

**Отзыв официального оппонента, кандидата химических наук Крылова Вадима Борисовича, на диссертационную работу Сапожниковой Ксении Андреевны «Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических конъюгатов антител», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности**

**1.4.9. – «биоорганическая химия»**

**Актуальность темы исследования**

Разработка эффективных методов диагностики и терапии онкологических заболеваний представляет собой крайне актуальную, но очень трудную задачу для современной науки и медицины. По данным Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания, наряду с болезнями сердечно-сосудистой системы и инфекционными заболеваниями, входят в первую тройку причин смертности. Благодаря развитию технологий, связанных с направленным дизайном и получением моноклональных антител, все большее внимание уделяется методам иммунодиагностики и иммунотерапии онкологических заболеваний с использованием иммуноглобулинов и конъюгатов на их основе. Диссертационное исследование Сапожниковой К.А., посвященное разработке методологии сайт-направленной конъюгации антител с флуоресцентными метками и терапевтическими агентами, относится к данному чрезвычайно актуальному направлению.

**Научная и практическая новизна**

В ходе выполнения своего диссертационного исследования Сапожникова К.А. получила ценные научные результаты. Эти результаты можно условно разделить на два раздела: «химический» и «биологический».

«Химические» результаты включают в себя разработку методов синтеза и анализа полифункциональных лигандов для последующей направленной модификации антител. Следует отметить, что данные соединения и соответствующие синтетические блоки отличаются высокой структурной сложностью, что требует особых навыков при анализе спектров ЯМР полученных соединений для подтверждения чистоты и подлинности. Другим "химическим" достижением автора является разработка методологии конъюгации получаемых лигандов с антителами. Среди предложенных и испытанных автором методик выгодно отличается способ синтеза конъюгатов антител с помощью оксимного лигирования со снятием этоксиэтилиденовой защитной группы *in situ*.

«Биологические» результаты диссертационного исследования были получены благодаря диагностическим и терапевтическим конъюогатам, синтезированным автором на основе моноклонального антитела против онко-ассоциированного белка PRAME. Были получены результаты по иммуноокрашиванию и цитотоксическому эффекту на PRAME-положительных клеточных линиях. Все эти новые результаты показывают перспективность белка PRAME в качестве мишени для разработки диагностических и терапевтических средств против определенных типов онкологических заболеваний, а описанные в работе линкеры и методики конъюогации открывают путь к разработке востребованных иммунобиологических препаратов.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и состоит из разделов «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Обсуждение результатов», «Экспериментальная часть», «Выводы», «Благодарности», «Список литературы» и «Приложения». Работа изложена на 197 страницах, содержит 56 рисунков, 15 схем, 5 таблиц, 47 приложений. Список литературы содержит 292 источника.

Во введении кратко обоснована актуальность исследования, обозначены цели и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость, а также описаны основные методы исследования и суммированы основные положения, выносимые на защиту. Последние сформулированы корректно и соответствуют поставленным целям работы. Также приведена информация об апробации результатов работы на конференциях и публикации их в рецензируемых научных изданиях.

В обзоре литературы рассмотрены основные подходы к получению конъюогатов на основе антител, включая химические и генно-инженерные методы. Также в обзоре уделено внимание самой реакции оксимного лигирования, рассмотрен её механизм и возможности катализа. Следует отметить, что данный раздел высокоактуален и содержит самую последнюю информацию о конъюогированных иммунобиологических препаратах (данные на март 2023 года). Обзор литературы логично структурирован, написан понятным языком и содержит необходимые для понимания исследования сведения.

Обсуждение результатов включает в себя два раздела. Первый посвящен получению флуоресцентных конъюогатов антител с помощью оксимного лигирования. Второй – получению терапевтических конъюогатов антител. В первом разделе описан синтез бифункциональных линкерных реагентов на основе гидрофильных олигоэтиленгликолей и производных пентаэритрита для сайт-специфической

модификации антител. Особый практический интерес представляют полученные в работе *N*-этоксиприлиден-защищенные оксаминовые производные флуоресцентных красителей. Данные реагенты использовались для синтеза конъюгатов антител с помощью оксимного лигирования со снятием этоксиприлиденовой защитной группы *in situ*. Полученные флуоресцентные антитела использовались для исследования экспрессии опухолевого белка PRAME на поверхности клеток методами проточной цитометрии и иммуноокрашивания с последующей конфокальной микроскопией. В работе описано получение меченных антител с увеличенной нагрузкой по красителю, что достигалось благодаря использованию разветвленных линкеров. Важно отметить, что самотушение для конъюгатов данного типа было несущественным.

