



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)**

Бавилова 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: [jsinfo@eimb.ru](mailto:jsinfo@eimb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

**ОТЗЫВ**

Официального оппонента о диссертационной работе

**Беловежец Татьяны Николаевны**

НА ТЕМУ

**«ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ CAR T- И CAR NK-КЛЕТОК В ДОКЛИНИЧЕСКИХ  
МОДЕЛЯХ В-КЛЕТОЧНЫХ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА»**

представленной к защите на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертационная работа Беловежец Т. Н. - комплексное исследование, посвященное одной из наиболее динамично развивающихся областей современной молекулярной биологии и трансляционной медицины – клеточной иммунотерапии с использованием химерных антигенных рецепторов (CAR). Несмотря на впечатляющие успехи CAR T-клеточной терапии при В-клеточных злокачественных новообразованиях, остаются нерешенными ключевые проблемы: развитие резистентности за счет потери целевого антигена (например, CD19), ограниченная персистенция CAR T-клеток, высокая стоимость аутологичных продуктов и риск тяжелых токсических реакций.

Автором обоснованно выбраны два стратегических направления: (1) разработка и сравнительный анализ CAR против альтернативной мишени CD20 на основе трех различных scFv-доменов (включая полностью человеческий 2F2), а также бивалентные CAR, распознающие одновременно CD19 и CD20 и (2) исследование потенциала аллогенных NK-клеточных линий (NK-92, YT, KHYG-1) в качестве «off-the-shelf» носителей для CAR. Такой подход имеет высокую актуальность, поскольку направлен на преодоление антиген-зависимого ускользания опухоли и

создание более доступных, стандартизируемых клеточных продуктов. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных подходов – от молекулярного конструирования до прижизненной биолюминесцентной визуализации *in vivo*.

### **Актуальность темы выполненной работы**

Передовые достижения в терапии онкологических заболеваний основаны на использовании моноклональных антител и adoptивной 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, что приводит к их активации и цитотоксичности против клеток мишеней. Клинические испытания CAR, направленного против B-лимфоцитарных антигенов CD19 и CD20, показали высокую эффективность при лечении резистентных к химиотерапии опухолей B-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 adoptивной 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 T-клеток и NK-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**

Показано, что полученные CD20-специфичные CAR-T проявляют цитотоксичность в отношении B-клеточных мишеней *in vitro* и элиминируют опухолевые клетки *in vivo* с эффективностью, сравнимой с CAR, нацеленными на CD19. Создана и экспериментально валидирована биолюминесцентная система на основе комбинации NanoLuc и h-целентразина.

Получена линейка бифункциональных и дуальных CAR против CD19/CD20, причем впервые показано, что конструкция dualCAR (два независимых CAR, разделенные P2A) существенно превосходит по функциональности тандемные биспецифические варианты (biCAR/revbiCAR) в условиях длительной стимуляции антигеном. Показано, что полученная в ходе диссертационного исследования CAR-KHYG-1 NK-клеточная линия, специфичная к CD20, обладает выраженным противоопухолевым контролем над опухолью и увеличивает продолжительность жизни мышей в модели с ксенотрансплантацией.

### Новизна исследования и полученных результатов

В этом комплексном исследовании впервые были созданы и функционально охарактеризованы в идентичном контексте CAR на основе последовательностей одноцепочечных антител переменных фрагментов моноклональных антител, специфичных к маркерам В-клеточных неоплазий. Показано, что CAR на основе антитела 2F2 человека не уступает мышинным аналогам по цитотоксичности *in vitro* и *in vivo*, что важно при рассмотрении возможной иммуногенности CAR Т-клеточных продуктов. Впервые в России получены биспецифичные и дуальные варианты CAR различной структуры, продемонстрировавшие эффективность и функциональную активность на уровне, не уступающим современным мировым стандартам. Экспериментально обосновано использование фермент-субстратной пары NanoLuc и h-целентразина для проведения прижизненной детекции биораспределения опухолевых клеток и оценки динамики опухолевой нагрузки в доклинических моделях. Впервые проведено сравнение трех NK-клеточных линий (NK-92, YT, KHYG-1) как носителей CAR и показано, что линия KHYG-1 обеспечивает наиболее выраженное увеличение выживаемости мышей с ксенотрансплантированной лимфомой Беркитта. Этот результат предвещает возможность создания новых аллогенных CAR-NK продуктов. Исследованы активационно-индуцируемые промоторы (включая регуляторные элементы гена CD69) для разработки «усиленных» CAR-клеток с контролируемой экспрессией терапевтических трансгенов.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы не вызывают сомнений. Разработанные и функционально охарактеризованные CAR-конструкции и методологические подходы могут быть использованы для доклинических и клинических испытаний (в частности, CAR на основе 2F2). Созданная линия Nalm6-Nluc-copGFP и протокол биоломинесцентной визуализации являются готовым инструментом для оценки противоопухолевой активности в лабораторных условиях. Работа имеет явный трансляционный потенциал.

