

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Государственного научного центра Российской Федерации

Института 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 04 декабря 2024 г. № 28

О присуждении **Волкову Дмитрию Васильевичу** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной терапии гемопозитических опухолей» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология принята к защите 01 октября 2024 г. (протокол заседания № 18) Диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Волков Дмитрий Васильевич, 04 сентября 1996 года рождения. В 2020 г. окончил специалитет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по специальности Фармация. С 2020 по 2024 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории биокатализа отдела пептидно-белковых технологий ГНЦ ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории биокатализа отдела пептидно-белковых технологий ГНЦ ИБХ РАН.

Научный руководитель - кандидат биологических наук Степанов Алексей Вячеславович, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра

Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук **Тиллиб Сергей Владимирович**, главный научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий, ФГБУН Института биологии гена Российской академии наук;

Доктор биологических **Судариков Андрей Борисович**, заведующий отделом молекулярной генетики, заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, г. Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном заведующим лабораторией молекулярной иммуногенетики доктором биологических наук Кофиади Ильей Андреевичем и утвержденном директором членом-корреспондентом РАН, доктором медицинских наук Хаитовым Мусой Рахимовичем, указала, что диссертация Волкова Дмитрия Васильевича является завершенной научно-квалификационной работой, которая по своей новизне, актуальности и достоверности полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации 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. №1690; 26.01.2023 г. №101, 25.01.2024 № 62, а ее автор достоин присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 3 работы общим объемом 2 печ. л. в рецензируемых научных изданиях из перечня, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Д.В. Волков внес основной и существенный вклад, включают:

1. Stepanova, V. M.*, **Volkov, D. V.***, Osipova, D. S., Wang, W., Hou, Y., Pershin, D. E., Fadeeva, M.S., Malakhova, E.A., Kulakovskaya E.A., Cuicui, L., Mingfeng, Z., Zang, H., Xia, J., Zhang, D., Mamedov, I.Z., Chernov, A.S., Telegin, G.B., Rubtsov, Y.P., Gabibov

- A.G., Wu, P., Maschan M.A., Stepanov, A. V. Targeting CD45 by gene-edited CAR-T cells for leukemia eradication and hematopoietic stem cell transplantation preconditioning *Molecular Therapy Oncology*. 2024. V. 32. № 3. P. 200843 (* – эквивалентный вклад);
2. **Volkov, D. V.**, Stepanova, V. M., Rubtsov, Y. P., Stepanov, A. V., Gabibov, A. G. Protein Tyrosine Phosphatase CD45 As an Immunity Regulator and a Potential Effector of CAR-T therapy *Acta Naturae*. 2023. V. 15. № 3. P. 17-26;
 3. Ukrainskaya, V. M., Molostova, O. O., Shelikhova, L. N., Pershin, D. E., Kulakovskaya, E. A., **Volkov, D. V.**, Rakhtenko, A.V., Muzalevskii, Y.O., Kazachenok, A.S., Brilliantova, V.V., Osipova D.S., Rubtsov, Y.P., Stepanov A.V., Maschan, M. A. Haploidentical donor-derived memory CAR T cells: first in human experience and in vitro correlative study *Blood advances*. 2022. V. 6. № 19. P. 5582–5588;

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.б.н. Тиллиба Сергея Владимировича.
Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) Небольшое замечание к Литературному обзору: интересно, как происходит взаимосвязь узнающей и эффекторной функций CAR? Есть ли какие-то литературные данные на этот счет?

2) Основные мои замечания к экспериментальной части связаны с оформлением, в первую очередь, раздела Материалы и Методы.

Стр. 41 -При описании ПЦР не указано, какой фермент и в какой концентрации использовали.

Стр. 45-46 -При описании ИФА в краткой схеме эксперимента не указаны ни составы растворов, ни концентрации реактивов, ни время инкубаций и число повторов (при промывках).

При описании ряда процедур используются неопределенные термины, так на стр. 51: «... отбирали необходимое количество клеток ... ресуспендировали в соответствующем количестве клеток объеме холодного буфера ...» и подобное есть в ряде других мест. Желательно было бы иметь больше определенности, например, указания концентрации клеток ...

Стр. 54 -«пакирующих плазмид» - неудачный перевод английского термина, лучше было бы прямо написать: плазмид, содержащих гены, необходимые для сборки лентивируса.

4) Хотя в конце диссертации есть замечательное Приложение, хотелось бы видеть и при описании конкретных экспериментов и рисунков, какие именно антитела были

использованы в данном случае. Так, например, в таблице приложения указано 3-4 варианта анти-CD45 антител из трех разных компаний. Однако, не указано, какие из них использовались в опытах, результаты которых представлены, например на рис. 16 и 22. Интересно, к какому именно домену белка получены антитела и насколько полно эти антитела детектируют различные изоформы CD45?

5) При исходном выборе направляющих гидовых РНК были выбраны 3 различных варианта. Согласно представленным результатам, сработал, и весьма эффективно, только один из 3-х вариантов. Есть ли у диссертанта соображения, почему это так?

