

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

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 22 декабря 2021 г. № 16

О присуждении **Украинской Валерии Михайловне** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Изучение влияния опухолевого микроокружения на противоопухолевую активность CAR T-клеток» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология принята к защите 20 октября 2021 г. (протокол заседания № 11) Диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки 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 Украинская Валерия Михайловна, 19 октября 1993 года рождения. В 2017 году соискатель окончила фармацевтический факультет Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), а в 2021 году окончила аспирантуру в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории биокатализа отдела пептидно-белковых технологий ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории биокатализа отдела пептидно-белковых технологий ИБХ РАН.

Научный руководитель - кандидат биологических наук Степанов Алексей Вячеславович, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН **Купраш Дмитрий Владимирович**, заведующий Центром высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Кандидат биологических наук **Ефимов Григорий Александрович**, заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России 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 заместителем директора по науке и инновациям доктором биол. наук Шиловским Игорем Петровичем и утвержденном директором ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России чл.-корр. РАН, д.мед.н., профессором Хаитовым Мусой Рахимовичем, указала, что диссертация Украинской Валерии Михайловны является завершённой 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 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), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3. Молекулярная биология».

Соискатель имеет 9 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 6 работ общим объемом 4 печ.л. в рецензируемых научных изданиях из списка, 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 В.М. Украинская внесла основной либо существенный вклад, включают:

Ukrainskaya, V. M., Rubtsov, Y. P., Pershin, D. S., Podoplelova, N. A., Terekhov, S. S., Yaroshevich, I. A., Sokolova, A. I., Bagrov, D. V., Kulakovskaya, E. A., Shipunova, V., Deyev, S. M., Ziganshin, R. H., Chernov, A. S., Telegin, G. B., Maksimov, E. G., Markov, O. V., Oshchepkova, A. L., Zenkova, M. A., Xie, J., Zhang, H., Gabibov, A. G., Maschan, M. M., Stepanov, A. V., Lerner, R. A., Antigen-Specific Stimulation and Expansion of CAR-T Cells Using Membrane Vesicles as Target Cell Surrogates. *Small* 2021, 2102643. <https://doi.org/10.1002/sml.202102643>

V. M. Ukrainskaya, Y. P. Rubtsov, V. D. Knorre, M. A. Maschan, A. G. Gabibov, and A. V. Stepanov «The Role of Tumor-Derived Vesicles in the Regulation of Antitumor Immunity» *December 2019 Acta Naturae* 11(4):33-4 doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-33-41

Xia, Y., He, J., Zhang, H., Wang, H., Tetz, G., Maguire, C.A., Wang, Y., Onuma, A., Genkin, D., Tetz, V., Stepanov, A., Terekhov, S., **Ukrainskaya, V.**, Huang, H. and Tsung, A. (2020), AAV-mediated gene transfer of DNase I in the liver of mice with colorectal cancer reduces liver metastasis and restores local innate and adaptive immune response. *Mol. Oncol.*, 14: 2920-2935. doi: 10.1002/1878-0261.12787

Ukrainskaya V.M., Stepanov A.V., Glagoleva I.S., и др. Death Receptors: New Opportunities in Cancer Therapy // Acta Naturae. - 2017. - Т. 9. - №3. - С. 55-63. doi: 10.32607/20758251-2017-9-3-55-63

Ukrainskaya VM, Stepanov AV, Belogurov AA Jr, Gabibov AG "Combinatorial Screening of Peptides, Specific Ligands of Death Receptor DR5." Bull Exp Biol Med. 2017 Jul;163(3):381 doi: 10.1007/s10517-017-3809-8

Ukrainskaya VM, Bobik TV, Argentova-Stevens A, Slutskaia EA, Kalinin RS, Gabibov AG, Stepanov AV. "Directed Change in TNF α Specificity to Create DR5 Antagonists." Bull Exp Biol Med. 2018 Jul 12. doi: 10.1007/s10517-018-4176-9

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента к.б.н. **Ефимова Григория Александровича**. Отзыв положительный содержит следующие замечания: 1). Первый и второй вывод по сути являются одним выводом. 2). Не до конца ясная формулировка в расчете соотношения количества экзосом и CAR T-клеток на стр. 67. 3). Панели в рис. 14, вероятно, перепутаны. 4). Отсутствие на рис. 14 и 16 или в тексте указания на статистическую значимость полученных результатов, а также метода анализа. 5). Термин «обработка» в применении к введению мышам AAV представляется не совсем удачным. 6). Вывод 5, содержит слово «терапия», без указания на то, что речь идет о мышинной модели. 7). Незначительные опечатки.

