

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
**Пилунова Артема Михайловича**  
на тему: «Трансгенные Т-лимфоциты, специфичные к минорным  
антигенам гистосовместимости АСС-1У и НА-1»  
по специальности 3.2.7. «иммунология»

Генно-инженерное конструирование клеточных линий Т-лимфоцитов с заданной антигенной специфичностью и параллельное изучение функциональных особенностей и иммунных свойств созданных клеточных линий представляет одно из наиболее бурно развивающихся направлений молекулярной и клеточной иммунологии. Наряду с несомненным вкладом таких исследований в развитие современных представлений о механизмах функционирования иммунной системы человека, они крайне востребованы персонализированной медициной, поскольку способны предоставлять новейшие средства для высокоэффективной иммунотерапии онкологических заболеваний. Именно эта актуальная тематика и была выбрана для диссертационного исследования А.М. Пилунова. В ходе выполнения работы диссертантом был создан и успешно апробирован оригинальный экспериментальный подход к получению клональных линий цитотоксических Т-лимфоцитов, распознающих два минорных антигена гистосовместимости (МАГ), которые могут отличать бластоидные клетки крови пациентов с миелоидными типами лейкозов. Выверенная стратегия предложенного подхода и обобщение важнейших результатов апробации четко сформулированы в выносимых на защиту положениях.

Диссертационная работа А.М. Пилунова оформлена в полном соответствии с требованиями Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук МГУ, изложена на 139 страницах, включая 30 рисунков и 7 таблиц основного текста, а также приложения из 1 рисунка и 5 таблиц. Структура диссертации включает Введение, отдельные главы Обзор литературы, Материалы и Методы, Результаты, Обсуждение и

Заключение, в которое включены выводы и рекомендации, список цитируемой литературы, содержащего библиографические ссылки на 225 источников, благодарности и Приложения. В многочастном Введении автор излагает свои представления о научной новизне, теоретической и практической значимости, методологии выполненной работы, расшифровывает личный вклад в проведенное исследование, приводит список собственных публикаций по теме диссертации и, самое главное, дает развернутую характеристику основного объекта исследования и перспективности его использования при клеточной терапии миелобластных лейкозов. В своей совокупности все части Введения прекрасно обосновывают актуальность темы исследования и значимость выносимых на защиту положений.

В главе Обзор литературы диссертант раскрывает теоретические принципы, клиническую значимость, особенности применения некоторых современных протоколов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) при лечении гематологических заболеваний. Особое внимание автор уделяет обсуждению возможного сочетания двух разнонаправленных процессов реформирования иммунной системы организма пациентов с онкологическими заболеваниями крови, а именно – первоначальному эффективному замещению донорскими клетками системы кроветворения реципиента и желательному направлению иммунной реакции донорских лимфоцитов преимущественно на опухолевые (реакция «трансплантат против лейкоза» - РТПЛ), но не на нормальные (реакция «трансплантат против хозяина» - РТПХ) клетки пациента. Преобладающая часть обзора посвящена глубокому и разностороннему анализу использованию минорных антигенов гистосовместимости (МАГ) при терапевтической алло-ТГСК, включая вопросы формирования иммуногенности МАГ, преимуществ и ограничений использования отдельных МАГ, перспективы о особенностях МАГ-специфической терапии. Следует отметить, что А.М. Пилунов провел анализ не только большого

объема научной литературы, но и опубликованных результатов клинических исследований. Обзор написан хорошим научным языком, адекватно иллюстрирован информативными рисунками и, в целом, отражает высокий уровень теоретической подготовки диссертанта и уверенное владение самой современной информацией по тематике выполненной им диссертационной работы.

Глава Материалы и Методы приятно поражает объемом и разнообразием методологического арсенала, которым владеет соискатель. Глава состоит из 31 подраздела, содержащих описание современных методов культивирования клеточных линий, цитометрии и клеточного сортирования, высокопроизводительного секвенирования генов Т-клеточных рецепторов, геномного редактирования и других экспериментальных приемов, используемых диссертантом при создании и характеристике трансгенных линий Т-лимфоцитов человека. Большинство приведенных методик и их модификаций изложены с достаточными для независимого воспроизведения подробностями. В последнем разделе главы скрупулезно поименованы приемы и компьютерные программы, используемые при статистической обработке результатов тех или иных экспериментов.

