

На правах рукописи

Сапожникова Ксения Андреевна

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

1.4.9 – БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

Научный руководитель: **Коршун Владимир Аркадьевич**, доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Жердев Анатолий Виталиевич**, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории иммунобиохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Защита состоится «14» июня 2023 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан « » 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Разработка линкеров для биоконъюгации, позволяющих получать химически модифицированные функциональные антитела, является актуальным направлением, поскольку химически модифицированные антитела находят применение в клинической медицине и диагностике. Наиболее интересной моделью для применения разрабатываемых линкеров является получение конъюгатов антител с лекарствами (терапевтические конъюгаты антител, antibody–drug conjugates, ADC). Практическое значение разработки таких препаратов исключительно велико, поскольку с ними сейчас связаны большие надежды в области терапии онкологических заболеваний.

Цель работы и задачи исследования. 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 промотируемого напряжением цикла 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 варианте, когда карбонильная группа тем или иным способом генерируется на антителе.

Научная новизна и практическая значимость работы. Методы получения ADC-препаратов разнообразны, но наиболее трудными задачами являются контроль стехиометрии и сохранение аффинности антитела. Линкер, соединяющий антитело с противоопухолевым антибиотиком (цитотоксическим агентом), должен быть гидрофильным, достаточно протяженным и биоразлагаемым; внутри клетки должно происходить высвобождение антибиотика. В работе впервые предложено контролировать стехиометрию конъюгата с помощью введения в состав линкера флуоресцентных красителей, которые количественно детектируются по электронным спектрам поглощения. Разработан усовершенствованный метод оксимного лигирования, в котором реакцию карбонильного соединения проводят *in situ* с защищенным гидроксиламином. Подход использован также для флуоресцентного мечения антител, применимых в диагностике. Впервые показана применимость опухолевого антигена PRAME для создания конъюгата с цитотоксическим препаратом.

Научная новизна данной работы заключается в следующем: предложен новый подход к мечению окисленных периодатом антител с помощью оксимного лигирования со снятием защитной группы с оксиамина *in situ*; предложен метод синтеза разветвленных линкеров для синтеза конъюгатов антител с увеличенной нагрузкой; предложен ряд подходов к сборке терапевтических конъюгатов антитело-препарат, содержащих в структуре цианиновый краситель, расщепляемый линкер и препараты доксорубицин и монометилауристин Е; предложен способ контроля стехиометрии конъюгата с помощью флуоресцентного красителя, встроенного в линкер; впервые показано, что конъюгаты антитело-препарат, нацеленные на белок PRAME, вызывают гибель клеток, экспрессирующих PRAME на мембране.

Практическая значимость данной работы заключается в следующем: с помощью разработанного подхода к мечению были получены диагностические флуоресцентные антитела к мембранному белку PRAME, позволяющие проводить иммунотипирование больных лейкозами и меланомой; получены диагностические флуоресцентные антитела с увеличенной

нагрузкой красителя, обладающими повышенной яркостью флуоресценции; впервые показана возможность создания терапевтических конъюгатов антитело-препарат, нацеленных на опухоль-ассоциированный антиген PRAME, в перспективе пригодных для лечения онкологических заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны и синтезированы бифункциональные линкерные реагенты на основе гидрофильных олигоэтиленгликолей и производных пентаэритрита для сайт-специфической модификации антител. В качестве функциональных групп были использованы оксиамины, азиды и терминальные алкины.
2. Сульфо-производные цианиновых красителей в составе линкера позволяют спектрофотометрически определить стехиометрию конъюгатов антител.
3. Реакция окисленных периодатом иммуноглобулинов G с N-защищёнными оксиаминами в буфере с pH меньше 4.5 даёт продукты оксимного лигирования *in situ*. Показано сохранение аффинности при данном способе модификации антител (для антител к белку PRAME, бН8).
4. Получены N-этоксипропилиден-защищённые оксиаминовые производные флуоресцентных красителей. С их помощью были получены флуоресцентные антитела к опухолевому белку PRAME и применены для детекции антигена на поверхности опухолевых клеток.
5. С помощью разветвлённых линкеров получены флуоресцентные антитела с увеличенной нагрузкой по красителю. Показано, что краситель sCy5 в малой степени подвержен самогашению в полимеченных конъюгатах.
6. Комбинация периодатного окисления гликанов антител и оксимного лигирования использована для синтеза конъюгатов антитело-цитотоксический препарат. В качестве цитотоксического агента были использованы доксорубин и монометилауристин Е. Разработан одностадийный и три двухстадийных подхода к получению таких конъюгатов. Подходы были применены к антителам к опухолевому белку PRAME. Показано, что белок PRAME может быть использован в качестве мишени для конъюгатов антитело-препарат.

Личный вклад автора. Основные результаты получены лично автором или при его непосредственном участии. 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 разрабатывала линкеры и методы их синтеза, нарабатывала вещества для изучения их физико-химических характеристик и установления структуры, анализировала данные по физико-химическим характеристикам веществ (интерпретировала масс-спектры, спектры ЯМР), проводила конъюгацию полученных линкерных молекул с антителами, обрабатывала полученные результаты, а также участвовала 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 ИБХ РАН и в рамках научного сотрудничества с другими организациями: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (В.А. Мисюрин, А.Е. Бармашов, Ю.П. Финашугина), 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).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (24–28 июля 2022 г., Новосибирск); всероссийской научной конференции «Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней», школе-конференции молодых ученых «Органическая химия: Традиции и Современность» (16–21 сентября 2022 г., Лоо, Сочи); конференции МОБИ-ХимФарма (12–14 октября 2021 г.); на XXXII и XXXIII зимних международных молодёжных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (10–13 февраля 2020 г. и 8–11 февраля 2021, Москва); на III объединённом научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (3–8 октября 2021, Сочи–Дагомыс).

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 197 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов,

выводов, списка цитируемой литературы, включающего 292 ссылки, и 47 приложений. Диссертация содержит 56 рисунков, 15 схем и 5 таблиц.

Публикации. По материалам работы опубликовано 5 статей в международных рецензируемых журналах и 11 тезисов докладов на научных конференциях и симпозиумах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Белок PRAME (*Preferentially expressed antigen in melanoma*), относящийся к раково-тестикулярным антигенам, сверхэкспрессируется при ряде онкологических заболеваний и является важным диагностическим маркером. В норме этот белок отсутствует в соматических клетках, но при патологии наблюдается появление этого белка в цитозоле, ядре и на поверхности клеточной мембраны. Коллегами из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (В.А. Мисюрин и др.) совместно с ООО «Генотехнология» (А.В. Мисюрин и др.) была выделена мембранная форма белка PRAME и получено моноклональное антитело 6H8 к нему.

Это антитело может быть использовано как для детекции белка в клетках для иммунотипирования больных, так и для разработки терапевтических препаратов. Прямая детекция связывания антитела с PRAME возможна с помощью проточной цитометрии. Для этого антитела должны содержать флуоресцентную метку. В связи с этим возникла необходимость разработки надежной процедуры флуоресцентного мечения антитела, сохраняющей его аффинность. Периодатное окисление гликанов подходит для этой цели, так как при их окислении не затрагивается антигенсвязывающий центр. 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 или цитотоксического препарата.

Периодатное окисление иммуноглобулина 6H8

Для выбора наиболее оптимальных условий периодатного окисления, а именно температуры, концентрации окислителя и времени проведения реакции, антитела были подвергнуты модификации при различных условиях: при двух концентрациях периодата, 5 мМ и 20 мМ, при комнатной температуре и при 0°C (Рис.1). В качестве буфера был выбран 20 мМ ацетат с рН 5.0 и 150 мМ NaCl. Во всех случаях реакция продолжалась в течение 30 мин. После чего 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 рН 5.0. Модифицированные антитела анализировались методом иммуноферментного анализа (ИФА)¹ (Рис.1).

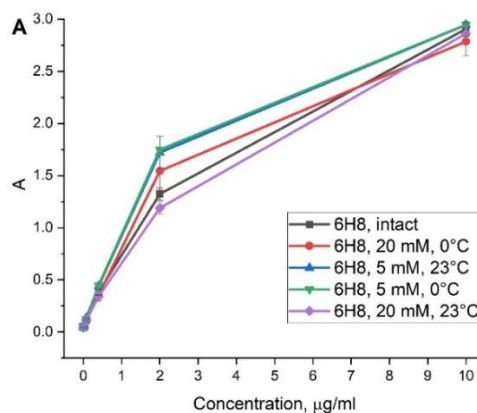


Рис. 1. ИФА окисленных антител 6H8 к рекомбинантному белку PRAME. Окисление при различных концентрациях периодата натрия NaIO_4 и различных температурах в течение 30 мин. После окончания реакции все антитела были обработаны семикарбазидом (2 мМ, рН 5.0, 60 мин, 23°C).

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

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 рН 5.0 для получения антител с карбонильными группами, пригодными для дальнейшей модификации.

Получение флуоресцентного конъюгата

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 1). Этот подход основан на широко используемых методах – модификации карбонильных соединений *O*-алкилгидроксиламинами и Cu(I)-катализируемом циклоприсоединении терминальных алкинов к азидам.

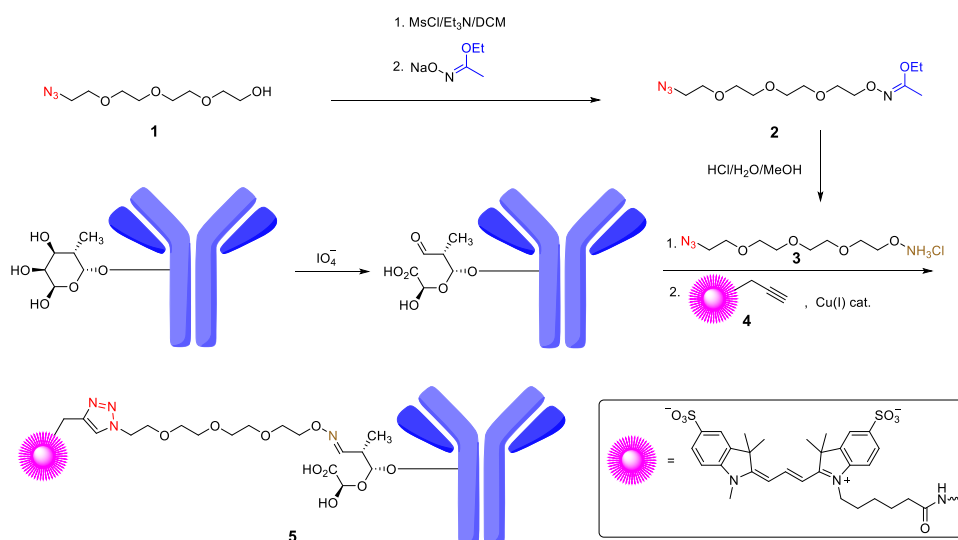


Схема 1. Получение флуоресцентно меченого антитела. Схематически изображено окисление L-фукозы в альдегидо-кислоту.

