

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра  
Е.Л.Богдан  
« 18 » сентября 2020 г.

Регистрационный № 086-0920

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С РЕФРАКТЕРНЫМИ И  
РЕЦИДИВНЫМИ ФОРМАМИ ЛЕЙКОЗОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ–РАЗРАБОТЧИК:** государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии»

**АВТОРЫ:** Вашкевич Е.П., к.б.н. Шман Т.В., к.б.н. Мелешко А.Н.,  
Матвеевко М.А., Мигас А.А., Наумович М.Г., д.м.н., профессор, член-  
корреспондент Национальной академии наук Беларуси Алейникова О.В.

Минский р-н, 2020

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра

\_\_\_\_\_ Е. Л. Богдан  
18.09.2020  
Регистрационный № 086-0920

**МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С РЕФРАКТЕРНЫМИ  
И РЕЦИДИВНЫМИ ФОРМАМИ ЛЕЙКОЗОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: Е. П. Вашкевич, канд. биол. наук Т. В. Шман, канд. биол. наук  
А. Н. Мелешко, М. А. Матвеевко, А. А. Мигас, М. Г. Наумович, д-р мед. наук,  
проф., чл.-корр. НАН Беларуси О. В. Алейникова

Минск 2020

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЕК-клетки	– естественные киллерные клетки
ИЛ	– интерлейкин
мАТ	– моноклональные антитела
МНК	– мононуклеарные клетки
ПК	– периферическая кровь
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
ЭТС	– эмбриональная телячья сыворотка

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод лечения рефрактерных и рецидивных форм лейкозов с применением естественных киллерных клеток человека, полученных из материала мононуклеарных клеток периферической крови донора путем их экспансии *in vitro* в присутствии генно-инженерной фидерной клеточной линии (FD21).

Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с рефрактерными и рецидивными формами лейкозов (МКБ-10: С91-С95). Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными новообразованиями в стационарных условиях.

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

1. Ламинарный шкаф, класс защиты 2В.
2. CO<sub>2</sub>-инкубатор.
3. Микроскоп лабораторный прямого света.
4. Центрифуга настольная.
5. Проточный цитофлуориметр.
6. Дозатор серологический.
7. Набор микропипеток автоматических.
8. Холодильник двухкамерный с морозильной камерой.
9. Вортекс настольный.
10. Камера Горяева и стекла к ней.
11. Штативы для пробирок на 15 и 50 мл.
12. Среда ростовая RPMI-1640 с NEPES и L-глутамином в составе, стерильная.
13. Эмбриональная телячья сыворотка, стерильная.
14. Фосфатно-солевой буфер, стерильный.
15. Реагент для создания градиента плотности (1,077 г/см<sup>3</sup>), стерильный.
16. Рекомбинантный человеческий интерлейкин-2, стерильный.
17. Уксусная кислота.
18. Краситель трипановый синий.
19. Раствор хлорида натрия, 0,9 %, стерильный.
20. Флуоресцентно-меченные моноклональные антитела для проточной цитометрии к поверхностным клеточным антигенам человека CD3, CD56, CD69, NKp44 (CD336).
21. Генно-инженерная клеточная линия FD21, экспрессирующая белки 4-1BBL и рекомбинантный мембраносвязанный вариант ИЛ-21 человека.
22. Пробирки центрифужные на 15 и 50 мл, стерильные.
23. Пробирки типа «эппендорф» на 1,5 мл, стерильные.
24. Пробирки для проточного цитофлуориметра.
25. Наконечники одноразовые с фильтром для микропипеток, стерильные.
26. Наконечники для серологического дозатора с градуировкой, объем 5, 10, 25 мл, стерильные.

27. Флаконы культуральные форматов Т75 и Т175 с вентилируемой крышкой с площадью ростовой поверхности соответственно 75 и 175 см<sup>2</sup> для адгезионных культур, стерильные.

28. Шприцы медицинские объемом 50 мл.

### ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Первичные лейкозы (МКБ-10: С91-С95) с отсутствием ремиссии после окончания протокольного лечения.

2. Рецидивы лейкозов (МКБ-10: С91-С95) с отсутствием ремиссии после окончания противорецидивного протокольного лечения.

