasaki, R.B.; Osuga, D.T.; Feeney, R.E. Periodate oxidation of methionine in proteins. *Anal. Biochem.* **1982**, *126* (1), 183–189. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90127-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90127-0).

- ¹⁴² Hageman, T.; Wei, H.; Kuehne, P.; Fu, J.; Ludwig, R.; Tao, L.; Leone, A.; Zocher, M.; Das, T.K. Impact of tryptophan oxidation in complementarity-determining regions of two monoclonal antibodies on structure-function characterized by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry and surface plasmon resonance. *Pharm. Res.* **2019**, *36* (1), 24. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2545-8>.
- ¹⁴³ O'Shannessy, D.J.; Dobersen, M.J.; Quarles, R.H. A novel procedure for labeling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties. *Immunol. Lett.* **1984**, *8* (5), 273–277. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(84\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0165-2478(84)90008-7).
- ¹⁴⁴ McDonnell, K.A.; Low, S.C.; Hoehn, T.; Donnelly, R.; Palmieri, H.; Fraley, C.; Sakorafas, P.; Mezo, A.R. Synthesis and structure–activity relationships of dimeric peptide antagonists of the human immunoglobulin G–human neonatal Fc receptor (IgG–FcRn) interaction. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (4), 1587–1596. <https://doi.org/10.1021/jm901128z>.
- ¹⁴⁵ Bartheldyová, E.; Effenberg, R.; Mašek, J.; Procházka, L.; Knötigová, P. T.; Kulich, P.; Hubatka, F.; Velínská, K.; Zelničková, J.; Zouharová, D.; Fojtíková, M.; Hřebík, D.; Plevka, P.; Mikulík, R.; Miller, A. D.; Macaulay, S.; Zyka, D.; Drož, L.; Raška, M.; Ledvina, M.; Turánek, J. Hyaluronic acid surface modified liposomes prepared via orthogonal aminoxy coupling: synthesis of nontoxic aminoxylipids based on symmetrically α -branched fatty acids, preparation of liposomes by microfluidic mixing, and targeting to cancer cells expressing CD44. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29* (7), 2343–2356. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00311>.
- ¹⁴⁶ Nakane, P.K.; Kawaoi, A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **1974**, *22* (12), 1084–1091. <https://doi.org/10.1177/22.12.1084>.
- ¹⁴⁷ Hurwitz, E.; Levy, R.; Maron, R.; Wilchek, M.; Arnon, R.; Sela, M. The covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies, with retention of both drug and antibody activities. *Cancer Res.* **1975**, *35* (5), 1175–1181. <https://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/35/5/1175/2394079/cr0350051175.pdf>
- ¹⁴⁸ Fischer-Durand, N.; Salmain, M.; Vessières, A.; Jaouen, G. A new bioorthogonal cross-linker with alkyne and hydrazide end groups for chemoselective ligation. Application to antibody labelling. *Tetrahedron* **2012**, *68* (47), 9638–9644. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.09.062>.
- ¹⁴⁹ Hoffman, W.L.; O'Shannessy, D.J. Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports. *J. Immunol. Meth.* **1988**, *112* (1), 113–120. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90041-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90041-5).
- ¹⁵⁰ Quarles R.H., W. L.; O'Shannessy, D. J. Specific conjugation reactions of the oligosaccharide moieties of immunoglobulins. *J. Appl. Biochem.* **1985**, *7* (4-5), 347–355. PMID: 3912370
- ¹⁵¹ Pfeiffer, F.; Tolle, F.; Rosenthal, M.; Brändle, G. M.; Ewers, J.; Mayer, G. Identification and characterization of nucleobase-modified aptamers by click-SELEX. *Nat. Protoc.* **2018**, *13* (5), 1153–1180. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.023>.
- ¹⁵² Zhong, X.; D'Antona, A. M.; Scarcelli, J. J.; Rouse, J. C. New opportunities in glycan engineering for therapeutic proteins. *Antibodies* **2022**, *11* (1), 5. <https://doi.org/10.3390/antib11010005>.
- ¹⁵³ O'Shannessy, D.J. Hydrazido-derivatized supports in affinity chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1990**, *510*, 13–21. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93734-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93734-3).

- ¹⁵⁴ O'Shannessy, D.J.; Quarles, R.H. Specific conjugation reactions of the oligosaccharide moieties of immunoglobulins. *J. Appl. Biochem.* **1985**, *7* (4–5), 347–355.
- ¹⁵⁵ Fleminger, G.; Solomon, B.; Wolf, T.; Hadas, E. Single step oxidative binding of antibodies to hydrazide-modified eupergit C. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *26* (3), 231–238. <https://doi.org/10.1007/BF02921504>.
- ¹⁵⁶ Ruhn, P.F.; Garver, S.; Hage, D.S. Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **1994**, *669* (1–2), 9–19. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80332-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80332-3).
- ¹⁵⁷ Thompson, P.; Bezabeh, B.; Fleming, R.; Pruitt, M.; Mao, S.; Strout, P.; Chen, C.; Cho, S.; Zhong, H.; Wu, H.; Gao, C.; Dimasi, N. Hydrolytically stable site-specific conjugation at the N-terminus of an engineered antibody. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (10), 2085–2096. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00355>.
- ¹⁵⁸ Scheck, R.A.; Francis, M.B. Regioselective labeling of antibodies through N-terminal transamination. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2* (4), 247–251. <https://doi.org/10.1021/cb6003959>.
- ¹⁵⁹ Netirojjanakul, C.; Witus, L.S.; Behrens, C.R.; Weng, C.-H.; Iavarone, A.T.; Francis, M.B. Synthetically modified Fc domains as building blocks for immunotherapy applications. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (1), 266–272. <https://doi.org/10.1039/C2SC21365F>.
- ¹⁶⁰ Witus, L.S.; Netirojjanakul, C.; Palla, K.S.; Muehl, E.M.; Weng, C.-H.; Iavarone, A.T.; Francis, M.B. Site-specific protein transamination using N-methylpyridinium-4-carboxaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (45), 17223–17229. <https://doi.org/10.1021/ja408868a>.
- ¹⁶¹ Witus, L.S.; Francis, M. Site-specific protein bioconjugation via a pyridoxal 5'-phosphate-mediated N-terminal transamination reaction. *Curr. Prot. Chem. Biol.* **2010**, *2* (2), 125–134. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch100018>.
- ¹⁶² Zhang, Z.; Shah, B.; Richardson, J. Impact of Fc N-glycan sialylation on IgG structure. *mAbs* **2019**, *11* (8), 1381–1390. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1655377>.
- ¹⁶³ Schauer, R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. In: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*; Elsevier, 1982; Vol. 40, pp 131–234. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60109-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60109-2).
- ¹⁶⁴ Haxho, F.; Neufeld, R.J.; Szewczuk, M.R. Neuraminidase-1: a novel therapeutic target in multistage tumorigenesis. *Oncotarget* **2016**, *7* (26), 40860–40881. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8396>.
- ¹⁶⁵ Mindt, T. L.; Jungi, V.; Wyss, S.; Friedli, A.; Pla, G.; Novak-Hofer, I.; Grünberg, J.; Schibli, R. Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (1), 271–278. <https://doi.org/10.1021/bc700306n>.
- ¹⁶⁶ Kahl, B.; Hamadani, M.; Caimi, P.F.; Reid, E.G.; Havenith, K.; He, S.; Feingold, J.M.; O'Connor, O.A. First clinical results of ADCT-402, a novel pyrrolbenzodiazepine-based antibody drug conjugate (ADC), in relapsed/refractory B-cell lineage NHL. *Hematol. Oncol.* **2017**, *35*, 49–51. https://doi.org/10.1002/hon.2437_33.

- ¹⁶⁷ Dennler, P.; Chiotellis, A.; Fischer, E.; Brégeon, D.; Belmant, C.; Gauthier, L.; Lhospice, F.; Romagne, F.; Schibli, R. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody–drug conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (3), 569–578. <https://doi.org/10.1021/bc400574z>.
- ¹⁶⁸ Dennler, P.; Schibli, R.; Fischer, E. Enzymatic antibody modification by bacterial transglutaminase. In: *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; *Meth. Mol. Biol.*; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 1045, pp 205–215. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-541-5_12.
- ¹⁶⁹ Yamazaki, C.M.; Yamaguchi, A.; Anami, Y.; Xiong, W.; Otani, Y.; Lee, J.; Ueno, N.T.; Zhang, N.; An, Z.; Tsuchikama, K. Antibody-drug conjugates with dual payloads for combating breast tumor heterogeneity and drug resistance. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 3528. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23793-7>.
- ¹⁷⁰ Anami, Y.; Yamazaki, C. M.; Xiong, W.; Gui, X.; Zhang, N.; An, Z.; Tsuchikama, K. Glutamic acid–valine–citrulline linkers ensure stability and efficacy of antibody–drug conjugates in mice. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 2512. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04982-3>.
- ¹⁷¹ Anami, Y.; Xiong, W.; Gui, X.; Deng, M.; Zhang, C. C.; Zhang, N.; An, Z.; Tsuchikama, K. Enzymatic conjugation using branched linkers for constructing homogeneous antibody–drug conjugates with high potency. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (26), 5635–5642. <https://doi.org/10.1039/C7OB01027C>.
- ¹⁷² Anami, Y.; Otani, Y.; Xiong, W.; Ha, S.Y.Y.; Yamaguchi, A.; Rivera-Caraballo, K. A.; Zhang, N.; An, Z.; Kaur, B.; Tsuchikama, K. Homogeneity of antibody-drug conjugates critically impacts the therapeutic efficacy in brain tumors. *Cell Rep.* **2022**, *39* (8), 110839. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110839>.
- ¹⁷³ Anami, Y.; Deng, M.; Gui, X.; Yamaguchi, A.; Yamazaki, C.M.; Zhang, N.; Zhang, C.C.; An, Z.; Tsuchikama, K. LILRB4-targeting antibody–drug conjugates for the treatment of acute myeloid leukemia. *Mol. Canc. Ther.* **2020**, *19* (11), 2330–2339. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0407>.
- ¹⁷⁴ Yamaguchi, A.; Anami, Y.; Ha, S.Y.Y.; Roeder, T.J.; Xiong, W.; Lee, J.; Ueno, N.T.; Zhang, N.; An, Z.; Tsuchikama, K. Chemical generation of small molecule-based bispecific antibody-drug conjugates for broadening the target scope. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *32*, 116013. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116013>.
- ¹⁷⁵ Chio, T.I.; Demestichas, B.R.; Brems, B.M.; Bane, S.L.; Tumey, L.N. Expanding the versatility of microbial transglutaminase using α -effect nucleophiles as noncanonical substrates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (33), 13814–13820. <https://doi.org/10.1002/anie.202001830>.
- ¹⁷⁶ Wang, L.; Brock, A.; Herberich, B.; Schultz, P.G. Expanding the genetic code of *Escherichia Coli*. *Science* **2001**, *292* (5516), 498–500. <https://doi.org/10.1126/science.1060077>.
- ¹⁷⁷ Young, D.D.; Schultz, P.G. Playing with the molecules of life. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (4), 854–870. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00974>.
- ¹⁷⁸ Hallam, T.J.; Smider, V.V. Unnatural amino acids in novel antibody conjugates. *Future Med. Chem.* **2014**, *6* (11), 1309–1324. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.79>.

