

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»



Первый заместитель Министра

Е.Н.Кроткова

2024 г.

Регистрационный № 138-1223

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ И РЕЦИДИВАМИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЛОГЕННЫХ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: Наумович М.Г., к.б.н. Шман Т.В., Вашкевич Е.П., Горбач
Е.И., Ласюков Е.А., Ермилова Т.И.

Минск, 2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ARA-C – цитарабин

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

FLU – флударабин

FD21 – генно-инженерная фидерная клеточная линия

IDA – идарубицин

MIT – митоксантрон

VP-16 – этопозид

АЧН – абсолютное число нейтрофилов

ЕК клетки – естественные киллерные клетки

ЕКТ клетки – ЕК подобные Т клетки

ИЛ – интерлейкин

МОБ – минимальная остаточная болезнь

МНК – моноклеарные клетки

ОЛ – острый лейкоз

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ПК – периферическая кровь

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен метод лечения пациентов с острым миелоидным лейкозом и рецидивами острых лейкозов (МКБ 10: С91 – С95) с применением аллогенных естественных киллерных клеток.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-гематологов и врачей-онкологов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с острыми лейкозами в условиях организаций здравоохранения III и IV технологических уровней оказания медицинской помощи.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Первичный острый миелоидный лейкоз группы промежуточного риска с отрицательным уровнем минимальной остаточной болезни;
2. Первичный острый миелоидный лейкоз групп стандартного и высокого риска с положительным уровнем минимальной остаточной болезни;
3. Первичный острый миелоидный лейкоз с рефрактерностью к проводимой терапии после двух блоков лечения в соответствии с клиническим протоколом;
4. Рецидивы острых лейкозов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Текущая неконтролируемая инфекция.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

- Стерильные одноразовые перчатки;
- емкости для утилизации отходов и дезинфицирующие средства;
- шприцы медицинские объемом 50 мл (стерильные) или контейнеры, предназначенные для заготовки крови и ее компонентов объемом 100 мл с антикоагулянтом;
- флаконы для экспансии клеток типа G-Rex (gas-permeable rapid expansion) с площадью ростовой поверхности 100 см²;
- дозаторы (от 0,5 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл);
- наконечники для дозаторов объемом от 0,5 до 1000 мкл с фильтром стерильные;
- автоматический дозатор для серологических пипеток;
- пипетки серологические с градуировкой объемом 5, 10, 25 мл, стерильные;
- пробирки центрифужные объемом 15 и 50 мл, стерильные;
- штативы для центрифужных пробирок объемом 15 и 50 мл;
- пробирки для проточного цитофлуориметра;
- криоконтейнеры для хранения биологического материала, стерильные;
- ламинарный шкаф, класс защиты 2В;
- СО₂-инкубатор;
- микроскоп лабораторный прямого света;
- центрифуга с относительной центробежной силой до 800 g;
- проточный цитофлуориметр;
- вихревой смеситель настольный;
- морозильная камера, поддерживающая температуру минус 20 °С ± 2 °С;

холодильник, поддерживающий температуру 4 °С...8 °С;
аппарат программируемого замораживания;
криохранилище, поддерживающее температуру жидкого азота;
глюкометр портативный и тест-полоски к нему;
камера Горяева и покровные стекла к ней;
среда ростовая RPMI-1640, содержащая в составе 4-(2-гидроксиэтил)-
1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES, не менее 10 мМ) и L-
глутамин (не менее 2 мМ), стерильная;
эмбриональная телячья сыворотка, стерильная;
фосфатно-солевой буферный раствор (10 мМ фосфат натрия; 2,7 мМ
хлорид калия; 137 мМ хлорид натрия; 1,76 мМ фосфат калия, рН 7,2–7,4);
реагент для создания градиента плотности (1,077 г/см³), стерильный;
рекомбинантный человеческий интерлейкин-2, стерильный;
уксусная кислота 3 %;
краситель трипановый синий 0,4 %;
раствор хлорида натрия 0,9 %, стерильный;
криопротекторная среда RPMI-1640, содержащая солевой раствор 5 %
альбумина человека и 20 % диметилсульфоксида;
флуоресцентно-меченные моноклональные антитела для проточной
цитофлуориметрии к поверхностным клеточным антигенам человека CD3,
CD56, CD69 и NKp44 (CD336);
генно-инженерная клеточная линия FD21, экспрессирующая белки 4-
1BBL и рекомбинантный мембранносвязанный вариант ИЛ-21 человека.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод лечения пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и рецидивами острых лейкозов (ОЛ) с применением аллогенных естественных киллерных (ЕК) клеток включает следующие этапы (рисунок 1):

