

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 наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 22 февраля 2023 г. № 5

О присуждении **Калинину Роману Сергеевичу** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология принята к защите 7 декабря 2022 г. (протокол заседания №30) 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 (ИБХ РАН) (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 Калинин Роман Сергеевич, 28 августа 1993 года рождения, в 2017 г. окончил магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» по специальности Биология. С 2017 по 2021 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности инженера-исследователя 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 **Яшин Денис Владимирович**, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук, и кандидат биологических наук **Друцкая Марина Сергеевна**, ведущий

научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук, дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», в своем **положительном** отзыве, подписанном генеральным директором чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. РАН Лагарьковой Марией Андреевной и ведущим научным сотрудником лаборатории клеточной биологии к.б.н. Еремеевым Артемом Валерьевичем, и утвержденном заместителем генерального директора по научной работе д.б.н. Лазаревым Василием Николаевичем, указала, что диссертация Калинина Романа Сергеевича 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 Российской Федерации от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426, 26.09.2022 г. № 1690), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ в рецензируемых научных изданиях, в том числе по теме диссертации опубликовано 4 работы, общим объемом 3 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 Р.С. Калинин внес основной либо существенный вклад, включают:

Stepanov A.V.*, **Kalinin R.S.***, Shipunova V.O.*, Zhang D., Xie J., Rubtsov Y.P., Ukrainskaya V.M., Schulga A.A., Konovalova E.V., Volkov D.V., Yaroshevich I.A., Moysenovich A.M., Belogurov A.A. Jr, Zhang H., Telegin G.B., Chernov A., Maschan M.A., Terekhov S.S., Deyev S.M., Lerner R.A., Gabibov A.G., Altman S. (2022). Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T. PNAS. v. 119, № 46. (* - равный вклад)

Kalinin R.S., Ukrainskaya V.M., Chumakov S.P., Moysenovich A.M., Tereshchuk V.M., Volkov D.V., Pershin D.S., Maksimov E.G., Zhang H., Maschan M.A., Rubtsov Y.P. (2021). Frontiers in Molecular Biosciences **8**, 745286.

Kalinin R.S., Petukhov A.V., Knorre V.D., Maschan M.A., Stepanov A.V., Gabibov A.G. (2018). *Acta Naturae* **10** (2), 16–23.

Stepanov A.V., Markov O.V., Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Zhang H., Jones T., Senkova A.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., **Kalinin R.S.**, Rubtsova M.P., Meleshko A.N., Genkin D.D., Belogurov A.A., Xie J., Gabibov A.G., Lerner R.A. (2018). Autocrine-based

selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma. Science Advances 4 (11), eaau4580.

На диссертацию поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. **Яшина Дениса Владимировича**. Отзыв *положительный* содержит следующие замечания: 1) В работе недостаточно обсужден рисунок 19В. Исходя из представленных на нем данных получается, что 80% мышей почти не реагирует на терапию, в то время как оставшиеся 20% реагируют весьма сильно. 2) В тексте встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки и неудачные выражения.

Отзыв официального оппонента к.б.н. **Друцкой Марины Сергеевны**. Отзыв *положительный* содержит следующие замечания:

1. В разделе литературного обзора, посвященного проблемам CAR-T терапии, обсуждаются сложности лечения солидных опухолей. Однако все рассуждения об опухолевом микроокружении и его супрессорной активности сводятся к иммунологическим контрольным точкам и лиганд-рецепторным взаимодействиям между опухолевыми и CAR-T клетками без упоминания опухоль-ассоциированных макрофагов, фибробластов и секреторного компонента (SASP). Кроме того, одним из нежелательных побочных эффектов, связанных с CAR-T терапией, упоминается «цитокиновый шторм», но не обсуждается существующая практика или перспектива применения анти-цитокиновой терапии для контроля чрезмерной продукции цитокинов (каких?) при с CAR-T терапии.

2. В работе несколько раз приводится тезис, что разработанная аутокринная система отбора пептидов в клинической практике будет по времени сопоставима с классической CAR-T терапией, однако автор не приводит временных ориентиров. Сколько времени гипотетически занимает получение CAR-T клеток с момента взятия биопсии у пациента? В случае аутокринной селекции на Рис. 12 (Рис. 1 автореферата), тест на самоактивацию проводится в формате единичных клеток? В противном случае, где гарантия того, что собранный В-клеточный рецептор на одной клетке не провзаимодействует с циклопептидом в составе CAR на соседней клетке?

