

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Генеральный директор  
ФГБУ «НМИЦ радиологии»  
Минздрава России  
академик РАН, профессор, д.м.н.  
А.Д. Каприн  
«*А.Д. Каприн*» 2023 года

## **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

**федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Даниловой Анны Борисовны на тему: «Изучение механизмов «уклонения» опухолевых клеток от иммунного надзора в контексте разработки современных методов активной специфической иммунотерапии», представленной к защите в диссертационный совет 21.1.033.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, 3.2.7. Иммунология**

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Последние годы в онкологии наблюдается интенсивный прогресс, связанный с революционными открытиями в молекулярной и клеточной биологии, касающимися выявления ключевых моментов генной и клеточной регуляции. Однако, несмотря на то, что в области хирургического лечения и лекарственной терапии злокачественных новообразований достигнуты колоссальные успехи, мировые показатели общей смертности практически не изменились, и прогноз для больных метастатическими формами злокачественных новообразований по-прежнему остается неблагоприятным. В тоже время такие пациенты составляют значительную группу среди онкологических больных, и практическим онкологам приходится сталкиваться с ними ежедневно. Учитывая вышесказанное, становится

понятной необходимостью разработки принципиально новых подходов к противоопухолевой терапии, основанных на знании биологии злокачественных новообразований, роли опухолевого микроокружения, взаимодействия с клеточными компонентами иммунной системы. Возможности использования клеточных технологий на основе современных достижений науки расширяют арсенал приемов воздействия на опухолевый процесс. Здесь на первый план выходят трансляционные исследования онкогенеза с созданием клеточных модельных систем *in vitro*, позволяющих воспроизводить процессы взаимодействия малигнизированных клеток человека с клеточными элементами опухолевого микроокружения и внеклеточным матриксом, оценивать реактивность клеток-эффекторов иммунной системы пациентов и методы ее коррекции.

В последние десятилетия укрепились представления об опухоли как о сложной, пластичной системе, включающий постоянное, динамическое и реципрокное взаимодействие между злокачественными клетками и их микроокружением, при этом поддержание пролиферативной активности, жизнеспособности опухолевых клеток, индукция ангиогенеза, активация инвазии и метастазирования, запуск воспалительных реакций, способствующего развитию опухоли, устойчивость к воздействию иммунной системы в различной степени определяются механизмами, реализуемыми злокачественными клетками, воздействующими на микроокружение.

Более углубленное изучение свойств опухолевых клеток, их антигенного состава, метаболических особенностей, способностей к миграции и инвазии важно также для преодоления иммунорезистентности, в том числе возникающей в процессе иммунотерапии, разработки индивидуальных подходов в контексте персонализированной противоопухолевой терапии, поиска прогностических и предиктивных факторов, позволяющих оптимизировать лечение онкологических пациентов.

В этой связи диссертационная работа Даниловой А.Б., посвященная изучению закономерностей биологической изменчивости свойств

злокачественных клеток, способствующих опухолевой прогрессии, и их экспериментальное обоснование для совершенствования методологии противоопухолевой клеточной иммунотерапии, представляет собой крайне своевременное и актуальное научное исследование.

### **Научная новизна диссертационного исследования**

Выполненная работа является комплексным, многофакторным исследованием, которое позволило создать уникальную коллекцию хорошо охарактеризованных индивидуальных клеточных линий меланомы кожи (МК), сарком мягких тканей и остеогенных сарком (СМТ/ОС), опухолей эпителиального происхождения (ЭО), которые могут быть использованы в качестве экспериментальных моделей в доклинических исследованиях. Кроме того, созданы и запатентованы опухолевые клеточные линии и способы их применения в качестве клеточных моделей при разработке методов оценки поствакцинального клеточного иммунитета, в том числе позволяющих визуализировать процесс киллинга и выживаемости клеток солидных опухолей после взаимодействия с цитотоксическими лимфоцитами *in vitro*, провести количественный и качественный анализ эффективности этого взаимодействия.

