

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Яшина Дениса Владимировича на диссертационную работу Калинина Романа Сергеевича “КОМБИНАТОРНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТОК И МЕТОДЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ”, представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Актуальность темы исследования.

Диссертация Романа Сергеевича посвящена борьбе с опухолевыми заболеваниями. Смертность от опухолей уступает только сердечно-сосудистым заболеваниям, и поэтому актуальность данной работы не подлежит сомнению. Для решения задачи борьбы с опухолями автор избрал один из самых современных и перспективных подходов – CAR T клетки. Данные клетки способны размножаться в организме, становиться клетками памяти и в дальнейшем бороться с рецидивами заболевания. Это делает их очень перспективными средствами противораковой терапии. В данной работе автор предпринял ряд шагов для снижения негативных эффектов, наблюдающихся при CAR-T терапии: неспецифический цитотоксический эффект, сниженный эффект при терапии солидных опухолей и неэффективность терапии при снижении уровня таргетной опухолевой молекулы. Для решения этих задач автором были предложены оригинальные подходы с использованием новейших достижений современной молекулярной биологии, что также подтверждает высокую актуальность данного исследования.

Структура диссертации.

Диссертационная работа имеет классическую структуру и состоит из разделов “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы исследования”, “Результаты и обсуждение”, “Выводы”, “Список сокращений” и “Список литературы”. Диссертационная работа изложена на 140 страницах,

иллюстрирована 6 таблицами и 40 рисунками. Список литературы включает 255 источников.

Раздел Введение кратко аргументирует актуальность проблемы, описывает основные цели и задачи работы, ее научную новизну и практическую значимость, упоминает основные методы исследования и суммирует выносимые на защиту положения работы. 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 написан очень хорошо. Он четко структурирован, написан понятным языком и содержит все необходимые данные для понимания диссертационной работы. В обзоре подробно объяснена структура химерного рецептора CAR, упомянуты все проблемные точки при дизайне данного рецептора, описано проведение сигнала через химерный рецептор, и важное место уделено CAR T терапии. Обзор написан подробно, ссылается на большое количество источников, и в целом дает понять, что диссертант хорошо разбирается в тематике исследований.

Глава Материалы и методы исследования содержит краткие методики всех экспериментов, проведенных в работе. Этот раздел позволяет понять схему проведения всех экспериментов и воспроизвести их. В данной работе использовались современные методы молекулярной биологии, и в целом она выполнена на очень высоком экспериментальном уровне.

Раздел Результаты и обсуждение состоит из 3 больших глав. В первой главе автором разрабатывается система для быстрого получения специфического рецептора на новый антиген. Эта система может быть использована и за рамками данной диссертации. Однако, в рамках данной работы, автору удалось получить несколько новых рецепторов для В-клеточной лимфомы, полученной из материала биопсии трех пациентов. Показаны преимущества такого подхода: более сильный эффект по сравнению с анти-CD19 CAR и лучшая специфичность. Хочется отдельно отметить, что автор не ограничился цитотоксическими исследованиями на клеточных культурах, а провел полноценное исследование, само по себе достойное защиты как отдельная работа. Было проведено исследование на различных тестовых системах с трансфицированными опухолевыми клетками, проведены опыты *in vivo* на мышинных моделях и даже проведены опыты на клетках из материала биопсии, что показывает очень серьезный и методичный подход автора к своему исследованию.

Во второй главе автор решил отдать должное научной моде и выяснить роль анти-PD1 терапии в CAR T исследованиях. Автором было создано несколько конструкций, позволяющих CAR T клеткам преодолеть защитный механизм, используемый многими солидными опухолями – высокую экспрессию PD-1L, вызывающую смерть или анергию инфильтрирующих противоопухолевых лимфоцитов. Автору 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 автору, 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 складывающегося не по предложенной гипотезе эксперимента. Так автором была установлена важная роль PD-1/PD-1L взаимодействия в жизненном цикле активированного лимфоцита, которая напрочь игнорируется почти всеми современными исследователями.

В третьей части работы автором был применен интересный подход, который может стать этапным для создания универсальной CAR T терапии. Он создал сборный рецептор, состоящий из двух частей. Одна часть закреплена в клетке и выполняет свою работу по активации клетки только тогда, когда к ней прикрепляется вторая часть, которая вводится отдельно и отвечает 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 неспецифической 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 в организм 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.

Результаты работы изложены подробно и читаются с большим интересом.

Выводы, сделанные автором в данной работе, абсолютно достоверны, подкреплены экспериментальным материалом и соответствуют поставленным задачам.

Замечания к диссертационной работе.

Замечаний к работе немного. В тексте встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки и неудачные выражения, но их очень немного и работа хорошо вычитана.

В работе недостаточно обсужден рисунок 19В. Исходя из представленных на нем данных получается, что 80% мышей почти не реагирует на терапию, в то время как оставшиеся 20% реагируют весьма сильно.

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

Данная диссертация обладает высокой научной новизной и является значимой для развития CAR T терапии.

Текст автореферата полно отражает содержание диссертации. Основные результаты диссертации отражены в 4 печатных работах в высокорейтинговых изданиях.

Заключение.

Таким образом, диссертационная работа Калинина Романа Сергеевича “Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности” является законченной научно-квалификационной работой. Диссертация Калинина Романа Сергеевича полностью соответствует требованиям Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. 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 ее автор,

Калинин Роман Сергеевич заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Яшин Денис Владимирович



Старший научный сотрудник

лаборатории Молекулярной иммуногенетики рака

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Доктор биологических наук

Шифр специальности 03.01.03 – “молекулярная биология”

Адрес: г. Москва, ул Вавилова 34/5

Тел. 8-916-957-0938

Адрес электронной почты: yashin_co@mail.ru

26. 12. 2022г.

Подпись д.б.н. Яшина Д.В. ЗАВЕРЯЮ:

Ученый секретарь ИБГ РАН

Д.б.н. Набирочкина Е.Н.

