

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2013 г.

Регистрационный № 118-1013

**МЕТОД ВАКЦИНОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С
ХИМИОРЕЗИСТЕНТНЫМИ ОПУХОЛЯМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ
АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение

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

АВТОРЫ:

Алейникова О.В., член-корреспондент НАН Беларуси, д.м.н., профессор,
Жаврид Э.А., д.м.н., профессор, Исайкина Я.И., к.б.н., Семак И.А.

Минск, 2013

Настоящая инструкции по применению (далее – инструкция) предназначена для врачей-онкологов и других врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам после удаления солидных опухолей различной локализации, в организациях здравоохранения, имеющих материальную базу для создания индивидуальных противоопухолевых вакцин.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод вакцинотерапии с применением индивидуальной противоопухолевой вакцины на основе аутологичных дендритных клеток для развития полноценного противоопухолевого иммунного ответа у пациентов с химиорезистентными солидными опухолями после радикально проведенной хирургической операции и стандартного послеоперационного лечения (химиолучевая терапия).

Необходимым условием является получение письменного информированного согласия пациента о проведении ему противоопухолевой вакцинотерапии для лечения химиорезистентной опухоли.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Инфекционные (бактериальные, вирусные) заболевания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Проточной цитофлуориметр.
2. Наборы моноклональных антител для определения поверхностных клеточных маркеров CD80, CD83, CD86, CD14.

3. Ламинарный шкаф 2-ого класса защиты для асептической работы с аутологичными клетками пациента и клетками опухоли.
4. CO₂-инкубатор для создания условий для роста и дифференцировки клеток.
5. Сепаратор крови для проведения процедуры лейкофереза.
6. Центрифуга.
7. Микроскоп инвертированный.
8. Культуральные флаконы на 175 см².
9. Пипетки серологические на 10 и 25 мл.
10. Пробирки центрифужные на 15 и 50 мл.
11. Камера Горяева.
12. Среда для клеточных культур RPMI 1640 с HEPES и L-глутамином.
13. Гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ).
14. Интерлейкин 4 (ИЛ-4).
15. Интерлейкин 1 β (ИЛ-1 β).
16. Интерлейкин 6 (ИЛ-6).
17. Эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС).
18. Альбумин человека сывороточный.
19. Фактор некроза опухолей - α (ФНО- α).
20. Фиколл- 1077 Гистопак.
21. 0,9%-ный раствор NaCl.

ЭТАПЫ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

Этап 1. Проведение хирургической операции по радикальному удалению злокачественной опухоли у пациента.

Этап 2. Получение опухолевого лизата – источника опухолевых антигенов.

2.1. Доставка образца опухоли размером не менее 2 см² в стерильном растворе 0,9% NaCl в течение 2 часов из операционной в лабораторию, оснащенную для проведения манипуляций со стерильным клеточным материалом,

2.2. Механическое диспергирование образца опухоли в асептических условиях до состояния гомогената.

2.3. Отмывка опухолевого гомогената в 0,9% NaCl и фильтрация через нейлоновый фильтр (70 μm).

2.4. Подсчет опухолевых клеток в камере Горяева и оценка их жизнеспособности с применением красителя трипанового синего.

2.5. Осуществление лизиса опухолевых клеток путем 4-х кратного замораживания в жидком азоте с последующим размораживанием при комнатной температуре.

2.6. Получение суспензии белков центрифугированием лизированных опухолевых клеток при 400g в течение 30 минут с последующей фильтрацией.

2.7. Фасовка опухолевого лизата по дозам, исходя из соответствия: 1 доза - 1×10^7 опухолевых клеток.

2.8. Облучение опухолевого лизата (70 Гр).

2.9. Замораживание и хранение лизата при температуре ниже -70°C.

