

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

**СТЕНОГРАММА**

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН  
4 декабря 2024 года

Защита диссертации  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Волков Дмитрий Васильевич**

**Тема: Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и  
оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной терапии  
гемопоэтических опухолей**

Специальность 1.5.3 – “Молекулярная биология”

Москва – 2024

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 4 декабря 2024 года.

Председатель  
диссертационного совета академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь  
диссертационного совета д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
4.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
5.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
6.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
7.	Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
9.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
10.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
11.	Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.4.9)
12.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
13.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
14.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
15.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
16.	Д.б.н.	Рубцов Юрий Петрович	(1.5.3)
17.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

**Председатель диссертационного совета Мирошников А.И.**

У нас сегодня две защиты. Кандидатские, я надеюсь, что мы справимся с этим. То есть кворум у нас вроде бы есть с онлайн. Так, значит, первая защита – это Волков Дмитрий Васильевич. Название видно всем. Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной терапии гемопозитических опухолей, диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология, научный руководитель Алексей Вячеславович Степанов, лаборатория Биокатализа, официальные оппоненты Тиллиб Сергей Владимирович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий Института биологии гена и Судариков Андрей Борисович, доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной генетики, национального медицинского исследовательского центра гематологии Министерства здравоохранения. Ведущая организация: Государственный научный центр, Институт иммунологии, Федерального медико-биологического агентства. Так, пожалуйста.

**Ученый секретарь Олейников В.А.**

Так, материалы личного дела. Волков Дмитрий Васильевич, гражданин Российской Федерации, окончил факультет фундаментальной медицины МГУ по специальности фармация в 2020 году. С 2020 по 2024 аспирант нашего института ГНЦ ИБХ РАН. С 20-го по настоящее время техник-лаборант, инженер, теперь младший научный сотрудник лаборатории биокатализа нашего института. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология сдан на оценку отлично. Работа выполнена в лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН. Научный руководитель Степанов Алексей Вячеславович, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа. По теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых международных журналах. Объявления о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 1 октября 2024 года, и все необходимые документы в деле имеются.

**Председатель диссертационного совета Мирошников А.И.**

Спасибо. Дмитрий Васильевич, пожалуйста.

**Диссертант Волков Д.В.**

*(Излагает основные положения диссертационной работы)*

**Председатель диссертационного совета Мирошников А.И.**

Спасибо. Вопросы? Да, пожалуйста.

**С.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ГНЦ ИБХ РАН к.б.н. Коваленко Е.И.**

Мне очень понравилась представленная работа. У меня два вопроса. Первый вопрос. Вы делали нокауты CD45, у Т-клеток и, соответственно, у НК-клеток. По вашему мнению, есть ли какие-то различия в эффективности получения этих нокаутов? И если есть, то с чем они связаны?

**Председатель диссертационного совета Мирошников А.И.**

Давайте сразу второй вопрос.

**С.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ГНЦ ИБХ РАН к.б.н. Коваленко Е.И.**

Давайте сразу второй вопрос. Он связан с тем, что вы использовали, когда получали Т-клетки памяти, да, вы, соответственно, удаляли CD45RA и удаляли не только наивные, но и высоко дифференцированные RA-позитивные клетки. И как вы оцениваете, насколько вот эта потеря была значима или незначима?

**Диссертант Волков Д.В.**

Спасибо большое за вопросы. Ну, по поводу первого вопроса, наверное, лучше продемонстрировать это на слайде, то есть вот эффективность нокаута НК клеток: то есть окрашивание по CD45 и клетки без нокаута, клетки с нокаутом (на слайде). Ну, то есть это сопоставимо по количеству оставшихся неночаутированными клеток с Т-клетками. То есть примерно эффективность одинаковая. Ну, по сути, здесь основные отличия, наверное... больше в программах, которые мы использовали для нокаута на приборе. То есть у прибора есть программы, заточенные под Т-клетки и программы, заточенные под НК-клетки. Соответственно, каждая из этих программ даёт максимальную эффективность на определённой клеточной популяции. То есть либо на Т-клетках, либо на НК-клетках. То есть в целом здесь каких-то сложностей дополнительных не было. Ну, кроме того, что НК-клетки просто сложнее культивировать, чем Т-клетки. Вот, а по поводу второго вопроса. Да, мы удаляли, получается, и наивные, и терминально дифференцированные клетки. Это, без сомнения, влияет на, ну, как мы уже поняли по результатам, на их персистенцию, и в то же время это помогает снизить процент того, что у вас возникнет вот эта вот реакция трансплантата против хозяина, за которую чаще всего отвечают именно наивные клетки. Вот, наверное, как-то так. Спасибо.

**Председатель диссертационного совета Мирошников А.И.**

Еще вопросы? Не вижу. Спасибо. Научному руководителю, пожалуйста, слово, Алексей Вячеславович.

**С.н.с. лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН, к.б.н. Степанов А.В.**

Здравствуйтесь, здравствуйтесь. Меня слышно, да?

**Председатель диссертационного совета Мирошников А.И.**

Да, конечно.

