

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

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01

22 февраля 2023 года

Защита диссертации

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Калинина Романа Сергеевича

По теме: «Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов т-клеток и методы регулирования их активности»

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

Москва – 2023

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, от 22 февраля 2023 года.

Председатель
диссертационного совета д.х.н., академик РАН Мирошников Анатолий Иванович

Ученый секретарь
диссертационного совета д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1. Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
3. Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
4. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
5. Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
6. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
7. Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8. Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
9. Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
10. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
11. Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
12. Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
14. Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
15. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
16. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
17. Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
18. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19. Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
20. Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
21. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Мирошников А.И., председатель: Уважаемые коллеги! Кворум у нас есть. Начинаем заседание диссертационного совета. Первая защита у нас Калинина Романа Сергеевича. Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности. Научный руководитель: старший научный сотрудник Степанов Алексей Вячеславович. Официальные оппоненты: Яшин Денис Владимирович, старший научный сотрудник из Института биологии гена, Друцкая Марина Сергеевна из Института молекулярной биологии. Ведущая организация: научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Лопухина ФМБА. Пожалуйста, личное дело.

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает информацию о соискателе и документах, содержащихся в личном деле соискателя).* Да, Калинин Роман Сергеевич, гражданин Российской Федерации. Бакалавриат – Санкт-Петербургский государственный университет по специальности «Биология», далее, семнадцатый год – магистратура, Санкт-Петербургский государственный университет по специальности «Биология». С семнадцатого по двадцать первый – инженер лаборатории биокатализа. Далее, младший научный сотрудник, в настоящее время – инженер-исследователь лаборатории биокатализа нашего института. С семнадцатого по двадцать первый – аспирантура нашего института. Кандидатский экзамен по специальности Молекулярная биология сдан на «хорошо». Работа выполнена в лаборатории биокатализа ИБХ РАН, научный руководитель Степанов Алексей Вячеславович, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа. По теме диссертации опубликованы четыре статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus. Объявление о защите автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя – четырнадцатого декабря двадцать второго года и все необходимые документы имеются.

Мирошников А.И., председатель: Да, спасибо, пожалуйста, Роман Сергеевич.

Калинин Р.С., соискатель: *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Вопросы, пожалуйста. Да, Николай Владимирович.

Бовин Н.В.: У Вас существенную роль в этом исследовании выполняют циклические пептиды. Но Вы ни слова не сказали – что такое циклические пептиды, что они собой представляют, откуда они берутся и т.д. Объясните, пожалуйста. Если у Вас есть дополнительные слайды, то, это вообще, было бы замечательно.

Калинин Р.С., соискатель: Спасибо за вопрос и за замечание. Я не рассказал подробнее, что у нас идет 7 аминокислот, по концам стоят цистеины, за счет этого они циклизируются – получается циклопептид. Использовали библиотеку циклопептидов. Ее разнообразие было 10^9 .

Бовин Н.В.: Откуда берется эта библиотека?

Калинин Р.С., соискатель: Эта библиотека была заказана, она – коммерческая

Бовин Н.В.: Ну, хорошо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще вопросы? Да, пожалуйста.

Купраш Д.В.: Так эти циклопептиды связаны за счет SN-связей? За счет SN-связей они циклически?

Калинин Р.С., соискатель: За счет цистеиновых связей, да. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Да. Пожалуйста.

Купраш Д.В.: У меня два вопроса. Если можно.

Калинин Р.С., соискатель: Да. Пожалуйста.

Купраш Д.В.: Не могли бы пояснить, в чем был рациональ, зачем нужно было, в принципе, делать CAR-T клетки против PD-1. В чем преимущество перед моноклональными антителами?

Калинин Р.С., соискатель: Спасибо за вопрос. Преимущество в том, что мы сразу же модифицируем, ну, теория такая была, что мы модифицируем сразу одним лентивирусом, где у нас несется CAR и в этой же части здесь же через пептид стоит блокатор, что у нас сразу же CAR-T клетки не будут нести PD-1. Т.е., нам не надо проводить дополнительную терапию, что у нас уже модифицированы T-клетки так, что они не будут взаимодействовать с PD-1.

Купраш Д.В.: Но оказалось так, что они меняют фенотип. Понятно.

Калинин Р.С., соискатель: Да.

Купраш Д.В.: И еще я в автореферате прочитал, что в качестве одного из преимуществ модульного подхода CAR-T Вы выдвигаете, что можно отключать CAR-T терапию, переставая давать дополнительное вещество. Вы экспериментально проверяли, что она действительно отключается?

Калинин Р.С., соискатель: Проводили *in vitro* эксперименты, где мы не вводили дарпин-барназу. У нас не активировались CAR-T клетки. Также в перспективе было запускать блокаторы, которые бы несли молекулярно барназу, либо барстар, чтобы взаимодействовать либо с CAR-T клетками, либо сразу же блокировать молекулы-посредники.

Купраш Д.В.: Нет, мне казалось, там другая была идея, что терапия уже идет, т.е. сначала у Вас добавлена барназа, а потом Вы ее перестаете давать пациенту или мыши, так сказать, экспериментальной модели, и прекращается действие CAR-T клеток. Вот так там было написано. Вот эту модель проверяли или нет?

