

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения «Томский
национальный исследовательский
медицинский центр Российской
академии наук», доктор
биологических наук, профессор,
академик РАН

В.А. Степанов

«24 декабря» 2025г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Алсаллум Алаа «Фенотипические и функциональные характеристики Т-лимфоцитов с генетически-модифицированным Т-клеточным рецептором, специфичным к антигену NY-ESO-1» на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 3.2.7. Иммунология.

Актуальность темы диссертационной работы

В современных исследованиях в области иммунотерапии онкологических заболеваний активно разрабатываются новые подходы, направленные на повышение способности иммунной системы распознавать опухолевые клетки и усиливать их противоопухолевую активность. Очевидно, что основные требования к новому методу должны быть связаны с повышением иммуногенности и киллерного потенциала специфических эффекторов.

Одним из перспективных направлений является адоптивная Т-клеточная терапия с использованием генетически модифицированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих Т-клеточные рецепторы (TCR). Они способны распознавать

внутриклеточные опухолевые антигены, представленные в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC I).

Особое внимание автор уделил антигену NY-ESO-1 - высокоиммуногенному представителю семейства раково-тестикулярных антигенов, для которого характерна невысокая экспрессия в нормальных тканях и, напротив, аберрантное ее повышение при солидных опухолях.

В данной работе изучаются функциональные характеристики TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к раково-тестикулярному антигену NY-ESO-1, с применением современных методов, включая секвенирование РНК одиночных клеток (scRNA-seq). Такой подход позволяет детально охарактеризовать фенотипические и транскриптомные профили клеток, выявить их гетерогенные субпопуляции и глубже понять механизмы реализации противоопухолевого потенциала TCR-Т-лимфоцитов. Выполнив все запланированные исследования, автор представил корректную картину фенотипического разнообразия, и, что очень важно, получил опыт проведения ретровирусной трансдукции, - создал популяцию генетически модифицированных Т-лимфоцитов. Таким образом, проведённое исследование является важным шагом в развитии адаптивной клеточной терапии и представляет актуальную научную задачу для совершенствования стратегий лечения солидных опухолей. Все полученные результаты были верифицированы на модели ксенотрансплантатов клеток меланомы и открыли путь для создания метода, отличающегося сочетанием как антиген-зависимого, так и TCR-независимого противоопухолевого действия.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертационной работы полностью соответствует специальности 3.2.7. Иммунология (Направления исследования: №3 Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты. №7 Разработка способов воздействия на иммунную систему с

помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий.

Основные результаты диссертационной работы

Основным достижением в данной работе является получение популяции генетически модифицированных TCR, распознающих эпитоп NY-ESO. Субпопуляционный состав лимфоцитов включает CD8⁺ и CD4⁺ лимфоциты и ряд ингибиторных рецепторов, терминально дифференцированные эффекторные и Т-клетки памяти. В представленной работе проведено комплексное исследование функциональных свойств NY-ESO-1 специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов. Для генной модификации использовалась ретровирусная конструкция, кодирующая α - и β -цепи Т-клеточного рецептора, содержащие аминокислотные замены Gly⁵⁰→Ala и Ala⁵¹→Glu в CDR2-домене β -цепи. Указанные замены обеспечивают повышение аффинности связывания TCR с пептид-МНС-I-комплексом антигена NY-ESO-1.

Фенотипический анализ полученных Т-клеток продемонстрировал гетерогенность популяции, включавшей наивные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты, а также субпопуляции терминально дифференцированных эффекторных клеток памяти. Сохранение значительной доли наивных клеток рассматривается как благоприятный признак для адоптивной клеточной терапии, обеспечивающий пролонгированную персистенцию TCR-модифицированных клеток *in vivo*.

Транскриптомный анализ выявил активацию генов, ответственных за миграцию (*CCR2*, *CCR5*, *ITGAM*) и активацию Т-лимфоцитов (*CD96*, *TNFSF8*). При совместном культивировании TCR-модифицированных Т-лимфоцитов с NY-ESO-1⁺ опухолевыми клетками линии SK-Mel-37 отмечено повышение экспрессии генов IFN- γ -сигнального пути при одновременном снижении экспрессии регуляторных генов (*FOXP3*, *TGFB1*, *CTLA4*). Это указывает на дифференцировку клеток в направлении эффекторного фенотипа.

Подтверждением служат результаты проведенного функционального исследования *in vitro*, показавшие, что NY-ESO-1-специфичные TCR-T-лимфоциты проявляют выраженную антиген-специфическую цитотоксичность в отношении NY-ESO-1⁺ опухолевых клеток. Это сопряжено с экспрессией маркеров цитотоксичности (CD107a, FasL), сопровождающейся усиленной продукцией цитотоксических молекул (перфорина, гранзимов В и А, гранулизина) и провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17). Это свидетельствует об активации основных механизмов Т-клеточной цитотоксичности - перфорин-гранзимного, Fas/FasL-опосредованного и цитокин-зависимого путей.