**С.н.с. лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН, к.б.н. Степанов А.В.**

Здравствуйте, спасибо большое. Здравствуйте, уважаемые коллеги. Хотелось бы дать характеристику Дмитрию Васильевичу. У него медицинское образование, что очень помогло ему в этой работе, потому что тут очень много именно клинических данных было и само предложение такое клиническое. Это очень важно, чтобы понимать не просто, что он делает, а зачем, кому это может помочь, а кому не может. И Дмитрий сам подошёл к Александру Гавриловичу после его выступления в МГУ, сказал, что хочет заниматься CAR T клетками, и пришёл к нам в лабораторию. Это всегда похвально, такая инициатива. Дмитрий является самостоятельным учёным. Он пишет и гранты, и статьи уже активно сам пишет. Активно отвечает на замечания рецензентов. С ним уже довольно приятно работать. И он освоил большое количество методов, которые раньше мы даже не думали, что мы можем делать, особенно всякие гемопоэтические модели или нокауты. И он их сам успешно освоил и обучил ещё коллег, студентов, и коллег Дмитрия Рогачева. То есть он очень активный такой участник научного процесса, коммуникативный. И что важно в Дмитрии, что он никогда не унывает. Он всегда верит в успех, никогда не расстраивается, и это очень важно в научной деятельности. Так что я очень доволен тем, что Дмитрий появился у нас в лаборатории, с ним приятно работать, и максимально положительную даю ему оценку как сотрудника. Спасибо.

**Председатель диссертационного совета Мирошников А.И.**

Спасибо. Владимир Александрович, пожалуйста, вам слово.

**Ученый секретарь Олейников В.А.**

Так, ну теперь, значит, речь пойдёт о отзывах. Ну и первое, значит, заключение. *(Зачитывает положительное Заключение организации, где выполнена диссертация)*. Это учреждение, где выполнена работа. Работа выполнена в нашем институте. Биографические такие-то данные, я зачитывал. Обучение в аспирантуре с 2020 года. Научный руководитель Алексей Вячеславович Степанов только что выступал. Тема утверждена в первой редакции 9 декабря 2020 года, в последней редакции 4 октября 2023 года, то есть там были минорные изменения темы. Далее, тема была представлена на семинаре отдела пептидно-белковых технологий летом этого года, и, соответственно, по результатам этого семинара дано следующее заключение. Ну, во-первых, об актуальности темы. Ну, это, как обычно, так сказать, связано с тем, что онкологические заболевания – это очень серьёзно, и любое развитие в этом направлении, оно уже, так сказать, является актуальным. А тут ещё с тем, что развитие применения генно-инженерных аутологических Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором, является одним из таких перспективных направлений персонализированной медицины. То есть тема

актуальна. Личное участие Волкова заключается в планировании проведения научных экспериментов, обработке интерпретаций полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций. Степень достоверности результатов не вызывает сомнения. Результаты опубликованы в международных научных журналах, использованы целый комплекс современных методических подходов, современных воспроизводительных молекулярно-биологических, биохимических, иммунологических методов исследований. Новизна. Ну, здесь перечислено уже то, что мы сегодня, так сказать, даже слышали. Целая серия разных замечаний, что впервые практическая значимость результата, результатов. Опять же, перечислены некие вещи, связанные с применением. Научная специальность. Диссертация планируется представлением в защите на исследование учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 молекулярной биологии. Это полностью соответствует содержанию работы. Материалы диссертации достаточно полно опубликованы соискателем в трёх статьях в хороших журналах. Кроме этого, представлено на международных российских конференциях. Далее идёт подробное, достаточно подробное перечисление результатов проведённых исследований. Ну и в заключении, значит, записано, что диссертация Волкова Дмитрия Васильевича рекомендуется к защите на соискании учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 молекулярная биология. Подписано председателем семинара доктором химических наук профессором РАН Алексеем Анатольевичем Белогуровым, подтверждено Ямпольским Ильёй Викторовичем и утверждено директором нашего института академиком Габибовым Александром Габибовичем.

Теперь отзыв ведущей организации, в качестве которой выступил Институт иммунологии ФМБА России. *(Зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный)*. Отзыв полностью положительный. Опять же, начинается с подтверждения актуальности темы диссертационной работы. Ну и тут с самого начала. Одним из ключевых вопросов по разработке CAR T клеточной терапии остаётся поиск антигена, ассоциированного с опухолью, которая бы отсутствовала в других тканях. Важным вектором развития CAR T терапии является подход к использованию аллогенных Т-клеток. И в целом тема рассматриваемой диссертационной работы представляется актуальной. Соответствие темы диссертации указанной специальности соответствует специальности 1.5.3 молекулярная биология. И даже перечислены направления: номер 6 молекулярная биология клетки, номер 9 геновая белковая клеточная инженерия. Основные результаты. Ну, здесь опять же, подробно описаны, конкретно, значит, вот эти полученные результаты. О которых мы сегодня слышали. Достоверность, достаточное количество