- ¹⁷⁹ Evans, E.G.B.; Millhauser, G.L. Genetic incorporation of the unnatural amino acid *p*-acetyl phenylalanine into proteins for site-directed spin labeling. In: *Meth. Enzymol.*; Elsevier, 2015; Vol. 563, pp 503–527. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.06.008>.
- ¹⁸⁰ Palei, S.; Mootz, H.D. Cyclic peptides made by linking synthetic and genetically encoded fragments. *ChemBioChem* **2016**, *17* (5), 378–382. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500673>.
- ¹⁸¹ Costa, S.A.; Mozhdehi, D.; Dzuricky, M.J.; Isaacs, F.J.; Brustad, E.M.; Chilkoti, A. Active targeting of cancer cells by nanobody decorated polypeptide micelle with bio-orthogonally conjugated drug. *Nano Lett.* **2019**, *19* (1), 247–254. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b03837>.
- ¹⁸² Tian, F.; Lu, Y.; Manibusan, A.; Sellers, A.; Tran, H.; Sun, Y.; Phuong, T.; Barnett, R.; Hehli, B.; Song, F.; DeGuzman, M. J.; Ensari, S.; Pinkstaff, J. K.; Sullivan, L. M.; Biroc, S. L.; Cho, H.; Schultz, P. G.; DiJoseph, J.; Dougher, M.; Ma, D.; Dushin, R.; Leal, M.; Tchistiakova, L.; Feyfant, E.; Gerber, H.-P.; Sapra, P. A general approach to site-specific antibody drug conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111* (5), 1766–1771. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321237111>.
- ¹⁸³ Matos, M.J.; Brown, L.; Bernardim, B.; Guerreiro, A.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G.J.L. Sequential dual site-selective protein labelling enabled by lysine modification. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28* (22), 115783. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115783>.
- ¹⁸⁴ Kazane, S.A.; Sok, D.; Cho, E.H.; Uson, M.L.; Kuhn, P.; Schultz, P.G.; Smider, V.V. Site-specific DNA-antibody conjugates for specific and sensitive immuno-PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (10), 3731–3736. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120682109>.
- ¹⁸⁵ Wold, E.D.; McBride, R.; Axup, J.Y.; Kazane, S.A.; Smider, V.V. Antibody microarrays utilizing site-specific antibody–oligonucleotide conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (5), 807–811. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00111>.
- ¹⁸⁶ Zhang, L.; Wang, Z.; Wang, Z.; Luo, F.; Guan, M.; Xu, M.; Li, Y.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Wang, W. A simple and efficient method to generate dual site-specific conjugation ADCs with cysteine residue and an unnatural amino acid. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32* (6), 1094–1104. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00134>.
- ¹⁸⁷ Guthrie, Q.A.E.; Proulx, C. Oxime ligation via in situ oxidation of *N*-phenylglycinyll peptides. *Org. Lett.* **2018**, *20* (9), 2564–2567. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00713>.
- ¹⁸⁸ Tharp, J.M.; Vargas-Rodriguez, O.; Schepartz, A.; Söll, D. Genetic encoding of three distinct noncanonical amino acids using reprogrammed initiator and nonsense codons. *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16* (4), 766–774. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00120>.
- ¹⁸⁹ Yao, H.; Jiang, F.; Lu, A.; Zhang, G. Methods to design and synthesize antibody-drug conjugates (ADCs). *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2), 194. <https://doi.org/10.3390/ijms17020194>.
- ¹⁹⁰ Van Berkel, S.S.; van Delft, F.L. Enzymatic strategies for (near) clinical development of antibody-drug conjugates. *Drug Discovery Today: Technol.* **2018**, *30*, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.09.005>.
- ¹⁹¹ Axup, J.Y.; Bajjuri, K.M.; Ritland, M.; Hutchins, B.M.; Kim, C.H.; Kazane, S.A.; Halder, R.; Forsyth, J.S.; Santidrian, A.F.; Stafin, K.; Lu, Y.; Tran, H.; Seller, A.J.; Biroc, S.L.; Szydluk, A.; Pinkstaff, J.K.; Tian, F.; Sinha, S.C.; Felding-Habermann, B.; Smider, V.V.; Schultz, P.G.

- Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (40), 16101–16106. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211023109>.
- ¹⁹² Kazane, S.A.; Axup, J. .; Kim, C.H.; Ciobanu, M.; Wold, E.D.; Barluenga, S.; Hutchins, B. A.; Schultz, P.G.; Winssinger, N.; Smider, V.V. Self-assembled antibody multimers through peptide nucleic acid conjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (1), 340–346. <https://doi.org/10.1021/ja309505c>.
- ¹⁹³ Kim, C.H.; Axup, J.Y.; Lawson, B.R.; Yun, H.; Tardif, V.; Choi, S.H.; Zhou, Q.; Dubrovskaya, A.; Biroc, S.L.; Marsden, R.; Pinstaff, J.; Smider, V.V.; Schultz, P.G. Bispecific small molecule–antibody conjugate targeting prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110* (44), 17796–17801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316026110>.
- ¹⁹⁴ Kularatne, S.A.; Deshmukh, V.; Ma, J.; Tardif, V.; Lim, R.K.V.; Pugh, H.M.; Sun, Y.; Manibusan, A.; Sellers, A.J.; Barnett, R.S.; Srinagesh, S.; Forsyth, J.S.; Hassenpflug, W.; Tian, F.; Javahishvili, T.; Felding-Habermann, B.; Lawson, B.R.; Kazane, S.A.; Schultz, P.G. A CXCR4-targeted site-specific antibody-drug conjugate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (44), 11863–11867. <https://doi.org/10.1002/anie.201408103>.
- ¹⁹⁵ Bi, X.; Pasunooti, K.K.; Lescar, J.; Liu, C.-F. Thiazolidine-masked α -oxo aldehyde functionality for peptide and protein modification. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (2), 325–329. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00667>.
- ¹⁹⁶ Bi, X.; Yin, J.; Rao, C.; Balamkundu, S.; Banerjee, B.; Zhang, D.; Zhang, D.; Dedon, P.C.; Liu, C.-F. Thiazolidin-5-imine formation as a catalyst-free bioorthogonal reaction for protein and live cell labeling. *Org. Lett.* **2018**, *20* (24), 7790–7793. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03195>.
- ¹⁹⁷ Brabham, R.L.; Keenan, T.; Husken, A.; Bilsborrow, J.; McBerney, R.; Kumar, V.; Turnbull, W.B.; Fascione, M.A. Rapid sodium periodate cleavage of an unnatural amino acid enables unmasking of a highly reactive α -oxo aldehyde for protein bioconjugation. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18* (21), 4000–4003. <https://doi.org/10.1039/D0OB00972E>.
- ¹⁹⁸ Drake, P.M.; Albers, A.E.; Baker, J.; Banas, S.; Barfield, R.M.; Bhat, A.S.; de Hart, G.W.; Garofalo, A.W.; Holder, P.; Jones, L.C.; Kudirka, R.; McFarland, J.; Zmolek, W.; Rabuka, D. Aldehyde tag coupled with HIPS chemistry enables the production of ADCs conjugated site-specifically to different antibody regions with distinct *in vivo* efficacy and PKA outcomes. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (7), 1331–1341. <https://doi.org/10.1021/bc500189z>.
- ¹⁹⁹ Dickgiesser, S.; Rasche, N.; Nasu, D.; Middel, S.; Hörner, S.; Avrutina, O.; Diederichsen, U.; Kolmar, H. Self-assembled hybrid aptamer-Fc conjugates for targeted delivery: a modular chemoenzymatic approach. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (9), 2158–2165. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00315>.
- ²⁰⁰ Kudirka, R.A.; Barfield, R.M.; McFarland, J.M.; Drake, P.M.; Carlson, A.; Bañas, S.; Zmolek, W.; Garofalo, A.W.; Rabuka, D. Site-specific tandem Knoevenagel condensation–Michael addition to generate antibody–drug conjugates. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (11), 994–998. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00253>.
- ²⁰¹ Yao, H.; Jiang, F.; Lu, A.; Zhang, G. Methods to design and synthesize antibody-drug conjugates (ADCs). *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (2), 194. <https://doi.org/10.3390/ijms17020194>.

