

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «ГНЦ Институт
Иммунологии» ФМБА России,
доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент
РАЕН



М.Р. Хаитов

«29» октября 2024 г.

ОТЗЫВ

о научно-практической значимости диссертационной работы Волкова Дмитрия Васильевича «Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR-T-клеточной терапии гемопозитических опухолей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3. Молекулярная биология»

Актуальность темы диссертационной работы

Одним из ключевых вопросов в разработке CAR-T-клеточной терапии остается поиск антигена, ассоциированного с опухолью, который бы отсутствовал на других тканях. Много лет главными кондиционирующими агентами остаются химиотерапия и облучение, которые приводят к тяжелым побочным эффектам (генотоксичность). В связи с этим ведется поиск альтернативных кондиционирующих агентов, среди которых наиболее перспективными являются CAR-T-клетки. В настоящее время разработаны иммунотерапевтические агенты кондиционирования на основе моноклональных антител к CD45 – химио- и радиотерапевтические

конъюгаты, которые, тем не менее, часто не позволяют полностью элиминировать лекарственно устойчивые опухолевые клетки. Модифицированные CAR иммунные клетки, направленные на CD45 способны стать новым тканеспецифичным и менее токсичным способом полноценного кондиционирования и эффективного лизиса гемопоэтических опухолей перед трансплантацией костного мозга за счет объединения аффинности антитела и литического потенциала цитотоксических иммунных клеток.

Другим важным вектором развития CAR-T-терапии является переход к использованию аллогенных Т-клеток. Это необходимо, так как Т-клетки пациентов после многократных раундов химио- и радиотерапии находятся в нефункциональном состоянии. Ключевое препятствие на данном пути – риск возникновения реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Ранее было показано, что отдельные популяции Т-клеток (Т-клетки памяти) не склонны провоцировать РТПХ. При этом, CAR-T-клетки, полученные из таких Т-лимфоцитов, одинаково эффективны в элиминации опухолей, что было продемонстрировано в доклинических испытаниях.

Таким образом, тема рассматриваемой диссертационной работы представляется актуальной.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Содержание диссертации соответствует специальности «1.5.3. Молекулярная биология» (Направления исследований №6: Молекулярная биология клетки; №9: Генная, белковая и клеточная инженерия).

Основные результаты диссертационной работы

Классические методы лечения онкозаболеваний – химиотерапия, лучевая терапия, оперативное лечение, отнюдь не всегда способствуют полной регрессии заболевания. Более того, данные способы лечения обладают серьезными побочными эффектами. В связи с этим требуется разработка новых адресных, высокоэффективных и низкотоксичных методов терапии

онкологических заболеваний. Развитие применения генно-инженерных аутологичных Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR T), является одним из таких перспективных направлений персонализированной медицины.

В связи с этим в работе были получены устойчивые к аутоксичности нокаутные по CD45 CAR45-T-клетки и CAR45-NK-клетки, специфично лизирующие CD45-позитивные клетки человека. В многочисленных экспериментах было убедительно показано, что нокаут гена *PTPRC*, кодирующего CD45, не снижает цитотоксичность Т-клеток и CAR-T-клеток, нокаутные по CD45 CAR45-T клетки и CAR45-NK-клетки успешно уничтожают CD45-позитивные клетки крови человека *in vitro*. В рамках *in vivo* исследований на релевантных животных моделях было продемонстрировано, что разработанные нокаутные по CD45 CAR45-T-клетки эффективно элиминировали ксенографты CD45-позитивных человеческих опухолей и человеческих РВМС.

В ходе клинического исследования аллогенных CAR19-T-лимфоцитов с фенотипом Т клеток памяти была впервые показана эффективная элиминация В-клеточного острого лимфобластного лейкоза без осложнений в виде РТПХ тяжелой степени. Были обнаружены отличия CAR19 Т лимфоцитов с фенотипом Т-клеток памяти от классических CAR19-T-лимфоцитов в персистенции в крови пациентов. В дальнейших сравнительных экспериментах *ex vivo* было обнаружено, что CAR19-T-лимфоциты с фенотипом Т-клеток памяти и классические CAR19-T-лимфоциты не отличаются по уровню немедленной цитотоксичности и активации, но CAR19-T-лимфоциты с фенотипом Т-клеток памяти быстрее теряют способность лизировать опухолевые клетки в условиях повторных раундов инкубации со свежими клетками-мишенями. Кроме того, было установлено, что CAR19-T-лимфоциты с фенотипом Т-клеток памяти экспрессируют больше маркеров истощения и более дифференцированы.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена с использованием достаточного количества экспериментального материала и широкого комплекса методов и подходов. Полученные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и являются достоверными.

