

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2012 г.

Регистрационный № 142-1012

**МЕТОД ОБЕСПЕЧЕНИЯ И ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ
ИММУНОТЕРАПИИ АУТОЛОГИЧНЫМИ ДЕНДРИТНЫМИ
КЛЕТКАМИ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ,
ХРОНИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИОННЫМИ И АУТОИММУННЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии»

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ:

кандидат медицинских наук Гончаров А.Е., доктор медицинских наук Скрягина Е.М., доктор медицинских наук, профессор Титов Л.П., доктор медицинских наук, профессор Путырский Л.А., кандидат медицинских наук Скрягин А.Е., кандидат биологических наук Шпаковская Н.С., Романова И.В., Солодовникова В.В., Кошелев С.В.

Минск, 2012

Для лечения пациентов, страдающих онкологическими, аутоиммунными и хроническими инфекционными заболеваниями, может быть использована иммунотерапия при помощи аутологичных дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови или гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Настоящая инструкция разработана для оценки и обеспечения безопасности проводимой иммунотерапии.

Инструкция предназначена для врачей-иммунологов, врачей-онкологов, врачей-инфекционистов, врачей-фтизиатров.

1 Показания к применению

Проводимая иммунотерапия пациентов аутологичными дендритными клетками является показанием к обязательному использованию данной инструкции.

2 Перечень необходимого оборудования, реактивов и материалов:

- оборудование, расходные материалы и реагенты для определения показателей общего анализа крови, общего анализа мочи, биохимического анализа крови (определение билирубина, АЛТ, АСТ, креатинина, мочевины), показателей иммунного статуса (число Т-клеток и их основных субпопуляций: CD3, CD4, CD8, Т-регуляторных клеток), выявления антинуклеарных антител;
- инструменты и расходные материалы для забора венозной крови и/или костного мозга и введения культур дендритных клеток.

3 Технология использования метода

3.1 Подбор пациентов

В процессе подбора учитывают показания к применению метода иммунотерапии, представленные в соответствующих инструкциях по применению. На момент подготовки настоящей инструкции в Республике Беларусь утверждены инструкции по применению на «Способ иммунотерапии хронического гепатита В с использованием культур

аутологичных моноцитарных дендритных клеток» (утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь, регистр. № 062–0609) и «Метод иммунотерапии пациентов с мультирезистентным туберкулезом аутологичными моноцитарными дендритными клетками» (утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь, регистр. № 185–1110).

С целью минимизации возможных побочных эффектов при проведении иммунотерапии и достижения максимальной эффективности учитывают противопоказания к проведению иммунотерапии дендритными клетками. Такими противопоказаниями являются беременность, лактация, возраст до 18 и свыше 60 лет, сопутствующие аллергические и аутоиммунные заболевания в фазе клинико-лабораторного обострения, тяжелые острые интеркуррентные заболевания. Пациентам, получающим иммуносупрессивную терапию, может быть назначена иммунотерапия с использованием дендритных клеток спустя месяц после прекращения приема иммуносупрессивных средств. Рекомендовано не назначать иммунотерапию дендритными клетками пациентам, страдающим алкогольной и/или наркотической зависимостью, в связи с тем, что проведение терапии и последующий контроль эффективности и безопасности может быть затруднен.

3.2 Оценка и обеспечение биобезопасности культур дендритных клеток

1. Выбор питательной среды и ее компонентов. Выбирая питательную среду для генерации дендритных клеток, используемых в иммунотерапии, руководствуются, прежде всего, требованиями биобезопасности.