- ²⁰² Rosa, L.D. Labeling of VEGFR1D2 through oxime ligation. *Bioorg. Chem.* **2019**, *91*, 103160. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103160>.
- ²⁰³ Falsey, J.R.; Renil, M.; Park, S.; Li, S.; Lam, K.S. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12* (3), 346–353. <https://doi.org/10.1021/bc000141q>.
- ²⁰⁴ Iskandar, S.E.; Haberman, V.A.; Bowers, A.A. Expanding the chemical diversity of genetically encoded libraries. *ACS Comb. Sci.* **2020**, *22* (12), 712–733. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.0c00179>.
- ²⁰⁵ Bilodeau, D.A.; Margison, K.D.; Serhan, M.; Pezacki, J.P. Bioorthogonal reactions utilizing nitrones as versatile dipoles in cycloaddition reactions. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (12), 6699–6717. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00832>.
- ²⁰⁶ Ulrich, S.; Boturyn, D.; Marra, A.; Renaudet, O.; Dumy, P. Oxime ligation: a chemoselective click-type reaction for accessing multifunctional biomolecular constructs. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (1), 34–41. <https://doi.org/10.1002/chem.201302426>.
- ²⁰⁷ Maza, J.C.; Ramsey, A.V.; Mehare, M.; Krska, S.W.; Parish, C.A.; Francis, M.B. Secondary modification of oxidatively-modified proline N-termini for the construction of complex bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18* (10), 1881–1885. <https://doi.org/10.1039/D0OB00211A>.
- ²⁰⁸ Li, T.; DiLillo, D.J.; Bournazos, S.; Giddens, J.P.; Ravetch, J.V.; Wang, L.-X. Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114* (13), 3485–3490. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702173114>.
- ²⁰⁹ Li, T.; Tong, X.; Yang, Q.; Giddens, J.P.; Wang, L.-X. Glycosynthase mutants of endoglycosidase S2 show potent transglycosylation activity and remarkably relaxed substrate specificity for antibody glycosylation remodeling. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (32), 16508–16518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738765>.
- ²¹⁰ Fairbanks, A.J. Synthetic and semi-synthetic approaches to unprotected *N*-glycan oxazolines. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 416–429. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.30>.
- ²¹¹ Tong, X.; Li, T.; Orwenyo, J.; Toonstra, C.; Wang, L.-X. One-pot enzymatic glycan remodeling of a therapeutic monoclonal antibody by endoglycosidase S (endo-S) from *Streptococcus pyogenes*. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (7), 1347–1355. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.053>.
- ²¹² Giddens, J.P.; Lomino, J.V.; DiLillo, D.J.; Ravetch, J.V.; Wang, L.-X. Site-selective chemoenzymatic glycoengineering of Fab and Fc glycans of a therapeutic antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115* (47), 12023–12027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812833115>.
- ²¹³ Haneda, K.; Inazu, T.; Yamamoto, K.; Kumagai, H.; Nakahara, Y.; Kobata, A. Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of glycopeptides by *Mucor hiemalis* endo- β -N-acetylglucosaminidase. *Carbohydr. Res.* **1996**, *292*, 61–70. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)91025-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)91025-3).
- ²¹⁴ Kadowaki, S.; Yamamoto, K.; Fujisaki, M.; Izumi, K.; Tochikura, T.; Yokoyama, T. Purification and characterization of a novel fungal endo- β -N-acetylglucosaminidase acting on

- complex oligosaccharides of glycoproteins. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54* (1), 97–106. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.54.97>.
- ²¹⁵ Yamamoto, K. Chemo-enzymatic synthesis of bioactive glycopeptide using microbial endoglycosidase. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *92* (6), 493–501. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80307-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80307-8).
- ²¹⁶ Mizuno, M.; Muramoto, I.; Kawakami, T.; Seike, M.; Aimoto, S.; Haneda, K.; Inazu, T. A synthesis of a glycopeptide analogue of eel calcitonin. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (1–2), 55–58. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)10487-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10487-7).
- ²¹⁷ Le, N.P.L.; Bowden, T.A.; Struwe, W.B.; Crispin, M. Immune recruitment or suppression by glycan engineering of endogenous and therapeutic antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1860* (8), 1655–1668. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.04.016>.
- ²¹⁸ Wang, L.-X.; Tong, X.; Li, C.; Giddens, J.P.; Li, T. Glycoengineering of antibodies for modulating functions. *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88* (1), 433–459. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012911>.
- ²¹⁹ Griffin, M.E.; Hsieh-Wilson, L.C. Glycan engineering for cell and developmental biology. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (1), 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.12.007>.
- ²²⁰ Wang, L.-X.; Lomino, J.V. Emerging technologies for making glycan-defined glycoproteins. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (1), 110–122. <https://doi.org/10.1021/cb200429n>.
- ²²¹ Faridoon, F.; Shi, W.; Qin, K.; Tang, Y.; Li, M.; Guan, D.; Tian, X.; Jiang, B.; Dong, J.; Tang, F.; Huang, W. New linker structures applied in glycosite-specific antibody drug conjugates. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6* (17), 3144–3149. <https://doi.org/10.1039/C9QO00646J>.
- ²²² Smith, E.L.; Giddens, J.P.; Iavarone, A.T.; Godula, K.; Wang, L.-X.; Bertozzi, C.R. Chemoenzymatic Fc glycosylation via Engineered aldehyde tags. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (4), 788–795. <https://doi.org/10.1021/bc500061s>.
- ²²³ Min, B.; Jin, J.; Kim, H.; Her, N.-G.; Park, C.; Kim, D.; Yang, J.; Hwang, J.; Kim, E.; Choi, M.; Song, H.Y.; Nam, D.-H.; Yoon, Y. CIRCRC201-DPBD, a novel pyrrolobenzodiazepine dimer-containing site-specific antibody–drug conjugate targeting c-Met overexpression tumors. *ACS Omega* **2020**, *5* (40), 25798–25809. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03102>.
- ²²⁴ Shin, S.H.; Park, Y.; Park, S.S.; Ju, E.J.; Park, J.; Ko, E.J.; Bae, D.J.; Kim, S.; Chung, C.; Song, H.Y.; Jang, S.J.; Jeong, S.; Song, S.Y.; Choi, E.K. An elaborate new linker system significantly enhances the efficacy of an HER2-antibody-drug conjugate against refractory HER2-positive cancers. *Adv. Sci.* **2021**, *8* (23), 2102414. <https://doi.org/10.1002/advs.202102414>.
- ²²⁵ Kim, C.H.; Axup, J.Y.; Dubrovskaya, A.; Kazane, S.A.; Hutchins, B.A.; Wold, E.D.; Smider, V.V.; Schultz, P.G. Synthesis of bispecific antibodies using genetically encoded unnatural amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (24), 9918–9921. <https://doi.org/10.1021/ja303904e>.
- ²²⁶ Lyu, Z.; Kang, L.; Buuh, Z. Y.; Jiang, D.; McGuth, J. C.; Du, J.; Wissler, H.L.; Cai, W.; Wang, R.E. A switchable site-specific antibody conjugate. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (4), 958–964. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00107>.

- ²²⁷ Snyder, J.T.; Malinao, M.-C.; Dugal-Tessier, J.; Atkinson, J.E.; Anand, B.S.; Okada, A.; Mendelsohn, B.A. Metabolism of an oxime-linked antibody drug conjugate, AGS62P1, and characterization of its identified metabolite. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15* (6), 2384–2390. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00225>.
- ²²⁸ Kularatne, S.A.; Deshmukh, V.; Gymnopoulos, M.; Biroc, S.L.; Xia, J.; Srinagesh, S.; Sun, Y.; Zou, N.; Shimazu, M.; Pinkstaff, J.; Ensari, S.; Knudsen, N.; Manibusan, A.; Axup, J.Y.; Kim, C.H.; Smider, V.V.; Javahishvili, T.; Schultz, P.G. Recruiting cytotoxic T cells to folate-receptor-positive cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (46), 12101–12104. <https://doi.org/10.1002/anie.201306866>.
- ²²⁹ Lim, R.K.V.; Yu, S.; Cheng, B.; Li, S.; Kim, N.-J.; Cao, Y.; Chi, V.; Kim, J. Y.; Chatterjee, A.K.; Schultz, P.G.; Tremblay, M.S.; Kazane, S.A. Targeted delivery of LXR agonist using a site-specific antibody–drug conjugate. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (11), 2216–2222. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00203>.
- ²³⁰ Dovgan, I.; Koniev, O.; Kolodych, S.; Wagner, A. Antibody–oligonucleotide conjugates as therapeutic, imaging, and detection agents. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (10), 2483–2501. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00306>.
- ²³¹ Lehmann, F.; Marchand, M.; Hainaut, P.; Pouillart, P.; Sastre, X.; Ikeda, H.; Boon, T.; Coulie, P. G. Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. *Eur. J. Immunol.* **1995**, *25* (2), 340–347. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250206>.
- ²³² Ikeda, H.; Lethé, B.; Lehmann, F.; Van Baren, N.; Baurain, J.-F.; De Smet, C.; Chambost, H.; Vitale, M.; Moretta, A.; Boon, T.; Coulie, P.G. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* **1997**, *6* (2), 199–208. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80426-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80426-4).
- ²³³ Kaczorowski, M.; Chłopek, M.; Kruczak, A.; Ryś, J.; Lasota, J.; Miettinen, M. PRAME expression in cancer. A systematic immunohistochemical study of >5800 epithelial and nonepithelial tumors. *Am. J. Sur. Pathol.* **2022**, *46* (11), 1467–1476. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001944>.
- ²³⁴ Chen, X.; Jiang, M.; Zhou, S.; Chen, H.; Song, G.; Wu, Y.; Zhu, X. PRAME promotes cervical cancer proliferation and migration via Wnt/ β -catenin pathway regulation. *Cancers* **2023**, *15* (6), 1801. <https://doi.org/10.3390/cancers15061801>.
- ²³⁵ Coppock, J.D.; Gradecki, S.E.; Mills, A.M. PRAME expression in endometrioid and serous endometrial carcinoma: a potential immunotherapeutic target and possible diagnostic pitfall. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2023**, *42* (1), 35–42. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000864>.
- ²³⁶ Jahangirian, E.; Zargan, J.; Rabbani, H.; Zamani, J. Investigating the inhibitory and penetrating properties of three novel anticancer and antimicrobial scorpion peptides via molecular docking and molecular dynamic simulation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2023**, *in press*. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2188956>.
- ²³⁷ Yu, L.; Cao, H.; Yang, J.-W.; Meng, W.-X.; Yang, C.; Wang, J.-T.; Yu, M.-M.; Wang, B.-S. HDAC5-mediated PRAME regulates the proliferation, migration, invasion, and EMT of laryngeal squamous cell carcinoma via the PI3K/AKT/MTOR signaling pathway. *Open Medicine* **2023**, *18* (1), 20230665. <https://doi.org/10.1515/med-2023-0665>.

