

ОТЗЫВ

официального оппонента
на диссертационную работу Украинской Валерии Михайловны
«Изучение влияния опухолевого микроокружения на противоопухолевую активность CAR
Т-клеток», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Представленная к защите работа Украинской В.М. посвящена исследованиям в области адаптивной иммунотерапии, наиболее бурно развивающимся направлением которой является терапия онкологических заболеваний с применением Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (*англ.* Chimeric Antigen Receptor, CAR). Эти химерные рецепторы, обладающие высокой аффинностью к опухолевому поверхностному антигену, перенаправляют Т-клетки пациента или здорового донора таким образом, что они специфически узнают и убивают клетки опухоли. Процесс создания CAR-T клеток включает в себя выделение Т-лимфоцитов, их модификацию псевдовирусными частицами, несущими CAR конструкт, и дальнейшую экспансию перед введением пациенту. Процесс стимуляции и экспансии играет ключевую роль в качестве получаемого биомедицинского клеточного продукта. В работе Украинской В.М. предложен новый способ стимуляции CAR Т-клеток, который заключается в получении микросфер, несущих мишень CAR, из обычных клеточных линий. Эта новая методология может значительно расширить возможности получения улучшенных популяций функциональных CAR Т-клеток для терапии. Использование искусственных антигенных везикул, меченных флуоресцентным белком, потенциально позволит создавать CAR любого дизайна, так как распознавание CAR Т-клетки происходит за счет взаимодействия с целевым антигеном и не зависит от структуры химерного рецептора. Процесс получения CAR Т-клеток методически сложен, что во многом затрудняет развитие данного направления в мире и в России. Вместе с тем, на пути создания новых препаратов этого класса имеются фундаментальные проблемы, которые могут повлиять на результат адаптивной иммунотерапии. Так, после введения пациенту модифицированные лимфоциты сталкиваются с агрессивным микроокружением опухоли. В работе Украинской В.М. акцентируется внимание на двух различных компонентах опухолевого микроокружения: опухолевые экзосомы и внеклеточные ловушки нейтрофилов, данные об иммуносупрессорном влиянии которых на Т-клетки имеются в научной литературе. Особенную актуальность данное направление исследования приобретает в области иммунотерапии солидных опухолей, которые известны своим агрессивным микроокружением, не предоставляющим возможности Т-клеткам и CAR Т-клеткам длительно существовать в пределах опухоли, эффективно выполняя свои цитолитические функции.

Диссертационная работа Украинской В.М. была направлена на выявление иммуносупрессорных эффектов, которое опухолевое микроокружение может оказывать на CAR Т-клетки и поиск новых подходов для их преодоления. На основании полученных

данных было подробно охарактеризовано взаимодействие опухолевых экзосом с CAR T-клетками и показано, что экзосомы могут как активировать, так и подавлять, функцию CAR T-клеток и вызывать увеличение экспрессии генов CAR T-клеток, ответственных как за активацию, так и за так называемое истощение. Особенно следует отметить новый способ получения искусственных антигенных везикул, несущих опухолевый антиген для детекции химерного антигенного рецептора на поверхности T-клеток. Убедительно показано, что эти везикулы можно с успехом применить как для идентификации и выделения CAR-положительной популяции, так и для специфичной активации CAR T-клеток, что позволяет получить CAR T-клеточный продукт с повышенной функциональной активностью *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, автором 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 в печени в экспериментальной сингенной мышинной модели.

Работа изложена на 118 страницах, содержит 35 рисунков и 4 таблицы. Она построена по классическому плану и включает в себя разделы «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Имеется также два приложения с описанием синтетических олигонуклеотидов и антител, использованных в работе.

Объем обзора литературы составляет около 30 страниц (примерно 1/3 от общего объема) и описывает историю создания технологии CAR-T, при этом ссылаясь на ключевые работы в данной области. Отдельное внимание уделено подходам к экспансии и пролиферации CAR T-клеток, в этом разделе описаны основные характеристики CAR T-клеток, которые могут влиять на эффективность дальнейшей терапии. Большую часть обзора занимает обсуждение роли экзосом в опухолевом микроокружении: их биогенеза и взаимодействия с иммунными клетками, и по сути представляет собой часть обзорной статьи Ukrainskaya et al. Acta Naturae 2019 года.

