

СТЕНОГРАММА

Заседания Диссертационного совета 24.1.037.01

На базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

От 22 декабря 2021 года

Защита диссертации

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Украинской Валерии Михайловны

По теме: **«Изучение влияния опухолевого микроокружения на
противоопухолевую активность CAR T-клеток»**

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

Москва 2021

Стенограмма

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 22 декабря 2021 года

Председатель
диссертационного совета академик РАН, д.х.н. Иванов Вадим Тихонович

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

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Иванов Вадим Тихонович	(1.4.9)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.5.6)
6.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
7.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
8.	Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(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.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
14.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
15.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
16.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
17.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
18.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(1.5.6)
19.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
20.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
21.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
22.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
23.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)

Олейников Владимир Александрович: Валерия Михайловна Украинская. Российская Федерация. Окончила фармацевтический факультет Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова в 2017 году. С 2016 г. – инженер, а с 2020 по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории биокатализа нашего института. В 2021 году окончила аспирантуру ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности "молекулярная биология" сдан с оценкой "отлично". Работа выполнена в лаборатории биокатализа ИБХ РАН. Научный руководитель диссертационной работы Степанов Алексей Вячеславович, старший

научный сотрудник лаборатории биокатализа. По теме диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 20 октября 2021 года. Все необходимые документы в «деле» имеются.

Иванов Вадим Тихонович: Есть ли какие-то вопросы? Замечания? Обычно не бывает. Сегодня этот случай по-видимому не исключение. Тогда даю слово Валерии Михайловне. 20 минут на доклад.

Украинская Валерия Михайловна: *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо, есть таковые?

Иванов Вадим Тихонович: Если есть вопросы, прошу к микрофону выйти и задать его.

Купраш Дмитрий Владимирович: Добрый день. Купраш Дмитрий Владимирович официальный оппонент. К докладу вопрос: чтобы внеклеточные везикулы делать, новая методика - нужно встряхивать или нужно центрифугировать?

Украинская Валерия Михайловна: Сначала встряхивать, потом центрифугировать.

Купраш Дмитрий Владимирович: А центрифугирование отделяет что от чего?

Украинская Валерия Михайловна: Когда мы встряхиваем, как видно на изображении конфокальной микроскопии, везикулы все еще остаются прикрепленными к клеткам, и для того чтобы их открепить достаточно просто механического воздействия на клетки. И в дальнейшем уже для того чтобы отделить оставшиеся клетки, цельные клетки, от везикул мы проводим раунды центрифугирования.

Купраш Дмитрий Владимирович: То есть часть клеток тоже всплывает, потом вы их осаждаете и везикулы остаются.

Украинская Валерия Михайловна: Да, все верно.

Купраш Дмитрий Владимирович: Понятно, спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Вопросов больше нет, спасибо. Научный руководитель имеет право охарактеризовать диссертанта. Алексей Вячеславович, да?

Степанов Алексей Вячеславович: Да.

Иванов Вадим Тихонович: Есть желание, давайте.

Степанов Алексей Вячеславович: Добрый день члены ученого совета, коллеги. Я с большим удовольствием прослушал доклад Валерии, с ней работать одно удовольствие. Она очень способная девушка, очень производительная, не боится новых методов, экспериментов и что самое важное предъявляет высокие требования и к научному руководителю - приходится самому расти вместе с таким способным учеником. Это очень важно, я считаю. Валерия научилась не только сама делать эксперименты, но и

организовывать сложные эксперименты с нашими коллабораторами, все люди специфические. Она тонко чувствует, как это можно сделать с максимальным выходом. Часто, когда я подходил к Валерии с какой-то идеей, оказывалось что этот эксперимент уже либо закончен, либо в процессе. В общем, я крайне впечатлен и самые наилучшие впечатления о ней, спасибо за внимание.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Мы переходим уже к заслушиванию отзывов. Мне сообщили что Дмитрий Владимирович официальный оппонент торопится, есть ли возможность переждать первый отзыв, а потом уже выступить или вам нужно уже сейчас выступить?

Купраш Дмитрий Владимирович: Все нормально, успеем.

Иванов Вадим Тихонович: Все нормально, тогда двигаемся по официальной процедуре. Заключение организации, в которой проводилась работа - наш институт, ну и дальше заключение ведущей организации.

Олейников Владимир Александрович: *(зачитывает заключение организации, где выполнялась работа, заключение положительное)* Заключение организации, где делалась работа - это Институт биоорганической химии. Ну естественно начинается с биографических данных, о которых мы говорили в самом начале. Тема работы утверждена на заседании ученого совета нашего института еще в декабре 2019 года. Научный руководитель только что выступал Степанов Алексей Вячеславович, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа. Далее отмечается что рассмотрена была на семинаре соответствующем, отмечается актуальность работы, тоже прозвучала сегодня в докладе о том, что изучение микроокружения может потенциально расширить фундаментальные представления о развитии опухолевых заболеваний, предложить новые подходы противоопухолевой терапии, что в общем-то является важной актуальной задачей. Новизна результатов - в заключении этом приводятся конкретно два пункта, я не буду на этом останавливаться, потому что уже это прозвучало. Личное участие, значит, заключается в создании конструкций для репортерных линий клеток, конструкций, кодирующих химерные антигенные рецепторы, непосредственное получение и создание клеток и проведение функциональных и *in vivo* экспериментов. Некоторые эксперименты были проведены совместно с другими лабораториями, например, получение изображений конфокальной и сканирующей микроскопии. Проводился с участием других участников *in vivo* анализ совместно с группой Сергея Михайловича Деева. Также Украинская занималась обработкой и интерпретацией полученных результатов, и подготовкой материалов для научных публикаций. Степень достоверности - на высоком уровне все выполнено, сомнений не вызывает. Далее практическая значимость тоже подчеркивается,

специальность соответствует. Специальность «1.5.3. -Молекулярная биология». Ну и соответственно, работа рекомендована к защите. Приводится список публикаций этой работы. Это был семинар отдела Вадима Тихоновича Иванова, и председатель семинара подписал Вадим Тихонович Иванов, заместитель директора Ямпольский подписал, утверждено директором нашего института академиком Габибовым Александром Габибовичем.

