

## ОТЗЫВ

официального оппонента на работу **Сапожниковой Ксении Андреевны**  
«Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических  
конъюгатов антител», представленную на соискание учёной степени кандидата  
химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия

Важным, активно развивающимся направлением разработки новых терапевтических препаратов является создание средств направленного транспорта токсичных агентов или их компонентов в органы и ткани, пораженные патологическим процессом. Особенно важны такие препараты для лечения онкологических заболеваний. Серьезной проблемой существующих препаратов является недостаточная селективность их доставки в клетки-мишени, что приводит к серьезным побочным реакциям в нецелевых органах и тканях. Антитела, специфически взаимодействующие с онкомаркерами, предоставляют возможность корректной доставки конъюгированных с ними фармпрепаратов. Однако терапевтическое действие таких конъюгатов во многом зависит от их состава, сохранения антиген-связывающих свойств антитела после модификации, а также его стабильности при циркуляции в организме. Использование традиционных методик конъюгирования позволяет удовлетворять эти требования лишь в ограниченной степени. Поэтому востребована разработка и оценка возможностей новых методик синтеза для получения модифицированных иммуноглобулинов. Дополнительной значимой областью применения таких конъюгатов является диагностика заболеваний, достоверность которой также зависит от свойств модифицированных антител.

В последние годы разнообразие подходов, которые могут быть применены для конъюгирования биомолекул, существенно расширилось. Активно разрабатываются биоортогональные реакции и клик-реакции, минимизирующие получение нежелательных побочных продуктов. Значимость этих исследований подчеркивает присуждение Нобелевской премии по химии 2022 года за формирование данных научных направлений. В то же время имеющийся опыт использования этих подходов применительно к модификации антител ограничен, систематические сравнительные исследования продуктов синтеза, получаемых разными способами, отсутствуют.

Таким образом, современная ситуация в полной степени соответствует критериям **актуальности** поиска эффективных линкерных молекул и синтетических методик для получения модифицированных антител терапевтического и диагностического назначения, что и являлось целью диссертационного исследования К.А. Сапожниковой.

Подготовленная диссертационная работа и публикации К.А. Сапожниковой отражают успешное достижение поставленной цели и решение всех необходимых для этого задач.

Диссертационная работа изложена на 197 страницах, содержащих 56 рисунков в основном тексте и 47 – в приложении, 15 схем и 5 таблиц, и имеет традиционную структуру. Во введении дается общее представление об объектах исследования, формулируются его цель и задачи, характеризуется личный вклад соискателя в работу и приводится перечень опубликованных статей.

В обзоре литературы рассмотрено оксимное лигирование как востребованный способ получения конъюгатов биомолекул. Обсуждаются общие свойства антител, терапевтическое применение их конъюгатов с фармпрепаратами, критерии оценки качества конъюгатов. Диссертант описывает основные стратегии химической модификации биомолекул, их достоинства и ограничения. Рассмотрены существующие разработки по модификации молекул иммуноглобулинов и формированию их конъюгатов с маркерами и биологически активными соединениями. Детальное рассмотрение этих разработок, охватывающее как исследования последних лет, так и приоритетные публикации, позволяет аргументированно выбрать наиболее перспективные подходы, сочетающиеся в рамках разработки автора с оксимным лигированием. Обзор дает информативное и достаточно полное описание работ в тематической области диссертационного исследования и подтверждает высокий профессиональный уровень К.А. Сапожниковой.

В главе 2 последовательно рассмотрены проведенные исследования и полученные результаты. Для рассмотрения различных способов модификации и конъюгирования было выбрано моноклональное антитело, специфичное к онкомаркеру PRAME – preferentially expressed antigen in melanoma. К.А. Сапожниковой охарактеризованы продукты периодатного окисления углеводного компонента антитела в различных условиях и последующего лигирования по карбонильным группам. Рассмотрено связывание конъюгата антитела и красителя Cyanine3 с различными клеточными линиями; показана пригодность конъюгата для селективного выявления PRAME на поверхности клеток. Проведено сравнительное изучение оксимного лигирования, проводимого в различных условиях. С использованием флуоресцентно меченого антитела показана возможность выявления PRAME-положительных клеток методом проточной цитометрии. Получена серия препаратов с увеличенной нагрузкой флуорофора на молекулу антитела, обеспечиваемой за счет применения разветвленных линкеров. Разработанные подходы успешно применены для модификации антител двумя видами терапевтических препаратов

– доксорубицином и монометилауристатином Е. Совокупность полученных результатов отражает эффективность выбранного подхода для синтеза стабильных и функционально активных конъюгатов антител с гаптенами разной природы и тем самым свидетельствует об успешном достижении цели диссертационного исследования.

В главе 3 «Экспериментальная часть» представлены использованные в работе методы. Подробно описано все разнообразие методик получения нескольких десятков модифицированных гаптенов и конъюгатов, подтверждения их состава, методики модификации антител, иммуноферментного анализа, проточной цитометрии, МТТ-тест. Выбор методов представляется вполне оправданным, обеспечивающим получение необходимых синтетических продуктов и их комплексную характеристику. Глава 3 отражает приобретенную К.А. Сапожниковой высокую квалификацию в области биоорганической химии.