При изучении антигенного фенотипа опухолевых клеток в процессе длительного культивирования автором обнаружено сходство антигенных изменений в клетках МК, СМТ/ОС, ЭО, характеризующихся уменьшением презентации опухолеассоциированных антигенов (ОАА) и антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса, появлением антигенов HLA II класса, усилением пролиферативных и инвазивных свойств, что соответствует эволюционным изменениям, наблюдаемым в опухоли *in vivo*.

Автором также установлено сходство профиля экспрессии раково-тестикулярных генов (РТГ) в клетках солидных опухолей разного гистогенеза, что позволяет использовать культивируемые клетки МК как источник раково-тестикулярных антигенов (РТА) в клеточной

иммунотерапии. Даниловой А.Б. разработан и создан новый универсальный клеточный продукт для нагрузки и активации ДК *in vitro*.

Выявлена способность культивируемых клеток солидных опухолей синтезировать и секретировать в окружающую среду широкий спектр иммуносупрессивных факторов (ИСФ), которая становится более выраженной при длительном культивировании, при этом секреторные функции культивируемых опухолевых клеток, связанные с формированием иммуносупрессивного микроокружения, зависят от пространственной организации клеточной модели *in vitro*. Автором обнаружена высокая предиктивная и прогностическая ценность данных о продукции культивируемыми опухолевыми клетками ИСФ для клеточной иммунотерапии, что позволяет их использовать в качестве прогностических и предиктивных факторов, которые могут применяться при планировании лекарственного лечения.

Научная новизна исследования подкреплена наличием 13 патентов Российской Федерации на создание, применение линий клеток солидных опухолей и на создание клеточного продукта для нагрузки и активации дендритных клеток (ДК) IRTAN-2018.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Проведённое исследование позволило научно обосновать и объективно оценить с помощью моделирования *in vitro* роль антигенного фенотипа и секреторного профиля клеток солидных опухолей в реализации феномена «ускользания» от иммунного надзора.

Выявленные функциональные особенности клеток солидных опухолей имеют фундаментальное значение для рассмотрения новых аспектов поведения клеток иммунной системы в условиях опухолевого роста и разработки новых терапевтических подходов к лечению злокачественных новообразований. Результаты анализа экспрессии клетками опухолей различного гистогенеза РТА позволили определить иммунные мишени, общие для всех неоплазий, экспрессирующих эти антигены, и доказать

возможность универсального подхода к разработке противоопухолевых дендритно-клеточных вакцин.

Практическое значение полученных в настоящем исследовании результатов заключается в том, что созданная коллекция охарактеризованных клеточных культур солидных опухолей стала неотъемлемой частью Банка биологических образцов однотипно пролеченных больных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, существование которого значительно расширяет возможности проведения доклинических исследований. Получены свидетельства интеллектуальной собственности на создание и применение клеточных линий опухолей различного гистогенеза.

Обнаруженные общие закономерности эволюции антигенного профиля и метаболических особенностей клеток солидных опухолей в процессе длительного культивирования, зависимость секреторных свойств малигнизированных клеток от пространственной организации модели позволяют более адекватно подходить к вопросу клеточного моделирования с целью создания условий, максимально приближенных к реальной клинической ситуации.

Данные о сходстве профиля экспрессии РТГ клетками различных солидных опухолей позволили разработать клеточные модели, с помощью которых была показана принципиальная возможность универсального использования лизатов культивируемых клеток МК для нагрузки и активации ДК. Создан и запатентован для внедрения в клиническую практику новый клеточный продукт для активации вакцинных ДК.

Взаимосвязь экспрессии генов *PRAME*, *PASDI*, *SSX1* и продукции ИСФ, таких как интерлейкины (IL) IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ 1, MICA, VEGF, с инвазивным потенциалом опухолевых клеток и реализацией феномена «ускользания» от воздействия клеток-эффекторов позволяет рассматривать эти факторы как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

Обнаруженная прогностическая и предиктивная значимость продукции ИСФ культивируемыми опухолевыми клетками пациентов позволяет использовать установленные закономерности как критерий выбора способа клеточной иммунотерапии для пациентов со злокачественными новообразованиями.

