

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Алрхмуна Салеха на тему «Клонирование TCR и получение HER2/neu-специфичных TCR-T-клеток с доклинической оценкой их активности»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность темы

Одной из наиболее сложных и актуальных задач современной клинической и фундаментальной иммунологии является формирование эффективного антиген-специфического клеточного ответа, способного распознавать опухолевые клетки с высокой точностью. Традиционные платформы направленной клеточной иммунотерапии, такие как CAR-T технологии или использование моноклональных антител, сегодня сталкиваются с фундаментальными ограничениями. Прежде всего, эти подходы жестко ограничены пулом поверхностно-экспрессируемых белков, что оставляет недоступным подавляющее большинство внутриклеточных опухолевых антигенов, в то же время ключевые механизмы «ускользания» опухоли от иммунного надзора часто включают в себя нарушение презентации таких антигенов. Кроме того, терапия CAR-T клетками ассоциирована с высокими рисками системной токсичности и синдрома выброса цитокинов вследствие их искусственной повышенной активации, что диктует необходимость поиска более физиологичных и селективных терапевтических стратегий

В связи с этим разработка T-лимфоцитов, модифицированных специфическими T-клеточными рецепторами (TCR-T), открывает принципиально иное, прорывное направление. Эта технология позволяет T-клеткам распознавать процессированные внутриклеточные опухолевые пептиды, презентируемые молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC/HLA), что кардинально расширяет спектр

доступных терапевтических мишеней. Но не менее важно и то, что TCR-T представляет собой естественный способ борьбы иммунной системы с опухолями. Поскольку этот механизм физиологичен, в организме уже заложены все необходимые эволюционные факторы регуляции активности таких клеток. Это позволяет добиться выраженного терапевтического эффекта без экстремальной системной токсичности, делая терапию более контролируемой и безопасной.

Актуальность диссертационной работы Алрхмуна Салеха определяется созданием платформы, обеспечивающей сквозной цикл поиска, селекции и характеристики Т-клеточных рецепторов специфичных к опухолю-ассоциированному антигену HER2/neu. Данное исследование закладывает технологический фундамент для иммунотерапии солидных опухолей, предлагая инструмент для генерации персонализированных клеточных продуктов с верифицированной способностью индуцировать направленный противоопухолевый ответ.

Научная новизна и практическая значимость исследования

Научная новизна и практическая ценность диссертационного исследования Алрхмуна Салеха неразрывно связаны между собой и ориентированы на создание универсальной технологической платформы, и на получение на её основе терапевтического TCR-T продукта, полностью готового к проведению клинических испытаний. Особое значение имеет разработанный протокол индукции антиген-специфических лимфоцитов с помощью дендритных клеток, который позволил успешно активировать и выделить Т-клеток с высокоаффинными природными Т-клеточными рецепторами. Получение таких «натуральных» TCR имеет принципиальное преимущество перед использованием искусственно модифицированных рецепторов, так как минимизирует риски перекрестной реактивности и аутоиммунных осложнений. Патентная защита обнаруженного клонотипа, специфичного к эпитопу HER2/neu в комплексе с HLA-A*02, закладывает

надежный фундамент для создания эффективных терапевтических продуктов для адаптивной иммунотерапии широкого спектра карцином и меланом.

Глубокое картирование популяционной динамики модифицированных Т-клеток с помощью секвенирования единичных клеток и мультиплексного анализа секретома позволило детально охарактеризовать функциональный статус и субпопуляционный состав лимфоцитов, выявив формирование уникальной CD4+CD8+ дубль-позитивной фракции клеток с высоким цитолитическим потенциалом.

Что особенно выделяет рецензируемую работу на фоне смежных исследований, так это её выраженная прикладная направленность: разработанная конструкция и алгоритмы ее валидации позволяют полностью стандартизировать и масштабировать процесс получения терапевтических Т-клеточных продуктов против широкого спектра целевых белковых антигенов. Это открывает реальные перспективы для прямой трансляции предложенных подходов в сферу персонализированной медицины и проведения стандартизированного клинического мониторинга клеточных препаратов.

Общая характеристика

Структура диссертационной работы Алрхмуна Салеха полностью соответствует каноническим требованиям. Текст диссертации изложен последовательно, с четким разделением этапов исследования и глубоким анализом полученных результатов.

Во «Введении» четко сформулирована иммунологическая концепция исследования, определены цель, задачи, объект и научная гипотеза работы.

В «Обзоре литературы» демонстрирует серьезную подготовку автора в области онкоиммунологии. Подробный разбор достоинств и системных недостатков различных платформ клеточной терапии позволяет аргументированно обосновать выбор стратегии для борьбы с солидными опухолями. Кроме того, диссертант подробно анализирует существующие терапевтические подходы для лечения HER2/neu-положительных опухолей, разбирая причины возникновения резистентности к ним.

Глава «Экспериментальная часть» отражает высокий уровень методологической культуры автора. Для решения поставленных задач автор привлек широкий спектр современных иммунологических и молекулярно-биологических методов: от реализации протокола индукции антиген-специфических Т-лимфоцитов и последующего отбора кандидатных рецепторов до глубокой функциональной характеристики и оценки терапевтического потенциала клеток на системном уровне.

