

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук, профессора Рукавицына Олега Анатольевича, начальника гематологического центра федерального государственного бюджетного учреждения «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко», на диссертацию Мисюрина Всеволода Андреевича «PRAME – драйверный белок канцерогенеза и мишень противоопухолевой терапии», представленную к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия

### **Актуальность темы**

Раково-тестикулярный белок PRAME является одним из большого количества антигенов, ассоциированных с ростом злокачественных новообразований. Как ген, так и белок PRAME активно изучаются на протяжении последних лет. Известно, что PRAME может блокировать клеточную дифференцировку, а также увеличивать скорость пролиферации. Известно о PRAME-опосредованной резистентности к химиопрепаратам при лимфоме Ходжкина и раке молочной железы. В представленной работе белок PRAME рассмотрен с позиции драйвера. Наличие его, с одной стороны, способствует выживаемости опухолевой клетки, с другой - может сделать опухолевую клетку чувствительной к PRAME-направленным методам таргетной терапии. Однако методы специфической терапии пока не разработаны. Причина – недостаточный объем информации о биологии гена и белка PRAME. Исследование драйверных свойств белка PRAME

необходимо для разработки методов таргетной терапии опухолевых заболеваний.

### **Степень новизны, достоверности и обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Автором продемонстрированы драйверные свойства гена *PRAME* на модели неопухолевой диплоидной клеточной линии фибробластов человека WI-38, трансфицированной вектором для экспрессии *PRAME*. Установлена способность трансфицированных клеток к росту в условиях дефицита сыворотки, и к формированию колоний при росте на полутвёрдой среде.

Установлена взаимосвязь уровня экспрессии *PRAME* со снижением параметров общей и бессобытийной выживаемости при аденокарциноме, раке молочной железы, раке толстого кишечника, плоскоклеточном раке головы и шеи, светлоклеточной карциноме почки, аденокарциноме и плоскоклеточном раке лёгкого, аденокарциноме поджелудочной железы, меланоме кожи и раке эндометрия. Показано, что поражение костного мозга и лимфатических узлов, а также лейкемизация при фолликулярной лимфоме и Т-клеточных лимфомах сопровождается экспрессией *PRAME*. Установлено, что значимым регулятором экспрессии *PRAME* является RNF8. Доказан синергизм бортезомиба с цисплатином, цитарабином, доксорубицином, мелфаланом и циклофосфамидом, проявляющийся на линиях опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии *PRAME*. Разработан препарат химерных моноклональных антител для терапии *PRAME*-позитивных онкологических заболеваний.

### **Оценка содержания и оформления диссертации**

Диссертация написана по общепринятому плану, общий объём 228 страниц, содержит 21 таблицу и 69 рисунков. Текст организован в главы введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы.

Во введении автор формулирует проблему значительной частоты экспрессии раково-тестикулярного белка PRAME при онкологических заболеваниях и недостаточной его изученности.

В обзоре литературы автор анализирует имеющийся объем информации о биологии гена *PRAME* и свойствах белка PRAME. Оценивается результативность существующих методов иммунотерапии по отношению к PRAME-позитивным больным и рассматриваются известные данные о прогностической значимости экспрессии PRAME. Это позволило автору обосновать драйверные свойства белка PRAME. Он рассмотрен как фактор, обеспечивающий опухолевой клетке самодостаточность в пролиферативных сигналах, провоцирующий изменения морфологии клеток. А также влияющий на метаболизм и генетическую нестабильность, снижение чувствительности к апоптозу и рост-ингибирующим сигналам, обеспечивающий неоангиогенез, способствующий блокированию дифференцировки и апоптоза. Однако при этом повышается иммуногенность опухолевой клетки.

В материалах и методах подробно перечислены экспериментальные методы, использованные при выполнении данного исследования. Они являются адекватными для решения задач исследования. Обосновано применение статистических критериев.

Результаты исследования изложены в третьей главе. Автором создана модельная неопухолевая линия WI38, в которую трансфицирован вектор для экспрессии гена *PRAME* и исследованы изменения, происходящие в этой линии клеток. Полученная линия обладала большей скоростью пролиферации по сравнению с исходной, и отличалась увеличенной способностью выживать в культуральной среде. Полученная линия клеток была способна формировать колонии во время культивирования на полутвёрдой среде. Проведён также анализ выживаемости больных с широким спектром злокачественных опухолей в зависимости от величины уровня экспрессии *PRAME*. Автором доказано, что в большинстве случаев

