

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, доцента, заместителя директора по научной работе «Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой», профессора кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии с курсом детской онкологии факультета послевузовского образования имени профессора Б.В. Афанасьева ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ Моисеева Ивана Сергеевича на диссертационную работу Беловежец Татьяны Николаевны «Оценка эффективности CAR T- и CAR NK-клеток в доклинических моделях В-клеточных онкогематологических заболеваний человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

1. Актуальность темы диссертационного исследования

Актуальность диссертационного исследования обусловлена бурным развитием отрасли иммунных клеток с химерным антигенным рецептором. Среди иммунных клеток, которые могут нести химерный антигенный рецептор (CAR) наиболее часто в фундаментальных и прикладных исследованиях, а также в клинической медицине используются Т-клетки (CAR-T) и NK клетки (CAR-NK). Первый препарат анти-CD19 CAR-T против В-клеточных опухолей зарегистрирован в 2017 году, а в настоящий момент в мире зарегистрировано для клинического применения 5 CAR-T продуктов индустриального производства, и более 100 CAR-T продуктов академического производства против В-клеточных опухолей находятся в разработке.

Данная группа препаратов направлена на лечение рецидивирующих и рефрактерных В-клеточных опухолей во 2-ой и 3-ей линии терапии. Во второй линии терапии долгосрочная выживаемость без заболевания при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ), самом частом показании для CAR-T составляет около 30-40%, в третьей линии не превышает 15% на

стандартной терапии. Применение коммерчески доступных CAR-T позволяет повысить выживаемость на 10-20% в зависимости от генетических вариантов. Также анти-B-клеточные CAR-T используются для лечения рефрактерного B-клеточного острого лимфобластного лейкоза у детей, и, в меньшей степени, у взрослых. В сочетании с консолидацией аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток CAR-T терапия позволяет достигать долгосрочных ремиссий у половины пациентов с этой нозологией. Предварительные научные данные указывают, что оптимизации конструкции CAR-T рецептора может повышать клиническую эффективность этого вида терапии.

Наиболее частым направлением является изменение антигенсвязывающего домена, или использование нескольких антиген-связывающих доменов в одной конструкции. Антигенное ускользание – причина рецидивов у 25-30% пациентов с B-клеточными опухолями. Использование биспецифичных CAR-T продуктов позволяет предотвратить рецидивы заболевания в этой группе пациентов.

Тем не менее, после терапии зарегистрированными вариантами CAR-T около половины пациентов имеют рефрактерность заболевания или рецидивы после их применения. Вторая проблема – невозможность или неудача афереза периферических лимфоцитов, или неудача производственного процесса. Вероятность такого клинического сценария зависит от предлеченности пациента, предшествующей терапии. В разных работах сообщается о 5-20% неудач производства CAR-T. Для таких пациентов единственной опцией остается использование аллогенных клеток. Для применения аллогенных CAR-T необходимы многочисленные генетические модификации, включающие нокаут HLA I класса, бета-2-микроглобулина, гена СИТА. Необходимость таких модификаций усложняет производственный процесс и создает предпосылки для повышения неудач производства клеточного продукта. Кроме того, аллогенные клетки требуют стандартизации требований к характеристикам донора. НК клетки не экспрессируют HLA антигены, поэтому не требуют вышеперечисленных модификаций и являются перспективным направлением для разработки доступных аллогенных продуктов CAR-NK.

Таким образом, разработка оптимальных конструкций CAR-T и CAR-NK является актуальной задачей в области клеточной биологии.

2. Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации

Задачи исследования четко сформулированы и соответствуют цели работы. Для решения поставленных задач автором использован комплекс современных молекулярно-биологических культуральных методов. Выносимые автором на защиту положения логично и четко сформулированы, отражают наиболее значимые результаты собственных исследований, описанных в тексте диссертации. Обоснованность выводов и практических рекомендаций обоснована использованием релевантных валидированных *in vitro* и *in vivo* моделей. Также в работе на этапе выбора связывающего домена проанализирована биологическая активность достаточного количества анти-CD20 доменов, проведено сравнение с референтным анти-CD19 FM63 связывающим доменом. Проведена оценка активности биспецифического CAR-T анти-CD19/CD20 в сравнении с моноспецификом. Количество повторов *in vitro* соответствует принятым стандартам. Для сравнения полученных результатов использованы релевантные статистические методы.

