

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Д.Л.Пиневич

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Регистрационный №

## МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОМ

инструкция по применению

### УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова».

### АВТОРЫ:

к.б.н. Мелешко А.Н., к.м.н. Петровская Н.А., Вашкевич Е.П., Хожовец М.В.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод лечения В-клеточных лимфом с помощью комбинированной ДНК вакцины, включающей пероральную форму бактериальной вакцины и внутримышечную инъекцию. Вакцинация позволяет увеличить длительность ремиссии и предотвратить развитие рецидивов.

Инструкция предназначена для использования в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение В-линейных неходжкинских лимфом, а также для врачей-онкологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с лимфомами в стационарных и/или амбулаторных условиях.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

В-клеточная неходжкинская лимфома С82, С83, С91.1 (фолликулярная лимфома, диффузная В-крупноклеточная лимфома, нодальная лимфома из клеток маргинальной зоны, лимфома из клеток мантийной зоны, хронический лимфолейкоз).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Соответствуют таковым для применения медицинских изделий необходимых для выполнения настоящей инструкции.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИИ

АК - антикоагулянт

ДМСО - диметилсульфоксид

ИФА - иммуноферментный анализ

КМ- костный мозг

КОЕ - колониеобразующая единица

МНК - моноклеарные клетки

МОБ - минимальная остаточная болезнь

НХЛ - неходжкинская лимфома

ПЭИ - полиэтиленмин

ПК - периферическая кровь

БРБ8 - Натрий-фосфатный буфер Дульбекко, без кальция, магния

ЕЫ8РОТ - Епгуше-Ъткеё 1шшипo8po1

ГКР-у - интерферон гамма

РУХСР- роШо У1ГШ Х соа! рго1ет (белок капсида вируса Х картофеля)

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

### **РЕАКТИВЫ**

Антитела моноклональные к человеческому иммуноглобулину М, О, каппа- и лямбда легкой цепи.

Белок РУХСР.

Буферный раствор калий-фосфатный (БРБ8).

Вода для инъекций.

Гепарин.

Глицерин.

Глюкоза 20% раствор для инъекций.

Питательная бактериальная среда ТБ (Тегпйс ЁгоШ).

Питательная бактериальная среда 8ОС.

Полиэтиленимид, линейный, 20кДа.

Реагент для создания градиента плотности ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ), стерильный.

### **РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

Вакутайнеры (пробирки для забора крови), КЭДТА, 10-15 мл.

Емкости пластиковые, прозрачные с широким горлышком и закручивающейся крышкой 20-40 см<sup>3</sup>.

Камера Горяева и покровные стекла к ней.

Капсулы желатиновые, 1 размер.

Наконечники для дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл, стерильные.

Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем - от 0,1 до 1000 мкл).

Одноразовые флаконы и планшеты для суспензионных культур клеток, стерильные.

Пробирки для проточного цитофлуориметра.

Пробирки типа эппендорф (0,5; 1,5; 2,0 мл).

Серологические пипетки с градуировкой (объем 5, 10, 25 мл), стерильные.

Стерильные пастеровские пипетки.

Стерильные пипетки на 1 и 5 мл.

Стерильные пипетки на 5-10 мл.

Фильтры с диаметром пор 40-100 мкм, подходящие для фильтрации суспензии клеток от сгустков.

Центрифужные пробирки (объем 15), стерильные.

Центрифужные пробирки 15 и 50 мл.

Центрифужные фильтры для стерилизации.

Чашки Петри, стерильные.

Шприцы для инъекций, 10 мл.

## ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Получение персональной ДНК-вакцины
2. Применение персональной ДНК-вакцины
3. Контроль лечения

### **1. Получение персональной ДНК-вакцины**

Вакцину получают путем ПЦР клонирования генов вариабельных доменов иммуноглобулинов из РНК опухолевой ткани (Инструкция по применению №245-1215, дата утверждения 23 декабря 2015 г. «Метод получения персональной идиотипической ДНК-вакцины и вакцинации пациентов с лимфомами»)

#### **1.1. Инъекционная вакцина на основе конъюгата ДНК-ПЭИ**

Лекарственная форма вакцины образуется путем смешения водного раствора ДНК-вакцины с раствором линейного полиэтиленimina (ПЭИ) с молекулярной массой 20 кДа непосредственно перед вакцинацией.

