

ОТЗЫВ

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

Диссертация Пилунова Артема Михайловича посвящена разработке одного из самых современных методов терапии злокачественных опухолей, а именно TCR-T терапии. Применение этой технологии для лечения рецидивирующих лейкозов является актуальным направлением, т.к. рецидивы после трансплантации костного мозга характеризуются высокой степенью резистентности в различных видах терапии. Актуальность темы также обусловлена возможностью использования разработанных подходов для терапии злокачественных новообразований других нозологических форм.

Новизна исследования несомненная, т.к. TCR-T терапия злокачественных опухолей и лейкозов, в частности, находится на стадии доклинических и клинических исследований в мире, а в Российской Федерации представлены единичными публикациями и исследование автора является одной из первых работ в этом направлении. Автором впервые получены сиквенсы вариабельных доменов клеточного рецептора, специфичные к минорным антигенам гистосовместимости, а также отработаны методические подходы для получения трансгенных лимфоцитов, экспрессирующих искусственный TCR. Доказана перспективность использования такого подхода для лечения рецидивов лейкозов у пациентов позитивных по соответствующему минорному антигену.

Теоретическая и практическая значимость работы обусловлена тем, что автором подтверждено, что минорные антигены гистосовместимости могут быть мишенями иммунотерапии в ряде гематологических заболеваний, таких как ОМЛ, В- и Т-клеточные лейкозы, а использованные методы селекции и получения TCR-T, цитотоксичных по

отношению к реципиент-специфическим эпитопам, могут быть транслированы для применения в клинических исследованиях.

Диссертационная работа построена по классическому типу и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 225 источников. Работа изложена на 136 страницах, содержит 30 рисунков, 7 таблиц и приложение из 1 рисунка и 5 таблиц.

В обзоре литературы автор подробно описывает проблему лечения злокачественных лейкозов их рецидивов и возможную роль минорных антигенов развитию РПТХ и РПТЛ, а также приводит данные о современных технологиях клеточной и иммунной терапии злокачественных лейкозов. В результате им формулируются цель и задачи исследования. В Главе Материалы и методы приводится подробное описание арсенала использованных методов. Он включает основные современные методы иммунологии и молекулярной биологии, такие как секвенирование и биоинформационный анализ репертуара специфических Т-клеточных рецепторов, клонирование генов альфа и бета цепей пар и их функциональная проверка. Получение цитотоксичных, по отношению к антиген-позитивным клеткам TCR-Т лимфоцитов и др.

Глава 3 «Результаты» состоит из 9 параграфов, в которых автор подробно описывает этапы получения популяции активированных целевым эпитопом лимфоцитов, их селекцию, получение сиквенсов Т-клеточных рецепторов, методы получения функциональных пар и их проверку. Использованный комплекс современных методов позволил автору впервые в нашей стране получить TCR-Т популяции лимфоцитов, специфически распознающие эпитопы минорных антигенов гистосовместимости на поверхности клеток мишеней и вызывающие специфический их лизис. Особо хотелось обратить внимание на две составляющие: биоинформационный

анализ сиквенсов репертуаров целевых ТКР и проверка их функциональности с использованием репортерных линий лимфоцитов.

Особого внимания заслуживает раздел по проверки функциональности полученных конструкций и клеточных линий на мононуклеарах здоровых доноров и пациентов со злокачественными новообразованиями крови, имеющими различный генотип как по минорному антигену гистосовместимости, так и по отличающиеся по аллелю HLA-A*02. Разработанный комплекс методических подходов является универсальным и позволяет использовать его для получения TCR-T для любых эпитопов, презентруемых выбранными генотипами HLA. Особо хотелось подчеркнуть методологический подход автора для подавления экспрессии эндогенного ТКР. Использование технологии CRISPR/Cas позволило автору получить высокофункциональные линии лимфоцитов, экспрессирующих специфический к минорным антигенам гистосовместимости ТКР. Другим важным достижением работы являются результаты автора по исследованию цитотоксичности полученных TCR-T по отношению к злокачественным клеткам, позитивным по эпитопу МАГ HA-1 с разными нозологическими формами злокачественной патологии клеток крови. Было показано, что МАГ HA-1 может являться потенциально универсальной иммуногенной мишенью для иммунотерапии различных злокачественных гематологических новообразований. Хотелось обратить также внимание, что автор проверил аллореактивность полученных ТКР по отношению к наиболее часто-встречающимся аллелям HLA (всего 37) и показал, что полученные ТКР безопасны для пациентов, несущих эти генетические варианты, и это позволяет говорить о практической возможности применения разработанных TCR-T для широкого круга пациентов. Достижение этих результатов позволяет, после проведения соответствующих доклинических исследований, надеяться на внедрение полученных TCR-T в клиническую практику для терапии различных онкогематологических заболеваний. Все полученные

автором данные высоко достоверны, т.к. получены на достаточном объёме экспериментального материала и их статистическая значимость подтверждена. Выводы, сформулированные автором, подтверждаются приводимыми результатами исследования.

Использованный автором подход и примененный комплекс методов позволяет транслировать его для разработки TCR-T терапии широкого круга онкологических патологий, характеризующихся наличием специфических иммунологических свойств. Такими мишенями могут быть, например, соматические мутации в опухоли. Разработанные методы позволяют получать индивидуализированные клеточные препараты, обладающие высокой специфичностью и низкой токсичностью. Это подчеркивает высокую практическую значимость полученных автором результатов.

Автореферат и публикации автора отражают основные положения диссертации.

В качестве замечания хотелось обратить внимание на отсутствие в разделе Материалы и методы сиквенса использованных в работе пептидных эпитопов генов HA-1 и ACC-1Y. В то время как в Литературном обзоре приводятся соответствующие сиквенсы. Также хотелось обратить внимание, что для решения проблем получения специфических пар T-клеточных рецепторов используют метод секвенирования их последовательностей из единичного лимфоцита. Этот подход позволяет избежать трудоемкого биоинформационного анализа репертуара последовательностей и сразу получить необходимые пары сиквенсов переменных доменов T-клеточных рецепторов.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает 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 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 медицинских наук, профессор
Зав. отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии
опухолей Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава
России.

Боженко Владимир Константинович

Контактные данные:

тел.: _____ e-mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.01.12 - Онкология

Адрес места работы:

117997, город Москва, улица Профсоюзная 86 Федерального
государственного бюджетного учреждения российский научный центр
рентгенорадиологии Минздрава России, зав.отделом молекулярной биологии
и экспериментальной терапии опухолей
Тел.: 8(499)1201114 ; e-mail: vbojenko@rncrr.ru

Подпись Боженко В.К. удостоверяю

Ученый секретарь

ФГБУ РНЦРР Минздрава России

д.м.н., профессор _____ Цаллагова З.С.

20.11.2024 г.