

ФМБА РОССИИ

Федеральное  
государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный научно-клинический центр  
физико-химической медицины  
имени академика Ю.М. Лопухина  
Федерального медико-биологического  
агентства»  
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина  
ФМБА России)

119435, Москва, ул Малая Пироговская, д.1А  
Тел. (499) 246-77-21 Факс (499) 246-44-09  
<http://www.rcpcm.org>, e-mail: [niihfm@fmbamail.ru](mailto:niihfm@fmbamail.ru)

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель генерального  
директора  
по научной работе  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
«Федеральный научно-клинический  
центр физико-химической медицины  
имени академика Ю.М. Лопухина  
Федерального медико-биологического  
агентства»  
д.б.н. В.Н. Лазарев



«14» января 2023 г.

24.01.2023 № 95

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»  
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России)

на диссертационную работу **Калинина Романа Сергеевича**  
«КОМБИНАТОРНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ  
ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТОК И МЕТОДЫ  
РЕГУЛИРОВАНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

#### Актуальность диссертационной работы

Во всем мире в течение последних десятилетий отмечается стабильный рост количества онкологических заболеваний, которые нередко являются причиной смерти и тяжелой инвалидности. В России каждый год примерно у полумиллиона человек диагностируется онкология. В Российской Федерации в настоящее время насчитывается порядка 3,6 – 3,7 млн. человек с онкологическими заболеваниями (2,5% населения), а ежегодный прирост числа онкологических больных составляет 1 – 2% в год. Число умерших от злокачественных новообразований – более 280 тыс. человек в год. Имеющиеся на сегодняшний день классические методы лечения – химиотерапия, лучевая терапия, оперативное лечение, отнюдь не всегда способствуют полной регрессии заболевания. По этой причине, сегодня для мирового научного сообщества жизненно важной становится задача создания новых и усовершенствование существующих методов лечения

онкологических заболеваний, выявление молекулярных механизмов, участвующих в долгосрочной ремиссии онкопатологии.

Представленная к защите диссертационная работа Калинина Р.С. посвящена исследованиям в области разработки новых адресных, высокоэффективных и безопасных методов терапии онкологических заболеваний, развитию технологии применения генно-инженерных Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR), что на сегодняшний день является одним из актуальных направлений персонализированной медицины. Преимущество использования данного подхода состоит в том, что CAR-T клетки, обладающие высокой аффинностью к опухолевому поверхностному антигену, перенаправляют Т-клетки пациента или здорового донора таким образом, что они специфически узнают и уничтожают клетки опухоли, формируя клетки памяти. Это в дальнейшем позволяет бороться с рецидивами заболевания.

CAR-T терапия в настоящее время применяется для лечения диффузных В-клеточных опухолевых заболеваний человека. Однако, она часто сопряжена с побочными эффектами (синдром высвобождения провоспалительных цитокинов и внеопухолевая цитотоксичность CAR-T клеток). В диссертационной работе Калинина Р.С. рассматриваются способы устранения побочных эффектов CAR-T терапии, а также применение CAR-T терапии при лечении солидных опухолей.

### **Научная новизна исследования**

Для нивелирования негативных последствий, наблюдающихся при CAR-T терапии: неспецифическая цитотоксичность, низкий результат при лечении солидных опухолей и неэффективность терапии при снижении уровня таргетной опухолевой молекулы в данной работе Калинина Р.С. были предложены оригинальные подходы с использованием новейших достижений современной молекулярной биологии:

- разработана технология получения персонифицированных химерных антигенных рецепторов для борьбы с В-клеточными лимфомами;

- изучено влияние блокатора экспрессии PD-1 у CAR-T клеток на основе наноантитела 102с3 анти PD-1.

- 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 *in vitro* и *in vivo*. Предложенная система имеет высокий потенциал в области технологии «переключения» активности CAR-T клеток для трансляционной медицины.

### **Значимость для науки и практики**

Диссертационная работа Калинина Р.С., несомненно, имеет высокую фундаментальную и практическую значимость.