Калинин Р.С., соискатель: Нет, это не проверяли на терапии. Но как происходит терапия - вводятся CAR-T клетки и добавляется молекула-посредник, если пациент отвечает плохо - добавляют больше. Если видят, что гиперактивация происходит, если плохо будет - цитокиновый шторм, то отмена введения дарпин-барназы, т.е. молекулы-посредника и она выводится из организма. И CAR-T клетки не активируются.

Купраш Д.В.: Идея понятна. Вопрос был, была ли экспериментальная проверка?

Калинин Р.С., соискатель: Нет. Экспериментальной проверки не было.

Купраш Д.В.: Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще вопросы? Пожалуйста. Сергей Анатольевич, пожалуйста, к этому микрофону.

Лукьянов С.А.: В общем-то да, работа по охвату, она впечатляет очень сильно. Скажите, а найденные циклические пептиды – вот эти три, они под конкретного пациента функциональны или это некие универсальные изменения, которые можно вносить в CAR-T?

Калинин Р.С., соискатель: Спасибо за вопрос. Это персонализированная терапия. Для каждого пациента будет специфичный циклопептид потому, что большое разнообразие большое В-клеточных рецепторов.

Лукьянов С.А.: Ну скажем так – это очень интересный подход, но реализуемость его требует серьезных там доработок во всей системе там подготовки и легитимизации лекарственных препаратов. Хотя, наверное, в связи с генной терапией перспектива есть. Спасибо.

Калинин Р.С., соискатель: Спасибо большое.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще вопросы. Не вижу. Да, пожалуйста.

Долгих Д.А.: Спасибо за очень интересный доклад. У меня, вот какой вопрос. Вы использовали систему с посредником – барназой-барстар. Но в качестве контроля или просто для интереса вы получали такую конструкцию, где вместо барстара вот в этой клетке сидит просто сразу дарпин? И вот если получали, то, какие ее свойства, какая у нее активность? Я понимаю, что в этом случае теряется возможность управления регуляцией, но, просто, вот получали, смотрели?

Калинин Р.С., соискатель: Именно дарпин, мы не применяли, но применяли одноцепочечный переменный фрагмент в составе химерного антигенного рецептора, который нацелен напрямую на рецепторы эпидермального фактора роста. Вот, на графике я показал. Они по эффективности были примерно одинаковы в цитотоксическом тесте *in vitro*.

Долгих Д.А.: Спасибо.

Калинин Р.С., соискатель: Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо Вам. Еще вопросы? Не вижу. Спасибо.

Калинин Р.С., соискатель: Спасибо большое.

Мирошников А.И., председатель: Так, значит теперь у нас по Зуму научный руководитель.

Степанов А.В., научный руководитель: Да, здравствуйте. Я хотел бы сказать, похвалить Романа. И сказать, что ему не очень повезло, потому что я очень часто ездил по командировкам, поэтому приходилось брать ручное управление Александру Габировичу и Сергею Михайловичу. Вот они ручное управление над ним осуществляли, но Роман справился с таким давлением. Он сделал большинство этих экспериментов *in vitro* и на животных тоже много работал. Конечно, не один он делал, но очень старался. Он очень старательный молодой человек. Очень способный и очень дружелюбный. Я ни разу не слышал, чтобы он ругался когда-либо, то есть он очень такой позитивный товарищ. Всегда всем помогает.

Мирошников А.И., председатель: Может, просто, не слышали?

Степанов А.В., научный руководитель: Я проверял! Вроде ничего такого. Так что я Рому могу порекомендовать, как очень приятного и исполнительного коллегу, с которым очень всегда приятно работать. Вот, и я только с положительной стороны могу его охарактеризовать.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо.

Степанов А.В., научный руководитель: Спасибо Вам.

Мирошников А.И., председатель: Владимир Александрович, пожалуйста.

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает положительное заключение организации, где выполнялась работа)*. Так, ну, во-первых, заключение организации, где выполнялась работа. А она выполнялась в нашем институте в лаборатории биокатализа. Ну, заключение от нашего института. Естественно, сначала идут биографические данные, о которых мы уже поговорили. То, что тема диссертации была модифицирована, то есть первый раз она была утверждена еще в семнадцатом году и в последней редакции – в двадцать втором году. Диссертационная работа представлена на семинаре отдела, и, соответственно, вот заключение по данной диссертационной работе. Ну, во-первых, актуальность темы, направленность исследования. Актуальность связана с тем, что это посвящено борьбе с онкологическими заболеваниями, что само по себе уже делает ее оригинальной и актуальной. Терапия CAR-T клетками изменила многие аспекты клинической и трансляционной онкологии. А значительные успехи, достигнутые на сегодняшний день, привели к быстрому расширению клинических и фундаментальных научных исследований в этой области. Ну, и в этой связи. создание новых методов и комбинаторных подходов для повышения уровня эффективности и безопасности CAR-T терапии в лечении онкологических заболеваний является крайне актуальной задачей. Личное участие, но здесь подчеркивается, что личный вклад заключается в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, также в подготовке материалов научных исследований. А далее, конкретно рассматривается, по каким еще пунктам дополнительно, значит, эти работы выполнены были с участием диссертанта, но совместно с другими организациями и учеными.