Научная новизна

В диссертационной работе впервые показано, что нокаут рецептора CD45 не снижает цитотоксичность Т-клеток, но снижает их провоспалительную активность, а также что нокаутные по CD45 CAR45-Т-клетки эффективно элиминируют человеческие гемопоэтические клетки *in vivo*, что расширяет представления о механизмах регуляции сигнала активации от Т клеточного и химерного антигенного рецептора. Кроме того, впервые была продемонстрирована эффективная элиминация опухоли с помощью аллогенных CAR19-Т-клеток, полученных из Т-лимфоцитов памяти гаплоидентичных доноров, в популяции пациентов с рефрактерным течением В клеточного острого лимфобластного лейкоза. Одновременно изучены функциональные и фенотипические особенности CAR19-Т-клеток, полученных из Т-лимфоцитов памяти, что позволяет более тщательно разобраться во влиянии CD45 на биологию CAR-Т-клеток, выявить новые связи между фенотипическими маркерами и функциональными характеристиками таких иммунотерапевтических агентов.

Теоретическая значимость работы

Данные, представленные в работе, позволяют по-новому взглянуть на использование геномодифицированных эффекторных клеток иммунной системы. Так показано, что CAR19-Тm-клетки не уступают CAR19-Т-клеткам в реакциях активации и немедленной цитотоксичности, но быстрее теряют способность лизировать таргетные клетки при повторной инкубации с ними. Также в работе убедительно продемонстрировано, что CAR19-Т-клетки с

фенотипом клеток памяти быстрее теряют функциональную активность и отличаются по ряду характеристик (фенотип, профиль истощения) от CAR19-T-клеток.

Таким образом исследование обогащает теоретическую базу для разработки новых терапевтических подходов, углубляет понимание иммунологии онкогематологических заболеваний, а также демонстрирует новейшие методики в области изучения T- и NK-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами.

Полученные результаты могут быть использованы при подготовке учебных программ в высших учебных заведениях медицинского профиля, а также при разработке курсов повышения квалификации медицинских работников.

Научно-практическая значимость работы

Диссертационная работа имеет высокую научно-практическую значимость. В том числе автором показано, что нокаутные по CD45 CAR45-T-клетки и CAR45-NK клетки способны уничтожать CD45-позитивные клетки крови человека *in vitro* и эффективно элиминировать человеческие CD45-позитивные опухоли и РВМС-трансплантат *in vivo*. Эти свойства позволяют использовать полученные клетки как новый тканеспецифичный и менее токсичный агент кондиционирования пациентов перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, в том числе при терапии большого количества гемопоэтических опухолей, благодаря широкому спектру литической активности нокаутных по CD45 CAR45-T клеток.

Эффективная элиминация В-клеточной опухоли у пациентов аллогенными CAR19-Tm-клетками, полученными из популяции T-клеток памяти гаплоидентичных доноров, в отсутствие тяжелой РТПХ, впервые показанная в ходе представленных исследований, позволяет надеяться на будущее применение таких терапевтических агентов в качестве альтернативы для пациентов с онкологией, которые прошли ряд процедур химиотерапии и

облучения и как компонент трансплантата, способный к элиминации опухолей, для снижения риска развития рецидива лейкоза после ТГСК.

Детальное сравнительное *ex vivo* исследование CAR19-T-лимфоцитов с фенотипом T-клеток памяти с классическими CAR19-T-лимфоцитами выявило различия в их фенотипе, параметрах истощения, транскриптомном профиле и длительности цитотоксической активности, которые необходимо учитывать для успешного клинического применения аллогенных CAR-T-лимфоцитов с фенотипом T-клеток памяти.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа имеет классическую структуру и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Сокращения», «Список литературы» и «Приложения». Диссертационная работа изложена на 135 страницах, иллюстрирована 6 таблицами и 53 рисунками. Список литературы включает 173 источника.

В разделе «Введение» кратко аргументируется актуальность проблемы, описываются основные цели и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость, упоминаются основные методы исследования и излагаются положения диссертационной работы, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов. Положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и соответствуют поставленным целям работы. Достоверность результатов подтверждается публикациями в ведущих международных изданиях и докладами на международных конференциях, а также надежностью используемых методов и адекватной статистической обработкой результатов.

