

**ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора биологических наук, профессора

Толстиковой Татьяны Генриховны

на диссертацию Боденко Виталины Васильевны «Разработка таргетного конъюгата на основе
каркасного белка и цитотоксина для терапии HER2-экспрессирующих опухолей»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология и

3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы диссертационного исследования.

По данным отдела Международного агентства по изучению рака ВОЗ (МАИР), в мире ежегодно рак диагностируется у 14 млн человек, в 2025 году эта цифра достигла 19 млн в год и к 2035 году - достигнет 24 млн.

К сожалению, Томская область остается лидером по количеству первичной заболеваемости раком в России. В регионе число первичной заболеваемости раком на 23% выше, чем в целом по России и составила в 2025 году - 338 случая на 100 тысяч населения.

Увеличение процента заболеваемости в целом по России можно объяснить повышением качества ранней диагностики и терапии. Однако, еще одной из причин роста заболеваемости — это устойчивость многих видов рака к существующим методам лечения, что подчеркивает необходимость разработки новых эффективных и безопасных, как препаратов, так и их методов доставки.

В настоящее время получила широкое развитие направление – таргетная доставка терапевтического средства, которая позволяет эффективно проникать цитотоксическому агенту в опухолевую клетку и минимизировать токсическое воздействие на здоровые ткани.

Примером технологического прорыва в таргетной анти-HER2-терапии стали конъюгаты моноклональных антител (мкАТ) с цитотоксическими агентами, первым из которых стал трастузумаб эмтанзин.

Высокая распространенность HER2-позитивных опухолей в сочетании с их агрессивным фенотипом и ограничениями существующей таргетной терапии обуславливают актуальность разработки, непосредственно, новых HER2-направленных таргетных терапевтических агентов.

Для улучшения характеристик препаратов и повышение эффективности терапии при разработке новых HER2-направленных конъюгатов применяются различные подходы:

увеличение аффинности связывания с мишенью, одновременное блокирование двух доменов HER2, различные механизмы цитотоксического воздействия на опухолевую клетку, увеличение соотношения цитотоксических агентов на молекулу антитела, использование «эффекта свидетеля», повышение стабильности конъюгата в кровотоке. Конъюгаты антител с лекарственным средством представляют собой моноклональное антитело (мкАТ), ковалентно связанное с низкомолекулярным цитотоксическим агентом посредством синтетического линкера. Антитело в результате связывания с целевой мишенью на поверхности опухолевой клетки и последующей интернализации конъюгата высвобождает высокоэффективный цитотоксический агент внутрь опухолевой клетки, обеспечивая ее гибель.

В настоящее время при разработке таргетных конъюгатов лекарственного средства стали использовать каркасные белки аффибоди. При применении аффибоди, как основу, большое значение имеет оптимизация молекулярного дизайна нацеливающего белка, в частности выбора линкера и цитотоксического лекарственного средства. Для достижения оптимальных фармакокинетических свойств препарата в составе таких конъюгатов в доклинических исследованиях успешно применяют альбумин-связывающий домен ABD035, неструктурированные биоразлагаемые полипептиды PAS и XTEN, состоящие из случайной последовательности аминокислот (пролин, аланин и серин для PAS, аланин, пролин, серин, треонин, глицин и глутаминовая кислота для XTEN) и увеличение гидродинамического радиуса слитых белков.

Диссертационная работа Боденко В.В. посвящена актуальной проблеме - разработке таргетных препаратов-конъюгатов, состоящих из высокоаффинного каркасного белка аффибоди и цитотоксических агентов для HER2-направленной терапии.

Научная новизна

Учитывая все сложности в получении таких препаратов, автором работы удалось впервые разработать методы конструирования HER2-направленных терапевтических конъюгатов на основе каркасного белка аффибоди ZHER2:2891, слитого с альбумин-связывающим доменом ABD, с неструктурированными биоразлагаемыми полипептидами PAS и XTEN, и цитотоксическими агентами DM1 (эмтанзина), MMAE (монометилауристатин E) или MMAF (монометилауристатин F) с включением междоменных глицин-сериновых линкеров G4S, (G3S)₃, (S3G)₃.

Для разработанных конъюгатов впервые определить *in vitro* цитотоксические свойства, высокую специфичность и аффинность к рецептору HER2 и медленную интернализацию.

Для разработанных конъюгатов впервые изучены фармакокинетические свойства *in vivo* и показано, что линкеры с повторами серина (G3S)₃ и (S3G)₃ значимо снижают накопление разработанных конъюгатов в печени, по сравнению с коротким линкером G4S.