## **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 и апробацией работы на многочисленных симпозиумах и конференциях.

## **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. Результаты опубликованы в 5 статьях в рецензируемых журналах (в т.ч. International Journal of Molecular Sciences, BMC Medical Genomics, Российский журнал персонализированной медицины), апробированы в докладах на российских и международных конференциях. Принципиальных расхождений с литературными данными нет.

## **Структура и объем работы**

Диссертация Беловежец Татьяны Николаевны изложена на 134 страницах текста и представляет собой рукопись, построенную и оформленную по схеме, принятой для данной формы представления диссертации. Она включает следующие основные разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методика экспериментов», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список литературы» (впечатляет и содержит 507 источников). Литературный обзор написан логично и подробно охватывает все ключевые аспекты: биологию и классификацию В-клеточных онкогематологий, структурно-функциональные особенности химерных антигенных рецепторов, основных методологических подходов, связанных с их получением. В обзоре литературы рассмотрены проблемы тонического сигналинга, субпопуляционный состав CAR Т-клеточных продуктов, НК-клетки и НК-клеточные линии как альтернативные носители CAR, а также современные подходы к улучшению CAR. Автор демонстрирует глубокое понимание проблемы, критически анализирует данные клинических испытаний. Материалы и методы представлены полно и воспроизводимо. Использован широкий спектр методов: лентивирусная трансдукция, проточная цитофлуориметрия, тесты на моментальную и повторяющуюся цитотоксичность, ИФА, модели ксенотрансплантации на

иммунодефицитных мышцах линий NSG и NOD/Scid, система прижизненной визуализации IVIS Spectrum. Отдельно стоит отметить корректную статистическую обработку.

Рукопись проиллюстрирована 29 рисунками и содержит 7 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 Беловежец Т. Н., 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) Выбранные анти-CD20 клоны 2F2, 1F5, Leu16 являются известными и широко применяемыми клонами антител, но в работе о них практически не приведено никакой информации – ни данных из литературы, ни собственного анализа. Было бы интересно узнать могут ли полученные результаты быть опосредованы разницей в аффинности этих антител к антигену или в кинетике связывания антигена с антителом (эти параметры отличаются у данных клонов), или связыванием с разными эпитопами CD20? Могут ли scFv на основе этих разных моноклональных антител опосредовать тонический сигналинг по-разному или они вообще не влияют на развитие тонического сигналинга?

2) Из обзора литературы следует, что оба опухолевых антигена – CD19 и CD20 - способны ускользать от CAR-T терапии, а из раздела результаты следует, что анти-CD19 CAR и выбранный анти-CD20 CAR имеют сходную эффективность. Почему тогда для создания CAR-NK были выбраны анти-CD20 конструкции, если известно, что CD19 имеет большее терапевтическое окно, присутствуя на большем количестве В-клеточных стадий и покрывая большее количество нозологий?

3) В обзоре литературы и в результатах автор диссертационного исследования настаивает на перспективности клона 2F2 в связи с тем, что он является человеческим и, как следствие, ведет к сниженной иммуногенности, но в *in vivo* экспериментах показана его сниженная эффективность по сравнению с клонами мышшиного антитела Leu16 и 1F5 (Рис 18Б).

Более того, далее для создания CAR-NK автор использует конструкцию, содержащую Leu16. Ввиду этого возникает вопрос, стоит ли все-таки использовать человеческий менее иммуногенный клон 2F2 вопреки его сниженной эффективности?

4) Рисунок 17 демонстрирует, что анти-CD20 CAR варианты продуцируют значительно повышенные уровни продукции IFN $\gamma$  и IL-2 и затем автор справедливо отмечает, что это может быть предпосылкой для повышенного развития AICD и CRS, но оценить эти риски *in vitro* не представляется возможным и лучше это оценивать на мышинных моделях. Затем при переходе к мышинным моделям (рис. 18) оценивается только смертность мышей, но никак не развитие побочных эффектов от CAR-T. Предположительно, оценить синдром выброса цитокинов на NSG мышах проблематично, но вопрос о том, будет ли анти-CD20 CAR опосредовать повышенные побочные эффекты остается нерешенным. Кроме того, не ясно, почему в этом исследовании не проводили прижизненную визуализацию роста опухоли на фоне терапии.