В главе Результаты автор в исторической последовательности излагает содержание этапов своего исследования, посвященного разработке оригинального подхода к созданию инновационного препарата Т-клеточной терапии для повышения эффективности алло-ТГСК и предотвращения рецидивов миелобластных лейкозов. Созданным подход включает стадии а) МАГ-стимулированную *ex vivo* экспансию наивных Т-лимфоцитов и выявление субкультур, специфичных к выбранному МАГ, б) определение клонального репертуара полученных субкультур и секвенирование генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей Т-клеточных рецепторов (ТКР) высоко-представленных клонотипов, в) создание лентивирусных экспрессионных конструкторов и серии линий трансгенных Т-лимфоцитов, г) характеристика цитотоксических и других иммунных свойств полученных трансгенов для определения терапевтически

перспективных линий Т-клеток, обладающих полноразмерными ТКР заданной МАГ-специфичности. Изложение результатов можно условно разделить на два этапа. Первый из них был сосредоточен на исследовании субкультур Т-лимфоцитов с ТКР, специфичным к МАГ АСС1-У и посвящен совершенствованию общей стратегии разрабатываемого подхода, оптимизации условий культивирования и стимуляции наивных Т-клеток, выбору критериев функциональной активности МАГ-специфичных сублиний и другим подобным аспектам. Многоплановый анализ свойств как первично обогащенных, так и трансгенных субкультур убедительно подтвердил результативность нового подхода к созданию терапевтических препаратов и позволил идентифицировать АСС1У/HLA\_A\*24:02-специфичный Т-клеточный рецептор с ранее неизвестной структурой TRAV131\*02-TRAJ3\*01/TRBV6-5\*01-TRBD2\*02-TRBJ1-3\*01. Второй этап проведенного автором исследования посвящен применению нового экспериментального подхода к созданию и характеристике прототипа терапевтического препарата на основе трансгенных CD8+ Т-клеток с ТКР, специфичными к МАГ НА-1. На основе проведенного биоинформатического анализа баз данных и собственных результатов крупномасштабного секвенирования ТКР определены структурные особенности НА-1-специфичных рецепторов. Идентифицировано 13 новых ТКР с заданной антигенной специфичностью. Создана панель Т-клеточных линий с различными вариантами трансгенных ТКР. С использованием нескольких репортерных линий/субкультур отобраны трансгенные ТКР с наиболее высокой аффинностью и/или отсутствием аллореактивности. Получена клеточная линия с муринаезированным трансгенным ТКР и нокаутом по эндогенному ТКР, для которой показана высокая цитолитическая активность в отношении опухолевых клеток от пациентов с несколькими типами лейкозов. Суммируя степень проработки предложенного подхода и значимость полученных результатов исследование А.М. Пилунова возможно охарактеризовать как

успешную попытку создания прототипа клеточного препарата для пост-трансплантационной ТКР-терапии миелолейкозов.

В завершающей главе Обсуждение соискатель проводит сравнение областей применения CAR-T и ТКР-терапии, достоинств и недостатков обоих способов лечения злокачественных заболеваний, перспектив дальнейшего развития и вопросов, требующих дополнительного изучения. Краткое обобщение результатов собственного исследования еще раз освещает их высокую научно-практическую значимость.

### Вопросы и замечания к диссертационной работе

1. Некорректно и противоречиво описана процедура подготовки кДНК ТКР, специфичных к АСС-1У. В разделе 2.7. (стр. 43) без приведения структуры праймеров схематично указаны стадии пробоподготовки к NGS со ссылкой на публикацию [166] (Mamedov et al. 2013). Однако, цитируемая система пробоподготовки не позволяет получать и клонировать полноразмерные кДНК генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей ТКР. Вероятно, получение и секвенирование по Сенгеру полноразмерных кДНК ТКР (см. стр. 72-73) проводили так, как это описано в работе А.М.Пилунов и др., 2019. Если последнее верно, требует объяснения использование праймеров, комплементарных лишь одному V сегменту  $\beta$ -цепи и одному V сегменту  $\alpha$ -цепи генов T-клеточного рецептора.
2. В результате антиген-стимулированной экспансии наивных CD8+ клеток автором были получены 7 субкультур, содержащих АСС-1У-специфичные лимфоциты (стр. 70 и Табл.2 Приложения). Вопросы: а) По каким критериям лишь одна из них, содержащая ~87% тетрамер-позитивных клеток (рис. 7г), была выбрана для секвенирования и клонирования ТКР?; б) Проводили ли «спектротайпинг» или другую оценку клонального разнообразия всех семи полученных субкультур?

