

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

2012г.

Регистрационный № 159-1112

**МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ИДИОТИПИЧЕСКОЙ
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИМФОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

К.б.н.

Мелешко А.Н.

профессор, член-корр.

Алейникова О.В.

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
20.12.2012
Регистрационный № 159-1112

**МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ИДИОТИПИЧЕСКОЙ
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИМФОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.Н. Мелешко, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН
Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2012

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПТГ — изопропилтиогалактозид

ОАА — опухоль-ассоциированные антигены

ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз

ММ — множественная миелома

НХЛ — неходжкинская лимфома

ПК — периферическая кровь

п.о. — пар оснований

ПЦР — полимеразная цепная реакция

CRD3 — complementary-determine region 3 (3-й регион, определяющий комплементарность)

Id — idiotype (идиотип)

Ig — immunoglobulin (иммуноглобулин)

IgH — immunoglobulin heavy chain gene (ген тяжелой цепи иммуноглобулина)

IgG — иммуноглобулин-G

IgK — Immunoglobulin kappa chain gene (ген к-цепи иммуноглобулина)

IgL — Immunoglobulin lambda chain gene (ген λ-цепи иммуноглобулина)

IgM — иммуноглобулин-M

PAGE — polyacrylamide gel electrophoresis

PBS — phosphate buffered saline

PMSF — phenylmethanesulfonylfluoride

scFv — single-chainvariable fragment (одноцепочечный вариабельный фрагмент)

SDS — sodiumdodecyl sulfate (лаурилсульфат натрия)

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод получения пациент-специфической, идиотипической рекомбинантной вакцины против лимфом.

Область применения метода: иммунология, онкология, биотехнология.

Настоящая инструкция по применению предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, иных специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с лимфомами.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

Центрифуга для пробирок 15–50 мл

Центрифуга с охлаждением на 14000 об./мин

Проточный цитофлуориметр

ПЦР боксы

Вортекс

Спектрофотометр

Термомиксер

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле

Аппарат для вертикального электрофореза в полиакриламидном геле

Документирующая система

Микроскоп

Камера Горяева

Секвенатор

Морозильник -20°C

Морозильник -80°C

Дозаторы

Термоциклер

Варипипетки (дозаторы)

Вакуумный аспиратор

Магнитная мешалка с подогревом

Термостат +37°C

Термостат с шейкером для суспензионных культур +37°C

Аппарат для ультразвука или клеточный дезинтегратор

Хроматографическая колонка

Расходные материалы

Пластиковые прозрачные емкости с широким горлышком и закручивающейся крышкой 20–40 см³

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

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

ПЦР-пробирки (0,2 мл)

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

Центрифужные пробирки 15 и 50 мл

Стерильные пастеровские пипетки

Стерильные пипетки на 5–10 мл

Стерильные пипетки на 1 и 5 мл
Чашки Петри
Плоскодонные колбочки 50 мл
Центрифужные фильтры для стерилизации

Реагенты

Питательная среда RPMI-1640
ЭДТА
Ингибиторы РНКаз (RNAlater)
Гистопак (Histopaque) или Лимфопреп
Фосфатно-солевой буфер, pH = 7,4
NaCl
Трис-HCl
ЭДТА
SDS (лаурилсульфат натрия)
Протеиназа-K
Фенол
Хлороформ
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)
Изопропанол
Ацетат аммония
В-меркаптоэтанол
Три-реагент
Этанол
Олиго-dT (dT18) олигонуклеотиды
Смесь трифосфат дезоксинуклеотидов (дНТФ)
Обратная транскриптаза
Моноклональные антитела к человеческому иммуноглобулину М, G, каппа- и
ламбда легкой цепи
Taq-полимераза
Праймеры
Агароза
Вода деионизованная
Маркер молекулярного веса
Акриламид
Бис-акриламид
Персульфат аммония
ТЕМЕД
Трис-боратный буфер, pH=7,5
Этидиум бромид
Набор для выделения ДНК из агарозного геля
Наборы для секвенирования ДНК
Вектор pTZ57R/T (или другой для клонирования ПЦР-фрагментов)
Вектор pET24b
Вектор pING или pcDNA3.1
Рестриктазы
T4-лигаза

Хлорид кальция
Набор для выделения плазмид
Штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL
Штамм *E. coli* XL1-blue
Изопропилтиогалактозид (ИПТГ)
Ингибиторы протеаз (PMSF)
Имидазол
Ni-NTA агароза
Мочевина
Глицерин
Жидкая питательная среда LB
LB-агар

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Фолликулярная неходжкинская лимфома:

- 1.1. Мелкоклеточная с расщепленными ядрами, фолликулярная
- 1.2. Смешанная, мелкоклеточная с расщепленными ядрами и крупноклеточная, фолликулярная
- 1.3. Крупноклеточная, фолликулярная

2. Диффузная неходжкинская лимфома:

- 2.1. Мелкоклеточная (диффузная)
- 2.2. Мелкоклеточная с расщепленными ядрами (диффузная)
- 2.3. Смешанная мелко- и крупноклеточная (диффузная)
- 2.4. Крупноклеточная (диффузная)
- 2.5. Иммунобластная (диффузная)
- 2.6. Лимфобластная (диффузная)

Условия:

Экспрессия на опухолевых клетках иммуноглобулина М или G изотипа.

Лимфомы, имеющие относительно неблагоприятный прогноз, высокий риск развития рецидива, хроническое течение с медленной прогрессией опухоли.

Устойчивая первая ремиссия в течение, по меньшей мере, полугода, для восстановления иммунитета после химиотерапии и развития иммунного ответа на вакцинацию.