Синтез азидо-оксиаминового реагента **3** осуществляли из известного азидоспирта **1** с использованием этоксиэтилиденовой защитной группы для гидроксиламина (Схема 1). Ранее в превращении вещества **1** в реагент **2** защищенный гидроксиламин использовали Вос и фталимидную защитные группы. Мы обнаружили, что более удобной защитой является этоксиэтилиденовая группа. Алкилирование этил-*N*-гидроксиацетимидата натрия мезилатами спиртов с последующим удалением защиты в мягких условиях является удобным методом получения соответствующих *O*-алкилгидроксиламинов. Проведение реакции в смеси *трет*-бутанола и изопропанола (1:1) позволило получить защищенное производное **2** с выходом 80% (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 выходом 92%.

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 Cu3 **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. Для этого был получен спектр поглощения в УФ и видимой области. Далее по соотношению интенсивности поглощения на максимумах и молярных коэффициентов поглощения была определена нагрузка N красителя **4** на одну молекулу антитела (DOL, degree of labeling), которая составила 6 (Рис. 2).

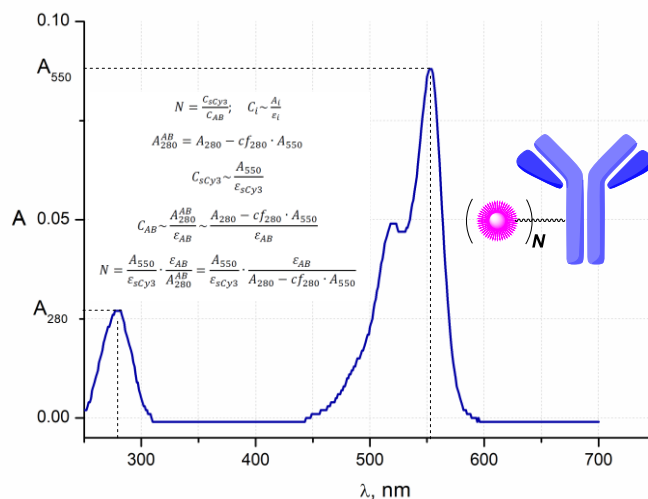


Рис. 2. Спектр поглощения конъюгата антитела с сульфированным красителем СуЗ и определение стехиометрии (нагрузки, N) модификации антитела красителем.

Свойства антител, меченых сульфо-СуЗ

Для определения способности антител 6Н8, меченых красителем сульфо-СуЗ, распознавать белок PRAME, использовались клетки линии K562, экспрессирующие мембранный PRAME. Серия экспериментов на проточном цитометре² показала, что антитела связывались с цитоплазмой более чем 98% пермеабелизованных клеток K562 (Рис. 3, слева). Эти же антитела были использованы для окрашивания цитоплазмы клеток mel P, причем связывание также было зафиксировано с цитоплазмой более 98% клеток (Рис. 3, справа). Таким образом, антитела сохранили способность связываться с нативным белком PRAME, находящимся в цитоплазме клеток. Клетки мышинной меланомы не окрашивались.

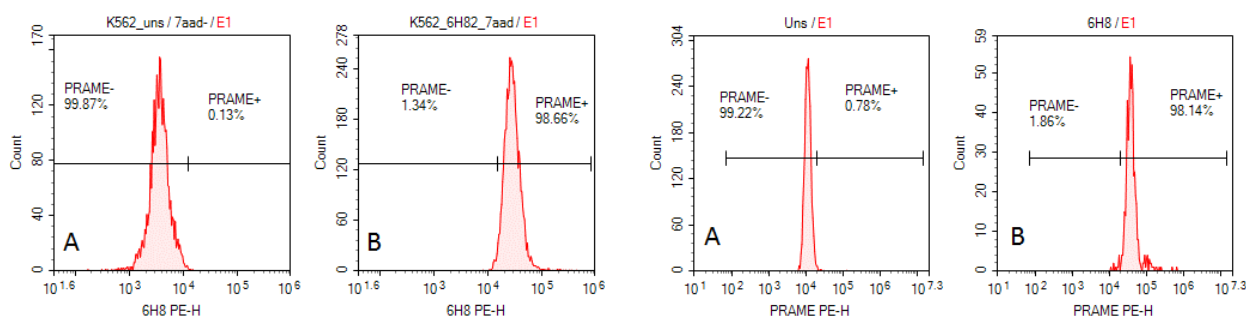


Рис. 3. Слева: пример окрашивания клеток K562 антителом 6Н8, меченым сульфо-Су. А – неокрашенные клетки, В – окрашенные клетки. Справа: пример окрашивания клеток mel P антителом 6Н8, меченым сульфо-Су. А – неокрашенные клетки, В – окрашенные клетки.

Оптимизация условий оксимного лигирования

Далее мы обнаружили, что этоксиэтилиденная защитная группа может быть удалена в слабокислом буфере (значения pH 4.5 и менее). Это позволило нам получить ранее недоступные красители – более яркие и стабильные спектральные аналоги флуоресцеина – Alexa488 и

² Выполнены коллегами в НИИЦ им. Блохина

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 N-защещенный оксиамин, хорошо хранятся 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. 4).

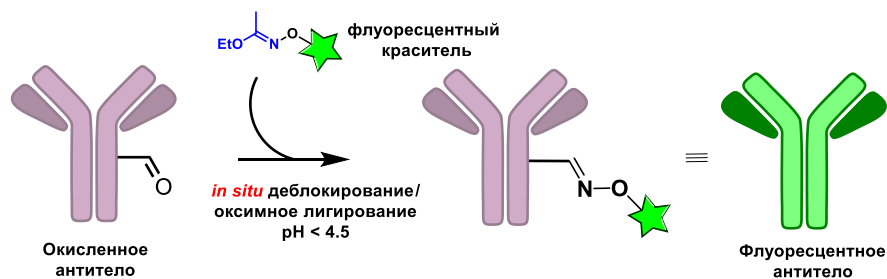


Рис. 4. Методология подхода деблокирования защищенного оксиамина *in situ* и последующего лигирования по карбонилам окисленных антител.

Кроме того, этоксиэтилиденовая защитная группа устойчива в различных условиях химических превращений, что открывает возможности по дальнейшей функционализации молекулы. 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-гидроксисукцинимидными (NHS) эфирами целевых красителей – BODIPY FL (BDP-FL), 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) и Alexa488 (AF488). В результате были получены защищенные оксиаминовые производные **7–9** (Схема 2). При попытке деблокировать оксиаминовую группу и получить красители со свободным оксиамином происходило быстрое разрушение хромофора. При этом защищённые производные были устойчивы.

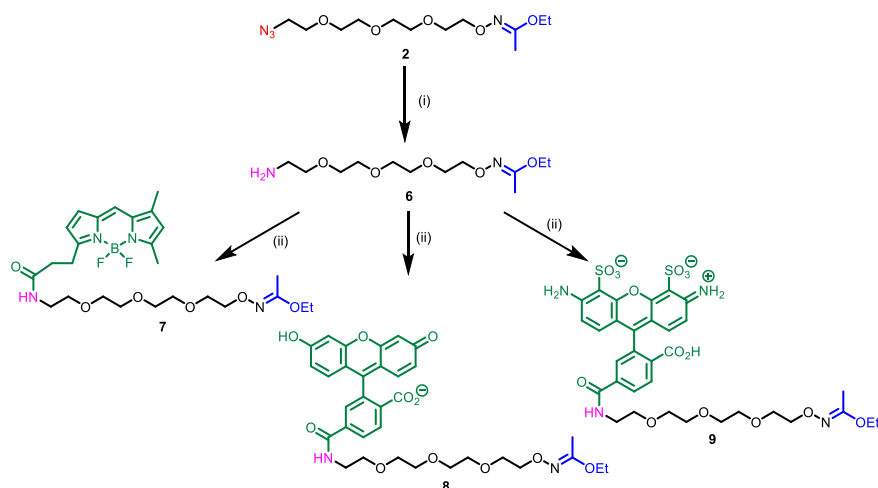


Схема 2. Синтез этоксиэтилиден-защищенных оксиаминовых производных флуоресцентных красителей. Реагенты и условия: (i) PPh₃, THF, 2 ч, далее H₂O; (ii) краситель NHS-эфир, DMF, DIPEA, 0°C

Далее полученными красителями были модифицированы моноклональные анти-PRAME антитела 6H8. Мечение проводилось по упомянутому выше протоколу, за исключением буфера, в котором проводилось непосредственно оксимное лигирование. В ходе экспериментов было установлено, что наилучшим буфером для эффективного деблокирования красителя *in situ* является 20 мМ цитратный буфер с pH 3.0–3.5 и 150 мМ NaCl. В таких условиях

лигирование полностью протекало за 2 ч. Видимых следов агрегации иммуноглобулинов (помутнения раствора) не наблюдалось.

Степень мечения антитела красителем была определена по спектрам поглощения конъюгата. Для FAM-конъюгата она составила 4, для BDP-FL – 2 и для Alexa488 – 2.5 молекулы красителя на одно антитело (Рис. 5А). Максимумы эмиссии флуоресцентных антител находятся на тех же длинах волн, что и у исходных красителей FAM и AF488 (520 нм), BDP-FL (509 нм) (Рис. 5В).

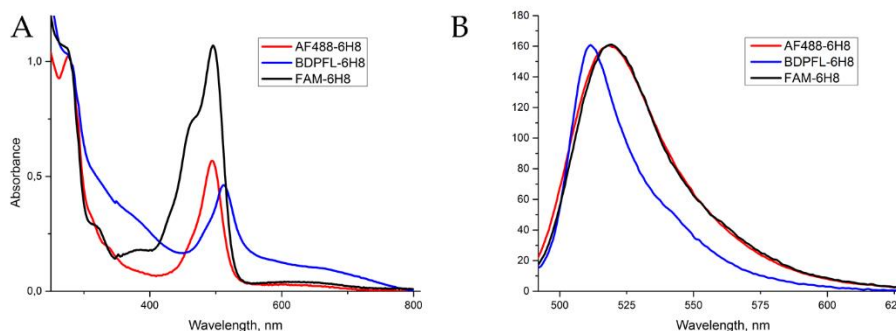


Рис. 5. А) Нормализованные спектры поглощения флуоресцентно меченных антител; В) Нормализованные спектры флуоресценции меченных красителями антител ($\lambda_{ex} = 484$ нм)

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. 5А,В).

