

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ИДИОТИПИЧЕСКОЙ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИМФОМ

С.Н. Доронина, Е.П. Вашкевич, А.Н. Мелешко

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии

Неходжкинские лимфомы входят в десяток наиболее распространенных и опасных онкологических заболеваний. В 2008 г. в мире выявлено 355900 первичных лимфом и 191400 смертей от этого заболевания [1]. В Республике Беларусь в 2004 г. выявлено 968 первичных лимфом и этот показатель растет [2]. Классические подходы к лечению онкогематологических заболеваний (химиотерапия, лучевая терапия, хирургия) приближаются к пределу своей эффективности. Все большее распространение получает иммунотерапия, клеточная терапия и применение противораковых вакцин. Противораковая вакцинация, в отличие от инфекций, сталкивается с серьезными ограничениями, связанными с малым количеством известных опухоль-ассоциированных антигенов.

Весьма привлекательным кандидатом на роль опухоль-специфического антигена для лимфопрролиферативных заболеваний выступают лимфоцитарные иммунорецепторы — иммуноглобулин для В-клеток и Т-клеточный рецептор для Т-клеток. Идиотип (Id) — уникальная часть молекулы иммуноглобулина, образованная вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, в т. ч. экспрессирующегося на поверхности В-лимфоцитов в качестве В-клеточного рецептора. Идиотип уникален для каждого клона В-лимфоцитов. Поскольку лимфома является клональным заболеванием, идиотип может использоваться в качестве пациент-специфического опухолевого антигена. Разработки идиотипических вакцин начались с 1992 г., когда Рон Леви и Ларри Квак (Стэнфордский университет, США) впервые вакцинировали пациентов с фолликулярной лимфомой опухолевым иммуноглобулином [3]. За последние 10 лет многочисленные клинические испытания показали иммунологический и клинический ответ у вакцинированных пациентов [4, 5]. Большая часть этих вакцин были получены путем гибридомной технологии — длительного и дорогостоящего метода. Дальнейшие исследования были направлены на получение рекомбинантных вакцин путем клонирования вариабельных доменов иммуноглобулина из опухолевых клеток [6]. Различные методы экспрессии Id-белков были использованы, включая культуры клеток насекомых [7], растений [8, 9], бактерии *E.coli* [10, 11] или бесклеточные системы экспрессии [12, 13]. Перспективным вариантом является ДНК-вакцины, когда иммунизация проводится плазмидной ДНК, кодирующей антиген [14].

Все методы получения ДНК-вакцин подразумевают клонирование вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, соединенных в «линейный вариабельный фрагмент» (scFv), соединенный коротким пептидным линкером [15]. В этом исследовании мы предлагаем метод амплификации вариабельных регионов IgM, IgG тяжелых цепей, IgK, IgL легких цепей без добавления или потери аминокислот, способ сборки scFv, клонирования scFv в векторе экспрессии для получения ДНК-вакцины или экспрессии идиотипического белка в бактериях *E.coli*.

Методы:

1. Клеточные линии и образцы пациентов.

Четыре клеточные линии лимфом, экспрессирующих иммуноглобулин, IM-9, Daudi, RPMI1788 и Namalwa использовались для получения идиотипа. Клетки выращивались в RPMI-1640 среде с 10% ЭТС и

2 mM глутамином. Кроме того, использовали опухолевые клетки из пораженных лимфоузлов двух пациентов с лимфомой Беркитта и диффузной В-крупноклеточной лимфомой. РНК выделялась с помощью TRI reagent (Sigma). 1 мкг РНК использовался для синтеза кДНК с обратной транскриптазой SuperScriptIII (Life Technologies) и Oligo-dT.

2. ПЦР-амплификация переменных фрагментов иммуноглобулина.