Вакцина представляет собой стерильный раствор плазмидной ДНК в буферном растворе (0,1X БРБ8) в количестве 400 мкг. Хранится отдельно в замороженном виде. Стоковый раствор ПЭИ 10 мкг/мкл (рН=7,4) храниться замороженным, после разведения водой аликвоты 1 мкг/мкл (1,5 - 2 мл) хранится при 4°C. Конъюгирование производят путем смешения раствора ДНК с раствором ПЭИ в массовом соотношении ДНК: ПЭИ = 1,2-1,3.

Порядок приготовления вакцины следующий:

- доза ДНК равная 400 мкг разводится водой (5% глюкозы) в объеме 3 мл.
- доза ПЭИ равная 500 мкг разводится водой (5% глюкозы) до 2 мл.

Оба раствора герметично закрывают в стерильных стеклянных флаконах и хранятся при 4-6°C в до 10 дней. Аликвота каждого компонента вакцины отдается на микробиологический контроль. Непосредственно перед инъекцией оба раствора смешивают в шприце. Первым набирается в шприц на 10 мл весь объем раствора ПЭИ, затем он вносится в емкость с раствором ДНК. Порядок смешения - раствора ПЭИ добавляется к раствору ДНК, либо смешение происходит одновременно. Смесь вводится внутримышечно. После смешения конъюгат не хранится более 10 минут (возможна преципитация

ДНК). Раствор вакцины готовят в стерильных условиях из инфузионных растворов (вода и глюкоза). Раствор ДНК готовят стерильным по технологии очистки (осаждение и отмывка осадка ДНК спиртами). Раствор ПЭИ в стоковой концентрации обладает сильными дезинфицирующими свойствами. Стерильность контролируется бактериальным посевом.

Объем введения - 5-6 мл. Инъекция проводится в ягодичную мышцу.

### **1.2. Пероральная форма вакцины на основе бактерий**

При этом способе доставки вакцины используют аттенуированный штамм бактерий *Salmonella dysenteriae* *Segol* *ag 1* *pur* *BMunit* 882017. При пероральной форме приема вакцины пациент получает суспензию  $10^{10}$  КОЕ клеток *Salmonella*, содержащего плазмиду соответствующей ДНК-вакцины. Плазида соответствующей ДНК-вакцины вводится в клетки бактерий методом электропорации и клетки селективируют на среде с канамицином. После 16-18 часов инкубации, культуру отмывают стерильным физраствором, ресуспензируют в 2-3 мл 80С среды и сохраняют при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Затем проводят подсчет КОЕ методом серийных разведений с шагом в 1 порядок до  $10^{-10}$  в объеме 1 мл. Последние три разведения высевают на чашки в дублях (по 100 мкл), оставляют на ночь, после чего подсчитывают количество колоний. Подсчитывается количество колоний на чашках в интервале от 10 до 300 колоний. На основании минимум двух измерений рассчитывают концентрацию КОЕ/мкл исходного раствора. Необходимая доза суспензии бактерий отмывается в 1 мл стерильного физраствора, концентрируется, ресуспензируется в 50% глицероле и вносится в желатиновую капсулу. Капсулы с суспензией живых бактерий хранятся не более 3 часов при  $4-15^{\circ}\text{C}$  или 2 недели при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Капсулу принимают перорально и запивают небольшим объемом воды.

## **2. Применение персональной ДНК-вакцины**

Вакцинация начинается (продолжается), если:

- Удалось успешно клонировать опухолевый идиотип и подтвердить правильную сборку конструкции ДНК;
- Отсутствует прогрессирования болезни, требующая химиотерапии или радиотерапии;
- Число лейкоцитов и другие показатели крови в норме

Применение вакцины на фоне значительной опухолевой нагрузки (частичный ответ), или прогрессировании болезни сопровождается резко сниженной эффективностью иммунизации и потому нецелесообразно.