3. Рис. 17 (Рис. 4 автореферата) CAR-T клетки вводили через 17 дней после введения опухолевых клеток. При этом размер опухоли в этой временной точке составлял до 50 мм³ (то есть, фактически опухоли были очень маленькими), а выживаемость мышей после CAR-T составляла всего 20%. Сколько мышей было в каждой группе? Что будет если ввести клетки раньше, когда видимой опухоли еще нет? Удастся ли повысить эффективность? А если CAR-T вводить несколько раз? Почему была выбрана именно эта временная точка для введения CAR-T?

4. Поскольку дарпин-барназы были продуцированы в бактериальной системе, то как контролировалось наличие эндотоксина? В противном случае, схема введения дарпин-барназ (6-кратное введение в течение месяца) с возможными примесями эндотоксина (в качестве адъюванта) соответствует классической схеме иммунизации. Нет ли такого, что часть эффекта может быть связана с иммуногенностью дарпин-барназ и образованием антител?

5. NSG мыши позволяют использовать их не только в качестве реципиентов опухолевых клеток человека, но и клеток костного мозга, то есть ксенотрансплантация опухоли может происходить на фоне интактной гуманизированной иммунной системы (что позволяет оценить вклад опухолевого окружения и инфильтрирующих опухоль иммунных клеток). Не очень понятно из описания, как было сделано в данной работе?

6. На большинстве рисунков с изображениями микроскопии отсутствует масштабная линейка и не указано увеличение. В частности, не понятно есть ли различия в увеличении между левой и правой панелью на Рис. 14 (Рис. 2 автореферата), верхней и нижней панелью на Рис. 16, русскоязычные публикации в списке литературы, а также в списке публикаций автора приведены на английском языке.

Отзыв ведущей организации. Отзыв *положительный*. Принципиальных замечаний по диссертации нет. Отмечается, что несколько стилистических неточностей никак не снижают ценность данной диссертационной работы и значимость полученных в ней результатов.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и иммунологии, которые подтверждены сериями публикаций в ведущих российских и международных журналах. В ведущей организации – ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России) – проводятся исследования в области иммунологии, механизма клеточного иммунитета, терапии рака, а также по поиску биологических маркеров заболеваний с применением современных молекулярно-диагностических технологий. Проводятся исследования по оценке вклада генетических факторов в развитии сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, молекулярных механизмов и причин развития патологического состояния. Официальный оппонент Друцкая Марина Сергеевна является ведущим специалистом в области молекулярной биологии, опухолевой иммунологии и опухолевого микроокружения. Официальный оппонент Яшин Денис Владимирович также является специалистом в области иммунологии, молекулярной иммуногенетики рака, Т-клеточного иммунного ответа и адоптивной иммунотерапии. 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 соискателем был впервые разработан метод аутокринной селекции направляющего специфичного циклопептида из пептидной библиотеки в составе CAR против В-клеточного рецептора клеток из биопсии фолликулярной лимфомы пациента. Применение данной библиотеки циклопептидов дает возможность охватить все разнообразие В-клеточного репертуара рецепторов и создать персонализированные специфичные CAR-T клетки без кросс-реактивности на здоровые ткани пациента. Полученные CAR-T клетки такого типа элиминируют опухолевые клоны как *ex vivo*, так и *in vivo* с одинаковой эффективностью, что и CAR, нацеленный на CD19, используемый в настоящий момент в медицинской практике. Была создана новая модульная система контроля активности CAR-T клеток на основе высокоаффинного и специфичного взаимодействия уникальной молекулярной пары *барназа-барстар*. Оригинальность результатов также заключается в том, что было продемонстрировано свойство переключения таких CAR-T клеток на разные ассоциированные с опухолью антигены. Кроме того, данная модульная система эффективно подавляет рост HER2-положительной солидной опухоли *in vivo*. Впервые показано, что однодоменное наноантитело, клон 102с3, специфичное к PD-1, может быть использовано для блокирования экспрессии PD-1. В экспериментах *in vitro* модифицированные Т-клетки от здорового донора с подавленной экспрессией PD-1 теряли активность в цитотоксических тестах с добавлением новых опухолевых клеток несколько раз, по сравнению с Т-клетками с нормальной экспрессией PD-1. Было установлено, что клетки с блокирующей PD-1 конструкцией быстрее дифференцируются до терминального фенотипа, а также быстрее истощаются.