Вышеприведенная оценка позволяет признать научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертации, достаточно обоснованными. Диссертационная работа Беловежец Татьяна Николаевна выполнена на высоком методическом уровне и не вызывает возражений.

3. Научная новизна результатов исследования

В процессе работы создан оригинальный анти-CD20/19 CAR-T продукт, для которого оптимизирован как шарнирный домен CAR-T рецептора, так и подобран оптимальный анти-CD20 связывающий домен. Также проведено сравнение эффективности биспецифического варианта анти-CD20/19 CAR-T и варианта,

экспрессирующего два независимых CAR-T рецептора, продемонстрировано преимущество конкретной конструкции dual CAR-T. Впервые продемонстрирована активность созданного оригинального продукта в отношении линии клеток CD20-экспрессирующего острого лимфобластного лейкоза (CD20-NALM6) *in vitro*. Впервые продемонстрирована устойчивость полученных CAR-T клеток к истощению, что является обязательным тестом при отборе кандидатных CAR-T для клинических исследований. Впервые проведена трансфекция разработанного CAR-T клеточного продукта в линии NK-клеток YT, NK-92 и KHYG-1. Продемонстрировано преимущество CAR NK-92 и CAR KHYG-1 над CAR YT. Впервые продемонстрирована активность разработанного биспецифического анти-CD20/19 CAR-T в *in vivo* модели генетически модифицированной линии мышей NOD/Scid с опухолью лимфомы Беркитта человека Raji-ffluc. Продемонстрировано, что CAR KHYG-1 достоверно лучше обеспечивала контроль над опухолью по сравнению с донорскими мононуклеарами. Впервые протестирована возможность усиления CAR-NK с помощью оптимизации промоторных элементов.

4. Значимость для науки и практики результатов диссертационного исследования

В ходе диссертационного исследования разработана оригинальная конструкция двойного анти-CD19/CD20 CAR-T, продемонстрирована его активность *in vivo* и *in vitro*, устойчивость к истощению в тесте хронической стимуляции. Тем не менее, в производственном процессе клинического уровня создание достаточного количества двойных CAR-T представляет значительные трудности, учитывая низкий выход клеток с двойной экспрессией рецептора, необходимость нескольких циклов производства, удлинение общего цикла производства. На основании полученных отрицательных результатов протестированных биспецифических анти-CD19/CD20 CAR-T в работе предложены направления разработки, которые позволяют в дальнейшем оптимизировать предложенную генетическую конструкцию для перехода в разработку клинического производственного процесса.

Среди протестированных *in vitro* и *in vivo* анти-CD19/CD20 CAR-NK клеточных линий выбрана наиболее перспективная линия КНУГ-1. Полученные результаты могут стать основой для дальнейшей разработки аллогенного биспецифического продукта на основе NK-клеточных линий, что является одним из перспективных направлений разработки аллогенного продукта. Предложены направления повышения эффективности CAR-NK. Таким образом, работа закладывает основу для создания клинического анти-B-клеточного нового поколения для злокачественных новообразований кроветворной системы.

5. Оценка содержания, степень завершенности и качество оформления диссертационного исследования

Диссертационное исследование Беловежец Татьяны Николаевны написано хорошим литературным языком, оформлено в соответствии с существующими требованиями и представляет завершенное исследование, так как была достигнута поставленная цель и выполнены сформулированные задачи.

Научно-квалификационная работа изложена на 134 страницах печатного текста и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение собственных исследований, заключение, выводы, список сокращений, список литературы с достаточным количеством источников (507 отечественных и зарубежных) и 1 приложение. Диссертация содержит достаточный объем иллюстративного материала (29 рисунков и 7 таблиц), способствующий восприятию полученной автором информации.