- ²³⁸ Thomsen, I.M.N.; Heerfordt, I.M.; Karmisholt, K.E.; Mogensen, M. Detection of cutaneous malignant melanoma by tape stripping of pigmented skin lesions – a systematic review. *Skin Res. Technol.* **2023**, *29* (3), e13286. <https://doi.org/10.1111/srt.13286>.
- ²³⁹ Kunc, M.; Żemierowska, N.; Skowronek, F.; Biernat, W. Diagnostic test accuracy meta-analysis of PRAME in distinguishing primary cutaneous melanomas from benign melanocytic lesions. *Histopathology* **2023**, *in press*. <https://doi.org/10.1111/his.14904>.
- ²⁴⁰ Fernandez-Flores, A.; Singh, R.; Cassarino, D.S. Top 10 differential diagnoses for desmoplastic melanoma. *Head Neck Pathol.* **2023**, *17* (1), 143–153. <https://doi.org/10.1007/s12105-023-01536-y>.
- ²⁴¹ Ricci, C.; Altavilla, M.V.; Corti, B.; Pasquini, E.; Presutti, L.; Baietti, A. M.; Amorosa, L.; Balbi, T.; Baldovini, C.; Ambrosi, F.; Grillini, M.; D’Errico, A.; Fiorentino, M.; Foschini, M. P. PRAME expression in mucosal melanoma of the head and neck region. *Am. J. Surg. Pathol.* **2023**, *in press*. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000002032>.
- ²⁴² Miao, Q.; Zang, J.; Shao, X.-B.; Sun, J.; Chen, Y.-P.; Chen, H. Analysis of PRAME immunocytochemistry in 109 acral malignant melanoma in situ. *J. Clin. Pathol.* **2023**, *in press*. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208697>.
- ²⁴³ Mudhar, H.S.; Milman, T.; Stevenson, S.; Watson, M.; Kim, J.; Magan, T.; Salvi, S.M.; Harley, U.; Lally, S.E.; Shields, C.L. PRAME expression by immunohistochemistry and reverse transcription quantitative PCR in conjunctival melanocytic lesions—a comprehensive clinicopathologic study of 202 cases and correlation of cytogenetics with PRAME Expression in challenging conjunctival melanocytic lesions. *Human Pathol.* **2023**, *134*, *in press*. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2023.02.002>.
- ²⁴⁴ Roy, S.F.; Panse, G.; McNiff, J.M. PRAME immunohistochemistry can distinguish melanocytic pseudonests of lichenoid reactions from melanoma in situ. *J. Cutan. Pathol.* **2023**, *in press*. <https://doi.org/10.1111/cup.14407>.
- ²⁴⁵ Fernandez-Flores, A. Conceptos modernos en tumores melanocíticos. *Actas Dermo-Sifiliográficas* **2023**, *in press*. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2023.01.001>.
- ²⁴⁶ Jung, J.M.; Lee, M.Y.; Won, C.H.; Chang, S.E.; Lee, M.W.; Lee, W.J. Performance of PRAME immunohistochemistry compared with that of C-Kit, C-Myc, or cyclin D1 for the diagnosis of acral melanocytic tumors. *Pathol. Internat.* **2023**, *73* (1), 27–36. <https://doi.org/10.1111/pin.13292>.
- ²⁴⁷ Schmitt, T.A.; Lee, J.C.; Martinka, M.; Ko, K.Y.C. PRAME immunohistochemistry is useful in differentiating oral melanomas from nevi and melanotic macules. *J. Cutan. Pathol.* **2023**, *50* (3), 275–278. <https://doi.org/10.1111/cup.14361>.
- ²⁴⁸ Chen, Y.; Zhang, W.; Qiu, Y.; Ke, L.; Chen, H.; Chen, G. PRAME is a useful marker for the differential diagnosis of melanocytic tumours and histological mimics. *Histopathology* **2023**, *82* (2), 285–295. <https://doi.org/10.1111/his.14814>.
- ²⁴⁹ Dang, L.T.; Rybak, I.; Lyu, Y.; Konia, T.; Fung, M.A.; Qi, L.; Kiuru, M. The influence of PRAME immunohistochemistry on the diagnosis, diagnostic confidence and treatment recommendation by dermatopathologists: a single institution prospective survey-based study. *Acad. Dermatol. Venereol.* **2023**, *37* (1). <https://doi.org/10.1111/jdv.18536>.

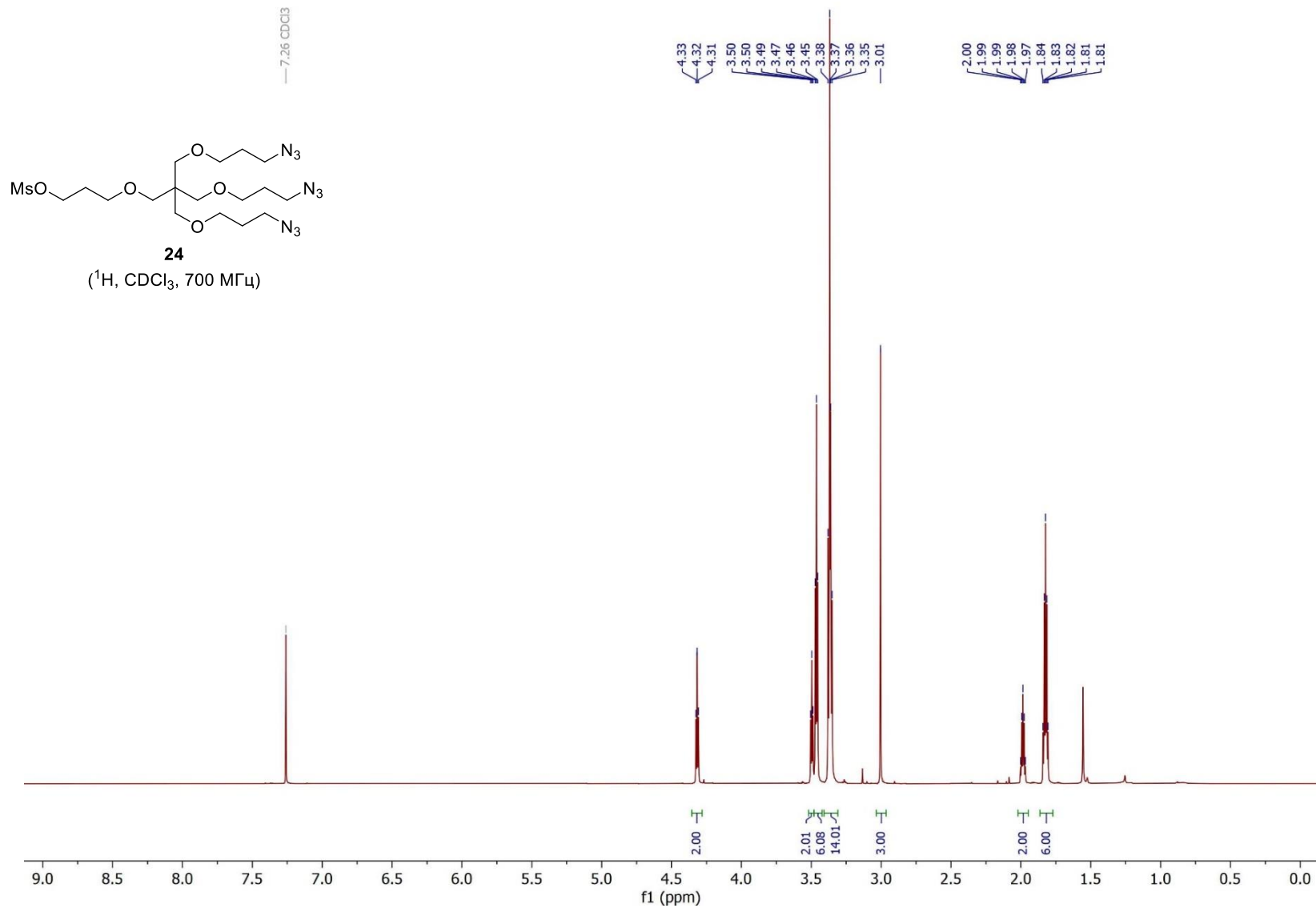
- ²⁵⁰ Han, L. M.; Lee, K.W.; Uludag, G.; Seider, M.I.; Afshar, A.R.; Bloomer, M.M.; Pekmezci, M. Prognostic value of BAP1 and preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) immunohistochemistry in uveal melanomas. *Modern Pathol.* **2023**, *36* (4), 100081. <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2022.100081>.
- ²⁵¹ Kuruwitage Ishikawa, A. S.; Tesser-Gamba, F.; Petrilli, A. S.; de Seixas-Alves, M. T.; Garcia-Filho, R. J.; de Toledo, S. R. C. Quantitative expression evaluation of PRAME gene in osteosarcoma. *Mol. Biol. Rep.* **2023**. *in press*. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08290-y>.
- ²⁵² Fuchs, J.R.; Schulte, B.C.; Fuchs, J.W.; Agulnik, M. Emerging targeted and cellular therapies in the treatment of advanced and metastatic synovial sarcoma. *Front. Oncol.* **2023**, *13*, 1123464. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1123464>.
- ²⁵³ De Wet, J.; Plessis, P.J. du; Schneider, J.W. Staged excision of lentigo maligna of the head and neck: assessing surgical excision margins with melan A, SOX10, and PRAME immunohistochemistry. *Am. J. Dermatopathol.* **2023**, *45* (2), 107–112. <https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000002354>.
- ²⁵⁴ See, S.H.C.; Smith, S.H.; Finkelman, B.S.; LaBoy, C.; Novo, J.E.; Siziopikou, K.P.; Blanco, L.Z. The role of PRAME and NY-ESO-1 as potential therapeutic and prognostic biomarkers in triple-negative breast carcinomas. *Pathol. Res. Pract.* **2023**, *241*, 154299. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154299>.
- ²⁵⁵ Kulkarni, N.V.; Shetty, R.A.; Kumari, N.S.; Shetty, V.V.; Krishna, R.; Arumugam, M.; Kalal, A.A.; Shetty, P. Correlation of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) gene expression with clinical characteristics in acute leukemia patients. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2022**, *20* (1), 97. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00376-7>.
- ²⁵⁶ Пенская Е.Л., Мисюрин В.А., Мисюрина А.Е., Кравченко С.К., Горенкова Л.Г., Пластинина Л.В., Тихонова В.В., Финашутина Ю.П., Лыжко Н.А., Касаткина Н.Н., Кесаева Л.А., Солопова О.Н., Мисюрин А.В. Прогностическое значение экспрессии гена PRAME у пациентов с Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями. *Клиническая онкогематология* **2019**, *12* (1), 73–78. <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2019-12-1-73-78>.
- ²⁵⁷ Мисюрин В.А., Мисюрина А.Е., Кравченко С.К. и др. Прогностическое значение активности гена PRAME в опухолевых клетках фолликулярной лимфомы. *Клиническая онкогематология* **2019**, *12* (2), 73–78. <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2019-12-2-173-178>.
- ²⁵⁸ Мисюрин, В. А. Клиническое значение экспрессии гена PRAME при онкогематологических заболеваниях. *Клиническая онкогематология* **2018**, *11* (1), 26–33. <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2018-11-1-26-33>.
- ²⁵⁹ Мисюрин, В. А. Теория и практика иммунотерапии, направленной против антигена PRAME. *Клиническая онкогематология* **2018**, *11* (2), 138–149. <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2018-11-2-138-149>.
- ²⁶⁰ Steinbach, D.; Pfaffendorf, N.; Wittig, S.; Gruhn, B. PRAME expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in primary acute myeloid leukemia. *Canc. Genet. Cytogenet.* **2007**, *177* (1), 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2007.05.011>.