Детекция PRAME с помощью проточной цитометрии

Для детекции были использованы две PRAME-положительные клеточные линии K562 и АМО-1. Клетки были окрашены флуоресцентно мечеными антителами и протестированы (Рис. 6). Данные проточной цитометрии показали, что клетки этих линий, окрашенные флуоресцентными антителами, дают значительно более сильный сигнал, чем клетки, окрашенные изотипическим контролем. Уровень экспрессии белка PRAME в клеточных линиях K562 и АМО-1 составляет примерно $1393 \pm 83\%$ и $414 \pm 29\%$ относительно белка ABL, соответственно. Исследования активности PRAME в клеточной линии АМО-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.

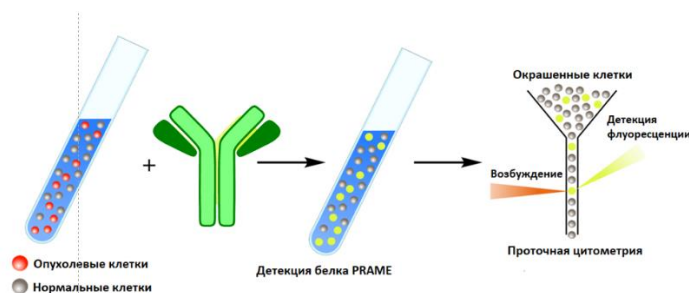


Рис. 6. Детекция клеток, экспрессирующих мембранный белок PRAME, с помощью проточной цитометрии

Активность гена PRAME и интенсивность окрашивания мембраны клеток АМО-1 оказалась ниже, чем у клеток K562. Это было ожидаемо, так как уровень мРНК PRAME и количество белка находятся в прямой зависимости: чем меньше мРНК, тем меньше зрелого белка.

Наиболее высокая интенсивность окраски была получена с помощью антител, меченных BDP-FI и FAM красителями. Поэтому для дальнейших экспериментов были отобраны FAM-модифицированные антитела. Были проведены исследования на образцах костного мозга пациентов с онкогематологическими заболеваниями.³ Бластные клетки пациентов с острой миелоидной лейкемией были успешно окрашены флуоресцентными антителами (Таблица 1).

Таблица 1. Окрашивание клеток костного мозга больных острой миелоидной лейкемией; данные представлены в единицах средней флуоресцентной интенсивности

Пациент	Уровень экспрессии гена (% относительно ABL)	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.

Флуоресцентные антитела с увеличенной нагрузкой

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, позволят 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) вместо медь-катализируемой реакции циклоприсоединения (CuAAC). SPAAC был выбран, так как он в меньшей степени нарушает аффинность антитела по сравнению с CuAAC.

Для проверки гипотезы об усилении сигнала за счет большей нагруженности антитела красителем, было решено сравнить антитела с повышенной нагрузкой с флуоресцентными антителами, получающимися при модификации 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. 7).

В качестве исходного материала для создания новых бифункциональных разветвленных ядер был использован ранее полученный триазид **23** на основе пентаэритрита (Схема 3А). 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 оксамин **25** из мезилата **22** и натриевой соли этил-N-гидроксиацетимида в соответствии с ранее описанным методом (Схема 1).

Как было описано ранее, защитная группа может быть удалена в кислом буфере при pH 3–4.5, после чего происходит мгновенное лигирование с карбонильной группой антител. Следует отметить, однако, что длительная инкубация антител при значениях pH 3 или ниже может потенциально привести к снижению аффинности чувствительных антител.

³ Выполнены коллегами в НМИЦ им. Блохина

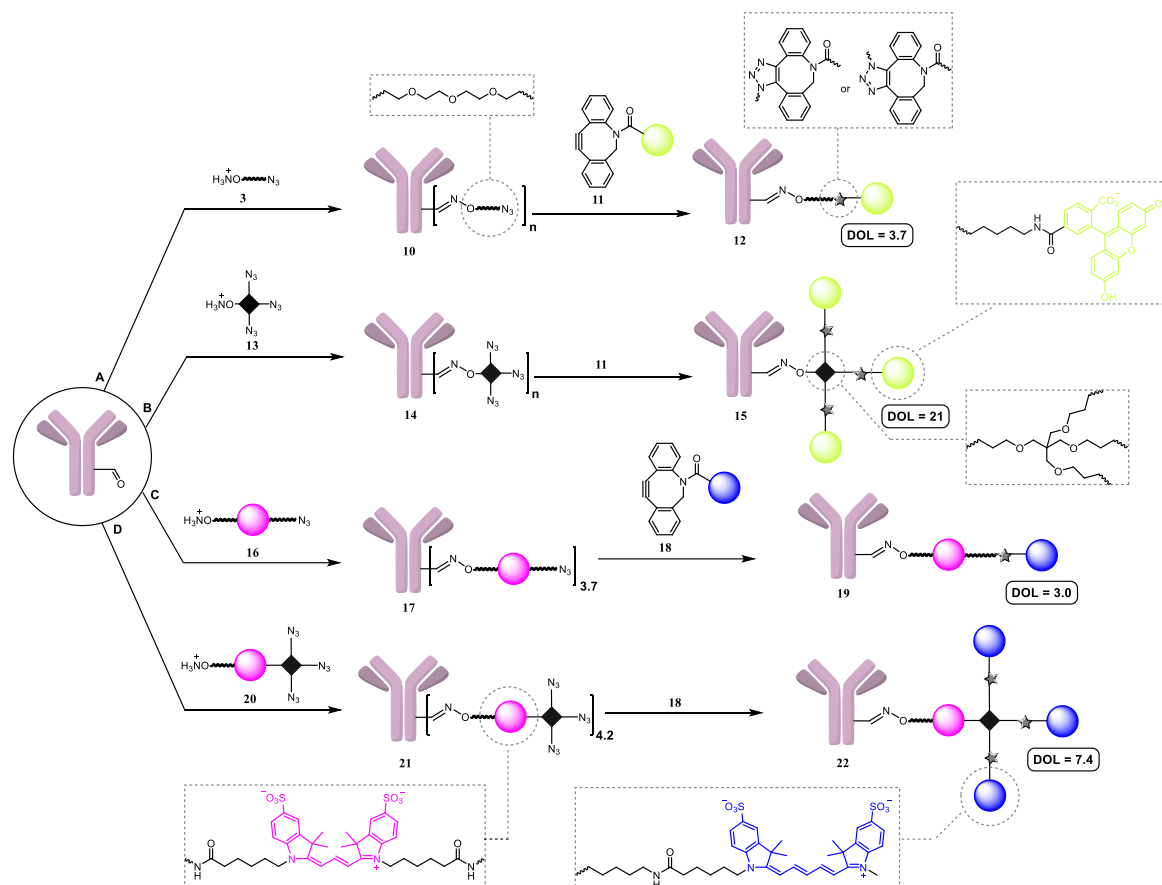


Рис. 7. Общая схема получения флуоресцентных конъюгатов с увеличенной нагрузкой

Для минимизации этих побочных явлений проводили подбор условий. Было обнаружено, что оптимальное значение pH для деблокирования/оксимного лигирования *in situ* составляет 4.0. При таком pH 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 антитела 2–4.

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. 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 3А).

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 3А). Бифункциональный линкер **27** сам по себе может быть интересен для различных применений. В нашем случае он был соединен с производным сульфо-Су3 **28** с получением бифункционального флуоресцентного линкера **20** (Схема 3В).

Превращение **28** в **31** проводилось с использованием конденсирующего реагента TSTU в тройной системе растворителей DMF–1,4-диоксан–H₂O. 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 вводился в реакцию с реагентом **6** с получе-

нием **30** (схема 3В). Кислотная депротекция приводила к получению свободного оксиаминового варианта **20** флуоресцентного линкера **30**; аналогичным образом получен линкер **16** (Схема 4А).

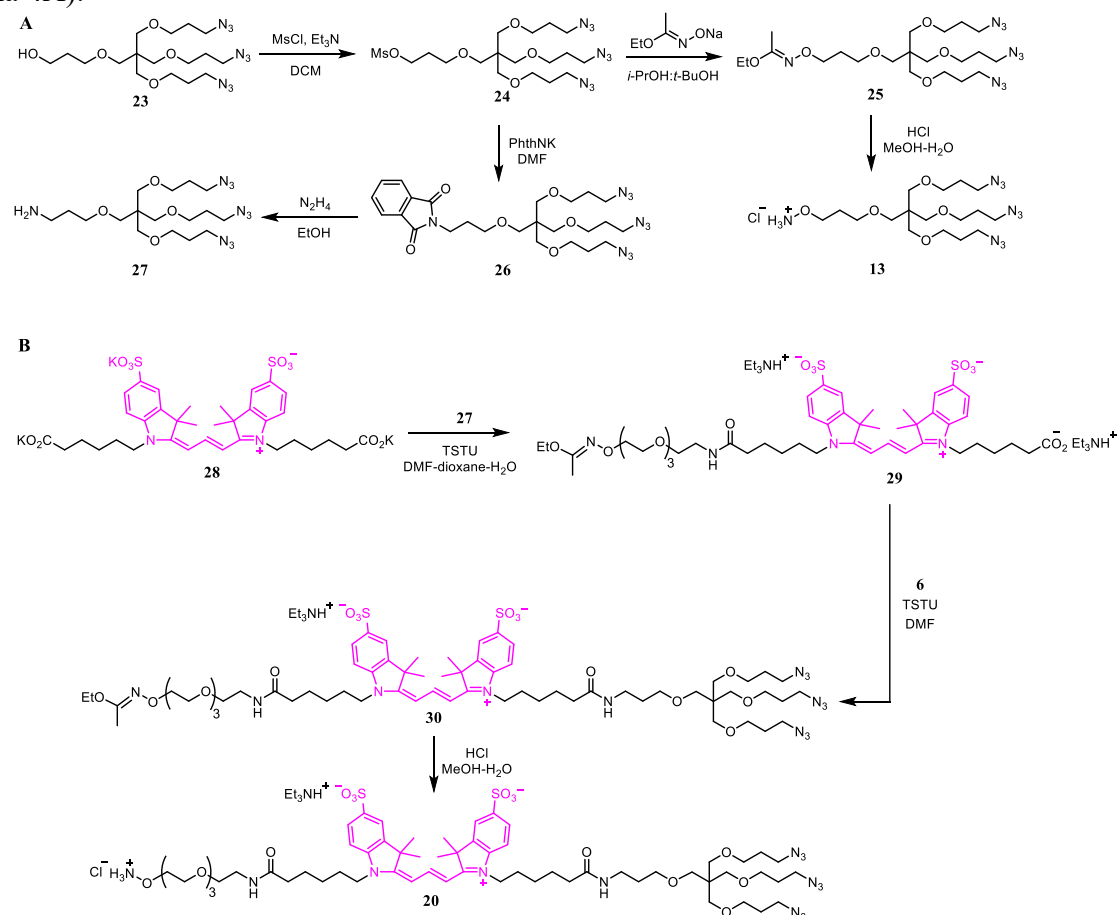


Схема 3. Получение разветвленных линкеров

Сначала были получены антитела, меченные разветвленным реагентом **13** (Схема 2В). В качестве контроля использовали антитело, меченное линейным линкером **3**, полученное по отработанной методике (Схема 2А). Полученные конъюгаты были очищены и введены в реакцию с флуоресцеиновым производным дибензоциклооктина (DBCO) **11**, которое подходит для реакции клика с азидами в биомолекулах, в результате чего были получены линейные и разветвленные FAM-конъюгаты **12** и **15**. Аналогичным образом получали конъюгаты **17** и **21** с флуоресцентными линкерами **16** и **20**, соответственно (Схема 2 С, D). Затем они были модифицированы sCy5-DBCO красителем **18**.