Во введении автор убедительно обосновала актуальность проблемы, ясно сформулировала цель и задачи исследования, представила научную новизну, практическую и теоретическую значимость полученных результатов, а также основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы изложен в первой главе диссертации на 32 страницах текста и свидетельствуют о понимании автором современного состояния CAR-T- и CAR-NK-клеточной терапии B-клеточных онкологических заболеваний. Детально проработанный обзор литературы служит основой для критичного и

квалифицированного подхода автора к выбору методов исследования и анализу полученных результатов.

Подробное описание методов исследования использованных реактивов, включая молекулярно-биологическое клонирование и различные клеточные тесты, а также методов работы с животными и статистического анализа нашло отражение во второй главе диссертации.

Работа характеризуется высоким качеством иллюстрирующих материалов и таблиц данных. Показано как создание новых химерных рецепторов, специфичных к CD20, так и их характеристика в тестах *in vitro*. Для вновь полученных CAR продемонстрирована активность в тестах *in vitro* и на модели ксенотрансплантированной опухоли *in vivo*, сопоставимая с широко используемым в клинической практике FMC63-CAR, специфичным к CD19. Для проведения исследований на *in vivo* модели подобрана фермент/субстратная пара, позволяющая эффективно визуализировать опухолевые клетки и оценивать как суммарную опухолевую нагрузку, так и биораспределение таких клеток во временной динамике. Проведено сравнение трех NK-клеточных линий человека, NK-92, KHYG-1, YT-1, - в качестве носителей CAR на модели лимфомы Беркитта, ксенотрансплантированной мышам линии *NOD/scid* и показано, что CAR-NK клетки на основе линии KHYG-1 достоверно увеличивают продолжительность жизни мышей с ксенотрансплантированными опухолями.

Заключение представляет собой обобщение полученных автором результатов с учетом современных научных представлений. Выводы диссертационной работы логично вытекают из проведенной исследовательской работы и полностью основаны на полученных результатах.

Автореферат отражает основные положения и выводы, полностью соответствующие тексту диссертации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ: 5 статей в российских и иностранных журналах, из них 4 публикации в журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки России. Основные положения выполненной работы доложены и обсуждены на конференциях всероссийского и международного уровня в виде устных докладов.

6. Замечания и вопросы по диссертационной работе

Необходимо отметить высокий методический уровень диссертационной работы Беловежец Татьяны Николаевны, использованы современные лабораторные методы, методы биоинформатики и статистического анализа, что оставляет благоприятное впечатление о работе. Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет.

В порядке дискуссии выдвинут спектр вопросов, требующих обсуждения:

1. Исследованные в Вашей работе CAR-T лимфоциты обладают значительной вариабельностью по CD4, CD8, TEMRA, Tcon лимфоцитов. Как данная вариабельность влияет на полученные результаты?
2. Чем Вы объясняете потерю эффективности вариантов анти-CD19/CD20 revbiCAR и biCAR тесте хронической стимуляции?
3. Облученные CAR-NK клеточные линии обладают ограниченной персистенцией и экспансией после инфузии и могут быть использованы для разработки технологии, но клиническое применение, вероятно, потребует, либо изменение режима дозирования по сравнению с CAR-T, либо изменение популяции клеток, в которой экспрессируется химерный рецептор. Как Вы видите развитие этого направления Вашей работы?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Беловежец Татьяны Николаевны «Оценка эффективности CAR T- и CAR NK-клеток в доклинических моделях В-клеточных онкогематологических заболеваний человека», выполненная под научным руководством кандидата биологических наук Горчакова Андрея Александровича и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3.Молекулярная биология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи – разработки альтернативных способов клеточной

иммунотерапии В-клеточных онкологических заболеваний и полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями и дополнениями в редакции от 16 октября 2024 года, действующей с 01 января 2025 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Беловежец Татьяна Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Официальный оппонент,

Официальный оппонент, доктор медицинских наук (шифр 3.1.28 Гематология и переливание крови), доцент, заместитель директора по научной работе «Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой», профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии с курсом детской онкологии факультета послевузовского образования имени профессора Б.В. Афанасьева ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ
Моисеев Иван Сергеевич

Адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой

Тел. +7-921-796-19-41

Email: moisiv@mail.ru

Подпись официального оппонента Моисеева Ивана Сергеевича заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ
д.м.н., профессор Беженарь Виталий Федорович



12 мая 2026