Далее, степень достоверности. Выполнена на высоком научном уровне, то есть с использованием самых современных методов. Результаты достоверны. Научная новизна, ну соответственно, при непосредственном участии была разработана платформа для комбинаторного аутокринного отбора, направляющие молекулы для CAR-T терапии, ну и так далее. Практическая значимость, значимость. Метод аутокринной селекции направленного пептида из пептидной библиотеки позволяет создать персонализированный CAR для каждого пациента. Впервые показано, что однодоменные антитела, специфичные к PD-1 могут быть использованы для эффективного блокирования экспрессии PD-1. Создана уникальная система регуляции активности CAR-T клеток. Научная специальность. Подчеркивается, что соответствует диссертация специальности 1.5.3. Молекулярная биология достаточно полно. Опубликованы 4 хорошие статьи. Далее, результаты, ну, только что мы слушали доклад, в котором, в общем-то, эти результаты были

оглашены. И таким образом, представленная диссертация соответствует заявленной специальности – молекулярной биологии и отрасли науки – биологические науки. Ну, и соответственно, вывод, что диссертация рекомендована к защите. Заключение принято на открытом семинаре отдела пептидно-белковых технологий нашего института. 27 человек присутствовало, против – нет, воздержавшихся – нет. Соответственно, подписано председателем семинара Белогуровым, зам. директора Ямпольским, утверждено директором нашего института академиком Александром Габибовичем Габибовым.

Теперь о ведущей организации (*зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный*). Ведущая организация – это ФМБА России Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физ.-хим. медицины имени академика Лопухина». Полностью отзыв положительный. И, опять же, подчеркивается актуальность. Во-первых, конечно, связано, опять же, с борьбой с онкологическими заболеваниями. Пишется, что посвящена исследованию в области разработки новых адресных высокоэффективных и безопасных методов терапии онкологических заболеваний. Развития технологии применения генно-инженерных Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором CAR. Научная новизна. Ну, здесь прямо по пунктам. Как раз вот в трех частях мы слышали в докладе. И вот по пунктам расписано, что вот и то новое, и это новое, и, последнее, тоже это новое. Новизна есть. Структура диссертации классическая: 140 страниц, 255 источников. Опять же отмечается, что обзор литературы четко структурирован, написан хорошим языком, материалы и методы достаточно полны, достаточно подробно изложены все методы, которые использованы. Результаты исследования и их обсуждение состоит из трех опять же больших частей в соответствии с тем, что мы сегодня слышали. Выводы резюмируют полученные результаты. И насчет достоверности. Выполнено с использованием достаточного количества экспериментального материала и широкого комплекса методов и подходов. Освещение диссертации в научной печати – 4 хорошие публикации. Замечания. Но тут очень интересно, что замечаний к диссертационной работе немного. В тексте встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки и неудачные выражения, которые не относятся к научной сути работы. Все. Ну, и заключение, значит. В заключении пишется, что работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам диссертант Калинин Роман Сергеевич заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология. Подписана. Подписана генеральным директором ФГБУ ФХМ имени Лопухина Марией Андреевной Лагарьковой, кандидатом биологических наук, Еремеевым Артемом Валерьевичем и утверждено директором по научной работе этого учреждения доктором биологических наук, Лазарев подписал. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Ну, насколько я понял, замечаний нет, поэтому на автореферат есть отзыв?

Олейников В.А., ученый секретарь: Нет, на автореферат ничего не поступило.

Мирошников А.И., председатель: Тоже ничего нет? Так, ну, тогда что – оппоненты. Денис Владимирович Яшин, будьте добры.

Яшин Д.В., официальный оппонент: *(излагает отзыв, отзыв положительный)*. Уважаемые коллеги, я хотел бы поблагодарить за то, что мне довелось оппонировать такую блестящую работу. Сразу скажу, что мое отношение к этой работе сугубо положительное. Самое главное, наверное, достижение в этой работе, которое не прозвучало тут – это в том, что автору удалось сделать работающий рецептор, по-настоящему работающим, с изменяемой специфичностью. Т.е. теоретически его можно подстроить под практически любую молекулу или вещество, которое может быть в организме. И это, на мой взгляд, очень большое достижение. Вполне его одного бы хватило для того, чтобы можно было эту работу защитить. Однако, автор провел достаточное количество других исследований, в том числе на опухолевых клетках на первичных культурах человека. И я считаю, что эта работа очень-очень достойная. Значит, работа написана, кроме того, что она еще содержит в себе очень важную научную информацию, она еще очень хорошо написана. Я вот лично читал эту работу, как будто приключенческий роман. Т.е. в ней очень хороший подробный обзор литературы. Ничего лишнего. Но то, что нужно в диссертации все там написано. И вообще, она хорошо очень написана. В ней очень маленькое количество оформительских ошибок, неизбежных при таком объеме текста, англицизмов и неудачных выражений. Значит, еще я хотел бы отметить то, что автор очень бережно относится к своим материалам. Вот он провел большую работу по анти PD-L1-терапии, и она пошла не так, как он планировал. Т.е. не сработала его задумка, что анти PD-L1-терапия улучшит CAR-T терапию. Вот многие исследователи просто бы остановились на этом вопросе. Однако, он провел достаточно серьезную работу и показал, что вот это взаимодействие. PD-L1/PD-1 очень важно для функционирования Т-клеток. И поэтому вот этот факт игнорируется практически всеми исследователями, которые используют эту новомодную анти PD-L1 терапию. Ну, и в заключение позвольте мне зачитать эти важные слова. Диссертационная работа Калинина Романа Сергеевича «Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности» является законченной научно-квалификационной работой. Диссертация Калинина Романа Сергеевича полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842, а ее автор Калинин Роман Сергеевич заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология. Спасибо Вам большое за внимание.