экспериментального материала, широкий комплекс методов и подходов, повышенные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и являются достоверными. Научная новизна. Впервые показано, что нокаут рецептора CD45 не снижает цитотоксичность Т-клеток, но снижает их противовоспалительную активность, а также что нокаутные по CD45 CAR45T клетки эффективно элиминируют человеческие гемопоэтические клетки *in vivo*, и это расширяет представление о механизмах регуляции сигнала активации от Т-клеточного и химерного антигенного рецептора. Впервые продемонстрирована эффективная элиминация опухоли с помощью аллогенных CAR19 Т клеток. Изучены функциональные фенотипические особенности CAR19 Т клеток. Новые связи выявлены между фенотипическими маркерами и функциональными характеристиками иммунотерапевтических агентов. Теоретическая значимость работы. Данные, представленные в работе, позволяют по-новому взглянуть на использование геномодифицированных эффекторных клеток иммунной системы. Таким образом, исследование обогащает теоретическую базу для разработки новых терапевтических подходов, углубляет понимание иммунологии онкогематологических заболеваний, а также демонстрирует новейшие методики в области изучения Т и НК клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами. Полученные результаты могут быть использованы при подготовке учебных программ в высших учебных заведениях медицинского профиля, а также при разработке новых курсов повышения квалификации медицинских работников. Научно-практическая значимость. То есть подчёркивается, что дистанционная работа имеет высокую научно-практическую значимость. Выявлены некие свойства, которые позволяют использовать полученные клетки как новый тканеспецифичный и менее токсичный агент для кондиционирования пациентов перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, в том числе при терапии большого количества гемопоэтических опухолей. Общая характеристика диссертационной работы. Ну, тут классическая структура, 135 страниц, 173 источника. Введение кратко аргументируется актуальность проблемы, цели и задачи. Достоверность результатов подтверждается публикациями. Обзор литературы чётко структурирован, написан понятным языком, широко охватывает материал, содержит все необходимые данные для понимания диссертационной работы. Особое внимание в литературном обзоре уделено кондиционированию пациентов. Объем проработанного литературного материала, уверенное оперирование им свидетельствует о том, что диссертант имеет высокий уровень теоретической подготовки, хорошо разбирается в тематике исследований. Материалы и методы. Раздел позволяет понять схему выполнения всех экспериментов и воспроизвести их. То есть методический уровень диссертации заслуживает высокой оценки. Результаты

обсуждения две части. Первая часть. Разрабатываются агенты для адаптивной иммунотерапии онкогематологических заболеваний, кондиционирования пациентов. Вторая часть. Описываются результаты клинического исследования терапевтических потенциалов и характеристики аллогенных CAR19 Т лимфоцитов с фенотипом Т-клеток памяти. Выводы обоснованы, автореферат полностью соответствует работе, значимых замечаний по содержанию оформления диссертации нет. В то же время хотелось бы отметить, что в работе не рассматриваются причины более низкой секреции провоспалительных цитокинов Т и CAR Т клетками после нокаута гена, кодирующего CD45. Также в главе 4.2.7 о нокаутных по CD45 CAR45 NK клетках не указано, какое происхождение у клеток мишеней по отношению к CAR45 NK клеткам аутологичное или аллогенное. Однако вышесказанное не влияет на общую положительную оценку работы, а диссертационная работа является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для молекулярной биологии. Сама диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым кандидатским диссертациям. Ну, соответственно, положение её о присуждении учёных степеней утверждено постановлением правительства Российской Федерации, постановление номер 845 со всеми изменениями. И автор достоин присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 молекулярная биология. Значит, отзыв заслушан на заседании расширенного семинара лаборатории молекулярной иммуногенетики ФГБУ ГНЦ Института иммунологии ФМБА России и подписан заведующим лабораторией молекулярной иммуногенетики этого института Кофиади И.А. Отзыв утверждён директором ФГБУ Института иммунологии ФМБА России, доктором медицинских наук, профессором, чл.-корр. РАН Хаитовым М.Р.

**Председатель диссертационного совета Мирошников А.И.**

Спасибо. Дмитрий Васильевич, ну, вроде бы и отвечать нечего. Тогда давайте на автореферат.

**Ученый секретарь Олейников В.А.**

В диссертационный совет поступило два отзыва на автореферат. Значит, отзывы полностью положительные.

*(Зачитывает первый отзыв).* Практическая значимость результатов несомненна, достоверность не вызывает сомнений. Подписан кандидатом физико-математических наук, директором ООО "ЭМ Энд ЭС Десижанс" Косинским Юрием Анзельмовичем. Значит, вот это первый отзыв.

*(Зачитывает второй отзыв).* И второй тоже. Представлено убедительное обоснование, перспектив, подходов использованных. Поставленные задачи решены в



полном объёме. И подписан отзыв кандидатом биологических наук, научным сотрудником кафедры биофизики, биофака МГУ Ярошевичем Игорем Александровичем. То есть полностью без замечаний.

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Спасибо. Ну, слово предоставляется теперь оппоненту. Сергей Владимирович, пожалуйста.

**Официальный оппонент г.н.с. лаборатории молекулярных биотехнологий ИБГ РАН, д.б.н. Тиллиб С.В. (Излагает отзыв. Отзыв положительный)**

