

**Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
«Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова»
(ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)**

На правах рукописи

**НЕХАЕВА
Татьяна Леонидовна**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК**

специальность – 14.01.12 – онкология

– 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель:
доктор медицинских наук
И. А. Балдуева**

**Санкт-Петербург
2014**

Оглавление

Введение	6
Глава 1	10
Дендритные клетки (ДК) и их роль в противоопухолевом иммунитете	10
(обзор литературы).....	10
1.1. Фенотипическая и функциональная гетерогенность ДК.....	10
1.2. Миелоидные ДК: иммунофенотип и функциональная активность	12
1.3. Миелоидные ДК и противоопухолевый иммунный ответ	14
1.4. Миелоидные ДК и противоопухолевая вакциноterapia.....	16
1.5. Требования надлежащей лабораторной практики (GLP) в получении противоопухолевых дендритноклеточных вакцин	19
Глава 2	25
Материалы и методы исследования	25
2.1. Материалы.....	25
2.2. Методы	30
2.2.1. Получение костномозговых и периферических дендритных клеток	34
2.2.2. Дифференцировка дендритных клеток из миелоидных предшественников ex vivo.....	35
2.2.3. Приготовление опухолевого лизата содержащего раково-тестикулярные антигены	40
2.2.4. Криоконсервация миелоидных предшественников и вакцинных дендритных клеток	41
2.2.5. Размораживание миелоидных предшественников и вакцинных дендритных клеток	41
2.2.6. Оценка количества и жизнеспособности (миелоидных предшественников, вакцинных дендритных клеток, мононуклеаров, опухолевых клеток)	41
2.2.7. Иммуноцитохимическая характеристика дендритных клеток.....	43
2.2.8. Иммунофенотипический анализ миелоидных предшественников, вакцинных дендритных клеток, опухолевых клеток.....	43
2.2.9. Мониторинг специфического поствакцинального иммунного ответа (ELISpot анализ)	45
2.2.10. Оценка поствакцинального гуморального иммунного ответа	47
(клеточный ИФА).....	47
Глава 3	51
Стандартизация методов получения и криоконсервации миелоидных предшественников ДК из аферезного материала и периферической крови	51
3.1. Стандартизация оптимальных условий выделения МНК и моноцитов из аферезного материала и периферической крови	51

3.2. Стандартизация оптимальных условий криоконсервации МНК и моноцитов из аферезного материала и периферической крови	56
Глава 4	61
Оптимизация и стандартизация условий дифференцировки вакцинных ДК.....	61
4.1. Изучение влияния ростового фактора GM-CSF импортного (GM-CSF ¹) и отечественного (GM-CSF ²) производства на дифференцировку ДК ex vivo.....	61
4.2. Изучение влияния различных концентраций IL-4 на дифференцировку ДК ex vivo	63
4.3. Изучение влияния IFN- α на дифференцировку ДК ex vivo.....	65
4.4. Изучение влияния питательных сред на дифференцировку и созревание ДК	67
4.4.1. Оценка иммунофенотипа ДК, дифференцированных на различных питательных средах: контроль качества.....	68
Глава 5	73
Оптимизация и стандартизация условий нагрузки и активации ДК.....	73
5.1. Характеристика клеточных линий меланомы кожи человека, экспрессирующих РТА.....	73
5.2. Нагрузка и активация незрелых CD14 ⁻ CD1a ⁺ CD83 ⁻ ДК	78
5.3. Оценка дифференцировки ДК по уровню экспрессии иммунофенотипических маркеров на разных стадиях созревания ДК.....	79
Глава 6	83
Стандартизация условий криоконсервации и хранения вакцинных ДК в соответствии иммунофенотипа, требований надлежущей лабораторной и клинической практики.....	83
6.1. Оценка жизнеспособности ДК до и после криоконсервации в ультранизких температурах	83
6.2. Продолжительное хранение криоконсервированной дендритноклеточной вакцины: контроль качества	85
6.3. Оценка возможности использования бессывороточной среды для криоконсервации и хранения ДК.....	88
6.4. Оценка функциональной активности криоконсервированных вакцинных ДК.....	89
6.5. Скрининг вакцинного препарата ДК на наличие инфекционных агентов: контроль качества.....	91
6.6. Организация лаборатории длительного хранения криоконсервированных дендритноклеточных вакцин (криогенная лаборатория)	93
Глава 7	96
Активная специфическая иммунотерапия (вакциноterapia) аутологичными костномозговыми и периферическими ДК больных диссеминированной меланомой кожи ...	96
7.1. Оценка безопасности вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками	96
7.2. Оценка клинической эффективности вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками	97

