

ОТЗЫВ

официального оппонента, д.б.н. Тиллиба Сергея Владимировича,
о диссертационной работе Волкова Дмитрия Васильевича на тему
«Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной
популяции для CAR T клеточной терапии гемопоэтических опухолей»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология»

Диссертация Дмитрия Васильевича Волкова представляет собой комплексное фундаментально-прикладное исследование в очень актуальном сегодня направлении CAR-T иммунотерапии для лечения больных онкогематологическими заболеваниями, связанным с получением и применением модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR) T-клеток или NK-клеток (клеток-убийц) иммунной системы человека. Эта технология позволяет сочетать антитело-опосредованное специфическое таргетирование заданных поверхностных маркеров раковых клеток и цитотоксичность T лимфоцитов или NK-клеток. В работе продемонстрирована возможность совмещения кондиционирования и противоопухолевой терапии при помощи созданных CAR-T клеток с отредактированным геномом (с нарушением экспрессии пан-лейкоцитарного антигена CD45) и специфичных к CD45, а также впервые показано, что аллогенные CAR-T клетки с фенотипом клеток памяти способны эффективно элиминировать B-клеточную опухоль и не вызывают существенной реакции отторжения у пациентов с рецидивами опухоли.

Актуальность выполненного исследования

Наряду с традиционными методами онкотерапии (хирургия, химио- и радиотерапия) сегодня большие надежды возлагают на новые иммунотерапевтические препараты и подходы, сочетающие антиген-узнающие молекулы и активируемые цитотоксические иммунные клетки. Стремительно развивающимся направлением иммунотерапии является применение T клеток (пациента или здорового донора), модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR T). Химерные антигенные рецепторы (CAR) связывают заданные антигены опухолевых клеток независимо от молекул главного комплекса гистосовместимости, и такое взаимодействие запускает сигнальные каскады внутри CAR T-клеток, что приводит к их активации и цитотоксичности против клеток-мишеней. Клинические испытания CAR T-клеток

показали высокую эффективность данного подхода в случае гематологических опухолевых заболеваний, в том числе для некоторых опухолей В-клеточного происхождения, резистентных к химиотерапии. Однако, CAR-T иммунотерапия является глобальным инвазивным воздействием на организм пациента и естественно не лишена серьезных побочных эффектов, связанных, например, с неконтролируемой активацией провоспалительных цитокинов и неспецифической цитотоксичностью. Для уменьшения этих нежелательных побочных эффектов было предложено использовать CAR-модифицированные NK клетки, которые почти не вызывают синдром выброса цитокинов. Другой частой проблемой является недостаточная функциональность аутологичных Т лимфоцитов в случае пациентов, уже перенесших химио- или радиотерапевтическое воздействие. Использование здоровых донорских Т лимфоцитов для производства CAR Т-клеток может решить данную проблему. Однако, применение аллогенных Т-лимфоцитов для получения CAR Т клеток ограничено риском развития реакции отторжения трансплантата. С целью минимизации этой проблемы было предложено использовать аллогенные Т клетки памяти (Т_m). Т_m эквивалентны по эффективности элиминации опухолей обычным CAR Т-клеткам *in vivo*, а в случае аллогенного применения не вызывают реакции отторжения трансплантата. Проведенное в представленной работе исследование эффективности CAR Т_m-клеточной терапии на пациентах и детальное сравнение CAR Т_m клеток и классических CAR Т клеток *in vitro* и *ex vivo* крайне актуальны.

Важной задачей является выбор ассоциированного с опухолью антигена, который не представлен в остальных тканях организма, для преодоления внеопухолевой антиген-опосредованной токсичности. Для онкогематологических заболеваний уникальным антигеном является общий лейкоцитарный антиген CD45, который экспрессируется на большей части клеток крови (кроме эритроцитов и тромбоцитов), включая злокачественные. Такие свойства делают CD45 уникальной мишенью для таргетной терапии, особенно при кондиционировании (освобождении от собственных клеток костного мозга) пациентов перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. В этой связи, актуальной научно-исследовательской задачей является создание CAR Т-клеток и CAR NK-клеток специфичных к CD45 и способных к эффективной элиминации клеток крови человека, включая злокачественные.

В представленной работе получены очень интересные и актуальные новые результаты, связанные с решением указанных выше актуальных задач и реализацией инновационных решений с целью развития методов CAR-T иммунотерапии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, являются обоснованными и подтверждены публикациями автора по теме диссертации в высокорейтинговых журналах.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов.