Мирошников А.И., председатель: Денис Владимирович, что и замечаний нет? Т.е. роман, который очень интересно читать, да, и замечаний не видно?

Яшин Д.В., официальный оппонент: Ну, у меня были замечания к рисунку. Который здесь был на странице, он не очень хорошо обсужден в тексте. Вот получается, что мыши при

реакции на CAR-T терапию, большая часть мышей – 80% практически, не отвечает на нее, а 20% – практически излечиваются. Вот, как бы вот этот результат в тексте обсужден был недостаточно.

Мирошников А.И., председатель: Ну хорошо, спасибо. Так, второй оппонент Марина Сергеевна Друцкая. Будьте добры. Марина Сергеевна, Вам тоже понравилось?

Друцкая М.С., официальный оппонент: Мне работа очень понравилась, но у меня будут замечания.

Мирошников А.И., председатель: Да, какие?

Друцкая М.С., официальный оппонент: *(излагает отзыв, отзыв положительный).*

Уважаемые коллеги, я с большим интересом и удовольствием ознакомилась с работой Романа Сергеевича. К делу приложен официальный отзыв, в котором содержатся все общие формулировки. По структуре и содержанию работы, я не буду на них останавливаться, но я хотела бы вот отразить, помимо критических замечаний, еще моменты, которые вот здесь пока не прозвучали. Ну, первое, меня заинтересовало, насколько тема CAR-T терапии и клинического применения CAR-T клеток актуальна сейчас в России и вообще в мире. На сайте <https://www.clinicaltrials.gov/> отражены, как правило, большая часть клинических испытаний, которые проводятся в мире. И вот, на сегодняшний день там зарегистрировано около трехсот клинических испытаний с применением CAR-T. В нашей стране там отражено одно единственное испытание – это лечение острого лимфобластного лейкоза у детей в возрасте, у пациентов в возрасте, от трех лет, от трех месяцев до двадцати пяти лет, и это CD-19, CD-22 CAR-T терапия. Речь идет о рекрутировании пятидесяти пациентов. Кроме того, насколько мне известно, подобные клинические испытания проводились в гематологическом научном центре. И там было рекрутировано 60 взрослых пациентов с различными заболеваниями В-клеточных, с различными В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями. И еще одно испытание, опять же в центре Димы Рогачева – это острый мелоидный лейкоз и анти CD-33, CD-123 CAR-T, и это 3 пациента. Т.е. я хочу сказать, что, насколько мне известно, речь идет вот для нашей страны буквально о десятках, ну может быть чуть больше сотни пациентов, которым удалось попасть в такие исследования. И все они были организованы компанией Miltenyi Biotec. И в 2022 году эта компания отказалась сотрудничать с Россией. И, насколько мне известно, на сегодняшний день в Российской Федерации CAR-T терапия даже в условиях клинического применения не применяется. Т.е. таких исследований не проводится, возможно, я ошибаюсь, но вот я не смогла найти такой информации. Соответственно, здесь очевидна актуальность представленной сегодня работы, и больше того, мне кажется, это такое стратегическое направление биомедицинских исследований, которое, разумеется, должно быть горячо поддержано в нашей стране. Значит, Роман Сергеевич в своей работе с CAR-T клетками объединил 3 довольно разных, если угодно, независимых исследования – это создание платформы для отбора опухолеспецифичных CAR против В-клеточных лимфом, разработка внутриклеточного

блокатора PD-1 супрессии CAR-T клеток и, наконец, создание регулируемой модульной системы на основе белковой пары бараза-барстар для возможности инактивации CAR-T клеток в случае необходимости. Реализация этих трех направлений потребовала привлечения широкого спектра таких высокотехнологичных экспериментальных решений. Ну, я как человек, всю жизнь, проработавший с мышинами моделями, была потрясена тем, что в работе участвовало аж 2 линии иммунодефицитных мышей, которым проводили ксенотрансплантации, получали ксенографты опухолевых линий человека. И, действительно, масштаб исследований в этом плане поражает. Давайте теперь по содержанию. Оно отражает основные результаты. Они, как уже здесь упоминалось, опубликованы в российских и международных изданиях. И, в целом, они приведены с логикой заявленных целей и задач. Как я уже сказала, я думаю, это была не простая задача для Романа Сергеевича, потому, действительно – это 3 достаточно разных исследования. Итак, тем не менее, у меня есть ряд замечаний, которые возникли в ходе прочтения работы. Ну, во-первых, в разделе литературного обзора, посвященного проблемам CAR-T терапии, обсуждаются сложности лечения солидных опухолей. Однако все рассуждения сводятся к контрольным иммунологическим точкам, лиганд-рецепторным взаимодействиям и при этом никак не обсуждается опухолевое микроокружение. Такие клетки, как опухоль-ассоциированные макрофаги и фибробласты, секреторный компонент, который производят эти клетки, который, безусловно, должен учитываться при рассуждении о возможных способах терапии. Упоминается цитокиновый шторм, однако, не обсуждается, какие именно цитокины являются драйверами этого процесса и какая перспектива применения, например, анти-цитокиновой терапии вместе с CAR-T терапии – это первое замечание. Второе замечание. В работе несколько раз приводится тезис, что разработанная аутокринная система отбора пептидов в клинической практике будет по времени сопоставима с классической CAR-T терапией. Вот, однако, автор совершенно не упоминает о каких временных ориентирах может идти речь. Сколько времени гипотетически должно пройти с момента, как вы получили клетки, т.е. с момента взятия биопсии у пациента до момента, когда Вы получаете функциональные CAR-T клетки. Еще вопрос. В случае аутокриной селекции на рисунке 12 диссертации – это рисунок 1 автореферата, он здесь был в докладе, тест на самоактивацию, похоже, что не проводился в формате единичных клеток. И если этого не было сделано, то где гарантия того, что собранный B-клеточный рецептор на одной клетке не провзаимодействует с циклопептидом в составе CAR на соседней клетке. Т.е. вот здесь говорилось об аутокриной, но поскольку мы работаем не в формате единичных клеток, то где гарантия того, что не было какой-то крос-реактивности – это второе замечание. Третье замечание. Рисунок 17 диссертации, он же рисунок 4 автореферата. Собственно, Денис Владимирович тоже по этому рисунку задавал вопрос. CAR-T клетки вводили через 17 дней после введения опухолевых клеток. При этом размер опухоли в этой временной точке составлял до 50 мм³. Т.е. это очень маленькие опухоли, а выживаемость мышей после CAR-T составляла