7.3. Оценка иммунологической эффективности терапии.....	100
7.3.1. Оценка реакций ГЗТ у больных на фоне терапии ДКВ	100
7.3.2. Оценка содержания субпопуляций лимфоцитов у больных, получавших лечение аутологичными ДК	101
7.3.3. Оценка специфического иммунного ответа	103
Глава 8	108
Обсуждение результатов исследования	108
Выводы	120
Литература	122
Приложения	136

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АПК	–	антигенпрезентирующая клетка
ГЗТ	–	гиперчувствительность замедленного типа
ДК	–	дендритная клетка
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ИФА	–	иммуноферментный анализ
МкАт	–	моноклональные антитела
МНК	–	мононуклеары периферической крови
нг	–	нанограмм
мкг	–	микрограмм
мл	–	миллилитр
ОАА	–	опухолеассоциированные антигены
НЯ	–	нежелательные явления
ПЗ	–	прогрессирование заболевания
РТА	–	раково-тестикулярные антигены
СК	–	стволовая клетка
СКПК	–	стволовая клетка периферической крови
СЗ	–	стабилизация заболевания
ОЦК	–	объем циркулирующей крови
ЧР	–	частичный регресс
ЧСС	–	частота сердечных сокращений
ФГА	–	фитогемагглютинин
ЦТЛ	–	цитотоксический Т-лимфоцит
CD	–	кластер дифференцировки
GLP	–	надлежащая лабораторная практика
GMP	–	надлежащая производственная практика
G-CSF		гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF	–	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GCP	–	надлежащая клиническая практика
HLA	–	лейкоцитарные антигены человека
IFN	–	интерферон
IL-4	–	интерлейкин-4
TNF- α	–	фактор некроза опухоли альфа

Введение

Актуальность темы. Поиск новых возможностей лечения больных с распространенным опухолевым процессом является актуальной задачей современной онкологии. Высокий уровень смертности, недостаточная эффективность лекарственного лечения, прорыв в понимании молекулярно-генетических и иммунобиологических механизмов развития рака, становятся основополагающими факторами развития фундаментальной и клинической онкологии (Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2009). Анализ мировой литературы и информация ведущих сайтов в области онкологии (<http://www.fda.gov/> U.S. Food and Drug Administration; <http://www.cancer.gov/> the National Cancer Institute (NIH, USA); <http://www.reportlinker.com/> Industry reports, Company profiles and Market Statistics) свидетельствует о перспективах развития иммунобиологических технологий, персонализации лекарственного лечения и иммунотерапии больных с местно-распространенными и метастатическими формами рака.

На современном этапе развития науки не представляет сомнений факт участия дендритных клеток (ДК) в «высокопрофессиональной» презентации низкоиммуногенных опухолеассоциированных антигенов (ОАА) (Михайлова И.Н. и соавт., 2007; Morel P.A., Turner M.S., 2010; Murphy J.F., 2010). ДК являются объектом широкого круга исследований, основной целью которых является создание клеточных вакцин, способных корректировать иммунный ответ у больных со злокачественными новообразованиями (Барышников А.Ю. и соавт., 2009; Кадагидзе З.Г. и соавт., 2011; Ridgway D., 2003; Mackiewicz J., Mackiewicz A., 2009; Palucka K. et al., 2010; Castiello L. et al., 2011; Tuyaerts S., 2011). Разработка отечественных инновационных (оригинальных) вакцин на основе аутологичных дендритных клеток (ДК-вакцина), обладающих эффективностью, безопасностью и надлежащим уровнем качества, отвечают задачам стратегической импортзамещающей программы Правительства РФ. Решение данной проблемы предполагает использование комплексного подхода к созданию аутологичных терапевтических вакцин современными высокотехнологичными методами на основе системного изучения биологических и технологических характеристик вакцинного препарата, и их рационального выбора. По данным электронного регистра клинических исследований Национального института здоровья США (www.clinicaltrials.gov) в настоящее время в мире проводится более 200 клинических испытаний I-II-III фаз с использованием ДК в лечении различных заболеваний (меланома, рак почки, множественная миелома, рак предстательной железы, толстой кишки, молочной железы, глиобластома, рак легкого, лимфома, рак пищевода, саркома, а также рассеянный склероз, вирусный гепатит, ВИЧ-инфекция и др.). Вместе с тем, использование ДК-вакцин, обладающих эффективностью, безопасностью и надлежащим уровнем качества в рутинной

клинической практике, предполагает оптимизацию и стандартизацию рекомендованных методик (Моисеенко В.М., Балдуева И.А., 2011; Draube A. et al., 2010; Alfaro C. et al., 2011; Chiang C.L.L. et al., 2011; Harada Y., Yonemitsu Y., 2011).