Здравствуйтесь, уважаемый председатель, члены диссертационного совета, коллеги. Мне было очень приятно ознакомиться с этой высококлассной работой. И я написал довольно большой отзыв, писал его уже довольно давно, поэтому сейчас я, наверное, просто зачитаю какие-то фрагменты его. Принципиальное. Но главное, что, на мой взгляд, действительно работа очень достойная, приятно наблюдать. Было за докладом, потому что доклад тоже очень хорошо подготовлен. И у меня самое приятное впечатление оставила эта работа. Я скажу основные какие-то положения. Понятно, что уже многие говорили, поэтому я в сокращённом формате это делаю. Диссертация Дмитрия Васильевича Волкова представляет собой высококлассное, комплексное, фундаментально-прикладное исследование в очень актуальном сегодня направлении CAR T иммунотерапии для лечения больных онкогематологическими заболеваниями, связанными с получением и применением инфицированных химерными антигенными рецепторами T-клеток и НК-клеток иммунной системы человека. Эта технология позволяет сочетать антитело-опосредованное специфическое таргетирование заданных поверхностных маркеров раковых клеток и цитотоксичность т-лимфоцитов или НК-клеток. И в работе продемонстрирована возможность совмещения кондиционирования и противоопухолевой терапии при помощи созданных CAR T клеток с отредактированным геномом с нарушением экспрессии пан-лейкоцитарного антигена CD45 и специфичностью в то же время к CD45. А также впервые показано, что аллогенные CAR T клетки с фенотипом клеток памяти способны эффективно элиминировать В-клеточную опухоль и не вызывают существенные реакции отторжения у пациентов с рецидивами опухолей. Я не буду подробно останавливаться, очевидно, что работа чрезвычайно актуальна сегодня. Проведена на самом высоком уровне и, в общем, публикации, тезисы и качество проведённых исследований с контролями и вообще подробные описания проведённых экспериментов не оставляют сомнений в достоверности результатов и в значимости результатов. Действительно получены принципиально новые знания в такой актуальной области, и они имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Конечно, я

дальше скажу, что даже, по-моему, это избыточно, то, что в работе продемонстрировано уже применение данной технологии для лечения конкретных больных. Вот, конечно, такая смелая, но, в общем, яркая часть работы. Ну, про структуру диссертации здесь так подробно не говорили, но, в общем, она построена по классическому образцу, содержит, как обычно, введение, обзор литературы, материалы, методы, результаты обсуждения, заключения, выводы, список сокращений. Здесь просто замечу, что список сокращений желательнее было бы дать его в начале, потому что я его нашёл, только уже прочитав работу. Список литературы включает 173 ссылки. Диссертация включает три приложения. Обзор состоит из трёх основных частей и заключения, содержит основную базовую информацию, которая требуется для понимания актуальности задачи проводимого исследования в контексте общего положения дел в данной области. Автор описывает основные сегодняшние представления и последние данные, касающиеся кондиционирующей терапии, основных сведений об общем лейкоцитарном антигене CD45, базовые сведения и актуальные задачи в области CAR T клеточной терапии. Обзор изложен весьма компактно, на 25 страницах, написан понятным языком, логично, информативно и достаточно сфокусирован. То есть он компактный, но вообще вся работа, надо отметить, что, во-первых, там мало таких стилистических ошибок работа написана ясным языком и очень сфокусирована, компактна и её легко читать. В главе материалы и методы достаточно подробно описаны многочисленные, весьма разнообразные методики, использованные для решения поставленных задач. Следует отметить использование автором очень широкого и впечатляющего арсенала самых современных методов молекулярной клеточной биологии, цитофлуориметрии, а также особо отмечу впечатляющую работу с иммунодефицитными мышами. Здесь уже говорил, что, ну, скажу пару слов про главу результаты обсуждения. Диссертант последовательно излагает полученные результаты и иллюстрирует их с помощью наглядных рисунков и таблиц. Как уже говорилось, эта глава содержит введение и два больших раздела. В общем, я не буду, наверное, повторяться. Среди основных результатов работы отмечу следующее. С целью создания новых возможностей адаптивной иммунотерапии, основанных на таргетировании разных изоформ пан-лейкоцитарного антигена CD45 для кондиционирования пациентов перед трансплантацией костного мозга от донора были получены методами генной и клеточной инженерии устойчивые к аутоксичности CAR-T и CAR-NK клетки, в которых нарушен ген, кодирующий пан-лейкоцитарный антиген CD45, и при этом встроены химерный антигенный рецептор, специфически связывающий антиген CD45 на поверхности клеток. Показана воспроизводимость и высокая эффективность проводимого геномного редактирования с целью нокаутить ген, кодирующий белок CD45 в Т и НК клетках. То

есть здесь можно сказать, что подобный подход может быть применён и для создания других химерных рецепторов. Отмечу в плане удачного преодоления возникающих сложностей, что в данной работе с целью преодоления исходно-наблюдающегося такого частичного братаубийства полученных CAR-T клеток при их размножении удалось найти подходящий реактив, обратимый ингибитор тирозиновых киназ дазатиниб. Убедительно продемонстрирована требуемая функциональная активность полученных CAR-T клеток как *in vitro*, так и на хитроумных гуманизированных мышинных моделях *in vivo*. Особо отмечу очень наглядные, изящные, эффектные опыты на иммунодефицитных мышках по элиминации CD19-позитивных и CD45-позитивных опухолей. Также автором впервые была показана эффективная элиминация В-клеточной опухоли у пациентов аллогенными CAR19 Tm клетками, полученными из популяции Т-клеток памяти гаплоидентичных доноров в отсутствии тяжёлой реакции отторжения трансплантата. Конечно же, особо отмечу несколько отдельные направления представленной работы, может быть, несколько избыточные для этой защиты, очень смелые, однако, чрезвычайно значимые и яркие в плане практического применения разрабатываемых CAR T-препаратов, использование для терапии пациентов с повторными релапсами острой лимфобластной лейкемии. В разделе «Заключения» кратко изложены основные результаты исследования, обсуждены теоретическая и практическая значимость данной работы. В разделе «Выводы» подведены итоги работы. Выводы не вызывают сомнений.