Полученные закономерности проверены автором при исследовании противоопухолевого действия *in vivo*, установлено, что введение NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов в ксенотрансплантат меланомы SK-Mel-37 приводило к полной регрессии опухоли.

Автором была поставлена задача проведения секвенирования одиночных клеток, ее решение (транскриптомный анализ Т-лимфоцитов периферической крови животных на 14-е сутки после введения выявил субпопуляции CD8⁺ терминально дифференцированных эффекторных клеток памяти с повышенной экспрессией генов цитотоксических молекул (*PRF1*, *GZMB*, *GZMH*, *GNLY*) и рецепторов NK-клеток (*NKG7*, *KLRK1*, *FCGR3A*), а также повышенной экспрессией ингибиторных рецепторов (*LAG3*, *KLRG1*, *KLRC1*, *CD300A*), что указывает на потенциальное наличие двойного механизма противоопухолевого действия: TCR-зависимого (антиген-специфического) и TCR-независимого, опосредованного активацией рецепторов врождённого иммунитета.

Наряду с этим выявлены CD4⁺ эффекторные клетки памяти, у которых наблюдался аналогичный, но менее выраженный транскрипционный профиль, включая повышение экспрессии *PRF1*, *GNLY*, *GZMH* и *GZMB*, что указывает на их возможное участие в TCR-опосредованном лизисе опухолевых клеток.

Таким образом, было показано, что NY-ESO-1-специфичные TCR-модифицированные Т-лимфоциты обладают выраженной противоопухолевой активностью *in vivo* за счёт действия терминально дифференцированных CD8⁺ и CD4⁺ эффекторов памяти, несущих TCR. Полученные данные подчёркивают потенциал разработанной TCR-конструкции для дальнейшего усовершенствования подходов адоптивной терапии солидных опухолей.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов базируется на достаточном объеме проведенных *in vivo* и *in vitro* экспериментальных исследований. Цель и задачи работы, сформулированные автором, выполнены в полном объёме. Достоверность полученных результатов обеспечивается продуманным дизайном исследования, использованием современных высокоинформативных иммунологических и в том числе молекулярных методов исследования. Результаты работы получены на сертифицированном и откалиброванном оборудовании. Полученные автором экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны. Положения, выносимые на защиту, в полной мере подтверждены полученными результатами. Выводы основываются на полученных результатах исследования.

Научная новизна

Впервые проведена комплексная фенотипическая и транскриптомная характеристика TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к комплексу NY-ESO-1_{157–165}/HLA-A*02:01, с использованием оптимизированной конструкции TCR с усиленной аффинностью, включающей аминокислотные замены в CDR2-домене β-цепи (Gly50→Ala, Ala51→Glu).

Показано, что полученные клетки сочетают фенотип наивных и терминально дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов памяти и

обладают антиген-специфической цитотоксичностью в отношении несущих NY-ESO-1⁺ опухолевых клеток.

Получены новые данные о молекулярных механизмах цитотоксической активности NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов, включая повышенную экспрессию CD107a и FasL на CD8⁺ Т-клетках, а также секрецию гранзимов, перфорина, цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 и растворимого Fas-лиганда (sFasL).

Впервые установлено, что взаимодействие TCR-модифицированных Т-лимфоцитов с опухолевыми клетками приводит к индукции эффекторного фенотипа, сопряженного с активацией IFN- γ -зависимого сигнального пути и снижением экспрессии генов Т-регуляторных клеток.

В экспериментальной модели ксенотрансплантата меланомы SK-MEL-37 у иммунодефицитных мышей линии NRG введение NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов приводило к выраженному противоопухолевому эффекту с полной регрессией опухоли.

С использованием высокотехнологичного метода секвенирования одиночных клеток (scRNA-seq) в работе впервые охарактеризовано функциональное состояние NY-ESO-1-TCR-модифицированных Т-лимфоцитов *in vivo*, выявлена субпопуляция CD8⁺ терминально дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов памяти, экспрессирующих гены, характерные для NK-клеток (*KLRK1*, *FCGR3A*, *NKG7*), что свидетельствует о вовлечении комбинированных TCR-зависимых и TCR-независимых механизмов противоопухолевой цитотоксичности.

Получены оригинальные данные об активации экспрессии генов ингибиторных рецепторов, а именно *KLRC1*, *KLRG1*, *CD300A* и *LAG3*. Возможность регуляции активности указанных генов открывает перспективы повышения эффективности TCR-терапии путем модуляции активности этих генов.

Теоретическая значимость работы

Диссертационное исследование Алсаллум Алаа вносит существенный вклад в развитие фундаментальных основ TCR-модифицированной клеточной терапии. Полученные данные о фенотипических и функциональных характеристиках TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к антигену NY-ESO-1, расширяют современные представления о механизмах противоопухолевого иммунного ответа.