всего 20%. Вот хотелось бы уточнить, почему так мало и нормальная ли это ситуация. Я понимаю, что это очень агрессивные опухоли, но, тем не менее, вот 20% эффективности CAR-T. Что будет, если ввести клетки раньше. Вот почему была выбрана точка именно семнадцатый день, а что будет, если ввести клетки до того, как появляется видимая опухоль и удастся ли повысить эффективность, если вводить CAR-T клетки несколько раз. Четвертое замечание уже касается экспериментов с дарпин-барназами. Они были экспрессивны в бактериальной системе. И вот как контролировалось наличие эндотоксинов в этих образцах. В противном случае схема введения дарпин-барназ – это шестикратное введение в течение месяца с возможными примесями эндотоксинов. Эндотоксин, я напоминаю – это часто используемый адъювант. Вот такая схема введения – она напоминает иммунизацию. И где гарантия того, насколько мне известно об моногенности дарпин-барназ, нет ли такого, что часть эффекта может быть связана с их иммуногенностью и образованием антител. И последнее замечание про NSG мышей. Т.е, насколько мне известно, последняя модель этих мышей, она позволяет не только водить опухолевые клетки и CAR-T клетки, но также для начала восстанавливать гемопоетическую иммунную систему, т.е. это не иммуно дефицитные мыши – это полностью гуманизированные мыши, у которых есть и моноциты пациента. Здесь не уточнено, в каком формате проводилась ксенотрансплантация или нет. Есть минорные замечания, такие как, отсутствие масштабной линейки на изображениях с микроскопией, что не дает возможность понять – это одинаковое увеличение или нет. В частности, на рисунке 14, он же рисунок 2 автореферата и рисунок 16. Русскоязычные публикации в списке литературы, а также в списке публикации автора приведены на английском языке почему-то. Вот и последний вопрос, который меня мучает. Значит, мы говорим о специфичных антигенных рецепторах, вот, соответственно, об их специфичности, т.е. вот как правильно – это специфические, что есть в названии работы, или это все-таки специфичные рецепторы. Хотелось бы этот вопрос прояснить. Если можно, теперь прочитаю заключение. Диссертационная работа Романа Сергеевича Калинина «Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, является самостоятельным и законченным научным исследованием, которое вносит существенный вклад в развитие новых методов и комбинаторных подходов для повышения эффективности и безопасности CAR-T терапии в лечении онкологических заболеваний. Основные результаты диссертационной работы отражены в печати в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых изданиях, средний импакт-фактор $IF=8.59$, в том числе, в таких высокоимпактных журналах как Science Advances и PNAS. Сделанные замечания не ставят под сомнение научную ценность проведенного исследования. Выводы сформулированы корректно и имеют биологическую значимость. По актуальности темы, научному и методическому уровню, качеству полученных результатов, объему проделанной работы, научной новизне и практической значимости

диссертация Калинина Романа Сергеевича полностью соответствует, в некоторых частях превосходит критерии, установленные «Положением о присуждении ученых степеней». Ее автор, безусловно, заслуживает присуждение искомой степени по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология». Большое спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, Марина Сергеевна. Ну, Роман Сергеевич, чтобы не мучился оппонент, давайте отвечайте.

Калинин Р.С., соискатель: Спасибо за вопросы и замечания. По вопросам от Дениса Владимировича и Марины Сергеевны по *in-vivo* экспериментам на мышах, что терапевтический эффект не такой хороший, как бы хотелось. Я согласен с этим замечанием. Можно было доработать эту модель, введя CAR-T клетки раньше. Также можно было еще модифицировать протокол и вводить, например, ИЛ-2 человека, вводить больше CAR-T клеток. Но мы использовали в данной работе положительный контроль, нацеленный на CD-19 и эффект у нас получился найденного циклопептида в составе химерного антигенного рецептора такой же, как и положительный контроль. Далее, по микроокружению опухоли. Я согласен, там много аспектов, они очень интересные и сложные. Я сосредоточился только на иммунной контрольной точке, а именно PD-1 и у меня был акцент сделан на это взаимодействие.