Стехиометрия конъюгатов красителей была определена методом спектрофотометрии. 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. 8А).

Напротив, конъюгаты **17** и **21**, синтезированные в аналогичных условиях (Рис. 7С, D), имеют сравнимую степень модификации (Рис. 8В), 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 4В) и измерили соотношение поглощения sCy3/sCy5 на их максимумах (Рис. 8D). Несколько удивительно, что значение (0.91) оказалось намного выше ожидаемого ($[\epsilon_{548} \text{ sCy3} + \epsilon_{548} \text{ sCy5}] / \epsilon_{646}$

$sCu5 = (1.62 \times 10^5 + 1.20 \times 10^4) M^{-1}cm^{-1} / (2.71 \times 10^5) M^{-1}cm^{-1} = 0.64$). Эти данные были использованы для оценки степени модификации **17** с помощью *sCu5*-DBCO, которая протекала с выходом 82%, давая конъюгат **19** с DOL 3.0. В аналогичных условиях разветвленный конъюгат **21** дал конъюгат **22**, который обладал более высокой DOL 7.4, как рассчитано по поглощению *sCu5* (Рис. 8B,C).

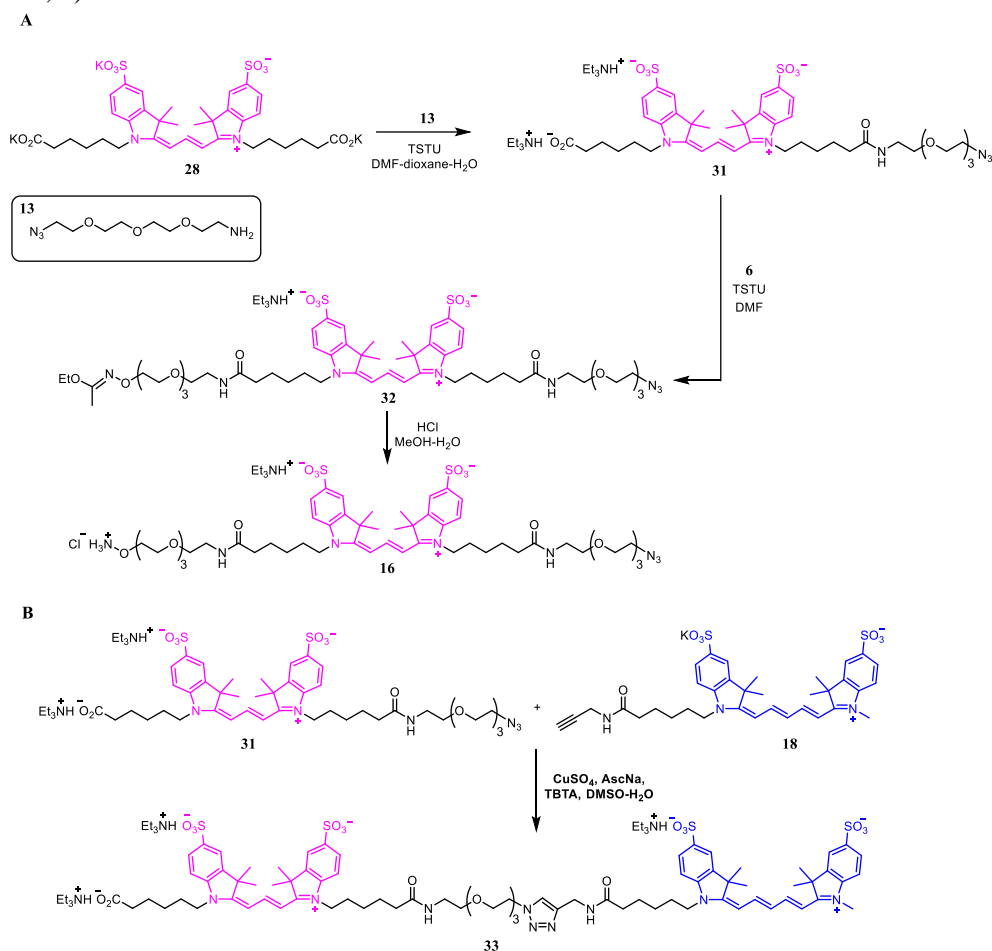


Схема 4. Получение бифункционального линкера с красителем и модельного конъюгата красителей *Cu3* и *Cu5*

Для оценки флуоресцентных свойств меченых антител были записаны спектры эмиссии флуоресценции четырех конечных конъюгатов (Рис. 9). Хотя разветвленный конъюгат **15** демонстрировал более высокую интенсивность флуоресценции по сравнению с конъюгатом **12** (Рис. 9А), примерно двукратное увеличение было не пропорционально более чем пятикратной разнице в DOL (21 против 3.7). Это несоответствие можно объяснить самотушением флуоресценции 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. 9В). Отчасти это может быть связано с более длинным линкером, соединяющим фрагменты красителя с ядром в **22** по сравнению с **15** (Рис.7).

Для дополнительного подтверждения структуры конъюгатов **19** и **22** мы изучили эффект FRET в паре *sCu3*-*sCu5* (Рис. 9C,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*.

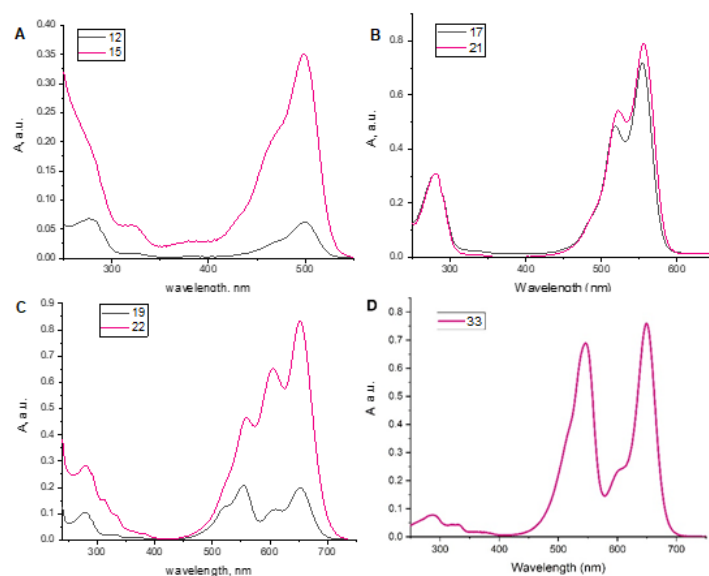


Рис. 8. (A-C) UV-Vis спектры FAM-конъюгатов (12-15) и sCy3-sCy5 (19-22) антитела 6H8, нормализованных по концентрации антитела. (D) Спектр поглощения конъюгата sCy3-sCy5 33

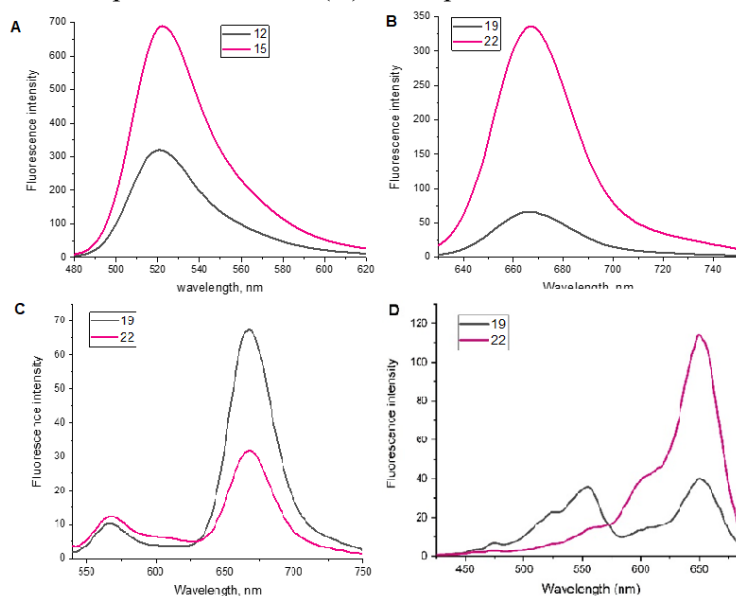


Рис. 9. Спектры флуоресценции конъюгатов 6H8, нормализованные по концентрации антитела (A) Спектр эмиссии 12 и 15, длина возбуждения 460 нм. (B) Спектр эмиссии 19 и 22, длина волны возбуждения 610 нм. (C) Спектр эмиссии 19 и 22, длина волны возбуждения 520 нм. (D) Спектр возбуждения 19 и 22, длина волны поглощения 710 нм

Также с помощью ИФА было проверено сохранение аффинности у всех конъюгатов. Было показано, что сродство к антигену в основном не нарушено (Рис. 10). Флуоресцентные конъюгаты затем были протестированы на линиях клеток, заведомо экспрессирующих мембранную форму PRAME (линии ТНР-1, К562, MelP и WI-38 со сверхэкспрессией PRAME) с помощью проточной цитометрии.⁴ Определяли медианную интенсивность флуоресценции окрашенных клеток, а неокрашенные клетки использовали в качестве контроля. Полученные данные обобщены в Таблице 2.

