

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

«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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
28.06.2019
Регистрационный № 088-0619

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОМ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»

АВТОРЫ: канд. биол. наук А. Н. Мелешко, канд. мед. наук Н. А. Петровская, Е. П. Вашкевич, М. В. Хожовец

Минск 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК — антикоагулянт
ДМСО — диметилсульфоксид
ИФА — иммуноферментный анализ
КМ — костный мозг
КОЕ — колониеобразующая единица
МНК — мононуклеарные клетки
МОБ — минимальная остаточная болезнь
НХЛ — неходжкинская лимфома
ПЭИ — полиэтиленимин
ПК — периферическая кровь
DPBS — натрий-фосфатный буфер Дульбекко, без кальция, магния
ELISPOT — Enzyme-Linked ImmunoSpot
INF- γ — интерферон гамма
PVXCP — potato virus X coat protein (белок капсида вируса X картофеля)

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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Реактивы

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

Белок РVXСР.

Буферный раствор калий-фосфатный (DPBS).

Вода для инъекций.

Гепарин.

Глицерин.

Глюкоза 20 % раствор для инъекций.

Питательная бактериальная среда ТВ (Terrific broth).

Питательная бактериальная среда SOC.

Полиэтиленмин, линейный, 20 кДа.

Реагент для создания градиента плотности (1,077 г/см³), стерильный.

Расходные материалы

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

Емкости пластиковые, прозрачные с широким горлышком и закручивающейся крышкой 20–40 см³.

Камера Горяева и покровные стекла к ней.

Капсулы желатиновые, 1 размер.

Наконечники для дозаторов объемом от 0,1 до 1 000 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.

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 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

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

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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 переменных доменов иммуноглобулинов из РНК опухолевой ткани (инструкция по применению № 245-1215, утверждена 23.12.2015 «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 ПЭИ с молекулярной массой 20 кДа непосредственно перед вакцинацией.

Вакцина представляет собой стерильный раствор плазмидной ДНК в буферном растворе (0,1X DPBS) в количестве 400 мкг. Хранится отдельно в замороженном виде. Стоковый раствор ПЭИ 10 мкг/мкл (рН = 7,4) хранится замороженным, после разведения водой аликвоты 1 мкг/мкл (1,5–2 мл) — при 4 °С. 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 °С 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 — раствор ПЭИ добавляется к раствору ДНК либо смешение происходит одновременно. Смесь вводится внутримышечно. После смешения конъюгат не хранится более 10 мин (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 enterica serovar typhimurium* SS2017. 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 селектируют на среде с канамицином. После 16–18 ч инкубации культуру отмывают стерильным физраствором, ресуспензируют в 2–3 мл SOC среды и сохраняют при 4 °С. Затем производят 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. Капсула с суспензией живых бактерий хранится не более 3 ч при 4–15 °С или 2 недели при -80 °С. Капсулу принимают перорально и запивают небольшим объемом воды.

2. Применение персональной ДНК-вакцины

Вакцинация начинается (продолжается), если:

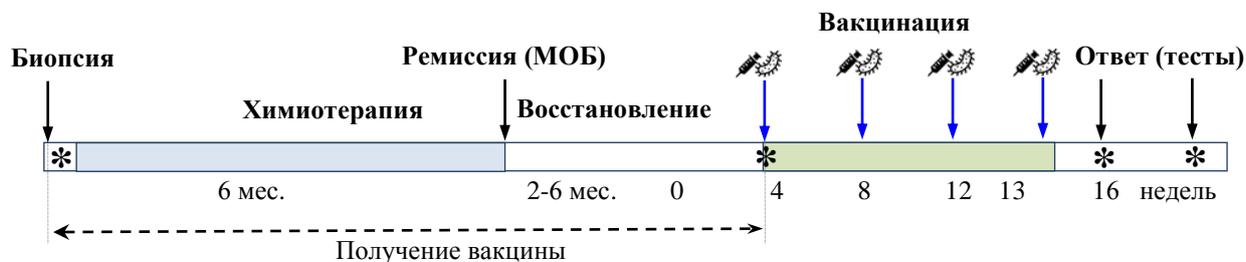
удалось успешно клонировать опухолевый идиотип и подтвердить правильную сборку конструкции ДНК;

отсутствует прогрессирование болезни, требующее химио- или радиотерапии;

число лейкоцитов и другие показатели крови в норме.

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

Вакцина вызывает минимальные побочные. Ни в одном случае вакцинация не сопровождалась токсичностью выше grade 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 1 сут.



* Забор и криосохранение МНК периферической крови

Рисунок — Временная схема вакцинации

Курс вакцинации состоит из 4 введений вакцины с интервалом 4 недели. Каждая вакцинация включает инъекцию и прием капсулы с дозой бактерий одновременно или с интервалом в 1–2 дня. По завершении курса берут ПК для оценки иммунного ответа через 1 неделю и 1 мес. 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 до вакцинации производится в двух точках или в одной из них — при первичной диагностике или перед вакцинацией. После вакцинации мониторинг проводится в нескольких точках (рисунок): через 1 неделю и 1 мес. после последней вакцинации.

В каждой точке производится забор ПК:

I. В объеме 10–50 (максимально возможно по состоянию пациента) в пробирку с ЭДТА (50 мл). Если такой объем набрать затруднительно, берут приемлемое количество или забор крови повторяют через 1–2 дня. Из крови проводят выделяют мононуклеарные клетки по стандартной методике. Все клетки замораживают 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, собирается верхняя фракция сыворотки. Хранится сыворотка в подписанных пробирках при -80°C .

Иммунологические тесты

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

1. Оценка МОБ методом RQ-PCR с использованием идиотип-специфичных праймеров (или другая стандартная методика оценки МОБ).

2. Определение антител в сыворотке вакцинированных пациентов методом ИФА против белка антигена.

3. Продукция INF- γ лимфоцитами вакцинированных пациентов в присутствии белка PVXCP или пептидной библиотеки соответствующего антигена методом ELISPOT.

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

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ ИСПРАВЛЕНИЯ

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 мин).

Решение:

измерять концентрацию ДНК надежным методом; наилучшим является фотометрическое определение со стандартами концентрации;

использовать для растворения ДНК 5 % раствор глюкозы;

смешивать раствор ДНК с ПЭИ в шприце непосредственно перед инъекцией.