В практике клинической для уменьшения цитокинового шторма, шока, также, когда происходит неспецифическое нацеливание CAR-T клеток, сейчас – это вводят кортикостероиды и антитела. В основном это тоцилизумаб, это против интрелейкина-6. Как и при COVID19 использовали тоже это антитело против цитокинового шторма, однако такая терапия приводит к снижению активности, в том числе, и терапевтических CAR-T клеток. И поэтому важно разработать систему контроля, не снижая активность, не снижая терапевтическую активность, вообще не выключая CAR-T клетки. Регулировать эти плохие побочные эффекты от гипер-активации иммунной системы.

Так, второй вопрос по времени разработки персонализированного химерного антигенного рецептора. Если все этапы отработать, будет занимать около трех-четырех недель. Причем биопсию можно взять раньше, чем проводят терапию, выделить клетки, отсекулировать, получить последовательность В-клеточного рецептора. Уже созданные репортерные клеточные системы, в которых уже есть химерный антигенный рецептор с библиотекой циклопептидов. Проводить отборы, три отбора, также здесь связан следующий вопрос про аутокринный эффект и парокринный эффект. Т.к. у нас химерный антигенный рецептор находится сразу же в одной клетке с рецептором- мишенью – В-клеточным рецептором из реконструированного В-рецептора клеток опухоли пациента, это взаимодействие более высоковероятно, а также мы проводили несколько раундов селекции. В итоге, из набора циклопептидов мы получали один, что скорее всего парокринный эффект терялся в процессе циклов отбора. Далее мы этот циклопептид отобрали. Он уже у нас в составе химерного антигенного рецептора, что можно быстро перекинуть в лентивирусный вектор. Модифицировать Т клетки, получить CAR-T клетки. Этот

пул CAR-T клеток нарабатывается в течение одной-двух недель. Чтобы получить большую популяцию, специфичных CAR-T клеток, далее вводят пациенту. Классическая CAR-T терапия занимает около двух-трех недель. Однако, я как тут отметил, что опухоль можно взять раньше. И получается от выделения T-клеток от пациента либо от донора, чаще от пациента получают. В итоге продукт будет получен примерно в одинаковые сроки.

Так, четвертый вопрос про содержание эндотоксинов в молекулах-посредниках, которые могли бы влиять на иммунизацию. Во-первых, мы применяли на иммунодефицитных мышах, которые не вырабатывают антитела. Далее, до моих экспериментов проводились эксперименты по введению здоровым мышам молекулы барназы-барстара было видно, что нет ответа и смотрели, есть ли производство антител у таких мышей. Далее, я думаю, если будут приклинческие испытания, там изучат более полно эффект вот этих бактериальных белков. Также очистка этих молекул барназы-барстара проводится в несколько стадий. Первая стадия – хроматография. Снимается белок, потому что он экспрессируется вместе и барназа и барстар, потому что барназа действует на бактериальные клетки и не нарабатывается, поэтому необходима коэкспрессия в бактериальной системе. Далее, при хроматографии барстар снимается шести молярным гидрохлоридом гуанидина. Далее проводится еще также ионная хроматография. После получения этого препарата, похожего белка, изучали в LAL-тесте, а именно турбидиметрический кинетический тест, где численно определяется количество эндотоксина, его было 5 единиц на мг белка, что даже ниже, чем использующийся для пациентов, например, интерферон гамма для лечения людей, что говорит о том, что данное получение молекул-посредников с очень низким количеством эндотоксинов. Так, по NSG-мышам, также следующий вопрос. Мой костный мозг не подсаживали мышам, они у нас выступали, только как, но можно сказать, как пробирки, чтобы у них и прижилась опухоль, в том числе, вот эти опухолевые клетки, которые, несли B-клеточный рецептор, реконструированный. Также в следующем эксперименте по модульной системе также водились мышам, чтобы эта опухоль выросла и CAR-T клетки нормально могли персистировать. И также были изучены на 21 день как кровь, так и костный мозг, так и селезенка, что CAR-T клетки у нас присутствуют в организме, в организме мыши.

Так, далее. Спасибо за замечание по масштабной линейке. Там были изображения, сейчас, верхняя панель и нижняя – это в одном масштабе, т.е. это в обычном свете. Это снята флуоресценция. Одинаковый масштаб, что в эксперименте на модульных клетках, так в эксперименте, где мы сортировали клетки Jurkat в платформе. Так, статья, которая у меня была в русском журнале, она также есть в переводном, в полностью переводном варианте. И на него только и ссылаются ученые. Кажется, в основном из Китая. Это обзор литературы в Acta Naturae. Вот, и поэтому было решено указывать в английском варианте эту статью.

Мирошников А.И., председатель: Все?

Калинин Р.С., соискатель: Все, кажется, на все ответил.

Мирошников А.И., председатель: Марина Сергеевна Вы удовлетворены? Уже мучиться не будете? Спасибо большое. Так, дискуссия.

Олейников В.А., ученый секретарь: Кто желает выступить?

Мирошников А.И., председатель: Да, Николай Владимирович, пожалуйста.