Теперь отзыв ведущей организации, которой выступал Институт Иммунологии ФМБА России. *(Зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный)* Отзыв полностью положительный. Опять же здесь говорится о микроокружении, о важности микроокружения клетки опухолевой, и, соответственно, с практической точки зрения поиск новых подходов и методов активации и экспансии CAR-T клеток *ex vivo* является ключевым моментом в дальнейшем развитии и усовершенствовании методом адаптивной иммунотерапии, то есть подчеркивается актуальность и важность работы. Соответствие специальности подчеркивается, что соответствует паспорту специальности. Основные результаты – опять же оговаривается, что целью работы было изучение влияния факторов опухолевого микроокружения, включая внеклеточные везикулы, на CAR-T клетки и выяснения возможности применения искусственных антигенных везикул для специфической стимуляции CAR-T клеток. Все поставленные задачи выполнены. Диссертационная работа выполнена на высоком уровне, научном и методическом. Современные методы исследования, тщательный анализ экспериментальных данных, адекватно подобранные методы статистического анализа подтверждают достоверность полученных результатов. Выводы обоснованы результатами исследования и четко сформулированы. Это по поводу достоверности. Научная новизна – впервые было показано что опухолевые экзосомы несущие опухолевые антигены могут с высокой специфичностью связываться и поглощаться CAR-T клетками, вызывая тем самым различные изменения в клетке резиденте, даже приводя к подавлению ее функции. Во-вторых, Украинской был впервые предложен метод борьбы с внеклеточными ловушками нейтрофилов, когда введение ДНКазы I позволяет восстановить иммунный ответ и приводит к ингибированию роста метастазов. Предложен способ увеличения активности CAR-T клеток еще до введения в пациента посредством инкубации CAR-T клеток с искусственными везикулами, несущими специфические опухолевые антигены. Теоретическая значимость состоит в подробной характеристике фенотипических и функциональных свойств CAR-T клеток. Практическая значимость работы также здесь отмечается, что характеризуется разработкой новых экспериментальных методик. Общей характеристикой диссертационной работы, ну, естественно, она построена по

классической и традиционной схеме – 113 страниц, источников 158, обзор литературы написан хорошим научным языком, описывает ключевые исторические моменты в развитии технологий CAR-T. В главе материалы и методы подробно изложен современные методы, изложенные в работе. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Вот тут интересно, принципиальных замечаний к диссертации нет. Насколько стилистических неточностей не умоляют ценность диссертационной работы. Ну и далее в заключении отмечается что диссертация Украинской полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно положениям о присуждении ученых степеней, а сама она заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология. Отзыв обсужден и утвержден на расширенном заседании лаборатории противовирусного иммунитета ФБГУ ГНЦ «Института иммунологии» ФМБА России, составил заместитель директора по науке и инновациям Шиловский И.П. ну и соответственно отзыв утвержден директором ФБГУ ГНЦ «Института иммунологии» ФМБА член-корреспондентом РАН, доктором мед. наук, профессором М.Р. Хаитовым.

Иванов Вадим Тихонович: Я так понимаю, что замечаний нет.

Олейников Владимир Александрович: Нет.

Иванов Вадим Тихонович: А есть ли отзывы на автореферат?

Олейников Владимир Александрович: *(Зачитывает отзыв на автореферат, отзыв положительный)* Есть отзыв на автореферат. Ну тоже он полностью положительный. Ну в нем отмечается тщательность, с которой выполнено исследование Украинской. Отмечено количество современных молекулярно-биологических методов, использованных в работе и так далее. Все очень хорошо, и, соответственно, подписан отзыв заведующей лабораторией биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ Сибирского отделения Российской академии наук Зенковой Мариной Аркадьевной, доктор биологических наук. Тоже без замечаний.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо, все это мы учитываем при голосовании. И я имею возможность перейти к заслушиванию отзывов официальных оппонентов. Член-корреспондент Купраш Дмитрий Владимирович, прошу.

Купраш Дмитрий Владимирович: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).* Уважаемые коллеги, добрый день! Большое спасибо за возможность оппонировать эту работу, за приглашение, за создание исключительно теплой атмосферы в зале, правда очень жарко. Я сразу начну с того, что работу я оцениваю крайне положительно и высоко. Поставлена актуальная задача с очевидным медицинским выходом в будущем. Для ее решения разработаны адекватные инструменты в виде репортерных клеточных линий,