Все представленные в диссертационной работе эксперименты выполнены с необходимым количеством повторностей и набором контролей, описываемые закономерности статистически подтверждены, сопоставлены с данными аналогичных исследований. В связи с этим **достоверность** полученных диссертантом результатов не вызывает сомнений.

В качестве основных результатов, подтверждающих **научную новизну** работы, следует отметить предложенный и реализованный подход для оценки эффективности модификации биомолекул посредством включения при этой модификации в состав конъюгата флуоресцентных красителей со спектрофото- и флуориметрическим контролем их содержания. К.А. Сапожниковой разработан усовершенствованный метод оксимного лигирования, в котором реакция карбонильного соединения проводится *in situ* с защищённым гидроксиламином. Разработаны методики синтеза конъюгатов гаптен-белок с увеличенной нагрузкой гаптена, основанные на использовании разветвленных линкеров. Проведено сравнительное изучение состава и функциональной активности полученных терапевтических конъюгатов антител, содержащих цианиновый краситель, расщепляемый линкер и фармпрепараты (доксорубицин либо монометилауристатин Е).

**Практическая значимость** диссертационного исследования К.А. Сапожниковой следует из показанной эффективности полученных препаратов для выявления поверхностных антигенов методом проточной цитометрии, а также для селективного токсического воздействия на опухолевые клетки.

При ознакомлении с работой возникли некоторые **замечания и вопросы**.

1. Во введении и в обзоре литературы диссертант дает краткую общую характеристику биоконъюгатов, после чего переходит к рассмотрению оксимного

лигирования, на котором и сфокусировано проведенное исследование. Оценка существующего разнообразия подходов смещена во вторую половину литературного обзора, начинается с очень информативной, но не обсуждаемой таблицы 2, после которой дается содержательная характеристика подходов, появившихся на протяжении последних десятилетий. По мнению рецензента, такая последовательность изложения не является оптимальной. Исходя из общей постановки задач модификации иммуноглобулинов и сформулированных требований к продуктам этой модификации, можно было бы более аргументированно оценить исследования предшественников и с учетом ограничений полученных ими результатов обосновать выбор предложенного в диссертации подхода.

2. Для распространенных коммерческих реагентов, модифицирующих лизиновые остатки иммуноглобулинов (в частности, обеспечивающих биотинилирование белков), в ряде работ подтверждена возможность проведения такой модификации без утраты или значимого снижения аффинности по отношению к антигену. Соответственно риски такой обработки для новых препаратов антител в значительной степени связаны с особенностями их переменных участков, входящих в активный центр антитела или примыкающих к нему. С учетом этого при рассмотрении модификации моноклонального антитела, специфичного к PRAME, было бы полезно учитывать, какие реакционно способные аминокислотные остатки имеются в переменных участках данного антитела.

3. Для введения в белковые молекулы красителя Cyapine3 имеется его коммерчески доступное реакционноспособное производное - активированный N-гидроксисукцимидный эфир. Экспериментальное сравнение продуктов традиционной и предлагаемой диссертантом сайт-специфичной модификации было бы наглядной иллюстрацией преимуществ разработанного подхода.

4. В качестве обобщающей оценки полученных препаратов антител, модифицированных флуорофорами, была бы полезна сводная таблица, отражающая нагрузку флуорофора на одну молекулу IgG в каждом варианте и, по необходимости, другие значимые параметры. Это позволило бы аргументированно выбирать оптимальные препараты. Сейчас информация о составе синтезированных продуктов распределена по тексту главы 2, что затрудняет доказательные выводы о сравнительной эффективности различных реализованных подходов.

Вышеизложенные соображения носят частный и дискуссионный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку диссертационной работы.

Содержание диссертационной работы К.А. Сапожниковой соответствует паспорту научной специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия и полностью представлено

профессиональному сообществу в виде статей и выступлений. По результатам исследования опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, сделано 11 докладов на научных конференциях и симпозиумах. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам исследования, полно и адекватно отражает его результаты. Диссертация К.А. Сапожниковой является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития биоорганической химии – предложен и охарактеризован комплекс методов синтеза конъюгатов антител с флуорофорами и препаратами, обеспечивающих высокую функциональную эффективность и стабильность продуктов.

**Заключение.** На основании вышеизложенного считаю, что диссертация «Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических конъюгатов антител» является законченной научно-квалификационной работой, соответствующей всем требованиям "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями согласно Постановлениям Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Сапожникова Ксения Андреевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия.

#### Официальный оппонент

**Жердев Анатолий Виталиевич,**

доктор химических наук (специальность 1.5.4. – Биохимия),  
ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии

Федерального исследовательского центра  
«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук



#### Контактные данные:

Телефон: 8 (916) 113-80-61; E-mail: zherdev@inbi.ras.ru

Почтовый адрес: 119071 г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2