

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора РАН
Денисова Евгения Владимировича на диссертационную работу
Алрхмуна Салеха на тему «Клонирование TCR и получение HER2/неи-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 исследования

На сегодняшний день экспериментальная онкоиммунология развивается очень динамично: на смену традиционным методам лечения, которые токсичны для всего организма и тяжело переносятся пациентами, приходят технологии направленной клеточной терапии. Речь идет об использовании живых, генетически модифицированных T-лимфоцитов, способных избирательно распознавать конкретные опухолевые мишени. Несмотря на колоссальный успех CAR-T терапии при онкогематологических заболеваниях (лейкозах и лимфомах), её эффективность против солидных опухолей всё еще остается ограниченной. Кроме того, технология CAR ограничена тем, что позволяет распознавать лишь поверхностные маркеры, что дает опухолевым клеткам возможность ускользать от иммунного надзора за счет снижения экспрессии целевого белка на своей мембране и таким образом “прятаться” от терапевтических T-клеток.

В данном контексте технология репрограммирования T-лимфоцитов с помощью альфа-бета T-клеточных рецепторов (TCR-T) обладает принципиальным преимуществом, поскольку позволяет распознавать внутриклеточные опухолеассоциированные неоантигены, презентируемые в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA). Более того, даже если целевой антиген изначально экспрессировался на мембране, а опухолевые клетки в целях избегания распознавания T-лимфоцитами снизили уровень его поверхностной экспрессии, молекулы HLA все равно продолжают презентировать пептидные фрагменты этого белка на клеточной поверхности. Однако ключевым «узким горлышком» направления является поиск эффективных и безопасных последовательностей TCR. Мало того, что они не должны вызывать перекрестных реакций, их терапевтическое действие всегда жестко лимитировано конкретным вариантом HLA.

Диссертационное исследование Алрхмуна Салеха посвящено разработке комплексной биотехнологической платформы, объединяющей передовую технологию секвенирования единичных клеток (scRNA-seq) для идентификации последовательностей T-клеточных рецепторов, современные методы биоинформатического анализа для определения оптимальных клонотипов и предсказания их аффинности к целевому пептиду

в комплексе с молекулой HLA, молекулярно-генетический инжиниринг для создания терапевтических TCR-T лимфоцитов, специфичных к опухоль-ассоциированному антигену HER2/neu и их последующее доклиническое тестирование. Актуальность данной работы не вызывает сомнений, поскольку она предлагает новое технологическое решение в области клеточной терапии онкологических заболеваний.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы носит комплексный характер и базируется на стыке вычислительной биологии и экспериментальной онкоиммунологии. Принципиально важным шагом является применение технологии секвенирования единичных клеток, которая позволила одновременно решить две сложнейшие задачи: провести масштабный скрининг природных антиген-специфических T-клеточных рецепторов с сохранением правильной нативной сборки пары альфа- и бета-цепей для каждого клона и параллельно проанализировать транскриптомный профиль самих T-лимфоцитов. На основе этих комплексных данных в работе создан оригинальный биоинформатический инструмент TCRscape, способный осуществлять мультиомиксное профилирование, процессинг и селекцию терапевтически перспективных клонотипов T-клеточных рецепторов. Результатом этой работы стал детальный анализ и успешный патентный контур одной уникальной последовательности T-клеточного рецептора, специфичной к опухоль-ассоциированному антигену HER2/neu. Поскольку данный рецептор распознает KIFGSLAFL пептид в комплексе с аллелем HLA-A2, самым распространенным генотипом класса I HLA в популяциях человека, разработанный терапевтический продукт потенциально применим для большинства пациентов с HER2/neu-положительными новообразованиями. Это позволяет частично преодолеть ключевое ограничение TCR-терапии, связанное с ее узкой индивидуальной специфичностью, повышая потенциальную доступность технологии для клинической практики.