Культивирование дендритных клеток на стандартных питательных средах требует обязательного наличия 5–10% аутологичной сыворотки

(или плазмы) пациента или пулированной АВ-сыворотки доноров. Хотя имеется возможность тщательной проверки сыворотки доноров на контаминацию вирусами иммунодефицита человека, вирусами парентеральных гепатитов, герпес-вирусами и др., всегда существует риск заражения пациента. Риск значительно повышается при использовании пулированной (взятой от 30–40 доноров) сыворотки. Несмотря на кажущееся преимущество (особенно в целях биобезопасности) использования аутологичной сыворотки, данная методика не всегда позволяет получать функционально полноценные дендритные клетки. По всей видимости, это связано с наличием в сыворотке пациентов цитотоксичных (билирубин при вирусных гепатитах) и иммуносупрессивных веществ (различные белки, продуцируемые опухолевыми клетками), которые препятствуют процессу дифференцировки клеток и их дальнейшему созреванию. Кроме того, возникают вопросы стандартизации метода получения дендритных клеток, поскольку сыворотки, полученные от разных пациентов, содержат различные биологически-активные вещества в широком диапазоне концентраций. Использование ксеногенной сыворотки в протоколах культивирования дендритных клеток является недопустимым в связи с риском инфицирования различными вирусами и прионами. Кроме того, даже следовые количества чужеродной сыворотки могут вызвать анафилактические реакции у лиц, сенсibilизированных к компонентам сыворотки коров или лошадей.

Таким образом, рекомендуется использование бессывороточных сред, которые позволяют наладить стандартизованное приготовление культур дендритных клеток и минимизировать риск заражения пациента.

2. Выбор антигенов для праймирования. Используемые антигены должны тщательно тестироваться на наличие жизнеспособных

микроорганизмов (рекомбинатные белки, лизаты бактерий), цитотоксичность.

3. Условия проведения культуральной работы. Работу с культурами клеток проводят строго в изолированных боксовых помещениях в ламинарных шкафах не ниже II класса защиты. Культивирование клеток проводят в углекислотных инкубаторах, оснащенных HEPA-фильтрацией воздуха. Боксовое помещение, ламинарный шкаф и углекислотный инкубатор не должны быть использованы для проведения микробиологических или вирусологических исследований.

4. Контроль качества. С целью оценки и обеспечения биобезопасности осуществляют контроль культур дендритных клеток, который включает:

1. исследование морфологии клеток;
2. анализ иммунофенотипа клеток;
3. контроль микробной контаминации.

Контроль морфологии дендритных клеток проводят с использованием инвертированного микроскопа, оснащенного объективом $\times 400$, позволяющим проводить исследование объекта методом фазового контрастирования. Дендритные клетки имеют округлую форму, размер от 12 до 20 мкм, многочисленные цитоплазматические отростки разной длины, относительно небольшое, смещенное к периферии ядро. Оценивают наличие в культуре значительной примеси клеток иных популяций (лимфоциты, фиброциты и др.), видимых признаков микробной контаминации.

С использованием проточного цитофлуориметра контролируют жизнеспособность клеток (должна составлять не ниже 95%), наличие клеток в состоянии апоптоза (не более 5%), иммунофенотип дендритных

клеток (относительное число клеток, экспрессирующих молекулу CD11c или CD209 – более 90%, CD83 – более 50%).

Проводят контроль микробиологической чистоты (наличие контаминации дрожжеподобными грибами и бактериями) с использованием рутинных бактериологических методов или автоматических анализаторов (см. инструкцию на «Методы контроля контаминации микроорганизмами культур мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и пуповинной крови», утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь, регистр. № 167–1208).

3.3. Учет и оценка постинъекционных реакций и побочных эффектов

3.3.1 Оценка реакции в месте инъекции

Осмотр места инъекции осуществляют ежедневно в течение 5 дней после введения клеток. В процессе иммунотерапии возможно развитие постинъекционных реакций, которые не оказывают негативного влияния на состояние здоровья пациентов и не требуют применения медицинской помощи. По данным авторов инструкции, зуд в месте инъекции возникал у 21% пациентов в течение первых суток и продолжался в течение 1–2 суток после инъекции. У 11% пациентов возникала аллергическая реакция замедленного типа на повторные введения клеток, которая проявлялась в виде гиперемии и образования подкожных инфильтратов, исчезающих без остаточных изменений на коже и в подкожной клетчатке в течение 2–3 недель после инъекций и не требующих медицинского вмешательства.