Теперь по замечаниям. Принципиальных замечаний по сути данной работы и по сделанным выводам у меня нет. Однако, помимо некоторых выявляемых, ну, очень небольшого числа грамматических неточностей, англицизмов, я бы хотел сделать ряд замечаний, сформулировать некоторые вопросы и предложения в основном дистанционного характера.

1. Небольшое замечание к литературному обзору. Интересно, как происходит взаимосвязь узнающей и эффекторной функций вот этого химерного антигенного рецептора? Есть ли какие-то литературные данные на этот счёт? В принципе, это, конечно, сложная вещь, но вот хотелось бы, чтобы было побольше рассказано по этому поводу, потому что это именно принципиальная вещь. Вот связь узнающей и эффекторной частей вот этого химерного рецептора.

2. Второе. Основные мои замечания в экспериментальной части связаны с оформлением, в первую очередь, раздела материала и метода. Здесь я, наверное, просто скажу, что там не указан где-то фермент, не указаны составы растворов, концентрация реактивов, время инкубации. Просто где-то это довольно стандартные процедуры, но все-

таки в такой работе нужно это указать. Неудачный перевод английского термина, это я не буду говорить.

3. Хотя в конце диссертации есть замечательное приложение, хотелось бы видеть 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 трёх разных компаний. Однако не указано, какие из них использовали в опыте, результаты которых представлены, например, на рисунках 16 и 22. Интересно, к какому именно домену белка получены антитела и насколько полные антитела детектируют различные изоформы CD45. Этот вопрос был уже освещён в докладе и было сказано, что все формы познаются полученным химерным антителом.

4. При исходном выборе направляющих гидовых РНК были выбраны три различных варианта. Согласно представленным результатам, сработал весьма эффективно только один из трёх вариантов. Есть ли у диссертанта соображение, почему это так?

5. На рисунке 16В представлены данные секвенирования в области геномного редактирования, однако нет дискуссии, какого рода изменений произошли, терминации рамки, изменения кодирующей последовательности. Автор тоже ответил на это в своём докладе. Интересно, на основании чего выбрали 183 других сайта для проверки? Предполагаю, что по гомологии с последовательностью гидовой РНК2. Это не указано в работе. Я не нашёл.

6. Подписи к некоторым рисункам, на мой взгляд, недостаточно подробные. Желательно указать, например, на рисунке 17, анализ Т-клеток после нокаута. Желательно указать, какого именно нокаута. Желательно, чтобы рисунки были 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 карте препарата. Таких, как сколько именно CAR Т клеток вводили пациентам и как именно это делали, в каком режиме, как следили за последствиями. В докладе было показано, как много людей из разных организаций принимали участие в этой работе, поэтому, конечно, это такое комплексное, сложное исследование, и понятно, что диссертант в этой работе делал какую-то важную часть, но вот, может быть, именно эти режимы введения, это все-таки специфика уже непосредственно медицинской организации.

8. Дискуссионный вопрос. На рисунке 69 результатов. В разделе результатов указано, что использовали биспецифический активатор Т-клеток блинатумомаб, который связывает CD19 на опухолевой клетке и CD3-эпсилон на Т-лимфоцитах, активируя ТКР.

На рисунке 19В видно, что цитотоксичность Т-клеток и Т-клеток с нокаутом CD45 сопоставимы. Мне интересен в этой связи глобальный вопрос, в чем может быть преимущество дорогой инвазивной карты технологий по сравнению с использованной здесь технологией биспецифичного клеточного активатора, который можно вводить системно прямо в пациента и избежать клеточных модификаций XV. Мне просто по моей работе ближе вот этот подход биспецифических конструкций, которые соединяют иммунные клетки, например.

Заключение. Сделанные замечания касаются в основном оформительского плана, носят дискуссионный характер и ничуть не снижают самой высокой оценки данной очень интересной работы, выполненной на высоком методическом уровне. Таким образом, диссертационная работа Волкова Дмитрия Васильевича на тему "Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной терапии гемопозитических опухолей", представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 молекулярная биология, является законченной самостоятельно выполненной работой. По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертация Волкова Д.В. полностью соответствует требованиям, предъявляемым кандидатским диссертациям в соответствии с пунктами 9-14 положения присуждения учёных степеней, утверждённого в постановлении правительства Российской Федерации от 24.09.2013 номер 842 с изменениями в постановлении правительства Российской Федерации. Здесь они перечислены, их много, а сам диссертант Волков Д.В. заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 молекулярная биология. Спасибо за внимание.

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Спасибо, Сергей Владимирович. Дмитрий Васильевич, отвечайте на вопросы, только не повторяйте то, что у вас было в докладе. На половину вопросов вы, по-моему, уже ответили.

**Диссертант Волков Д.В.**

Сергей Владимирович, спасибо большое за обстоятельный анализ работы, за вопросы. Наверное, я отвечу на вопрос о такой теоретической стороне вопроса про химерный антигенный рецептор, про связь узнающей и эффекторной части. В целом, машинерия, которая за этим стоит, она аналогична Т-клеточному рецептору, за исключением того, что в Т-клеточном рецепторе вот эта вот сборка иммунологического синапса, она осуществляется всеми участниками комплекса этого рецептора, но индуцируется это все тем, что у нас связывается антиген, там презентируемый в комплексе