Доступность достаточного количества опухолевого материала – не менее 10^7 опухолевых клеток всего и не менее 50% опухолевых клеток в материале биопсии до начала химиотерапии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Для указанных нозологий отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Суть метода состоит в клонировании нуклеотидной последовательности идиотипа из опухолевых клеток в векторе для экспрессии, который используется в качестве ДНК-вакцины, или вводится в клетки бактерии продуцента для синтеза и очистки рекомбинантного белка.

1. Биопсия опухолевого материала

Для получения персонального препарата вакцины необходимо предварительное получение материала живых опухолевых клеток до начала химиотерапии. Источником опухоли может быть ткань опухоли, удаленная хирургически, пораженный лимфоузел, асцитная или плевральная жидкость, а также костный мозг при наличии там подтвержденного морфологически преобладающего большинства опухолевых клеток.

В биопсийном опухолевом материале должно содержаться не менее 10^7 опухолевых клеток.

При хирургическом удалении опухоли необходимо отделить кусок более 1 см^3 , избегая включения соединительной ткани, сосудов, крови и т. д. и в стерильных условиях поместить в емкость $23\text{--}50 \text{ см}^3$, наполовину заполненную питательной средой RPMI-1640. Емкость плотно закрывается, и немедленно (не более 1–2 ч) передается в лабораторию для обработки. Температура при транспортировке между комнатной и температурой тела ($16\text{--}37^\circ\text{C}$).

В случае поражения костного мозга (более 30% бластных клеток) на момент диагностики, проводится костно-мозговая пункция. Набирается 3 пробирки (вакутайнера) по 10–15 мл в полном объеме с КЭДТА в качестве антикоагулянта.

1-я пробирка — морфологическое и иммунофенотипическое исследование;

2-я пробирка — выделение опухолевых клеток на РНК/ДНК;

3-я пробирка — выделение опухолевых клеток для криосохранения.

Одновременно до начала лечения выполняется забор периферической крови в объеме 50–200 мл или 450 мл (максимально возможно по состоянию пациента). Кровь забирается в стерильный гемакон (450 мл) или в пробирки 50 мл с антикоагулянтом ЭДТА или цитратом. ПК используется для выделения мононуклеарных клеток, которые разделяют на дендритные клетки и лимфоциты для иммунологических тестов.

2. Выделение ДНК, РНК и синтез кДНК

Ткань опухоли измельчается в 2 мл физраствора с добавлением 50 мкл RNeasy для получения клеточной суспензии. Из костного мозга опухолевые клетки выделяются в составе фракции мононуклеаров центрифугированием на слое Histopaque. Клетки отмываются в фосфатно-солевом буфере (PBS), подсчитываются в камере Горяева и разделяются по 10 млн. Клонирование геномной последовательности идиотипа выполняется из «транскриптома» (кДНК), но геномная ДНК также выделяется для подтверждения клонированной нуклеотидной последовательности.

Для выделения геномной ДНК клетки лизируют в буфере для лизиса (DB-буфер) (100 mM NaCl, 10 mM tris-HCl, 25 mM EDTA, 0,5 SDS, 0,1 мг/мл протеиназа-K, pH = 8,0) при 45°C в течение 2–5 ч. Выделение ДНК проводится общепринятым способом фенол-хлороформной экстракции и с последующей преципитацией изопропанолом. При необходимости дополнительная очистка ДНК от примеси белка выполняется из DB-буфера за счет его преципитации равным объемом 8M раствором ацетата аммония с последующим осаждением ДНК из супернатанта изопропанолом. ДНК отмывается 70% этанолом, высушивается и растворяется в 50–200 мкл TE-буфера.

Выделение суммарной РНК проводится с использованием TRIreagent или любого набора. Очищенная РНК растворяется в стерильной воде с добавлением

0,001% RNAsin, измеряется концентрация и чистота РНК на спектрофотометре и немедленно замораживается на -80°C . кДНК синтезируется из РНК обратной транскрипцией с использованием рэндом-гексамеров и MMLV транскриптазы. Для синтеза используется объем РНК, содержащий 1мкг РНК. После отжига с олиго-dT в течение 5 мин при 70°C алиquota РНК вносится в смесь для обратной транскрипции с 10 единиц/мкл обратной транскриптазы MMLV и инкубируется при 37°C в течение 1 ч.

3. ПЦР-амплификация переменных регионов опухолевого иммуноглобулина

Большинство В-клеточных лимфом экспрессирует IgM изотип иммуноглобулина с каппа либо ламбда легкой цепью. Однако некоторые лимфомы экспрессируют иммуноглобулин G. Для покрытия наибольшего числа лимфом клонируется область переменного региона целиком, тяжелой цепи для IgM и IgG, а также легкой цепи IgK и IgL. Предлагаемая панель праймеров позволяет амплификацию всех переменных генных сегментов трех генов иммуноглобулинов человека, включая аллельные варианты, с +1 нуклеотида трансляции без потери или добавления аминокислот. «Прямой» праймер включает первые 7–8 кодонов V-сегментов с избеганием переменных или полиморфных нуклеотидов вблизи 3'-конца праймера. Дизайн праймеров допускал не более двух несовпадений. Такой же принцип подбора «прямых» праймеров для переменных доменов — 6 семейство VH-сегментов, 3 семейств Vk и 5 семейств VL генных сегментов.