1. Получение ЕК клеток из периферической крови донора методом экспансии, криоконсервирование клеток;
2. Проведение кондиционирования (химиотерапии) согласно установленной группы риска;
3. Трансфузия ЕК клеток.



* – Для пациентов с первичным ОМЛ определено от одного до трех введений ЕК клеток.

Рисунок 1 – Общая схема этапов метода лечения пациентов с ОМЛ и рецидивами ОЛ с применением аллогенных ЕК клеток

1. Получение ЕК клеток из периферической крови донора методом экспансии. Криоконсервирование клеток

1.1 Первичный материал периферической крови (ПК) донора получают путем сбора в контейнер для сбора крови и ее компонентов (объемом 100 мл) или в шприцы (объемом 50 мл), содержащие антикоагулянт гепарин. Объем донорской крови зависит от веса пациента. При весе пациента менее 30 кг необходимо 100 мл крови, более 30 кг – 150 мл, более 60 кг – 200 мл. Кровь донора транспортируют при температуре 4 °С... 8 °С в лабораторию для проведения дальнейших манипуляций.

1.2 Экспансия и активация ЕК клеток. Экспансию и активацию ЕК клеток в присутствии клеток фидерной линии FD21 (К-562-4-1BBL-МИЛ-21) осуществляют на протяжении 10–12 дней следующим образом:

День минус 12 (-12). Проводят выделение фракции моноклеарных клеток (МНК) из ПК донора на градиенте плотности (плотность 1,077 г/мл) центрифугированием с ускорением 400 g в течение 30 минут при комнатной температуре. Полученные МНК дважды отмывают в среде RPMI-1640 путем центрифугирования с ускорением 400 g в течение 20 минут при температуре 21 °С... 28 °С, клеточный осадок ресуспендируют в среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). В камере Горяева определяют количество выделенных клеток с использованием уксусной кислоты.

Размораживают ранее заготовленные фидерные клетки FD21 и отмывают в среде RPMI-1640 центрифугированием с ускорением 400 g в течение 5 минут при температуре 21 °С... 28 °С. Осадок клеток FD21 ресуспендируют в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ЭТС. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева и оценивают их жизнеспособность путем окрашивания трипановым синим.

Во флакон типа G-Rex100M вносят 20 млн МНК, 100 млн фидерных клеток FD21, среду RPMI-1640, содержащую 10 % ЭТС и ИЛ-2 в концентрации 50 МЕ/мл, до конечного объема 1000 мл. Флакон помещают в CO₂-инкубатор. Количество используемых флаконов для экспансии ЕК клеток зависит от требуемой дозы клеток.

На **минус 3 (-3), (-7) и (-10) дни** культивирования в культуральную среду во флаконах добавляют ИЛ-2 в конечной концентрации 50 МЕ/мл.

Начиная с **-7 дня** проводят измерения концентраций глюкозы в культуральной среде для оценки прироста клеток с использованием портативного глюкометра. При уровне глюкозы менее 2 ммоль/л экспансируемые клетки можно использовать для терапии.

День 0 (сбор ЕК клеток). Из флакона G-Rex серологической пипеткой отбирают максимально возможное количество надосадочной культуральной среды, но не более 90% от ее объема. Клетки с оставшейся культуральной средой переносят в центрифужные пробирки объемом 50 мл. Осаждают центрифугированием с ускорением 400 g в течение 20 минут при температуре 21 °С... 28 °С. Отмывают повторным центрифугированием (400 g, 20 минут) в 0,9 % растворе натрия хлорида. Затем осадок клеток ресуспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида. Подсчитывают количество и жизнеспособность клеток в камере Горяева путем окрашивания трипановым синим.