новых методик и все это сделано на современном совершенно мировом уровне с использованием адекватных мышинных моделей, методик имиджинга, анализа и так далее и замечательно опубликовано. По поводу CAR-T терапии конкретно мишени CD19, хочу немножко сказать очень часто опускают тот момент что CD19 это собственно не опухоль ассоциированный антиген в узком смысле этого слова это нормальная молекула компонент ассоциированный с B-клеточным рецептором, молекула необходимая для нормального развития B-клеток и то, что 4 из 5 зарегистрированных FDA способах CAR-T терапии на данный момент все нацелены на CD19 связано с уникальной биологией этой молекулы. Можно убить вместе с опухолью также и все нормальные B-клетки и это не вызывает серьезных проблем, потому что остаются ранние предшественники, из которых через некоторое количество недель образуются свежие B-клетки и остаются плазматические клетки, производящие защитные антитела. Ни на тех и ни на других молекула CD19 нет, она экспрессируется в широком окне, но не экспрессируется на ранних предшественниках и на клетках терминальной дифференцировки. Это делает ее уникальной такой уникальной терапевтической мишенью и для CAR-T клеток и для терапевтических антител. Есть еще несколько аналогичных молекул, но в принципе у нас мало таких тканей в организме, в которых, с которыми можно так безнаказанно поступать. Это один момент который делает этот продукт, эту технологию не универсальной, а нишевой. Другой момент что, хотя CAR-T действительно не требует представление антигена МНС, оно требует, чтобы антиген находился на внешней мембране клетки. CAR-T невозможно нацелить на внутриклеточные мишени, поэтому действительно эта терапия совершенно революционизировала лечение B-клеточных лимфом опухоль совершенно не поддающийся никаким схемам лечения поддаются лечению CAR-T, но надо понимать что это некий очень важный сектор значит онкологии. Что еще сказать по достоинствам этой диссертации, я согласен с отзывом ведущей организации, она действительно хорошо структурирована, понятно написана, все действительно в целом ее приятно читать, но при этом ее первое, я перехожу к замечаниям, первое замечание, что не характерно относится, все-таки, к качеству текста. Обычно это отмечают в конце, это все-таки бросается в глаза, при том что это не мешает понимаю и общему положительному впечатлению – текст недоделанный. Там много неточностей, опечаток, в том числе и в, я сейчас пример привожу, в списке сокращений, вместо «аденоассоциированный вирус» написано «AVV», с опечаткой сделана одна из ключевых аббревиатур – это не замечено. Ни одна английская аббревиатура не расшифрована по-английски, что как бы требуется, если человек не знает с ходу что это такое ему за каждой придется лезть в Википедию, потому что не даны русские расшифровки. Нет иногда никаких согласований слов, на рисунках панели

обозначены буквами «А,Б,В», а в тексте на них ссылаются как «А,В,С» латинскими. Вот, что еще, многие заголовки начинаются со слова «изучение», а при этом что собственно сделано в заголовке не сказано и не очень информативно. Это, к сожалению, очень частая особенность российских диссертаций. Дальше замечания по какой-то сути представлены. Для анализа цитотоксической активности CAR-T инкубировали с экзосомами (EV) в течение 2 дней, с антигенными везикулами (AV) - в течение 4 дней (раздел 2.6.3). Кроме того, после инкубации с AV CAR-T промывали PBS перед тем, как добавить к клеткам-мишеням, а после инкубации с EV (а также в случае CAR-T от пациентов с ОЛЛ) о промывке ничего не сказано. С чем связаны эти различия? Дальше эксперименты по цитотоксичности описаны довольно путанно, недостаточно понятно и из доклада мне не стало понятнее. То есть там есть существенное отличие в цитотоксичности в зависимости от времени инкубации, так есть периоды 10 часов, 24 часа, 48, высказаны какие-то предположения с чем данные отличия связаны, но этот вопрос как-то совсем не исследован, в частности транскриптом анализировали только в точке 24 часа, на основе рассмотрения анализа транскриптома сказано, что экзосомы могут как активировать так и ингибировать функцию CAR-T клеток и первое, что приходит в голову, что, возможно, это какие-то два разных процесса, которые идут с разной кинетикой и просто просится анализ транскриптома в нескольких точках, чего не сделано, по моему этот момент тоже не доработан, хотелось бы и видеть больше экспериментальных данных и может быть видеть более внятное обсуждение того что сделано. Значит вот новые, пузырьки, полученные новым методом довольно хорошо охарактеризованы, на самом деле хотелось бы видеть еще более детальный анализ их свойств, в частности на рисунке 19 интересно было бы посмотреть совместную детекции тек маркеров, которые там исследуются и флуоресцентного белка dTomato, которые показывают по отдельности. На рисунка 20, я вот уже не уверен это В или Б, либо В либо Б, там есть диаграмма прямого и бокового рассеяния и по виду диаграммы очевидно, что, вот сейчас может быть нам покажут, очевидно, что применяют какой-то гейт, на какой-то предыдущей диаграмме отсекают часть клеток, это видно по вертикальной прямой левее которой ничего нет, при этом то такой гейтированной диаграмме проводится зеленый овал в котором подсчитывает 0.5% чего-то, что кажется довольно лишённым смысла, хотелось бы видеть полную картину. Дальше был эксперимент, на котором, в котором эти значит новые частицы использовались не только для окраски, окрашивания нам показывали, оно хорошо получается, но и для сортировки клеток. Результаты сортировки выглядят не блестяще, там, как мне показалось чистота популяции около 80% - для сортировки на проточном цитометре это не много. И хотелось бы конечно видеть, как проходит контрольная

сортировка в тех же условиях с обычными антителами. Здравый смысл подсказывает что, наверно, здоровые штуки размером микронным должны работать хуже, чем антитела, то есть не будет упреком автору если окажется что они работают хуже, хотелось бы напрямую их сравнить. Еще пара, немножко не по порядку у меня получилось. На рисунке на странице 66, на рисунке 9 написано, что отдельные экзосомы отмечены стрелочками, а на рисунке нет стрелок, по-моему они были в презентации, значит без стрелок сложно понять. И насчет размера везикул в тексте есть утверждение о том, что средний размер 100 нм с отклонением 10%, при этом на диаграмме довольно широкий, красивый, но довольно широкий разброс от 50 до 150 нм. У меня в отзыве прошу прощения опечатка, напиано миллиметров. Значит, тут некое противоречие. И, значит, дальше у меня два замечания по составу работы и авторский вклад. Совершенно замечательная работа с мутантной ДНКазой, там большой авторский коллектив и Валерия Михайловна где-то в середине. Из самой статьи непонятно что она делала и поэтому было бы, не была бы лишняя оговорка что она делала в этой работе и вообще не был бы лишним в диссертации секция об авторском вкладе. Было сказано об авторском вкладе в отзыве организации, но в диссертации это не помешало бы, при том, что личный вклад не вызывает сомнений это центральный эксперимент и все было сделано очевидно ей. И еще меня озадачили две статьи, посвященные лигандам рецептора смерти DR5, которые присутствуют в списке публикаций по теме, при этом эти самые рецепторы смерти упоминаются единственный раз в одном параграфе в лит. обзоре, где сказано что в принципе на внеклеточным везикулах эти рецепторы встречаются. То есть больше никак, если я что-то не пропустил эти молекулы в диссертации не исследованы. То есть представляется очевидным что это видимо либо какие-то предыдущие, либо дополнительные проекты, по которым Валерия Михайловна поработала, опубликовалась и слава богу, но, по-моему, эти статьи в списке лишние, там более, что и без них список выглядит не просто достаточным, а превышающим требования ВАКа и совершенно достойным. По-моему, они здесь неуместны. И два вопроса, и я уже заканчиваю. CAR-T терапия даже против такого, против такой биологически хорошей мишени как CD19 все равно часто приводит к опасным для жизни осложнениям, наподобие цитокинового шторма и так далее. Обязательно и хорошо ли, и еще лучше CAR-T клетки стимулировать, такой концептуальный вопрос. Думали ли авторы работы о том, чтобы как-то встроить в эту систему, которую они сделали какие-то механизмы контроля может быть или может быть они видели какие-то нехорошие явления в экспериментах на мышах, что они по этому поводу думают. И последний вопрос является ли разработанный метод выделения крупных везикул патентоспособным? Он, по-видимому, действительно новый, но может

