

Отзыв официального оппонента

доктора биологических наук Уласова И.В. на диссертационную работу Рудаковой Анны Андреевны «Эффективность синтетических неоантигенных пептидов в модели персонализированной противоопухолевой вакцины», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность

Иммунотерапия с помощью противоопухолевых вакцин уже в течение длительного времени привлекает внимание исследователей, было доказано, что именно вакциноterapia может помочь иммунной системе распознать антигенные маркеры, экспрессированные на опухолевых клетках, и уничтожить эти клетки. Однако клиническая реализация этой стратегии до сих пор остается сложной задачей.

Одним из основных препятствий на пути к разработке эффективной противоопухолевой вакцины является выбор антигена. Антигенный состав опухолей разнообразен и зависит от типа опухоли. Опухолевые антигены могут сильно различаться при разных типах рака и даже у разных пациентов с одним и тем же заболеванием. Специфичные для опухоли и отсутствующие в нормальных тканях антигены, которые образуются в результате накопления в злокачественных новообразованиях многочисленных соматических мутаций, называются неоантигенами. Большинство неоантигенов уникальны для каждого индивидуального пациента и его опухоли, и это требует создания персонализированной терапии, направленной на них. Современные достижения в NGS-секвенировании и биоинформатическом анализе полученных данных привели к быстрой и доступной идентификации индивидуальных неоантигенов у пациентов. Неоантигенные вакцины могут вызывать эффективную индукцию противоопухолевых иммунных реакций, которые сохраняются длительное время. Исследования эффективности неоантигенных пептидных вакцин еще только

начинаются, но уже можно сказать, что неоантигены могут стать привлекательными мишенями для иммунотерапии опухолей.

Работа Анны Андреевны Рудаковой посвящена экспериментальному изучению иммуногенности и противоопухолевой активности ряда синтетических неоантигенных пептидов, специфически отобранных для модели противомеланомной вакцины.

Учитывая сохраняющуюся необходимость разработки современных подходов к эффективному лечению меланомы, актуальность работы Анны Андреевны Рудаковой не вызывает сомнений.

Научная новизна

В диссертационной работе Рудаковой А.А. впервые изучена иммуногенность и противоопухолевая эффективность моделей противоопухолевой вакцины против мышинной меланомы B16-F10, содержащих комбинации смесей синтетических неоантигенных пептидов без адъюванта и с адъювантом Poly(I:C). Показано влияние роста опухоли B16-F10 и иммунизации агонистом TLR-3 Poly(I:C) на иммунофенотип клеток селезенки мышей C57Bl/6. В результате проведенного исследования выбраны наиболее иммуногенные синтетические неоантигенные пептиды для мышинной модели противомеланомной вакцины и оценена их противоопухолевая эффективность на экспериментальных животных. В ходе диссертационной работы показано, что иммунизация моделями вакцины с адъювантом, содержащими смесь пептидов оказывает лучший противоопухолевый эффект, чем иммунизация моделью вакцины, содержащей только один пептид.

Достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и практических рекомендаций

Разработанный алгоритм оценки иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов, качество проведения экспериментов, правильно подобранные схемы вакцинаций, наличие всех

необходимых контролей достаточны для решения задач, поставленных в работе и обоснования положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Для обработки собранных данных были использованы современные подходы математической статистики. Анализ результатов ELISpot проводили с использованием программ Excel и GraphPad Prism 5.0, результаты сравнивали с помощью непарного t-теста. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Для статистического анализа данных проточной цитометрии и оценки противоопухолевого эффекта использовали критерий Манна – Уитни и применяли программу STATISTICA v.7.

Полученные данные согласуются с отдельно опубликованными литературными данными по изучению персонализированных противоопухолевых вакцин на основе синтетических неоантигенных пептидов. Выводы работы полностью соответствуют полученным результатам.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, изложена на 114 листах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав: 1) обзор литературы, 2) материалы и методы, 3) результаты и 4) обсуждения полученных результатов, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 200 источников: 5 отечественных и 194 зарубежных. Текст иллюстрирован 19 рисунками и 11 таблицами.

Во введении автором обоснована актуальность научного исследования, поставлена цель и последовательно определены задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели. Также выделены научная новизна, практическая и теоретическая значимость проведенного исследования, кратко изложены использованные методы и методологическая основа исследования. Обоснована достоверность полученных результатов, которая не вызывает сомнений. «Положения, выносимые на защиту» отражает конкретные достижения

проведенного исследования. Указаны представленные доклады на конференциях по теме диссертации.