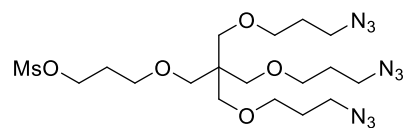
- ²⁶¹ Steinbach, D.; Hermann, J.; Viehmann, S.; Zintl, F.; Gruhn, B. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Canc. Genet. Cytogenet.* **2002**, *133* (2), 118–123. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(01\)00570-2](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(01)00570-2).
- ²⁶² Luetkens, T.; Schafhausen, P.; Uhlich, F.; Stasche, T.; Akbulak, R.; Bartels, B.M.; Hildebrandt, Y.; Gontarewicz, A.; Kobold, S.; Meyer, S.; Gordic, M.; Bartels, K.; Lajmi, N.; Cao, Y.; Kröger, N.; Bokemeyer, C.; Brümmendorf, T.H.; Atanackovic, D. Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Res.* **2010**, *34* (12), 1647–1655. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.03.039>.
- ²⁶³ Huang, Q.; Wei, H.; Wu, Z.; Li, L.; Yao, L.; Sun, Z.; Li, L.; Lin, Z.; Xu, W.; Han, S.; Cao, W.; Xu, Y.; Song, D.; Yang, X.; Xiao, J. Preferentially expressed antigen of melanoma prevents lung cancer metastasis. *PLoS One* **2016**, *11* (7), e0149640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149640>.
- ²⁶⁴ Huang, Q.; Li, L.; Lin, Z.; Xu, W.; Han, S.; Zhao, C.; Li, L.; Cao, W.; Yang, X.; Wei, H.; Xiao, J. Identification of preferentially expressed antigen of melanoma as a potential tumor suppressor in lung adenocarcinoma. *Med. Sci. Monit.* **2016**, *22*, 1837–1842. <https://doi.org/10.12659/MSM.895642>.
- ²⁶⁵ Tajeddine, N.; Millard, I.; Gailly, P.; Gala, J.-L. Real-time RT-PCR quantification of PRAME gene expression for monitoring minimal residual disease in acute myeloblastic leukaemia. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2006**, *44* (5), 548–555. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.106>.
- ²⁶⁶ Epping, M.T.; Wang, L.; Edel, M.J.; Carlée, L.; Hernandez, M.; Bernardis, R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* **2005**, *122* (6), 835–847. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.003>.
- ²⁶⁷ Wadelin, F.R.; Fulton, J.; Collins, H.M.; Tertipis, N.; Bottley, A.; Spriggs, K.A.; Falcone, F. H.; Heery, D.M. PRAME is a Golgi-targeted protein that associates with the elongin BC complex and is upregulated by interferon-gamma and bacterial PAMPs. *PLoS One* **2013**, *8* (2), e58052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058052>.
- ²⁶⁸ Pankov, D.; Sjöström, L.; Kalidindi, T.; Lee, S.-G.; Sjöström, K.; Gardner, R.; McDevitt, M. R.; O'Reilly, R.; Thorek, D. L. J.; Larson, S. M.; Veach, D.; Ulmert, D. *In vivo* immunotargeting of an extracellular epitope of membrane bound preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME). *Oncotarget* **2017**, *8* (39), 65917–65931. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19579>.
- ²⁶⁹ Proto-Siqueira, R.; Figueiredo-Pontes, L.L.; Panepucci, R.A.; Garcia, A.B.; Rizzatti, E.G.; Nascimento, F.M.; Ishikawa, H.C.F.; Larson, R.E.; Falcão, R.P.; Simpson, A.J.; Gout, I.; Filonenko, V.; Rego, E.M.; Zago, M.A. PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Leukemia Res.* **2006**, *30* (11), 1333–1339. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.02.031>.
- ²⁷⁰ Мисюрин, А.В. Основы молекулярной диагностики онкогематологических заболеваний. *Российский биотерапевтический журнал* **2016**, *15* (4), 18–24. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2016-15-4-18-24>.
- ²⁷¹ Kirkey, D.C.; Loeb, A.; Castro, S.; McKay, C.N.; Perkins, L.; Pardo, L.; Leonti, A.R.; Tang, T.; Loken, M.R.; Eidenschink Brodersen, L.; Loeb, K.R.; Scheinberg, D.A.; Le, Q.; Meshinchi,

