



ПОТВЕРЖДАЮ»

Директор
ФГБУ «ФНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России
член-корреспондент РАН,
д-р мед. наук, профессор М.Р. Хаитов

ОТЗЫВ

о научно-практической значимости диссертационной работы
Украинской Валерии Михайловны
«Изучение влияния опухолевого микроокружения
на противоопухолевую активность CAR-T-клеток»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
«1.5.3 – молекулярная биология»

Актуальность темы диссертационной работы

В настоящее время прорывным и высокоэффективным подходом для терапии онкологических заболеваний является использование Т-клеток, несущих химерный антигенный рецептор. Преимущество использования данного подхода состоит в том, что такие модифицированные Т-клетки могут специфично распознавать опухолевые клетки, несущие определенный антиген и убивать их, в дальнейшем формируя клетки памяти. Эффективность использования данной терапии была показана во многих клинических исследованиях, и неоспоримо то, что данный подход позволит сохранить много жизней тяжелобольных пациентов. Однако терапия CAR-T-клетками не обладает гарантированным 100% успехом, даже в случае лечения диффузных видов рака. Еще до взаимодействия с опухолевой клеткой цитолитическая функция CAR-T-клетки может быть подавлена за счет негативного влияния иммуносупрессивного опухолевого микроокружения. В понятие опухолевого микроокружения входит несколько механизмов, которые по-разному (за счет секреции растворимых факторов, продукции на поверхности клеток опухоли ингибиторных молекул, привлечения иммуносупрессорных

популяций лимфоидных и миелоидных клеток), но всегда негативно влияют на противоопухолевый иммунитет. Понимание фундаментальных механизмов, участвующих в формировании опухолевого микроокружения, а также поиск мишеней и методов, позволяющих разрушить или устранить влияние микроокружения на иммунные клетки, является ключом к успешному лечению онкологических заболеваний. Также важно понимать, что создание CAR-T-клеточного продукта непосредственно занимает несколько недель, в течение которых Т-клетки пациента модифицируются и наращиваются в биореакторах до определенной плотности популяции. Важно максимально быстро провести экспансию клеточного продукта при этом сохранив Т-клетки в активном состоянии. 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 методов адоптивной иммунотерапии.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Диссертационная работа Украинской В.М. выполнена на базе ФГБУН «Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН и посвящена исследованию влияния различных компонентов опухолевого микроокружения на активность CAR-T-клеток. Тематика диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «1.5.3 – Молекулярная биология».

Основные результаты диссертационной работы и их достоверность

Диссертация Украинской В.М. представляет собой хорошо спланированное исследование, предметом которого являются анализ изменений, происходящих с CAR T-клетками под действием компонентов опухолевого микроокружения и искусственных антигенных везикул. Целью работы было изучение влияния факторов опухолевого микроокружения, включая внеклеточные везикулы, на CAR-T-клетки и выяснение возможности применения искусственных антигенных везикул для специфической стимуляции CAR-T-клеток. Для достижения цели автором были поставлены задачи, которые можно разделить на технические, такие как выделение и характеристика экзосом глиомных и лимфомных клеток, разработка метода получения искусственных антигенных везикул; и содержательные, а именно изучение влияния опухолевых везикул и искусственных антигенных везикул на активность CAR-T-клеток и изучение возможности применения мутантной ДНКазы I

для подавления метастазирования и прогрессирования опухоли, связанного с образованием внеклеточных ловушек нейтрофилов.