быть встряхивать и центрифугировать настолько просто, что и патентовать нечего. Интересно готовиться ли и существует ли патентная заявка или патентные эксперты сказали, что это невозможно. Вот, на этом мое замечание закончено, дальше следуют все необходимые оговорки, что замечания не снижают общего замечательного впечатления о работе, работа полностью достойна, удовлетворяет всем официальным критериям со всеми опубликованными поправками и является самостоятельным законченным научным исследованием, решившим важный вопрос, получившим новое знание, а Валерия Михайловна достойна присуждения степени кандидата биологических наук. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Тем не менее Валерия Михайловна есть на что ответить. Прошу вас.

Украинская Валерия Михайловна: Я благодарю за такой подробный отзыв, и начну, пожалуй, с того, что соглашусь, что существует правда много опечаток в диссертационной работе и с этим замечанием я соглашаюсь. Далее по вопросу о временах инкубирования и по искусственным везикулам, и по антигенным везикулам, в случае с экзосомами мы моделировали примерно тот эффект, который может происходить в организме, то есть мы предварительно инкубировали экзосомы с CAR-T клетками и в дальнейшем не отмывали их PBSom и вводили их в эксперимент либо по анализу провоспалительных цитокинов, либо по цитотоксичности. Время инкубации мы подбирали исходя из существующих протоколов, которые были использованы при изучении влияния экзосом на T-клетки. Если же мы говорим про антигенные везикулы, мы подбирали условия инкубации максимально приближенные к существующим протоколам экспансии клеток. Поэтому инкубацию проводили либо 4 либо 7 дней, время варьировалось, и также использовали этап промывки PBSom. Кроме того, в экспериментах, которые в основной части моего рассказа не были представлены, в клетках, полученных от больных острым лимфобластным лейкозом мы также проводили инкубацию в течении 4-х дней и промывали PBSom. Далее следуют вопросы по измерению цитотоксической активности на CAR-T клетках при добавлении экзосом, и я соглашусь, что данные эксперименты описаны путанно, и для существующих экспериментов в материалах и методах существует только одна описанная методика. Поэтому, чтобы более подробно рассказать, что происходит, я представила на слайде материалы и методы этих экспериментов. Стоит отметить, что в отличие от представленной методики, существующие эксперименты отличались только временем инкубации, и кроме того, было замечание по поводу клеток, которые использовались в эксперименте по инкубации в течение 24 часов и 48 часов – это были клетки Jeko-1. Для инкубации в течение 10 часов и 24 часов мы использовали соотношение 2:1, используя различные клетки мишени. Также, мы проводили

эксперименты таким образом: предварительно мы сделали анализ на провоспалительные цитокины и этот анализ проводился одновременно с анализом транскриптома, поэтому мы использовали в транскриптоме инкубацию 24 часа, исходя опять же из существующих методик. Мы обнаружили, что в течение 24-х часовой инкубации мы видим выброс цитокинов и, следовательно, в дальнейшем мы проводили эксперименты инкубации и анализа цитотоксичности уже в течение 24 часов, но не обнаружили никаких различий. Поэтому, после этого мы решили использовать времена либо меньше, либо больше предложенного предварительного времени, и показали, что, если мы берем 48 часов у нас, опять же, нет различия, если мы берем 10 часов инкубации мы видим подавление цитотоксической активности. И опять же я в своем докладе уже сказала с чем потенциально это может быть связано. Конечно, я соглашусь с тем, что нужны дополнительные эксперименты, как и по анализу цитотоксической активности, построению кинетических кривых зависимости и уже конкретно то предположение, которое я высказала в докладе возможно либо опровергнуть, либо подтвердить. Кроме того, я забыла сказать, что мы также измеряли в течение 24 часов зависимость от количества добавленных экзосом и активности CAR-T клеток, и тоже мы не увидели статистически-значимых различий. Кроме этого, мы также проводили различные кинетические эксперименты, правда, не изучая цитотоксическую активность. Мы проводили измерения поглощения везикул в системе трансвелл при добавлении их к CAR-T клеткам, показали специфичность поглощения и проводили измерение скорости истощения клеток, которые преинкубировали с экзосомами отрицательным либо положительными по антигену. Эта длительная инкубация, она длилась в течение 15 дней, где постоянно добавлялись новые таргетные клетки в эксперимент, и эти данные показывают, что мы также не видим никаких статистически-значимых различий. Однако, при анализе уже на конечной точке эксперимента, при анализе клеток на различные маркеры истощения мы увидели, красным показаны контрольные графики, мы увидели, что происходит маркера PD-1, там, где были добавлены антиген-положительные экзосомы, что согласуется с нашими данными транскриптомного анализа, к которому я по своей невнимательности забавила добавить тепловую карту, она добавлена на слайде. И также соглашусь с замечанием, что по данному анализу транскриптома невозможно конкретно сказать какой эффект оказывают экзосомы и что нужно конечно же исследовать кинетические зависимости, но этот транскриптом мы делали в самом начале эксперименте использовали его как, во-первых, подтвердить, что у нас правда происходит активация и, во-вторых, показать какие потенциальные гены мы можем в дальнейшем исследовать. Касательно следующего вопроса, по антигенным везикулам и их

