

Министерство науки
и высшего образования РФ



Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова»
(ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова)

«Утверждаю»
Директор ФГБНУ НИИВС
им. И.И. Мечникова,
академик РАН, д.м.н., профессор РАН
Свитич О.А. Свитич О.А.
«19» мая 2026 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

по диссертации аспиранта Фёдоровой Полины Олеговны на тему «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR». Диссертация выполнена на базе Федерального Государственного Бюджетного Научного Учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» в лаборатории прикладной вирусологии.

В 2021 году Фёдорова Полина Олеговна, 1997 года рождения, гражданство РФ, окончила ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по специальности «Медицинская биохимия».

В 2022 году зачислена в число аспирантов 1-ого курса на очную форму обучения в аспирантуру по специальности 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология» (направление подготовки 30.06.01 – Фундаментальная медицина) во ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». Отчислена из очной бюджетной аспирантуры по специальности 3.2.7 - «Иммунология» в связи с окончанием срока обучения.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 11/2025 от 24.06.2025 года выдана в Федеральном Государственном Бюджетном Научном Учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

С 2018-2021гг. работала лаборантом-исследователем в лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, с 2021-2022гг. работала младшим научным сотрудником в лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, с 2022 г. по настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории прикладной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Научные руководители:

Маркушин Станислав Георгиевич – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов Отдела вирусологии имени О.Г.Анджапаридзе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова

Чикилева Ирина Олеговна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета и биотехнологий Отдела онкоиммунологии Научно-исследовательского института Экспериментальной онкологии и канцерогенеза Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

По итогам обсуждения диссертационного исследования «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR», представленного на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология принято следующее заключение:

•Оценка выполненной соискателем работы

Диссертация Фёдоровой Полины Олеговны на тему «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR», представляемая на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология, является законченной, самостоятельной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком научном и методическом уровне.

Диссертантом было четко составлено задание и поставлены задачи по подбору материалов исследования, проведению дальнейшего анализа. Проведен анализ отечественных и зарубежных литературных источников с выделением направлений по задачам исследования.

При изложении материала диссертант высказал различные предположения, объясняющие полученные результаты, которые при завершении работы легли в основу научной новизны и практической значимости. По итогам обсуждения и на основании заключений рецензентов к.б.н., зав. лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова Аммура Ю.И. и к.б.н., зав. лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова Дьякова И.Н. установлено, что диссертационная работа Фёдоровой П.О. на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему: «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR» представляет собой законченный труд, в котором содержится решение научной задачи, актуальной для иммунологии, и может быть представлена в диссертационный совет для защиты по специальностям 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология.

• **Актуальность темы диссертационного исследования**

Онкологические заболевания представляют собой опасную группу неинфекционных заболеваний, распространенных по всему миру и являющихся одной из ведущих причин смертности среди населения. Поиск эффективного способа лечения рака продолжается на протяжении последних пятидесяти лет, однако разработанные на данный момент методы терапии не способны гарантировать пациенту полное выздоровление. На сегодняшний день одним из самых перспективных подходов к лечению онкологических заболеваний является иммунотерапия, к которой относится терапия на основе химерного рецептора антигена (CAR-терапия).

CAR-терапия основана на получении активированных и генетически модифицированных клеток иммунной системы, которые экспрессируют химерный рецептор антигена (CAR), что необходимо для опухолевого распознавания и реализации противоопухолевого иммунитета. Сейчас многие отечественные и зарубежные исследователи фокусируют свое внимание на натуральных киллерах (НК-клетках) и НКТ-клетках, используя их в качестве клеток-эффекторов при CAR-терапии. Однако, CAR-технология на основе НК- и/или НКТ-клеток пока не получила широкого применения. На сегодняшний день не существует единого протокола, разработанного с учетом максимальной эффективности генетической модификации и экспансии CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток: так разные исследовательские группы используют уникальные методики без сравнения результатов их применения относительно других разработанных протоколов, что затрудняет сравнение результатов различных исследований между собой. Поэтому для оптимизации процесса производства CAR-НК-клеток крайне необходима разработка

протокола для выделения, активации, экспансии и генетической модификации НК- и НКТ-клеток *in vitro*, включающая в себя преимущества ранее созданных методик.

• Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Исходя из темы диссертации, автор принимал личное участие при выборе направления исследования, и разработке его дизайна, а также при определении цели и задач исследования. Вся экспериментальная часть исследования (транспортировка биологического материала, выделение моноклеарных клеток человека, культивирование лимфоцитов, трансдукция, трансфекция, цитометрия, цитотоксический тест), а также обработка, визуализация и интерпретация полученных данных выполнена лично диссертантом. Подготовка публикаций научного исследования по проведенной работе, апробация результатов исследования, представлении результатов исследования на научных конференциях, написание и оформление рукописи диссертации выполнены автором самостоятельно.

• Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов определяется достаточной выборкой включенных в исследование образцов крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата, применением лабораторных методов исследования, а также статистических подходов обработки полученных результатов.

• Научная новизна результатов проведенных исследований

В данной работе для повышения эффективности обогащения культивируемых НК-клеток впервые был использован FCS, который, по данным литературы, ранее не применяли при культивировании НК- и НКТ-клеток.

Кроме того, был изучен эффект таких классических активаторов деления иммунных клеток, как L-ФГА и КонА, на первичную культуру лимфоцитов в режиме длительного культивирования в течение 21 дня.

В данной работе впервые был разработан протокол для экспансии НК-клеток на основе их соинкубации с клетками культуры НЕК 293Т.

Также в исследовании впервые освещены достоинства и недостатки различных подходов к созданию CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток в их сравнительной характеристике и разработан единый протокол, объединяющий достоинства разных методик.

• Практическая значимость проведенных исследований

Полученные данные могут использоваться при проведении последующих доклинических и клинических испытаний, а также могут быть применены для масштабирования производства CAR-препарата, учитывая, что на данный момент в России не зарегистрировано ни одного отечественного препарата на основе CAR-НК- и/или

CAR-НКТ-клеток. Применение такого клеточного продукта относится к отрасли персонализированной медицине, что соответствует самым современным тенденциям в лечении пациентов и отражает приоритеты научно-технологического развития Российской Федерации.

• Ценность научных работ соискателя ученой степени

Ценность научных работ соискателя ученой степени заключается в комплексном подходе для оптимизации метода обогащения и экспансии популяций НК- и НТ-клеток и повышения эффективности лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-клеток.

Несмотря на большое разнообразие существующих подходов к активации и трансдукции НК- и НКТ-клеток на данный момент не существует единого стандартизированного подхода. Теоретически оценить эффективность методик, применяемых разными исследовательскими группами, также является крайне затруднительным ввиду отличия в дизайнах проводимых исследований. Поэтому основным вектором данной работы была сравнительная характеристика наиболее используемых подходов к культивированию и трансдукции первичной культуры лимфоцитов. Исследование можно разделить на четыре направления – это анализ влияния различных комбинаций цитокинов на характеристики НК- и НКТ-клеток; изучение воздействия различных митогенов на популяции НК- и НКТ-клеток; оценка активирующего потенциала клеточной линии НЕК 293Т, используемой в качестве аллогенных фидерных клеток для НК- и НКТ-клеток, а также подбор параметров для осуществления эффективной лентивирусной трансдукции лимфоцитов. Кроме анализа существующих подходов к активации иммунных клеток, также экспериментально изучались иные подходы, не описанные ранее в литературе. Так сравнили активацию НК- и НКТ-клеток, проводимую при помощи МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, с активацией посредством L-ФГА (лектина, связывающегося с рецепторами Т-клеток) или КонА (лектина, избирательно стимулирующего Т-лимфоциты). В данной работе впервые детально изучали стимулирующее воздействие FCS, полисахарида, выделенным из морского огурца *Cucumaria japonica*, в качестве активатора пролиферации иммунных клеток. Кроме того, в качестве фидерных клеток тестировали клеточную линию почек эмбриона человека НЕК 293Т, которая, по данным литературы, ранее не использовалась для активации иммунных клеток.