Отзыв официального оппонента д.б.н. профессор, чл.-корр. РАН, **Купраша Дмитрия Владимировича**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Качество текста по ряду параметров вызывает неудовлетворение. Список сокращений сделан недостаточно тщательно - он содержит опечатки (AVV вместо AAV), не приведена английская расшифровка англоязычных сокращений. Часто встречается несогласование слов (то "перенос гена ДНКазой I в печень", то "перенос гена ДНКазы I в печени"), жаргонные выражения (например, "прогрессирование метастазов в печень"), неточные формулировки. На некоторых рисунках (например, рис. 13) панели обозначены русскими буквами А, Б, В, а в тексте - латинскими А, В, С. Многие заголовки начинаются со слова "изучение", без указания на суть полученных результатов, что делает их неинформативными.
2. Для анализа цитотоксической активности CAR-T инкубировали с экзосомами (EV) в течение 2 дней, с антигенными везикулами (AV) - в течение 4 дней (раздел 2.6.3). Кроме того, после инкубации с AV CAR-T промывали PBS перед тем, как добавить к клеткам-мишеням, а после инкубации с EV (а также в случае CAR-T от пациентов с ОЛЛ) о промывке ничего не сказано. С чем связаны эти различия?
3. Эксперименты по цитотоксичности описаны путано и недостаточно понятно. На рис. 16Б показаны различные соотношения CAR-T к клеткам-мишеням, но не

сказано, какие клетки были мишенью. На рис. 16В показана цитотоксичность по отношению к разным клеткам-мишеням, но не указано соотношение. Вариант с измерением цитотоксичности через 10 часов после начала эксперимента не описан в разделе 2.6.3. Была ли в данном случае промывка PBS? Почему было выбрано именно 10 часов и изучались ли другие времена инкубации с AV? При короткой инкубации драматически повышена неспецифическая цитотоксичность, а специфическая - снижена, особенно против клеток Nalm-6. Хотелось бы увидеть внятные пояснения или предположения по поводу биологического смысла этих наблюдений, и в случае, если такой смысл есть - исследование кинетики при других временах инкубации. Замечание о предварительной инкубации CD19-CAR Т-клеток с CD19+ экзосомами в течение 24 часов со ссылкой на рис. 16Б дополнительно запутывает, т.к. такой интервал инкубации не указан ни в разделе 2.6.3, ни в подписи к рисунку, но зато имеется в описании анализа транскриптома (раздел 2.6.7).

4. Анализ транскриптома проводили после 24 часов инкубации, а не 10 или 48. Учитывая драматические отличия в эффектах на цитотоксичность, необходимо знать, что происходит с транскриптомом в кинетике. О чем именно говорят различия, наблюдаемые в единственной точке, понять затруднительно. Кроме того, на рис. 17 отсутствует легенда для цветов на тепловой карте.
5. При анализе AV, полученных новым методом, хотелось бы видеть еще более детальный анализ их свойств. В частности, на рис. 19 были бы уместны результаты совместной детекции исследуемых маркеров и флуоресцентного белка dTomato. На рис. 20В на диаграмме прямого и бокового рассеяния для клеток очевидны результаты применения гейта (диаграмма обрезана по вертикали, левее этой линии никаких точек нет). В такой ситуации измерение количества AV (зеленый овал, 0.5%) представляется лишеным смысла, и хотелось бы видеть полную картину.
6. Показанные на рис. 23 результаты сортировки клеток далеки от идеала: чистота отсортированных популяций составляет около 80%, средняя интенсивность флуоресценции сильно снижена. Хотелось бы видеть детали, а именно, как выглядели диаграммы рассеяния и гейты во время сортировки, и какие результаты можно получить с использованием антител, а не AV.
7. Эксперименты с AAV-DNase I поставлены в США, а В.М. Украинская присутствует в списке авторов с российской аффилиацией и далеко от первой позиции. В связи с этим, хотелось бы узнать о личном вкладе автора в эту часть работы (в статье сказано лишь, что Валерия Михайловна выполняла эксперименты). Следует отметить, что в целом ключевой личный вклад автора в работу не вызывает сомнений, однако соответствующий раздел не обнаруживается ни в диссертации, ни в автореферате.

8. Две статьи, посвященные лигандам "рецептора смерти" DR5, крайне слабо связаны с темой работы и не отражены в диссертации, за исключением параграфа в обзоре литературы, сообщающем о том, что соответствующие молекулы обнаруживаются в составе везикул. Диссертация выиграла бы от отсутствия этих двух статей в списке.
9. На стр. 66 написано, что отдельные экзосомы на рис. 9 отмечены стрелками, однако на данном рисунке стрелок нет. Без стрелок и пояснений сложно понять, на что следует смотреть на рис. 9А.
10. Непонятно, как соотносится утверждение в тексте об узком распределении размера везикул (отклонение от 100 нм - в пределах 10%), и рис. 9Б, где виден разброс от 50 до 150 нм.
11. Одним из опасных побочных явлений CAR-T терапии является чрезмерная активация иммунной системы, вплоть до развития цитокинового шторма. Не увеличит ли эту опасность продолжительная и эффективная активация CAR-T клеток? Можно ли предусмотреть способы борьбы с этим риском - например, путем экспрессии в клетках-продуцентах AV частиц каких-то дополнительных регуляторных молекул?
12. Является ли разработанный метод выделения искусственных везикул патентоспособным?