ПЦР была выполнена для каждого гена полугнездным способом со специально подобранной панелью праймеров. Все праймеры были оптимизированы для температуры отжига 60°C. Реакция проводилась в 30 мкл с 12,5 пмоль каждого праймера, 200 мкМ дНТП, 1,5 mM MgCl₂ и 1U HF ДНК-полимеразы (Праймтех). Амплификация включала 20 циклов для 1 шага и 30 циклов для последующих. ПЦР-продукты проверялись электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле.

3. Молекулярное клонирование и секвенирование.

Клонирование выполнялось методом рестрикции эндонуклеазами и лигирования с помощью T4-лигазы (Life Technologies). Трансформация клеток *E.coli* XL1-blue выполнялась стандартным кальций-хладовым методом. Выделение плазмид проводили с использованием набора Plasmid Mini Kit (QIAGEN). Фрагмент ДНК собранной scFv-конструкции вырезался из агарозного геля, ДНК выделялась набором QIAquick GelExtraction Kit (Qiagen). Секвенирование выполнялось с BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) на аппарате ABI PRISM 3130.

Результаты и их обсуждение. Дизайн праймеров для ПЦР-амплификации переменных доменов иммуноглобулина. Большинство В-клеточных лимфом экспрессируют иммуноглобулин М или G с каппа или лямбда легкой цепью [16]. Для покрытия максимального количества лимфом мы разработали расширенную панель праймеров на 4 гена иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgK и IgL. Генные сегменты были собраны по гомологии семейства и выравнены с помощью программы AlignX из пакета Vector NTI 9.0 (Invitrogen). Прямые праймеры подбирались для первых 7–8 кодонов V-генных сегментов, избегая переменных или полиморфных нуклеотидов вблизи 3'-конца праймера.

Два обратных праймера для проксимального (C1) константного региона IgM, IgG, IgK и IgL генов были подобраны для двух шагов полугнездной ПЦР-амплификации переменных доменов. Для IgL было подобрано два альтернативных проксимальных праймера.

Амплификация переменных доменов и сборка scFv-конструкции. Изотип иммуноглобулина и легкая цепь определялись методом проточной цитометрии. ПЦР реакции для соответствующих генов были выполнены отдельно с каждой парой праймеров первого шага.

Каждый из двух переменных регионов иммуноглобулина амплифицировался независимо, фрагменты очищали, секвенировали и реамплифицировали с праймерами для клонирования. Фрагменты «сшивали» вместе в линейную конструкцию scFv.

Переменные домены IgH и IgL собирались в scFv методом «перекрывающейся ПЦР». Для этого 6 кодонов гистидина (CACCATCATCATCACCAC) добавляется к 5'-концам V-clon праймеру IgK/IgL и обратнo-комплементарная последовательность к 5'-концу C-clon праймера IgH. Каждый из двух фрагментов после этого очищается, они смешиваются и подвергаются 10 циклам ПЦР без добавления праймеров с температурой отжига 55°C и высокоточной полимеразой. Фрагмент ДНК собранной scFv-конструкции клонировали в рTZ57R, после проверки правильности нуклеотидной последовательности субклонировали в вектор рЕТ24b для экспрессии белка в клетках *E.coli* или в вектор рING для применения в качестве ДНК-вакцины. Экспрессия белкового препарата идиотипической вакцины была проверена в клетках *E.coli* и подтверждена методом иммуноблотинга. Иммуногенность ДНК-вакцины усиливается добавлением гена-костимулятора. Ген был клонирован из зараженной ткани листьев картофеля и добавлен в конструкцию вакцины на N-конце scFv.

Выводы:

1. Разработан метод ПЦР-амплификации переменных доменов иммуноглобулина, охватывающий около 96% лимфом.
2. Выполнен дизайн ДНК-вакцины, пригодной для клинического применения.

Предложения по сотрудничеству: начало клинических испытаний индивидуальной идиотипической ДНК-вакцины на пациентах с В-клеточными лимфомами. Приглашаются онкологи, занимающиеся лечением неходжкинских лимфом у взрослых пациентов.