В фундаментальном аспекте исследование автора позволило установить важное значение роли PD-1/PD-1L взаимодействия в жизненном цикле активированного лимфоцита, которое опростетчиво не учитывается многими учеными. В ходе проведенных исследований диссертант установил возможность регулирования силы иммунного ответа, варьируя концентрацию вводимой в организм растворимой части химерного антигенного рецептора. Также им была продемонстрирована возможность изменения специфичности созданных CAR-T клеток при изменении растворимой части модульного рецептора. Таким образом появляется возможность оперативно подстроить уже введенные клетки под другой или изменившийся антиген, а также управлять активностью CAR-T клеток. Данные эксперименты открывают новые горизонты для создания универсальной безопасной CAR-T терапии.

Несомненна и практическая значимость диссертационной работы – удалось создать персонализированные CAR против клеток В-клеточной лимфомы с помощью платформы аутокринного отбора и доказать их эффективность и специфичность, сопоставимую с анти-CD19 CAR. Это в перспективе позволит скорректировать тактику лечения и значимо повысить эффективность проводимой противоопухолевой терапии, особенно в случаях, когда опухолевые клетки теряют CD19 или происходит их ускользание от иммунной терапии при мутациях CD19.

### **Структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна**

Диссертационная работа имеет классическую структуру и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследований и их обсуждение», «Выводы», «Перечень сокращений и обозначений» и «Список литературы». Диссертационная работа изложена на 140 страницах, иллюстрирована 6 таблицами и 40 рисунками. Список литературы включает 255 источников.

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 основные пункты диссертационной работы, выносимые на защиту. Положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и соответствуют поставленным целям работы. Достоверность результатов подтверждается публикациями в ведущих международных изданиях и докладами на международных конференциях.

Обзор литературы четко структурирован, написан понятным языком, широко охватывает материал (использовано большое количество источников, проанализирован колоссальный массив информации по теме диссертационной работы) и содержит все необходимые данные для понимания диссертационной работы. В обзоре подробно объяснена

структура химерного рецептора CAR, указаны все проблемные точки при дизайне данного рецептора, описано проведение сигнала через химерный рецептор, важное место отведено CAR-T терапии. 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 исследований и их обсуждение» состоит из 3-х больших частей. В первой части автором разрабатывается система для быстрого получения специфического CAR на В-клеточный рецептор опухолевой клетки. Эта система аутокринного отбора в дальнейшем может быть использована и в других исследованиях, выходящих за рамки данной диссертации. В этой работе удалось получить персонализированные CAR для В-клеточных лимфом из материала биопсии трех пациентов. Хочется отдельно отметить, что исследование не ограничено цитотоксическими экспериментами на клеточных культурах, а проведено полноценное исследование, которое может служить основой для защиты отдельной диссертационной работы. Были проведены эксперименты *in vitro* с клеточной линией Raji, которые несли на своей поверхности реконструированные В-клеточные рецепторы из клеток лимфом. Проведены опыты *in vivo* на мышинных моделях, а также выполнены опыты на первичных клетках из материала биопсии, что показывает очень серьезный и методичный подход Калинина Р.С. к своему диссертационному исследованию.

Во второй части автор решил отдать должное научной моде и выяснить роль анти-PD1 терапии в CAR-T исследованиях. Им было создано несколько конструкций, позволяющих CAR-T клеткам преодолеть защитный механизм, используемый многими солидными опухолями – высокую экспрессию PD-1L, вызывающую апоптоз или анергию инфильтрирующих противоопухолевых лимфоцитов. В исследовании удалось получить CAR-T лимфоциты, не реагирующие на PD-1L, и показать их более высокую эффективность на коротких сроках наблюдения. Однако, оказалось, что в дальнейшем такие клетки теряют свою эффективность. Нужно отдать должное диссертанту, который не остановился на достигнутом, и показал механизмы, вызывающие такой эффект. В данной части работы автор показал себя вдумчивым исследователем, который может сделать важные выводы из эксперимента, складывающегося вопреки предложенной гипотезе. Так, Калининым Р.С. была установлена важная роль PD-1/PD-1L

взаимодействия в жизненном цикле активированного лимфоцита, которая игнорируется подавляющим большинством исследователей.