- S. Therapeutic targeting PRAME with MTCRCAR T cells in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **2023**, 7 (7), 1178–1189. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008304>.
- ²⁷² Ларина, М.В. Финашутина, Ю.П., Лыжко, Н.А., Мисюрин, В.А. и др. Получение гуманизированного антитела 5D3HU к опухолевому антигену PRAME. *Биоорг. химия*, **2022**, 48 (2), 240–252. <https://doi.org/10.31857/S0132342322020130>
- ²⁷³ Лыжко, Н.А., Мисюрин, В.А. и др. Проявление цитостатического эффекта моноклональных антител к белку PRAME. *Российский биотерапевтический журнал* **2016**, 15 (4), 53–58. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2016-15-4-53-58>.
- ²⁷⁴ Holmes, K.L.; Lantz, L.M. Protein labeling with fluorescent probes. *Meth. Cell Biol.*; Elsevier, 2001; Vol. 63, pp 185–204. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)63013-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)63013-9).
- ²⁷⁵ Haque, M.; Forte, N.; Baker, J.R. Site-selective lysine conjugation methods and applications towards antibody–drug conjugates. *Chem. Commun.* **2021**, 57 (82), 10689–10702. <https://doi.org/10.1039/D1CC03976H>.
- ²⁷⁶ Adumeau, P.; Sharma, S.K.; Brent, C.; Zeglis, B.M. Site-specifically labeled immunoconjugates for molecular imaging—Part 1: cysteine residues and glycans. *Mol. Imag. Biol.* **2016**, 18 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0919-4>.
- ²⁷⁷ Dannheim, F.M.; Walsh, S.J.; Orozco, C.T.; Hansen, A.H.; Bargh, J.D.; Jackson, S.E.; Bond, N.J.; Parker, J.S.; Carroll, J.S.; Spring, D.R. All-in-one disulfide bridging enables the generation of antibody conjugates with modular cargo loading. *Chem. Sci.* **2022**, 13 (30), 8781–8790. <https://doi.org/10.1039/D2SC02198F>.
- ²⁷⁸ Wang, L.; Amphlett, G.; Blättler, W. A.; Lambert, J. M.; Zhang, W. Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, HuN901-DM1, by Mass Spectrometry. *Protein Sci.* **2005**, 14 (9), 2436–2446. <https://doi.org/10.1110/ps.051478705>.
- ²⁷⁹ Martin, C.; Brachet, G.; Colas, C.; Allard-Vannier, E.; Kizlik-Masson, C.; Esnault, C.; Respaud, R.; Denevault-Sabourin, C.; Chourpa, I.; Gouilleux-Gruart, V.; Viaud-Massuard, M.-C.; Joubert, N. In vitro characterization and stability profiles of antibody–fluorophore conjugates derived from interchain cysteine cross-linking or lysine bioconjugation. *Pharmaceuticals* **2019**, 12 (4), 176. <https://doi.org/10.3390/ph12040176>.
- ²⁸⁰ Bertozzi, C.R.; Bednarski, M.D. The synthesis of heterobifunctional linkers for the conjugation of ligands to molecular probes. *J. Org. Chem.* **1991**, 56 (13), 4326–4329. <https://doi.org/10.1021/jo00013a053>.
- ²⁸¹ Khomutov, M.A.; Mandal, S.; Weisell, J.; Saxena, N.; Simonian, A.R.; Vepsalainen, J.; Madhubala, R.; Kochetkov, S.N. Novel convenient synthesis of biologically active esters of hydroxylamine. *Amino Acids* **2010**, 38 (2), 509–517. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0410-0>.
- ²⁸² Chen, Y. Drug-to-antibody ratio (DAR) by UV/Vis Spectroscopy. In: *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; *Meth. Mol. Biol.*; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 1045, pp. 267–273. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-541-5_16.
- ²⁸³ Hestand, N.J.; Spano, F.C. Expanded theory of H- and J-molecular aggregates: the effects of vibronic coupling and intermolecular charge transfer. *Chem. Rev.* **2018**, 118 (15), 7069–7163. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00581>.

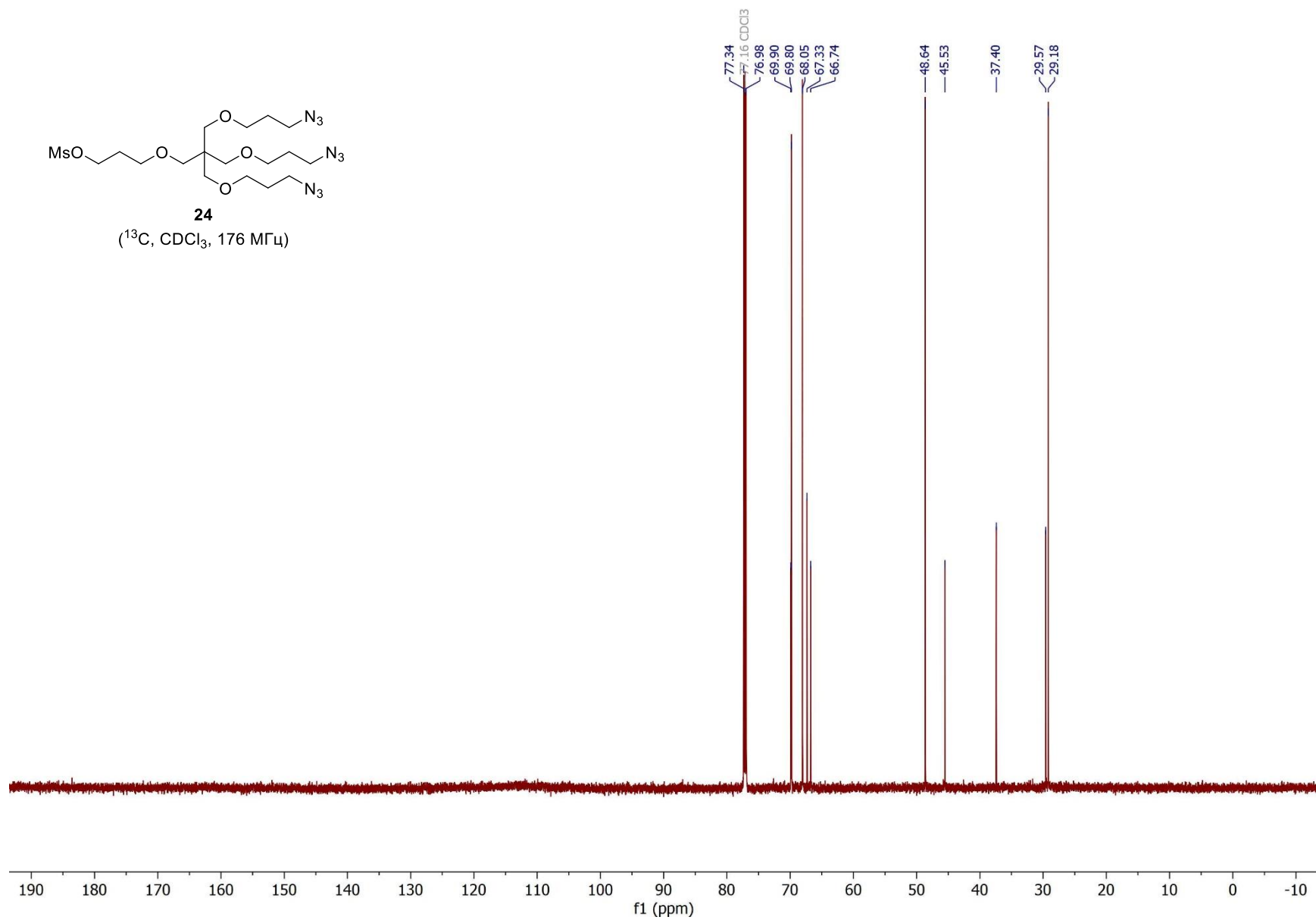
- ²⁸⁴ Barna, G.; Reiniger, L.; Tátrai, P.; Kopper, L.; Matolcsy, A. The cut-off levels of CD23 expression in the differential diagnosis of MCL and CLL. *Hematol. Oncol.* **2008**, *26* (3), 167–170. <https://doi.org/10.1002/hon.855>.
- ²⁸⁵ Larina, M.V.; Finashutina, Y.P.; Lyzhko, N.A.; Misyurin, V.A.; Novoseletsky, V.N.; Dolgikh, D.A.; Solopova, O.N.; Moysenovich, A.M.; Balabashin, D.S.; Aliev, T.K.; Misyurin, A.V.; Kirpichnikov, M.P. Development of a humanized antibody 5D3Hu against the PRAME Tumor Antigen. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2022**, *48* (2), 360–371. <https://doi.org/10.1134/S1068162022020133>.
- ²⁸⁶ Grünebach, F.; Mirakaj, V.; Mirakaj, V.; Müller, M. R.; Brümmendorf, T.; Brossart, P. BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Canc. Res.* **2006**, *66* (11), 5892–5900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2868>.
- ²⁸⁷ Qin, Y.; Lu, J.; Bao, L.; Zhu, H.; Li, J.; Li, L.; Lai, Y.; Shi, H.; Wang, Y.; Liu, Y.; Jiang, B.; Huang, X. Bortezomib improves progression-free survival in multiple myeloma patients overexpressing preferentially expressed antigen of melanoma. *Chin. Med. J.* **2014**, *127* (9), 1666–1671. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20132356>
- ²⁸⁸ Sletten, E.M.; Bertozzi, C.R. Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998. <https://doi.org/10.1002/anie.200900942>.
- ²⁸⁹ Ponomarenko, A.I.; Brylev, V.A.; Sapozhnikova, K.A.; Ustinov, A V.; Prokhorenko, I.A.; Zatsepin, T.S.; Korshun, V.A. Tetrahedral DNA conjugates from pentaerythritol-based polyazides. *Tetrahedron* **2016**, *72* (19), 2386–2391. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.03.051>.
- ²⁹⁰ Uckun, F.; Jaszcz, W.; Ambrus, J.; Fauci, A.; Gajl-Peczalska, K.; Song, C.; Wick, M.; Myers, D.; Waddick, K.; Ledbetter, J. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood* **1988**, *71* (1), 13–29. <https://doi.org/10.1182/blood.V71.1.13.13>.
- ²⁹¹ Powroźnik, B.; Kubowicz, P.; Pękala, E. Monoclonal antibodies in targeted therapy. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2012**, *66*, 663–673. <https://doi.org/10.5604/17322693.1009980>.
- ²⁹² Goswami, L.N.; Houston, Z.H.; Sarma, S.J.; Jalisatgi, S.S.; Hawthorne, M.F. Efficient synthesis of diverse heterobifunctionalized clickable oligo(ethylene glycol) linkers: potential applications in bioconjugation and targeted drug delivery. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (7), 1116–1126. <https://doi.org/10.1039/c2ob26968f>.