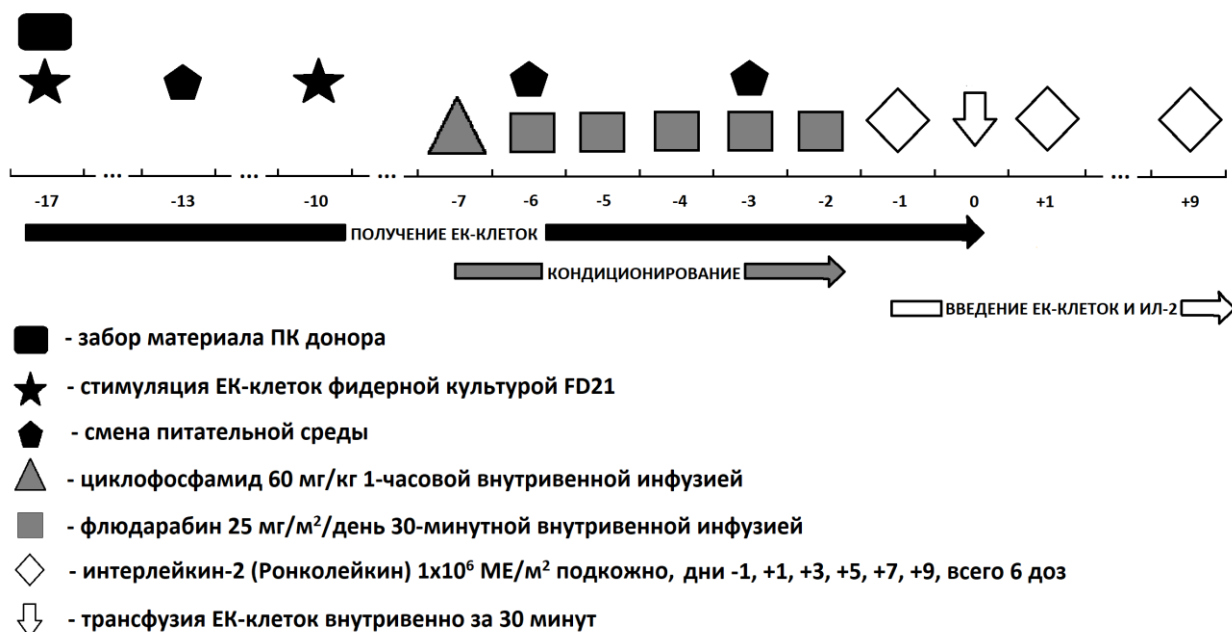
### ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

### ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод лечения пациентов с рефрактерными и рецидивными формами лейкозов с применением естественных киллерных клеток включает несколько этапов (рисунок):

1. Получение естественных ЕК-клеток.
2. Проведение кондиционирования.
3. Введение ЕК-клеток и иммунотерапия ИЛ-2.



**Рисунок — Схема этапов метода лечения пациентов с рефрактерными и рецидивными формами лейкозов с применением естественных киллерных клеток**

## 1. Процедура получения ЕК-клеток

### 1.1 Забор первичного материала ПК донора

Забор периферической крови донора осуществляется в отделении трансфузиологии в пробирки (50 мл) или мешок, содержащие антикоагулянт гепарин. Объем крови зависит от веса пациента: при весе пациента менее 30 кг — 100 мл крови, более 30 кг — 150 мл. Кровь донора транспортируют в лабораторию для дальнейших манипуляций.

### 1.2 Экспансия и активация ЕК-клеток *in vitro*

Экспансию и активацию ЕК-клеток в присутствии фидерной культуры осуществляют на протяжении 17 дней.

День -17 (1-я стимуляция). Проводят выделение фракции МНК из материала ПК на градиенте плотности (плотность 1,077 г/мл) центрифугированием с ускорением 400 g в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем дважды отмывают в среде RPMI-1640, ресуспендируют в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС. Определяют количество выделенных клеток и их жизнеспособность с использованием камеры Горяева. Далее проводят иммунофенотипический анализ МНК. Исследуемые клетки отмывают в ФСБ центрифугированием с ускорением 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем инкубируют с соответствующими мАТ к антигенам человека CD3, CD56, CD69, НКp44 (CD336) в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. После инкубации клетки отмывают в ФСБ центрифугированием с ускорением 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Исследования выполняют на проточном цитофлуориметре. Анализируют количество ЕК- (CD3-CD56+), ЕК Т- (CD3+CD56+) и Т-клеток (CD3+CD56-), а также количество позитивных по CD69 и НКp44 ЕК-клеток. Размораживают фидерные клетки FD21 и отмывают в среде RPMI-1640 центрифугированием с ускорением 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем ресуспендируют в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева. Во флакон Т75 вносят 7,5 млн МНК и 15 млн фидерных клеток FD21 в 30 мл среды RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС и ИЛ-2 в конечной концентрации 50 МЕ/мл. Флаконы помещают в СО<sub>2</sub>-инкубатор в вертикальном положении.

День -13 (смена питательной среды). Проводят смену 1/2 объема надосадочной среды на среду RPMI-1640, содержащую 10 % ЭТС и ИЛ-2 в количестве, необходимом для получения конечной концентрации во флаконе 50 МЕ/мл.

