

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертационную работу

**Алрхмуна Салеха**

**«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 диссертационной работы**

Развитие новых и совершенствование существующих методов терапии опухолевых заболеваний несомненно остаётся одним из наиболее актуальных и критически важных направлений современной молекулярной онкологии и биомедицины. В этом контексте диссертационная работа С. Алрхмуна затрагивает важную задачу: создание универсальной платформы для получения антиген-специфических TCR-T-клеток на основе технологии секвенирования единичных клеток для отбора перспективных TCR, и ее успешное внедрение для таргетного поиска TCR против антигена HER2/neu. Концепция TCR-T-терапии опирается на естественные механизмы иммунной системы с привлечением T-клеточного рецептора для распознавания и элиминации опухолевых клеток, в отличие от CAR-T-терапии на основе искусственно созданных химерных рецепторов. Кроме того, TCR-T-клетки способны распознавать пептидные антигены в комплексе с молекулами HLA (главного комплекса гистосовместимости), включая эпитопы внутриклеточного происхождения, что недоступно для CAR-T-терапии. Используемый в работе подход с отбором естественных TCR с использованием секвенирования единичных клеток обладает преимуществом перед применением искусственно модифицированных рецепторов. Искусственное повышение аффинности TCR, хотя и усиливает их связывание с опухолевой мишенью, критически повышает опасность неспецифического распознавания (внемишневой реактивности) и аутоиммунных осложнений. Напротив, естественные TCR функционируют в рамках физиологических регуляторных контуров, гарантируя безопасность для нормальных тканей организм. Выбор HER2/neu в качестве мишени для предложенного в данной работе TCR обоснован, поскольку повышение экспрессия данного антигена наблюдается в опухолях различного происхождения. Однако предложенный в работе протокол обладает платформенной универсальностью и может быть использован для любого

белкового антигена. Таким образом, тема кандидатской диссертации С. Алрхмуна отличается высокой актуальностью.

### **Научная новизна**

Научная новизна заключается в значительном вкладе в оптимизацию протоколов идентификации и генерации высокоаффинных HER2- специфичных TCR-T-клеток, разработку протокола получения антигенспецифичных Т-клеток, нацеленных на эпитоп HER2 KIFGSLAFL (HLA-A\*02-рестриктивный), что обеспечило более чем 200-кратное увеличение популяции таких Т-клеток *in vitro*.

Предложен подход, заключающийся в клонировании и молекулярном анализе HER2- специфичных TCR с использованием методов секвенирования единичных клеток, который позволил идентифицировать пары  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей TCR клонов. Предложенный подход универсален и может быть адаптирован к различным антигенам и вариантам HLA, что расширяет его потенциал как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения.

TCR-T-клетки избирательно уничтожали HER2-положительные линии SK-MEL-5 и SK-MEL-37, демонстрируя минимальное воздействие на клетки HCT-116 с умеренной экспрессией HER2 и на HER2-негативную линию MDA-MB-231, что свидетельствует о высокой специфичности и снижении риска неспецифической цитотоксической активности. Модель *in vivo* на мышах SCID с HER2-положительными опухолями продемонстрировала значительное уменьшение объёма опухоли с 10-ого день после введения генномодифицированных клеток, что подчёркивает терапевтический потенциал разработанных TCR-T-клеток.

### **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов**

Результаты данной работы расширяют фундаментальные знания в области инженерии Т-клеточных рецепторов и биологии антигенспецифичных Т-клеток. Применение секвенирования мРНК единичных Т-клеток для идентификации последовательностей TCR позволило проанализировать широкий спектр кандидатных клонов и оценить их клональную представленность, что позволило рационально отобрать доминирующие клонотипы с требуемым уровнем аффинности к целевому антигену.

Разработанный протокол обеспечивает высокую производительность и возможность масштабирования для создания клеточных продуктов, пригодных для клинического использования. Методология носит платформенный характер и может быть адаптирована для работы с другими опухолеспецифическими и опухолеассоциированными антигенами.