Все поставленные задачи были успешно выполнены диссертантом. В ходе выполнения исследования соискателем было подробно охарактеризовано взаимодействие опухолевых экзосом с CAR-T-клетками и показано, что экзосомы могут как активировать, так и подавлять, функцию CAR-T-клеток, влияя на цитотоксичность, секрецию воспалительных цитокинов, а также изменять профиль экспрессии генов CAR-T-клеток. Также был разработан способ получения искусственных антигенных везикул, несущих опухолевый антиген для детекции химерного антигенного рецептора на поверхности Т-клеток, и было доказано, что эти везикулы можно с успехом применить не только для идентификации и выделения CAR-положительной популяции, но и для специфичной активации CAR Т-клеток, что позволяет получить CAR-T-клеточный продукт с повышенной функциональной активностью *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, диссертантом было показано, что использование ДНКазы I при терапии колоректального рака не только позволяет эффективно бороться с внеклеточными ловушками нейтрофилов, но и может восстановить иммунный ответ в микроокружении опухоли, обеспечив иммунный контроль над раковыми клетками, что приводит к ингибированию развития метастазов CRC в печени.

Диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. Современные методы исследования, тщательный анализ экспериментальных данных, адекватно подобранные методы статистического анализа убеждают в достоверности полученных результатов. Выводы обоснованы результатами исследований и четко сформулированы. Достоверность полученных результатов дополнительно подтверждена использованием биологических повторов с негативными контролями, которыми служили везикулы и экзосомы, не несущие специфический антиген на поверхности, либо контрольные Т-клетки, не несущие химерный антигенный рецептор. Специфическая активация CAR-T-клеток была подтверждена в различных функциональных тестах. Все результаты исследования получены с использованием корректных статистических методов.

Структура диссертации соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Значительный вклад диссертанта на всех этапах выполнения исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна работы

Работа Украинской В.М. посвящена исследованию роли опухолевого микроокружения в противоопухолевом иммунном ответе CAR-T-клеток. Известно много данных, что различные компоненты опухолевого микроокружения могут подавлять активность T-клеток. Украинской В.М. подошла к исследованию данного вопроса с разных сторон. Во-первых, в данной работе впервые было показано, что опухолевые экзосомы, несущие опухолевый антиген, могут с высокой специфичностью связываться и поглощаться CAR-T-клетками, вызывая тем самым различные изменения в клетке-реципиенте, даже приводя к подавлению ее функций. Во-вторых, Украинской В.М. впервые был предложен метод борьбы с внеклеточными ловушками нейтрофилов, когда введение ДНКазы I позволяет восстановить иммунный ответ и приводит к ингибированию роста метастазов. В дополнение к этому, в работе диссертанта предложен способ увеличения активности CAR-T-клеток еще до введения в пациента посредством инкубации CAR-T-клеток с искусственными везикулами, несущими специфичный опухолевый антиген.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования состоит в подробной характеристике фенотипических и функциональных свойств CAR-T-клеток. Особое внимание уделено подходам к созданию CAR-T-клеточного продукта и подробно охарактеризованы факторы, влияющие на эффективность CAR-T-клеток. В частности, показано, что распределение и динамика фенотипов CAR-T-клеток, соотношение CD4⁺- и CD8⁺-подтипов меняется в течение жизни CAR-T-клетки.

В работе также представлены результаты транскриптомного анализа CAR-T-клеток, обработанных опухолевыми везикулами. Показано, что происходит увеличение экспрессии генов, которые напрямую связаны как с подавлением, так и с активацией T-клеток. Выдвинута гипотеза о том, что CD19, находящийся на поверхности экзосом, может вызывать активацию CAR-T-клеток, в то время как другие опухолевые компоненты экзосом инициируют функциональное истощение CAR-T-клетки. Данное наблюдение представляет собой интересную область для будущих исследований.

Научно-практическая значимость

Научно-практическая значимость работы характеризуется разработкой новых экспериментальных методик. Разработанная технология получения искусственных везикул и ранее

нигде не описанный подход к экспансии CAR-T-клеток при помощи искусственных везикул в дальнейшем, несомненно, может найти свое применение в клинической практике. В процессе работы был создан ряд генетических конструкций и репортерных линий клеток для продукции экзосом и лимфома-клеточная линия, нокаутная по поверхностному антигену CD19. В работе также проведена множественная характеристика активности CAR T-клеток, как и в *in vitro*, так и в *in vivo* экспериментах. Также в работе были использованы современные методы цитофлуориметрического и микроскопического анализа, которые позволили анализировать различные фенотипические характеристики CAR-T-клеток: соотношение CD4⁺- и CD8⁺-популяций, распределение функциональных подтипов Т-клеток, уровень дегрануляции Т-клеток и др.

