



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05. E-mail: [isinfo@eimb.ru](mailto:isinfo@eimb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

**ОТЗЫВ**

Официального оппонента о диссертационной работе

**Калинина Романа Сергеевича**

на тему

**«КОМБИНАТОРНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ  
ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТОК И  
МЕТОДЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ»**

представленной к защите на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация Романа Сергеевича Калинина – комплексное исследование, посвященное созданию новых методов и комбинаторных подходов для повышения уровня эффективности и безопасности CAR-T терапии в лечении онкологических заболеваний. В работе описана платформа для отбора опухоль-специфичного CAR против В-клеточных лимфом; с помощью продукции внутриклеточного блокатора PD-1 показана возможность иммуносупрессивного действия PD-L1 на CAR-T клетки; разработана регулируемая модульная система CAR-T на основе белковой пары барназа-барстар, призванной повысить безопасность применения CAR-T терапии.

**Актуальность темы выполненной работы**

Передовые достижения в терапии онкологических заболеваний основаны на использовании моноклональных антител и адоптивной иммунотерапии. Наиболее прогрессивным направлением в иммунотерапии рака является применение CAR T-клеток. Суть этого подхода заключается в генетической модификации T-клеток пациента или здорового донора геном химерного антигенного рецептора, который распознает опухолевые антигены вне контекста главного комплекса гистосовместимости. CAR, взаимодействуя с мишенью, запускает сигнальные каскады

внутри CAR T-клеток, это приводит к их активации и цитотоксичности против клеток мишеней. Клинические испытания CAR, направленного против В-лимфоцитарного антигена CD19, показали высокую эффективность при лечении резистентных к химиотерапии опухолей В-клеточного происхождения. Однако такая терапия не лишена и серьезных побочных эффектов, связанных с неконтролируемой активацией провоспалительных цитокинов (цитокиновый шторм) и неспецифической цитотоксичностью. Примечательно, клинические испытания адоптивной иммунотерапии солидных опухолей, к сожалению, не повторили успеха CAR терапии в области гематологических опухолевых заболеваний. Основной причиной неудач принято считать иммуносупрессивное действие опухолевого микроокружения, гетерогенность солидных опухолей и сложность поиска антигенов-мишеней, которые присутствуют не только в пораженных тканях, но также широко распространены и в здоровых тканях. Развитие технологии и усовершенствование методов получения и применения генно-инженерных Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR), является одним из самых перспективных направлений персонализированной медицины, основные задачи которого сосредоточены на разработке новых адресных, высокоэффективных и безопасных методов терапии онкологических заболеваниями с минимальными побочными эффектами.

### **Основные научные результаты, полученные автором в работе**

С применением принципов комбинаторной химии и биологии создана технология получения персонифицированных химерных антигенных рецепторов для борьбы с лимфомами. Показано, что полученные высокоспецифичные CAR-T элиминируют опухолевые клетки с эффективностью, сравнимой с CAR, нацеленными на CD19, а время получения персонализированной популяции CAR-T для терапии сопоставимо с классическим подходом. На основе однодоменных V<sub>H</sub>H антител созданы мембранный и внутриклеточный блокаторы PD-1, и экспериментально продемонстрировано значение баланса положительных и отрицательных сигналов для поддержания функциональной активности CAR T-клеток. Разработана универсальная модульная система на основе высокоаффинного взаимодействия рибонуклеазы барназы с ее ингибитором барстаром, позволяющая контролировать активность CAR T-клеток в зависимости от концентрации молекулы-посредника дарпин-барназы.

### **Новизна исследования и полученных результатов**

В этом комплексном исследовании разработан метод аутокринной селекции направляющего пептида из пептидной библиотеки для CAR против В-клеточной лимфомы. Экспериментально продемонстрировано, что такие CAR-T клетки способны эффективно

элиминировать опухолевые клетки как *ex vivo*, так и *in vivo* сравнимо с CAR-T клетками, специфичными к CD19. Впервые показано, что однодоменное VHH мини-антитело, специфичное к PD-1, может быть использовано для эффективного блокирования экспрессии PD-1. Результаты полученные в этой части исследования, наглядно демонстрируют необходимость соблюдения баланса положительных и отрицательных сигналов для правильной активации CAR T-клеток. Создана и экспериментально валидирована уникальная система регуляции активности CAR T-клеток на основе взаимодействия барназы с барстаром. Научная новизна и научно-практическая значимость работы не вызывают сомнений.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

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

### **Достоверность научных положений, выводов, рекомендаций**

Достоверность научных положений, выносимых на защиту, сформулированных выводов и предложенных рекомендаций, отражающих полученные в ходе выполнения диссертационной работы научные достижения, не вызывает сомнений. В работе были использованы адекватные научно обоснованные экспериментальные подходы, а также методы статистической обработки результатов.

### **Структура и объем работы**

Диссертация Калинина Романа Сергеевича изложена на 140 страницах текста и представляет собой рукопись, построенную и оформленную по схеме, принятой для данной формы представления диссертации. Она включает следующие основные разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Перечень сокращений», «Список литературы» (содержит 255 источников) и «Благодарности». Литературный обзор подробно описывает структурно-функциональные особенности химерных антигенных рецепторов, основных методологических подходов, связанных с их получением, а также проблемы CAR-T терапии и возможные способы их решения. Основная содержательная часть с результатами исследования и их обсуждением разделена на три части, каждая из которых посвящена разным этапам работы. Подробно описаны методы и экспериментальные подходы, приведены ссылки на ранее опубликованные протоколы, а также представлен сравнительный анализ основных результатов по теме диссертационного исследования с другими

опубликованными исследованиями. Рукопись иллюстрирует 40 рисунков и 6 таблиц. В разделе «Заключение» подводятся итоги выполненного исследования и описаны рекомендации и перспективы, касающиеся дальнейшей разработки темы. Раздел «Выводы» суммирует главные достижения, которые отражают основные результаты диссертационной работы и логически соотносятся с положениями, выносимыми на защиту, а также целью и задачами исследования (раздел «Введение»).

