

**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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
28.11.2013  
Регистрационный № 118-1013

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

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси О.В. Алейникова, д-р мед.  
наук, проф. Э.А. Жаврид, канд. биол. наук Я.И. Исайкина, И.А. Семак

Минск 2013

Настоящая инструкция 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.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Проточный цитофлуориметр.
2. Наборы моноклональных антител для определения поверхностных клеточных маркеров CD80, CD83, CD86, CD14.
3. Ламинарный шкаф 2-го класса защиты для асептической работы с аутологичными клетками пациента и клетками опухоли.
4. CO<sub>2</sub>-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 см<sup>2</sup>.
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 NEPEP и L-глутамином.
13. Гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ).
14. Интерлейкин 4 (ИЛ-4).
15. Интерлейкин 1β (ИЛ-1β).
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%-й раствор NaCl.

## **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 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Инфекционные (бактериальные, вирусные) заболевания.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 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 см<sup>2</sup> в стерильном растворе 0,9% NaCl в течение 2 ч 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% раствора NaCl и фильтрация через нейлоновый фильтр (70 мкм).

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-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 мин с последующей фильтрацией.

2.7. Фасовка опухолевого лизата по дозам, исходя из соответствия: 1 доза —  $1 \times 10^7$  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.

4.1. Госпитализация пациента и установка 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 5000 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, наслоением на Гистопак (плотность 1,077 г/мл).

5.2. Центрифугирование клеток при 400g 30 мин.

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 ч при +37°C, 5% CO<sub>2</sub> в пластиковых флаконах площадью 175 см<sup>2</sup>.

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-1β (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% растворе NaCl и ресуспендирование клеток в 0,3 мл 0,9% растворе NaCl для последующей инъекции пациенту.

**Этап 8.** Проведение 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 регионарных лимфатических коллекторов.

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

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

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

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