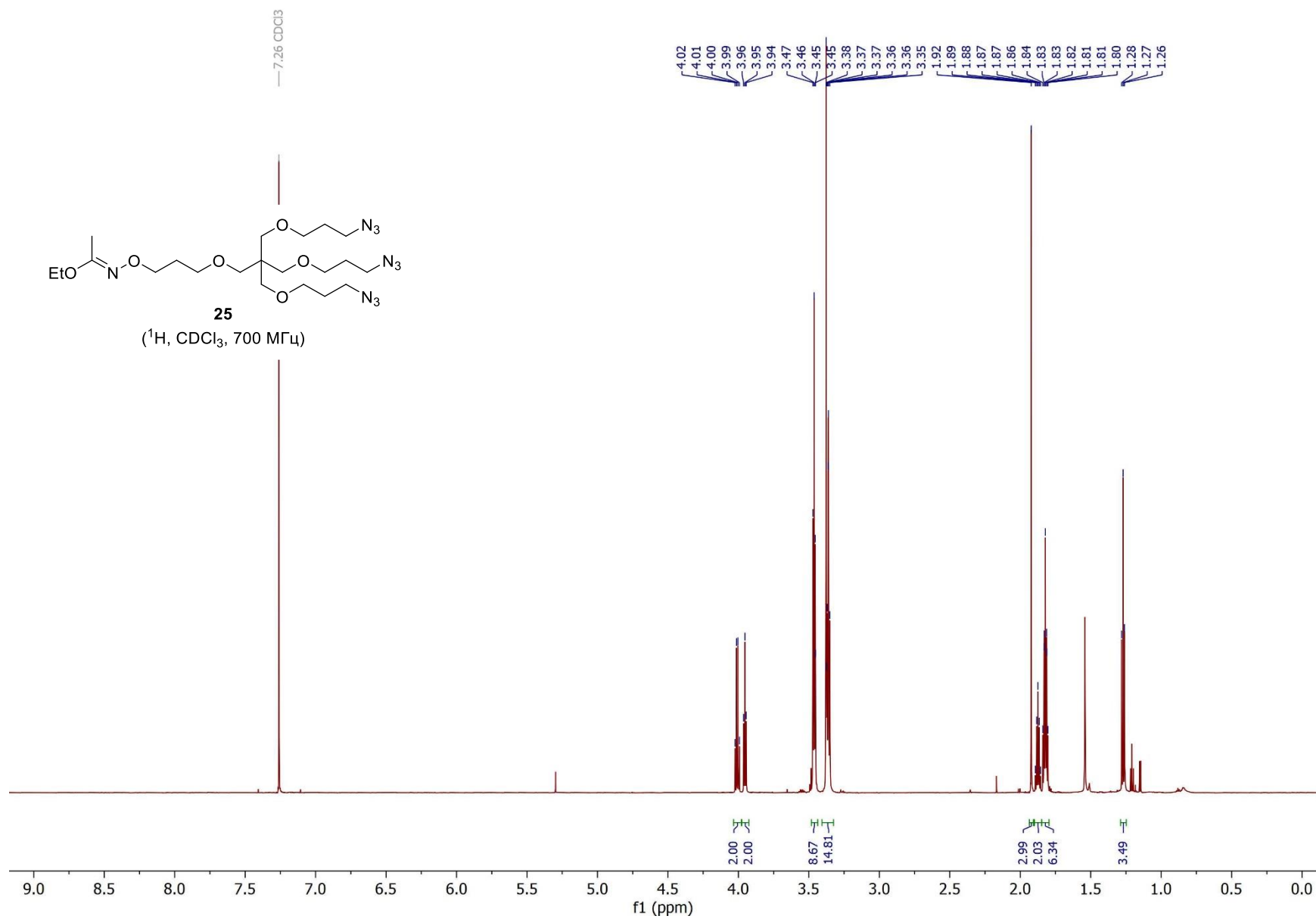
ПРИЛОЖЕНИЕ

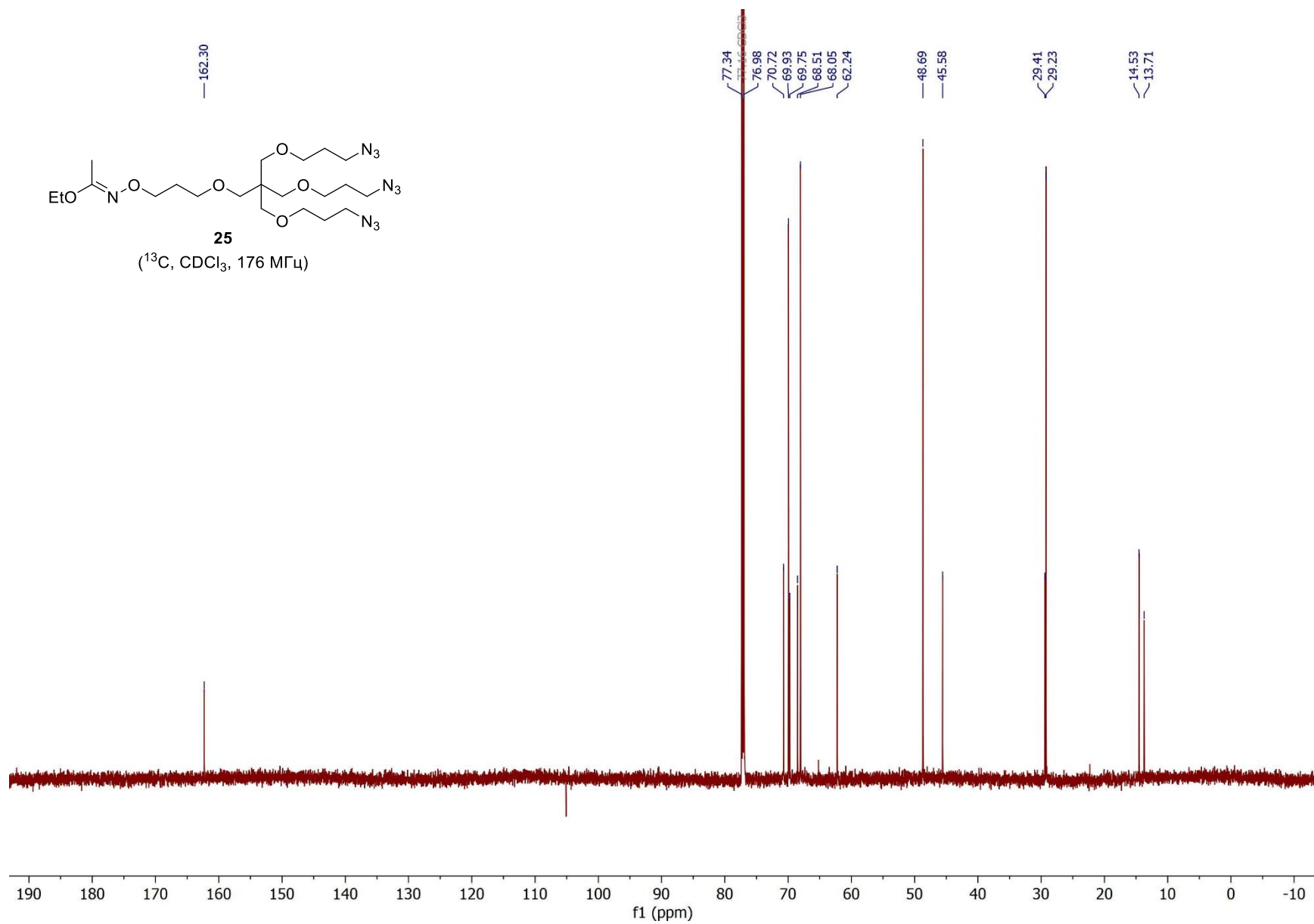


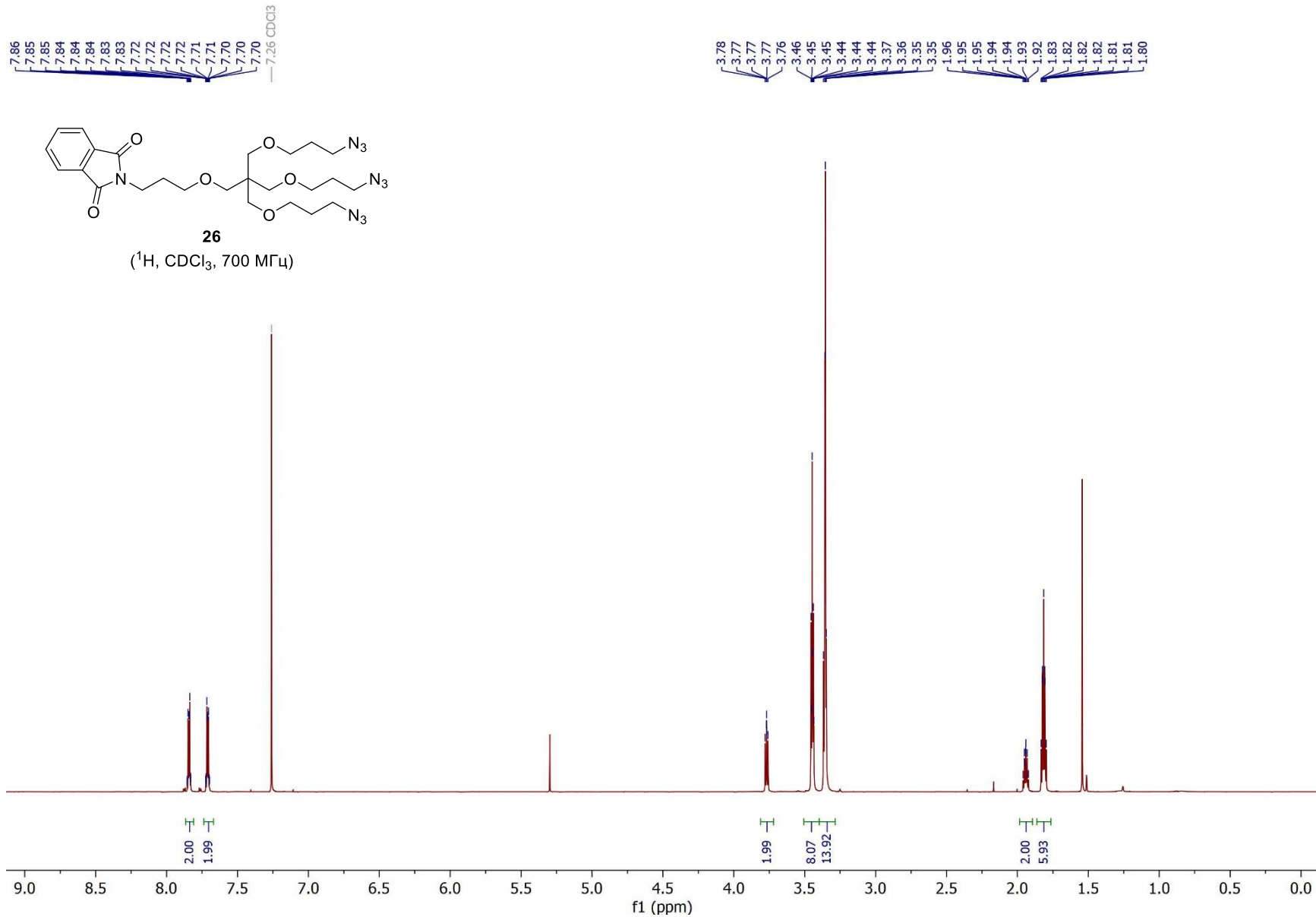


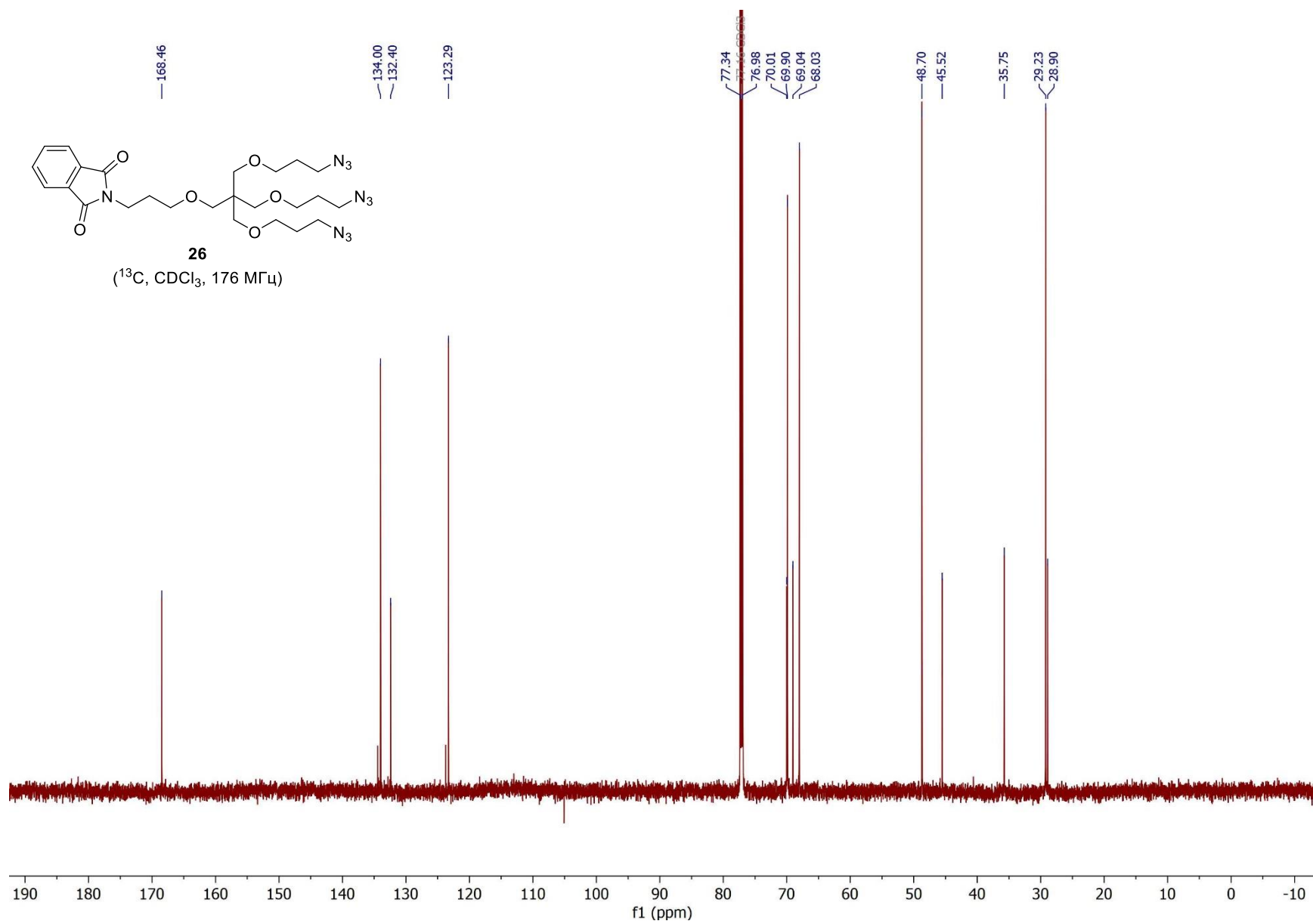
24
(^{13}C , CDCl_3 , 176 МГц)