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв *положительный*. Принципиальных замечаний по диссертации нет. Несколько стилистических неточностей не умаляют ценности диссертационной работы.

Отзыв на автореферат заведующей лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, д.б.н. проф. **Зенковой Марины Аркадьевны**. Отзыв *положительный*, замечания отсутствуют.

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, механизма клеточного иммунитета, терапии рака, а также по поиску новых опухолевых специфических маркеров. Официальный оппонент Купраш Дмитрий Владимирович является ведущим специалистом в области молекулярной биологии, опухолевой иммунологии и опухолевого микроокружения. Официальный оппонент Ефимов Григорий Александрович также является специалистом в области иммунологии, Т-клеточного иммунного ответа и адоптивной иммунотерапии. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень

научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований было впервые подробно охарактеризовано взаимодействие опухолевых экзосом, выделенных из клеток лимфом и глиом с CAR T-клетками и показано их влияние на активность CAR-T в зависимости от присутствия опухолевого антигена (CD19 или IL13R2a) на поверхности экзосом. Диссертантом было показано, что опухолевые экзосомы из клеток лимфом могут, в зависимости от концентрации, как активировать, так и подавлять, функцию CAR T-клеток, влияя на секрецию воспалительных цитокинов и изменяя профиль экспрессии генов CAR T-клеток. Кроме того, диссертантом описан новый способ получения искусственных антигенных везикул, несущих опухолевый антиген для детекции химерного антигенного рецептора на поверхности T-клеток. Доказано, что эти везикулы можно с успехом применить для идентификации, активации и экспансии CAR-положительной популяции T-клеток. Помимо этого, был разработан вектор AAV, кодирующий ДНКазу I, которая эффективно позволяет бороться с внеклеточными ловушками нейтрофилов.

Теоретическая значимость исследования состоит в углублении знаний о механизмах ускользания опухоли от противоопухолевого иммунного ответа и поиске способов преодоления агрессивного влияния микроокружения опухоли на CAR T-клетки: проведена подробная характеристика фенотипических и функциональных свойств CAR T-клеток; особое внимание уделено подходам к созданию CAR T-клеточного продукта и подробно охарактеризованы факторы, влияющие на эффективность CAR T-клеток, в частности, показано, что компоненты опухолевого микроокружения могут влиять на активность T-клеток и CAR T-клеток.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что абсолютно уникальные и неожиданные результаты, полученные при исследовании искусственных антигенных везикул и изучении их действия на CAR-T, будут существенно способствовать дальнейшему развитию терапевтического применения CAR-T клеток. Разработанный диссертантом метод получения и применения AV для размножения в культуре CAR-T клеток с большой вероятностью значительно облегчит, удешевит и ускорит получение эффективных терапевтических CAR-T клеток с улучшенными характеристиками.

Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает: исследования проводились с использованием современных научных методов, экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована,

при анализе данных были использованы современные методы сбора и обработки информации.

Личный вклад Украинской Валерии Михайловны заключался в создании конструкций для репортерных линий клеток и конструкций, кодирующих химерные антигенные рецепторы. Непосредственное получение AV, создание CAR T-клеток и проведение функциональных и *in vivo* экспериментов также проводились Украинской В.М. Получение изображений с помощью конфокальной и сканирующей микроскопии проводились в сотрудничестве с научным сотрудником Н.А. Подоплеловой из ФНКЦ им. Дмитрия Рогачева и сотрудниками биологического факультета МГУ Д.В. Багровым, И.А. Ярошевичем, Е.Г. Максимовым. *In vivo* анализ CAR T-клеток проводился совместно с группой д.б.н. С.М. Деева из лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН. Цитофлуориметрический анализ проводился в сотрудничестве с научным сотрудником Д.С. Першином из ФНКЦ им. Димы Рогачева. Украинская В.М. принимала непосредственное участие в создании конструкции AVV-ДНКазы I и проведении *in vitro* тестов совместно с коллегами из Медицинского центра Векснера при Университете штата Огайо. Также Украинская В.М. занималась обработкой и интерпретацией полученных экспериментальных данных и подготовкой материалов научных публикаций.

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Был задан уточняющий методический вопрос, на который соискатель дала положительный ответ.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Украинской В.М. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой важны для развития молекулярной биологии и медицины. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом диссертационная работа Украинской Валерии Михайловны «Изучение влияния опухолевого микроокружения на противоопухолевую активность CAR T-клеток», 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).

На заседании 22 декабря 2021 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по исследованию опухолевого микроокружения и изучению его влияния на противоопухолевую активность CAR T-клеток, имеющей

существенное значение для развития молекулярной биологии и медицины, в частности области адоптивной иммунотерапии, присудить Украинской Валерии Михайловне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 8 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3. Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 22, против - 0, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.х.н.



Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Олейников Владимир Александрович

23 декабря 2021 г.