Проводят иммунофенотипический анализ полученного продукта путем окрашивания флуоресцентно-мечеными моноклональными антителами для проточной цитофлуориметрии к поверхностным клеточным антигенам человека CD3, CD56, CD69 и NKp44 (CD336). Оценивают содержание ЕК-, Т- и ЕКТ клеток в полученном клеточном продукте.

1.3 Криоконсервирование клеток. Полученные в ходе экспансии ЕК клетки (или часть клеток), ресуспендированные в 0,9 % растворе натрия хлорида, переносят в предназначенные для хранения биологических продуктов криоконтейнеры. Затем постепенно смешивают с равным объемом криопротекторной среды RPMI-1640, содержащей солевой раствор 5 % альбумина человека и 20 % диметилсульфоксида. Дальнейшую процедуру криоконсервирования проводят на аппарате программируемого замораживания, хранение ЕК клеток проводят в парах жидкого азота в криохранилище.

1.4 Размораживание клеток. Размораживают ЕК клетки при температуре 37 °С. Затем постепенно смешивают с предварительно прогретой до 37 °С культуральной средой RPMI-1640, содержащей 10% ЭТС, и осаждают центрифугированием с ускорением 400 g в течение 20 минут при температуре 21 °С... 28 °С. Отмывают повторным центрифугированием (400 g 20 минут) в 0,9 % растворе натрия хлорида. Затем осадок клеток ресуспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида. Подсчитывают количество и жизнеспособность клеток в камере Горяева путем окрашивания клеток трипановым синим. Проводят иммунофенотипический анализ полученного продукта путем окрашивания флуоресцентно-мечеными моноклональными антителами для проточной цитофлуориметрии к поверхностным клеточным антигенам человека CD3, CD56, CD69 и NKp44 (CD336). Рассчитывают необходимую дозу клеток в соответствии с массой тела пациента (30–100×10⁶ клеток / кг массы тела).

2. Кондиционирование

Для лучшей персистенции донорских клеток *in vivo* на момент введения ЕК клеток пациент должен находиться в цитопении. Поэтому

введение ЕК клеток проводят после проведения блока химиотерапии согласно выбранному плану лечения.

Для пациентов *с первичным ОМЛ с отрицательным уровнем минимальной остаточной болезни (МОБ)* проводят один курс лечения с использованием ЕК клеток. Предшествующий введению клеток блок химиотерапии включает:

день минус 7 (-7): циклофосфамид 60 мг/кг 1-часовой внутривенной инфузией, 1 доза.

дни (-6) - (-2): флюдарабин 25 мг/м²/день 30-минутной внутривенной инфузией, всего 5 доз.

Для пациентов *с первичным ОМЛ с положительным уровнем МОБ* проводят два курса лечения с использованием ЕК клеток. Первый курс химиотерапии выполняют по схеме HD-ARA-C + IDA, которая включает:

дни минус 5 (-5) – (-3): ARA-C 3000 мг/м² 3-часовой инфузией каждые 12 часов, всего 6 доз;

дни (-5) – (-4): IDA 10 мг/м² 1-часовой инфузией каждые 24 часа, всего 2 дозы;

день (-2): интратекальная терапия двумя препаратами в возрастной дозировке.

Второй курс химиотерапии выполняют по схеме АМЕ-Н:

дни минус 6 (-6) – (-3): ARA-C 2000 мг/м² 2-часовой инфузией каждые 12 часов, всего 8 доз;

день (-3): VP-16 500 мг/м² 1-часовой инфузией;

дни (-6) – (-5): MIT 15 мг/м² 2-часовой инфузией, всего 2 дозы;

день (-2): интратекальная терапия тремя препаратами в возрастной дозировке.

Для пациентов с *рецидивами острых лейкозов и пациентов с рефрактерностью* проводят два курса лечения с использованием ЕК клеток.