3.3.2 Оценка аллергических реакций

Несмотря на то, что культуры дендритных клеток перед введением тщательно отмывают несколько раз в официальном растворе хлорида

натрия, невозможно полностью исключить развитие аллергических реакций немедленного типа на компоненты питательной среды: витамины, антибиотики, цитокины, антигены для праймирования и др.

Для предотвращения возникновения системных аллергических реакций проводят кожные пробы, используя взвесь дендритных клеток. Для этого пациенту вводят внутрикожно в область медиальной поверхности предплечья 0,1 мл взвеси клеток (но не более 1×10^6 клеток). Через 30 минут при отсутствии системных и местных реакций (гипотензия, крапивница, бронхоспазм и др.) проводится введение оставшейся взвеси клеток. Взвесь дендритных клеток вводят подкожно, с соблюдением правил асептики и антисептики, по 0,2–0,3 мл (но не более 10×10^6 клеток в одно место инъекции) в область медиальной поверхности предплечья либо другие анатомические зоны (если этого оговорено соответствующей инструкций по применению или программой клинических испытаний) на расстоянии не менее 3 см от каждого введения. Опыт терапии дендритными клетками 39 пациентов в Республике Беларусь показал, что аллергические реакции немедленного типа в ответ на введение дендритных клеток не развивались.

3.3.3 Оценка токсических реакций

Мировая практика применения дендритных клеток, равно как и опыт их использования в Республике Беларусь, показали высокую безопасность их применения и отсутствие токсических реакций на их введение. Тем не менее, следует контролировать общее состояние пациента после терапии и показатели, указывающие на наличие поражения печени, почек, изменения в гемограмме. Для этого проводят термометрию пациентов, опрос с целью регистрации возможного возникновения миалгии, артралгии, головной боли и др. По данным авторов инструкции, у 13% пациентов через несколько часов после инъекции дендритных клеток

температура тела повышалась до 37°C, однако в течение последующих 12 часов возвращалась к норме без применения лекарственной терапии.

Гемограмму с целью исключения анемии, тромбоцитоза и лейкопении) выполняют через 5 и 30 дней после начала терапии и через 3 месяца после завершения терапии дендритными клетками.

Для исключения токсических реакций со стороны печени возможно определение АЛТ и протромбинового времени, а для контроля функции почек – общего анализа мочи, мочевины и креатинина через 5 и 30 дней после начала терапии и через 3 месяца после завершения терапии дендритными клетками.

Учитывая, что риск развития токсических реакций вследствие применения дендритных клеток чрезвычайно мал, следует в первую очередь исключать иные причины их появления (применение лекарственных средств, прогрессирование заболевания).

3.3.4 Оценка аутоиммунных реакций

Проводят определение титра антинуклеарных антител с использованием НЕР-2 субстратных слайдов или методом иммуноферментного анализа до начала терапии и спустя 3 месяца после терапии.

3.3.5 Оценка иммунного ответа в процессе иммунотерапии

С целью оценки иммунного ответа в процессе терапии дендритными клетками и контроля развития иммуносупрессии определяют следующие основные показатели: число лейкоцитов, лимфоцитов, число Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций (CD3, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺), Т-регуляторных клеток, антигенспецифических клеток до терапии, через 1 месяц после начала иммунотерапии и через 3 месяца после последней инъекции дендритных клеток.

Основной функцией дендритных клеток является генерация антигенспецифических $CD3^+$ Т-клеток, обладающих прямой и опосредованной противоопухолевой активностью. По литературным данным увеличение числа антигенспецифических клеток у пациентов с раком на фоне проводимой иммунотерапии рассматривается как свидетельство достаточной стимуляции иммунитета дендритными клетками и, как правило, коррелирует с клинической эффективностью лечения.