активность PRAME сопровождается ухудшением прогноза заболевания и снижением эффективности проводимой терапии. Особенно интересные данные получены для таких заболеваний, как фолликулярная лимфома и Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания. Так, при полученные автором результаты позволяют усовершенствовать систему прогнозирования течения этих заболеваний. Позиция «драйверности» PRAME убедительно обоснована автором. Это дает возможность разработки таргентной анти-PRAME терапии. Изложены результаты экспериментов по созданию подходов по терапии PRAME-экспрессирующих заболеваний. Автором показана возможность блокирования транскрипционного фактора PNF8 для снижения уровня экспрессии PRAME. Это делает опухолевую клетку менее жизнеспособной и более чувствительной к цисплатину. Автором также предложена иммунотерапия, выполняемая при помощи моноклональных антител. Были созданы и успешно применены химерные аналоги этих антител *in vitro* и *in vivo*. Наконец, продемонстрирована способность бортезомиба уменьшать негативные последствия экспрессии PRAME.

В четвертой главе автор оценивает перспективы применения разработанных методов. В завершающей главе изложены выводы, которые соответствуют поставленным задачам.

Список литературы содержит ссылки на 300 источников, из которых 20 – на русском языке, и 280 – на английском. Автореферат диссертации полностью отражает объём проведённых исследований.

### **Научная и научно-практическая значимость**

Автором получен большой объем важной информации о течении злокачественных опухолей с гиперэкспрессией белка PRAME в опухолевых клетках. В частности, результаты работы позволяют объяснить неудачи терапии и снижение общей выживаемости у отдельных групп онкологических больных. Внедрение методов диагностики активности PRAME на уровне белка или мРНК позволит улучшить существующие

прогностические модели. Автором предложен способ выделить прогностически неблагоприятную группу больных фолликулярной лимфомой.

Обоснованы подходы, с помощью которых можно разрабатывать новые способы терапии PRAME- экспрессирующих заболеваний. Так, обнаружена PNF8-зависимая регуляция экспрессии PRAME. Поскольку PNF8 не является значимым для соматических клеток транскрипционным фактором, автором показана возможность разработки средств для блокирования его экспрессии с целью снизить активность белка PRAME. Продемонстрировано, что бортезомиб может быть рекомендован для внедрения в клиническую практику для увеличения чувствительности PRAME-экспрессирующих опухолей к цисплатину, цитарабину, доксорубину, мелфалану и циклофосфамиду. Автором разработано химерное PRAME-распознающее антитело 6H8. Это антитело может быть использовано для терапии PRAME-экспрессирующих больных.

Принципиальных замечаний к работе и вопросов нет.

### **Апробация работы**

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них – 10 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК перечнем Минобрнауки России. Основные положения научной работы представлены на научных конференциях в России и за рубежом, в том числе на 19th Congress of the European Hematology Association (Милан, 2014); XI Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Милан, 2014); Научной Сессии НИЯУ МИФИ «Наноматериалы для терапии, диагностики и мониторинга результатов лечения» (Москва, 2015); VII Съезде Российского общества медицинских генетиков, (Санкт-Петербург, 2015); XIX Российском онкологическом конгрессе, (Москва, 2015); III конгрессе гематологов России, Москва, (Москва, 2016); XI и XII Всероссийской научно-практической конференции «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике», (Москва, 2014 и 2015); XIII и XIV

Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные 14 противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова, (Москва, 2016 и 2017); Конференции с международным участием «Меланома и опухоли кожи», (Москва, 2018); IV, V и IV Петербургском онкологическом Форуме «Белые ночи» Санкт-Петербург, 2018, 2019 и 2020); I, II, III, IV и V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2015, 2016, 2017, 2018 и 2019); Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2019", (Москва, 2019).

### **Заключение**

Диссертационная работа Всеволода Андреевича Мисюрина «PRAME – драйверный белок канцерогенеза и мишень противоопухолевой терапии» является законченным научно-квалификационным трудом, в котором общий объём выполненных автором исследований позволяет предложить новое решение проблемы экспрессии драйверного белка PRAME в опухолевых клетках различного гистогенеза, что создаёт теоретическую и практическую базу для разработки способов терапии онкологических заболеваний путём блокирования функций, выполняемых белком PRAME, а также методами иммунотерапии.

Диссертация соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168, от 11 сентября 2021 г. № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а соискатель Мисюрин Всеволод Андреевич достоин присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Начальник гематологического центра федерального государственного  
бюджетного учреждения «Главный военный клинический госпиталь имени  
академика Н.Н. Бурденко»,  
доктор медицинских наук, профессор



Рукавицын О.А.  
2.02.2022г.



В.А. Терещенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный  
клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко»,

Адрес: 107014, г. Москва, Госпитальная пл. 3.

Тел.: 8(499)263-55-55 (2817)

E-mail: [gvkg\\_fl@mil.ru](mailto:gvkg_fl@mil.ru)