Теоретическая значимость проведенных исследования обоснована тем, что разработанный новый метод создания CAR с использованием библиотеки циклопептидов в составе направляющего домена CAR позволяет создать персонализированные модифицированные Т-клетки против клонов опухолевых В-клеток. Модульные CAR эффективно регулируются молекулами-посредниками, что, несомненно, дает импульс к развитию современных представлений о решении проблем контроля CAR-T клеток. Впервые продемонстрирована блокировка PD-1 на CAR-T клетках с помощью наноантитела, специфичного к PD-1, заякоренного в мембране с помощью пептида PEBL. Эффект полного отсутствия PD-1 на поверхности модифицированных CAR-T клеток приводит к быстрой дифференциации до терминального фенотипа и истощению. Тем самым продемонстрировано важная значимость PD-1, полная блокировка PD-1 нарушает функциональность CAR-T клеток.

Значение полученных результатов исследований для практики подтверждается следующим: представлены новые подходы к решению проблем, связанных с побочными эффектами, возникающими при применении CAR-T клеток для иммунотерапии рака. Была разработана платформа аутокринного отбора конструкции CAR. Ее распознающий домен представлен библиотекой циклопептидов, специфичной для В-клеточного рецептора. Последовательность данного рецептора получена из клеток биопсии фолликулярной лимфомы пациента. Разработанная платформа служит инструментом нахождения персонализированного CAR для пациентов с фолликулярной лимфомой, что повышает безопасность CAR-T терапии за счет нацеливания только на В-клеточный рецептор клеток опухоли. Кроме того, данный CAR можно альтернативно использовать в качестве CAR, специфичного к CD19. Создана уникальная система контроля активности и переключения CAR-T клеток за счет молекулы-посредника, что не только повышает безопасность терапии, но также дает возможность переключения CAR-T клеток на разные антигены, ассоциированные с опухолью. Данный подход можно будет применять для лечения солидных и гетерогенных опухолей, исключив побочный эффект гиперактивации CAR-T клеток, приводящий к цитокиновому шоку или синдрому лизиса опухоли.

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

Личный вклад Калинина Романа Сергеевича складывается из непосредственного участия в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования. Соискателем созданы генетические конструкции, в том числе кодирующие химерные антигенные рецепторы. Непосредственное получение лентивирусов, создание CAR-T клеток и проведение функциональных и *in vivo* экспериментов также проводились Калининым Р.С. Совместно с лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук под руководством чл.-корр. РАН, профессора, д.б.н. М.А. Зенковой и республиканским научно-практическим центром детской онкологии, гематологии и иммунологии (Беларусь), а также лабораторией профессора Р.А. Лернера научного института Скриппса (США) была разработана платформа для комбинаторного аутокринного отбора направляющей молекулы для CAR терапии лимфом. Калининым Р.С. были получены высокоспецифичные CAR-T, которые элиминируют опухолевые клетки как *ex vivo*, так и *in vivo* также эффективно, как и хорошо известный CAR,

нацеленный на CD19. В сотрудничестве с к.б.н. С.П. Чумаковым, с.н.с. группы экспрессии белковых факторов роста и дифференцировки ИБХ РАН, и д.б.н. Ю.П. Рубцовым, зав. лаб. молекулярной вирусологии ИБХ РАН, были созданы генно-инженерные конструкции на основе наноантитела против PD-1, эффективно убирающие PD-1 с поверхности модифицированных клеток. При непосредственном участии Калинина Р.С. и в тесном сотрудничестве с коллегами лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН под руководством академика, проф., д.б.н. С.М. Деева и совместно с лабораторией биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН под руководством чл.-корр. РАН, проф., д.б.н. М.А. Зенковой, а также лабораторией проф. Р.А. Лернера Научного института Скриппса (США), и с научной консультацией проф. Сидни Альтмена (США) была создана новая универсальная модульная система CAR на основе уникальной молекулярной пары рибонуклеаза-барназа и ее ингибитор – барстар, которая позволяет регулировать активность CAR-T клеток. Кроме того, Калининым Р.С. была проведена обработка и интерпретация полученных экспериментальных данных, соискатель принимал активное участие в подготовке материалов для научных публикаций.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Существенную роль в этом исследовании выполняют циклические пептиды. Что такое циклические пептиды, что они собой представляют, откуда они берутся. Откуда берется библиотека циклопептидов? Эти циклопептиды связаны за счет SN-связей?

