

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ В.В. Колбанов

30 сентября 2005 г.

Регистрационный № 161-1204

**БИОТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИТОКИНОВ  
В ЛЕЧЕНИИ ДЕТЕЙ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. М.П. Потапнев, канд. мед. наук Н.Е. Конопля, канд. мед. наук Р.С. Исмаил-заде, В.П. Савицкий, Е.П. Вашкевич, С.Е. Буглова, М.В. Белевцев

Минск 2007

Современная комбинированная терапия онкологических заболеваний включает в качестве базовых составляющих хирургическое вмешательство, радио- и химиотерапию. Повышение эффективности комбинированной терапии в последнее время связывают с ее интенсификацией и применением биотерапии, задачи которой сводятся к оказанию дополнительного терапевтического воздействия на опухолевую ткань (клетки), усилению чувствительности опухолевой ткани к радиационному воздействию и/или химиопрепаратам, повышению устойчивости органов и тканей больного в ходе лечения, а также к влиянию опухолевого процесса.

Среди типов биотерапии различают:

- бактериальные вакцины,
- иммуностимуляторы растительного и животного происхождения,
- цитокины,
- адаптивный перенос иммунных лимфоцитов, дендритных клеток,
- антитела и иммунотоксины,
- антигены/пептиды опухолевых клеток,
- гипертермия и другие типы биофизического воздействия.

Большинство из перечисленных методов биотерапии использует механизмы иммунного воздействия на опухоль. Несмотря на то, что многие виды рака неиммуногенны, т. е. не вызывают выраженного иммунного ответа, за любым типом отклонения гомеостаза в организме человека существует иммунологический контроль. Повышение эффективности этого контроля и является основной задачей биотерапии и, в частности, иммунотерапии онкологических заболеваний. Как правило, применение иммунотерапии показано при наличии остаточной опухолевой ткани после проведения основных этапов комбинированного лечения; при распространенном и метастатическом процессе, особенно в случае устойчивости опухолевой ткани к химио- и радиотерапии; для защиты иммунной системы от интенсивной химиотерапии, в комплексе лечения первой линии при наличии селективной чувствительности отдельных видов рака к иммунотерапевтическому воздействию.

Иммуноадьювантная терапия традиционно используется в течение многих лет для лечения онкологических заболеваний. Она включает введение больным бактериальных вакцин (BCG, *Corynebacterium parvum*, др.) и бактериальных продуктов (мурамилдипептид, лентинан, пирогенал и т. д.). Основным механизмом их действия – это индукция медиаторов иммунитета и воспаления (ИЛ-1,  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-6, интерферонов, ИЛ-2 и др.), недостаток которых в организме онкологического больного не позволяет формировать эффективный Т-клеточный иммунный ответ против слабоиммуногенных опухолевых антигенов. В настоящее время на смену им пришли более эффективные препараты цитокинов (ИЛ-2,  $\alpha$ -интерферон, комбинированные препараты цитокинов), применяемые все более широко в онкологической практике. Кроме мощного иммуноадьювантного эффекта, определяющего основной механизм действия цитокинов, многие из них ( $\alpha$ -интерфероны,  $\alpha$ -ФНО) прямо воздействуют на опухолевые клетки, вызывая их гибель. Другие

иммуноадьювантные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6, ГМ-КСФ, Г-КСФ) защищают кроветворные клетки костного мозга от циторедуктивного действия химио- и радиотерапии. Использование цитокинов для иммуноадьювантной терапии злокачественных заболеваний человека имеет и ряд ограничений, связанных с токсичностью высоких доз препаратов и способностью ряда цитокинов ( $\gamma$ -ИНФ, ГМ-КСФ, ИЛ-2) вызывать устойчивость опухолевых клеток к апоптозу под влиянием неблагоприятных факторов (иммунная защита, лекарственные препараты и т. д.).

На основе собственного и мирового опыта изучения биологического действия ИЛ-2 и интерферона- $\alpha$  на иммунную систему нами апробированы и предлагаются следующие схемы (протоколы) лечения больных (детей) с онкологическими заболеваниями.