Таблица 1 — Последовательности праймеров для ПЦР-амплификации переменных доменов иммуноглобулина

Название праймера	Последовательность 5'-3'	Направление
VH1-5'clon	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG	прямой
VH2-5'clon	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGG	прямой
VH3-5'clon	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG	прямой
VH4-5'clon	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG	прямой
VH5-5'clon	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG	прямой
VH6-5'clon	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG	прямой
C μ -3'	CTCTCAGGACTGATGGGAAGCC	обратный дистальный
C μ -clon	GGAGACGAGGGGAAAAG	обратный проксимальный
IgG-3'	GCCTGAGTTCCACGACACC	обратный дистальный
IgG-clon	CAGGGGGAAGACCGATGG	обратный проксимальный
Vk1-5'clon	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC	прямой
Vk2/3-5'clon	GATATTGTGATGACCCAGACTCCA	прямой
IgkC-3'	CCCCTGTTGAAGCTCTTTGT	обратный дистальный
IgkC-clon	AGATGGCGGGAAGATGAAG	обратный проксимальный
VL1_(51)_clon	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTC	прямой
VL1_(36-	TCTGTGCTGACTCAGCCACCCTC	прямой

47)_clon		
VL1_(40)_clon	CAGTCTGTCGTGACGCAGCCGCCCTC	прямой
VL2-clon	TCCGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTC	прямой
VL3-clon	ACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTG	прямой
VL4-clon	TCCTCTGCCTCTGCTTCCCTGGGA	прямой
VL5-clon	CAGCCTGTGCTGACTCAGCC	прямой
IGLC-3'	GTGTGGCCTTGTGGCTTG	обратный дистальный
IGLC2-7_clon	CGAGGGGGCAGCCTTGGG	обратный проксимальный
IGLC1_clon	AGTGACCGTGGGGTTGGCCTTGGG	обратный проксимальный

Обратные праймеры были подобраны для первого (C1) константного региона IgM, IgG, IgK генов для двухстадийной полугнездной ПЦР амплификации переменных доменов. Используются два обратных праймера для константного региона каждого гена, один, дистальный, в середину региона, и второй, проксимальный, к 5'-концу C1 сегмента. Последовательности праймеров приведены в табл. 1, схема расположения праймеров — на рис. 1.

Все праймеры адаптированы для температуры отжига 60°C. ПЦР выполняется в 60 мкл с 12,5 пмоль каждого праймера, 200 мкМ дНТП, 1,5 мМ MgCl₂ и 1 Ед. высокоточной ДНК-полимеразы и включает 30 циклов (второй и третий шаги — 20 циклов). Продукты первого шага ПЦР проверяются в 1,5% агарозном геле (рис. 2). Продукты ПЦР первого шага подвергаются гетеродуплексному анализу в 8% полиакриламидном геле для разделения полосы гомодуплексов (моноклональных ПЦР-продуктов) от мазка медленно движущихся в геле гетеродуплексов (происходящих из поликлональных ПЦР-продуктов). Для этого образцы ДНК денатурируются при 95°C в течение 5 мин и быстро охлаждаются до +4°C, после чего загружаются в гель. Полосы гомодуплексов вырезаются из геля, ДНК элюируется и секвенируется с праймерами, использованными для амплификации, с целью идентификации нуклеотидной последовательности опухолевого идиотипа.

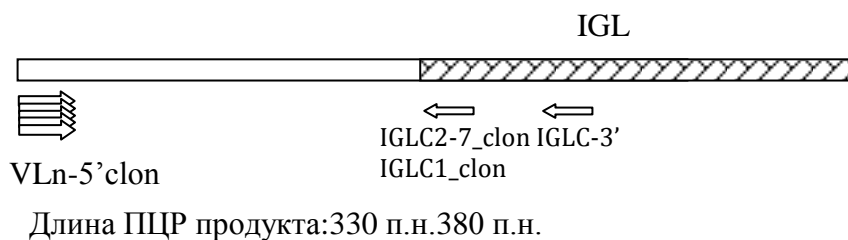
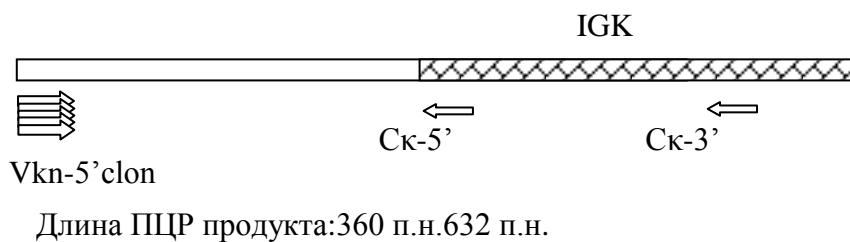
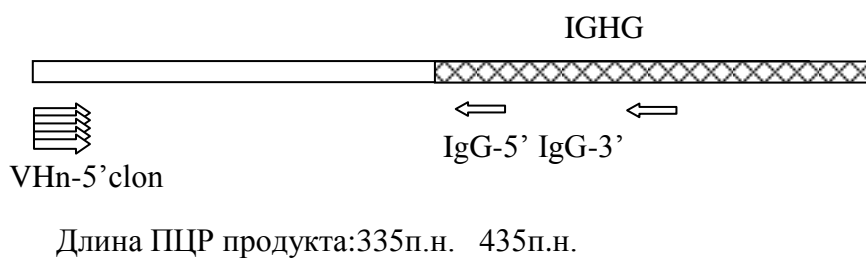
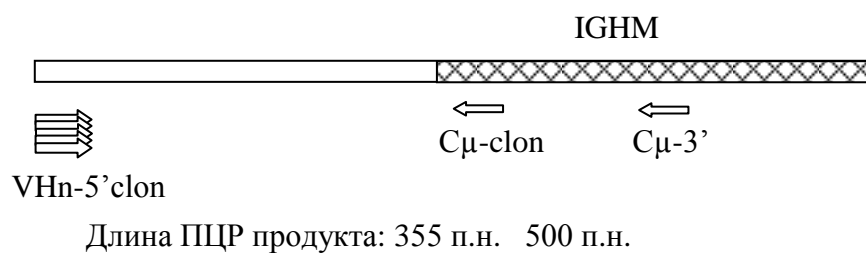


