

**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**

Актуальность темы диссертации не вызывает сомнений. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток сопряжена со значительным риском рецидива злокачественного заболевания крови, и предложенные в диссертации подходы к решению этой проблемы определенно заслуживают внимания. Работа посвящена созданию генетически модифицированных Т-киллеров, способных распознавать минорные антигены гистосовместимости – презентруемые в молекулах HLA пептиды, различающиеся у донора и реципиента из-за генетического полиморфизма, и специфически уничтожать только клетки крови, несущие минорные антигены. Для потенциального применения такой терапии необходимо соблюдение двух условий – хотя бы частичное совпадение пары донор-реципиент по генам главного локуса гистосовместимости и различие в полиморфизмах, приводящих к образованию минорных антигенов. Как справедливо отмечает автор, ниша применения такой терапии довольно ограничена, однако это не отменяет актуальности исследования выбранных минорных антигенов НА-1 и АСС1-У как мишеней Т-клеточной терапии благодаря тканеспецифичной экспрессии этих антигенов и потенциальной диагностичности такой терапии, поскольку НА-1 и АСС-1У широко экспрессированы в клетках злокачественных новообразований крови различных нозологий.

Диссертационная работа Пилунова Артема Михайловича имеет классическую структуру и содержит обзор литературы, описание методов, полученных результатов и обсуждение. Работа изложена на 136 страницах, содержит 30 рисунков, 7 таблиц и приложение из 1 рисунка и 5 таблиц.

Литературный обзор исчерпывающим образом описывает проблематику минорных антигенов гистосовместимости: в обзоре освещена история изучения минорных антигенов, подробно раскрывается молекулярный механизм их возникновения и на примере клинических наблюдений обосновывается целесообразность применения минорных антигенов гистосовместимости как терапевтических мишеней. В обзоре также приведен подробный анализ клинических испытаний с использованием минорных антигенов гистосовместимости.

Раздел «материалы и методы» подробно описывает использованные в диссертации молекулярно-биологические методы, протоколы работ с клеточными культурами, использованные в работе реагенты и статистические методы.

Раздел «результаты» описывает данные, полученные вследствие изучения лимфоцитов, специфичных к минорным антигенам гистосовместимости АСС-1У и НА-1 соответственно.

Первая часть результатов посвящена изучению ТКР, специфичного к минорному антигену АСС-1У. Раздел начинается с получения и исследования АСС1-У-специфичного Т-клеточного клона с помощью тестов на секрецию IFN- γ и цитотоксичность. Т-клетки, трансдуцированные лентивирусным конструктором, несущим трансгенный АСС-1У-специфичный ТКР демонстрировали антиген-специфичную секрецию IFN- γ . Таким образом автором была проведена валидация используемого подхода.

Рецепторы, специфичные к антигену НА-1, исследованы значительно более подробно в данной диссертации в виду большего клинического значения для российской популяции исходя из частоты встречаемости аллелей HLA-A*02 и HLA-A*24. Описан биоинформатический анализ, с помощью которого были отобраны субъединицы ТКР, наиболее вероятно принадлежащие НА-1-специфическим клонам Т-лимфоцитов. Детально описано конструирование генетически модифицированных Т-лимфоцитов со специфичностью к данному антигену, включая клонирование отобранных

цепей ТКР в лентивирусный вектор и исследование аффинности, кроссреактивности различных функциональных комбинаций цепей ТКР. Данный анализ проводился с помощью модели репортерных Т-лимфоцитов J76 и исследования их ответа на клетки крови здоровых доноров и пациентов с лейкозами, положительных и отрицательных по HA-1. Таким образом, были отобраны 3 наиболее подходящих для разработки Т-клеточной терапии ТКР с последующим сужением этого пула до наиболее высокоаффинного и некроссреактивного ТКР E28. Наконец, продемонстрирован цитотоксический ответ CD8⁺ лимфоцитов, модифицированных HA-1-специфичным ТКР лентивирусной трансдукцией и CRISPR/Cas нокаутом эндогенного ТКР, на клетки крови пациентов с различными типами лейкозов, что подтверждает применимость метода для разработки терапии.

Основные положения и выводы, сформулированные в данной диссертации, полностью обоснованы и следуют из представленных в работе данных. Сформулированная цель работы выполнена – представленный метод позволяет получить трансгенные Т-лимфоциты, распознающие МАГ HA-1 и АСС-1У. Поставленные задачи выполнены, выносимые на защиту положения и выводы соответствуют друг другу. Приведенные репрезентативные данные цитометрии убедительно свидетельствуют о цитотоксичности трансгенных CD8⁺ Т-лимфоцитов в отношении клеток крови пациентов с антигеном HA-1.