## **I. Использование ИЛ-2 для биотерапии медуллобластомы у детей**

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Дети в возрасте от 1 года до 18 лет с верифицированным диагнозом медуллобластомы/ПНЭО в послеоперационном периоде.
2. Одновременно с проведением неоадьювантной полихимиотерапии (ПХТ).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

1. Выраженные нарушения жизненно важных органов, в т. ч. сердечно-сосудистой, дыхательной, печеночной, почечной недостаточности и др.
2. Сопутствующие аллергические или аутоиммунные заболевания (крапивница, отек Квинке, синдром Лайелла, системные заболевания соединительной ткани и др., псориаз, нейродермит).
3. Отказ родителей от проведения иммунотерапии.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. На первом этапе терапии всем больным выполняется нейрохирургическое вмешательство с целью максимального удаления опухоли.
2. На втором этапе проводится неоадьювантная полихимиотерапия, включающая цитостатические препараты – винкристин, циклофосфан, вепезид, цис- или карбоплатин. Продолжительность курса 3 дня. Всего проводится 4 курса ПХТ с интервалом между курсами 21-28 дней.
3. Цитокиновая иммунотерапия препаратом ИЛ-2 (Ронколейкин) проводится на каждом курсе полихимиотерапии, за день до начала и на протяжении всех 3 дней. Курсовая доза – 4 млн ЕД. Ронколейкин вводится внутривенно в разовой дозе 1 млн ЕД на 400 мл 0,9% физиологического раствора и 4 мл 10% альбумина. Инфузия проводится в течение 6 ч.

4. Состояние клеточного иммунитета по показателям периферической крови (ПК) оценивали за 24 ч до начала 1-го введения Ронколейкина и через 24-48 ч после окончания курса полихимиотерапии.

Перечень обязательного обследования больных:

1. Общеклиническое физикальное и лабораторное обследование.
2. Компьютерная или магнитно-резонансная томография головного мозга.
3. Рентгенологическое исследование органов грудной клетки.
4. Ультразвуковое исследование органов брюшной полости и малого таза.

5. Оценка состояния клеточного иммунитета по показателям периферической крови:

- абсолютному содержанию лимфоцитов;
- субпопуляционному составу лимфоцитов ПК.

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов проводится методом проточной цитофлуориметрии на аппарате FACScan (фирмы Becton Dickinson, США) с помощью стандартной панели моноклональных антител. Учитывали процентное и перерассчитывали абсолютное содержание Т-, В-клеток, естественных киллерных (ЕК) клеток, CD4+ и CD8+ субпопуляций Т-лимфоцитов, активированных HLA-DR+ Т-лимфоцитов, а также CD4+Т-клеток «хелперов», экспрессирующих рецепторы к ИЛ-2 (CD25+). Для маркера CD25 регистрировали также показатель средней интенсивности флуоресценции (СИФ), отражающий плотность экспрессии молекул на клеточной мембране.

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

Проведение курсов цитокиновой иммунотерапии прекращается при индивидуальной непереносимости Ронколейкина в следующих случаях:

1. Анафилактические и аллергические реакции.
2. Опасные для жизни побочные действия препарата – резкое ухудшение самочувствия, гипертермия выше 40°C, энцефалопатия, отеки, выпот в серозные полости, лабораторно подтвержденное ухудшение функции печени и почек, желудочно-кишечного тракта, выраженные нарушения со стороны ЭКГ и других показателей сердечно-сосудистой системы, включая гипотензивные реакции.

Критерии оценки эффективности цитокиновой иммунотерапии

Для оценки иммуномодулирующего действия ИЛ-2 на фоне химиотерапии исследовали ряд показателей клеточного иммунитета до и после каждого цикла лечения в двух группах больных. В основной группе (ИЛ-2+), включавшей 16 человек, пациенты получали полихимиотерапию и Ронколейкин, в группе сравнения (ИЛ-2-), включавшей 15 человек, – только ПХТ.

Динамика абсолютного содержания лимфоцитов отражает иммуносупрессивное действие ПХТ, которое не зависит от сопутствующей

терапии Ронколейкином. Различия в реакции системы Т-клеточного иммунитета на сопоставляемые схемы терапии (с Ронколейкином и без него) выявляются при анализе субпопуляционного состава лимфоцитов, причем они становятся достоверными только во второй половине курса терапии, т. е. после 3-4 цикла.

При использовании Ронколейкина процентное содержание Т-лимфоцитов, а также их субпопуляций на протяжении курса лечения оказывается более стабильным, тогда как при проведении ПХТ без Ронколейкина наблюдается значительное нарушение баланса CD4+/CD8+ Т-лимфоцитов с преобладанием CD8+ клеток, а также избыточное увеличение доли HLA-DR+ Т-лимфоцитов.

