

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ



**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ
РЕЦИДИВНЫМ И МЕТАСТАТИЧЕСКИМ РАКОМ ПОЧКИ,
ПЕРВИЧНЫМ И РЕЦИДИВНЫМ МЫШЕЧНО-НЕИНВАЗИВНЫМ
РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ, С ПРИМЕНЕНИЕМ
БИОМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ
АУТОЛОГИЧНЫХ ЦИТОКИН-ИНДУЦИРОВАННЫХ
КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», учреждение здравоохранения «Минский городской клинический онкологический диспансер»

АВТОРЫ: д-р. мед. наук, проф. Прохоров А.В., канд. мед. наук, доц. Гончаров А.Е., канд. биол. наук., доц. Антоневиц Н.Г., Малашевская А.О., Прохоров В.А., Брезовский А.В., Тимохина О.В.

Минск, 2023

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БМКП – биомедицинский клеточный продукт

ДК – дендритные клетки

МПК – мононуклеары периферической крови

РМП – рак мочевого пузыря

МНРМП – мышечно-неинвазивный рак мочевого пузыря

РП – рак почки

ЦИКК – цитокин-индуцированные киллерные клетки

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения злокачественных новообразований урогенитальной сферы с использованием биомедицинского клеточного продукта (БМКП) – цитокин-индуцированных киллерных клеток (ЦИКК), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение рецидивного и метастатического рака почки (РП) (код по МКБ-10: С64), первичного и рецидивного мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря (МНРМП) (код по МКБ-10: С67, D09.0)

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим рецидивным и метастатическим РП, первичным и рецидивным МНРМП, в амбулаторных и (или) стационарных условиях и (или) в условиях дневного стационара.

1 Показания к применению

1.1 Рак почки: пациенты женского и мужского пола от 18 до 85 лет, страдающих рецидивным и метастатическим РП со статусом Карновского 60–100% (ECOG 0–3 балла). Иммуноterapia показана в комплексном лечении пациентов с РП, перенесшим паллиативное хирургическое лечение (паллиативную нефрэктомия, нефрадrenalэктмию, нефрэктомия с тромбэктомией, комбинированные операции) и адьювантную таргетную терапию совместно с препаратами интерлейкина-2 или пазопанибом.

1.2 Рак мочевого пузыря: пациенты женского и мужского пола от 18 до 85 лет, страдающих первичным или рецидивным МНРМП со статусом Карновского 70–100% (ECOG 0–1 балл). Иммуноterapia показана в комплексном лечении пациентов с верифицированным диагнозом первичного и рецидивного МНРМП, подлежащие радикальной трансуретральной резекции мочевого пузыря с или без внутривезикулярной химиотерапии/иммунотерапией вакциной БЦЖ.

2 Противопоказания к применению

1. Отказ пациента от применения метода лечения, изложенного в данной инструкции по применению.
2. Любая лучевая терапия органов брюшной полости в течении 6 месяцев, предшествующих началу лечения в соответствии с данной инструкцией по применению.
3. Общее состояние по шкале EGOС у пациентов с РП – выше 3 баллов и у пациентов с РМП – выше 2 баллов.
4. Системные инфекционные или воспалительные заболевания.
5. Алкогольная и/или наркотическая зависимость.
6. Беременность и кормление грудью.
7. Психические расстройства, при которых пациент не способен полноценно сотрудничать с врачом-исследователем, соблюдать его предписания.
8. Ожидаемая продолжительность жизни менее 3-х месяцев.
9. Общее состояние по шкале ECOG – выше 3 баллов
10. Положительные тесты на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит В или гепатит С, сифилис.
11. Выраженное нарушение функции печени – нарушение функции печени средней (концентрация билирубина $> 1,5-3,0 \times$ верхней границы нормальных значений (ВГН) и АСТ выше референтных значений здорового индивидуума) или тяжелой (концентрация билирубина $> 3,0 \times$ ВГН и АСТ выше референтных значений здорового индивидуума).
12. Выраженное нарушение функции почек с СКФ < 30 мл/мин/м².

3 Перечень необходимых изделий медицинского назначения, медицинской техники

3.1 Изделия медицинского назначения и медицинская техника, необходимые для взятия крови из периферической вены и выполнения внутривенного капельного введения БМКП;

3.2 Биомедицинский клеточный продукт на основе аутологичных ЦИКК, внесенный в Государственный реестр биомедицинских клеточных продуктов Республики Беларусь, или другой биомедицинский клеточный продукт на основе ЦИКК, соответствующий следующим требованиям:

- 1) количество клеток в единичной дозе БМКП: не менее 0,5 млн ЦИКК на 1 кг веса тела пациента;
- 2) количество жизнеспособных клеток: не менее 85%;
- 3) подлинность (иммунофенотипическая характеристика клеток):
 - содержания $CD3^+CD8^+$ клеток от числа $CD45^+$ клеток – более 30 %,
 - содержания $CD3^+CD56^+$ клеток от числа $CD45^+$ клеток – более 20 %,
 - экспрессия $CD3^+$ клетками гранзима В – более 80 %;
- 4) стерильность: не обнаружено контаминации микробами и дрожжеподобными грибами.