гистосовместимости в случае Т-клеточного рецептора, в случае химерного антигенного рецептора у нас получается просто связывается нативный антиген. Из-за этого индуцируются конформационные изменения молекулы, которые, в свою очередь, провоцируют появление вот этого иммунологического синапса, кластеризацию этих рецепторов, в связи с чем дальнейшее конформационное изменение приводит к тому, что в эффекторной части, то есть в костимулирующих доменах в сигнальном домене рецептора открываются тирозины для фосфорилирования, и одновременно с тем, что у нас образуется вот этот вот иммунологический синапс, в области этого синапса нарушается баланс между фосфатазами и киназами, то есть тирозиновые фосфатазы, тирозиновые киназы, и, соответственно, те тирозины, которые у нас открываются на сигнальных доменах, на костимулирующих доменах, становятся доступны для фосфорилирования, дальше сигнал уже передаётся там, ну внутрь клетки с помощью каких-то переносчиков до транскрипционных факторов соответствующих. И запускается вот этот вот каскад пролиферации клеток, активации, выделения цитокинов с какой-то активностью. Собственно, вот как-то так. И, наверное, ещё про клинические данные, ну, я узнал у коллег, как это все происходило точно, то есть там было два варианта введения, когда пациентам вводили CAR-T вместе с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток, тогда доза CAR-T была меньше, то есть там 100 тысяч клеток на килограмм. Когда им вводили CAR-T клетки уже после трансплантации, то есть второй вариант введения, доза клеток была больше в 5 раз, то есть 500 тысяч на килограмм. И такой дискуссионный вопрос про, наверное, ещё геновые РНК. Ну, собственно, сама вот эта вот процедура, она довольно по-разному переносится разными клетками, и, соответственно, последовательность вот этих геновых РНК, она влияет и на связь белка КАС-9 с ДНК и на то, какие вторичные структуры геновая РНК может образовывать, то есть на комплекс самой РНК с этим белком КАС-9. Ещё есть различные тоже такие методы оценки эффективности геновых РНК. Исследователи синтезировали огромное количество этих геновых РНК, меняли, соответственно, последовательность и смотрели, как они, как с помощью них нокаутируются клетки. И, соответственно, там есть разные оценки, то есть вот по оценке, например, одной из таких наиболее известных, у той геновой РНК, которая у нас сработала, у неё был самый наивысший балл, 0.6, у остальных там в районе 0.4. Ну и считается, что должно быть вот это вот значение должно быть больше 0.5, ну или в районе 0.5, чтобы эффективно происходил нокаут. Вот, соответственно, ну там, скорее всего, ещё куча факторов влияет на успешность этой процедуры. Ну, я бы, наверное, сказал то, что для нашей работы больше мы как потребители такие использовали уже готовую какую-то схему, то есть если у нас геновая РНК сработала, то мы её, собственно, использовали. Вот,

а по поводу того, насколько интереснее использовать биспецифические вот эти вот агенты. Да, мне тоже интересно это направление. И, ну, наверное, хорошей характеристикой этих биспецифических агентов является то, что они образуют классический иммунный синапс как в Т клеточном рецепторе. То есть это более физиологичное такое явление. Но в случае, например, тех же CAR T клеток, мы вводим их один раз, ну или там дробно, но вводим как бы цельную дозу. И мы формируем иммунитет с CAR T клетками памяти, которые могут задерживаться в тканях и обеспечивать более долгосрочный эффект этой CAR T терапии. В случае биспецифического антитела мы привязаны к тому, что мы должны каждый раз делать инфузию этих антител. здесь несопоставимый период полувыведения препарата. и опять же, если обращаться к каким-то клиническим данным: нет, к сожалению, пока сравнения прямого, то есть CAR-T против этих биспецификов, все эти результаты оцениваются ретроспективно, либо по результатам клинических исследований, либо в рамках госпитального исключения какие-то исследования. И все-таки есть ощущение пока, что CAR T более эффективны в элиминации опухоли, особенно на поздних стадиях заболевания. То есть, если, допустим, мы посмотрим на complete response, то есть это полноценная ремиссия. В случае CAR-T у нас 45%, в случае биспецификов только 17%. Поэтому, наверное, как и CAR-T, технология без специфических антител, она тоже гибкая очень и в данный момент очень сильно развивается, поэтому я думаю, что в конце концов мы придем к тому, что может быть даже совместно это будем использовать. Вот, наверное, всё.

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Сергей Владимирович, вы удовлетворены? Спасибо. Так, второй оппонент. Андрей Борисович Судариков, пожалуйста.

**Заведующий отделом молекулярной генетики, заведующий лабораторией молекулярной гематологии НМИЦ Гематологии, д.б.н. Судариков А.Б. (Излагает отзыв. Отзыв положительный).**

Добрый день, уважаемые коллеги. Прежде всего я хочу поблагодарить руководителей и Александра Габибовича за то, что меня позвали. Для меня большая честь выступить в этом зале, и я получил большое удовольствие, читая работу. Работа действительно очень хорошая. Ну, общая характеристика работы уже была дана предыдущим оппонентом, поэтому, с вашего позволения, я не буду особо задерживаться и ничего нового по этому поводу сказать не могу по структуре диссертации. Но все-таки два слова я хотел бы сказать про актуальность. Вот как бы с позиции научного центра гематологии, который я в настоящий момент представляю. CAR T терапия – это действительно революция. И нам регулярно врачи на экране показывают МРТ-картинки с массивными опухолями до