### **Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций**

Цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, сформулированы ясно и убедительно. Использованный обширный биологический материал, полученный от 826 пациентов с МК, СМТ/ОС, ЭО, и большой перечень методов исследования позволили выполнить крупномасштабные исследовательские работы, всесторонне изучить поставленную проблему и получить значительный объём данных, который дал возможность адекватно использовать соответствующие задачам статистические методы, что убеждает в обоснованности и достоверности полученных результатов.

Основное содержание работы изложено в 75 публикациях, из них 29 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук, из которых 27 — в изданиях международной реферативной базы данных и системы цитирования.

### **Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности в целом**

Диссертация написана согласно современным требованиям, изложена на 368 стр. и состоит из введения, глав литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, раздела «Перспективы разработки темы», списка сокращений и списка литературы, который включает 832 источника, из них 818 – на английском языке. Текст иллюстрирован 45 таблицами и 84 рисунками.

**Во введении** автор детально определяет актуальность и необходимость исследования, формулирует цель и задачи, научную новизну и практическую значимость, представляет результаты апробации работы, личный вклад автора, а также положения, выносимые на защиту, которые отражают суть диссертационного исследования.

**Литературный обзор (глава 1)**, представленный на 57 стр., детально освещает состояние данной области биомедицины на сегодняшний день. Литературный обзор выдержан в стиле монографии, в нем приводятся подробные сведения, касающиеся особенностей функционирования иммунной системы в условиях опухолевого роста. Автор подробно рассматривает концепцию иммунного «редактирования» опухоли, уделяя особое внимание феномену «ускользания» опухоли от иммунного надзора, тем механизмам, которые используют опухолевые клетки для формирования микроокружения, благоприятного для их пролиферации и диссеминации, известным на сегодняшний день. Автор затрагивает проблему выбора стратегий иммунотерапии злокачественных новообразований в контексте теории иммунного редактирования опухоли и роль опухолевого микроокружения для выбора тактики иммунотерапевтического лечения. В заключении автор, оперируя представленными сведениями, обосновывает актуальность темы исследования и логически подводит читателя к изложению полученных результатов.

Литературные данные описаны хорошим языком и позволяют определить место и значение предпринятого исследования в системе существующих научных положений.

**Во второй главе**, «Материалы и методы» (39 стр.), дана подробная характеристика материала, который был использован в исследовании. Исследование было выполнено на биологическом материале 826 больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в 2001–2019 годы. В качестве материала для экспериментального исследования были использованы образцы опухолевой

ткани, супернатанты культур нормальных и опухолевых клеток, образцы периферической крови, компоненты крови после лейкофереза. Для оценки клинической значимости продукции ИСФ опухолевыми клетками был проведен дополнительный анализ исследований, проводившихся с 2001 по 2014 год в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, в рамках которых было пролечено 204 пациента с местно-распространенными и диссеминированными формами меланомы кожи (МК), рака почки (РП), сарком мягких тканей (СМТ).

Для реализации поставленных задач автор использовал широкий спектр, морфологических, иммунохимических, иммунологических, молекулярно-генетических методов. Объем изученного материала и избранные методы статистического анализа не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

**Третья глава** занимает 201 стр. и посвящена результатам собственных исследований, которые сопровождаются обсуждением в свете существующих научных положений и промежуточными выводами. Такая нестандартная подача материала имеет свои преимущества, так как позволяет сразу оценить важность и значимость полученных результатов. Автором была проведена работа по выделению, культивированию клеток солидных опухолей различного гистогенеза, что привело к созданию коллекции клеточных культур первичных, рецидивирующих и метастатических опухолей нейрального, мезенхимального и эпителиального происхождения. В результате длительного культивирования получено 110 (13,63%) клеточных линий злокачественных новообразований, обладающих стабильными пролиферативными характеристиками, что позволило провести на значительном материале заявленные исследования.

