

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, доцента Титова Константина Сергеевича, заведующего онкохирургическим отделением опухолей кожи и мягких тканей государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московского клинического научно-практического центра имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы» 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

Онкологические заболевания по-прежнему остаются социально значимой проблемой, а их лечение, особенно на 3-4 стадиях далеко не всегда приводит к излечению и длительной ремиссии, также имея ряд побочных эффектов. Например, при применении комбинации таргетных препаратов дабрафениба и траметиниба у больных с метастатической меланомой кожи частота объективного ответа достигает 67%. Однако у значительной части больных в процессе лечения развивается к ним лекарственная резистентность. Почти у половины пациентов, ответивших на таргетную терапию, происходит прогрессирование опухоли в течение первого года. Применение при меланоме ингибиторов контрольных точек иммунитета, особенно комбинированной иммунотерапии Ипилимуаб + Ниволумаб позволило достигнуть объективного ответа примерно у 50% больных. При этом около 60% больных с меланомой имеют первичную иммунорезистентность, то есть не чувствительность к иммунотерапии. Часто данная терапия токсична и имеет ряд нежелательных побочных явлений. Таким образом, поиск новых лекарственных препаратов и схем системной противоопухолевой терапии злокачественных новообразований по-прежнему крайне актуален.

Новые возможности для терапии онкологических больных открываются благодаря частой экспрессии белка PRAME в опухолях. PRAME, или

предпочтительно экспрессирующийся антиген при меланоме, обладает свойствами «хорошего опухолевого антигена». В числе этих свойств – специфичная экспрессии в опухолевых клетках, высокий уровень экспрессии, иммуногенность и способность экспонироваться на клеточной мембране. Неудивительно, что эти свойства позволили рассматривать PRAME в качестве мишени для иммунотерапии.

В настоящее время в мире проводятся клинические испытания вакцин для терапии PRAME-экспрессирующих заболеваний, в основе которых CAR-T-клетки, дендритноклеточные вакцины, а также вакцины на основе пептидов и белка PRAME. Каждый из этих подходов обладает рядом достоинств, но также обременён недостатками. CAR-T-лимфоциты дороги в производстве, а их применение ограничено HLA-репертуаром опухоли. При солидных опухолях CAR-T-вакцины малоэффективны. Дендритноклеточные и пептидные вакцины стимулируют В- и Т-клеточный ответ против белка PRAME у больного. Однако для развития этого ответа время и нормальная работоспособность иммунной системы. Преимуществом могли бы обладать моноклональные антитела против PRAME, но такие пока не существуют.

Кроме иммунологических методов никакие другие способы таргетной терапии PRAME-позитивных заболеваний в мире в настоящее время не рассматриваются и не разрабатываются. Возможности применения малых молекул не обсуждаются по причине отсутствия у белка PRAME ферментативных свойств. Новые способы терапии требуют повышения уровня знаний о биологических особенностях PRAME и его роли в канцерогенезе.

Все вышесказанное подчеркивает значимость и актуальность представленного исследования, посвященного разработке абсолютно новых способов таргетной терапии PRAME-экспрессирующих заболеваний.

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

Новыми являются результаты исследования причин активации *PRAME* в опухолевой клетке, в частности, обнаруженная PHF8-опосредованная

регуляция экспрессии *PRAME* в опухолевых клетках. Влияние PHF8 доказано биоинформатическими методами, сопоставлением профиля экспрессии мРНК генов *PRAME* и *PHF8*, а также нокаутом экспрессии *PHF8* при помощи разработанных автором тиопроизводных антисмысловых олигонуклеотидов.

Впервые в мире подробно изучены процессы, происходящие с нормальной клеткой после трансфекции в неё вектора для гиперэкспрессии *PRAME*. Для этого применялись методы культивирования клеток на полутвёрдой среде, в среде с низким содержанием сыворотки и исследование профиля экспрессии генов на микрочипах. Исследования подобного рода ранее проводились только на опухолевых клетках, либо в них не рассматривался фактор экспрессии гена *PRAME*.

Примечательны результаты исследования синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов. Используя культуральные методы и формулу расчёта синергизма, автор доказал, что бортезомиб усиливает цитотоксический эффект химиопрепаратов против *PRAME*-гиперэкспрессирующих линий клеток.

Новым результатом для клинической практики является оптимизированный протокол FLIP1 для определения групп риска у больных фолликулярной лимфомой. Для оптимизации использовался кластерный анализ клинических данных о выживаемости больных фолликулярной лимфомой.

Впервые разработаны химерные антитела для терапии *PRAME*-экспрессирующих заболеваний.

Достоверность научных положений и полученных выводов подтверждается дизайном экспериментов, а также статистическими критериями, использованными с соблюдением правил их применения.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация написана по общепринятому плану, общий объём 228 страниц, содержит 21 таблицу и 69 рисунков. В тексте представлены следующие главы: введение, обзор литературы, материалы и методы,

результаты, обсуждение, выводы, список литературы. В списке литературы упомянуты 300 источников, из них на русском языке 20, на английском – 280.

Во **введении** автор формулирует цель и задачи исследования, подчеркивает важность настоящего исследования для понимания биологии гена *PRAME*, драйверных особенностей кодируемого им белка и разработки новых подходов к лечению *PRAME*-позитивных злокачественных новообразований.

