

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 27.11.2024 г. № 26

о присуждении **Котельниковой Полине Александровне**, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Конструкции на основе наночастиц и рекомбинантных белков для онкотераностики» по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология принята к защите 24 сентября 2024 г. (протокол заседания №17) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) (адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10) и действующим на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель, **Котельникова Полина Александровна**, 27 мая 1994 года рождения, в 2018 году окончила Московский физико-технический институт (НИУ) по направлению «03.04.01 Прикладные математика и физика». В 2022 г окончила аспирантуру ГНЦ ИБХ РАН по направлению 06.06.01 Биологические науки с квалификацией «Исследователь. Преподаватель-исследователь». В настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории молекулярной иммунологии ГНЦ ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии ГНЦ ИБХ РАН.

Научный руководитель – доктор биологических наук, академик РАН, профессор **Деев Сергей Михайлович** (главный научный сотрудник, рук. лаб. молекулярной иммунологии ГНЦ ИБХ РАН).

Официальные оппоненты – **Власов Валентин Викторович**, доктор химических наук, академик РАН, профессор, научный руководитель ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, и **Хомутов Алексей Радиевич**, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт цитологии Российской академии наук (ИИЦ РАН)**, Санкт-Петербург, в своем *положительном* отзыве, подписанном зав. лабораторией динамики внутриклеточных мембран отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта ИИЦ РАН, доктором биологических наук, профессором, Корниловой Еленой Сергеевной и утвержденном директором ИИЦ РАН, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН Томилиным Алексеем Николаевичем, указала, что диссертационная работа Котельниковой Полины Александровны «Конструкции на основе наночастиц и рекомбинантных белков для онкотераностики» полностью соответствует всем критериям (в том числе п.9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным 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; 29.05.2017 г. №650; 20.03.2021 г. №426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. №690; 26.01.2023 г. №101), а сам диссертант, Котельникова П.А., заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе 9 работ по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных изданиях (входят в базы Scopus, Web of Science и/или РИНЦ) общим объёмом 10 п.л. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Котельникова П.А. внесла основной либо существенный вклад:

1. **Kotelnikova P. A.**, Shipunova, V. O and Deyev, S. M. Targeted PLGA-Chitosan Nanoparticles for NIR-Triggered Photo-therapy and Imaging of HER2-Positive Tumors//Pharmaceutics, 2024. Vol. 16, № 1.
2. Shipunova, V. O., Belova, M. M., **Kotelnikova, P. A.**, Shilova, O. N., Mirkasymov, A. B., Danilova, N. V., ... & Nikitin, M. P. Photothermal Therapy with HER2-Targeted Silver Nanoparticles Leading to Cancer Remission // Pharmaceutics. MDPI, 2022. Vol. 14, № 5.
3. Shipunova, V. O., Kolesnikova, O. A., **Kotelnikova, P. A.**, Soloviev, V. D., Popov, A. A., Proshkina, G. M., ... & Deyev, S. M. Comparative evaluation of engineered polypeptide scaffolds in HER2-targeting magnetic nanocarrier delivery // ACS Omega. American Chemical Society, 2021. Vol. 6, № 24. P. 16000–16008.
4. Shilova, O., **Kotelnikova, P.**, Proshkina, G., Shramova, E., & Deyev, S. et al. Barnase-Barstar Pair: Contemporary Application in Cancer Research and Nanotechnology // Molecules. MDPI, 2021. Vol. 26, № 22.
5. Shipunova, V. O., Komedchikova, E. N., **Kotelnikova, P. A.**, Zelepukin, I. V., Schulga, A. A., Proshkina, G. M., ... & Prasad, P. N. et al. Dual Regioselective Targeting the Same

Receptor in Nanoparticle-Mediated Combination Immuno/Chemotherapy for Enhanced Image-Guided Cancer Treatment // ACS Nano. American Chemical Society, 2020. Vol. 14, № 10. P. 12781–12795.

6. Shipunova, V. O., **Kotelnikova, P. A.**, Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Novikov I.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. Self-assembling nanoparticles biofunctionalized with magnetite-binding protein for the targeted delivery to HER2/neu overexpressing cancer cells // J Magn Magn Mater. Elsevier B.V., 2019. Vol. 469. P. 450–455.
7. Belova, M. M., Shipunova, V. O., **Kotelnikova, P. A.**, Babenyshev, A. V., Rogozhin, E. A., Cherednichenko, M. Y., & Deyev, S. M. “Green” Synthesis of Cytotoxic Silver Nanoparticles Based on Secondary Metabolites of Lavandula Angustifolia Mill // Acta Naturae, 2019. Vol. 11, № 2. P. 47–53.
8. **Kotelnikova P. A.**, Shipunova, V. O., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Novikov I.A., Schulga A.A., Deyev S.M., Petrov R.V. Synthesis of Magnetic Nanoparticles Stabilized by Magnetite-Binding Protein for Targeted Delivery to Cancer Cells // Dokl Biochem Biophys. Pleiades Publishing, 2018. Vol. 481, № 1. P. 198–200.
9. Shipunova, V. O., **Kotelnikova, P. A.**, Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. Data on characterization of magnetic nanoparticles stabilized with fusion protein of Barstar and C-term part of Mms6 // Data Brief. 2018. Vol. 21. P. 1659–1663.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента, **Власова Валентина Викторовича**, **положительный**, содержит следующие замечания и вопросы:

1. В работе утверждается синергетическое действие иммунотоксина и адресных наночастиц, нагруженных доксорубицином. Каким методом рассчитывали эффективность сочетанной терапии? Подтверждали ли вы повышение эффективности препаратов на клетках другими методами? Сохраняется ли эффект синергизма и на животных моделях?
2. В работе описывается новый метод модификации наночастиц с использованием связывающего магнетит пептида и пары барназа-барстар. Существуют ли примеры применения такого метода модификации для других типов наночастиц, где эффективность связывания наночастиц подтверждалась бы общепринятыми методами клеточной биологии? В чем преимущество сложной системы бактериальной рибонуклеазы и ее ингибитора перед такими классическими системами, как биотин-стрептавидин?
3. На рисунке 16 диссертации приведены оптические томограммы мышей с исследуемыми наночастицами, однако не приведены численные данные, показывающие эффективность такого контрастирования опухоли. Для чего получали

снимки в двух различных режимах, а не только с использованием оптимальных длин волн для используемого красителя?

4. Работа содержит некоторое количество опечаток, заимствований и англицизмов, подписи на некоторых рисунках выполнены мелким шрифтом, что может затруднять восприятие материала.

Официального оппонента, **Хомутова Алексея Радиевича**. Отзыв **положительный**, содержит следующие замечания и вопросы:

1. В названии и тексте разделов 3.3.3 и 3.3.4 диссертации (стр. 98-101) и на стр. 17-19 автореферата используется не совсем корректное сокращение «наночастицы Ag-PEG-HER2», которое не соответствует природе используемых автором конъюгатов наночастица-(направляющий белок/полипептид). При этом следует отметить, что из текста диссертации и автореферата однозначно следует о каких конъюгатах в действительности идет речь.
2. В списке работ автора, опубликованных по теме диссертации (автореферат, стр. 27), для статей №№ 1, 2, 4 и 5 приведены неполные ссылки – отсутствуют номера страниц или номер публикации.

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв **положительный**, содержит следующие вопросы и замечания:

- 1) В диссертации предложен новый метод модификации наночастиц магнетита. Было бы интересно узнать, каким образом был выбран такой необычный объект, как пептид магнитотактических бактерий? За счет чего он связывает поверхность магнетита? Есть ли специфичность этого взаимодействия? Можно ли привести примеры других подобных белков, подтверждающие универсальность предложенного подхода?
- 2) В работе продемонстрированы фотосенсибилизирующие свойства наночастиц серебра. Есть ли практический смысл в модификации поверхности и присоединения направляющих молекул для частиц, для которых рассматривается внутриопухолевое введение?
- 3) Диссертация написана доступным языком и хорошо проиллюстрирована, но есть некоторое количество недочетов, которые затрудняют восприятие материала. В тексте присутствует ряд опечаток и нарушений согласования слов (например, инфракрасным (стр. 42), наночастицы (стр. 92), лиганды (стр. 94)). Увеличение размера подписей на некоторых рисунках (например, рис. 27, 31 и др.) могло бы улучшить их читаемость.

Отзыв на автореферат д.х.н., в.н.с. лаб. иммунобиохимии ФИЦ Биотехнологии РАН **Жердева Анатолия Витальевича**. Отзыв **положительный**, не содержит замечаний.

Отзыв на автореферат к.б.н., с.н.с. лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Института молекулярной биологии им. В.А.

Энгельгардта» РАН **Корнеева Кирилла Викторовича**. Отзыв **положительный**, не содержит замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: клеточной биологии, нанобиотехнологии, разработке методов доставки противораковых агентов, что подтверждается количеством и высоким уровнем их публикаций в ведущих научных международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы, а также высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Впервые проведено сравнение флуоресцентно меченых направляющих белков (аффибоди, дарпин G3 и трастузумаб) для доставки к раковым клеткам со сверхэкспрессией HER2. Установлена высокая специфичность связывания с HER2-положительными клетками разработанных наночастиц серебра с использованием аффибоди, превосходящая эффективность моноклональных антител. Также продемонстрирован фотосенсибилизирующий эффект PLGA-наночастиц с флуоресцентными красителями и их накопление в опухоли. Впервые исследована возможность комбинированного использования анти-HER2 иммунотоксина DARP-loPE и наночастиц, модифицированных аффибоди и доксорубицином, для адресной противораковой терапии. Разработан новый метод стабилизации и доставки магнитных наночастиц с использованием белковой пары барназа-барстар и связывающего магнетит белка.