Рис. 1 — Схема расположения праймеров и примерные длины ПЦР-продуктов

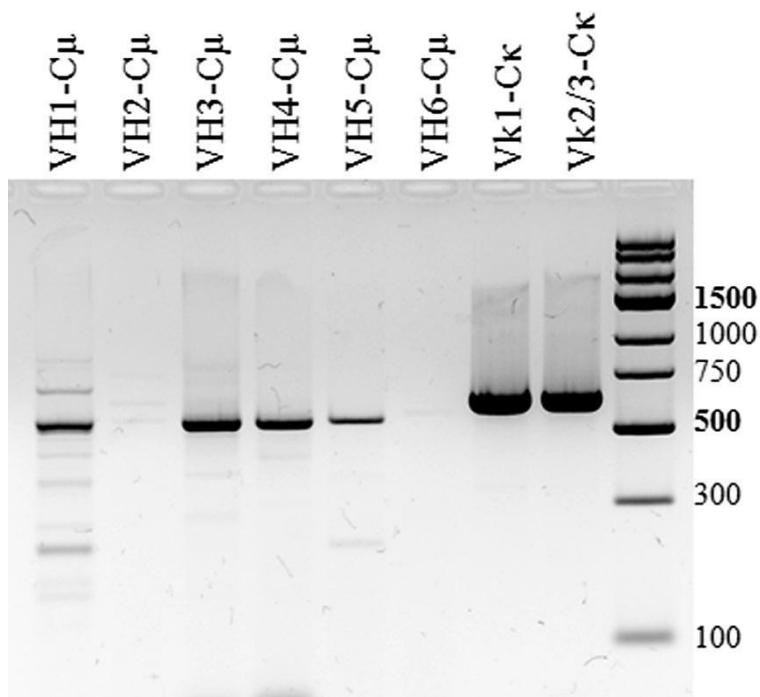


Рис. 2 — Электрофорез в агарозном геле продуктов первого шага ПЦР-амплификации IgH и IgK переменных регионов для В-клеточной линии Daudi

4. Сборка и клонирование линейного идиотипа (scFv)

Следующим этапом является сборка линейной последовательности идиотипа. Для этого оба фрагмента ДНК реамплифицируются с праймерами, включающими рестрикционные сайты для клонирования, старт- и стоп-кодоны и 6His-tag. Рестрикционные сайты были выбраны согласно их встречаемости в векторе для экспрессии рЕТ24b и их отсутствию в консенсусных регионах используемых частей иммуноглобулина. В начале конструкции добавлен сайт NdeI рестриктазы, содержащий старт-кодон (САТАТG). Конец конструкции был сконструирован двумя способами – с открытой и закрытой рамкой считывания. Первый вариант необходим для получения ДНК-вакцины с геном-костимулятором на 3'-конце. В этом случае идиотип завершается с SalI или HindIII сайтом в открытой рамке считывания, что позволяет добавлять дополнительный ген в слиянии с идиотипом как SalI/HindIII — NotI фрагмент. Второй вариант предназначен для получения идиотипического белка. Тогда scFv заканчивается введением стоп-кодона и NotI сайтом.

Соединение двух фрагментов выполняется с помощью т.н. «перекрывающейся ПЦР» (overlapping PCR), путем добавления к праймерам последовательности, названной tag. Кроме того, за счет последовательности tag вводится 6-His линкер. Гистидин кодируется двумя кодонами — САС и САТ. Шесть кодонов — 18 нуклеотидов вполне достаточно для прайминга синтеза новой цепи. 6-His-tag добавляется к обратным праймерам для клонирования (последнего шага амплификации), соответственно к IgH-Cg и IgH-Cμ, и называется Cg-tag и Cμ-tag соответственно. Перед соединяющей «перекрывающейся» ПЦР каждый из амплифицированных фрагментов ДНК реамплифицируется с праймерами, содержащими рестрикционные сайты и 6-His-tag. Последовательности всех праймеров для клонирования и сборки приведены в табл.2. После этого фрагменты

ДНК обоих переменных доменов очищаются и смешиваются друг с другом при добавлении концевых праймеров и амплифицируются 20 циклов при температуре отжига 55°C с использованием «точно читающих» полимераз (например, Pfu-polymerase). Полученные ПЦР-продукты разделяются в электрофорезе, и из геля выделяется фрагмент ДНК нужной длины. Последовательность шагов проиллюстрирована на рис. 3, общая схема конструкции представлена на рис. 4.