3.3 Медицинские изделия, реагенты и расходные материалы, необходимые для подготовки БМКП в соответствии с утвержденными ТНПА:

- среда бессывороточная для культивирования ЦИКК и дендритных клеток (ДК);
- градиент плотности фиколл-пак 1077 г/л;
- фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния;
- человеческая сыворотка АВ;
- раствор натрия хлорида 0,9 % для инфузий;
- рекомбинантные человеческие цитокины и моноклональные антитела: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), интерлейкин-4 (ИЛ-4), интерлейкин-2 (ИЛ-2),

интерферон гамма (ИНФ- γ), фактор некроза опухолей (ФНО)- α ; анти-CD3 (клон ОКТ3);

- дибутирил-цАМФ, аминоактиномицин Д или То-Pro;
- синтетические пептиды антигенов MUC1 и WT1;
- моноклональные антитела к антигенам человека, конъюгированные с флуорохромами: CD3, CD8, CD45, CD56, CD83, CD209, гранзим В (Granzyme B, GrB);
- среда тиогликолиевая и среда Сабуро;
- флаконы для суспензионных культур клеток T25, T75, T175;
- наконечники стерильные однократного применения 1–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл;
- пробирки центрифужные 15 мл и 50 мл однократного применения;
- чашки Петри;
- средства индивидуальной защиты;

3.4 Медицинская техника, необходимая для получения БМКП в соответствии с ТНПА, утвержденными в установленном порядке:

- ламинарный шкаф 2 класса биологической защиты;
- инкубатор углекислотный;
- проточный цитофлуориметр;
- микроскоп инвертированный;
- центрифуга с ротором для пробирок емкостью 15 и 50 мл;
- автоматические дозаторы переменного объема;
- холодильник с морозильной (поддержание температуры от -24 до -18 °C) и холодильной (поддержание температуры от $+2$ до $+10$ °C) камерами.

4 Технология получения цитокин-индуцированных киллерных клеток для аутологичного применения

4.1 Взятие, хранение и транспортировка биоматериала

В качестве биологического материала для получения единичной дозы БМКП ЦИКК используют кровь, полученную из периферической вены общепринятыми методами, в количестве 50–100 мл, помещённую в стерильную пробирку, содержащую натриевую соль гепарина в качестве антикоагулянта. Биологический материал может транспортироваться и храниться при температуре от +2 до +25 °С не более 24-х часов.

4.2 Получение и контроль качества БМКП

Подготовку БМКП осуществляют в соответствии с утвержденными ТНПА на базе организаций здравоохранения или научных организаций.

4.2.1. Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяют путем центрифугирования образца крови на градиенте плотности фиколл-пака с плотностью 1077 г/л, дважды отмывают в фосфатно-солевом буфере Дульбекко путём центрифугирования. Полученные МПК разделяют на две части для последующего культивирования ЦИКК и получения ДК, для стимуляции ЦИКК, в соотношении две трети и одна третья, соответственно.

4.2.2. Культивирование ЦИКК осуществляют в течение 12 суток в суспензионных флаконах в питательной среде RPMI-1640, содержащей 1,5% АВ0-сыворотку и рекомбинантные человеческие цитокины (90 нг/мл ИНФ- γ и 20 нг/мл ИЛ-2) и 50 нг/мл анти-CD3 (клон ОКТ3), в концентрации 1 млн клеток на 1 мл среды в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С. В 1-е сутки во флаконы с МПК добавляют 90 нг/мл ИНФ- γ , в 2-е сутки культивирования – 20 нг/мл ИЛ-2 и 50 нг/мл анти-CD3 (клон ОКТ3). Затем каждые 2-е суток (3, 5, 7, 9, 11-е сутки культивирования) контролируют морфологию клеток, подсчитывают в камере Горяева с добавлением во флаконы питательной среды RPMI-1640, содержащей 1,5% АВ0-сыворотку, поддерживая концентрацию 1 млн/мл клеток, а также 20 нг/мл ИЛ-2 и 50 нг/мл анти-CD3 (клон ОКТ3).

4.2.3. Для получения незрелых ДК, моноциты культивируют в течение 7 суток в флаконе с повышенной адгезивной способностью в питательной среде RPMI-1640, содержащей 1,5% АВ0-сыворотку и рекомбинантные человеческие цитокины (50 нг/мл ГМ-КСФ и 25 нг/мл ИЛ-4), в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С. На 7-е сутки незрелые ДК праймируют синтетическими пептидами MUC1 и WT1, и индуцируют их созревание посредством добавления 50 нг/мл ФНО-α и 50 мкг/мл дб-цАМФ. ДК культивируют 1 сутки в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С. На 8 сутки культивирования ДК осуществляют контроль микробиологической стерильности (отсутствие контаминации бактериями и дрожжеподобными грибами), морфологических признаков (звездчатая форма с наличием типичных для ДК цитоплазматических отростков), подлинности клеток путём оценки фенотипического состава с использованием моноклональных антител к молекулам CD83, CD209, меченных флюорохромами, и оценки жизнеспособности посредством окрашивания зондом – аминоактиномицином Д. ДК, прошедшие контроль качества (экспрессия CD83 – более 30 %, CD209 – более 90 %, жизнеспособности – более 85 %) используют для стимуляции ЦИКК.