характеристике, мы делали опухолевые клетки, клетки-продуценты, по методике, которая описана на слайде. Предварительно мы трансдуцировали клетки для экспрессии антигена, в дальнейшем сортировали эти клетки обогащая антиген-положительными и в дальнейшем проводили трансдукцию уже антиген-положительных клеток для экспрессии белка dTomato. Охарактеризовав на экспрессию флуорисцентного белка, клетки сортировали. Здесь показано двойное окрашивание и детекция dTomato и детекция антигена. То есть такая методика позволяет нам не приводить данные одновременной детекции, так как мы изначально брали для трансдукции клеток популяцию практически 95-98% положительную по антигену. Далее вопрос по гейтированию, здесь представлен тот график, к которому сделано замечание и на нем мы видим прямой и боковое светорассеяние и правда отрезанная популяция, и я согласна, что, исходя из этого нельзя сделать какие-то выводы, что у нас происходит обогащение антигенными везикулами. В свое оправдание хочу сказать, что обычно данное гейтирование мы используем для анализа клеток, так как в этой области обычно детектируется различных клеточный мусор, как и показано на исправленном гейте, мы видим, что здесь очень слабое облако популяции, которое составляет порядка 1%. В случае, когда мы анализируем везикулы, у нас доминирующая популяция антигенные везикулы – это порядка 50%.

Вопрос по поводу сортировки клеток. Я уже ранее и в докладе, и на слайде показала, что искусственные везикулы, возможно эффективно использовать для детекции CAR-положительной популяции и мы решили это свойство также применить для сортировки клеток. Здесь представлены клетки до сортировки и после сортировки. И в том и в другом случае мы видим, что клетки разделяются на два пика, однако интенсивность свечения правда снижена. Это объясняется тем, что это была не одновременная детекция CAR и в эксперимент синий и красный брались разные везикулы, полученные не в одно и то же время и из различных линий клеток. На тот момент методика была недостаточно стандартизирована, тогда мы еще не использовали метод цитометрии для подсчета везикул, поэтому интенсивность флуоресценции может варьироваться. Кроме того, сама эффективность сортировки у нас чаще всего не зависит от использования везикул, либо антител. К примеру, на слайде представлены сортировки CAR-клеток с помощью антител, и чаще всего это зависит настроек прибора, у нас, к сожалению, прибор достаточно капризный, зависит от калибровки прибора, от размера выбранного чипа, то есть не всегда, к сожалению, получается обогатить 100% популяцию.

Касательно моего вклада в работу по экспрессии мутантной ДНКазы и использовании этой ДНКазы для борьбы с внеклеточными ловушками нейтрофилов. Эта работа правда в большой степени была выполнена нашими коллегами из Медицинского института

Векснера и они там выполняли исследования по *in vivo* характеристике. Однако, я принимала непосредственное участие в создании конструкции аденоассоциированного вектора, кодирующего мутантную ДНКазу, получении аденоассоциированных вирусов методом трансфекции клеток HEK293T и анализе активности этих вирусов *in vitro*, и анализе активности ДНКазы тоже. Далее следует вопрос по поводу трех статей, которые посвящены рецепторам смерти, которые являются важной частью опухолевого микроокружения, также как и нейтрофилы и экзосомы. Данные три работы были выполнены мной, практически все эксперименты были сделаны моими руками, и видно, что здесь я являюсь первым автором. И, непосредственно, мы продолжаем комбинировать эти методики, в данных работах были получены различные репортерные линии для детекции апоптоза, был проведен фаговый отбор и были выбраны пептиды, которые специфично связываются с рецептором смерти. И в дальнейшем, так как экзосомы также несут рецепторы смерти, мы также планируем создавать CAR-T клетки нацеленные на рецепторы смерти, или же пробовать каким-то образом выводить экзосомы из кровотока, также нацеливая на эти рецепторы. Я соглашусь по поводу замечания, то что данные статьи практически не освещены в диссертационной работе, однако я считаю важным сказать, что мой вклад в этой работе был очень большой и эти работы также характеризуют меня как научного сотрудника, как аспиранта.

Также был вопрос по поводу стрелок, они были добавлены к картинкам на слайде. Также был вопрос по поводу размера, каким образом мы его оценивали. Данный график представлен на слайде – это характеристика распределения экзосом методом логнормального распределения, которое характеризует суспензию в которой присутствуют частицы более мелкого размера. И параметры, которые характеризуют это логнормальное распределение являются геометрическое среднее и размеры доверительного интервала, и они представлены на слайде, исходя из них мы уже рассчитывали средний размер и характеризовали эту популяцию экзосом.

Еще по поводу цитокинового шторма. Просто для этих вопросов у меня нет слайдов. В экспериментах *in vivo*, которые мы проводили, мы не наблюдали негативного эффекта от везикул, которые они могут оказывать на мышей. И кроме того сам процесс возникновения цитокинового шторма, он конечно зависит от того, каким образом были сделаны CAR-T клетки, но также этот параметр больше зависит от изначального размера опухоли, от пациента, его личных характеристик, от количества введенных CAR-T клеток, и исходя из этого, мы можем сказать единственное, что антигенные везикулы не вызывают возникновение цитокинового шторма, однако, так как эта методика развивается дальше, я думаю что использование антигенных везикул будет также комбинироваться с

другими новыми методами в CAR-T терапии, допустим использование различных адаптерных молекул, которые позволяют модулировать активность CAR-T клеток

И последний вопрос по поводу патентования. Мы уже подали патентную заявку, патент уже на эти исследования получен. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Благодарю вас. Сейчас начнется общая дискуссия, и там, если вы с чем-то не согласны, можно будет высказаться.