Для оценки динамики формирования специфического иммунного ответа на терапию дендритными клетками можно использовать следующие методы: кожные тесты с антигеном, использованным для праймирования дендритных клеток (в случае, если использование данного антигена разрешено для проведения такой диагностики); прямое определение антигенспецифических Т-лимфоцитов в крови при помощи тетрамеров; определение цитокин-продуцирующих клеток после сокультивирования с антигеном и последующей детекцией цитокинов Th1-спектра (в основном ИФН- γ) методом проточной цитометрии или при помощи метода ELISPOT; выявление цитотоксического эффекта $CD8^+$ Т-лимфоцитов на клетки-мишени, экспрессирующие антиген; определение пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на антиген до и после терапии; исследование изменения экспрессии генов цитокинов. Предпочтительным методом является выявление Т-лимфоцитов, отвечающих продукцией ИФН- γ в ответ на стимуляцию антигенами (см. также инструкцию на «Метод оценки специфического иммунного ответа на аутоиммунотерапию дендритными клетками пациентов, страдающих раком молочной железы», утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь, регистр. № 114–1111).

T-регуляторные клетки (T-рег), имеющие фенотип $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}FoxP3^+$, являются основными клетками системы иммунитета, обладающими иммуносупрессивной активностью. Во множестве работ показано, что у пациентов с раком различной локализации число T-рег увеличено как в периферической крови, так и в инфильтратах, окружающих опухоль. При этом большее число T-рег ассоциировано с худшим клиническим прогнозом. В то же время, уменьшение пула циркулирующих T-рег у пациентов с раком, положительно коррелировало с продолжительностью безрецидивного периода, что позволяет использовать результаты определения T-рег в качестве прогностического теста.

Иммуносупрессия характеризуется лейко- и лимфопенией, снижением числа T-клеток ниже 60% и уменьшением индекса CD4/CD8 ниже 0,8. Развитие иммунологической толерантности может проявиться значительным (в 2 и более раза) увеличением числа регуляторных T-клеток. Следует отметить, что признаки иммуносупрессии могут возникать в ответ на химиотерапевтическое лечение опухолей и хронических инфекций и не находиться в причинно-следственной связи с проводимой терапией дендритными клетками. В связи с этим, в каждом из случаев выявления признаков иммуносупрессии у пациентов, получавших терапию дендритными клетками, следует исключить иные причины ее развития (применение лекарственных препаратов, лучевая терапия, прогрессирование основного заболевания).

В случае выявления признаков иммуносупрессии или иммунологической толерантности, когда есть основания полагать, что они могут быть связаны с применением дендритных клеток, клеточную иммунотерапию прекращают.

3.4 Критерии безопасности способа иммунотерапии

Оценку переносимости и безопасности применения способа иммунотерапии проводят на основании обследования пациентов и изучения лабораторных показателей до начала терапии, во время их проведения и после окончания.

Переносимость способа иммунотерапии оценивают как:

- хорошую – если постинъекционные реакции или побочные явления отсутствовали;

- удовлетворительную – если присутствовали лишь постинъекционные реакции;

- неудовлетворительную – если у пациентов возникали умеренные побочные явления, связанные с применением способа иммунотерапии. К умеренным побочные явления относят такие, которые потребовали оказания медицинской помощи и/или отмены иммунотерапии.

См. также приложение Б.

4 Противопоказания к применению

Отсутствуют.