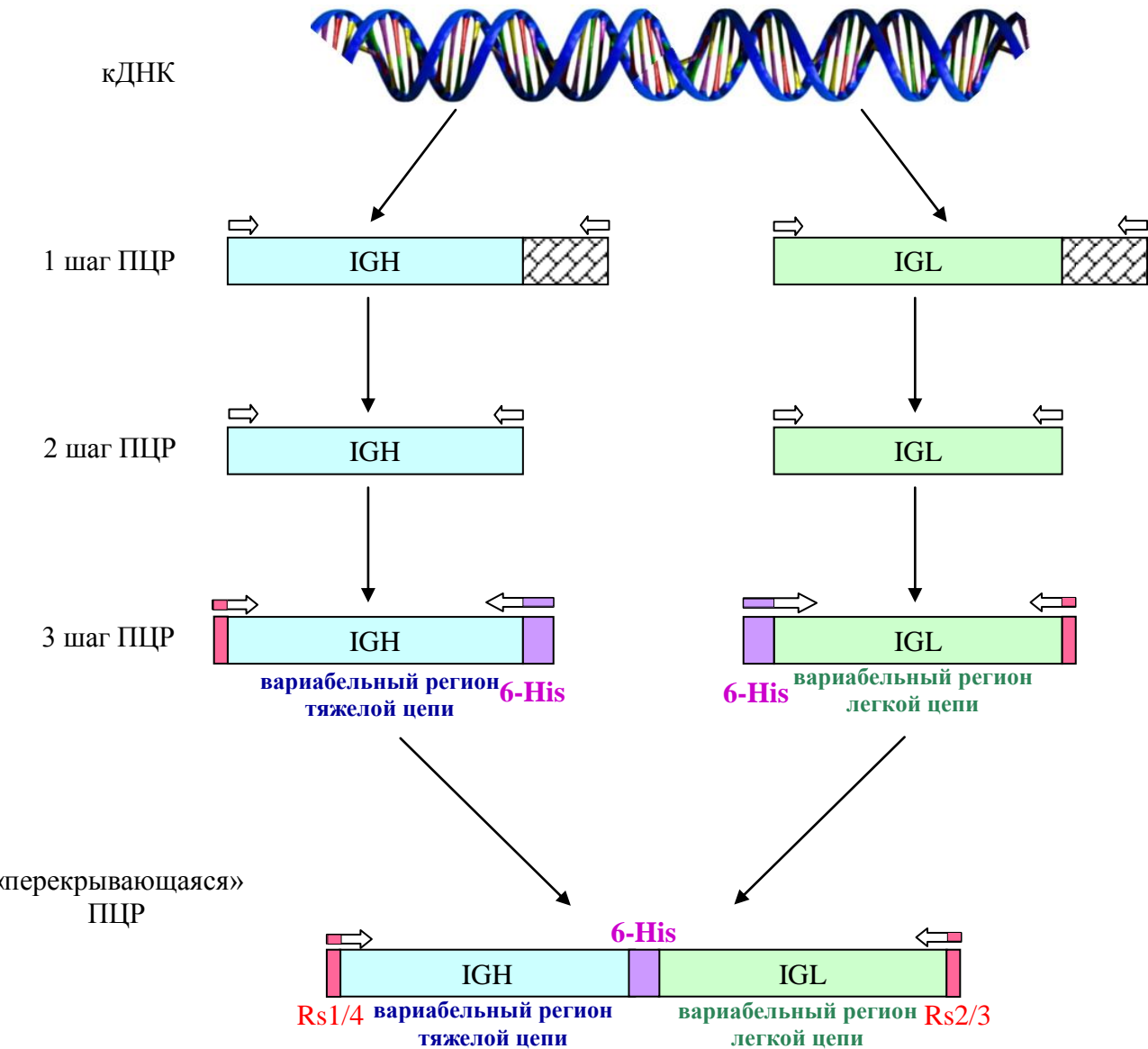


Рис. 3 — Этапы амплификации и сборки scFv

Таблица 2 — Последовательности праймеров для сборки и клонирования scFv

Прямые праймеры, клонирование идиотипа в бактериях для синтеза белка	
VH1-5'-NdeI	GCG TCT AGACAT ATG CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
VH2-5'-NdeI	GCG TCT AGACAT ATG CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG
VH3-5'-NdeI	GCG TCT AGACAT ATG GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
VH4-5'-NdeI	GCG TCT AGACAT ATG CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG
VH5-5'-NdeI	GCG TCT AGACAT ATG GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG
VH6-5'-NdeI	GCG TCT AGACAT ATG CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG

Прямые праймеры, клонирование идиотипа в качестве ДНК-вакцины	
VH1-5'- BamH1	GCG GGA TCC ACC ATG CAG GTG CAG CTG GTG CAG TC
VH2-5'- BamH1	GCG GGA TCC ACC ATG CAG GTC ACC TTG AAG GAG TC
VH3-5'- BamH1	GCG GGA TCC ACC ATG GAG GTG CAG CTG GTG GAG TC
VH4-5'- BamH1	GCG GGA TCC ACC ATG CAG GTG CAG CTG CAG GAG TC
VH5-5'- BamH1	GCG GGA TCC ACC ATG GAG GTG CAG CTG GTG CAG TC
VH6-5'- BamH1	GCG GGA TCC ACC ATG CAG GTA CAG CTG CAG CAG TC
Обратные праймеры, клонирование идиотипа в качестве ДНК-вакцины	
IgкC-SalI	GCG GTC GAC AGA TGG CGG GAA GAT GAA G
IgкC-HindIII	GCG AAG CTT AGA TGG CGG GAA GAT GAA G
IGLC2-7_SalI	GCG GTC GAC CGA GGG GGC AGC CTT GGG
IGLC2-7_HindIII	GCG AAG CTT CGA GGG GGC AGC CTT GGG
IGLC1_SalI	CGC GTC GAC AGT GAC CGT GGG GTT GGC CTT GGG
IGLC1_HindIII	GCG AAG CTT AGT GAC CGT GGG GTT GGC CTT GGG
Обратные праймеры, клонирование идиотипа в качестве ДНК-вакцины	
IGLC2-7_stop_NotI	GCG GC GGC CGC TTA CGA GGG GGC AGC CTT GGG
IGLC1_stop_NotI	GCG GC GGC CGC TTA AGT GAC CGT GGG GTT GGC CTT GGG
IgкC_stop_NotI	GCG GC GGC CGC TTA AGA TGG CGG GAA GAT GAA G
Прямые праймеры с добавлением 6-His	
Vk1-5'tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
Vk2/3-5'tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCA
VL1_(51)_tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG
VL1_(36-47)_tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC TCT GTG CTG ACT CAGC CA
VL1_(40)_tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG
VL2-tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC TCC GTG TCC GGG TCT CCT GGA
VL3-tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC ACT CAG CCA CCC TCG GTG TCA GTG
VL4-tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC TCC TCT GCC TCT GCT TCC CTG GGA
VL5-tag	CAC CAT CAT CAT CAC CAC CAG CCT GTG CTG ACT CAG CC
Обратные праймеры с добавлением 6-His	
Cg-tag	GTG GTG ATG ATG ATG GTG CAG GGG GAA GAC CGA TGG
Cμ-tag	GTG GTG ATG ATG ATG GTG GGA GAC GAG GGG GAA AAG
Праймеры для клонирования гена-костимулятора PVXCP	
PVXCP-F-SalI	GCG GTC GAC ATG TCA GCA CCA GCT AGC ACA A
PVXCP-F-HindIII	GCG AAG CTTATG TCA GCA CCA GCT AGC ACA A
PVXCP-R-NotI	G CGC GGC CGC TTA TGG TGG TGG TAG AGT GAC AAC