Купраш Дмитрий Владимирович: Я думаю, я должен сразу сказать.

Иванов Вадим Тихонович: Если есть желание.

Купраш Дмитрий Владимирович: Просто по поводу последней картинки. Доверительных интервал в чем измеряется? 1.8 и 1.79 чего?

Украинская Валерия Михайловна: Это безразмерная величина.

Купраш Дмитрий Владимирович: А как это транслируется в плюс минус 10 нм?

Украинская Валерия Михайловна: Для того, чтобы получить плюс минус, нужно умножить на это значение.

Купраш Дмитрий Владимирович: То есть получается 100 плюс минус 80

Украинская Валерия Михайловна: 100 плюс минус 180. Получается так.

Купраш Дмитрий Владимирович: А плюс минус 10 откуда тогда взялось в тексте?

Украинская Валерия Михайловна: Такого не было, по-моему, в тексте.

Купраш Дмитрий Владимирович: А откуда я это взял? Ладно. Тогда извините. Я конечно не подвергал сомнению ваш вклад в работу по DR5. На самом деле с вкладом все порядке. Вы прекрасно все рассказали, надо было в диссертацию все-таки добавить. Спасибо.

Украинская Валерия Михайловна: Спасибо больше за замечание.

Купраш Дмитрий Владимирович: В целом я удовлетворен, совершенно замечательно, квалифицировано ответили на вопросы. Спасибо.

Украинская Валерия Михайловна: Спасибо

Иванов Вадим Тихонович: Принято. Но мы еще должны послушать еще одного оппонента. Григорий Александрович Ефимов. Институт гематологии.

Ефимов Григорий Александрович: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).*

Коллеги, всем добрый день! Я хочу сказать, что я не первый раз выступаю на этой сцене в качестве оппонента и неизменно, как минимум те работы, на которые меня приглашали в качестве оппонента, в этом институте вызывают восхищение, потому что они сделаны на очень хорошем методологическом и современном уровне и отвечают на актуальные вопросы и сегодняшняя работа не исключение, а наоборот подтверждение этого правила. Тема крайне актуальная, крайне интересная, работа выполнена как совершенного ведущие

мировые исследования в этой области. Работа построена вокруг очень актуальной темы в онкоиммунологии, это Т-клеточная терапия опухолей, конкретно CAR-T терапия в этой области продемонстрировала несколько последних лет совершенно феноменальные успехи. Пациенты, которые были рефрактерны, устойчивы к различным терапиям, фактически обреченные пациенты на CAR-T терапии получают долгосрочную ремиссию, которую в общем можно назвать выздоровлением. Конечно успехи в онкогематологии, которая мне ближе, в терапии B-клеточных лейкозов и лимфом, они особенно заняты. А что касается солидных опухолей, то тут адоптивная Т-клеточная терапия немножко отстает, связана это с одной стороны с некоторым механическим свойством солидных опухолей, с затрудненным проникновением туда лимфоцитов в том числе связано и с образованием внеклеточных ловушек нейтрофилов, про которые в этой работе идет речь в том числе, а кроме того с неким активным механизмом с которым опухоль борется с иммунным ответом, с привлечением других клеток, иммуносупрессивных, как миелоидного, так и лимфоидного происхождения, с использованием механизма иммунологических контрольных точек, а также возможно с помощью экзосом, про которые в основном идет речь в этой работе. Автор начинает с того что, изучает свойства экзосом и влияние их на CAR-T лимфоциты, основываясь на том, что экзосомы происходящие из опухолевых клеток могут несли и несут фактически на своей поверхности антиген, который связывается с рецептором на поверхности лимфоцитов, CAR-T клеток в данном случае. Автор показал, что экзосомы несущие поверхностный антиген действительно специфически связываются с теми CAR-T лимфоцитами, которые несут рецептор. Во вторых, что это связывание имеет функциональный смысл, как на коротком промежутке времени это связывание видимо за счет механизмов даунрегуляции CAR-T рецептора, за счет интернализации снижает функциональную активность CAR-T лимфоцитов. Затем во второй части работы на основе этого наблюдения развивается в дальнейшем и автор, Валерия Михайловна, переходит к использованию внеклеточных везикул, искусственных везикул уже как метода, с одной стороны метода для детекции, для визуализации CAR-T лимфоцитов с помощью проточной цитофлуориметрии, а с другой стороны как метода для стимуляции клеток, несущих химерный антигенный рецептор, и соответственно для наработки их *ex vivo* для последующего введения в человека. Эту часть работы, она наиболее проработана, она сделана на абсолютно таком международном уровне, но собственно она и была опубликована в очень престижном международном журнале. Что я имею в виду, имею в виду что, во-первых создана панель клеточных линий, которые являются инструментом для работы, во-вторых, автор исследует не одну систему рецептор-мишень, а сразу пять, чтобы исключить возможность