Автором с помощью методов иммуноцит- и гистохимии был изучен широкий репертуар опухолеассоциированных антигенов (ОАА) и антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II класса, маркера пролиферации Ki-67 в клетках МК, СМТ/ОС и ЭО и установлено, что на ранних пассажах



*in vitro* имеет место преимущественное сохранение иммунофенотипического профиля исходной опухолевой ткани, что позволяет использовать культивируемые опухолевые клетки в качестве клеточных моделей для решения задач доклинических исследований. В процессе длительного культивирования установлен факт изменчивости презентации ОАА клетками солидных опухолей, приводящей к обеднению специфического антигенного профиля и HLA I класса, появления молекул HLA II класса, усиления презентации антигенов, ассоциированных с процессами пролиферации, инвазии и метастазирования.

Автором также показано, что в клетках солидных опухолей наблюдается гиперэкспрессия РТГ, при этом существует сходство профилей экспрессии этих генов клетками МК, СМТ/ОС и ЭО. В клетках МК выявлена транскрипционная активность 10 РТГ, что является основанием для их использования в качестве источника РТА в клеточной иммунотерапии на основе активированных ДК и нашло выражение в создании нового клеточного продукта для нагрузки и активации ДК IRTAN-2018.

Изучение секреторного профиля культивируемых опухолевых клеток показало, что наблюдается гиперпродукция ИСФ, которая увеличивается в процессе длительного культивирования, при этом пространственная организация клеточной модели *in vitro* оказывает влияние на метаболические и секреторные функции культивируемых клеток солидных опухолей, связанные с формированием иммуносупрессивного микроокружения.

Эксперименты по исследованию способностей клеток солидных опухолей к миграции и инвазии позволили установить, что эти свойства связаны с экспрессией РТГ *PRAME*, *PASDI*, *SSX1* и продукцией факторов HB-EGF, IGFBP, PLGF, PECAM-1, FST, SCF, IL-8, которые возможно рассматривать как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

Далее автором было осуществлено экспериментальное моделирование, позволяющее продемонстрировать, что миграционная активность

созревающих ДК зависит от присутствия ОАА на клетках меланом, с одной стороны, и экскреция ими в микроокружение таких биологически активных молекул, как TGF- $\beta$ 1, IL-10, VEGF-A, EGF, FGF, HGF, оказывает ингибирующее воздействие на подвижность ДК.

Далее в работе было показано, что цитотоксические Т-лимфоциты, генерированные в присутствии ДК, активированных препаратом IRTAN-2018, проявляют цитолитическую активность по отношению к клеткам сарком, при этом была выявлена корреляция с экспрессией генов *PRAME* и *PASDI*. Присутствие в секреторном профиле малигнизированных клеток IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ 1, MICA, VEGF было ассоциировано с индексом их жизнеспособности в экспериментальной модельной системе.

Результаты экспериментальных исследований позволили Даниловой А.Б. выдвинуть гипотезу, что метаболические свойства клеток злокачественных новообразований, позволяющие создавать микроокружение, которое благоприятствует дальнейшей диссеминации опухоли в организме, являются универсальным механизмом, способным существенно ограничивать клиническую эффективность клеточной иммунотерапии. Эта гипотеза была проверена на клиническом материале 99 пациентов, получивших клеточную иммунотерапию с помощью вакцин на основе аутологичных генетически модифицированных опухолевых клеток и активированных ДК.

Автором был установлен факт высокой предиктивной и прогностической ценности продукции опухолевыми клетками ИСФ для специфической клеточной иммунотерапии. Выявлен диапазон концентраций TGF- $\beta$ 1 от 1,4 до 3,0 нг/мл, пороговые концентрации MICA 574,7 пг/мл и IL-10 10,5 пг/мл в супернатантах опухолевых клеток пациентов, определяющие благоприятный прогноз. Уровни TGF- $\beta$ 1 и MICA оказались значимыми независимыми факторами прогноза общей выживаемости (ОВ) пациентов с МК, получавшими клеточную иммунотерапию. При анализе времени до прогрессирования (ВДП) значимым фактором являлся VEGF.