Одним из ключевых достижений исследования стало получение патента на разработанный Т-клеточный рецептор (TCR), что значительно усиливает перспективы клинического применения, открывая путь к дальнейшему внедрению в медицинскую практику.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа Алрхмуна С. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Текст изложен на 130 страницах, иллюстрирован 22 рисунками, включает 2 таблицы, список литературы содержит 334 библиографических источника.

Во введении автор представляет общую характеристику работы, которая содержит аргументацию актуальности и степень разработанности, формулирует цели и задачи своей работы, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы, изложенный в Главе 1, современен и релевантен. В нём глубоко обоснована значимость HER2/neu как терапевтической мишени при онкологических заболеваниях, рассматриваются различные современные виды иммунотерапии и место TCR-T-терапии в этом направлении. При этом автор подробно анализирует ограничения существующих подходов к терапии HER2/neu-позитивных опухолей и демонстрирует способность TCR-T-клеток компенсировать эти технологические и терапевтические ограничения. Обзор иллюстрирован качественными рисунками, охватывает широкий круг источников научной литературы и даёт полное представление о современных концепциях в области исследования.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследования, подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. Все методики, использованные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Полученные в ходе работы Алрхмуна Салеха экспериментальные данные подробно описаны в Главе 3 «Результаты», состоящей из четырёх основных подразделов. Раздел написан последовательно и логично структурирован: от секвенирования мРНК единичных клеток для выбора доминантного TCR и последующего клонирования Т-клеточных рецепторов, с использованием лентивирусной системы доставки для генерации модифицированных TCR-Т-клеток, к подробной характеристике полученных Т-клеток и оценке их функциональной активности *in vitro* и *in vivo*.

В разделе «Обсуждение» подробно и глубоко анализируются полученные экспериментальные данные в контексте современных научных представлений и литературных источников в области TCR-Т-терапии и иммунотерапии опухолевых заболеваний. Особое внимание автор уделяет сравнительному анализу разработанного подхода с современными патентными решениями в области получения HER2/neu-специфичных Т-клеточных рецепторов. Также предлагаются возможные направления дальнейших исследований на основе данной работы.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

**Степень обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность**

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных молекулярно-биологических и иммунологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки.

Материалы диссертации отражены в четырёх печатных работах, опубликованных в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, доложены и обсуждены на 7 российских и международных научных конференциях. При этом теоретические аспекты работы обобщены в двух обзорных публикациях. Публикации в рецензируемых журналах свидетельствуют о значимости полученных результатов и их признании научным сообществом.

**Замечания**

В работе можно отметить небольшое количество замечаний. Так, например, нет общего названия для Обзора литературы. Присутствует некоторое количество сленговых терминов, неудачных выражений и опечаток.

При прочтении работы возникли следующие вопросы:

1. Можете ли вы построить схему лечения пациентов с раком молочной железы с помощью TCR-T-клеточной терапии, предположить ее длительность и примерную стоимость для пациента?

2. Лечение с помощью TCR-T-клеточной терапии более подходит для солидных или гематологических опухолей? И каков возможный эффект от такого лечения на метастазы?

3. Ряд онкологических заболеваний характеризуется высоким уровнем экспрессии опухоль-специфичных генов, которые могут быть использованы для нацеливания T-клеток на опухолевые клетки. Есть ли в настоящее время препараты для TCR-T-клеточной терапии, вышедшие на рынок или находящиеся в стадии клинических исследований?

Вопросы и замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

## **Заключение**

Диссертационная работа Алрхмуна Салеха на тему «Клонирование TCR и получение HER2/neu-специфичных TCR-T-клеток с доклинической оценкой их активности» является законченной научно-квалификационной работой, в рамках которой успешно решена важная задача, имеющая большое научно-практическое значение в области иммунотерапии опухолевых заболеваний и развития T-клеточных технологий.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. По своей актуальности, новизне, уровню проведенных исследований и практической значимости диссертация соответствует требованиям пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Таким образом, соискатель Алрхмун Салех заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