каких-то случайных эффектов и методологически каждое утверждение подтверждено несколькими независимыми методами, методами довольно современные – проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, электронная микроскопия и даже масс-спектрометрия и все это очень убедительно показано, показано что полученные несущий антиген везикулы способны с одной стороны связывать, специфично связываться с CAR-T лимфоцитами, с другой стороны способны вызывать их активацию и что самое интересное, самая важная часть работы, показано что по сравнению с неспецифической активацией CAR-T лимфоцитов, которая является стандартной в практике получения и при введении в пациентов, стимуляция из микровезикулами, несущими антиген, вызывает сдвиг популяции в сторону менее терминально-дифференцированных клеток, которые обладают фенотипом клеток центральной памяти и которые имеют больший пролиферативный потенциал. А для CAR-T лимфоцитов пролиферативный потенциал необходим, является наиболее важным показателем, потому что, то что называется живое лекарство – единичные Т-клетки способствует тому что они уже дальше внутри организма продолжают персистировать и размножаться. И, возможно данный метод на основе этих везикул станет действительно применимым в практике. И наконец в заключительной, третьей части работы автор исследует способность мутированной формы ДНКазы I, доставленной с помощью аденоассоциированного вектора оказывать влияние на опухолевое окружение и показывает, что такая доставка ДНКазы I, приводит с одной стороны к повышенной инфильтрации опухоли цитотоксических Т-лимфоцитов, с другой стороны снижает число метастазов в печени на модели колоректального рака. И еще забыл упомянуть, что во второй части работы финальным аккордом является то что показано на мышинной модели, что такие клетки – CAR-T лимфоциты, полученные с помощью несущих антиген микровезикул обладают повышенной противоопухолевой активностью по сравнению с наиболее традиционным CAR-T лимфоцитами и показано это на линии NSG мышей, которые являются для такого рода исследований в международных журналах абсолютно золотым стандартом. Очень сложные мыши и тут надо отдать должное руководству института и научному руководителю, которые смогли обеспечить диссертанта таким инструментом, который позволяет поднять уровень доказательности такого рода исследования. Что касается самой работы, то она традиционная по структуре, по объему соответствует такого рода хорошей добротной диссертации. Мне очень понравилось, как написан обзор литературы, очень понравился экскурс в историю иммунотерапии, его приятно было читать, и очень понравились иллюстрации во второй части работы – они хорошо и подробно сделаны, из которых легко понимать. Теперь, что касается критики. Первая, так сказать не критика, а просто

констатация факта – работа немножко ассиметрична, вторая часть наиболее выпуклая, наиболее яркая. На ее фоне остальные, первая особенно, смотрится не так выигрышно. И второе замечание оно немножко, так сказать имеет логический характер. Выводов пять, первый и второй вывод по сути это одно и то же. Я думаю, что это скорее не к диссертанту надо обращаться, мне кажется я уже просто слышал такое поверие среди соискателей, что выводов должно быть пять. Вот, на сколько я знаю, ВАК не предъявляет никаких формальных требований и в такую магию чисел я лично не верю, мне кажется, что лучше иметь даже один хороший вывод, чем пять не таких хороших. Еще в работе были, как Дмитрий Владимирович отмечал, в частности, опечатки и некоторые неточности, где были перепутаны подписи к картинкам, я не буду вам зачитывать этот список, это сути работы никак не умоляет, но заключение формальное я должен произнести – что работа полностью соответствует требованиям, которые предъявляет ВАК к кандидатским диссертациям, а диссертант, без сомнения, Валерия Михайловна, без сомнения заслуживает присуждение степени. И хочу поблагодарить диссертанта за эту возможность и пожелать в дальнейших продолжениях исследований. Мне кажется не надо, мне не на что возражать или отвечать.

Иванов Вадим Тихонович: Нет, может быть диссертант захочет выступить, оставим ему на выбор.

Украинская Валерия Михайловна: Спасибо большое за отзыв. Мне очень приятно слышать такие слова и характеристику. По поводу первого замечания – выводы. Я не могу не согласиться с тем, что они правда звучат похоже, однако второй вывод более детально раскрывает первый. И мне кажется, что их можно оставить отдельно, друг от друга, не объединять в один. Так же у Вас был вопрос по поводу статистических методов, которые были использованы к двум данным рисункам. В нашей работе было уделено особое внимание статистике. Этому был посвящен целый раздел материалов и методов, где были описаны различные методы обработки данных, которые использовались в работе. Все эксперименты были обработаны статистически. Однако, по моей невнимательности, на двух данных рисунках отсутствует графическое изображение статистической обработки данных. Оно было добавлено в моем докладе, и оно подтверждает выводы, которые были сделаны в работе. Я согласна с тем, что существуют незначительные, как Вы пишете опечатки. Постараюсь в дальнейшем более детально и внимательно изучать текст в процессе работы. Кроме того, было замечание к слову - терапия, которое используется в выводе номер 5. Этот термин возможно применять к терапии при использовании мышинной модели. Поэтому в данном выводе я добавила, что терапия была проведена *in vivo*. Спасибо большое еще раз за отзыв.

Иванов Вадим Тихонович: Мы переходим к завершающему этапу, к общей дискуссии. Кто хотел бы добавить какие-то аргументы перед голосованием? Татьяна Владимировна – прошу.

Овчинникова Татьяна Владимировна: Уважаемые члены диссертационного совета, у меня очень короткая ремарка. На прошедшей в этом году XXXIII зимней молодежной научной школе, которая прошла в формате международной научной конференции, Валерия Михайловна докладывала эту работу, и хотела бы напомнить членам диссертационного совета, что в рамках конкурса молодых ученых, эта работа с большим отрывом, по мнению экспертного сообщества, получила гран-при. Поэтому, я хотела бы поздравить научного руководителя, Степанова Алексея Вячеславовича, и весь коллектив лаборатории биокатализа с этой, безусловно, выдающейся работой. Я буду голосовать «ЗА» и призываю всех членов диссертационного совета поддержать Валерию Михайловну. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Мы Вас услышали.

Габибов Александр Габибович: Причина моего выступления будет скоро понятна. Я должен сказать, что я был руководителем Валерии как аспиранта и сдал это руководство, когда ученый совет проголосовал, и мы теперь кандидатам, имеющим определенную в РНФ поддержку, имеем право передавать диссертантов. Я должен сказать, что с Валерией Михайловной я очень часто беседую по науке и, конечно, считаю, что у нее очень хорошая судьба, если она выберет фундаментальные исследования в дальнейшем. Но не знаю, какое она примет решение, но я думаю, что ее карьера будет очень хорошей.