### Оценка содержания диссертационной работы

Содержание диссертационной работы Калинина Р.С., представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, отражает основные результаты, преимущественно уже опубликованные по теме исследований в российских и международных изданиях. В целом, полученные результаты приведены в соответствии с логикой заявленных цели и задач диссертационной работы. Однако есть ряд замечаний, возникших в ходе в ходе прочтения работы:

1. В разделе литературного обзора, посвященного проблемам CAR-T терапии, обсуждаются сложности лечения солидных опухолей. Однако все рассуждения об опухолевом микроокружении и его супрессорной активности сводятся к иммунологическим контрольным точкам и лиганд-рецепторным взаимодействиям между опухолевыми и CAR-T клетками без упоминания опухоль-ассоциированных макрофагов, фибробластов и секреторного компонента (SASP). Кроме того, одним из нежелательных побочных эффектов, связанных с CAR-T терапией, упоминается «цитокиновый шторм», но не обсуждается существующая практика или перспектива применения анти-цитокиновой терапии для контроля чрезмерной продукции цитокинов (каких?) при с CAR-T терапии.
2. В работе несколько раз приводится тезис, что разработанная аутокринная система отбора пептидов в клинической практике будет по времени сопоставима с классической CAR-T терапией, однако автор не приводит временных ориентиров. Сколько времени гипотетически занимает получение CAR-T клеток с момента взятия биопсии у пациента? В случае аутокринной селекции на Рис. 12 (Рис. 1 автореферата), тест на самоактивацию проводится в формате единичных клеток? В противном случае, где гарантия того, что собранный B-клеточный рецептор на одной клетке не провзаимодействует с циклопептидом в составе CAR на соседней клетке?
3. Рис. 17 (Рис. 4 автореферата) CAR-T клетки вводили через 17 дней после введения опухолевых клеток. При этом размер опухоли в этой временной точке составлял до 50 мм<sup>3</sup> (то есть, фактически опухоли были очень маленькими), а выживаемость мышей

после CAR-T составляла всего 20%. Сколько мышей было в каждой группе? Что будет если ввести клетки раньше, когда видимой опухоли еще нет? Удастся ли повысить эффективность? А если CAR-T вводить несколько раз? Почему была выбрана именно эта временная точка для введения CAR-T?

4. Поскольку дарпин-барназы были экспрессированы в бактериальной системе, то как контролировалось наличие эндотоксина? В противном случае, схема введения дарпин-барназ (6-кратное введение в течение месяца) с возможными примесями эндотоксина (в качестве адъюванта) соответствует классической схеме иммунизации. Нет ли такого, что часть эффекта может быть связана с иммуногенностью дарпин-барназ и образованием антител?
5. И последнее, NSG мыши позволяют использовать их не только в качестве реципиентов опухолевых клеток человека, но и клеток костного мозга, то есть ксенотрансплантация опухоли может происходить на фоне интактной гуманизированной иммунной системы (что позволяет оценить вклад опухолевого окружения и инфильтрирующих опухоль иммунных клеток). Не очень понятно из описания, как было сделано в данной работе?

Несколько минорных замечаний:

- на большинстве рисунков с изображениями микроскопии отсутствует масштабная линейка и не указано увеличение. В частности, не понятно есть ли различия в увеличении между левой и правой панелью на Рис. 14 (Рис. 2 автореферата), верхней и нижней панелью на Рис. 16.

- русскоязычные публикации в списке литературы, а также в списке публикаций автора и приведены на английском языке

### **Заключение**

Диссертационная работа Калинина Романа Сергеевича «комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, является самостоятельным и законченным научным исследованием, которое вносит существенный вклад в развитие новых методов и комбинаторных подходов для повышения уровня эффективности и безопасности CAR-T терапии в лечении онкологических заболеваний. Основные результаты диссертационной работы отражены в печати в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых изданиях, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus (средний импакт-фактор  $IF=8.59$ ), в том числе в таких высокоимпактных журналах как Science Advances и PNAS,



Сделанные замечания не ставят под сомнение научную ценность проведенного исследования. Выводы сформулированы корректно и имеют биологическую значимость. По актуальности темы, научному и методическому уровню, качеству полученных результатов, объему проделанной работы, научной новизне и практической значимости диссертация Калинина Романа Сергеевича полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), 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; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Согласна на включение моих персональных данных в аттестационное дело, размещение в интернете и их дальнейшую обработку.

**Официальный оппонент:**

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

ДРУЦКАЯ Марина Сергеевна

Адрес места работы: 119991, Российская Федерация, Москва, г. Москва, ул. Вавилова, дом 32. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук. Тел.: +79166775130; e-mail: marinadru@gmail.com

«Подпись Друзцкой М.С. заверяю»  
Ученый секретарь  
ИМП РАН, к.в.п.

06.02.2023



Бочаров А. А.