введения CAR T клеток и после введения CAR T клеток. И это как ластиком стерли просто опухолевую ткань. И это помогает очень многим пациентам, и это активно развивается, но остаются некоторые проблемы с картой терапии. Ну, одна проблема, что до настоящего времени в основном таргетируются B-клеточные антигены, а спектр опухолей, в том числе гематологических, он значительно шире. Дмитрий Васильевич приложил руку к решению этой проблемы, то есть он разрабатывает метод таргетирования пан-лейкоцитарного антигена. Это чрезвычайно важно. Вторая проблема – это побочные эффекты, связанные в основном с цитокиновым штормом, который иногда возникает при введении CAR T клеток. И вот та часть работы диссертанта, которая посвящена изучению вариантов приготовления CAR T клеток из клеток памяти, и где он показывает, что эти клетки обладают меньшей аутоагрессивностью, она тоже очень важна и тоже очень актуальна. Ну и, наконец, тот подход, который предполагает использование CAR T клеток для кондиционирования перед аллогенной трансплантацией, он тоже весьма перспективен, и в данном случае результаты, полученные диссертантом, тоже очень важны. Мне очень понравился литературный обзор. Он хорошо иллюстрирован, написан хорошим литературным языком, практически не содержит опечаток и каких-то неточностей. И, наверное, он заслуживает отдельного опубликования в широкой печати, как мне кажется. И вот у нас в институте издается журнал гематологии и трансфузиологии. вот сейчас как раз собирается номер посвященный целиком CAR T клеточной терапии если бы Дмитрий Васильевич нашел возможным какую-то часть работы туда послать это наверное было бы весьма целесообразно ну и амплуа оппонента конечно же подразумевает наличие каких-то замечаний вопросов и указания на недочеты, поэтому я хотел бы такие, ну я должен сказать, что часть недочетов и моих замечаний уже были устранены в докладе, Дмитрий Васильевич соответствующим образом поменял некоторую терминологию.

А что бы мне хотелось все-таки еще дополнительно услышать:

1. вот в той части работы, где изучаются карты клетки, таргетированные к пан-лейкоцитарному антигену, там действительно возникает проблема с аутоксичностью этих клеток, поскольку антиген пан-лейкоцитарный. И это решается тем, что делается нокаут соответствующего антигена. Но последовательность такова, что сначала вводится эффектор, а потом делается нокаут антигена. Почему нельзя было сделать наоборот? Возможно, этому есть какие-то принципиальные технологические препятствия или идеологические комментарии по этому поводу. Я хотел здесь услышать.

2. Второй вопрос в экспериментах *in vivo* по поводу мышинных моделей. Автором использовались мыши, нагруженные человеческими клетками. Для этого использовались периферические клетки крови человека. Но эта модель разрабатывается для исследования



возможностей кондиционирования организма и, соответственно, для замены кроветворения при трансплантации. Но дело в том, что клетки периферической крови человека – это терминально дифференцированные клетки, а задача кондиционирования направлена как раз на недифференцированные предшественники, стволовые клетки. Хотелось бы услышать, насколько диссертант считает такую модель адекватной для исследования процессов кондиционирования.

Ну и я должен сказать, что все мои замечания, они носят в основном дискуссионный характер. И далее я, наверное, должен зачитать заключение, что диссертация Волкова Дмитрий Васильевич полностью соответствует требованиям, предъявляемым кандидатскими диссертациями в соответствии с пунктами 9-14, положения о присуждении ученых степеней, и там дальше перечисление всех постановлений правительства. А сам диссертант, Волков Дмитрий Васильевич, достоин присуждения искомой степени, кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 молекулярная биология.

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Спасибо. Спасибо, Андрей Борисович.

**Заведующий отделом молекулярной генетики, заведующий лабораторией молекулярной гематологии НМИЦ Гематологии, д.б.н. Судариков А.Б.**

Я могу садиться?

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Да, конечно. Дмитрий Васильевич, ну вы обещаете, что опубликуете обзор журнала?

**Диссертант Волков Д.В.**

Я очень постараюсь. Есть проблема, что, ну, большая часть результатов, конечно, уже опубликована, поэтому не знаю. Да, конечно. Отвечая на ваше замечание по поводу последовательности действий, я бы, наверное, сказал следующее. CD45 – это важный регулятор не только в процессе созревания этих клеток, но и в процессе активации. Сама вот эта вот методика модификации клеток с помощью лентивирусной трансдукции, она предполагает их преактивацию специальными микросферами, на которых есть антитела к CD3 и CD28, которые имитируют физиологическую активацию этих клеток. Поэтому, если мы уберем этот белок до того, как трансдуцируем клетки, понятное дело, что какая-то часть его останется на поверхности клеток, но я думаю, что это скажется на эффективности активации. И кроме того, вот эти вот протоколы, которые мы использовали для получения CAR T клеток, они до этого были отработаны много раз при получении обычных CAR T клеток. Если мы туда включаем нокаут до трансдукции, эффективность, я считаю, будет низкая у трансдукции. То есть мы получим очень маленький процент клеток с химерным антигенным рецептором, которым предстоит уничтожить огромную