Впервые для аффибоди применены стратегии увеличения периода полувыведения с использованием неструктурированных полипептидов XTEN и PAS.

Впервые установлены для исследуемых конъюгатов таргетные свойства *in vivo* в HER2-экспрессирующих ксенографтах опухоли аденокарциномы яичников SKOV3 в сравнении с HER2-негативными ксенотрансплантатами опухоли Ramos (лимфомы Беркитта).

Впервые определен терапевтический эффект *in vivo* с введением конъюгатов ZHER2-G4S-ABD-MMAF и ZHER2-G4S-ABD-DM1 в дозе 2,9 мг/кг в отношении HER2-экспрессирующих ксенографтов аденокарциномы яичников SKOV3.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов, научных положений и выводов по диссертации. Автором работы аргументировано обоснован выбранный метод получения конъюгатов на основе аффибоди, операясь на исследования [Т. Ху, Н. Ding, А. Vorobyeva [et al.], 2021], в которых доказана эффективность молекул аффибоди в качестве носителей низкомолекулярных цитотоксических агентов в составе конъюгатов для терапевтических применений в доклинических исследованиях. Кроме того, для конъюгата молекулы аффибоди ZHER2:2891, слитой с альбумин-связывающим доменом (ABD035), и цитотоксина DM1 продемонстрировано специфическое цитотоксическое воздействие *in vitro* и эффективная регрессия HER2-экспрессирующих опухолей *in vivo*.

Автором работы были сконструированы для исследований конъюгаты на основе аффибоди и доказана их эффективность. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам.

Результаты, корректно интерпретированные с помощью современных статистических методов представлены в таблицах и рисунках. Положения, выносимые на защиту и выводы, соответствуют цели, задачам исследования и фактическим результатам.

Теоретическая и практическая значимость

В результате проведенных исследований наработана линейка новых терапевтических HER2-направленных конъюгатов на основе высокоаффинного каркасного белка аффибоди и оценено влияние структурных доменов полученных конъюгатов на их свойства. Доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* выявили высокую перспективность полученных конъюгатов для разработки нового HER2-направленного терапевтического лекарственного средства. Установлено

высокоспецифичное опухолевое поглощение *in vivo* в HER2-экспрессирующих моделях опухолевого роста. Выявлена эффективная терапевтическая доза полученных конъюгатов при курсовом введении животным с HER2-экспрессирующими ксенографтами опухоли. Полученные данные могут быть использованы для создания новых эффективных таргетных конъюгатов на основе каркасных белков и цитотоксических агентов, предназначенных для терапии опухолей с гиперэкспрессией HER2, а также для модификации структуры существующих таргетных конъюгатов с целью улучшения их фармакокинетических и таргетных свойств и повышения эффективности терапии.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати.

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях и журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, и входящих в международные базы данных и системы цитирования Scopus, Web of Science; Основные положения диссертационной работы были доложены на 9 конференциях в том числе на 2 международных конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация построена по традиционному плану, имеет все необходимые разделы, изложена на 183 страницах, содержит 18 таблиц и 54 рисунка. Библиография включает 210 источников.

Во введении очень подробно обоснованы актуальность темы исследования, обозначены цель и задачи, раскрыта научная новизна исследования, а также сформулирована теоретическая и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» объемом 35 страниц обстоятельно представлена биология рецептора эпидермального фактора роста HER2 (семейство, строение, функции, онкогенную роль, экспрессии HER2 при различных видах рака). Уделено большое внимание препаратам таргетной HER2-направленной терапии, в частности, подробно даны характеристика и свойства препаратов моноклональных антител, конъюгатов антитела с лекарственными средствами (трастузумаб дерукстекан, трастузумаб эмтанзин и т.п.). Обстоятельно рассматриваются механизмы действия основных препаратов HER2-направленной терапии. Приводится подробно структура и краткая характеристика одобренных к применению терапевтических таргетных конъюгатов. Дается описание молекулам моноклональных антител, альтернативных каркасных белков в качестве нацеливающей молекулы - аффибоди их структура, а терапевтическое действие с использованием белковых молекул аффибоди может осуществляться напрямую путем блокирования взаимодействий «лиганд-рецептор», либо же путем