На рис. 16,В представлены данные секвенирования в области геномного редактирования, однако, нет дискуссии, какого рода изменения произошли: терминация рамки, изменение кодирующей последовательности? Интересно, на основании чего выбрали 183 других сайта для проверки (предполагаю, что по гомологии с последовательностью гидовой gRNA2)?

6) Подписи к некоторым рисункам, на мой взгляд, недостаточно подробные. Например, на рис. 17 - «Анализ Т клеток после нокаута ...». Желательно указать, какого именно нокаута. Желательно, чтобы рисунки были бы более самостоятельными, и можно было бы их анализировать без дополнительного обращения к тексту ...

7) Хотелось бы больше узнать о технических деталях в описываемом клиническом применении CAR Т препарата, таких, как сколько именно CAR Тm клеток вводили пациентам и как именно это делали (в каком режиме), и как следили за последствиями?

Дискуссионный вопрос: на стр. 69 (результаты) указано, что использовали биспецифический активатор Т-клеток (BiTE) блинатумомаб (рис. 19,А), который связывает CD19 на опухолевой клетке и CD3E на Т-лимфоцитах, активируя ТКР. На рис. 19,Б видно, что цитотоксичность Т клеток и Т клеток с нокаутом CD45 сопоставимы. Мне интересен глобальный вопрос: в чем может быть преимущество дорогой и инвазивной CAR Т технологии по сравнению с использованной здесь технологией биспецифичного клеточного активатора, который можно вводить системно прямо пациенту и избежать клеточных модификаций *ex vivo*?

2. Отзыв официального оппонента д.б.н. Сударикова Андрея Борисовича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: на стр. 66 написано, что «Результаты проведенных экспериментов подтверждают уменьшение количества CD45 в Т клетках после нокаута ниже уровня детекции как с помощью вестерн-блоттинга, так и с помощью флуоресцентно меченых антител». Далее на стр 79 указывается, что «CD45 в большом количестве присутствует на поверхности Т клеток и, вероятно, остаточное количество CD45 на мембране клеток достаточно для взаимной активации и

цитотоксичности». На первый взгляд может показаться, что эти два предложения противоречат друг другу. Однако, как указано на стр 81 (рис 31) схема эксперимента предполагала сначала трансдукцию CAR45, а потом нокаут CD45. На стр 83 написано, что «концентрация дазатиниба 50 нМ создает такие условия экспансии CD45Δ CAR45 T клеток, которые позволяют им продержаться до момента полноценного исчезновения CD45 с поверхности клеток, после чего лизировать оставшуюся после нокаута популяцию CD45-позитивных T лимфоцитов». В связи с вышеизложенным кажутся недообсужденными следующие моменты:

1 - почему выбрана схема сначала трансдукция, а потом нокаут, а не наоборот?

2 - зачем нужен дазатиниб на первом этапе в предложенной схеме?

На стр 90 (рис 41) не описано, как получали клетки костного мозга и какие клетки использовали в качестве контроля.

На стр 95 утверждается, что альтернативой трансгенных мышей могут быть мыши, «гуманизированные» с помощью человеческих РВМС. Однако, РВМС – это зрелые, терминально дифференцированные клетки. Не очевидно, насколько адекватно можно использовать их в качестве модели предтрансплантационного кондиционирования.

Исходя из схемы на стр 105 (рис 51) не совсем понятно, почему при добавлении клеток Јеко-1 их число резко падает, а потом медленно нарастает.

Заболевания «хронический лимфобластный лейкоз» в природе не существует, равно как и «хлороводородной кислоты».

Вероятно, не стоит использовать одновременно в качестве десятичного разделителя в числах и точки и запяты.

Английский термин relapse стоит переводить на русский язык как «рецидив», а не «релапс».

3. Отзыв ведущей организации **Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственного научного центра «Института иммунологии» Федерального медико-биологического агентства. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:**

В работе не рассматриваются причины более низкой секреции провоспалительных цитокинов T- и CAR-T-клетками после нокаута гена, кодирующего CD45.

В главе 4.2.7 о нокаутных по CD45 CAR45-NK-клетках не указано, какое происхождение у клеток-мишеней (T клеток и РВМС) по отношению к CAR45-NK клеткам - аутологичное или аллогенное.

4. Отзыв на автореферат к.б.н. научного сотрудника кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова **Ярошевича Игоря Александровича**. Отзыв положительный, замечаний нет.