Итак, при изучении различных активаторов пролиферации нецитокинового происхождения, было установлено, что наиболее предпочтительным способом активации общей популяции НК- и НКТ-клеток являлась стимуляция при помощи МАТ+FCS. При изучении влияния различных комбинаций цитокинов (ИЛ-2+ИЛ-15, ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, или только ИЛ-2) на популяции НК- и НКТ-клеток при их длительном культивировании в

течение 21-го дня после активации посредством МАТ было установлено, что самый благоприятный эффект, а именно наибольшая пролиферация НК- и НКТ-клеток и высокая цитотоксичность, наблюдался при добавлении в питательную среду комбинации цитокинов ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21. В исследовании был разработан и протестирован метод соинкубации первичной культуры лимфоцитов с обработанными митостатиком Митомицином С клетками культуры НЕК 293Т. Результаты данной серии экспериментов не только выявили потенциал использования клеток НЕК 293Т в качестве активатора иммунных клеток, но и показали значительный прирост НК-клеток уже на 4-й день культивирования (доля CD3-CD56+клеток составляла, в среднем, 43%), чего не удавалось добиться при использовании активаторов пролиферации или интерлейкинов. Культура НЕК 293Т была выбрана нами ввиду подверженности ее различным генетическим модификациям. Эта особенность позволит в дальнейшем создать модифицированную линию НЕК 293Т, экспрессирующую, по аналогии с многими фидерными линиями, дополнительные ОАА или мембраносвязанные ИЛ, что обеспечит более эффективную активацию иммунных клеток, в частности, НК-клеток.

В целях достижения высокой экспрессии CAR была отлажена методика концентрирования вирусосодержащего материала и трансфекции пакующей линии. Изучались методы активации лимфоцитов в контексте их возможного влияния на эффективность трансдукции, в одной из серий экспериментов перед трансдукцией проводилась магнитная сепарация клеток, также исследовали возможность селекции CAR-лимфоцитов для получения их обогащенной популяции. Так наилучшие результаты были получены при трансдукции лимфоцитов, которые после выделения подвергались магнитной сепарации (получение CD4+ и CD8+популяций) и затем активировались биodeградируемыми наночастицами.

• Внедрение результатов диссертационного исследования в практику

Основные результаты и выводы работы внедрены в учебный и научный процесс кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А. А. Воробьева ИОЗ им. Ф. Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И. М. Сеченова при изучении дисциплин микробиологии и иммунологии, читаемых студентам по направлениям подготовки 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.03 «Стоматология», 32.05.01 «Медико-профилактическое дело», 33.05.01 «Фармация», 31.05.02 «Педиатрия».

• Этическая экспертиза научного исследования в Локальном совете по этике ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. Постановили: одобрить исследование в рамках диссертационной работы «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR» (исследование проводит Фёдорова Полина

Олеговна). Выписка из протокола №8/2022 (дубликат) заседания Локального Совета по Этике от 2022 г.

• **Научная специальность и отрасль науки, которым соответствует диссертация**

Диссертация Фёдоровой Полины Олеговны соответствует

- специальности 3.2.7. Иммунология
- специальности 1.5.10. Вирусология
- отрасли медицинских наук

• **Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

Результаты материалов диссертации представлены в 14 печатных работах, среди которых 2 оригинальные и 1 обзорная научные статьи в международных, зарубежных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, а также 4 оригинальные и 1 обзорная научные статьи в изданиях, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, и 5 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций. Материалы работы включены в патент №2813531 от 13.02.2024.

Оригинальные статьи в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах данных Web of Science, Scopus, PubMed:

- 1) Anti-Cancer Potential of Transiently Transfected HER2-Specific Human Mixed CAR-T and NK Cell Populations in Experimental Models: Initial Studies on Fucosylated Chondroitin Sulfate Usage for Safer Treatment. Chikileva IO, Bruter AV, Persiyantseva NA, [и др.] // **Biomedicines** – 2023. – Т. 11. – С. 2563. – DOI 10.3390/biomedicines11092563 [PubMed].
- 2) Can magnetic nanoparticles enhance adoptive cell therapy via driving migration of lymphocytes into tumors? Chikileva I, Fedorova P, Shubina I [и др.] // **Explor Med**– 2024. – Т. 5. – С. 351-362. – DOI 10.37349/emed.2024.00224 [PubMed].
- 3) Hexagonal BN/Methylene Blue Heterostructures for Local Photodynamic Therapy of Melanoma. D. S. Kalugina, A. T. Matveev, R. V. Timoshenko [и др.] // **Ceramics International** – 2024. – Т. 50. – С. 55363-55371. – DOI 10.1016/j.ceramint.2024.10.394 [PubMed].