В **обзоре литературы** (глава 1) дан анализ проблем химиорезистентности и снижения параметров выживаемости, возникающих при экспрессии *PRAME* у больных. Перечислены свойства, которые могут характеризовать белок *PRAME* как драйвер канцерогенеза: это обеспечение опухолевой клетке самодостаточности в пролиферативных сигналах, изменение морфологии клеток, метаболизма и генетическая нестабильность, снижение чувствительности к апоптозу и рост-ингибирующим сигналам, неоангиогенез, блокирование дифференцировки и иммортализация. Раскрыты причины иммуногенности *PRAME* и перечислены апробированные к моменту написания диссертационного исследования способы иммунотерапии *PRAME*-позитивных онкологических заболеваний. Автор оценивает результативность существующих методов иммунотерапии по отношению к *PRAME*-позитивным больным и рассматривает известные данные о прогностической значимости экспрессии *PRAME*. Сделаны предположения о значимости *PRAME* для выживания опухолевой клетки и о том, что блокирование функций белка *PRAME* снизит жизнеспособность опухоли.

В **материалах и методах** (глава 2) перечислены материалы и методики, с помощью которых выполнялось данное исследование. Методики очень разнообразны, включают в себя компьютерные методы (биоинформатические и статистические), лабораторные методы (ведение клеточных линий, выделение РНК, ПЦР, МТТ-тест и расчёт комбинаторного индекса химиопрепаратов), а также анализ клинических данных. Статистический анализ отвечает современным требованиям.

В главе 3 представлены **результаты исследования**, с помощью которых автор решает поставленные ранее задачи. Автор собрал лабораторные и клинические доказательства драйверности белка PRAME. Были проведены наблюдения за изменениями в неопухолевой линии клеток WI38, которая приобрела способность к росту в условиях дефицита ростовых факторов, формированию колоний на полутвёрдой среде, и сниженную чувствительность к химиопрепаратам. Драйверные свойства были подтверждены исследованиями клинических данных больных различными солидными злокачественными опухолями и гемобластозами. Определив белок PRAME как драйвер, автор изучил промотор этого гена и выявил одну из причин экспрессии *PRAME* – это активность транскрипционного фактора PHF8. Более того, автор разработал и испытал антисмысловой олигонуклеотид, блокирующий экспрессию гена *PHF8* и одновременно снижающий уровень экспрессии *PRAME*, что подтвердило участие PHF8 в регуляции активности гена *PRAME*. Проводились эксперименты по культивированию опухолевых клеток с сочетаниями бортезомиба и других химиопрепаратов. Обнаружен синергизм бортезомиба и соединений, образующих свободные радикалы и повреждающих ДНК. Синергизм проявлялся в случае высокого уровня экспрессии PRAME в клетках, в том числе модельной неопухолевой линии WI38-PRAME, и не проявлялся на PRAME-низкоэкспрессирующих или PRAME-негативных линиях. Наконец, в ксенографтных моделях испытаны противоопухолевые эффекты оригинальных химерных антител, распознающих PRAME.

Преимущества и способы приложения разработанных подходов описываются в главе 4 «обсуждение». Автором сопоставляются собственные данные с контекстом мировой литературы, в том числе с результатами иммунотерапии больных. Обсуждаются способы внедрения и перспективы собственных методик. Предложен способ оптимизации прогностического критерия FLIP1 для больных фолликулярной лимфомой, в котором рекомендуется учитывать уровень экспрессии гена *PRAME* в опухолевых

клетках как дополнительный маркер. Предложены направления для развития терапевтических подходов PRAME-экспрессирующих заболеваний.

В завершающей главе изложены **выводы**, которые соответствуют поставленным задачам.

Автореферат диссертации полностью отражает объём проведённых исследований.

Научная и научно-практическая значимость

Полученные результаты позволяют объяснить ухудшение прогноза у PRAME-экспрессирующих больных онкологическими заболеваниями. Способы определения активности PRAME, на уровне как белка, так и мРНК, могут быть внедрены в клиническую практику для улучшения прогностических протоколов, а также для диагностики минимальной остаточной болезни в случае гемобластозов.

Предложено также три возможных направления таргетной терапии PRAME-экспрессирующих заболеваний. В качестве первого направления автором предложен способ снижения уровня экспрессии гена *PRAME*. Это может быть достигнуто посредством блокирования PNF8. Другой способ заключается в блокировании функций белка PRAME при помощи бортезомиба, ингибирующего протеосомы. Предложены химерные антитела для терапии PRAME-экспрессирующих онкологических заболеваний.

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 19 на научных конференциях в России и за рубежом.

Заключение

Таким образом, 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 PRAME-экспрессирующих онкологических заболеваний.

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.

Заведующий онкохирургическим
отделением опухолей кожи и мягких тканей
ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ,
доктор медицинских наук, доцент

Титов К.С.
20.12.2021г.

Подпись д.м.н., доцента Титова К.С. «заверяю»

Учёный секретарь ГБУЗ МКНЦ
имени А.С. Логинова ДЗМ
кандидат медицинских наук



Косачева Т.А.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
«Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова»
Департамента здравоохранения города Москвы

Адрес: 111123, г. Москва, ул. Шоссе Энтузиастов, д. 86.

Тел.: 8(495) 304-30-39, E-mail: info@mknc.ru