5. Отзыв на автореферат к.ф.-м.н. директора ООО «ЭМ Энд ЭС Десижанс» **Косинского Юрия Анзельмовича**. Отзыв положительный, замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и иммунологии, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. В ведущей организации - ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА – ведутся исследования в области иммунологии, механизмов клеточного иммунитета, терапии рака, а также по поиску новых опухоль-специфичных маркеров. Официальный оппонент Тиллиб Сергей Владимирович является специалистом в области молекулярной биологии и иммунологии, исследовании опухолевых маркеров. Официальный оппонент Судариков Андрей Борисович также является специалистом в области молекулярной генетики и гематологии, трансфузиологии. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской и экспертной работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании проведенной соискателем работы впервые показано, что нокаут рецептора CD45 не снижает цитотоксичность Т клеток, но снижает их провоспалительную активность, а также что нокаутные по CD45 CAR45 Т клетки эффективно элиминируют человеческие гемопоэтические клетки *in vivo*. Кроме того, впервые была продемонстрирована эффективная элиминация опухоли с помощью аллогенных CAR19 Т клеток, полученных из Т лимфоцитов памяти гаплоидентичных доноров, в популяции пациентов с рефрактерным течением В клеточного острого лимфобластного лейкоза. Одновременно проведено детальное сравнительное исследование традиционных CAR19 Т и CAR19 Т клеток, полученных из Т лимфоцитов памяти, которое выявило различия в их фенотипе, параметрах истощения, транскриптомном профиле и длительности цитотоксической активности, которые помогают более подробно разобраться в характеристиках таких клеточных продуктов.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что проведенные исследования расширяют представления о механизмах регуляции сигнала активации от Т клеточного и химерного антигенного рецептора. Кроме того, результаты диссертационной работы Волкова Дмитрия Васильевича углубляют понимание иммунологии онкогематологических заболеваний, а также демонстрирует разнообразие методик,

необходимых для изучения Т и NK клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами.

Значение полученных результатов исследований для практики состоит в следующем:

CD45^Δ CAR45 Т и CD45^Δ CAR45 NK клетки, полученные в ходе работы, это специфичные и менее токсичные агенты для одновременного кондиционирования и лизиса гематологических опухолей перед трансплантацией костного мозга, которые несомненно найдут свое применение в клинике в качестве альтернативы для пациентов с онкологией, которые прошли ряд процедур химиотерапии и облучения и как компонент трансплантата, способный к элиминации опухолей, для снижения риска развития рецидива лейкоза после ТГСК;

Результаты исследования аллогенных CAR19 Т клеток, полученных из Т лимфоцитов памяти, как и дальнейшая их характеристика, выявили слабые и сильные стороны таких терапевтических агентов, которые необходимо нивелировать для их успешного клинического применения.

Достоверность достигнутых результатов в исследованиях соискателя сомнений не вызывает. Данные получены в независимых экспериментах в необходимом объеме. Эксперименты проводились с использованием современных научных методов, результаты исследований были получены с применением сертифицированного оборудования. Воспроизводимость результатов была неоднократно продемонстрирована. При анализе данных были использованы современные методы сбора и обработки информации.

Личный вклад Д.В. Волкова в представленной диссертационной работе заключался в планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций. Основные эксперименты, за исключением перечисленных далее, были проведены лично автором.

В рамках создания CD45^Δ CAR45 Т и CD45^Δ CAR45 NK клеток совместно с сотрудниками Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Россия) были выполнены *in vitro* эксперименты по отключению гена *PTPRC*, кодирующего CD45, в Т и NK клетках и оценке эффективности нокаута. Совместно с сотрудниками научного института Скриппса (США) были проанализированы полученные данные в *in vitro* экспериментах. Совместно с сотрудниками Пущинского вивария и НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева были выполнены эксперименты по оценке способности CD45^Δ CAR45 Т к элиминации человеческих CD45⁺ опухолей и РВМС-трансплантата в животных моделях.

В рамках оценки противоопухолевого потенциала CAR19 Т клеток, полученных из Т клеток памяти, сотрудниками НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева было проведено клиническое исследование CAR19 Тm клеток на пациентах с В-клеточным острым миелоидным лейкозом, совместно с сотрудниками НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева был проведен сравнительный анализ транскриптома CAR19 Тm и CAR19 Т клеток и его интерпретация.

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Волкова Дмитрия Васильевича является законченной научно-квалификационной работой. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология». Таким образом диссертационная работа Волкова Дмитрия Васильевича «Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR Т клеточной терапии гемопозитических опухолей», 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 уточняющие вопросы:

1. Отличалась ли эффективность нокаута гена, кодирующего CD45 у Т и NK клеток?
2. Использование только Т клеток памяти и удаление наивных и терминально дифференцированных Т клеток повлияло ли на терапию?

Соискатель Волков Д.В. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

1. Эффективность нокаута была примерно одинаковая, так как использовались программы на приборе, специально подобранные под тип клеток и дающие наибольшую эффективность нокаута.
2. Несомненно, как видно по результатам, удаление этих популяций повлияло на персистенцию аллогенных CAR19 Т клеток памяти у пациентов, эффект терапии был на 60% успешным (полная ремиссия), не было случаев реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) высокой степени интенсивности, так как удаляя эти популяции мы свели риск возникновения РТПХ к минимуму.

На заседании 04 декабря 2024 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по разработке новых иммунотерапевтических агентов и оптимизации существующих, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии, а также иммунологии и онкологии, присудить Волкову Дмитрию Васильевичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 5 докторов наук (отдельно 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

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

04.12.2024 г.