После сборки scFv ПЦР-продукты разделяются в агарозном геле в триплетах, и фрагменты ДНК подходящего размера (750–780 п.н.) вырезаются из геля. ДНК очищается от агарозы, подвергается рестрикции соответствующими рестриктазами и лигируется в вектор pET24b, аналогично рестрицированный. Лигазная смесь вводится методом классической трансформации в клетки E.coliXL1-blue, которые высеваются на чашку с канамицином. Правильность сборки конструкции обязательно проверяется с помощью секвенирования в плаزمиде, выделенных из 5–10 рекомбинантных клонов. Сиквенс идиотипа, полученный от разных клонов, сопоставляется с исходным сиквенсом V_H и V_L фрагментов для того, чтобы убедиться в отсутствии нуклеотидных замен. Проверяется также расположение старт и стоп-кодона, правильность линкера, рестрикционных сайтов и т. д.

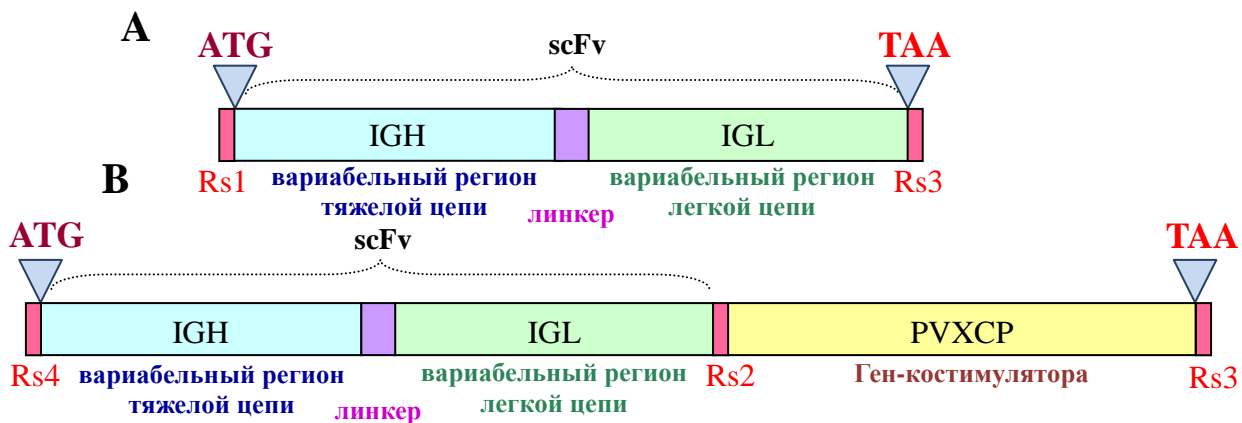


Рис. 4 — Схема генетической конструкции рекомбинантной идиотипической вакцины: А — для синтеза белка; В — для получения ДНК-вакцины. Сайты рестрикции: Rs1 — NdeI, Rs2 — SalI или HindIII, Rs3 — NotI, Rs4 — BamHI

5. Экспрессия и очистка идиотипического белка

Для экспрессии рекомбинантного идиотипического белка используются штаммы *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (предпочтительней) или BL21-(DE3), в клетки которого путем кальций-хладовой трансформации вводится плазида рЕТ24b с клонированной и проверенной секвенированием нуклеотидной последовательностью scFv. Клонирование идиотипа в этом случае обеспечивается по сайтам рестрикции NdeI и NotI. Селекция клонов трансформантов проводится в присутствии 20 мкг/мл канамицина (устойчивость обеспечивается вектором рЕТ24b) и 20 мкг/мл хлорамфеникола (только для BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL). Вектор рЕТ24b обеспечивает экспрессию рекомбинантного белка в бактериях штамма BL21 при индукции с помощью изопропилтиогалактозида (ИПТГ). Оптимальные условия для индукции синтеза белка — температура 31°C в течение 3 ч при 0,5 мМ ИПТГ в присутствии канамицина 20 мкг/мл.

Индукция синтеза рекомбинантного полипептида проводится после достижения бактериальной культурой оптической плотности $OD_{600}=0,3$ добавлением в среду культивирования ИПТГ в конечной концентрации 0,4 мМ. Время культивирования культуры после добавления индуктора составляло 3 ч при 37°C. Бактерии собираются центрифугированием 10 мин при 2000 об./мин и растворяются в буфере следующего состава: 0,5 М NaCl; 0,4 мМ PMSF; 20 мМ TrisHCl, pH = 8,0 и помещаются в морозильник на -20°C.