Но мое выступление связано с такой более общей проблемой. Дело в том, что здесь цитировалась работа в журнале Small, последняя прижизненная работа Ричарда Лернера, которую он читал, пробивал. Он ушел от нас уже третью неделю. Валерия хотела к нему ехать в лабораторию, но теперь эта лаборатория уже без него. Я считаю, что действительно, та работа, которую он пропустил через себя, последний автор ее. Надеюсь, что выйдет еще работа по каталитическим САРа, которую он очень активно продвигал. Но эту работу, когда она выйдет, он ее уже не увидит. Мне очень грустно, это человек с различными плюсами и минусами, но сопровождал мою научную карьеру всю жизнь, мы были большие друзья с ним. Знающие его люди могут это подтвердить. Это очень жалко. Конечно Валерия, я не хочу Вас расстраивать, но Вам нужно было поставить его в рамку. Но это никак не скажется, надеюсь, на голосовании.

Я хочу сказать, что Валерия абсолютно самостоятельный исследователь. Она очень хорошо воспринимает советы. Алексей внес большой вклад в ее карьеру на данном этапе. Я думаю, этот союз будет продолжаться и дальше, если Валерия не будет менять

тематику. Я должен сказать, что эта диссертация находится на уровне выше среднего. Я должен сказать, что для нашего института такой уровень должен быть нормой. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Есть еще желающие принять участие в дискуссии? Внимательно смотрю на зал. По-моему, желающих больше нет. Тогда я даю слово диссертанту, для заключительного выступления.

Украинская Валерия Михайловна: Я, в первую очередь, хочу поблагодарить всех собравшихся в этом зале, которые пришли меня поддержать. Для меня эта поддержка очень важна. Я очень вас благодарю. Хочу сказать огромное слово благодарности своему научному руководителю, одному из моих научных руководителей – Степанову Алексею Вячеславовичу. Он, несомненно, является для меня примером для подражания, является, по моему мнению, эталонным руководителем и всем хочу пожелать такого же. Он поддерживал меня на каждом этапе моей работы, даже несмотря на то, что какую-то часть времени он находился в Америке в институте Скрипса. Все равно он успевал контролировать, уделять время, собирать семинары. Для меня является большой честью то, что большую часть своей научной деятельности работала в лаборатории Биокатализа под руководством Габиева Александра Габиевича. Несомненно, он провел большую работу, уделил большое внимание в период формирования меня как научного сотрудника. Я безмерно ему благодарна. Кроме того, хочу выразить огромную благодарность Рубцову Юрию Петровичу, который тоже являлся моим руководителем и принимал активное участие во всех экспериментах. Мне особо было приятно с ним работать, так как это человек с острым умом, который нестандартно подходит к различным экспериментам. Общение с ним было очень приятным, и я надеюсь, мы продолжим сотрудничать и дальше. Также, я хотела поблагодарить Масчану Михаила Александровича, Першина Дмитрия и его лабораторию, Осипову Дарью, которые работают в Центре им. Рогачева. Они являются первыми нашими коллабораторами. С ними мы проводим много исследований, будем проводить и далее. И я надеюсь, что мы создадим какие-то новые CAR-T-клетки, новую CAR-T-терапию. Это внесет вклад в лечение детских онкологий. И я с большой радостью жду дальнейших наших коллабораций. Отдельная благодарность – Дееву Сергею Михайловичу и Шипуновой Виктории. Они внесли огромный вклад в работу по *in vivo* части. Непосредственно с ними мы делали работу по анализу CAR-T-клеток, обработанных антигенными везикулами. Хочу поблагодарить коллег из медицинского центра Векснера, который делали большую часть работы по анализу ДНКазы и анализу реактивности *in vivo*, с которыми мы также продолжаем работать. Хочу поблагодарить коллег с биологического факультета МГУ – Богрова Дмитрия, Ярошевича Игоря. Они, к сожалению, сегодня не могут присутствовать. Они помогали нам в

экспериментах по различным видам микроскопии (трансфузионной, сканирующей). Они внесли большой вклад в работу по антигенным везикулам. Отдельная благодарность покинувшему нас Лернеру Ричарду. Он принимал участие в анализе и интерпретации результатов данных, полученных в статье по антигенным везикулам. Он очень чутко отнесся к написанию текста. И мне очень печально говорить о том, что он нас покинул. Хочу выразить благодарность ведущей организации, Хаитову Мусе Рахимовичу и Шиловскому Игорю Петровичу, которые составили отзыв, внимательно прочитали мою диссертационную работу. Благодарю своих оппонентов Купраша Дмитрия Владимировича и Ефимова Григория Александровича. Спасибо, что очень внимательно прочитали мою диссертационную работу и отнеслись с большой ответственностью к написанию отзывов и замечаний. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо Вам. Мы приближаемся к завершению нашей работы по защитам, к голосованию. Объявляю перерыв на голосование.

(Идет тайное голосование).

Олейников Владимир Александрович: Счетная комиссия справилась с подсчетом голосов. Украинская Валерия Михайловна. Роздано бюллетеней – 23, присутствовало – 23, оказалось в урне – 23, за – 22, против – нет, недействительный – 1.

Иванов Вадим Тихонович: Кто за то, чтобы утвердить бюллетень для голосования? Все за, против нет.

(Идет голосование по проекту заключения диссовета. Принято единогласно)

Иванов Вадим Тихонович: Поздравляю диссертанта с прекрасной защитой.

Председатель
диссертационного совета



(Handwritten signature of V. T. Ivanov)
академик РАН, д.х.н. Иванов В.Т.

Ученый секретарь
диссертационного совета

(Handwritten signature of V. A. Oleynikov)
д.ф.-м.н. Олейников В.А.