Для конъюгатов 12 и 15 на основе флуоресцеина флуоресценция регистрировалась в канале FITC. Для линий К-562, ТНР-1 и MelP разница между окрашенными клетками и контролем была незначительной, а достаточная флуоресценция наблюдалась только для PRAME-

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

экспрессирующего WI-38. Разветвленный конъюгат **15** оказался хуже, чем его линейный аналог **12** (Таблица 2), что, вероятно, обусловлено сочетанием нескольких факторов: (1) самотушением флуоресцеина и (2) более низким сродством конъюгата **15** к антигену по сравнению с **12** (Рис. 10). 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 становится ниже, чем ожидалось.

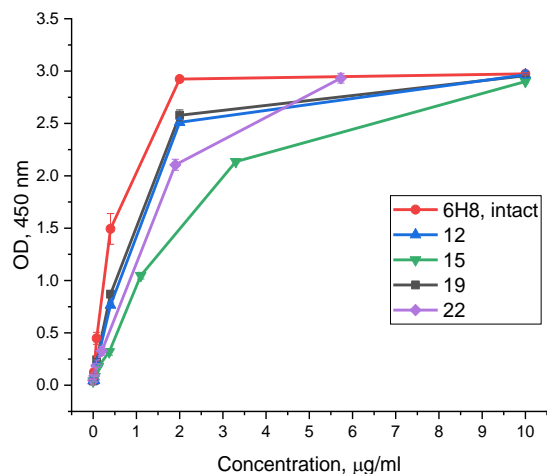


Рис. 10. ИФА флуоресцентных конъюгатов. Сохранение аффинности линейных конъюгатов **12** и **19** и разветвленных конъюгатов **15** и **22** к рекомбинантному белку PRAME

Таблица 2. Медианная интенсивность флуоресценции

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

В случае конъюгатов **19** и **22** была зарегистрирована хорошо детектируемая 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 2). В данном случае более высокий DOL успешно трансформировался в повышенную флуоресценцию клеток благодаря отсутствию самотушения 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.

Конфокальная микроскопия

Для изучения связывания флуоресцентно меченых антител с антигеном PRAME была проведена конфокальная микроскопия PRAME-положительной линии клеток K562 (Рис. 11).⁵ Мечение антителами было проведено на живых клетках при 37°C. Затем они были зафиксированы параформальдегидом для предотвращения пермеабиллизации и связывания AF488-меченых антител с внутриклеточной формой белка PRAME. Мембрана и ядро были окрашены красителями PKH26 и DAPI, соответственно.

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

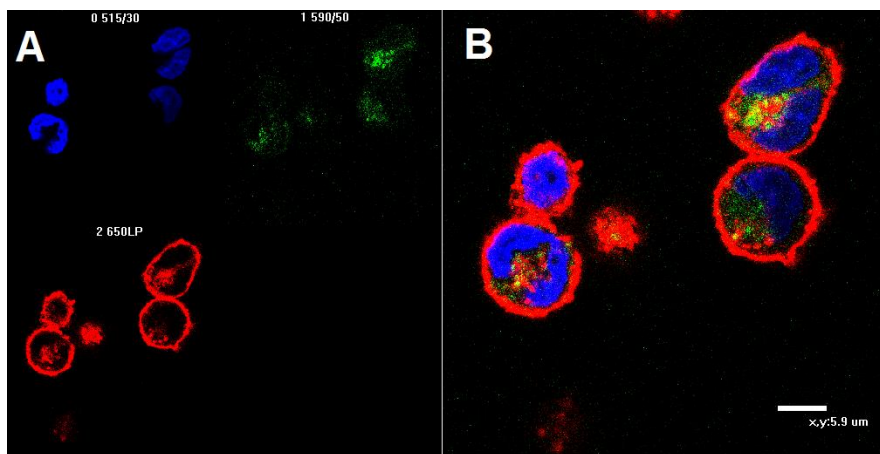


Рис. 11. Конфокальная микроскопия линии клеток K562, окрашенных AF488-мечеными антителами к белку PRAME, съемка в индивидуальных каналах (А), сложение (В).

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

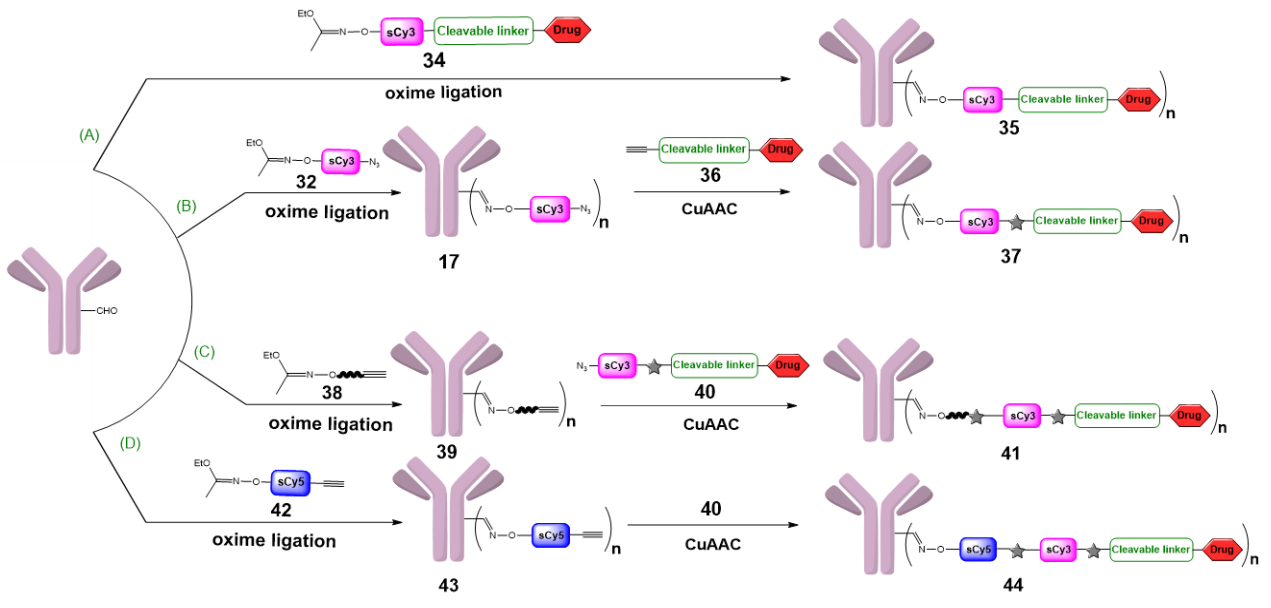
Терапевтические конъюгаты антител

Было логично применить разработанный метод сайт-специфической модификации для синтеза ADC. Основные варианты сборки конъюгата представлены на Схеме 5.

Подход А. Наиболее простым и очевидным подходом является синтез всей целевой молекулы, содержащей функциональную группу для конъюгации с антителом (этоксиптилидензащищенный оксиамин), краситель для контроля стехиометрии (сульфоцианин **32**, sCy3), цитотоксический препарат (доксорубин) и расщепляемый катепсиновый линкер (Val-Cit-PABA). Подобный реагент **34**, как предполагалось, будет способен реагировать с карбонильной группой окисленного антитела, давая модельный ADC (Схема 6).

Стехиометрия конъюгата может быть установлена спектрофотометрически: благодаря наличию красителя можно будет точно установить сколько именно фрагментов доксорубина находится на одной молекуле антитела (сравнивая поглощение IgG в области 280 нм (ϵ 210 000 $M^{-1}cm^{-1}$) и поглощение sCy3 в области 548 нм (ϵ 162 000 $M^{-1}cm^{-1}$). Таким образом планировалось удалить в кислом буфере этоксиптилиденную защитную группу *in situ*, что позволит свободной оксиаминовой группе прореагировать с карбонилем антитела, образуя целевой конъюгат. Однако возникли трудности, так как молекула доксорубина также имеет карбонильную группу. Предположение, что альдегидная группа на молекуле антитела значительно более реакционноспособна, чем кетонная 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 7). 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.



Структуры составных частей линкера:

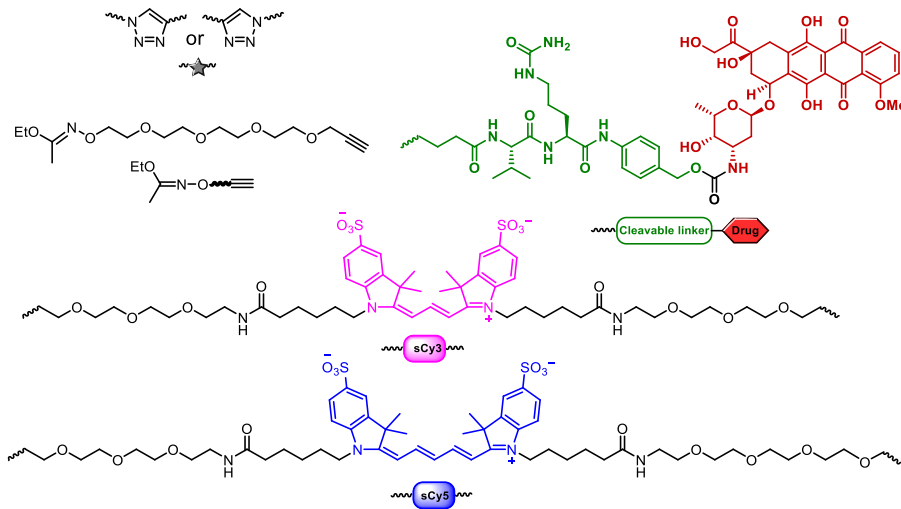


Схема 5. Подходы к сборке ADC с использованием оксимного лигирования окисленного IgG и флуоресцентных линкеров на основе сульфонианиновых красителей