4.2.4. На 8 сутки культивирования аутологичные ДК отмывают от ростовой среды и вносят во флаконы с ЦИКК. Сокультивирование проводят 4 суток в питательной среде RPMI-1640, содержащей 1,5% АВ0-сыворотку, ИЛ-2, анти-CD3 и ИНФ-γ, при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂.

4.2.5. В день проведения клеточной терапии биомассу (12 сутки культивирования) ЦИКК, стимулированные ДК, центрифугируют, к осадку добавляют фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния однократно омывают центрифугированием, затем двукратно центрифугируют в 0,9 % растворе хлорида натрия ЦИКК. В ламинарном

боксе переносят клеточную суспензию в 1 стерильный шприц объемом 12 мл (10 мл, концентрация ЦИКК может варьировать 5–50 млн/мл) для проведения клеточной терапии и один шприц объемом 1 мл для кожного теста (0,1 мл суспензии). Шприцы запечатывают с помощью упаковочной машины и маркируются с указанием ФИО и идентификационного номера пациента, объема суспензии, количества клеток, даты и времени изготовления, срока годности БМКП.

4.2.6. Для контроля подлинности клеток осуществляют оценку фенотипического состава БМКП с использованием моноклональных антител к поверхностным молекулам CD3, CD8, CD45, CD56 и внутриклеточным молекулам гранзима В, меченных флуорохромами. Учет проводят на проточном цитометре.

4.2.7. Для определения жизнеспособности БМКП используют Аннексин V или To-Pro. Учет проводят с помощью метода проточной цитометрии.

4.2.8. Контроль стерильности осуществляют согласно ст. 2.6.27 «Микробиологический контроль клеточных продуктов» Государственной фармакопеи Республики Беларусь.

4.2.9. БМКП считают прошедшим контроль качества при количестве клеток не менее 0,5 млн клеток на 1 кг веса тела пациента, содержании CD3⁺CD8⁺ клеток от числа CD45⁺ клеток – более 30 %, CD3⁺CD56⁺ клеток от числа CD45⁺ клеток – более 20 %, экспрессии CD3⁺ клетками гранзима В – более 80 %, жизнеспособности – не менее 85%, отсутствии контаминации бактериями и дрожжеподобными грибами.

4.2.10. К каждой единице БМКП прилагается аналитический паспорт, в котором приводится информация о соответствии предъявляемым требованиям по количеству содержащихся ЦИКК, показателям подлинности, жизнеспособности и микробиологической чистоты.

5 Технология использования метода

Введение БМКП осуществляется после оперативного вмешательства в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и (или) условиях дневного стационара при наличии информированного письменного согласия пациента.

5.1 Проведение кожного теста

При первом применении БМКП на основе ЦИКК для предотвращения возможных аллергических реакций немедленного типа проводят кожный тест, для чего вводят подкожно в область медиальной поверхности предплечья 0,1 мл БМКП. Наблюдают за состоянием пациента 30–60 минут. При отсутствии системных и местных реакций проводят дальнейшее введение БМКП. При наличии системных и местных аллергических реакций пациенту оказывают необходимую медицинскую помощь, дальнейшее проведение клеточной терапии прекращают.

5.2 Введение БМКП

БМКП вводят однократно внутривенно с соблюдением правил асептики и антисептики в дозе из расчета не менее $0,5 \times 10^6$ на кг массы тела пациента. БМКП предварительно суспендируют в 100 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Пакет с физиологическим раствором после добавления суспензии клеток необходимо тщательно перемешать, при необходимости (при оседании клеток) в момент введения необходимо также дополнительно перемешать содержимое пакета. Введение проводят через внутрисосудистый катетер с использованием шприцевого дозатора со скоростью инфузии 60 мл/ч. После первого введения ЦИКК пациенты должны находиться под наблюдением медперсонала не менее 3 суток.

Курс лечения включает не менее 3-х введений БМКП с интервалом 1–1,5 месяца.

5.3 Контроль эффективности

Контроль эффективности проводимой клеточной терапии осуществляют после проведения лечения через 6–12 месяцев.

Критериями эффективности иммунотерапии являются:

- отсутствие прогрессирования заболевания по результатам УЗИ исследования ОБП и мочевого пузыря, КТ-исследования;
- снижение содержания в периферической крови Т-регуляторных клеток;
- снижение содержания в периферической крови циркулирующих опухолевых клеток (определение ЦОК проводится в соответствии с инструкцией по применению №191.1-1220 от 28.01.2021).

6 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

После введения БМКП на основе ЦИКК в течение 1–3 суток допускаются субфебрильная температура, которая купируется путем приема нестероидных противовоспалительных лекарственных средств.

Осложнения, связанные с катеризацией вены и нарушением правил асептики при введении БМКП (гематома, инфильтрация, флебит и тромбоз вены, септицемия, сепсис).