

Отзыв на диссертационную работу Украинской Валерии Михайловны  
*«Изучение влияния опухолевого микроокружения на противоопухолевую  
активность CAR T-клеток»*

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности – 1.5.3 – молекулярная биология

В настоящее время наблюдается стремительный рост нового направления в иммунотерапии злокачественных заболеваний – адаптивной терапии с применением генетически модифицированных Т-лимфоцитов, в частности лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (CAR Т-лимфоцитов). CAR Т-терапия в онкогематологии демонстрирует потрясающие успехи в клинических испытаниях, ее применение приводит в возникновению стойкой ремиссии у пациентов с рецидивом после многочисленных предшествующих линий терапии. Это привело к тому, что за последние 5 лет FDA и EMA одобрило 5 препаратов этого класса для лечения В-клеточных лейкозов и лимфом, а также множественной миеломы.

В то же время, несмотря на многочисленные испытания, в лечении солидных опухолей CAR Т терапии пока не демонстрирует такой высокой клинической эффективности. Это связано в том числе с затрудненным доступом лимфоцитов вглубь новообразования и иммуносупрессивным микроокружением, которое формируется в опухолевой ткани. Подавление функции иммунных клеток достигается опухолью за счет использования механизма иммунных контрольных точек и привлечения клеток миелоидного и лимфоидного происхождения, выполняющих противовоспалительную функцию. Еще одним потенциальным механизмом опухолевой иммуносупрессии является секреция внеклеточных везикул (экзосом). В то же время внеклеточные ловушки, выбрасываемые активированными нейтрофилами, могут выступать в роли физического барьера для опухолеспецифичных лимфоцитов.

В данной работе, с одной стороны, изучается влияние внеклеточных опухолевых экзосом на функцию специфичных CAR T-лимфоцитов, с другой стороны, автор описывает новый метод получения искусственных антиген-содержащих микровезикул, которые могут быть использованы для специфичного окрашивания, а также *in vitro* размножения CAR T-лимфоцитов. Дополнительно в работе изучается подход использования DNКазы I для разрушения внеклеточных сетей нейтрофилов, выброс которых также является одним из факторов, препятствующих эффективному функционированию иммунного контроля опухолей.

В ходе выполнения диссертационной работы был создан ряд вспомогательных инструментов: получена линия лимфомы Nalm6, в которой с помощью CRISPR/Cas9 генетического редактирования был удален линейный антиген CD19, на ее основе получены линии продуценты экзосом с репортерными генами люциферазы или eGFP.

С помощью полученных клеточных линий было охарактеризовано влияние опухолевых экзосом на CAR T-лимфоциты. Было показано, что экзосомы, несущие антиген на своей поверхности, специфично связываются с CAR-T-лимфоцитами, имеющие распознающий его рецептор. *In vitro* экзосомы показали способность активировать CAR-T-лимфоциты. В то же время после стимуляции экзосомами T-лимфоциты демонстрировали сниженную цитотоксическую способность, что может быть связано с их функциональным истощением.

Во второй, наиболее проработанной части работы, был разработан способ получения искусственных антигенных везикул, несущих опухолевой антиген. Для этого клетки линии HeLa, которые были предварительно трансдуцированы пятью различными опухоль-ассоциированными антигенами, обрабатывали цитохалазином В, после чего фракцию, содержащую микровезикулы, выделяли путем ступенчатого центрифугирования. С использованием нескольких различных методов (масс спектрометрия, проточная цитофлуорометрия и электронная микроскопия) было подтверждено, что полученные везикулы содержат в своем составе опухолевые маркеры и специфично связываются с мембраной CAR T-клеток, несущих рецептор к данному маркеру.

Затем было продемонстрировано, что искусственные везикулы обладают способностью к специфической активации, с одной стороны, репортерных клеток, несущих химерный антигенный рецептор, а с другой стороны, первичных линий CAR T-лимфоцитов. Более того, CAR T-лимфоциты, стимулированные искусственными везикулами, несущими антиген, обладали повышенной цитотоксической активностью как при первичном взаимодействии с клетками-мишенями, так и при рестимуляции.

Использование искусственных везикул для культивации CAR T-лимфоцитов приводило к приросту доли CAR+ клеток, а также в сравнении с подходами неспецифической стимуляции T-лимфоцитов (IL-2 и магнитные частицы к CD3/CD28) сдвигало фенотип клеток в сторону клеток центральной памяти, обладающих большим пролиферативным потенциалом. В мышинной модели полученные таким образом CAR T-лимфоциты обладали более выраженными противоопухолевыми свойствами.

В третьей части работы было показано, что использование вектора на основе аденоассоциированного вируса, несущего мутантную форму ДНКазы I, в модели метастазирующего колоректального рака увеличивает число CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и снижает число метастазов в печени.

Диссертационная работа написана по классическому плану, изложена на 118 странице и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка использованной литературы, включающего 158 ссылок, и двух приложений. Работа содержит 40 рисунков и 4 таблиц.

Обзор литературы написан лаконично, очень четко и хорошим научным языком, содержит исторический экскурс в историю иммунотерапии и создания CAR T-лимфоцитов, а также освещает механизмы активации химерного антигенного рецептора и подходы к экспансии CAR T-лимфоцитов. Отдельно рассматриваются механизмы опухолевой иммуносупрессии, биогенеза экзосом и их биологической роли.

В разделе «Материалы и методы» подробно изложены использованные в работе методы. В разделе Результаты и обсуждение четко и убедительно описаны полученные экспериментальные данные и дана их интерпретация.

К незначительным замечаниям можно отнести:

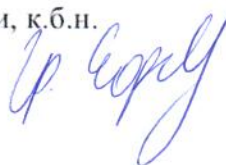
1. Первый и второй вывод по сути являются одним выводом.
2. Не до конца ясная формулировка в расчете соотношения количества экзосом и CAR T-клеток на стр. 67
3. Панели в рис. 14, вероятно, перепутаны.
4. Отсутствие на рис. 14 и 16 или в тексте указания на статистическую значимость полученных результатов, а также метода анализа.
5. Незначительные опечатки:
  - а. «в репортерными генами вместо» «с репортерными генами» в подписи к рис. 8
  - б. «поглащение» стр. 75
6. Термин «обработка» в применении к введению мышам AAV представляется не совсем удачным
7. Вывод 5, содержит слово «терапия», без указания на то, что речь идет о мышинной модели

Подводя итог, хочется сказать, что представленная работа выполнена на очень высоком уровне, сочетает в себе методы клеточной и молекулярной биологии и представляет собой крайне удачно спланированное, выполненное и описанное исследование. Результаты, полученные в данной работе крайне важны для понимания механизмов иммуносупрессивного воздействия опухолевого микроокружения. Кроме того, работа имеет высокую практическую ценность: предложены методы использования искусственных антигенных везикул для идентификации, а также для культивирования CAR T лимфоцитов.

Исходя из вышесказанного, можно сказать, что диссертационная работа Украинской Валерии Михайловны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертационным работам, установленным "Положением о

присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650, от 20.03.2021 г. №426), и ее автор заслуживает присуждения степени кандидата наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент,  
заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии  
ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, к.б.н.  
Ефимов Григорий Александрович



125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4  
Тел. +7 (495) 612-44-43  
e-mail: efimov.g@blood.ru

Подпись к.б.н. Ефимова Григория Александровича заверяю  
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России,  
к.м.н. Джулакян Унан Левонович



03.12.2021