Для очистки белка используется аффинная металлохелатная хроматография. После индукции клетки бактерий *E. coli* собираются центрифугированием при 5000 об./мин в течение 10 мин. Осадок бактерий отмывают стерильным физиологическим раствором, и ресуспензируют в 1 мл холодного буфера (20 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, pH = 8,0). Клетки трижды обрабатываются ультразвуком при 20 кГц в течение 30 с на льду или разрушают с помощью гомогенизатора при температуре 4°C. Лизат доводится 10 М раствором мочевины до концентрации 6 М и выдерживается в течение 60 мин на ледяной бане, после чего центрифугируется при 6000 об./мин в течение 20 мин. Супернатант, содержащий растворимые белки, аккуратно собирается, пропускается через нитроцеллюлозный фильтр 0,45 мкм и

наносится на колонку с Ni-NTA агарозой, предварительно уравновешенную связывающим буфером (5 mM имидазол, 20 mM Tris-HCl, 0,4 mM PMSF, 0,5 M NaCl, pH = 8,0), содержащим 6 M мочевины. После нанесения материала колонка отмывается 10 объемами связывающего буфера с 6 M мочевиной и 5 объемами отмывочного «Wash»-буфера (20 mM имидазол, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 6 M мочевины, pH = 7,9).

Элюция связавшихся на колонке белков проводится 5 объемами элюирующего буфера (300 mM имидазол, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 6 M мочевины, pH = 7,9). Имидазол, соли и мочевины удаляются с помощью поэтапного диализа с использованием буферных растворов, позволяющих постепенно (без образования конгломератов) удалять денатурирующие агенты, или ультрафильтрацией в центриконах. Фракции выделения очищенного белка анализируются в 12% SDS-PAGE (метод Лаэмми) геле, который окрашивается красителем Coomassie Brilliant Blue. На рис. 5 показана очистка идиотипического белка В-клеточной линии Namalva.

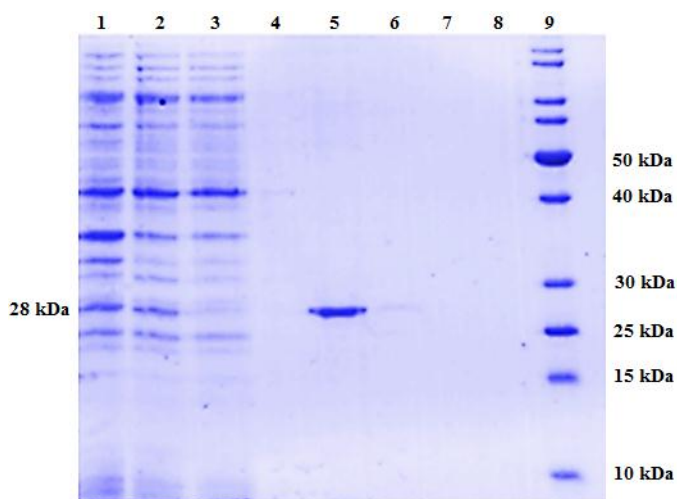


Рис. 5 — Фракции очистки белка scFv клеток Namalva: 1 — лизат клеток после индукции; 2 — супернатант лизата; 3 — лизат, прошедший через колонку; 4 — промывка колонки с 20 mM имидазолом; 5–8 — фракции элюции колонки с 300 mM имидазолом; 9 — маркер молекулярного веса

Очищенный белок концентрируется до концентрации около 1 мкг/мкл, стерилизуется фильтрацией через 0,2 мкм центрифужные фильтры и хранится при -80°C в физрастворе с 20% глицерином. Идиотипический белок используется для нагрузки аутологичных незрелых дендритных клеток пациента добавлением белка в количестве 50 мкг/мл среды и культивирования в течение 18 ч.

6. Получение идиотипической ДНК-вакцины

Применение ДНК-вакцины требует использования специального вектора и наличие химеры идиотипа с геном-костимулятором, увеличивающим иммуногенность вакцины. В качестве гена-костимулятора используется капсидный белок вируса X картофеля (PVXCP). Ген был клонирован из зараженной ткани листьев картофеля и в настоящее время имеется в коллекции «Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии». PVXCP ген был заранее встроен в вектор pET24b как HindIII – NotI фрагмент. После сборки идиотипа (scFv) от очередного

пациента, он встраивается как BamHI – HindIII фрагмент в полученную плазмиду pET24b:PVXCP. Плазмида клонируется в *E.coli*XL1-blue, проверяется секвенированием, после чего конструкция вакцины вырезается через BamHI – NotI сайты рестрикции (рис. 4B).

В качестве вектора для вакцины используется вектор pING, специально разработанный в США для ДНК-вакцинации у людей. В отсутствие этого вектора возможно использование стандартного вектора экспрессии млекопитающих pcDNA3.1. Лигирование производится через BamHI – NotI сайты рестрикции, после чего плазмида клонируется в *E.coli*XL1-blue и проверяется секвенированием.

ДНК плазмиды pING : scFv-PVXCP выделяется доступным ультрачистым методом получения большого количества плазмидной ДНК, свободной от эндотоксина, и доводится до концентрации 1000 мкг/мл. Препарат ДНК-вакцины представляет собой раствор ДНК плазмиды в смеси PBS-буфера и физраствора (1:1). Каждая доза вакцины составляет 500 мкг ультрачистой плазмидной ДНК в объеме 0,5 мл. Хранится отдельно в замороженном виде. После разморозки и нагрева до комнатной температуры раствор вводится шприцем внутримышечно.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Ошибка: *из опухолевого материала не выделяется РНК достаточно хорошего качества. Синтезированная кДНК не проходит в ПЦР.*

Причина: опухолевый материал слишком долго хранился при положительной температуре. Обработка материала биопсии проводилась неправильно.