2. Зачем нужно было делать CAR-T клетки против PD-1. В чем преимущество перед моноклональными антителами?

3. Одним из преимуществ модульного подхода CAR-T является возможность отключения CAR-T терапии, путем отмены введения дополнительного вещества. В экспериментах на мышинной модели выполнялась проверка?

4. Найденные три циклических пептида функциональны под конкретного пациента или это некие универсальные изменения, которые можно вносить в CAR-T?

5. В работе была использована система с посредником – барназа-барстар. Но в качестве контроля получали такую конструкцию, где вместо барстара на этой клетке находится сразу дарпин? И если получали, то какие ее свойства, какая у нее активность? Конечно, в этом случае теряется возможность управления регуляцией, но, такая работа проводилась?

Соискатель Калинин Роман Сергеевич ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию.

1. В работе используется комбинаторная библиотека циклопептидов из 7 аминокислот, по концам стоят цистеины, за счет них пептиды циклизируются, в результате получается циклопептид. Разнообразие библиотеки составляло 10^9 . Эта библиотека коммерческая.

2. CAR-T клетки против PD-1 модифицируются одним лентивирусом, который несет CAR и через саморазрезающийся пептид стоит блокатор, поэтому CAR-T клетки не будут нести PD-1. Следовательно, возникает преимущество в том, что не надо проводить дополнительную терапию антителами, T-клетки модифицированы таким образом, что они уже не будут взаимодействовать с PD-L1. Однако, такие модифицированные клетки меняют фенотип.

3. Проверки отключения терапии в экспериментах на мышах не проводилось. Однако, в *in vitro* экспериментах, где мы не добавляли дарпин-барназу, CAR-T клетки не активировались. В перспективе планируется использовать блокаторы с молекулярной барназой, либо с барстаром, чтобы взаимодействовать либо с CAR-T клетками, либо сразу же блокировать молекулы-посредники. Т.е. в терапии это происходило бы следующим образом. Вводятся CAR-T клетки, добавляются молекулы-посредники. Если пациент «отвечает» плохо, молекулы-посредники добавляются. Если у пациента начинается гиперактивация CAR-T клеток, введение дарпин-барназы (молекула-посредник) отменяют и она выводится из организма, следовательно, CAR-T клетки не активируются.

4. Это персонализированная терапия. Для каждого пациента будет специфичный циклопептид потому, что существует большое разнообразие В-клеточных рецепторов и у трех пациентов в данном исследовании был отобран свой специфичный циклопептид в составе CAR, не активирующийся на клетки от другого пациента.

5. Дарпин в конструкции CAR не применялся, но в качестве контроля применялся другой распознающий домен CAR – одноцепочечный варибельный фрагмент антитела в составе химерного антигенного рецептора, который напрямую нацелен на рецепторы эпидермального фактора роста 2. В цитотоксическом тесте на опухолевых клетках с гиперэкспрессией HER2 эффективность их была одинакова.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Калинина Р.С. 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 Калинина Романа Сергеевича «Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов T-клеток и методы регулирования их активности», 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 РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017г. №650; 20.03.2021г. №426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. №1690).

На заседании 22 февраля 2023 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по созданию новых комбинаторных подходов повышающие специфичность и безопасность терапевтических CAR-T клеток и изучение влияния контрольной иммунной точки PD -1 на пролиферацию и противоопухолевую активность CAR-T клеток, что имеет существенное значение для развития молекулярной биологии и медицины, присудить Калинину Роману Сергеевичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 8 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3. – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.



22 февраля 2023 г.