В главе обзор литературы кратко изложены последние достижения в области противоопухолевой иммунотерапии, при этом сделан акцент на применении терапевтических вакцин. Отдельный подраздел посвящен описанию опухолевых неоантигенов и обоснованию их применения в качестве мишеней для противоопухолевых вакцин. В логике темы диссертации рассматриваются варианты пептидных неоантигенных вакцин и адъювантов для противоопухолевых вакцин. В заключении автор обосновывает перспективность направления по разработке синтетических пептидных неоантигенных вакцин, в рамках которого была выполнена данная работа.

В разделе материалы и методы автором в полной мере представлены используемые в работе реактивы, оборудование и перечень 43-х изученных пептидов с их базовой характеристикой. Подробно описаны применяемые в работе методы работы с животными и культурами клеток, методы для определения иммуногенности тестируемых пептидов, включая ELISPOT и ELISA, а также проточную цитометрию. Подробно описана методика приготовления моделей вакцины и адъюванта и расписаны схемы вакцинации. Для оценки результатов использованы соответствующие статистические методы, непараметрический критерий Манна-Уитни.

В главе **«Результаты собственных исследований»** автор последовательно представляет результаты проведенных исследований в нескольких подразделах:

На первом этапе исследования автором была проведена оценка иммуногенности и противоопухолевой эффективности 2-кратной иммунизации моделями вакцины, состоящей из нескольких пептидов, с использованием адъюванта или без него.

На следующем этапе была изучена эффективность применения модели вакцины при 4-кратной иммунизации.

Проведены исследования по изучению иммунных реакций у мышей с меланомой B16-F10 при воздействии Poly(I:C). В результате были выявлены

параметры иммунофенотипа клеток селезенки мышей, на которые влияет опухолевая нагрузка и/или введение адъюванта Poly(I:C).

Далее автором проведен сравнительный анализ иммуногенности отдельных синтетических неоантигенных пептидов.

При оценке противоопухолевой активности модели вакцины показано, что иммунизация моделью вакцины, содержащей смесь нескольких пептидов, обладает более выраженным противоопухолевым эффектом, по сравнению с иммунизацией моделью вакцины, содержащей только один пептид.

В работе все данные представлены в виде графиков и таблиц, что позволяет наглядно оценить выявленные изменения.

В главе «Обсуждение полученных результатов» последовательно и обстоятельно изложены достижения автора. Представлены ключевые аспекты исследования, включая поиск специфических мутаций меланомы B16-F10, выбор пептидов для модели противоопухолевой вакцины, подробно обсуждаются собственные данные в сопоставлении с данными литературы, проводится анализ полученных результатов с точки зрения иммуногенности и противоопухолевой эффективности изучаемой модели неоантигенной вакцины, изменения иммунофенотипа под влиянием адъюванта Poly(I:C).

В «Заключении» автор лаконично представляет ключевые моменты каждого из разделов диссертации и подводит итоги своему научному исследованию. Заключение построено логично в соответствии с результатами исследований других глав.

Четко сформулированные выводы обоснованы и логично вытекают из результатов собственных исследований автора и полностью отражают суть поставленных задач.

Однако, несмотря на новые научные результаты, имеет смысл отметить и некоторые недостатки проведенных исследований;

1. В представленных в автореферате рисунках (3 и 4) отсутствует какая-либо статистика

2. В автореферате отсутствуют данные биоинформатического анализа и сравнение активности выбранных пептидов не только для B16-F10, но и линий меланом человека, в том числе резистентных к терапии.

3. Иммуногенность пептидов на модели B16-F10 ин vivo во многом зависит от микробиома кишечника. Использовал ли соискатель данной работы патоген-фри мышей, осталось не известным после ознакомления с данными из секции “Методология и методы исследования”

В целом, высказанные замечания не снижают ценности представленной работы, а носят больше рекомендательных характер.

Заключение.

Диссертационное исследование Рудаковой Анны Андреевны «Эффективность синтетических неоантигенных пептидов в модели персонализированной противоопухолевой вакцины» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном и методическом уровне с использованием современных методов исследования, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной задачи - подтверждена эффективность использования неоантигенов в качестве мишеней для иммунотерапии злокачественных опухолей и предложено решение по созданию персонализированных вакцин для лечения меланомы человека, имеющей значение для развития онкологии.

По своей актуальности, уровню и объему проведенных исследований, научной новизне полученных результатов и их практической значимости, способу решения поставленных задач диссертационная работа Рудаковой А.А. полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 20 марта 2021 года №426, от 11 сентября

2021 г. №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Ведущий научный сотрудник отдела современных биоматериалов
Института регенеративной медицины
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
доктор биологических наук

Уласов Илья Валентинович

«09» марта 2023 г.

Подпись д.б.н. Уласова И.В. заверяю.

Ученый секретарь

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
«Заслуженный врач Российской Федерации»,
доктор медицинских наук, профессор



 **Воскресенская Ольга Николаевна**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<https://www.sechenov.ru/>

E-mail: site@sechenov.ru