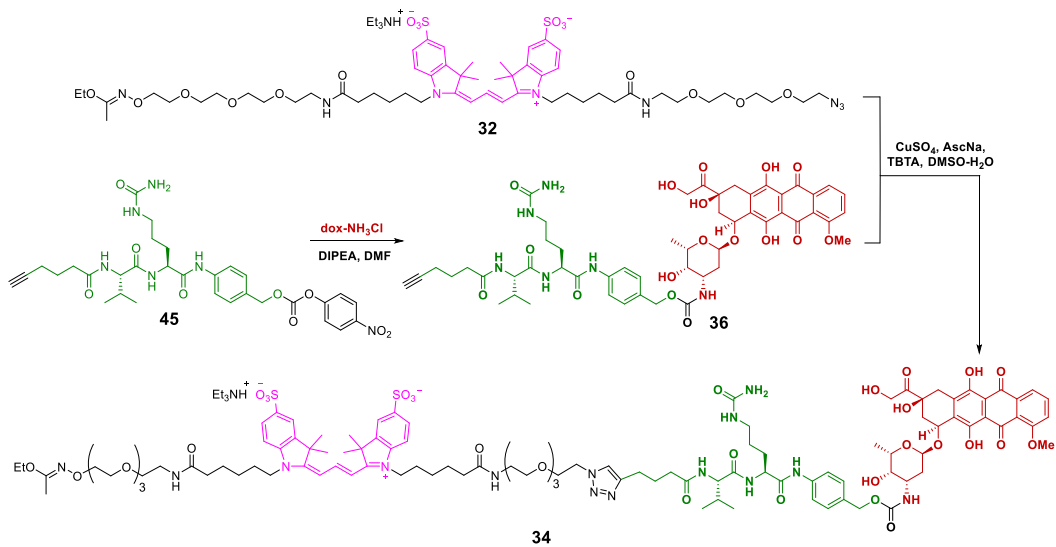


Схема 6. Синтез sCy3-Val-Cit-AVA-доксорубинового конъюгата 34

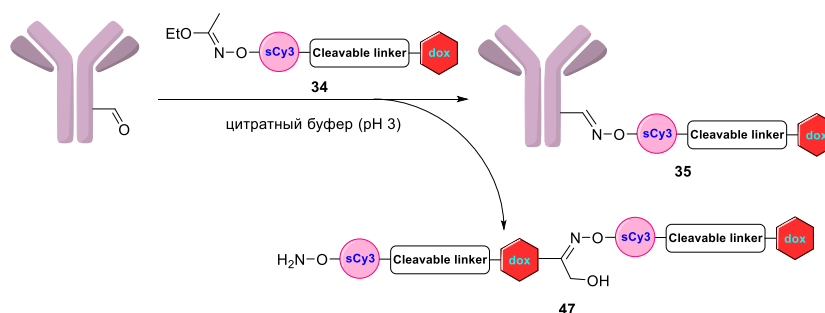


Схема 7. Побочная реакция в процессе получения конъюгата по пути А

Несмотря на то, что в данном случае подход не оправдал ожиданий, он может оказаться эффективным в случае для лекарственных молекул, не содержащих карбонильной группы (что продемонстрировано далее).

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 присоединение 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 доксорубицина не должна вступать в реакцию. Конечно, по причине того, что доксорубицин 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 8) (Рис. 12).

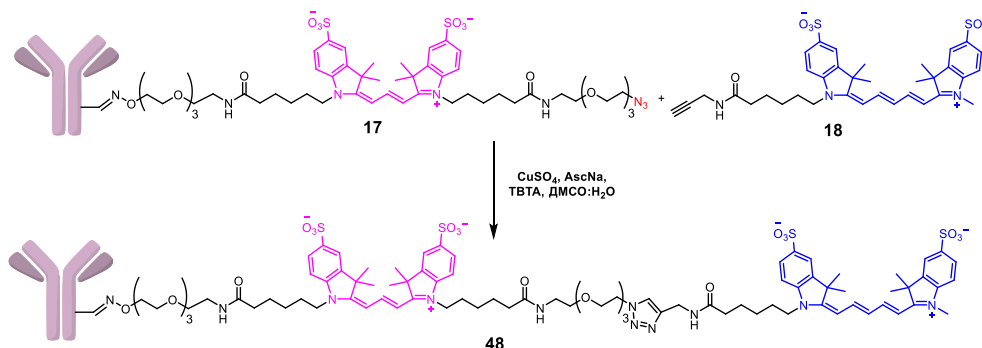


Схема 8. Модельный конъюгат sCy3 и sCy5 для оценки выхода клик-реакции на антителе

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 DMSO (более 30%), приводящие к повреждению иммуноглобулинов и значительной агрегации. Таким образом было обнаружено, что этот подход не является оптимальным для синтеза ADC.

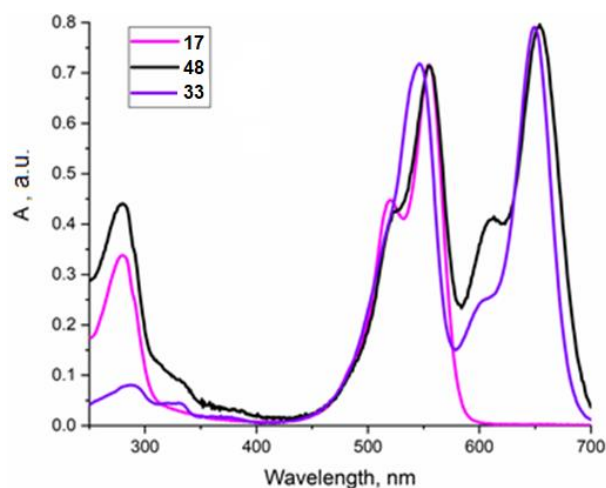


Рис. 12. Спектр UV/Vis конъюгатов бН8 **17** и **48** в сравнении с низкомолекулярным конъюгатом sCu3-sCu5 **33** в водном растворе

Подход С. Для увеличения растворимости модифицирующего реагента и обеспечения контроля стехиометрии, был синтезирован реагент **40** (Схема 10 А), более растворимый в воде благодаря гидрофильной природе красителя sCu3. Окисленные антитела были лигированы с оксиамин содержащим алкиновым линкером **38** в условиях, описанных выше (Схема 10Б). 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 с высоким выходом. Далее алкиновое антитело было промодифицировано реагентом **40** с помощью клик реакции CuAAC (Схема 10Б). Полезная нагрузка в получившемся конъюгате может быть оценена 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.

Подход D. Несмотря на то, что подход С 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 (Схема 10В). 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. 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.13).

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.

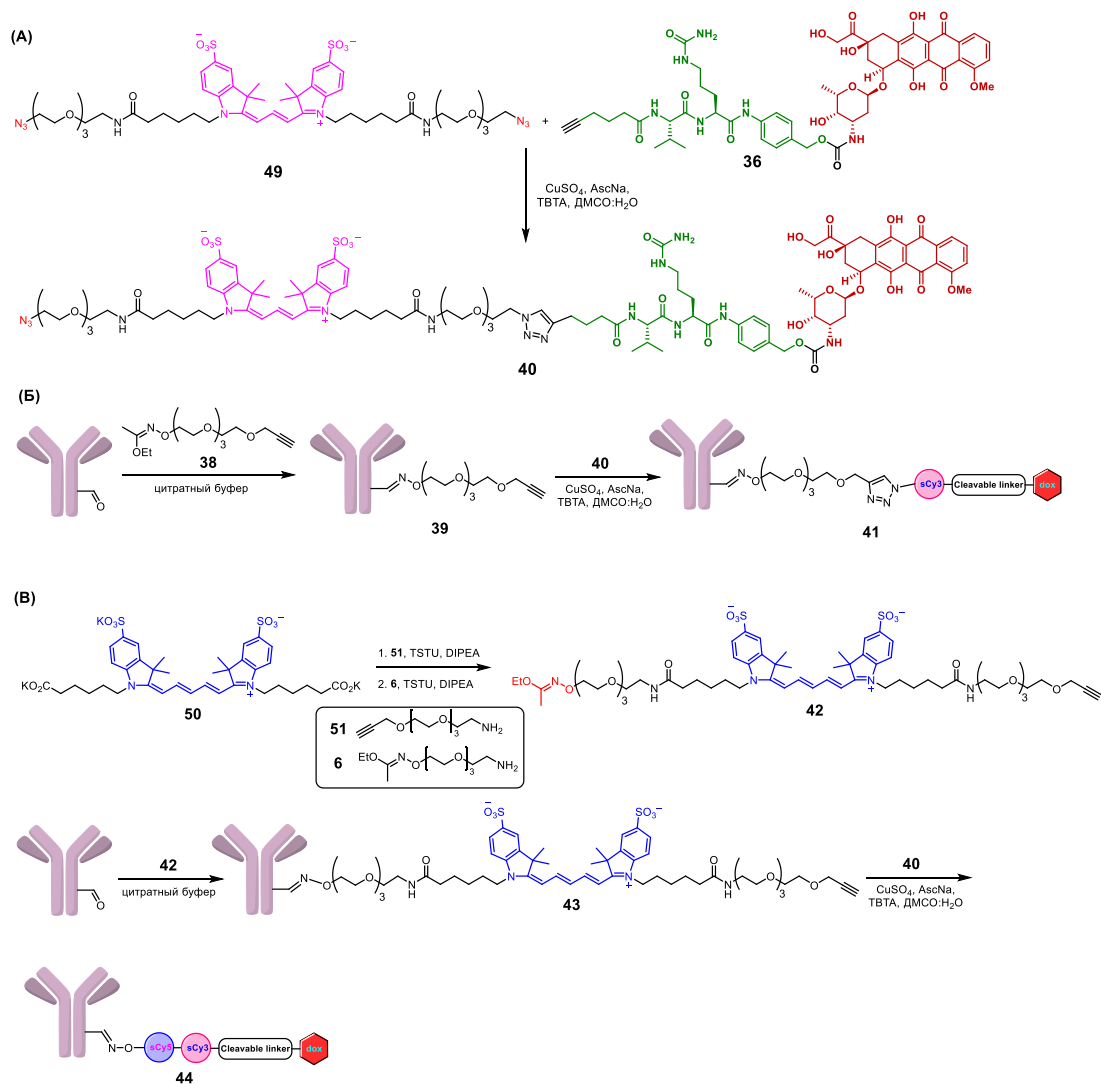


Схема 10. А) Синтез азидного реагента **40**. Б) Синтез конъюгата **41** по подходу С. В) Синтез конъюгата **44** по подходу D

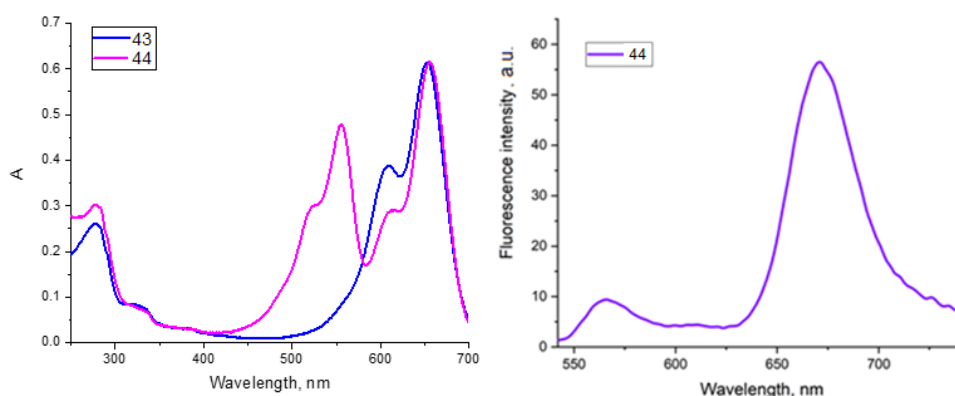


Рис. 13. UV/Vis спектр поглощения промежуточного конъюгата **43** и ADC **44** в буфере PBS, pH 7.4. Спектр флуоресценции конъюгата **44** (спектр эмиссии, длина волны возбуждения 520 нм).