Этап 3. Принятие решения о проведении пациенту дополнительно к стандартному послеоперационному лечению (химиолучевая терапия) курса противоопухолевой вакцинотерапии при наличии достаточного количества материала опухолевого лизата (не менее 5 проб);

Этап 4. Проведение лейкофереза пациенту.

4.1. Госпитализация пациента и постановка ему центрального венозного катетера.

4.2. Проведение лейкофереза пациенту на сепараторе клеток крови при содержании лимфоцитов в анализе периферической крови пациента – 60 - 70%, обрабатывая не менее 5 000 мл крови.

4.3. Доставка полученного продукта афереза, содержащего не менее $2,0 \times 10^9$ лейкоцитов в лабораторию, оснащенную для работы с клеточными культурами, для дальнейшего процессинга по выделению моноклеарных клеток (МНК).

Этап 5. Выделение фракции МНК для получения дендритных клеток (ДК).

5.1. Выделение не менее $1,0 \times 10^9$ МНК из продукта лейкофереза на градиенте плотности, наложением на Гистопак (плотность 1,077 г/мл).

5.2. Центрифугирование клеток при 400g 30 минут.

5.3. Двукратная отмывка клеток в среде RPMI-1640, содержащей 1% альбумин.

Этап 6. Получение ДК.

6.1. Культивирование МНК в среде RPMI-1640 с добавлением 10% ЭТС в течение 2 часов при +37°C, 5% CO₂ в пластиковых флаконах площадью 175 см².

6.2. Удаление после окончания культивирования среды, содержащей суспензию клеток.

6.3. Отмывка моноцитов, адгезированных к пластику, средой RPMI-1640.

6.4. Получение незрелых ДК, культивируя моноциты в среде RPMI-1640, содержащей 10% ЭТС, ГМ-КСФ (100 нг/мл) и ИЛ-4 (25 нг/мл) в течение 6 дней с двукратной сменой среды каждые 2 дня.

6.5. Идентификация генерированных незрелых ДК по экспрессии маркеров CD83, CD86 методом иммунофенотипирования.

6.6. Фасовка незрелых ДК по $1,5 \times 10^7$ клеток в среде RPMI-1640, содержащей 20% ЭТС.

6.7. Замораживание ДК в программируемом замораживателе и дальнейшее хранение при -196°C до проведения вакцинации.

Этап 7. Нагрузка ДК опухолевым лизатом для получения индивидуальной противоопухолевой вакцины.

7.1. Добавление к $1,5 \times 10^7$ незрелых ДК размороженного опухолевого лизата в соотношении 1:1 и инкубация клеток в течение суток.

7.2. Добавление к клеткам провоспалительных цитокинов: ФНО- α (20 нг/мл), ИЛ-1 β (10 нг/мл) и ИЛ-6 (3 нг/мл).

7.3. Исследование пробы ДК на стерильность.

7.4. Культивирование клеток в течение 2 дней до введения ДК пациенту.

7.5. Двукратная отмывка ДК в 0,9% NaCl и ресуспендирование клеток в 0,3 мл 0,9% NaCl для последующей инъекции пациенту.

Этап 8. Проведение пациенту после химиолучевой терапии курса вакцинотерапии, включающего не менее 5 инъекций противоопухолевой вакцины ДК.

8.1. Введение пациенту вакцины ДК в дозе $1,0-1,2 \times 10^7$ клеток внутривенно, в точке вблизи региональных лимфатических коллекторов.

8.2. Проведение вакцинотерапии пациенту по схеме: 1-е введение вакцины – день 7-8 после лейкофереза; 2-е и 3-е введение вакцины - с двухнедельным интервалом после первого, 4-е и каждое последующее введение вакцины – ежемесячно, но не менее чем за 5 суток до и 5 суток после получения пациентом курса поддерживающей химиотерапии.

Мероприятия этапов 1, 2, 4-7 осуществляются согласно общепринятым методам.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА

При четком соблюдении заданий этапов асептической работы ошибки и осложнения отсутствуют.