Бовин Н.В.: Нет никаких сомнений, что работа замечательная. И, конечно, я буду голосовать за эту работу. Хотел я сказать другое на самом деле. Работа перенасыщена материалом, т.е. здесь произошло то, что в двадцатиминутный доклад втиснуто, втиснут материал, который не рассчитан на двадцатиминутный доклад. Поэтому доклад получился такой по верхам и воспринимается он очень сложно, именно по причине своей перенасыщенности. Я задал один вопрос по этому докладу. На самом деле мне хотелось задать 5–6 аналогичных вопросов потому, что многие связки, многие экспериментальные обоснования и смысловые обоснования были пропущены именно по причине отсутствия времени на это. Если мы посмотрим ретроспективно, то подобные случаи у нас за последние пару лет уже встречались. Поэтому у меня предложение к диссовету такое. Каждая диссертация представляется диссоветом тремя членами совета на защиту, и, давайте, мы ведем такой пункт для рассмотрения вот этими тремя нашими участниками диссовета, которые рекомендуют дать этой, этому докладу двадцать минут или тридцать минут. Имея ввиду что, в основном, все-таки это будут более традиционные доклады двадцатиминутные, но в таких случаях, как мы имели сегодня, не то, что разрешать, но даже рекомендовать расширенный по времени доклад. Я думаю, что мы переживем увеличение времени нашего диссовета на 10 минут, но зато мы получим более понятные членам совета и всем присутствующим в зале. Будет дана возможность лучше понять докладываемый материал. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Да.

Деев С.М.: Не хотел выступать, потому что я соавтор одной из работы или двух работ, но я не являюсь ни руководителем данной работы, ни основным исполнителем. Вот Алексей Степанов, Александр Габибович Габибов. Вот, но я вот по предложению скорее Николая Владимировича хочу выступить. Вот, но давайте сначала про работу. Значит, на мой взгляд, фанатическая работа. Вот, она перегружена, я совершенно согласен. А перегружена сверхвысокими результатами. Здесь три направления. Я еще давно говорил Александру Габибовичу, что давно можно было выпускать Калинина на защиту. И любую из трех частей можно было защищать, как нормальную среднюю хорошую кандидатскую диссертацию. Здесь три главы, которые, конечно, over educated over qualified. Вот, что касается 30 минут, значит, коллеги, вот я являюсь председателем комиссии по надбавкам. Вот когда-то тут несколько лет назад было Вы не представляете сколько сотен обращений было ко мне. Вот сегодня получил еще одно от одного из членов нашего Ученого совета. Предложил мне там некий вопрос по патентам. Значит, вот каждая инициатива она имеет обратную сторону, мне кажется введение 20 или 30 минут по рекомендации – это может вылиться в некую дискриминацию. Кто-то будет обижаться, почему

у меня 20, а не 30 минут. Я абсолютно согласен с Николаем Владимировичем, что доклад перегружен, но я вот слушал ранее доклады. Они были немножко действительно сложны для понимания, здесь были прекрасные, ясные иллюстрации. Калинин не первый раз выступает на наших заседаниях, разных там аспиранских отчетах. И те, кто интересуется работами, они слышали эту работу уже не раз. Вот поэтому я согласен с одной стороны, что материал очень большой и его трудно, но, наверное, есть вот некие рекомендации, рекомендации ВАК, есть практика диссовета. Я бы с осторожностью, давайте обсуждать более подробно. Я бы с осторожностью отнесся к вот этому предложению 20 и 30 минут, может вылиться в некую дискриминацию. Вот, а по самой работе. Знаете, вот - ну гордость. Благодарен Вадиму Тихоновичу, ушедшему от нас, что он меня 23 года назад пригласил в этот замечательный институт. Я член трех диссертационных советов, больше просто нельзя. Вот, и уровень работ, которые у нас представляются, но он впечатляет. Сегодня, у нас будет еще одна защита – очень интересная, и мне кажется, что ну, товарищи, господа, ученые повезло нам, что работаем в таком шикарном институте. И вот эта диссертация, которая сегодня докладывается – это вот пример блестящих работ. Самого Романа, знаю, как человека исключительно скромного, вот, прекрасного, работающего. И вот хорошо, что у нас есть такие ученые. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Хорошо, примем к сведению замечания и предложения Николая Владимировича и Сергея Михайловича. Так, давайте, идите, благодарите Роман Сергеевич. А вы тоже еще будете?

Габибов А.Г.: Ну, действительно, я не руководил диссертацией, но поскольку мы с Сергеем Михайловичем были здесь названы, как Степанов сказал. Да, ну и я не буду говорить о работе. Хотя я так скажу, что некоторые ответы хорошо Роман готовился. Мог бы еще может быть и лучше сказать, но поверьте, это диссертация по статьям проходила очень сложно. Потому что статьи, так сказать, я не могу их оценивать. Я соавтор, даже в некоторых случаях и корреспондинг, но действительно – это крайне конкурентная область. Вот его первая статья, где еще Лернер принимал самое активное участие в восемнадцатом году. Она долго лежала в Сайнс, но по ней есть американские патенты. И вот статья в PNAS, где так нескромно, но подчеркну, хотя концентрация академиков как российских, так и американских очень значительная, она ашла по треку 2 и была представлена тоже американским академком. Я даже не знал, ну то есть пошла, попала к нему. По ней тоже вот американский патент сейчас предложено оформлять с Scripps. Я должен сказать, что не так сложно. Сложно вот это все-таки основное критическое замечание time table, вот можно ли эту технологию использовать для реальной терапии. Я скажу, что достаточно много фирм обращалось с просьбами и к Лернеру тогда и опосредованно ко мне, и к нашим партнерам, чтобы ее, так сказать, как говорят, имплементировать. И, в общем, эти дискуссии продолжаются. Вот найденные эти пептиды. И понятно, что это в общем, такой подход и технологии. Вот Роман по просьбе Марии, значит, представил эту схему, она в общем укладывается в определенные временные рамки. Те, кто