5) Иммунофенотипирование CAR-T-клеток проводили на восьмой день рестимуляции *in vitro* и разницы между анти-CD20 вариантами не наблюдали ни по иммунофенотипическому профилю, ни по уровню истощения, возможно более длительная рестимуляция дала бы больше информации о различии фенотипов. Такой же анализ можно было провести при *in vivo* исследовании: собирать образцы крови и проводить иммунофенотипирование. Вероятно, такой анализ дал бы больше информации о разнице анти-CD20 вариантов и возможно он мог бы объяснить высокую смертность мышей получавших 2F2-CAR-T? Такой же анализ мог бы быть интересен и для дуальных вариантов.

7) На рисунке 21 показана прижизненная визуализация ксенотрансплантированных клеток линии NALM6 при терапии мышей CAR-T. На рисунке 21Б видно, что ко дню 12 опухоль значительно нарастает по сравнению с днем 5, но ко дню 19 опухоль практически исчезает в обеих группах, а затем снова нарастает ко дню 26. Это же подтверждается рисунком 21В. С чем может быть связано такое явление? Почему опухоль растет в день 26 по сравнению с днем 19 даже в группе с целевыми CAR-T?

8) Известно, что облученные линии CAR-NK обладают недолгой персистенцией *in vivo*, что ведет к необходимости повторного дозирования. Интересно узнать, обладают ли выбранные для анализа NK-клеточные линии YT, NK-92 и KHYG-1 разной персистенцией *in vivo*? И может ли увеличение длительности персистенции, если таковая показана для какой-то из линий, опосредовать повышенную эффективность одной дозы CAR-NK и, как следствие, уменьшение повторных введений CAR-NK?

9) На рисунке 27 показан уровень цитотоксической активности NK-клеточных линий и CAR-NK-клеточных линий по отношению к опухолевым клеткам Raji и HEK293T-CD20 в

различных соотношениях эффектор:таргет, но рисунок сделан таким образом, что становится непонятно, какие именно соотношения использовались и что показано по оси X.

10) В разделе результаты описано, что для создания CAR-NK была использована следующая конструкция химерного антигенного рецептора: Leu16-IgG1-CD28-CD3 $\zeta$ . Таким образом, видно, что в качестве костимуляторного домена используется CD28, который, как известно, опосредует явление повышенного (или хронического) тонического сигналинга и повышенную эффекторную функцию CAR-клеток. Интересно, как тонический сигналинг влияет на эффективность CAR-NK-клеток и может ли вообще быть эффективна терапия CAR-NK при использовании другого костимуляторного домена (например, 4-1BB), учитывая необходимость быстрого действия CAR-NK ввиду недолгой персистенции?

Мелкие замечания:

В списке литературы из 507 источников всего три источника в русскоязычных журналах, при этом они приведены на английском языке и не охватывают весь спектр исследовательских групп в России, которые работают в этой же области науки. Кроме того, автор не ссылается на собственные публикации в тексте диссертации.

В подписи к рис. 21 в написано «интенсивность флуоресценции», хотя речь о люминесценции.

### Заключение

Диссертационная работа Беловежец Татьяны Николаевны «Оценка эффективности CAR T- и CAR NK-клеток в доклинических моделях В-клеточных онкогематологических заболеваний человека», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, является самостоятельным и завершенным научно-квалификационным исследованием, описывающим новые результаты в области молекулярной биологии и клеточной иммунотерапии, которое вносит существенный вклад в развитие новых методов и подходов для повышения эффективности и безопасности CAR-T терапии в лечении онкологических заболеваний. Основные результаты диссертационной работы отражены в печати в 5 статьях, опубликованных в рецензируемых изданиях, в том числе индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus.

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 Беловежец

Татьяны Николаевны полностью соответствует критериям, 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:**

Доктор биологических наук (специальность 1.5.3 «Молекулярная биология»), профессор РАН, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

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 Друцкой М.С. заверяю»  
Ученый секретарь  
ИМП РАН, к.ф.-м.н.

28.05.2026



Коновалова Е.В.