Соотношение содержания (%) CD25+CD4+Т-клеток «хелперов», экспрессирующих рецепторы к ИЛ-2 и CD3+CD4+Т-клеток «хелперов» характеризуется одинаковой устойчивой тенденцией к увеличению в обеих группах больных. При этом модифицирующее действие Ронколейкина на экспрессию рецепторов к ИЛ-2 проявляется только в повышении плотности (количества) маркера на поверхности клеток.

Полученные данные свидетельствуют о том, что Ронколейкин, применяемый в сочетании с ПХТ, обладает выраженным иммуномодулирующим действием, обеспечивая относительную стабильность содержания Т-хелперов и способствуя их активации путем индукции экспрессии рецепторов к ИЛ-2.

Клиническая эффективность цитокинотерапии с использованием ИЛ-2 оценивается по динамике общего состояния больных. Проведенные нами исследования показали, что при применении Ронколейкина ни в одном случае не было зарегистрировано необратимой и резко выраженной токсичности, требующей неотложных мероприятий. Побочное действие лечения проявлялось в виде гипертермической реакции, озноба. Лихорадка и озноб у всех больных носили легкий характер и исчезали самостоятельно.

Применение ИЛ-2 у детей с медуллобластомой/ПНЭО оказывало благоприятный эффект на переносимость полихимиотерапии.

## **II. Использование ИЛ-2 для биотерапии у детей с с далеко зашедшими саркомами мягких тканей**

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

1. Лечение выполнимо в онкологических учреждениях, располагающих установкой для создания общей гипертермии (ОГ) (Яхта-5, Эмона, НПО «Исток», Россия).
2. Препарат интерлейкина-2 (Ронколейкин, Биотех, Россия).

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Дети в возрасте 6-18 лет с первичными генерализованными формами сарком мягких тканей.

2. Ранние рецидивы опухоли (до 6 месяцев) после стандартного лечения или прогрессирования опухолевого процесса на фоне специального лечения.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

1. Выраженные нарушения жизненно важных органов, в т. ч. сердечно-сосудистая, дыхательная, печеночная, почечная недостаточность и др. (70% по шкале Карновского).

2. Сопутствующие аллергические или аутоиммунные заболевания (крапивница, отек Квинке, синдром Лайелла, системные заболевания соединительной ткани и др., псориаз, нейродермит).

3. Локализация опухолевого процесса в области головы и шеи.

4. Отказ родителей от проведения иммунотерапии.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. На первом этапе терапии генерализованных сарком проводится комплексное обследование больных, включая биопсию опухоли, направленное на установление стадии процесса и оценку состояния жизненно важных органов и систем согласно международным протоколам лечения этой категории больных в зависимости от нозологической формы саркомы мягких тканей.

2. На втором этапе проводится неоадьювантная ПХТ, включающая цитостатические препараты. В качестве выбора могут быть использованы схемы IVA, SEV и IVE, предполагающие проведение 3 блоков ПХТ (см. ниже) в течение 1 цикла с интервалом 3 недели.

IVE Винкристин 1,5 мг/м<sup>2</sup> внутривенно 1-й день;  
Дактиномицин 1,5 мг/м<sup>2</sup> внутривенно 1-й день;  
Ифосфамид 3000 мг/м<sup>2</sup> инфузия 3 ч, 1-3 дни.

SEV Винкристин 1,5 мг/м<sup>2</sup> внутривенно 1-й день;  
Карбоплатин 550 мг/м<sup>2</sup> инфузия 1 ч, 1-й день;  
Эпирубицин 150 мг/м<sup>2</sup> инфузия 24 ч.

IVE Винкристин 1,5 мг/м<sup>2</sup> внутривенно 1-й день;  
Вепезид 150 мг/м<sup>2</sup> инфузия 1 ч, 1-3 дни;  
Ифосфамид 3000 мг/м<sup>2</sup> инфузия 3 ч, 1-3 дни.

3. После трех блоков химиотерапии проводится контрольное обследование с целью оценки эффекта лечения. В дальнейшем больному проводится еще 2 цикла (6 блоков) химиотерапии аналогично первому, но в условиях общей управляемой гипертермии (41,5-42,5°C; 180 мин) и гипергликемии (22-33 ммоль/л). В процессе проведения общей гипертермии (ОГ) противоопухолевые препараты вводятся, когда температура тела поднимается до 41°C. К концу сеанса ОГ (когда температура тела снижается до 40,5°C) проводится 4-часовая инфузия ИЛ-2 (Ронколейкин, Биотех, Россия) в дозе 0,5-1 млн ЕД/м<sup>2</sup>. На второй и третий день после сеанса ОГ

химиопрепараты вводятся в обычном режиме. Ронколейкин вводится внутривенно через день, всего 3 введения. Такой многокомпонентный терапевтический подход обеспечивает максимальное повреждение опухолевых очагов с одновременной иммуномодуляцией. Как и при проведении блоков химиотерапии, интервал между курсами системной термохимиобиотерапии составляет 3 недели.