В дальнейшем было решено также получить конъюгаты, содержащие более активный препарат, такой как монометилауристатин E (ММАЕ). Это цитотоксическое вещество обладает в 1000 раз более низкими значениями IC_{50} – 1 нМ против 1 мкМ для доксорубина, и действует как ингибитор сборки микротрубочек. В отличие от

доксорубинина, 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 MMAE был соединен с sCu3-защищенным оксиамином **32** (Схема 11).

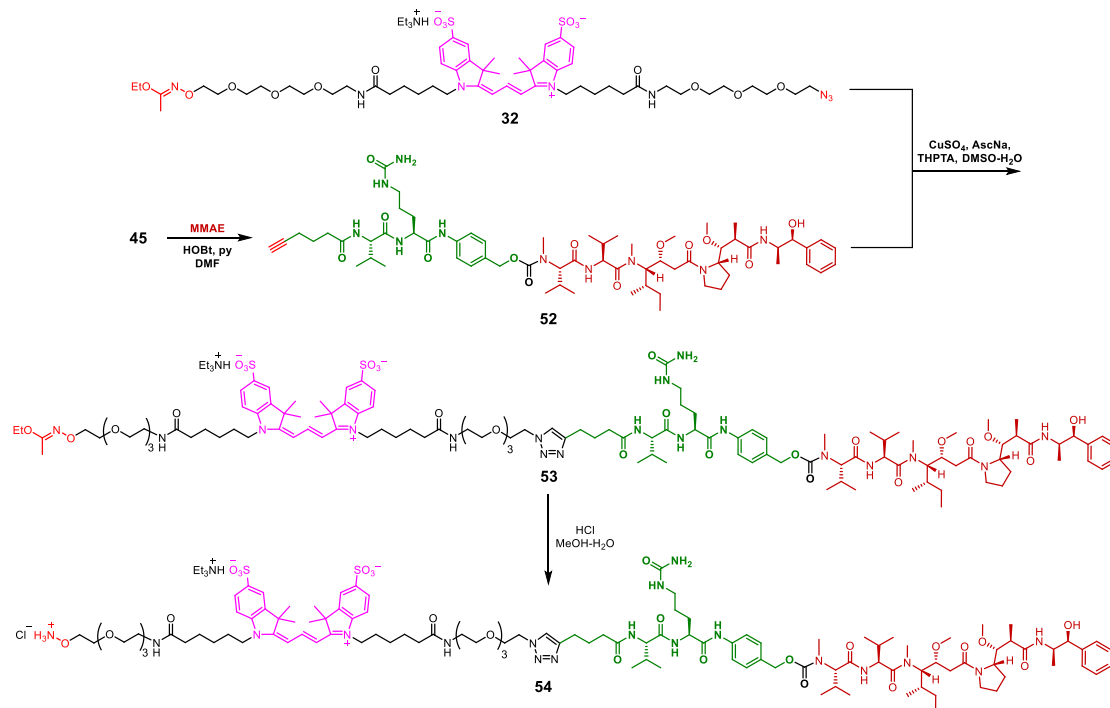


Схема 11. Синтез линкера с MMAE **54**

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, этоксиэтилиденная 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 (Рис.14).

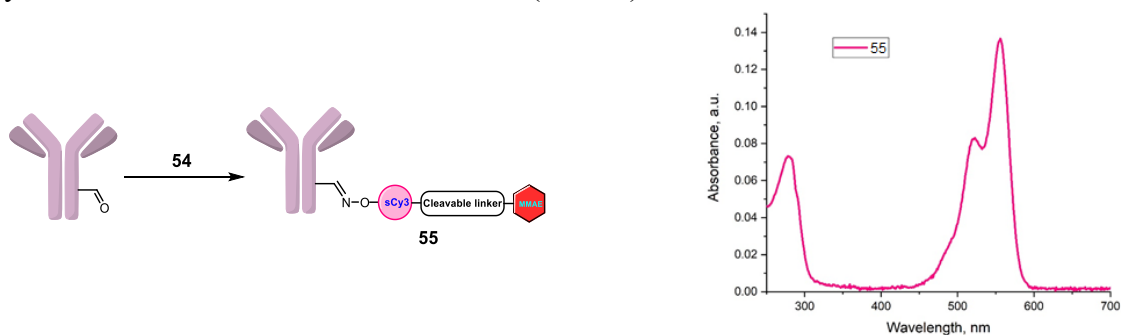


Рис. 14. Синтез конъюгата антитела бН8 с линкером **54**. UV/Vis спектр конъюгата **55**

Также был проведен анализ ИФА с использованием иммобилизованного рекомбинантного белка PRAME для определения влияния модификации на аффинность антител бН8. 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. 15).

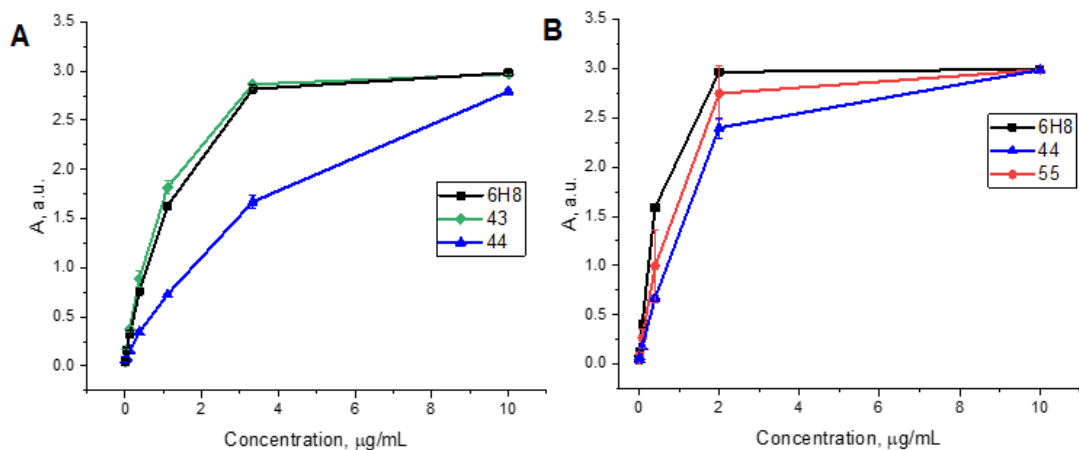


Рис. 15. ИФА анализ конъюгатов **43**, **44** и **55**

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 СТ26 (Рис. 16–18).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 MMAE, значительно снизилась ($IC_{50} = 47$ нМ), тогда как немодифицированное антитело 6H8 не проявило токсичности (Рис. 16А). Кроме того, мы проверили цитотоксичность свободного MMAE и конъюгата sCy3-MMAE **54** ($IC_{50} < 15.6$ нМ для обоих). Конъюгат **54** проявил меньшую цитотоксичность по сравнению с MMAE (Рис. 16А), что, вероятно, связано с его меньшей способностью проникать через клеточную мембрану из-за заряженного цианинового фрагмента молекулы.

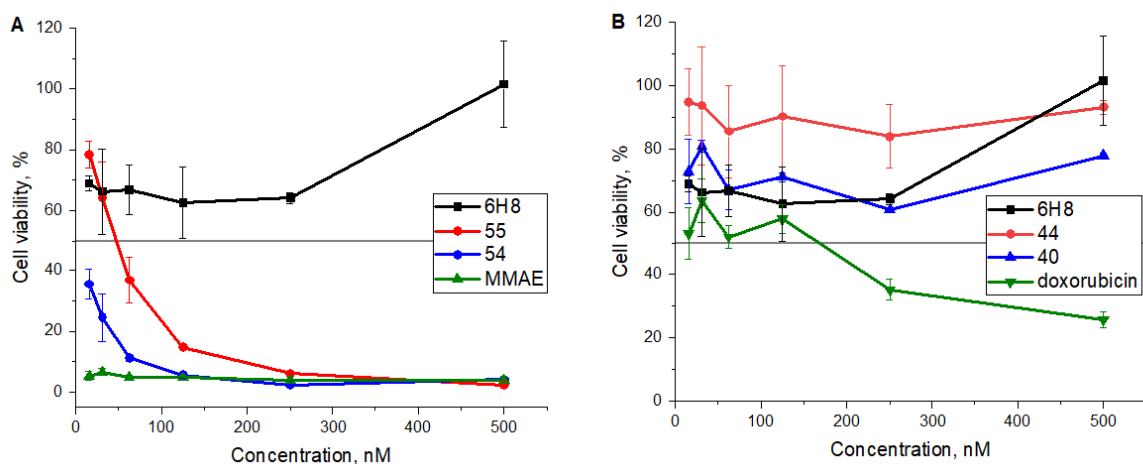


Рис. 16. МТТ анализ выживаемости PRAME(+) клеточной линии mel P, спустя 72 ч инкубации с (А) **54**, **55**, свободным MMAE и интактным антителом 6H8; (В) **40**, **44**, свободным доксорубицином и интактным антителом 6H8

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

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 (Рис. 16В).

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. 17А). Конъюгаты **44** и **40** на основе доксорубина оказались неэффективными, в то время как свободный доксорубин проявил довольно сильную цитотоксичность ($IC_{50} = 44$ нМ) (Рис. 17В).