Практическая значимость работы

Практическая ценность результатов исследования прежде всего определяется тем, что полученные анти-HER2 TCR-T клетки готовы к переходу на этап клинических исследований, поскольку основной объем доклинического анализа был успешно выполнен в рамках диссертации. Тем не менее, предложенный протокол поиска и анализа T-клеточных рецепторов обладает высоким трансляционным потенциалом и может быть непосредственно адаптирован для идентификации и анализа кандидатных TCR, специфичных к любым другим опухолевым антигенам белковой природы. Программой основой для этого выступает разработанный биоинформатический модуль TCRscape. Этот

инструмент успешно решил ключевую проблему эффективной обработки и анализа данных секвенирования TCR. Модуль выложен в открытый доступ, благодаря чему другие научные группы могут свободно использовать его в своих проектах для профилирования T-клеточных репертуаров. Наконец, полученный патент РФ на исследованную последовательность TCR создает надежный фундамент для разработки оригинальных клеточных препаратов против HER2-позитивных солидных опухолей.

Оценка содержания работы и её структуры

Диссертация Алрхмуна Салеха изложена по классической схеме, имеет академическую структуру, включает в себя введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Материал иллюстрирован высококачественными графиками, схемами биоинформатического процессинга и транскриптомными картами.

Во «**Введении**» четко сформулированы цель и задачи исследования, обоснована актуальность и вынесены на защиту положения.

В «**Обзоре литературы**» автор детально анализирует проблемы и недостатки современных подходов к лечению HER2/neu-позитивных новообразований, после чего подробно рассматривает эволюцию методов адаптивной клеточной иммунотерапии. Такой подход наглядно показывает глубокие знания автора в области молекулярной онкологии.

Глава « **Экспериментальная часть**» написана с полнотой и методической точностью. Диссертант оперирует широким арсеналом современных подходов: от высокопроизводительного секвенирования единичных клеток и биоинформатического предсказания специфичности полученных TCR-клонотипов до дизайна лентивирусных векторных систем третьего поколения, анализа цитотоксичности, секретома, транскриптома и *in vivo* моделей.

Глава «**Результаты**» выстроена в логической последовательности, которая шаг за шагом раскрывает архитектуру созданной биотехнологической платформы и доклинического тестирования полученных TCR-T лимфоцитов.

Описывается идентификация последовательностей T-клеточных рецепторов T-лимфоцитов, индуцированных дендритными клетками, путем секвенирования отдельных клеток с последующим биоинформатическим скринингом и предсказанием аффинности кандидатных клонов TCR к целевому пептиду в комплексе с молекулой HLA. Этот этап заслуживает особого внимания: он выполнен на высоком вычислительном уровне с помощью кастомных скриптов, что позволило автору с самого начала сориентироваться в массиве данных.

Дизайн экспрессионных векторов также детально продуман: использование Р2А-пептида для эквимольной экспрессии альфа- и бета-цепей TCR позволило минимизировать риски неправильного спаривания цепей. Для биобезопасности будущей терапии это критически важный технологический шаг.

Экспериментальный блок *in vitro* валидации выглядит аргументированно благодаря грамотно подобранной панели клеточных линий с четко верифицированным статусом экспрессии мишени и молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA-A*02).

Полученные результаты демонстрируют, как модифицированные Т-лимфоциты селективно уничтожают опухолевые клетки с высоким уровнем экспрессии целевого антигена HER2/neu. При этом в рамках исследования были использованы контроли сравнения: опухолевые клетки с базовым уровнем экспрессии мишени (сопоставимым со здоровыми тканями), а также полностью HER2/neu-негативные клеточные линии. Цитотоксическая активность модифицированных Т-клеток в отношении обеих контрольных линий оставалась минимальной и находилась на одинаковом базовом уровне. Столь выраженная разница в силе иммунного ответа между целевыми и контрольными мишенями доказывает антиген-специфичность и потенциальную безопасность созданного конструкта.

Важным результатом транскриптомного анализа стало выявление субпопуляционной динамики Т-клеток при контакте с опухолевыми клетками. Проведенное исследование позволило обнаружить уникальную дважды позитивную (CD4⁺CD8⁺) популяцию клеток, появление которой ассоциировано с более высокой противоопухолевой активностью.

Логическим завершением исследования стал успешный перенос результатов *in vitro* на *in vivo* модель. На ксенотрансплантатной модели солидной опухоли (подкожное введение клеток SK-MEL-37 иммунодефицитным мышам SCID) полученные TCR-Т-клетки вызвали выраженное и статистически значимое торможение опухолевого роста (до 86%).

