

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию Волкова Дмитрия Васильевича  
по теме: «Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и  
оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной  
терапии гемопозитических опухолей», представленную к защите на  
соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология**

**Актуальность темы исследования**

Диссертационная работа Волкова Дмитрия Васильевича посвящена разработке современных подходов лечения онкологических и, в частности, онкогематологических заболеваний, основанных на использовании иммунотерапевтических препаратов, которые позволяют одновременно повысить эффективность противоопухолевой терапии и минимизировать токсические эффекты, связанные с применением традиционных методов химио- и радиотерапии. Одним из перспективных таргетов для создания CAR-T клеточных препаратов для терапии лимфом и лейкозов является антиген CD45 - тирозиновая фосфатаза, которая также известна как общий лейкоцитарный антиген и присутствует на поверхности кроветворных и лимфатических клеток почти всех линий дифференцировки, включая злокачественно трансформированные, за исключением тромбоцитов и эритроцитов. Таким образом, в отличие от применяемых в настоящее время для терапии лимфом и лейкозов CAR-T клеточных препаратов, анти-CD45 клетки могут использоваться не только для элиминации опухолевых клонов, но и для щадящих режимов кондиционирования реципиента перед аллогенной трансплантацией стволовых гемопозитических клеток. Однако, пан-лейкоцитарный характер таргетирования CD45 кроме указанных преимуществ, имеет также определенные ограничения. В частности, такие CAR-T клетки обладают аутоксичностью, что

ускоряет их клиренс и снижает потенциальную эффективность. Дмитрию Васильевичу удалось успешно устранить этот недостаток анти-CD45 CAR-T клеток путем нокаута соответствующего гена *PTPRC*, кодирующего CD45. Для этого была использована технология геномного редактирования CRISPR/Cas9. В многочисленных экспериментах различными методами автор доказывает функциональную активность полученного клеточного препарата. Полученные CD45<sup>Δ</sup> CAR45 T клетки оказались эффективны в отношении человеческих CD45-позитивных опухолевых клеток *in vitro*, а также на мышинной модели перевиваемых человеческих клеточных линий *in vivo*. Другое важное направление исследований Волкова Дмитрия Васильевича – разработка подходов для использования аллогенных донорских клеток для создания CAR-T клеточных препаратов. Несмотря на привлекательность использования здоровых, нескомпрометированных донорских клеток по сравнению с клетками реципиента, подверженными цитостатической и иммуносупрессивной терапии, основным препятствием для их использования является высокий риск реакции трансплантат против хозяина. Дмитрию Васильевичу удалось доказать, что использование донорских Tm клеток для создания CAR-T клеточного препарата снижает риск развития реакции трансплантат против хозяина по сравнению с препаратом, полученным из суммарной фракции T клеток донора. Исходя из вышеизложенного, актуальность темы исследования не вызывает никаких сомнений.

### **Структура диссертации**

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов,

Обсуждения результатов, Заключение, Выводов, и Списка литературы. Работа изложена на 135 страницах, богато иллюстрирована и содержит 52 рисунка, 4 таблицы и 2 приложения. Список процитированной литературы включает 173 источника. Работа написана хорошим литературным языком и почти не содержит опечаток и стилистических погрешностей — замечены только на стр 2 (строка 1), стр 6 (строка 1), стр 22 (строка 6), стр 39 (строка 2), стр 41 (строка 8), стр 45 (строка 2), стр 68 (строка 3 снизу), стр 92 (строка 2) и стр 98. Особого внимания заслуживает литературный обзор, в котором дано подробное описание современного состояния разработок в области CAR-T клеточной терапии. Из литературного обзора логично вытекает постановка целей и задач оппонируемой диссертации. Последующие главы, содержащие описания методик и полученные результаты в целом написаны подробно и конкретно. Адекватность используемых экспериментальных подходов, валидность полученных результатов и доказанность выводов не вызывают сомнений.

### **Замечания к диссертационной работе**

Некоторые положения, возможно, стоило бы описать более подробно. В частности, 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 CD45<sup>+</sup> 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 запятые.

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

В целом работа производит очень хорошее впечатление. Адекватность выбранных методических подходов и достоверность полученных результатов не вызывают никакого сомнения. Большинство данных получены и проанализированы лично соискателем. Результаты работы опубликованы в международных рецензируемых высокорейтинговых периодических научных изданиях и доложены на многочисленных научных конференциях. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Работа имеет безусловное значение для понимания механизмов, лежащих в основе современных методов иммунотерапии. Кроме этого, полученные результаты могут иметь прикладную ценность в отношении разработки подходов для создания новых CAR-T клеточных препаратов, таргетированных к перспективным антигенам, а также создания аллогенных CAR-T клеточных препаратов. Высказанные замечания касаются в основном представления полученных результатов и не умаляют значимости диссертационного исследования.

### **Заключение**

Диссертация Волкова Д.В. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в соответствии с пп. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного 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 сам диссертант Волков Д.В. – присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

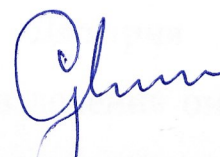
заведующий отделом молекулярной генетики

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Судариков Андрей Борисович



8 ноября 2024

Контактные данные:

тел.: +79262136729, e-mail: [dusha@blood.ru](mailto:dusha@blood.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

14.01.21 - Гематология и переливание крови

Адрес места работы:

125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Тел.: +74956122123; e-mail: [director@blood.ru](mailto:director@blood.ru)

Подпись сотрудника НМИЦ гематологии

А.Б. Сударикова удостоверяю:

Менделеева Лариса Павловна, д.м.н.

руководитель управления по научной  
и образовательной работе