знаком с CAR может, наверное, согласиться, что все-таки это du able, как говорят американцы, Да, и это в общем, не какие-то, так сказать, а вот это мое личное мнение. Ну, о Романа я должен сказать, что он сам захотел у нас работать. Он пришел в кабинет моей супруги в Ленинграде, он учился там или работал, в Петербурге. И вот со своим другом, который уже защитился, Назаровым, сказал, что очень хочет у нас в институте работать. Ну мы его взяли. Он выдержал экзамен. Мои сотрудники очень строги. Значит, он такой экзамен выдержал на возможность работать в лаборатории. И далее, действительно вот, с отъездами частыми Степанова, мне приходилось, в том числе, Сергею Михайловичу по просьбе, потому что проблема Switchable CAR очень актуальна сейчас. То, что фактически вводятся в организм неконтролируемые фармакокинетически лекарства. Да –это будет огромной проблемой то, что одна из вещей, которая предложена Сергеем Михайловичем, она действительно может работать. Незря на нее предложено оформить патент. И я должен сказать, что конечно, Роман очень внимательно и тщательно относился к работе. Он работал в Америке у Лернера. И я знаю лично, что Лернер был очень им доволен, ему даже были предложения там и как-то дальше продолжать. Вот, я думаю, что это очень хороший ученый. И вот как-то, если он уберет небольшой, абсолютно не нахал, скажу – супер-скромный человек, ему это иногда мешает. Вот, мы его готовили, действительно, с Сергеем Михайловичем, мне кажется, и успешно. Я думаю, что у него будет очень хорошая судьба, если, ну как-то вот он свяжет свою деятельность действительно с научной работой. В других областях, мне кажется, ему будет трудно. Спасибо

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Ну, еще желающие есть выступить? Роман, давайте. Заключительное слово Вам.

Калинин Р.С., соискатель: Во-первых, спасибо всем за поддержку, кто пришел в зал, кто – онлайн. Спасибо за моральную поддержку вообще моим родителям, маме с папой. Далее, по научной части – моему руководителю Алексею Вячеславовичу Степанову, который участвовал во всех этих направлениях, помогал мне, разрабатывал эти теории, а я работал руками. Далее, спасибо Александру Габировичу за то, что дал возможность работать и выполнять научную работу в его лаборатории. Далее, спасибо профессору Ричарду Лернеру за возможность, что я съездил на несколько месяцев, поработал уже в лаборатории американской. Далее, профессору Сидни Альтмену, который также участвовал в научной части по публикации статьи. Далее, всему коллективу в лаборатории. Хотел бы отметить тех, кто помогал мне в работе, здесь все фамилия обозначены. Далее, лаборатория Ричарда Лернера. Следующая лаборатория, а также искренняя благодарность Сергею Михайловичу Дееву за помощь как научном направлении, так и в поддержке, за участие в семинарах, где были даны очень полезные советы. Также лаборатории профессора Марины Аркадьевны Зенковой – это институт, я его выделил, в академгородке Новосибирска. Там выполнялись также исследования на мышах. За непосредственное участие Виктории Олеговне, которая помогала и выполняла большую часть работы по Switchable CARам. Алексею Анатольевичу Шульге за то, что он предоставил такие

молекулы уникальные, которые я использовал в своих исследованиях *in-vitro* и на мышах. Далее, Степану Петровичу Чумакову, его группе, что предоставили вот это наноантитело, которое взаимодействует с PD-1. А также всем, кто участвовал, помогал выполнять эксперименты, советом помогал. И студентам, которые тоже непосредственно под руководством помогали в работе руками. Все, кажется.

Мирошников А.И., председатель: Пол-академии на Вас работало. Спасибо. Так, все, спасибо. Значит, теперь у нас счетная комиссия в составе Михаила Ивановича Шахпаронова, Ажикиной Татьяны Леодоровны и, естественно, ученый секретарь.

Мирошников А.И., председатель: Коллеги, ну что, голосуем? Давайте.

Олейников В.А., ученый секретарь: Комиссия избрана.

(Идет тайное голосование)

Олейников В.А., ученый секретарь: Дорогие коллеги, счетная комиссия завершила свою работу. И, соответственно, по мере поступления. Итак, защита Романа Сергеевича Калинина. Присутствовало на заседании 21 член Ученого совета, роздано бюллетеней – 21, в урне оказалось – 21. Результаты голосования: за – 21, против и недействительных – нет.

Мирошников А.И., председатель: Вопросов нет? Утверждаем? Прошу голосовать. Кто против – нет. Все. Спасибо большое. Мы поздравляем коллег. Так, коллеги, у нас осталось утвердить проект заключения диссертационного совета. Николай Владимирович, у Вас есть замечания?

Бовин Н.В.: Может быть еще кто-нибудь хочет выступить, может быть я узурпирую?

Мирошников А.И., председатель: Да кроме Вас никто не выступает. Есть замечания?

(Бовин Н.В. высказывает замечания по редактированию некоторых формулировок. С учетом этого диссовет единогласно принимает заключение).

Мирошников А.И., председатель: Хорошо, спасибо. Так, коллеги, ну, до следующих встреч. До свидания.

Председатель
диссертационного совета



академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.