Достоверность и научная новизна проделанной работы и научных положений, выносимых на защиту, сформулированных выводов и предложенных рекомендаций, отражающих полученные в ходе выполнения диссертационной работы научные достижения, не вызывает сомнений. Достоверность подтверждается тремя публикациями в рецензируемых международных научных журналах. Результаты работы были представлены на 3 конференциях. Работа базируется на современных научных данных других исследователей и хорошо соответствует самым высоким требованиям исследований в данной области науки. Автором были использованы адекватные современные обоснованные экспериментальные подходы и методы статистической обработки результатов.

Структура и содержание диссертации.

Диссертационная работа организована по классическому образцу и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений (желательно было бы его дать в начале), список литературы (173 ссылки на первоисточники) и 3 приложения.

Обзор состоит из трех основных частей и заключения, содержит основную базовую информацию, которая требуется для понимания актуальности задач проводимого исследования в контексте общего положения дел в данной области науки. Автор описывает основные сегодняшние представления и последние данные, касающиеся кондиционирующей терапии, основных сведений об общем лейкоцитарном антигене CD45, базовые сведения и актуальные задачи в области CAR T-клеточной терапии. Обзор изложен весьма компактно, на 25 страницах, написан понятным языком, логично, информативно и достаточно сфокусировано.

В главе «Материалы и Методы» достаточно подробно описаны многочисленные и весьма разнообразные методики, использованные для решения поставленных задач. Следует отметить использование автором очень широкого весьма впечатляющего

арсенала самых современных методов молекулярной и клеточной биологии, цитофлуометрии, а также особо отмечу впечатляющие работы с иммунодефицитными мышами.

В главе «Результаты и обсуждение» диссертант последовательно излагает полученные результаты и иллюстрирует их с помощью наглядных рисунков и таблиц. Эта глава содержит введение и два больших раздела. Первый раздел имеет название «Получение, оценка функциональности и терапевтического потенциала CD45Δ CAR45 T клеток и CD45Δ CAR45 NK клеток» и состоит из 8 подразделов посвященных экспериментов, направленных на решение различных конкретных задач по получению и исследованию CAR T (или NK)-клеток, в которых методом геномного редактирования нарушен ген, кодирующий пан-лейкоцитарный антиген CD45 и при этом встроен химерный антигенный рецептор, специфически связывающий антиген CD45 на поверхности клеток. Второй раздел состоит из 5 подразделов и посвящен исследованию терапевтического потенциала аллогенных CAR (CD19) T-клеток, произведенных из CD45RA-негативных T-клеток памяти.

Описание проделанной работы сделано достаточно четко, последовательно и компактно. Обсуждение полученных результатов проводится вместе с описанием собственно результатов, не вынесено в отдельный раздел.

Среди основных результатов работы отмечу следующие. С целью создания новых возможностей адоптивной иммунотерапии, основанных на таргетировании разных изоформ лейкоцитарного антигена CD45 для кондиционирования пациентов перед трансплантацией костного мозга от донора, были получены методами геномной и клеточной инженерии устойчивые к аутоксичности CAR T- и CAR NK-клетки, в которых нарушен ген, кодирующий пан-лейкоцитарный антиген CD45 и при этом встроен химерный антигенный рецептор, специфически связывающий антиген CD45 на поверхности клеток. Показана воспроизводимость и высокая эффективность проводимого геномного редактирования с целью нокаутить ген, кодирующий белок CD45 вготавливаемых CAR T- или NK-клеток. Отмечу в плане удачного преодоления возникающих сложностей, что в данной работе, с целью преодоления исходно наблюдавшегося «братоубийства» полученных CD45Δ CAR45 T клеток при их размножении, удалось найти подходящий реактив – обратимый ингибитор тирозиновых киназ – дазатиниб. Убедительно продемонстрирована требуемая функциональная активность полученных CAR T-клеток как *in vitro*, так и на хитроумных мышинных (гуманизированных) моделях *in vivo*. Особо отмечу очень наглядные, изящные и эффектные опыты на иммунодефицитных мышах по элиминации CD19-позитивных и CD45-позитивных опухолей. Впервые показана

эффективная элиминация В-клеточной опухоли у пациентов аллогенными CAR19 Tm клетками, полученными из популяции Т клеток памяти гаплоидентичных доноров, в отсутствие тяжелой реакции отторжения трансплантата.

Конечно же особо отмечу несколько отдельное направление представленной работы, может быть несколько избыточное для этой защиты и очень смелое, однако, чрезвычайно значимое и яркое в плане практического применения разрабатываемых CAR Т-препаратов – использование для терапии пациентов с повторными релапсами В-ALL лейкемии.