«Обсуждение» выполнено в аналитическом ключе. Диссертант сопоставляет свои данные с передовыми мировыми аналогами, критически оценивает ограничения модели и намечает векторы дальнейшего развития платформы. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам и вытекают из массива полученных данных.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается комплексным междисциплинарным подходом: автору удалось грамотно объединить современные вычислительные методы и секвенирование единичных клеток с классической клеточной

иммунологией. Все выводы автора полностью обоснованы, поскольку они опираются на колоссальный объем проанализированных данных. Важно, что эксперименты ставились в нескольких независимых биологических повторах и прошли строгую статистическую проверку. Сформулированные положения логичны, прозрачны и прямо вытекают из полученных результатов. Сама же работа уже прошла серьезную независимую экспертизу научным сообществом: основные материалы диссертации в полной мере отражены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, которые индексируются в базах данных Web of Science и Scopus. Кроме того, технологическая новизна и оригинальность предложенного подхода подтверждены патентом РФ на изобретение.

Дискуссионные замечания и вопросы

Диссертационное исследование Алрхмуна Салеха выполнено на высоком методологическом уровне. Тем не менее, хотелось бы заметить, что цель работы сформулирована неконкретно и представляет фактически перечисление задач, раздел “Результаты” содержит повторное описание методов, и в выводах отсутствуют числовые показатели в плане цитотоксической и противоопухолевой активности TCR-T клеток. В работе присутствуют незначительные стилистические ошибки и опечатки.

В рамках научной дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы:

1. Чем объясняется выбор клеточных линий, использованных в работе? Почему включены линии меланомы SK-MEL-5 и SK-MEL-37, учитывая нехарактерную для них экспрессию HER2/neu, о чем говорит сам автор в Таблице 1? Почему не использовались классические HER2/neu-положительные линии рака молочной железы, например, BT-474, SK-BR-3, HCC1569, AU-565 или MDA-MB-361?

2. Насколько корректен анализ обогащения небольшого количества дифференциально экспрессируемых цитокинов (рисунок 20 В)? Были ли сложности с секвенированием единичных TCR-T клеток, учитывая их малое количество (рисунок 21Б), и как они преодолевались?

3. Чем может объясняться больший рост опухоли в случаях применения нетрансдуцированных Т-клеток (LV-нег) по сравнению с контролем (рисунок 22)?

4. Может ли внутриопухолевая гетерогенность экспрессии HER2/neu, характерная для большинства HER2/neu-положительных новообразований, быть ограничением для применения анти-HER2/neu TCR-T клеток, и какие могут быть варианты её преодоления? Возможно ли сочетание TCR-T клеток с неоантиген-специфическими мРНК вакцинами в данном случае?

5. В мышинной модели анти-HER2/neu TCR-T клетки вводили в опухолевый очаг. Какой способ их доставки может быть в случае лечения пациентов?

Замечания и вопросы не снижают научную ценность работы и носят дискуссионный характер.

Заключение

Диссертационная работа Алрхмуна Салеха «Клонирование TCR и получение HER2/neu-специфичных TCR-T-клеток с доклинической оценкой их активности» является законченным научно-квалификационным исследованием, содержащим решение важной научно-практической задачи: создание высокотехнологичной платформы генерации терапевтических TCR-T клеточных продуктов для персонализированной терапии HER2/neu-положительных злокачественных новообразований.

По актуальности, объёму выполненных исследований, новизне подходов, достоверности результатов и практической значимости диссертация полностью отвечает 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. Автор диссертации, Алрхмун Салех, безусловно заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии Томского НИМЦ, доктор биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, профессор РАН

16.06.2026

Денисов Евгений Владимирович

Контактные данные:

Телефон: 8 (3822) 28-26-76, доб. 3375

Email: d_evgeniy@oncology.tomsk.ru

Адрес места работы: 634009 г. Томск, пер. Кооперативный 7/1

Полное название организации: Научно-исследовательский институт онкологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Подпись д.б.н., Денисова Е.В. заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», кандидат биологических наук



—Хитринская Ирина Юрьевна

Адрес: 634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Сайт: <https://www.tnmc.ru/>

Телефон: 8 (3822) 46-95-66; Email: center@tnmc.ru