Ключевым теоретическим результатом работы является выявление субпопуляции CD8⁺ терминально дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов памяти с признаками НК-клеточного фенотипа. Транскриптомный профиль модифицированных TCR лимфоцитов свидетельствует о их функциональной пластичности и способности осуществлять как TCR-опосредованные, так и TCR-независимые пути активации.

Полученные результаты углубляют понимание молекулярных основ дифференцировки и функционирования генетически модифицированных Т-лимфоцитов, что имеет важное значение для совершенствования стратегий адоптивной клеточной терапии злокачественных новообразований.

Научно-практическая значимость работы

Диссертационная работа Алсаллум Алаа обладает высокой научно-практической значимостью. В исследовании получены новые данные о механизмах и конкретных эффекторах противоопухолевого действия NY-ESO-1-специфичных TCR. Выявление генов, вовлеченных в цитотоксический эффект модифицированных клеток расширяют наши представления о механизмах терапевтической эффективности полученной в работе TCR-конструкции против NY-ESO-1-позитивных опухолей. С использованием экспериментальной модели ксенотрансплантата опухоли у мышей, были получены данные, представляющие основу для дальнейших исследований и оптимизации протоколов TCR-терапии. Полученные результаты

подтверждают перспективность применения клеточной терапии и имеют ценность для разработки усовершенствованных протоколов, предусматривающих сочетание с другими терапевтическими подходами, такими как блокада иммунных контрольных точек и/или активация NK-рецепторов, с целью повышения эффективности лечения.

Особую значимость работы представляет выявление того, что NY-ESO-1-специфичный TCR индуцирует в CD4⁺ эффекторных Т-клетках памяти транскриптомный профиль, характерный для цитотоксических лимфоцитов. Это создаёт предпосылки для разработки новой стратегии целенаправленного получения МНС-I-реактивных цитотоксических CD4⁺ Т-лимфоцитов, способных эффективно участвовать в противоопухолевом иммунном ответе.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, изложена на 119 страницах машинописного текста и включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов исследования», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы». Работа иллюстрирована 23 рисунками и 6 таблицами. «Список литературы» включает 314 источников. В разделе «Введение» обоснована актуальность темы, аргументированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Содержание раздела «Обзор литературы» полностью соответствует теме диссертации, материалами обзора литературы обоснована необходимость проведения настоящего исследования. Полнота изложения материала подтверждает знание диссертантом современных научных данных по изучаемой проблеме. Глава «Материалы и методы» посвящена описанию использованных в работе методик. В материалах главы «Результаты» представлены результаты получения NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, их комплексная фенотипическая и

функциональная характеристика, включая анализ профиля экспрессии генов с использованием технологии NanoString, оценку противоопухолевой цитотоксичности в модели ксенотрансплантата меланомы, а также исследование функционального статуса этих клеток *in vivo* методом одноклеточного РНК-секвенирования. В главе «Обсуждение» приведены результаты анализа полученных данных и их интерпретация с привлечением литературных источников. Выводы, основанные на результатах, обоснованы и четко сформулированы.

Материалы диссертации доложены на российских и международных конгрессах и конференциях. Основные результаты диссертации представлены в 4-х печатных работах в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций (названия журналов: «Иммунология», «Frontiers in Immunology», «Biomedicines», «Clinical and Translational Medicine»).

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.


Заключение

Диссертационная работа Алсаллум Алаа «Фенотипические и функциональные характеристики Т-лимфоцитов с генетически-модифицированным Т-клеточным рецептором, специфичным к антигену NY-ESO-1» на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 3.2.7. Иммунология, является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и посвященной решению актуальной для современной иммунологии научной задачи – получена популяция TCR-T клеток, трансдуцированных ретровирусным вектором NY-ESO-1_{157–165}/HLA-A*02:01; обладающая противоопухолевым действием и обосновано ее применение в адоптивной клеточной терапии опухолей.

Диссертация полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в действующей редакции постановления Правительства РФ от 16 октября 2024 года №1382), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании межлабораторного семинара НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 11 от 23 декабря 2025 г.).

Врио заместителя директора НИИ онкологии
Томского НИМЦ по научной работе,
зав. лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии
НИИ онкологии Томского НИМЦ,
д. б. н, профессор
член-корреспондент РАН

 Н.В. Чердынцева

Подпись доктора биологических наук, профессора, член-корреспондента РАН
Чердынцевой Н.В.

«ЗАВЕРЯЮ»:

Ученый секретарь Томского НИМЦ,
кандидат биологических наук

«23» декабре 2025 г.



 И.Ю. Хитринская

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».
Адрес: 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10
Телефон: 8(3822) 51-22-28; center@tnimc.ru; сайт: <https://www.tnimc.ru>