Первый курс химиотерапии выполняют по схеме FLAG-IDA, которая включает:

дни минус 7 (-7) – (-3): FLU 30 мг/м² 30-минутной инфузией каждые 24 часа, всего 5 доз;

дни (-7) – (-3): ARA-C 1000 мг/м² 2-часовой инфузией каждые 12 часов, всего 5 доз;

дни (-7), (-5), (-3): IDA 10 мг/м² 1-часовой инфузией каждые 24 часа, дни 1,3,5, всего 3 дозы;

дни (-7) – (-3): G-CSF 5 мкг/кг внутривенно или подкожно (вводят перед FLU);

Второй курс химиотерапии выполняют по схеме FLAG, которая включает:

дни минус 7 (-7) – (-3): FLU 30 мг/м² 30-минутной инфузией каждые 24 часа, всего 5 доз;

дни (-7) – (-3): ARA-C 1000 мг/м² 2-часовой инфузией каждые 12 часов, всего 5 доз;

дни (-7) – (-3): G-CSF 5 мкг/кг внутривенно или подкожно (вводят перед FLU).

3. Процедура трансфузии ЕК клеток

Введение ЕК клеток проводят не ранее, чем через 48 часов после последнего введения химиопрепаратов.

За 30 минут до трансфузии ЕК клеток пациенту выполняют премедикацию (антигистаминный препарат клемастин в возрастной дозировке).

ЕК клетки вводят путем внутривенной инфузии в течение 30 минут в дозе от 30 до 100×10^6 клеток/кг. При этом доза Т клеток с иммунофенотипом CD3+CD56- не должна превышать 5×10^6 клеток/кг массы тела пациента.

Пациенты с первичным ОМЛ с отрицательным МОБ получают один курс терапии с двумя введениями ЕК клеток.

Пациенты с первичным ОМЛ с положительным уровнем МОБ, пациенты с рецидивами ОЛ и пациенты с химиорезистентностью получают один или два курса иммунотерапии с двумя или тремя введениями ЕК клеток на курс.

Применение кортикостероидов крайне нежелательно в течение 3 дней перед трансфузией ЕК клеток и в течение 7 дней после нее.

4. Оценка эффективности лечения

Оценку эффективности лечения проводят на основании результатов миелограммы и анализа уровня МОБ после восстановления гемопоэза (АЧН > 500 кл/мкл).

Для пациентов с первичным ОМЛ группы промежуточного риска лечение считают эффективным, если в результате лечения сохраняется отрицательный уровень МОБ. В случае эффективного лечения дальнейшую терапию не проводят.

Для пациентов с первичным ОМЛ групп стандартного и высокого риска лечение считают эффективным при снижении уровня МОБ в два раза и более. В случае эффективного лечения пациенты группы высокого риска получают аллогенную трансплантацию гемопоэтических клеток (ТГСК), пациентов группы стандартного риска наблюдают далее.

Для пациентов с первичным ОМЛ с рефрактерностью и пациентов с рецидивами лейкозов лечение считают эффективным при достижении морфологической ремиссии. В случае эффективного лечения пациентам проводят аллогенную ТГСК.

5. Возможные ошибки и осложнения выполнения метода

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. Также выполнение метода может быть затруднено в связи с состоянием пациента (таблица 1).

Таблица 1 – Возможные ошибки или осложнения, пути их устранения

Ошибка / осложнение	Возможная причина	Пути устранения
Низкая жизнеспособность МНК ПК	Несоблюдение норм при получении и транспортировке материала ПК донора	Сбор периферической крови должен осуществляться в стерильную емкость (шприцы, контейнеры), содержащую антикоагулянт гепарин. Длительность хранения – не более 18 часов при температуре 4 °С...8 °С
	Неподходящий pH растворов для отмывки клеток	pH в диапазоне 7,2–7,4
	Цитотоксическое действие раствора для градиентного разделения клеточных фракций ПК	Использовать качественные растворы, тестированные для культур клеток
	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 подпункте 1.2, увеличить посадочную плотность клеток
Контаминация клеток микробиологическими объектами	Несоблюдение стерильности при сборе периферической крови. Нарушение правил работы в чистом ламинарном боксе	Контаминированные образцы не используются
Невозможность провести введение клеток в срок	Состояние пациента	Заморозить клетки до возможности дальнейшего использования
	Недостаточная экспансия ЕК клеток	Продолжить экспансию. Провести инфузию клеток на несколько дней позже
Проявление значительных нежелательных явлений после введения клеток (grade >3)	Высокая доза клеток	Отменить последующие инфузии клеток или уменьшить дозу клеток