Достоверность приведенных данных в целом не вызывает сомнений. Следует прокомментировать результаты опыта с трансгенными АСС-1У-специфичными лимфоцитами. Хотя доля клеток в трансгенной культуре, ответивших секрецией IFN- γ , составляла всего около 3% (рис.10), в то время как в нативной культуре таких клеток было 40% (рис.8), представленные результаты можно считать достоверными, поскольку был выполнен анализ

количества интеграций вектора на геном и порядок количества интеграций соответствует порядку количества ответивших клеток.

Эксперименты по изучению свойств HA-1-специфичных рецепторов выполнены в достаточном числе повторений, выборка образцов крови пациентов со злокачественными новообразованиями крови достаточна, чтобы подтвердить третий вывод диссертации, а именно то, что трансгенные лимфоциты уничтожают только клетки с антигеном HA-1, не проявляя цитотоксичности в отсутствие этого антигена. В экспериментах использованы образцы крови пациентов с различными нозологиями (Т- и В-клеточные лейкозы, ОМЛ), и поскольку во всех случаях наблюдался эффективный лизис, можно поддержать утверждение о потенциально диагност-агностичной терапии. Функциональность HA-1-специфичных ТКР была также показана ортогональным методом, а именно измерением секреции IFN- γ . Для выявления кроссреактивности HA-1-специфичных ТКР была использована достаточно большая панель образцов с различными аллелями HLA, чтобы считать вывод об отсутствии кроссреактивности достоверным.

Научная новизна представленной работы, во-первых, связана с относительной малоизученностью минорных антигенов гистосовместимости, а во-вторых, с новизной технологии трансгенных лимфоцитов в России. Можно утверждать, что в рамках представленной работы впервые в России были созданы трансгенные Т-лимфоциты, распознающие минорные антигены гистосовместимости на клетках крови. Использованный в работе CRISPR/Cas нокаут в настоящее время становится стандартом при создании трансгенных терапевтических Т-клеточных продуктов и свидетельствует о продвинутом техническом уровне работы.

Однозначно имеют научную новизну опубликованные последовательности ТКР, специфичных к HA-1 и ACC-1Y. Описанный метод в целом может быть использован для поиска и изучения ТКР, специфичных к другим антигенам.

При анализе работы возникли следующие замечания:

Во-первых, хотя в целом использованные в работе методы достаточно унифицированы, в некоторых моментах наблюдается непоследовательность. В частности, для магнитной сепарации НА-1-специфичных лимфоцитов из первичной культуры используются и тетрамеры, и маркер активации CD137, что может вносить дополнительные ошибки в последующий анализ. Кроме того, для изучения ТКР, специфичных к АСС-1У и НА-1 используются разные лентивирусные конструкторы и различные методы получения лентивирусных частиц. Для дальнейших экспериментов указанные методы рекомендуется унифицировать.

Во-вторых, использование муриназированных ТКР, оправданное с точки зрения генной инженерии, может быть ограничено при клиническом применении. Как известно, в целях безопасности терапевтические антитела подвергаются максимально возможной гуманизации, в данном же клеточном продукте используются целый домен потенциально чужеродного белка. В целом, для разработки proof-of-concept и подтверждения возможной применимости клеточной или терапии моноклональными антителами действительно применяется метод с частично гуманизированными антителами (например, таким инструментом являются мыши NeoMab), однако золотым стандартом все же является приведение молекулы к структуре, наиболее близкой к человеческой. Автором приведена одна публикация, свидетельствующая о безопасном применении Т-клеток с муриназированным ТКР, однако большего количества доказательств не представлено, и при разработке полноценного лекарственного средства будет необходима дополнительная валидация безопасности клеточного продукта.

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, 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:

Кандидат медицинских наук,
Старший научный сотрудник лаборатории мультиомики Центра Живых Систем
ФГАОУ ВО "Московский физико-технический институт
(Национальный Исследовательский Университет)"

Табаков Дмитрий Вячеславович

22.11.2024 г.

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
14.01.12 - Онкология

Адрес места работы:

141701, Московская область, г.Долгопрудный, Институтский пер. 9, стр. 7
Лаборатория мультиомики Центра Живых Систем _
ФГАОУ ВО "Московский физико-технический институт
(Национальный Исследовательский Университет)"
Тел.: _____; e-mail: tabakov.dv@mipt.ru

Подпись Табакова Д.В. удостоверяю:

Ученый секретарь ученого совета
ФГАОУ ВО "Московский физико-технический институт
(Национальный Исследовательский Университет)"

Доктор экономических наук, доцент _____ Евсеев Е.Г.
22.11.2024 г.