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

Этап иммунотерапии	Осложнения или ошибки при выполнении	Пути устранения
Подбор пациентов для иммунотерапии	Терапия пациентов с противопоказаниями, перечисленными в п.3.1	Соблюдение правил подбора пациентов, установленных настоящей инструкцией
	Терапия пациентов, у которых ожидается слабый клинический эффект на терапию	Соблюдение правил подбора пациентов, установленных инструкциями по применению на метод иммунотерапии дендритными клетками
	Начало иммунотерапии онкологических заболеваний в период химиотерапевтического лечения	
Забор крови/костного мозга	Аллергические реакции на местные анестетики	Сбор аллергоанамнеза, проведение кожных проб
	Нарушение правил забора костного мозга/крови	Соблюдать установленные инструкции
	Нестерильные пробирки для забора крови, использование неподходящего антикоагулянта	В качестве антикоагулянта допускается использование только гепарина
	Нарушение сроков хранения биоматериала	Срок хранения крови и костного мозга не более 1 суток
Подготовка дендритных клеток и контроль их качества	Контаминация микроорганизмами	Соблюдение правила асептической работы с культурами клеток
	Отсутствие дифференцировки дендритных клеток	Контроль качества питательной среды, цитокинов
	Низкая жизнеспособность и высокие показатели апоптоза	Контроль этапов выделение клеток, культивирования, праймирования и подготовки к введению
Лечебный этап	Несоблюдение сроков введения, рекомендованного количества клеток	Соблюдать инструкцию по применению на метод иммунотерапии
	Трактовка развившихся у пациента симптомов болезни, как связанных с применением дендритных клеток	Тщательный анализ состояния пациента и данных лабораторных методов исследования

Приложение А

План обследования пациентов, получающих иммунотерапию дендритными клетками

№	Время	Методы обследования
1.	Не более 1 недели до начала иммунотерапии	- общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (АЛТ, АСТ, билирубин, мочевины, креатинин), иммунограмма, определение антинуклеарных антител
2.	30 минут до проведения иммунотерапии	- внутрикожная проба со взвесью клеток
3.	1-5-е сутки после проведения иммунотерапии	- осмотр, термометрия
4.	5-е сутки после проведения иммунотерапии	- общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (АЛТ, АСТ, билирубин, мочевины, креатинин)
5.	1 месяц после начала иммунотерапии	- общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (АЛТ, АСТ, билирубин, мочевины, креатинин), иммунограмма
6.	3 месяца после окончания иммунотерапии	- общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (АЛТ, АСТ, билирубин, мочевины, креатинин), иммунограмма, определение антинуклеарных антител

Приложение Б

Критерии оценки безопасности и переносимости иммунотерапии дендритными клетками

№	Критерий	Переносимость		
		Хорошая – отсутствие постинъекционных реакций	Удовлетворительная – наличие постинъекционных реакций	Неудовлетворительная – наличие побочных эффектов терапии
1.	Зуд в месте инъекции	отсутствует	зуд невысокой степени выраженности	сильный зуд, требующий применения лекарственных препаратов
2.	Гиперемия и/или инфильтрат в месте инъекции	отсутствует	наличие изменений, исчезающих без остаточных изменений на коже и в подкожной клетчатке в течение 2–3 недель после инъекций и не требующих медицинского вмешательства	образование инфильтрата, требующего оказания медицинской помощи, либо остаточные изменения в коже спустя более месяца после терапии
3.	Повышение температуры тела	температура тела в пределах нормы	субфебрильная температура не более суток после инъекции	фебрильная температура после введения клеток при отсутствии других причин для ее повышения
4.	Аллергические реакции немедленного типа	отсутствуют	отсутствует	аллергические реакции по типу крапивницы, отека Квинке и др., потребовавшие медикаментозной терапии
5.	Увеличение титра антинуклеарных антител	отсутствует	отсутствует	выявление антинуклеарных антител после терапии либо увеличение титра антинуклеарных антител в 4 раза и более
6.	Развитие иммуносупрессии и или иммунологической толерантности	отсутствуют признаки иммуносупрессии	отсутствуют признаки иммуносупрессии	увеличение числа Т-регуляторных клеток в 2 и более раза, снижение индекса CD4/CD8 ниже 0,8 (может также являться признаком опухолевой прогрессии или реакцией на проводимую химиотерапию и др.)