функционализации молекул аффибоди посредством связывания с фрагментами, увеличивающих время нахождения молекулы в плазме крови, и цитотоксичными молекулами, в качестве которых могут выступать радионуклиды, токсические домены (экзотоксины) или низкомолекулярные цитотоксические агенты. Низкомолекулярные цитотоксические агенты рассматриваются в обзоре как химиотерапевтические агенты, используемые в таргетном конъюгате, цитотоксические агенты, нацеленные на микротрубочки тубулина (свойства ауристатина), средства, ингибиторы топоизомеразы, ДНК и РНК-повреждающие средства. Дается определение и понятие линкерам, их свойствам и роли. Стратегия продления периода полувыведения терапевтических белков с использованием рекомбинантных биополимеров на основе аминокислот PAS и XTEN, связывание их с альбумином или альбумин-связывающими фрагментами.

Глава «Материалы и методы», изложенная на 27 страницах, посвящена описанию конструирования молекул трех групп конъюгатов с вариациями структурных компонентов для оценки их влияния на свойства *in vitro* и *in vivo* и выбора оптимальной структуры конъюгата. Применялись различные молекулярные методы оценки качества таргетных терапевтических конъюгатов на основе аффибоди, приведен огромный арсенал примененных современных методов исследования терапевтического действия новых конъюгатов. Обоснованы методы статистической обработки результатов - это двусторонний непарный t-тест, однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим post-hoc анализом по методу Тьюки, логранговый критерий Мантеля–Кокса. Результаты терапии (отсутствие ответа, частичный ответ, устойчивая ремиссия, полная ремиссия) анализировались с помощью критерия хи-квадрат. Анализы проводились с использованием программы Prism, версии 9.3.1 (Graphpad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

В главе «Результаты исследований и обсуждение» автором отражены 2 основных этапа - это весь не простой процесс конструирования терапевтических HER2-направленных конъюгатов на основе каркасного белка аффибоди, содержащего междоменные глицин-сериновые линкеры G4S, (G3S)₃, (S3G)₃, слитого с полипептидными фрагментами ABD, PAS или XTEN и конъюгированного с цитотоксическими агентами DM1, MMAE или MMAF, с чистотой выше 95 %, что является очень важным критерием в получении препаратов.

Второй этап - биоиспытаний полученных конъюгатов. Определены цитотоксические свойства *in vitro* всех конъюгатов на HER2-позитивных клеточных линиях SKOV3, SKBR3 и AU565 со значениями IC₅₀ в наномолярном диапазоне и наибольшим цитотоксическим действием конъюгата ZHER2-G4S-ABD-MMAF. Установлена медленная скорость интернализации (до 42% интернализированной активности через 24 ч инкубации) для всех конъюгатов без значимого влияния

состава междоменного линкера, полипептидных фрагментов, увеличивающих период полувыведения и цитотоксических агентов на уровень и скорость интернализации конъюгатов.

Для измерения аффинности и кинетики связывания исследуемых конъюгатов с HER2-экспрессирующими клетками SKOV3 вводили возрастающие концентрации (1, 2 и 5 нМ) соответствующего ^{99m}Tc -меченного конъюгата для измерения фазы ассоциации, также для ^{99m}Tc -меченные конъюгатов ZHER2-(G3S)3-ABD-DM1, ZHER2-(S3G)3-ABD-DM1, ZHER2-G4S-ABD-DM1 на здоровых мышцах линии NMRI оценены функциональная пригодность, биораспределение и фармакокинетика.

Так, для всех конъюгатов установлено влияние структуры конъюгатов на поглощение в различных органах, а именно, длительное до 10–13 % ВД/г удержание в крови через 4 часа после инъекции с постепенным снижением к 48 часам. Наиболее коротким периодом полувыведения из крови характеризовался ZHER2:2891-(S3G)3-ABD-DM1 ($T_{1/2} = 9,2$ ч), по сравнению с конъюгатами с линкерами (G3S)3 ($T_{1/2} = 10,3$ ч) и G4S ($T_{1/2} = 10,7$ ч).

Конъюгаты, содержащие линкеры с повторами серина, значительно снижали поглощение в печени по сравнению с конъюгатом с линкером G4S. Полипептиды с большей длиной аминокислотной цепи и, соответственно, с большей молекулярной массой, XTEN576, PAS600 и ABD, образующий комплекс с альбумином, наиболее эффективно увеличивали период полувыведения конъюгатов.