Решение: материал биопсии забирать стерильно и немедленно доставлять в лабораторию. Ткань лимфоузла погружать в питательную среду и транспортировать при температуре 30–37°C в течение 1–2 ч. При невозможности быстрой доставки погрузить ткань в физраствор или PBS, содержащий 10% реагента RNAlater, и хранить при 0–10°C не более суток. Выделять РНК строго в соответствии с инструкцией набора по выделению. Использовать свежие реактивы.

2. Проблема: *не удается идентифицировать клональные реаранжировки IgH/IgK/IgL генов, происходящие из опухоли.*

Причина: а) малое количество опухолевых клеток в образце;

б) редкие типы реаранжировок в опухолевых клетках.

Решение: а) использовать гистологически/морфологически подтвержденный материал опухоли. Определить количество опухолевых клеток в образце методом проточной цитометрии. Убедиться в наличии экспрессии иммуноглобулина на поверхности опухолевых клеток;

б) идентифицировать генные сегменты (V и J), участвующие в реаранжировке, на уровне ДНК, используя установленные способы ПЦР-диагностики. Выполнить первый шаг амплификации с использованием только праймеров, соответствующих установленному семейству V-сегментов и изотипу иммуноглобулина (M, G, каппа, ламбда цепь). Использовать гетеродуплексный анализ. Выполнить второй шаг ПЦР из ДНК, элюированной из вырезанной в геле полосы гомодуплексов.

3. Ошибка: *фрагменты двух переменных доменов не сливаются вместе при «перекрывающейся» ПЦР.*

Причина: неправильно подготовлены фрагменты ДНК.

Решение: убедиться, что фрагменты были амплифицированы с использованием 6-His-tag праймеров. Очистить оба фрагмента методом колоночной гель-фильтрации (любой набор для очистки ПЦР-продуктов от праймеров). Вычислить количество ДНК-фрагментов в агарозном геле, убедиться, что фрагменты имеют правильный размер. Вносить в реакцию одинаковое количество ДНК обоих фрагментов.

4. Ошибка: *в клонированной scFv на сиквенсе обнаруживается много нуклеотидных замен, ошибок, попадание стоп-кодона внутри конструкции.*

Причина: случайные ошибки Taq-полимеразы.

Решение: снизить на 10–15% концентрацию дНТП и хлорида магния при ПЦР. Уменьшить количество циклов ПЦР до 25. Исключить второй шаг полугнездной ПЦР, амплифицировать продукты первого шага сразу с праймерами для клонирования/сборки. Использовать высокоточные полимеразы (Pfu-полимераза, ферменты типа Phusion).

5. Проблема: *при клонировании получаются клоны, содержащие часть последовательности идиотипа.*

Причина: случайное попадание одного из сайтов рестрикции в гипервариабельный регион идиотипа.

Решение: убедиться, что сайт рестрикции встречается в вариабельном домене, изучив сиквенс после первого раунда амплификации и PAGE-очистки. Сайты рестрикции SalI и HindIII взаимозаменяемы — в случае неуместной встречаемости одного из них использовать праймеры с альтернативным сайтом. В случае попадания сайта NotI возможно клонирование scFv в открытой рамке по сайтам SalI или HindIII в вектор pET24b для синтеза белка. В этом случае в scFv добавится дополнительный 6-His-tag, который не мешает ни очистке, ни применению белка. Трансляция в этом случае завершится на внешнем, плазмидном стоп-кодоне. Сайт NdeI незаменим в рамках данной методики, его исключить в рамках данного метода невозможно. Сайт BamHI для генных сегментов VH3 (наиболее частый) и VH5 может быть заменен на сайт NcoI (CCATGG), что не требует смены праймеров, так как эта последовательность находится в соответствующих праймерах и включает в себя старт-кодон. В этом случае клонирование scFv в pING выполняется как NcoI – NotI фрагмент.

6. Проблема: *низкий уровень экспрессии идиотипического белка в бактериях.*

Причина: неизвестна.

Решение: штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL сконструирован на оптимизацию соответствия кодонов между бактерией и человеком. Однако в некоторых случаях достигается лучшая экспрессия в немодифицированном штамме *E. coli* BL21. Повысить объем выращиваемой культуры бактерий. Поднять температуру индукции ИПТГ с 31 до 37°C, увеличить время индукции с 3 ч до ночной индукции (12–15 ч).

7. Проблема: *белок не связывается на колонке.*

Причина: отсутствие взаимодействия между остатками 6-гистидинов и иммобилизованными ионами Ni²⁺.

Решение: использовать готовую коммерческую колонку с Ni-NTAагарозой для очистки белков, меченных 6-His. Убедиться, что нанесения белка на колонку происходит в присутствии 6М мочевины. Если белок сходит при промывке колонки буфером «Wash», снизить концентрацию имидазола в этом буфере с 20 до 5 мМ или

использовать на стадии промывки 100 мМ глицина вместо имидазола. Проверить на иммуноблоте полученный белок с антителами к 6-His.

8. Проблема: *белок не элюируется с колонки.*

Причина: потеря белка или слишком прочное его связывание.

Решение: это чаще всего происходит, если белок изначально не связался с колонкой (см. п. 6). Если он слишком прочно связался с колонкой, можно поднять концентрацию имидазола в буфере «Wash» с 300 до 450 мМ или снизить pH этого буфера до 6 добавлением NaH_2PO_4 .