День -10 (2-я стимуляция). Отбирают максимально возможное количество надосадочной среды. Клетки с оставшейся средой переносят в центрифужные пробирки на 50 мл. Осаждают центрифугированием с ускорением 400 g в течение 10–20 мин при комнатной температуре. Затем клеточный осадок ресуспендируют в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева. Размораживают фидерные клетки FD21 и отмывают в среде RPMI-1640 центрифугированием с ускорением 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева. Во флакон Т175 вносят 25 млн МНК и 25 млн фидерных клеток FD21 в 100 мл среды

RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС и ИЛ-2 в конечной концентрации 50 МЕ/мл. Флаконы помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор в вертикальном положении.

Дни -6, -3 (смена среды). Отбирают 60–70 мл надосадочной среды из каждого флакона. Подсчитывают приблизительное количество клеток в одном флаконе в камере Горяева. Данные экстраполируют на все флаконы. Подсчитывают общее количество клеток. Содержимое всех флаконов равномерно распределяют по флаконам T175 из расчета 50–100 млн клеток на один флакон. Доводят объем до 100 мл средой RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС и ИЛ-2 в количестве необходимом для получения конечной концентрации во флаконе 50 МЕ/мл. Флаконы помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор в вертикальном положении.

День 0 (получение конечного продукта ЕК-клеток). Отбирают максимально возможное количество надосадочной среды. Клетки с оставшейся средой переносят в центрифужные пробирки на 50 мл. Осаждают центрифугированием с ускорением 400 g в течение 10–20 мин при комнатной температуре. Осадок клеток ресуспендируют в растворе хлорида натрия. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева. Проводят иммунофенотипический анализ полученного продукта (см. аналогичную процедуру в день 0).

## **2. Кондиционирование**

Для лучшей персистенции донорских клеток *in vivo* на момент введения ЕК-клеток пациент должен находиться в состоянии цитопении. Поэтому ЕК-клеток вводят после блока химиотерапии (циклофосфан, флударабин) или после любого другого блока химиотерапии согласно выбранному плану лечения (рисунок).

## **3. Процедура трансфузии ЕК-клеток**

ЕК-клетки вводят не ранее чем через 48 ч после последнего введения химиопрепаратов. Для поддержания активации и пролиферации ЕК-клеток также проводится введение ИЛ-2 (Ронколейкин) в дозе  $1 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> подкожно (рисунок).

За 30 мин до трансфузии ЕК-клеток пациенту выполняется премедикация (антигистаминный препарат клемастин в возрастной дозировке).

ЕК-клетки вводят путем внутривенной инфузии в течение 30 мин в дозировке 50–100x10<sup>6</sup>/кг. Дозировка Т-клеток не должна превышать 5x10<sup>6</sup>/кг.

Применение кортикостероидов крайне нежелательно в течение 3-х дней перед введением ЕК-клеток и в течение 7 дней после.

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

В процессе экспансии и активации ЕК-клеток из материала МНК ПК донора с использованием генно-инженерной фидерной клеточной линии FD21 может возникнуть ряд осложнений на различных этапах процедуры, описанной в инструкции.

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Низкая жизнеспособность МНК ПК	Несоблюдение норм забора и транспортировки материала ПК	Забор материала должен осуществляться в отделении трансфузиологии в стерильную тару, содержащую антикоагулянт, длительность хранения при транспортировке не более 6 ч при температуре от 4 до 25 °С
	Неподходящий рН растворов для отмывки клеток	рН должна быть в диапазоне 7,2–7,4
	Цитотоксическое действие раствора для градиентного разделения клеточных фракций ПК	Использовать качественные растворы, тестированные для использования с культурами клеток
	Грубые механические манипуляции с клетками	Избегать чрезмерно активного пипетирования образцов со вспениванием, длительного центрифугирования
Низкая жизнеспособность ЕК-клеток при пассировании	Неподходящий рН растворов для отмывки и культивирования клеток	рН должна быть в диапазоне 7,2–7,4
	Цитотоксическое действие питательной среды	Использовать качественные растворы, тестированные для использования с культурами клеток
	Температура среды и растворов чрезмерно низкая	Использовать среды и растворы, прогретые до комнатной температуры
	Грубые механические манипуляции с клетками	Избегать чрезмерно активного пипетирования образцов со вспениванием, длительного центрифугирования
Отсутствие экспансии ЕК-клеток	Недостаточная стимуляция ЕК-клеток в процессе совместного инкубирования с фидерной линией FD21	Использовать соотношения МНК к FD21, описанные в подпунктах 3 пунктов 1.1 и 1.3 соответственно
	Несоблюдение режима пассирования культуры ЕК-клеток	Соблюдать режим пассирования, описанный в разделе 1