Вакцина вызывает минимальные побочные эффекты от применения вакцины. Ни в одном случае вакцинация не сопровождалась токсичностью выше дгаёе 2 (СТСАЕ V 3.0). Наиболее распространенными являются покраснение и индурация места введения, а также временные гриппо-подобные симптомы: недомогание, слабость, повышение температуры, болевые ощущения. Все симптомы проходят в течение суток.

Рисунок 1 - Временная схема вакцинации

Курс вакцинации включает четыре введения вакцины с интервалом в 4 недели. Каждая вакцинация включает инъекцию и прием капсулы с дозой бактерий одновременно или с интервалом в 1-2 дня. По завершению курса проводится набор периферической крови для оценки иммунного ответа через неделю и месяц после последней вакцинации.

При необходимости (недостаточный иммунный ответ, сохранение положительной МОБ) курс вакцинации может быть повторен.

### 3. Контроль лечения

#### 3.1. Иммунологический мониторинг

Материалом для иммунологических тестов являются мононуклеарные клетки и сыворотка крови. Иммунологический мониторинг основан на сравнении показателей адаптивного иммунитета до и после вакцинации.

Сбор материала да вакцинации проводится в двух точках или в одной из них - при первичной диагностике или перед вакцинацией. После вакцинации



& Забор и криосохранение МНК периферической крови

мониторинг проводится в нескольких точках (рисунок 1): через неделю и месяц после последней вакцинации.

В каждой точки производится забор ПК:

I в объеме 10-50 (максимально возможное по состоянию пациента) в 50 мл пробирки с ЭДТА. Если такой объем набрать затруднительно, набирается приемлемое количество или забор крови повторяется через 1-2 дня. Из крови проводят выделение мононуклеарных клеток по стандартной методике. Все клетки замораживаются с ДМСО в жидком азоте до выполнения тестов.

II пробирка 2-5 мл ПК (без АК, красная крышка) для выделения сыворотки. После свертывания крови пробирка центрифугируется и собирается верхняя фракция сыворотки. Хранится сыворотка с подписанных пробирках на -80°C.

#### Иммунологические тесты

Наличие крио-сохраненных образцов опухолевых клеток, а также МНК и сыворотки до и после вакцинации абсолютно необходимо для оценки эффективности иммунизации.

1. Оценка минимальной остаточной болезни (МОБ) методом Ж<sup>+</sup>-РСК с использованием идиотип-специфичных праймеров (или другая стандартная методика оценки МОБ);

2. Определение антител в сыворотке вакцинированных пациентов методом иммуноферментного анализа (ИФА) против белка антигена;

3. Продукция ГКР-у лимфоцитами вакцинированных пациентов в присутствии белка РУХСР или пептидной библиотеки соответствующего антигена методом ЕЫ8РОТ;

Цель иммунологических тестов - определение гуморального (антительного) и клеточного (цитотоксического) иммунного ответа на проводимую вакцинацию и динамика МОБ. Иммунный ответ считается положительным при двукратном увеличении титра антител или двукратном увеличении количества спотов (точек) ЕЫ8РОТ.

#### **4. Возможные ошибки и осложнения**

Сильное помутнение и выпадение осадка ДНК при приготовлении конъюгата ДНК-ПЭИ

Причины:

- концентрация ДНК в растворе более 100 нг/мкл;
- содержание солей выше 0,5 от физиологического раствора;
- длительное хранение конъюгата (более 30 минут);

Решение:

- выполнять измерение концентрации ДНК надежным методом.

Наилучшим является фотометрическое определение со стандартами концентрации;

- использовать для растворения ДНК 5% раствор глюкозы;
- проводить смешение раствора ДНК с ПЭИ в шприце непосредственно перед инъекцией.



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

«28» *августа* 2019 г.

Регистрационный № *088-0619*



**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОМ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова».

**АВТОРЫ:**

к.б.н. Мелешко А.Н., к.м.н. Петровская Н.А., Вашкевич Е.П., Хожовец М.В.

Минск, 2019