Обзор литературы четко структурирован, написан понятным языком, широко охватывает материал и содержит все необходимые данные для понимания диссертационной работы. В обзоре подробно объяснена роль панлейкоцитарного антигена CD45 в клетках иммунитета, в патогенезе

онкогематологических заболеваний, обширно раскрыты те уникальные причины, которые делают CD45 подходящей мишенью для таргетной терапии опухолевых заболеваний и кондиционирования пациентов перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Также в обзоре литературы уделено большое внимание кондиционированию пациентов, используемым в настоящее время подходам и перспективам использования адоптивной клеточной терапии для кондиционирования. Диссертантом подробно рассмотрена структура химерного рецептора CAR, ряд проблем, ассоциированных с CAR-T-клеточной терапией, которым посвящены экспериментальные результаты. Объем проработанного литературного материала и уверенное оперирование им, свидетельствует о том, что диссертант имеет высокий уровень теоретической подготовки и хорошо разбирается в тематике исследований.

Раздел «Материалы и методы» содержит краткие методики всех исследований, проведенных в работе. Этот раздел позволяет понять схему выполнения всех экспериментов и воспроизвести их. Автор демонстрирует использование большого арсенала современных методов молекулярной и клеточной биологии. В целом работа выполнена на очень высоком экспериментальном уровне. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из 2-х частей. В первой части автором разрабатываются агенты для адоптивной иммунотерапии онкогематологических заболеваний и кондиционирования пациентов, направленной на пан-лейкоцитарный антиген CD45 – CAR45-T-клетки и CAR45-NK клетки. Во второй части автор описывает результаты клинического исследования терапевтический потенциал и характеристики аллогенных CAR19-T-лимфоцитов с фенотипом T-клеток памяти. Данный раздел хорошо структурирован и иллюстрирован, способствует пониманию логики исследования, включает сравнение результатов с имеющимися литературными данными.

В разделе «Заключение» кратко изложены результаты проделанной работы, сформулированы перспективы разработок в рамках данной диссертации и вектор дальнейших исследований, которые могут дополнительно раскрыть потенциал исследуемой тематики.

Выводы обоснованы результатами исследования и четко сформулированы.

Материалы диссертации доложены на российских и международных конгрессах и конференциях. Основные результаты диссертационного исследования изложены в 3-х статьях, опубликованных в международных научных журналах *Molecular Therapy Oncology*, *Acta Naturae*, *Blood Advances*, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций. 3 тезиса были доложены и опубликованы в материалах международных и российских конференций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Значимых замечаний по содержанию и оформлению диссертации нет. В то же время хотелось бы отметить, что в работе не рассматриваются причины более низкой секреции провоспалительных цитокинов Т- и CAR-T-клетками после нокаута гена, кодирующего CD45. Также в главе 4.2.7 о нокаутных по CD45 CAR45-NK-клетках не указано, какое происхождение у клеток-мишеней (Т клеток и РВМС) по отношению к CAR45-NK клеткам – аутологичное или аллогенное. Однако вышесказанное не влияет на общую положительную оценку работы.

Заключение

Диссертационная работа Волкова Дмитрия Васильевича «Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR-T-клеточной терапии гемопоэтических опухолей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3. Молекулярная биология» является научно-

квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение для молекулярной биологии: доказано что CD45 Δ CAR45-T-клетки и CD45 Δ CAR45-NK клетки лизируют CD45-позитивные клетки человека, включая злокачественные, *in vitro*, а CD45 Δ CAR45-T-клетки элиминируют CD45-позитивные клетки человека, включая злокачественные, *in vivo*; установлено, что аллогенные CAR19-T-клетки с фенотипом клеток памяти эффективно элиминируют В клеточную опухоль и не вызывают РТПХ тяжелой степени у пациентов; показано, что CAR19-T-клетки с фенотипом клеток памяти быстрее теряют функциональную активность и отличаются по ряду характеристик (фенотип, профиль истощения) от CAR19-T-клеток.

Диссертация Волкова Д.В. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 № 62), а ее автор достоин присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3. Молекулярная биология».

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании расширенного семинара лаборатории молекулярной иммуногенетики ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, протокол (протокол № 2 от 28 октября 2024 г.).

Отзыв составил
заведующий лабораторией молекулярной
иммуногенетики ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России, д.б.н.

И.А. Кофиади