3. Для выделения фракций HA-1-специфичных клеток из субкультур Т-лимфоцитов, прошедших антиген-стимулированную экспансию, были использованы два альтернативных приема: иммуномагнитную сепарацию после рестимуляции культуры по маркеру активации CD137 или прямую сепарацию тетрамер-позитивных клеток (стр. 76-77). Какой из этих способов автор мог бы обоснованно рекомендовать для преимущественного использования в дальнейшей работе? Чем вызвана неудача секвенирования  $\alpha\beta$ ТКР пяти тетрамер-позитивных субкультур, полученных из крови донора p1221 (Таблица 1 Приложения)?
4. В разделе 3.3. или материалах Приложения отсутствуют данные о первичной обработке результатов NGS  $\alpha\beta$ ТКР HA-1-специфичных клонов. В частности, не указаны объем и глубина секвенирования каждого из образцов, не упомянута нормировка по количеству исходной РНК и/или кДНК библиотек. Отсутствие такого анализа может негативно сказываться на качестве сравнения репертуаров ТКР антиген-специфичных и антиген-неспецифичных фракций клеток.
5. Требуется уточнение в выборе критериев формирования  $\alpha\beta$  пар Т-клеточных рецепторов для анализа функциональности ТКР репортерных линий Т-лимфоцитов (раздел 3.4, стр. 85-86). Ввиду множественных опечаток и/или несоответствий крайне затруднено сопоставление сведений из Таблиц №№ 3 и 4 Приложения. Так, наименование  $\beta$ -субъединицы «p005 w5b» для ТКР «ER14» (таблица 4) отсутствует среди списка  $\beta$ -цепей и CDR3 $\beta$  в таблице 3 Приложения. Остается неясным а) все ли возможные комбинации  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей были использованы для реконструкции полных ТКР, б) допускалось ли присутствие двух  $\alpha$ -цепей в одной клетке из секвенированных культур антиген-специфичных Т-лимфоцитов. Желательно, также, получить комментарий диссертанта о выявленных

фактах различной «функциональности» ТКР, содержащих идентичные  $\beta$ -цепи, но различающиеся  $\alpha$ -субъединицы рецептора.

6. В диссертационной работе (раздел 3.7) предложена эффективная система гидовых РНК и CRISPR/Cas нокаута эндогенного ТКР. Как автор может прокомментировать целесообразность использования этой системы при разработке терапевтических препаратов на основе донорских лимфоцитов и/или клеточных линий с трансгенными ТКР.
7. В материалах диссертационной работы встречается некоторое количество стилистических ошибок, погрешностей оформления и смысловых несоответствий. Так, например, на страницах 76-77 приведено описание подготовки к секвенированию «положительной и отрицательной по экспрессии CD137 фракции... культуры (Т-лимфоцитов) из донора p180», а в Таблицах 1 и 3 Приложения нет данных о количестве секвенированных кДНК генов  $\alpha$ -цепей,  $\beta$ -цепей ТКР и соответствующих им структур CDR3 участков для донора p180, хотя обозначения этого донора и нескольких вариантов CDR3 $\beta$  присутствуют на Рисунке 13 (стр. 80).

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертация А.М.Пилунова " Трансгенные Т-лимфоциты, специфичные к минорным антигенам гистосовместимости АСС-1У и НА-1" является оригинальной научно-квалификационной работой, которая по актуальности темы проведенных исследований, достоверности и научной значимости полученных результатов, корректности и обоснованности выводов полностью соответствует всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 3.2.7. «Иммунология» (по биологическим наукам), а также критериям,

определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Пилунов Артем Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. «Иммунология»

**Официальный оппонент:**

доктор биологических наук, профессор  
главный научный сотрудник, зав. лабораторией сравнительной и функциональной геномики ФГБУН Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)

**ЛЕБЕДЕВ Юрий Борисович**

27.11.2024г. \_\_\_\_\_

Контактные данные:

тел.: +7(495)330-42-88, e-mail: lebedev\_yb@ibch.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:  
03.00.03 «молекулярная биология»

Адрес места работы:

117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10  
ФГБУН Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)  
тел.: +7 (495) 335-01-00, e-mail: office@ibch.ru

«Подпись Ю.Б.Лебедева заверяю»

Ученый секретарь ГНЦ ИБХ РАН,  
доктор физико-математических наук,  
профессор

ОЛЕЙНИКОВ Владимир Александрович