Оригинальные научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК при Минобрнауки России:

- 1) CAR НК-терапия: методы активации и экспансии НК-клеток. Фёдорова П.О. // **Acta Biomedica Scientifica** – 2024. Т. 5. – С. 53-65. – DOI 10.29413/ABS.2024-9.5.6.
- 2) Оценка воздействия различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность клеток – натуральных киллеров. Фёдорова П.О., Чикилева И.О. //

Российский биотерапевтический журнал – 2025. Т. 2. – С. 22-31. – DOI 10.17650/1726-9784-2025-24-2-22-31.

- 3) Использование клеточной линии НЕК 293Т в качестве активатора пролиферации НК-клеток в контексте разработки CAR-НК-терапии. Фёдорова П.О., Чикилева И.О., Киселевский М.В. // **Инфекция и иммунитет** – 2025. Т. 15. – № 5. – С. 855-870. – DOI 10.15789/2220-7619-CNT-17941.
- 4) Особенности экспансии и иммунофенотипа первичной культуры НК- и НКТ-клеток человека под действием различных активаторов пролиферации. Фёдорова П.О., Чикилева И.О., Токатлы А.И. [и др] // **Российский биотерапевтический журнал** – 2025. Т. 4. – С. 64–76. – DOI 10.17650/1726-9784-2025-24-4-64-76.
- 5) Оптимизация метода лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов. Фёдорова П.О., Чикилева И.О., Персиянцева Н.А. [и др] // **Имунопатология, аллергология, инфектология** – 2025. № 3. – С. 29-39. – DOI 10.14427/jipai.2025.3.29.

Материалы конференций по теме диссертационного исследования

- 1) Преимущества и недостатки обогащения популяций натуральных киллеров для адоптивной терапии опухолей путем их избирательного наращивания без сепарации. Шатунова П.О., Чикилева И.О. // Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы. Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова с международным участием. Москва, 2023
- 2) Эффекторные лимфоциты с HER2-специфическим рецептором в качестве потенциального препарата в комплексной терапии злокачественной меланомы. Персиянцева Н.А., Замкова М.А., Шатунова П.О. [и др.] // Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы. Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова с международным участием. Москва, 2023
- 3) Преимущества и недостатки обогащения популяций натуральных киллеров для адоптивной терапии опухолей путем их избирательного наращивания без сепарации. Шатунова П.О., Чикилева И.О., Маркушин С.Г. // *New approaches in the field of microbiology, virology, immunology and epidemiology*: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН. ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Москва, 2023
- 4) CAR-НК-терапия: влияние активаторов на степень пролиферации, выживаемость, рецепторный профиль и цитотоксическую активность НК-клеток. Федорова П.О., Чикилева И.О. // *New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and*

Epidemiology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН, Москва, 2024

5) Использование клеточной линии НЕК 293Т в качестве активатора пролиферации НК-клеток в рамках разработки CAR-НК-терапии. Федорова П.О., Чикилева И.О. // New approaches in the field of microbiology, virology, immunology and epidemiology: Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 80-летию Великой Победы. Москва, 2025

Зарегистрированные результаты интеллектуальной деятельности по теме
диссертационного исследования

- 1) Киселевский М.В., Чикилева И.О., Фёдорова П.О. [и др.]. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Биомедицинский клеточный продукт для терапии злокачественных новообразований. Патент № 2813531 РФ, № 2023111306, Заявл. 02.05.2023; Опубл. 13.02.2024, Бюл. №5.

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научных конференциях:

- 1) Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова с международным участием (г. Москва, 2023 год)
- 2) New approaches in the field of microbiology, virology, immunology and epidemiology (г. Москва, 2023 год)
- 3) New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology (г. Москва, 2024 год)
- 4) New approaches in the field of microbiology, virology, immunology and epidemiology (г. Москва, 2025 год)

Заключение

Диссертационная работа Фёдоровой Полины Олеговны на тему: «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема, имеющая значение для научных специальностей 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология.

Диссертационная работа Фёдоровой Полины Олеговны на тему: «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR» полностью соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней»