Раздел «Материалы и методы» занимает около 20 страниц, где методы структурированы на несколько методических групп. Самыми обширными группами являются работы по выделению и характеристике экзосом и искусственных везикул и различные функциональные эксперименты на T-клетках. Ряд методик, использованных автором, такие как выделение искусственных везикул или окрашивание клеток с dTomato-AV, впервые разработаны и опробованы в ходе данного исследования.

Раздел «Результаты и обсуждение» занимает около 40 страниц (более 1/3 объема), что составляет основную часть диссертации, и состоит из 3 подразделов, первый из которых посвящен исследованию влияния опухолевых экзосом, выделенных из клеток лимфом, на противоопухолевую активность CAR T-клеток. В частности, в данной работе показана двоякая роль экзосом, несущих опухолевый антиген. За счет специфичного взаимодействия с CAR T-клеткой опухолевые экзосомы могут специфично поглощаться, вызывая активацию CAR T-клеток, в то же самое время экзосомы могут подавлять цитотоксическую функцию CAR T-клеток, вызывая изменения на уровне экспрессии генов. Вторая часть,

самая объемная, в значительной степени является изложением ключевой статьи Ukrainskaya et al. Small 2021 года, которая посвящена созданию новой методики выделения искусственных везикул, несущих опухолевые антигены и способных вызывать активацию и пролиферацию CAR T-клеток. Примечательно то, что инкубация CAR T-клеток в присутствии искусственных везикул приводит к увеличению CAR-положительной популяции и повышению функциональной активности CAR T-клеток как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Наконец, третий подраздел посвящен созданию вектора, кодирующего мутантную ДНКазы I и *in vitro* и *in vivo* экспериментам по определению активности данного препарата против внеклеточных ловушек нейтрофилов.

Из вышеизложенного следует, что в диссертационной работе Украинской В.М. получены новые знания о роли опухолевых и искусственных экзосом в модуляции активности CAR T-клеток в опухолевом микроокружении, которые, несомненно, будут использованы в дальнейших исследованиях и могут иметь практическое значение в области адоптивной иммунотерапии.

Замечания и вопросы к работе:

1. Качество текста по ряду параметров вызывает неудовлетворение. Список сокращений сделан недостаточно тщательно - он содержит опечатки (AVV вместо AAV), не приведена английская расшифровка англоязычных сокращений. Часто встречается несогласование слов (то "перенос гена ДНКазой I в печень", то "перенос гена ДНКазы I в печени"), жаргонные выражения (например, "прогрессирование метастазов в печень"), неточные формулировки. На некоторых рисунках (например, рис. 13) панели обозначены русскими буквами А, Б, В, а в тексте - латинскими A, B, C. Многие заголовки начинаются со слова "изучение", без указания на суть полученных результатов, что делает их неинформативными.

2. Для анализа цитотоксической активности CAR-T инкубировали с экзосомами (EV) в течение 2 дней, с антигенными везикулами (AV) - в течение 4 дней (раздел 2.6.3). Кроме того, после инкубации с AV CAR-T промывали PBS перед тем, как добавить к клеткам-мишеням, а после инкубации с EV (а также в случае CAR-T от пациентов с ОЛЛ) о промывке ничего не сказано. С чем связаны эти различия?

3. Эксперименты по цитотоксичности описаны путано и недостаточно понятно. На рис. 16Б показаны различные соотношения CAR-T к клеткам-мишеням, но не сказано, какие клетки были мишенью. На рис. 16В показана цитотоксичность по отношению к разным клеткам-мишеням, но не указано соотношение. Вариант с измерением цитотоксичности через 10 часов после начала эксперимента не описан в разделе 2.6.3. Была ли в данном случае промывка PBS? Почему было выбрано именно 10 часов и изучались ли другие времена инкубации с AV? При короткой инкубации драматически повышена неспецифическая цитотоксичность, а специфическая - снижена, особенно против клеток Nalm-6. Хотелось бы увидеть внятные пояснения или предположения по поводу биологического смысла этих наблюдений, и в случае, если такой смысл есть - исследование кинетики при других временах инкубации. Замечание о предварительной инкубации CD19-CAR T-клеток с CD19+ экзосомами в течение 24 часов со ссылкой на рис. 16Б

дополнительно запутывает, т.к. такой интервал инкубации не указан ни в разделе 2.6.3, ни в подписи к рисунку, но зато имеется в описании анализа транскриптома (раздел 2.6.7).