Глава «Результаты» логически выстроена от направленной активации антиген-специфических Т-клеток и биоинформатического анализа до глубоких функциональных тестов в сложных биосистемах. На начальном этапе был применен протокол индукции антиген-специфических Т-лимфоцитов с помощью дендритных клеток. Последующий биоинформатический скрининг данных секвенирования TCR позволил отобрать последовательность Т-клеточного рецептора с потенциально оптимальной аффинностью к пептид-НЛА комплексу и целевым профилем транскриптома. Последующий молекулярный дизайн плазмидных векторов третьего поколения был выполнен с прицелом на минимизацию рисков миспайринга цепей TCR, что критически важно для предотвращения нежелательных аутоиммунных реакций.

Особого одобрения с точки зрения иммунологической строгости эксперимента заслуживает блок *in vitro* валидации. Диссертант верифицировал уровень экспрессии HER2/neu на панели опухолевых линий, наглядно продемонстрировав, как модифицированные Т-лимфоциты селективно уничтожают клетки с высоким уровнем экспрессии целевого антигена. При этом опухолевые клетки с базовым уровнем экспрессии мишени, а также полностью HER2-негативные контроли демонстрировали лишь минимальный, фоновый уровень лизиса, что доказывает антигенспецифичность полученного продукта. Этот цитолитический эффект был подтвержден на молекулярном уровне результатами мультиплексного профилирования секретома, зафиксировавшим мощный выброс ключевых цитокинов (IFN- γ , IL-2) и цитолитических молекул (перфорина и гранзимов) при распознавании мишени,

а также данными транскриптомного анализа на уровне единичных клеток, который выявил формирование уникальной дубль-позитивной (CD4+CD8+) популяции лимфоцитов, напрямую ассоциированной с более высокой противоопухолевой активностью.

Финальным подтверждением терапевтического потенциала разработанного продукта стали эксперименты *in vivo*. На модели ксенотрансплантата клеток SK-MEL-37 у иммунодефицитных мышей SCID, введение модифицированных Т-лимфоцитов привело к выраженному подавлению роста опухоли на 86%.

Глава «Обсуждение» содержит зрелую научную дискуссию, в которой автор сопоставляет эффективность разработанной им платформы с международными аналогами и обосновывает перспективность внедрения полученных результатов. Выводы полностью отражают содержание работы и научно аргументированы.

Достоверность полученных результатов

Обоснованность выводов и достоверность фактического материала диссертации базируются на комплексной функциональной валидации разработанного клеточного продукта как в условиях *in vitro*, так и на адекватных моделях *in vivo*. Преимуществом работы является независимое подтверждение противоопухолевого эффекта на молекулярно-клеточном уровне: данные мультиплексного профилирования секретома, зафиксировавшие секрецию IFN- γ , IL-2, гранзимов и перфорина, убедительно доказывают высокую цитолитическую активность модифицированных Т-клеток и согласуются с результатами транскриптомного анализа единичных клеток, выявившего уникальную дубль-позитивную фракцию лимфоцитов с повышенным терапевтическим потенциалом. Эксперименты на иммунодефицитных мышях с ксенотрансплантатами выполнены в соответствии со стандартами доклинических исследований. Столь глубокая проработка темы нашла отражение в серии публикаций в престижных научных изданиях первого квартиля (Q1) и подтверждена официальным патентом на

изобретение, что свидетельствует об актуальности и практической значимости проведенного исследования.

Замечания и вопросы

Характеризуя диссертационное исследование как высококачественный и заверченный научный труд, целесообразно в рамках дискуссии обсудить следующие вопросы:

1. Какова стабильность экспрессии трансгенного Т-клеточного рецептора на поверхности модифицированных лимфоцитов при их длительном культивировании? Происходит ли снижение уровня экспрессии разработанных конструкций со временем?
2. Почему в тестах *in vitro* не использовались опухолевые клетки, которые экспрессируют антиген HER2/neu, но являются HLA-A*02-негативными? Необходим ли, на ваш взгляд, такой перекрестный контроль для окончательного подтверждения HLA-рестрикции разработанного продукта?
3. Каков минимальный порог плотности экспрессии белка HER2/neu на мембране клеток-мишеней, необходимый для эффективной активации и цитолиза разработанным TCR-T продуктом? Позволяет ли созданная вами тест-система дифференцировать опухолевые клетки с повышенной экспрессией HER2 от нормальных тканей с низким базальным уровнем этого антигена?

Указанные вопросы и замечания носят академический характер, направлены на уточнение деталей и не снижают общую высокую оценку диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Алрхмуна Салеха «Клонирование TCR и получение HER2/neu-специфичных TCR-T-клеток с доклинической оценкой их активности» является самостоятельным, глубоким и законченным научно-квалификационным исследованием, вносящим существенный вклад в развитие клинической и фундаментальной иммунологии.

По актуальности темы, объему выполненных экспериментов, глубине теоретического анализа, новизне и достоверности выводов диссертация полностью соответствует требованиям пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Ее автор, Алрхмун Салех, безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ), доктор биологических наук, профессор

Аутеншлюс Александр Исаевич

Адрес: 630060, Новосибирск,
улица Тимакова, 2
Рабочий телефон: +7(383)274-95-50
e-mail: aiautenshlyus@frcftm.ru

дата отзыва: «15» июля 2026 г

Подпись д.б.н., профессора
Аутеншлюса Александра Исаевича
ЗАВЕРЯЮ:

Ученый секретарь ФИЦ ФТМ, д.б.н. Колдышева Елена Владимировна

Личную подпись Аутеншлюса А. И. заверяю
вед. специалист отдела кадров ФИЦ ФТМ
"15" июля 2026 г. подпись