оставшуюся популяцию CD45-позитивных клеток. Это приведет к тому, что у нас в конечном продукте, который мы исследуем, будет низкий процент этих CAR T клеток, что снизит эффективность терапии. Снизит эффективность тех тестов, которые мы проводили, снизит эффективность конечной терапии, на которую все нацелено. А по поводу нашей модели оценки *in vivo* элиминации вот этих вот клеток крови человека. Да, конечно, я согласен, что это не полностью отражает то, на что мы нацелены, именно на элиминацию гемопоэтических стволовых клеток. Однако для создания таких мышей необходима очень хорошо отлаженная технология, и мы, к сожалению, ее пока что не обладаем. Вот та модель, которую мы использовали, она все равно направлена на то, что мы как бы элиминируем здоровые клетки человека, то есть не опухолевые, а просто здоровые клетки. И мы показываем, что наши полученные CAR T, они также эффективны и в элиминации здоровых клеток. То есть частично это можно сказать, что кондиционирование произошло. Кроме того, также в работе был представлен эксперимент с элиминацией клеток костного мозга. Правда, *in vitro*, не *in vivo*, но я думаю, что его результаты тоже показательны. Там также через три дня значительная часть этих клеток костного мозга была элиминирована нашими CAR T клетками. Вот, наверное, все, что могу сказать по поводу замечаний.

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Спасибо. Так, коллеги. Ну, следующий пункт у нас дискуссия. Кто желает выступить в дискуссии? Да.

**Заведующий лабораторией биокатализа ГНЦ ИБХ РАН, д.х.н. Габибов А.Г.**

Спасибо. Действительно, я очень рад, что доклад был неплохой. В отличие от Степанова, я не являлся руководителем, автором всех работ. И действительно, Степанов здесь рассказал, что Дима ко мне обратился после моей лекции. Я курс лекций читаю, как заведующий кафедрой на фундаментальной медицине. Действительно, он выразил желание, это всегда подкупает. Честно скажу, что сначала у меня были сомнения. Но Дима скромный человек, действительно ли из него получится то, что мы сегодня видим, у меня такие сомнения были. И очень приятно, что за последние два года, я бы сказал, он эти сомнения развеял. Потому что тема очень сложная, она на стыке молекулярной биологии, клеточной биологии и, в общем-то, даже фундаментальной медицины, и мне очень, так сказать, приятно, что мы в свое время по инициативе моего друга, ушедшего от нас уже, Ричарда Лернера, в эту тематику вписались. Причем не просто я как индивид, а наша лаборатория и даже больше – институт, потому что Юрий Петрович и сотрудники отдела академика Донцовой. В этом участвует и Сергей Михайлович Деев, его сотрудники, в общем CAR T с фундаментальной точки зрения стала одним из направлений нашего института. Второй момент. Мне очень приятно, что здесь, мой старинный друг, хотя он

меня существенно моложе, профессор Судариков. Это один из лучших учеников с точки зрения молекулярной биологии Андрея Ивановича Воробьева. Это очень старые наши контакты. по всем факторам роста и по нашим факторам свертывания крови. И я посчитал, когда мы выбирали оппонентов, то, конечно, я считаю, что мы честны при всех жестких критиках. Мы взяли одного из лучших таких молекулярных иммунологов, В-клеточных иммунологов, профессора Тилиба, который уже ушел, мне кажется, и профессора Сударикова. Так что эта работа действительно была подвержена, мне кажется, достаточно четкой оценке и получены очень хорошие комментарии. Поэтому я должен сказать, что я удовлетворен, что Дмитрий, повторю, оправдал мои личные надежды. У меня очень высокие критерии, вы знаете, может быть, к себе они уже как-то понижают в силу возраста, а к сотрудникам они только повышаются. И Дмитрий соответствует этим критериям, поскольку предварительно я знаю, что он как-то с нами решил продолжать сотрудничество, мне это очень приятно. И я думаю, что свои, так сказать, фундаментальные знания, он выпускник факультета Ткачука, мне кажется, вы неформальной обстановке еще обсудите с профессором Судариковым. Все спасибо большое, значит, я хоть и лицо частично заинтересованное, призываю проголосовать за.

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Спасибо. Еще желающие? Не вижу. Дмитрий Васильевич, последнее слово. Только не показывайте эту картинку, где много сотрудников.

**Диссертант Волков Д.В.**

Хорошо. Большое спасибо членам диссертационного совета, председателю, коллегам, гостям. Огромное спасибо всем, кто меня поддерживал во время аспирантуры, во время учебы и во время написания этой работы. Огромная благодарность и научному руководителю, и Александру Габибовичу, который консультировал постоянно по поводу всех моментов. Большое всем спасибо, и я очень рад, что сегодня собралось так много людей. Надеюсь, вам понравилось.

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Дима, вы молодец. Так, смотрите, значит, счетная комиссия. Профессор Овчинникова Татьяна Владимировна, профессор Безуглов Владимир Виленович и ученый секретарь. Есть возражения? Хорошо, тогда голосуем. ...

*(Проходит тайное голосование)*

**Ученый секретарь Олейников В.А.**

Дорогие коллеги, члены ученого совета и присутствующие. Счетная комиссия закончила свою работу и, соответственно, Дмитрий Васильевич Волков. Результаты подсчета

голосов. Присутствовало на заседании 20 членов Совета, роздано бюллетеней – 20, оказалось в урне бюллетеней – 20, за – 20, против и недействительных нет.

**Председатель диссертационного совета, Мирошников А.И.**

Да, еще раз поздравляем. Так, утверждаем и вопрос по поводу заключения. Да, теперь вопрос по поводу заключения. Есть какие-нибудь проблемы? Замечания, предложения, нет? Тогда утверждаем. Кто за? Прошу голосовать, кто против. Спасибо. Заседание диссертационного совета закончено.

Председатель  
диссертационного совета



академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.