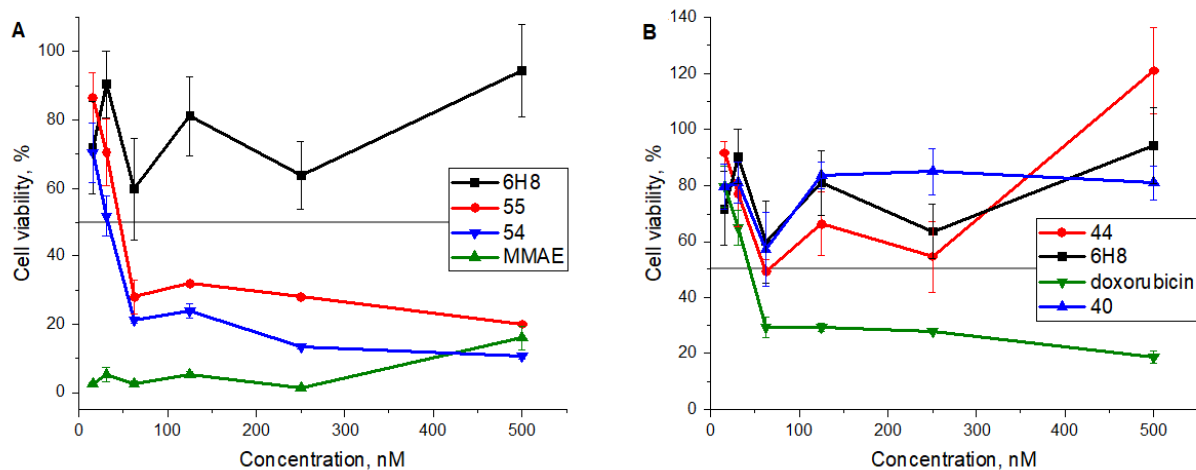


Рис. 17. МТТ анализ выживаемости PRAME(+) клеточной линии ТНР-1, спустя 72 ч инкубации с (А) **54**, **55**, свободным MMAE и интактным антителом 6H8; (В) **40**, **44**, свободным доксорубином и интактным антителом 6H8

В случае клеточной линии мышинной колоректальной карциномы СТ26 (Рис. 18А,В), которая не экспрессирует PRAME в мембранной или цитозольной форме, не наблюдалось снижения жизнеспособности после обработки конъюгатом **55** (Рис. 18А) или **44** (Рис. 18В). В этом случае цитотоксичность проявляли только MMAE ($IC_{50} = 22.4$ нМ), доксорубин ($IC_{50} = 0.19$ мкМ) и конъюгат **54** (0.49 мкМ).

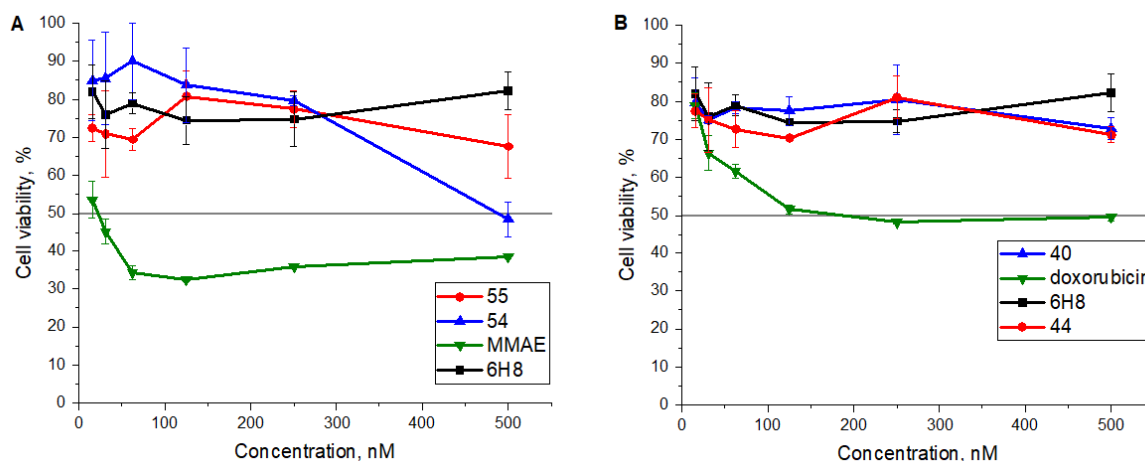


Рис. 18. МТТ анализ выживаемости PRAME(-) клеточной линии СТ26, спустя 72 ч инкубации с (А) **54**, **55**, свободным MMAE и интактным антителом 6H8; (В) **40**, **44**, свободным доксорубином и интактным антителом 6H8.

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 доксорубин недостаточно токсичен для использования в препаратах анти-PRAME ADC.

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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Sapozhnikova K.A.**, Gulyak E.L., Brylev V.A., Misyurin V.A., Oreshkov S.D., Alexeeva A.V., Ryazantsev D.Y., Simonova M.A., Ryabukhina E.V., Popova G.P., Tikhonova N.A., Lyzhko N.A., Barmashov A.E., Misyurin A.V., Ustinov A.V., Alferova V.A., Korshun V.A. 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 V.A., Simonova M.A., Ryabukhina E.V., Alexeeva A.V., Tikhonova N.A., Lyzhko N.A., Popova G.P., Misyurin A.V., Ustinov A.V., Korshun V.A., Alferova V.A., Ryazantsev D.Y., Brylev V.A. Branched linkers for site-specific fluorescent labeling of antibodies. *Molecules*, **28** (1), 425 (2023). <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. *Биоорганич. химия*, **47** (6), 775–784 (2021). <https://doi.org/10.31857/S013234232105033X>
Engl. transl.: **Sapozhnikova K.A.**, Misyurin A.V., Pestov N.B., Meleshkina E.G., Oreshkov S.D., Ganzhula E.P., Mikhailova A.S., Korshun V.A., Misyurin V.A., Brylev V.A. Detection of the PRAME protein on the surface of melanoma cells using a fluorescently labeled monoclonal antibody. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47** (5), 1077–1085 (2021). <https://doi.org/10.1134/S1068162021050332>

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>

Тезисы конференций и симпозиумов

1. Коршун В.А., **Сапожникова К.А.**, Гуляк Е.Л., Орешков С.Д., Верютин Д.А., Михайлова А.С., Мисюрин В.А., Алфёрова В.А., Брылёв В.А. Сайт-специфические диагностические и терапевтические конъюгаты антител. Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24–28 июля 2022 г., Новосибирск, Россия. Материалы конференции, 74. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=49266945&pff=1>
2. **Сапожникова К.А.**, Гуляк Е.Л., Брылёв В.А., Мисюрин В.А., Коршун В.А. Линкеры на основе *O*-алкилгидроксиламинов для получения диагностических и терапевтических конъюгатов антител. Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24–28 июля 2022 г., Новосибирск, Россия. Материалы конференции, 227. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=49267088&pff=1>
3. Гуляк Е.Л., **Сапожникова К.А.**, Брылёв В.А., Мисюрин В.А., Коршун В.А. Флуоресцентно меченные расщепляемые линкеры для терапевтических конъюгатов антител. Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24–28 июля 2022 г., Новосибирск, Россия. Материалы конференции, 170. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=49267030&pff=1>
4. **Сапожникова К.А.**, Гуляк Е.Л., Брылёв В.А., Мисюрин В.А., Коршун В.А. Получение диагностических и терапевтических флуоресцентных антител с помощью линкеров на основе *O*-замещенных гидроксиламинов. Всероссийская научная конференция «Марковниковские чтения: органическая химия от Марковникова до наших дней», школа-конференция молодых ученых «Органическая химия: Традиции и Современность», 16–21 сентября 2022 г., Лоо, Сочи, Россия. Материалы конференции, 81. <http://wsoc-msu.ru/index.php/ru/#>
5. Мелешкина Е.Г., Говтвань А.О., Волков Т.М., Брылёв В.А., Коршун В.А., **Сапожникова К.А.** Бифункциональные и полифункциональные линкеры на основе гидроксиламина для модификации карбонильных соединений. МОБИ-ХимФарма2021, Москва, 12–14 октября 2021 г., XXXIII Зимняя международная молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 8–11 февраля 2021, Москва. Сборник тезисов. М: ИБХ РАН, 2021, 214–215. http://www.spsl.nsc.ru/FullText/konfe/33_Winter_School_2021.pdf
<https://elibrary.ru/item.asp?id=45752013>
6. Брылёв В.А., Мисюрин В.А., **Сапожникова К.А.**, Орешков С.Д., Ганжула Е.П., Михайлова А.С., Мелешкина Е.Г., Коршун В.А. Сайт-специфическая модификация антител оксиаминовыми реагентами. III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, 3–8 Октября 2021, Сочи–Дагомыс. Научные труды, т. 2, 134. http://rusbiochem.org/files/uploaded/Vol2_BIOCHEM22112021.pdf
7. **Сапожникова К.А.**, Мелешкина Е.Г., Брылёв В.А., Коршун В.А. Бифункциональные и полифункциональные линкеры на основе гидроксиламина для модификации биологически активных молекул. III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, 3–8 Октября 2021, Сочи–Дагомыс. Научные труды, т. 2, 139–140. http://rusbiochem.org/files/uploaded/Vol2_BIOCHEM22112021.pdf
8. Коршун В.А., **Сапожникова К.А.**, Кравченко Т.В., Верютин Д.А., Орешков С.Д., Михайлова А.С., Ганжула Е.П., Мелешкина Е.Г., Матхеева Т.В., Пинегина Е.Д., Баранова А.А., Тюрин А.П., Мисюрин В.А., Алфёрова В.А., Брылёв В.А. Химия диагностических и терапевтических конъюгатов иммуноглобулинов. МОБИ-ХимФарма2021, Москва, 12–14 октября 2021 г., Сборник тезисов докладов Седьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». М: «Перо», 2021, 30. <http://mobiochem.org/images/papers2021.pdf>

9. **Сапожникова К.А.**, Говтвань А.О., Брылёв В.А., Коршун В.А. Бифункциональные реагенты на основе эфиров гидроксилamina для модификации карбонильных соединений. XXXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, ИБХ, 10–13 февраля 2020 г., Сборник тезисов, 29.
10. Кокин Е.А., **Сапожникова К.А.**, Брылёв В.А., Коршун В.А. Конъюгаты антител с малыми молекулами. XXXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, ИБХ, 10–13 февраля 2020 г., Сборник тезисов, 131.
11. **Сапожникова К.А.**, Никитин Т.Д., Слесарчук Н.А., Чистов А.А., Брылёв В.А., Коршун В.А., Устинов А.В. Синтез производных 3-метил-5-(перилен-3-илэтинил)урацила с помощью клик-реакции. МОБИ-ХимФарма2019, Крым, Судак, 15–18 сентября 2019 г., Сборник тезисов докладов Юбилейной V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». М: «Перо», 2019, 219.