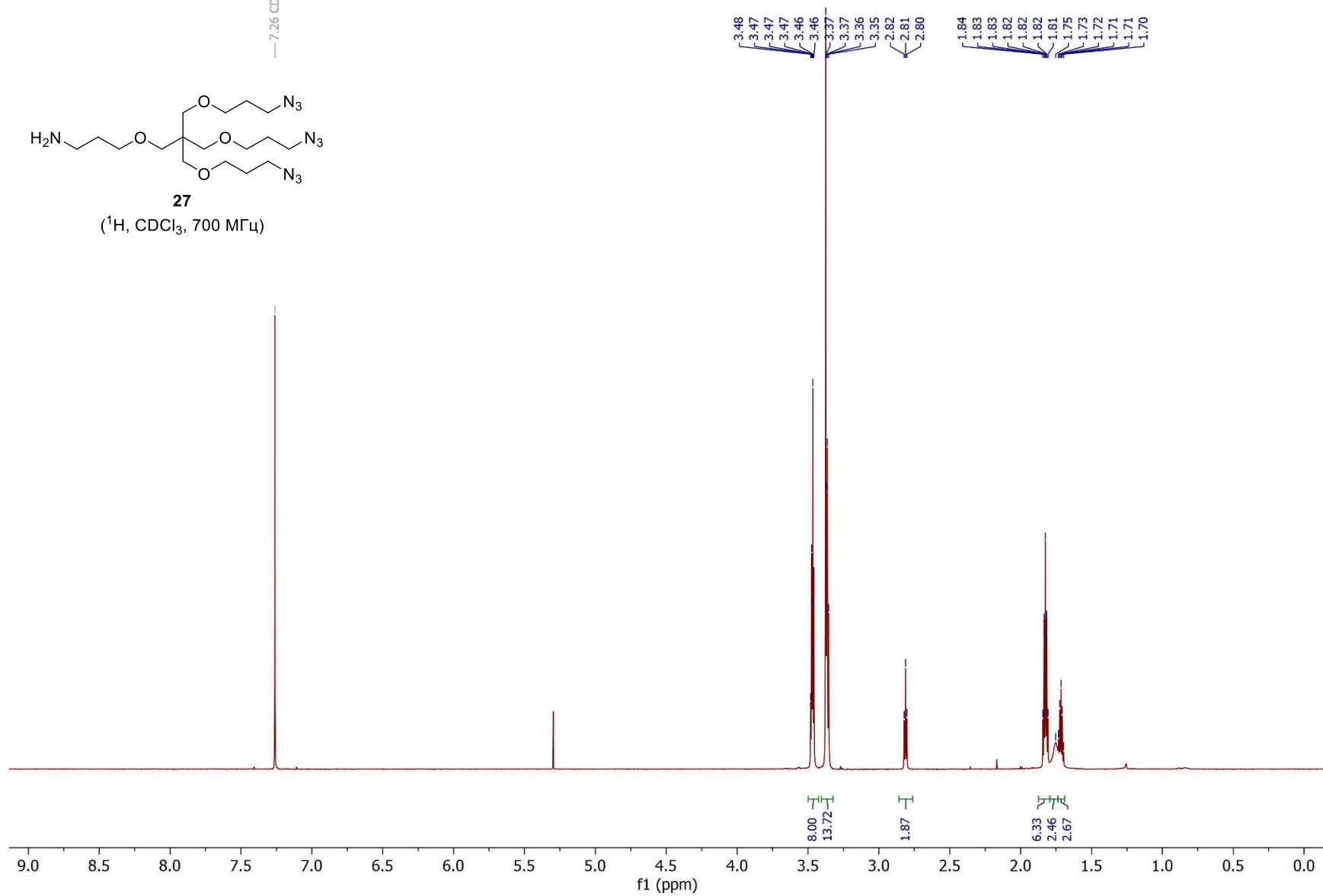
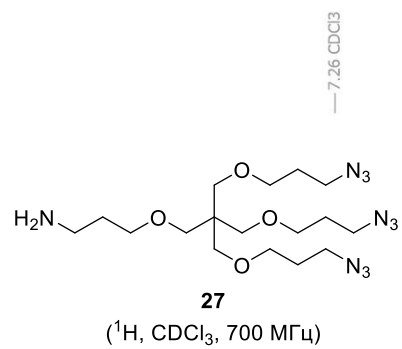


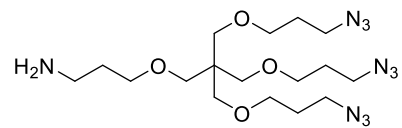










**27** $(^{13}\text{C}, \text{CDCl}_3, 176 \text{ MHz})$ 