В разделе «Заключение» кратко изложены основные результаты исследования и обсуждены теоретическая и практическая значимость данной работы.

В разделе «Выводы» подведены итоги работы. Выводы не вызывают сомнения.

Замечания

Принципиальных замечаний по сути данной работы и по сделанным выводам у меня нет. Однако, помимо некоторых выявляемых грамматических неточностей, англицизмов, я бы хотел сделать ряд замечаний, сформулировать некоторые вопросы и предложения в основном дискуссионного характера.

1) Небольшое замечание к Литературному обзору: интересно, как происходит взаимосвязь узнающей и эффекторной функций CAR? Есть ли какие-то литературные данные на этот счет?

2) Основные мои замечания к экспериментальной части связаны с оформлением, в первую очередь, раздела Материалы и Методы.

Стр. 41 – При описании ПЦР не указано, какой фермент и в какой концентрации использовали.

Стр. 45-46 – При описании ИФА в краткой схеме эксперимента не указаны ни составы растворов, ни концентрации реактивов, ни время инкубаций и число повторов (при промывках).

При описании ряда процедур используются неопределенные термины, так на стр. 51: «...отбирали необходимое количество клеток... ресуспендировали в соответствующем количестве клеток объеме холодного буфера...» и подобное есть в ряде других мест. Желательно было бы иметь больше определенности, например, указания концентрации клеток...

Стр. 54 – «пакирующих плазмид» - неудачный перевод английского термина, лучше было бы прямо написать: плазмид, содержащих гены, необходимые для сборки лентивируса.

4) Хотя в конце диссертации есть замечательное Приложение, хотелось бы видеть и при описании конкретных экспериментов и рисунков, какие именно антитела были использованы в данном случае. Так, например, в таблице приложения указано 3-4 варианта анти-CD45 антител из трех разных компаний. Однако, не указано, какие из них использовались в опытах, результаты которых представлены, например на рис. 16 и 22. Интересно, к какому именно домену белка получены антитела и насколько полно эти антитела детектируют различные изоформы CD45.

5) При исходном выборе направляющих гидовых РНК были выбраны 3 различных варианта. Согласно представленным результатам сработал, и весьма эффективно, только один из 3-х вариантов. Есть ли у диссертанта соображения, почему это так? На рис. 16,В представлены данные секвенирования в области геномного редактирования, однако, нет дискуссии, какого рода изменения произошли: терминация рамки, изменение кодирующей последовательности? Интересно, на основании чего выбрали 183 других сайта для проверки (предполагаю, что по гомологии с последовательностью гидовой gRNA2)?

6) Подписи к некоторым рисункам, на мой взгляд, не достаточно подробные. Например, на рис. 17 – «Анализ Т клеток после нокаута...». Желательно указать, какого именно нокаута. Желательно, чтобы рисунки были бы более самодостаточными, и можно было бы их анализировать без дополнительного обращения к тексту...

7) Хотелось бы больше узнать о технических деталях в описываемом клиническом применении CAR T препарата, таких, как сколько именно CAR Tm клеток вводили пациентам и как именно это делали (в каком режиме), и как следили за последствиями - ?

Дискуссионный вопрос: на стр. 69 (результаты) указано, что использовали биспецифический активатор Т-клеток (BiTE) блинатумомаб (рис. 19,А), который связывает CD19 на опухолевой клетке и CD3ε на Т-лимфоцитах, активируя ТКР. На рис. 19,Б видно, что цитотоксичность Т клеток и Т клеток с нокаутом CD45 сопоставимы. Мне интересен глобальный вопрос: в чем может быть преимущество дорогой и инвазивной CAR T технологии по сравнению с использованной здесь технологией биспецифичного клеточного активатора, который можно вводить системно прямо пациенту и избежать клеточных модификаций *ex vivo*?

Заключение

Сделанные замечания касаются в основном оформительского плана, носят дискуссионный характер и ничуть не снижают самой высокой оценки данной очень интересной работы, выполненной на высоком методическом уровне. Таким образом,

диссертационная работа Волкова Дмитрия Васильевича на тему «Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной терапии гемопоэтических опухолей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология», является законченной, самостоятельно выполненной работой. По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертация Волкова Д.В. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в соответствии с 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 сам диссертант Волков Д.В. заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

д.б.н. по специальностям 1.5.3. - «Молекулярная биология»,
главный научный сотрудник, и.о. зав. лаб. молекулярных биотехнологий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук

Тиллиб Сергей Владимирович



Адрес: 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5

e-mail: tillib@genebiology.ru

телефон: 8-903-791-8997

11 ноября 2024 г.