В заключении подведен итог выполненных исследований и обобщены полученные данные. Подчеркивается важность трансляционных исследований, идущих от экспериментальных работ *ex vivo* к апробированию результатов в реальной клинической практике. Выводы диссертации логически вытекают из результатов исследований и полностью соответствуют сформулированной цели и задачам. На основании полученных данных автором даны практические рекомендации и определены перспективы разработки темы. Автореферат отражает основные положения диссертации, хорошо иллюстрирован.

### **Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы**

Теоретические данные о закономерностях эволюции антигенного профиля и метаболических особенностей клеток солидных опухолей при длительном культивировании в 2D- и 3D-системах *in vitro* расширяют фундаментальные представления о процессах опухолевого роста и могут быть включены в образовательные программы высших медицинских учебных учреждений. Практические рекомендации по результатам исследования могут служить основой для внедрения данных технологий в клиническую практику медицинских учреждений онкологической направленности. Результаты работы могут служить основанием для планирования рандомизированных проспективных клинических исследований с целью подтверждения эквивалентности или превосходства иммунотерапии ДК-вакциной «CaTeVac», в регламент производства которой будет включен препарат IRTAN-2018, предназначенный для нагрузки и активации ДК, над другими вариантами системного лечения диссеминированных форм злокачественных новообразований и изучения эффективности «CaTeVac» в адьювантном лечении больных злокачественными новообразованиями в группах высокого риска прогрессирования.

Работа Даниловой А.Б. проведена в соответствии с планом основных научно-исследовательских направлений отдела онкоиммунологии ФГБУ

«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Результаты работы были внедрены в научно-практическую деятельность научного отдела онкоиммунологии и в клиническую практику ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (акт внедрения от 22.03.2023), а также в научно-практическую деятельность лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера ФГБНУ «ФИЦ КНЦ СО РАН», КНЦ СО РАН (акт внедрения от 05.03.2023).

### **Вопросы и замечания**

Принципиально важных замечаний по диссертационной работе нет.

### **Заключение**

Диссертационная работа Даниловой Анны Борисовны «Изучение механизмов «уклонения» опухолевых клеток от иммунного надзора в контексте разработки современных методов активной специфической иммунотерапии», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, 3.2.7. Иммунология, является законченным научным трудом, в котором решена актуальная научная проблема – изучены антигенные и метаболические свойства клеток злокачественных новообразований, способствующие опухолевой прогрессии, что позволило разработать универсальный подход к созданию противоопухолевых вакцин на основе активированных дендритных клеток и создать прогностический алгоритм эффективности клеточной иммунотерапии на основе анализа секреторного профиля культивируемых опухолевых клеток пациентов.

По своей актуальности, научной новизне, объему и уровню проведенных исследований, практической значимости полученных результатов диссертационная работа Даниловой А.Б. соответствует всем требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства Российской

Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 11.09.2021 г. №1539, от 18.03.2023 г. №415), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а автор Данилова А.Б. заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, 3.2.7. Иммунология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании отделения клинической иммунологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, протокол № 16 от 21.09.2023 г.

Заведующий отделением клинической иммунологии  
МРНЦ им. А.Ф. Цыба - филиала ФГБУ

«НМИЦ радиологии» Минздрава России,

доктор биологических наук

Л.Ю. Гривцова

Подпись д.б.н. Гривцовой Людмилы Юрьевны «заверяю»:

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ радиологии»

Минздрава России



Е.П. Жарова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес организации: 249031, Российская Федерация, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, д.4.

Телефон организации: +7(484)399-31-30; E-mail: mrrc@mrrc.obninsk.ru