4. Анализ транскриптома проводили после 24 часов инкубации, а не 10 или 48. Учитывая драматические отличия в эффектах на цитотоксичность, необходимо знать, что происходит с транскриптомом в кинетике. О чем именно говорят различия, наблюдаемые в единственной точке, понять затруднительно. Кроме того, на рис. 17 отсутствует легенда для цветов на тепловой карте.

5. При анализе AV, полученных новым методом, хотелось бы видеть еще более детальный анализ их свойств. В частности, на рис. 19 были бы уместны результаты совместной детекции исследуемых маркеров и флуоресцентного белка dTomato. На рис. 20В на диаграмме прямого и бокового рассеяния для клеток очевидны результаты применения гейта (диаграмма обрезана по вертикали, левее этой линии никаких точек нет). В такой ситуации измерение количества AV (зеленый овал, 0.5%) представляется лишенным смысла, и хотелось бы видеть полную картину.

6. Показанные на рис. 23 результаты сортировки клеток далеки от идеала: чистота отсортированных популяций составляет около 80%, средняя интенсивность флуоресценции сильно снижена. Хотелось бы видеть детали, а именно, как выглядели диаграммы рассеяния и гейты во время сортировки, и какие результаты можно получить с использованием антител, а не AV.

7. Эксперименты с AAV-DNase I поставлены в США, а В.М. Украинская присутствует в списке авторов с российской аффилиацией и далеко от первой позиции. В связи с этим, хотелось бы узнать о личном вкладе автора в эту часть работы (в статье сказано лишь, что Валерия Михайловна выполняла эксперименты). Следует отметить, что в целом ключевой личный вклад автора в работу не вызывает сомнений, однако соответствующий раздел не обнаруживается ни в диссертации, ни в автореферате.

8. Две статьи, посвященные лигандам "рецептора смерти" DR5, крайне слабо связаны с темой работы и не отражены в диссертации, за исключением параграфа в обзоре литературы, сообщающем о том, что соответствующие молекулы обнаруживаются в составе везикул. Диссертация выиграла бы от отсутствия этих двух статей в списке.

9. На стр. 66 написано, что отдельные экзосомы на рис. 9 отмечены стрелками, однако на данном рисунке стрелок нет. Без стрелок и пояснений сложно понять, на что следует смотреть на рис. 9А.

10. Непонятно, как соотносится утверждение в тексте об узком распределении размера везикул (отклонение от 100 нм - в пределах 10%), и рис. 9Б, где виден разброс от 50 до 150 нм.

11. Одним из опасных побочных явлений CAR-T терапии является чрезмерная активация иммунной системы, вплоть до развития цитокинового шторма. Не увеличит ли эту опасность продолжительная и эффективная активация CAR-T клеток? Можно ли предусмотреть способы борьбы с этим риском - например, путем экспрессии в клетках-продуцентах AV частиц каких-то дополнительных регуляторных молекул?

12. Является ли разработанный метод выделения искусственных везикул патентоспособным?

В заключение отзыва следует сказать, что перечисленные замечания не снижают в целом хорошего впечатления от работы, а вопросы заданы в порядке дискуссии и не касаются достоверности полученных результатов и обоснованности сделанных выводов.

Таким образом, диссертация Украинской Валерии Михайловны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям п.п. 9-14 “Положения о присуждении ученых степеней” (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.), а ее автор, Украинская Валерия Михайловна, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Купраш Дмитрий Владимирович

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, руководитель Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН.

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. +7 916 655 00 98, kuprash@eimb.ru

Подпись Купраша Дмитрия Владимировича
«Удостоверяю»

Ученый секретарь ИМБ РАН
к.в.н Бочаров А.А.

6 декабря 2021 г.