Через 4 часа после инъекции наблюдались несколько, но значимо ($p < 0,05$) сниженные уровни поглощения конъюгата с линкером (G3S)3 в желудке, по сравнению с конъюгатом с линкером G4S, а также сниженные уровни поглощения в остатках ЖКТ для конъюгата с линкером (G3S)3 по сравнению с конъюгатом с линкером G4S. Через 24 часа после инъекции уровни поглощения в органах и тканях не имели значимых различий ($p > 0,05$) среди всей группы конъюгатов. Через 48 часов после инъекции наблюдалось значимое ($p < 0,05$) снижение поглощения конъюгата с линкером G4S в легких, по сравнению с конъюгатами с линкерами (G3S)3 и (S3G)3, а также значимое ($p < 0,05$) снижение поглощения конъюгата с линкером G4S в селезенке и мышцах, по сравнению с конъюгатом с линкером (G3S)3. Показано, что выведение всех исследуемых конъюгатов осуществляется преимущественно через мочевыделительную систему.

При применении в экспериментах на BALB/c nu/nu мышцах, несущих ксенографты аденокарциномы яичников SKOV3, показано, что рост опухоли в группе ZHER2-G4S-ABD-MMAF и группе ZHER2-G4S-ABD-DM1 значимо ингибируется по сравнению с ростом опухоли в контрольных группах, но эффективнее в группе ZHER2-G4S-ABD-MMAF. В ходе исследований были выбраны препараты-лидеры - конъюгаты ZHER2-G4S-ABD-MMAF и ZHER2-G4S-ABD-

DM1, которые автором рекомендуются для проведения дальнейших доклинических и клинических исследований в качестве средств для терапии HER2-экспрессирующих видов рака.

Автор аргументированно, с использованием источников современной литературы объяснила полученные результаты, подкрепив их сведениями, представленными в современной научной литературе.

В заключении соискатель логично и последовательно обобщила полученные данные. Выводы диссертационной работы соответствуют цели и задачам работы, сформулированы грамотно и корректно. Содержание автореферата соответствует диссертации и отражает основные результаты, необходимые для суждения об обоснованности выводов.

К диссертационной работе Боденко Виталины Васильевны замечаний не имеется.

В качестве дискуссии хотелось получить ответы на следующие вопросы:

1. Как влияет и влияет ли перестановка междоменных линкеров на специфическую противоопухолевую активность?
2. Каким методом устанавливается опухолевое поглощение *in vivo* в HER2- экспрессирующих моделях опухолевого роста?
3. Как можно объяснить снижение поглощения в печени под действием конъюгатов, содержащих линкеры с повторами серина по сравнению с конъюгатом с линкером G4S?
4. С чем связано снижение поглощения в печени конъюгатов с более длинными гидрофильными линкерами из 12 аминокислот и высоким содержанием серина?
5. Что обозначают цифры в конце полипептидных молекул XTEN576?

Заключение

Диссертация Боденко Виталины Васильевны «Разработка таргетного конъюгата на основе каркасного белка и цитотоксина для терапии HER2-экспрессирующих опухолей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, 3.1.6. Онкология, лучевая терапия является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача, имеющая существенное значение для фармакологии, клинической фармакологии, онкотерапии, онкофармакологии.

Впервые разработаны HER2-направленные терапевтические конъюгаты на основе каркасного белка аффибоди ZHER2:2891, слитого с ABD, PAS или XTEN и цитотоксических агентов DM1, MMAE или MMAF с включением междоменных глицин-сериновых линкеров G4S, (G3S)₃, (S3G)₃. Для разработанных конъюгатов впервые *in vivo* изучены фармакокинетические

свойства, таргетные свойства в HER2-экспрессирующих ксенографтах опухоли аденокарциномы яичников SKOV3 в сравнении с HER2-негативными ксенотрансплантатами опухоли Ramos, а также доказан терапевтический эффект с введением конъюгатов ZHER2-G4S-ABD-MMAF и ZHER2-G4S-ABD-DM1 в дозе 2,9 мг/кг.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, обоснованности выводов, диссертационная работа **Боденко Виталины Васильевны** соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. Постановления правительства РФ от 16 октября 2024 г. № 1382), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией фармакологических исследований
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Новосибирского института
органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения Российской академии наук

Толстикова Татьяна Генриховна

Адрес: 630090, город Новосибирск,
проспект академика Лаврентьева, д. 9
Телефон: 8(383)330-07-01
e-mail: tg_tolstikova@mail.ru

Подпись профессора Т.Г. Толстиковой заверяю

Ученый секретарь НИОХ СО РАН, к.х.н.

«10» июля 2026 г.



Бредихин Роман Андреевич