Время и объем дополнительно выполняемого хирургического вмешательства и лучевой терапии выбирается индивидуально в зависимости от распространенности процесса и ответа на проводимое лечение.

4. Состояние клеточного иммунитета по показателям периферической крови оценивали за 24 ч до начала 1-го введения Ронколейкина и через 24-48 ч после окончания курса полихимиотерапии.

Перечень обязательного обследования больных:

1. Общеклиническое физикальное и лабораторное обследование.
2. Компьютерная или магнитно-резонансная томография зоны первичного очага и метастатического очага.
3. Рентгенологическое исследование, включая компьютерную томографию органов грудной клетки.
4. Ультразвуковое исследование органов брюшной полости и малого таза и зоны поражения.
5. Оценка состояния клеточного иммунитета по показателям периферической крови:

- абсолютному содержанию лимфоцитов;
- субпопуляционному составу лимфоцитов ПК.

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов проводится методом проточной цитофлуориметрии на аппарате FACScan (фирмы Becton Dickinson, США) с помощью стандартной панели моноклональных антител. Учитывали процентное и перерассчитывали абсолютное содержание Т-, В-клеток, естественных киллерных (ЕК) клеток, CD4+ и CD8+субпопуляций Т-лимфоцитов, активированных HLA-DR+ Т-лимфоцитов, а также CD4+Т-клеток «хелперов», экспрессирующих рецепторы к ИЛ-2 (CD25+) и экспрессию CD95 на CD3+клетках.

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

Проведенное нами клиническое исследование подтвердило хорошую переносимость курсов термохимиобиотерапии. Дополнительной токсичности, связанной с проведением ОГ и введением ИЛ-2, мы не наблюдали.

У каждого второго больного после инфузии ИЛ-2 может проявляться температурная реакция, озноб. Эти побочные действия, как правило, носят транзиторный характер. При плохой переносимости этой реакции больным рекомендуется прием парацетамола, 400 мг/м<sup>2</sup>.

### Критерии оценки эффективности цитокиновой иммунотерапии

Эффективность иммуномодулирующего действия ИЛ-2 оценивали на этапах общей гипертермии в комбинации с химиотерапией в группе, применяющей ИЛ-2+, включавшей 10 человек, и у больных, проводивших аналогичный курс лечения, но без ИЛ-2, включавшей 8 человек.

Динамика абсолютного содержания лимфоцитов отражает иммуносупрессивное действие ПХТ и особенно общей гипертермии, которое не зависит от сопутствующей терапии Ронколейкином. Иммуномодулирующий эффект ИЛ-2 проявляется на уровне субпопуляционного состава лимфоцитов, причем степень различия возрастает к завершающим циклам общей гипертермии. При использовании ИЛ-2 процент Т-лимфоцитов остается стабильным в обеих группах, тогда как баланс субпопуляций CD4+/CD8+Т-лимфоцитов различается в сторону увеличения числа CD4+ в группе применяющей ИЛ-2.

Соотношение содержания (%) CD25+CD4+Т-клеток «хелперов», экспрессирующих рецепторы к ИЛ-2, CD3+CD4+Т-клеток «хелперов» характеризуется одинаковой устойчивой тенденцией к увеличению, особенно в группе с ИЛ-2. При этом модифицирующее действие ИЛ-2 на экспрессию своих рецепторов практически не проявляется в повышении плотности (количества) маркера на поверхности клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что ИЛ-2, применяемый в сочетании с общей гипертермией и химиотерапией, обладает умеренно выраженным иммуномодулирующим действием.

Клиническая эффективность системной термохимиоцитокинотерапии с использованием ИЛ-2 оценена у 10 больных. Проведенные нами исследования показали, что при применении Ронколейкина ни в одном случае не было зарегистрировано необратимой и резко выраженной токсичности, требующей неотложных мероприятий. По нашим предварительным данным, применение ИЛ-2 с общей гипертермией у детей с далеко зашедшими саркомами мягких тканей улучшает непосредственные результаты лечения. Полная и частичная регрессия опухоли составила 67%.