Во втором разделе описана комбинация периодатного окисления гликанов антител и оксимного лигирования для синтеза конъюгатов антитело-цитотоксический препарат. В качестве цитотоксического агента были использованы доксорубин и монометилауристин Е. В работе описано несколько подходов к получению цитотоксических конъюгатов с биорасщепляемыми линкерами и показано, что белок PRAME может быть использован в качестве мишени для конъюгатов антитело-препарат.

Экспериментальная часть содержит методики синтеза всех соединений и конъюгатов антител, приведенных в исследовании, а также методики биологических испытаний конъюгатов *in vitro*. Приведенное описание соответствует общепринятым в научной литературе требованиям.

Выводы, сделанные автором по результатам работы, не вызывают сомнений, подтверждены экспериментальными данными и соответствуют целям и задачам исследования.

Список литературы содержит достаточное количество релевантных источников, комплексно отражающих современное состояние мировой науки по теме рассматриваемой диссертации.

В приложении представлены одномерные и двумерные спектры ЯМР, подтверждающие чистоту и подлинность полученных соединений.

### **Замечания к диссертационной работе**

По работе Сапожниковой К.А. имеется ряд замечаний, носящих рекомендательный и дискуссионный характер:

1) В экспериментальной части (раздел Материалы и Методы) следовало бы кратко добавить информацию об использованном в работе антителе 6H8: способе получения (например, наработка в асците или выделение из супернатанта клеточной культуры) и

основных характеристиках. Так как использованный в работе метод конъюгации основан на периодатном окислении углеводов, можно ли охарактеризовать содержание гликанов в исходном антителе?

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

3) В диссертации приведены спектры очень сложных соединений (например, HSQC-спектр соединения 53 на стр. 196). Возможно, следовало привести полное отнесение сигналов на спектре для подтверждения чистоты?

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

5) N-Этоксипропилиден-защищенные оксиаминовые производные характеризовались и вводились в реакционную смесь в виде раствора в ДМСО. Насколько устойчивы данные соединения в воде, и какая эффективность конъюгации (выход по лиганду) для данных соединений в зависимости от используемого избытка оксиаминового производного?

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

### **Достоверность полученных результатов**

Результаты рецензируемой работы не вызывают сомнений, поскольку получены на основе квалифицированного применения современных методов органического синтеза и физико-химических исследований: спектроскопии ЯМР (как одномерной на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , так и двухмерной корреляционной ЯМР-спектроскопии COSY, HSQC), масс-спектрометрии высокого разрешения, оптической спектроскопии, а также современных биохимических методов. Полученные результаты обсуждены с использованием новых данных современной химической литературы и находятся в поле современных научных

представлений о химии и практическом приложении иммуноглобулинов, дополняют и развивают соответствующую методологию. Основные научные результаты диссертации опубликованы в 5 статьях в международных рецензируемых журналах, индексируемых Scopus и Web of Science.

### Заключение

Таким образом, диссертационная работа Сапожниковой Ксении Андреевны «Полифункциональные линкеры для синтеза флуоресцентных и терапевтических конъюгатов антител» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Официальный оппонент

Крылов Вадим Борисович

старший научный сотрудник, заведующий Лабораторией синтетических гликовакцин  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической  
химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

Кандидат химических наук

Шифр специальности 02.00.03 – «органическая химия»

Адрес: 119991, г. Москва, Российская Федерация,

г. Москва, Ленинский проспект, 47

Тел. +7-915-024-31-42.

E-mail: [v\\_krylov@ioc.ac.ru](mailto:v_krylov@ioc.ac.ru)

03.05.23

Подпись к.х.н. Крылова В.Б.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

к.х.н. Коршевец И.К.

МП