В третьей части исследований был применен интересный подход, который может стать этапом для создания универсальной CAR-T терапии. Был создан сборный рецептор, состоящий из двух частей. Первая часть закреплена в клетке и выполняет работу по ее активации только тогда, когда к ней прикрепляется вторая часть, отвечающая за специфичность всей конструкции. То есть одна и та же CAR-T клетка способна активироваться в ответ на практически любой антиген, специфичность к которому доставляется в виде растворимой распознающей части рецептора, вводимой отдельно. Этим решаются проблемы контроля цитотоксичности CAR-T клеток, а также появляется возможность оперативно подстроить уже введенные клетки под другой или изменившийся антиген. В ходе своих исследований автор демонстрирует, что может поменять специфичность созданных CAR-T клеток, меняя растворимую часть сборного рецептора, а также возможность регулировать силу иммунного ответа, варьируя концентрацию вводимой растворимой части рецептора. Также интересно выглядят приведенные опыты по неспецифичной токсичности и специфичности созданных клеток. В целом, данная глава производит благоприятное впечатление и в ней есть большой задел для дальнейших исследований.

Раздел «Выводы» резюмирует полученные результаты и сделанные на их основе выводы, которые полностью соответствуют поставленным в работе целям и задачам.

Из вышеизложенного следует, что диссертантом проделан большой объем работы, выполненной на высоком научном уровне, получены новые знания, которые, несомненно, имеют практическое значение в области адоптивной иммунотерапии и будут использованы в дальнейших исследованиях. Результаты работы изложены подробно и читаются с большим интересом.

### **Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации**

Диссертационная работа выполнена с использованием достаточного количества экспериментального материала и широкого комплекса методов и подходов. Полученные экспериментальные данные были подвергнуты корректному статистическому анализу. На основании полученных данных диссертантом сделаны обоснованные выводы. Проведенные исследования выполнены на мировом уровне, достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений.

### **Освещение диссертации в научной печати**

Основные результаты диссертационного исследования изложены в 4-х статьях, опубликованных в международных научных журналах, таких как Proceedings of the National Academy of Sciences, Science Advances, Acta

Naturae, *Frontiers in Molecular Biosciences*, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций. 9 тезисов были доложены и опубликованы в материалах международных и российских конференций.

Информация, представленная в автореферате, полностью отражает содержание теоретических и практических положений диссертации, выводы идентичны.

### **Замечания и вопросы к содержанию диссертационной работы**

Замечаний к диссертационной работе немного. В тексте встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки и неудачные выражения, которые не относятся к научной сути работы.

Сделанные замечания никак не снижают ценность данной работы и значимость полученных в ней результатов.

### **Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным требованиям**

Принимая во внимание актуальность выполненной работы, ее научную новизну, обоснованность выводов, а также их существенную фундаментальную и практическую значимость, можно заключить, что диссертационная работа Калинина Романа Сергеевича «Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология является завершенной научно-квалификационной работой.

На основании выполненных автором исследований в ней решены задачи, которые важны для развития молекулярной биологии и вносят значительный вклад в решение актуальных проблем в области иммунотерапии рака:

- разработан метод аутокринной селекции направляющего пептида из пептидной библиотеки для CAR против В-клеточной лимфомы;

- впервые показано, что однодоменное антитело верблюжьих 102с3, специфичное к PD-1, может быть использовано для эффективного блокирования экспрессии PD-1. Данный подход позволяет изменять паттерн мембранных белков, не прибегая к геномному редактированию клеток;

- в экспериментах *in vitro* было установлено, что блокировка негативной передачи сигнала приводит к переактивации CAR-T-клеток и дальнейшему ухудшению выживаемости. Что указывает на важность соблюдения баланса положительных и отрицательных сигналов на адекватную активацию CAR-T-клеток;

- была создана уникальная система регуляции активности CAR-T-клеток на основе взаимодействия барназы с барстаром. Было показано, что система регулируется *in vitro* и функционально активна *in vivo*. Применение

такой системы может повысить безопасность CAR-T, а также сделать их универсальными.

Диссертация Калинина Р.С. «Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности», 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 № 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, от 26.09.2022 №1690, а сам диссертант - Калинин Роман Сергеевич, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории клеточной биологии (протокол № 1 от 18 января 2023 г.)

Доктор биологических наук, профессор РАН,

член-корреспондент РАН

Генеральный директор

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Лагарькова Мария Андреевна

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Еремеев Артем Валерьевич

Адрес: Россия, Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства». Сайт: <http://rcpcm.org/>

тел.: +7 (499) 246-7721; +7916220785; e-mail: lagar@vigg.ru

Подпись Лагарьковой М.А. и Еремеева А.В. заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,  
к.б.н. О.П. Лихнова

«20» января 2023 г.