### **III. Использование интерферона-α и общей гипертермии для биотерапии у детей с почечно-клеточным раком**

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

1. Лечение выполнимо в онкологических учреждениях, располагающих установкой для создания общей гипертермии (Яхта-5, Эмона, НПО «Исток», Россия).

2. Интерферон-α-2b (Интрон, Хоффман Ля Рош, Швейцария).

#### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Дети в возрасте 6-18 лет с распространенным почечно-клеточным раком (ПКР) после проведения нефрэктомии и лимфодиссекции, а именно:

- ПКР с отдаленными метастазами;



- ПКР с метастазами в регионарных лимфатических узлах;
  - ПКР с прорастанием опухоли в жировую капсулу почки, опухолевый тромб в почечной или нижней полой вене.
2. Все неоперабельные случаи по местному распространению опухоли.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

1. Тяжелое общее состояние больного (70% по шкале Карновского).
2. Нарушения функции сердца с явлениями декомпенсации (укорочение ФВ), значительное нарушение функции печени (повышение активности печеночных энзимов >3 раза) и почек (клиренс креатинина <60).
3. Лейкопения и тромбоцитопения (лейкоцитов <2000 и нейтрофилов <1000, тромбоцитов <100).
4. Отказ родителей от проведения термохимио- и иммунотерапии.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. Комплексное предоперационное обследование, направленное на установление стадии процесса и оценку состояния жизненно важных органов и систем.
2. Радикальная нефрэктомия и лимфодиссекция.
3. После заживления послеоперационной раны (7-8 дней после нефрэктомии) больному назначается интерферон- $\alpha$ -2b в дозе 3 млн ЕД/м<sup>2</sup> внутримышечно на 1, 2, 3, 5, 6, 7-й дни лечения за 1 ч до отхода ко сну. На 4-й день лечения утром также вводится интерферон- $\alpha$ -2b, и больной подвергается сеансу общей гипертермии, гипергликемии и химиотерапии (доксорубицин в дозе 50 мг/м<sup>2</sup>) под эндотрахеальным наркозом. Температурно-экспозиционный режим при проведении сеансов ОГ составляет в целом 41,5-42,5°C, 180 мин. Доксорубицин вводится при достижении температуры 41°C в виде 2-часовой инфузии. Такие курсы комбинированной химиобиотерапии повторяются каждые 3-4 недели. Всего проводится 4-5 курсов лечения.

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

Проведенное нами клиническое исследование подтвердило хорошую переносимость курсов термохимиобиотерапии. Побочное действие интерферона- $\alpha$ -2b может проявляться в виде гипертермической реакции, озноба и легкого «гриппоподобного синдрома». Эти побочные действия, как правило, носят умеренный характер и исчезают самостоятельно. При плохой переносимости гипертермической реакции больным рекомендуется парацетамол 400 мг/м<sup>2</sup>.

#### Критерии оценки эффективности цитокиновой иммунотерапии

Оценку иммуномодулирующего эффекта интерферона- $\alpha$  проводили на этапах общей гипертермии в комбинации с химиотерапией по изменению показателей клеточного иммунитета. В исследуемую группу было включено

5 больных, в контрольную входили 8 пациентов, у которых применялась общая гипертермия в комбинации с химиотерапией без введения цитокинов.

Применение интерферона- $\alpha$  способствует быстрейшему восстановлению абсолютного числа Т-лимфоцитов на этапах общей гипертермии в комбинации с химиотерапией. Применение данного цитокина не вызывает значимых изменений соотношения CD4/CD8 лимфоцитов, хотя можно отметить небольшую тенденцию к увеличению числа CD8 клеток при назначении интерферона- $\alpha$ .

Выраженного иммуномодулирующего действия на экспрессию маркеров активации (CD4+CD25+ и CD3+HLA-DR) на лимфоцитах интерферон- $\alpha$  практически не оказывает. Между тем, можно отметить общее усиление экспрессии HLA-DR и CD95 на отдельных субпопуляциях лимфоцитов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что интерферон- $\alpha$ , применяемый в сочетании с общей гипертермией и химиотерапией, обладает выраженным «иммуносохранным действием» по отношению ко всем лимфоидным клеткам и не влияет на их субпопуляционный состав.

Клиническая эффективность цитокинотерапии с применением интерферона- $\alpha$ -2b в условиях общей гипертермии оценивалась у 5 больных, в т. ч. у 2 пациентов с отдаленными метастазами. Все больные живы со сроком наблюдения 8-68 мес. (медиана 22 мес.).