PRODUCTION OF PATIENT-SPECIFIC IDIOTYPE DNA-VACCINE AGAINST LYMPHOMA

S.N. Doronina, K.P. Vashkevich, A.N. Meleshko

Idiotypе, the unique part of immunoglobulin molecule expressed on the surface of B-cells, represents a specific antigen for vaccination against lymphoma. Method of PCR-based amplification of variable immunoglobulin regions was developed and optimized. Three immunoglobulin expressing lymphoma cell lines IM-9, Daudi, Namalwa and tumor specimens from two pediatric patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma were used for idiotypе cloning.

We performed design of specific primers for direct amplification of all possible variable regions of IgM, IgG heavy chains, IgK, IgL light chains and described method of cloning, assembling scFv and expression of idiotypic protein in bacteria *E. coli*. We add a co-stimulator gene of potato virus X coat protein (PVXCP) to the construction in the N-part of the protein. The proposed method of vaccine production is suitable for the production of vaccines for immune therapy in more than 96% of cases of B-cell non-Hodgkin lymphoma.

Литература

1. Global cancer statistics / A.L. Jemal [et al.] // *Cancer J. Clin.* — 2011. — Vol. 61, № 2. — P. 69–90.
2. Эпидемиология злокачественных новообразований в Беларуси / И.В. Залуцкий [и др.]. — Минск: Зорны верасень, 2006. — 207 с.
3. Long-term follow-up of idiotype vaccination in human myeloma as a maintenance therapy after high-dose chemotherapy / M. Coscia [et al.] // *Leukemia.* — 2004. — Vol. 18, № 1. — P. 139–145.
4. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients / J.M. Timmerman // *Blood.* — 2002. — Vol. 99, № 5. — P. 1517–1526.
5. Clinical benefit associated with idiotypic vaccination in patients with follicular lymphoma / S. Inoges [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2006. — Vol. 98, № 18. — P. 1292–1301.
6. Idiotypic vaccination for B-cell malignancies as a model for therapeutic cancer vaccines: from prototype protein to second generation vaccines / P.A. Ruffini [et al.] // *Haematol.* — 2002. — Vol. 87, № 9. — P. 989–1001.
7. High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies / T. Kretzschmar [et al.] // *J. Immunol. Meth.* — 1996. — Vol. 195, № 1–2. — P. 93–101.
8. Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotype responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig / A.A. McCormick [et al.] // *J. Immunol. Meth.* — 2003. — Vol. 278, № 1–2. — P. 95–104.
9. Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study / A.A. McCormick [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 105, № 29. — P. 10131–10136.
10. Cloning of idiotype immunoglobulin genes in B cell lymphomas by anchored PCR and production of individual recombinant idiotype vaccines in *Escherichia coli* / C. Bertinetti [et al.] // *Eur. J. Haematol.* — 2006. — Vol. 77, № 5. — P. 395–402.
11. *Escherichia coli*-based production of a tumor idiotype antibody fragment — tetanus toxin fragment C fusion protein vaccine for B cell lymphoma / K.G. Patel [et al.] // *Protein. Expr. Purif.* — 2011. — Vol. 75, № 1. — P. 15–20.
12. Houot, R. Vaccines for lymphomas: Idiotype vaccines and beyond / R. Houot, R. Levy // *Blood Rev.* — 2009. — Vol. 23. — P. 137–142.
13. Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines / G. Kanter [et al.] // *Blood.* — 2007. — Vol. 109, № 8. — P. 3393–3399.
14. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma / M. Bendandi [et al.] // *Nat. Med.* — 1999. — Vol. 5, № 10. — P. 1171–1177.
15. Sahota, S.S. Identification and assembly of V genes as idiotype-specific DNA fusion vaccines in multiple myeloma / S.S. Sahota, M. Townsend, F.K. Stevenson // *Meth. Mol. Med.* — 2005. — Vol. 113. — P. 105–119.
16. Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphoma. Lack of correlation between immunophenotype and cell morphology / H.J. Schuurman [et al.] // *Am. J. Pathol.* — 1987. — Vol. 129, № 1. — P. 140–151.