Отдельно следует отметить использование в работе новейших методов исследования, таких как IncuCyte-анализ, конфокальную и сканирующую микроскопию, модели *in vivo* и другое.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация написана по классическому плану, изложена на 118 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Библиографический указатель включает ссылки на 158 источников. Диссертационная работа содержит 35 рисунков и 4 таблицы.

Обзор литературы написан хорошим научным языком и описывает ключевые исторические моменты в развитии технологии CAR-T иммунотерапии и подходы к созданию CAR-T-клеток. Отдельная глава посвящена характеристике экзосом, как части опухолевого микроокружения и описаны различные пути биогенеза экзосом. Последняя часть описывает уже известные в научной литературе пути влияния опухолевых экзосом на иммунный противоопухолевый ответ.

В главе «Материалы и методы» подробно изложены современные методы, использованные автором в работе. Глава «Результаты и обсуждение» имеет три раздела, где описаны экспериментальные данные, полученные при исследовании влияния опухолевых везикул на CAR-T-клетки, активация и экспансия CAR-T-клеток под действием искусственных везикул и результаты, полученные при исследовании влияния ДНКазы I на внеклеточные ловушки нейтрофилов. В каждом разделе убедительно и лаконично описаны полученные результаты, а также дана их интерпретация в контексте современных подходов адоптивной иммунотерапии. Выводы работы обоснованы и вытекают непосредственно из полученных диссертантом данных.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 2 международных конференциях. Результаты диссертационного исследования изложены в 6 печатных работах, опубликованных в международных журналах, таких как *Small, Molecular Oncology* и др., входящих в перечень рецензируемых научных изданий, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Несколько стилистических неточностей не умаляют ценности диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Украинской Валерии Михайловны «Изучение влияния опухолевого микроокружения на противоопухолевую активность CAR-T-клеток» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 – молекулярная биология» представляет собой научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований решены задачи, которые важны для развития молекулярной биологии и вносят значительный вклад в решение актуальных проблем в области иммунотерапии рака: впервые охарактеризовано взаимодействие опухолевых экзосом, выделенных из клеток лимфом и глиом, с CAR T-клетками и показано, что они способны как активировать, так и подавлять, функцию CAR T-клеток, воздействовать на их функциональную активность (цитотоксичность, секрецию цитокинов), а также изменять профиль экспрессии генов в этих клетках; впервые разработан способ получения искусственных везикул, несущих опухолевый антиген, для идентификации и выделения положительной популяции CAR-T-клеток с повышенной функциональной активностью *in vitro* и *in vivo*; показано, что использование ДНКазы I при терапии колоректального рака позволяет эффективно бороться с нейтрофильными внеклеточными ловушками, и тем самым восстановить иммунный ответ в микроокружении опухоли, который обеспечивает иммунный контроль над раковыми клетками, что приводит к ингибированию развития метастазов в печени.

Диссертация Украинской В.М. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335; от 20.03. 2021 г. № 426; от 02.08.2016 г. №

748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и утвержден на расширенном заседании лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, протокол № 3 от 26.11. 2021 г. Присутствовало на заседании 3 докторов наук и 3 кандидатов наук по профилю рассматриваемой диссертации. Результаты голосования: за – 6, против – 0, воздержались – 0.

Отзыв составил:

заместитель директора по науке и инновациям,
д-р биол. наук

И.П. Шиловский

Контактная информация:

115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

E-mail: info@nrcii.ru

Телефон +7 (499) 311-67-78

Подпись *Шиловский И.П.*
ЗАВЕРЯЮ
Учёный секретарь ФГБУ
«ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России
Власов А.А.
"26" ноября 2021 г.