Теоретическая значимость. Работа расширяет знания в области создания адресных систем диагностики и терапии онкозаболеваний, а также обосновывает эффективность применения малых белковых скаффолдов (аффибоди и дарпинов) для таргетной терапии. Разработаны новые подходы стабилизации наночастиц и управления их функциональными свойствами. Это закладывает основы для создания комплексных платформ, сочетающих терапевтические и диагностические функции, и способствует развитию нанобиомедицины.

Практическая значимость. Полученные результаты могут быть использованы для создания новых высокоспецифичных средств диагностики и терапии HER2-положительных опухолей. Предложенный модульный метод стабилизации наночастиц позволяет получать многофункциональные конструкции в одной пробирке, без использования методов химической конъюгации, при этом обеспечивает контролируемую

ориентацию биомолекул. Разработанные подходы позволяют создавать эффективные платформы для адресной доставки лекарственных препаратов, диагностики опухолей и снижения дозировок противораковых агентов, что способствует повышению эффективности и безопасности лечения.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, т.к. исследования проведены с помощью современных подходов с использованием методов клеточной биологии, проточной цитометрии, оптической и электронной микроскопии, динамического светорассеяния и др. Все эксперименты выполнены в количестве, достаточном для получения статистической достоверности результатов. Научные положения, выводы и практические предложения построены на основании достоверных результатов исследований, подтверждающихся первичной документацией, и согласуются с поставленными целью и задачами работы. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Результаты собственных исследований изложены убедительно и последовательно и отражают основное содержание диссертационной работы. Представленные в работе результаты не противоречат опубликованным ранее литературным данным по близкой к данной работе тематике.

Личный вклад диссертанта в представленной работе складывается из непосредственного участия в выборе направления научного поиска, разработке цели и задач исследований по теме диссертационной работы, проведении клеточных, молекулярных и других исследований, обосновании полученных результатов. Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии под руководством д.б.н., проф., Деева С.М., к.б.н. ст. науч. сотр. Шипуновой В.О. Основные эксперименты по наработке и очистке рекомбинантных белков, синтезу и характеристике наночастиц PLGA, электронной микроскопии наночастиц, изучению токсичности *in vitro*, специфичности связывания с клетками наночастиц и белков, а также визуализация ортотопической опухоли молочной железы мышей BALB/C, описанные в диссертации, выполнены лично автором. Магнитные наночастицы были получены в лаборатории молекулярной иммунологии ГНЦ ИБХ РАН Шипуновой В.О. и Колесниковой О.А., наночастицы серебра были получены в лаборатории молекулярной иммунологии ГНЦ ИБХ РАН Беловой М.М., конъюгированные аффибоды наночастицы PLGA были получены и охарактеризованы в лаборатории молекулярной иммунологии ГНЦ ИБХ РАН Комедчиковой Е.Н. и Шипуновой В.О., сканирующую электронную микроскопию с лантаноидным контрастированием клеток проводил И.А. Новиков (ФГБНУ "НИИГБ")

Диссертационный совет 21.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Котельниковой Полины Александровны является законченной научно-квалификационной работой, которая значительно расширяет знания о свойствах и методах модификации

адресных наночастиц для терапии и диагностики онкологических заболеваний. Работа написана автором самостоятельно, содержит актуальные новые научные результаты, а по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология. Таким образом диссертационная работа Котельниковой Полины Александровны «Конструкции на основе наночастиц и рекомбинантных белков для онкотераностики», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 № 62).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Удалось ли *in vivo* показать сочетанную терапию с использованием иммунотоксина и наночастиц, которую вы продемонстрировали на клетках в данной работе?

2. При сравнении антитела, дарпина и аффибоди, сравнивали ли вы, сколько молекул садится на поверхность наночастицы и сколько из них сохраняет активность?

Соискатель Котельникова П.А. ответила на задаваемые в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1. На ксенографтной модели HER2-положительных опухолей мы подтвердили *in vivo* эффективность комбинации иммунотоксина и адресных наночастиц, модифицированных аффибоди. Мышам вводили иммунотоксин и адресные наночастицы, нагруженные доксорубицином. Наилучшее уменьшение опухоли достигалось в группе мышей, которым вводили комбинацию этих препаратов.

2. Измеренное общее количество белка на поверхности наночастиц среди трех этих молекул (антитела, дарпина и аффибоди) было минимальным для трастузумаба. Сохранение активности мы оценивали только по связыванию с клетками. Лучше всего связывались наночастицы аффибоди, при этом связывание наночастиц с трастузумабом было сопоставимым – в 1,5 менее эффективным, чем для аффибоди. Наименее эффективно связывались наночастицы с дарпином G3, как мы предполагаем, за счёт геометрических трудностей, потому что этот маленький белок на поверхности крупной наночастицы не мог достигнуть своего адреса связывания у клеточной мембраны на HER2 рецепторе.

На заседании 27 ноября 2024 диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по разработке конструкций на основе наночастиц и рекомбинантных белков для онкотераностики, имеющей важное значение для создания новых методов терапии и диагностики онкологических заболеваний, присудить **Котельниковой Полине Александровне** ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 6 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3. Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф-м.н. Олейников В.А.

27.11.2024 г.