Дифференцировка вакцинных ДК из миелоидных предшественников *in vitro* с использованием различных питательных сред, ростовых факторов и факторов дифференцировки различной активности, выбор которых для каждой лекарственной формы ДК (зрелые, незрелые) основан на оценке иммунобиологических и технологических характеристик, изучении их влияния на эффективность, безопасность и стабильность лекарственной формы, в ряде случаев препятствует получению стандартного клеточного продукта охарактеризованного качества (Балдуева И.А., 2008; Toh H.C. et al., 2009; Koido S. et al., 2011; Ning J. et al., 2011). Решение данной проблемы предполагает использование комплексного подхода к созданию аутологичных терапевтических вакцин современными высокотехнологичными методами на основе системного изучения биологических и технологических характеристик вакцинного препарата, и их рационального выбора.

Внедрение в производство и практическое использование терапевтических ДК-вакцин за рубежом (Provence™, AVA, AVP), а также увеличение количества экспериментальных ДК-вакцин на российском рынке требуют оценки их биоэквивалентности. Для предварительной оценки иммуногенности разработанных ДК-вакцин в настоящее время рекомендованы иммунофенотипирование и различные функциональные тесты, в т.ч. исследование сенсibilизированных поствакцинальных Т-лимфоцитов *in vitro* в тесте «ELISpot» (от англ. *Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*) и выявление специфических опухолевых антител (IgG) методом клеточного ИФА («*Whole cell ELISA*»).

Выбор условий проведения исследования позволяет не только оценить качество лекарственной формы, но и контролировать стабильность технологии получения ДК-вакцин. Обеспечение качества отечественных аутологичных ДК-вакцин предполагает стандартизацию и контроль качества на основе использования рекомендованных методик, а также испытаний, отвечающих требованиям гармонизации и унификации. Сочетание новых мощных инструментов иммуномониторинга с усовершенствованием протоколов ДК вакцинации и рационально выстроенные фундаментальные научные исследования обеспечат больше доверие к противоопухолевой вакцинотерапии и откроют новые возможности лечения онкологических больных (Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю., 2003).

Цель исследования

Внедрение в клиническую практику стандартизированных методов получения вакцин на основе аутологичных костномозговых и периферических ДК для лечения больных меланомой кожи.

Задачи исследования

1. Апробировать и оптимизировать получение миелоидных предшественников ДК из лейкокаферезного материала и периферической крови.
2. Стандартизировать условия дифференцировки, нагрузки и активации аутологичных ДК на основе изучения иммунофенотипа незрелых и зрелых ДК и уровня экспрессии раково-тестикулярных антигенов (РТА) на опухолевых клеточных линиях, используемых для специфического созревания ДК.
3. Оценить стабильность иммунобиологических характеристик стандартизированных ДК-вакцины на основе незрелых костномозговых и зрелых периферических ДК в процессе криоконсервации и хранения.
4. Изучить иммунологическую и клиническую эффективность стандартизированных ДК-вакцин.

Научная новизна

В диссертационной работе впервые:

- стандартизированы методы получения ДК-вакцин на основе аутологичных костномозговых и периферических предшественников;
- проведена оценка поствакцинального клеточного и гуморального иммунного ответа у больных диссеминированной меланомой кожи.

Практическая значимость

- Обоснована целесообразность использования стандартизированных ДК-вакцин для лечения больных меланомой кожи.
- Снижена себестоимость получения ДК-вакцин в 5 раз за счет оптимизированного использования ростовых факторов GM-CSF и IL-4 как импортного, так и отечественного производства.
- Адаптированы, оптимизированы и внедрены в клиничко-лабораторную практику ELISpot-анализ и клеточный ИФА.
- Описаны стандартные операционные процедуры (СОП) для всех этапов получения ДК вакцин.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В результате оптимизации процесса дифференцировки ДК *in vitro* установлено: применение ростового фактора GM-CSF (72 нг/мл) отечественного производства (Фармсинтез, Россия) и GM-CSF (72 нг/мл) импортного производства (CellGenix, Германия) обеспечивает получение сопоставимых результатов и приводит к снижению стоимости ДК-вакцин в 5 раз.
2. Оптимальная концентрация IL-4 для дифференцировки ДК находится в пределах от 5 до 20 нг/мл, что снижает производство ДК-вакцин в 3-5 раз.
3. Для получения стандартизированных ДК-вакцин рекомендуется использовать оптимизированную панель моноклональных антител: CD14, CD1a, CD83, CD86, CD80, CCR7, HLA DR, метод проточной цитометрии или иммуноцитохимическое окрашивание, что позволит корректно определить степень зрелости ДК.
4. Критерием контроля качества вакцинных ДК является: жизнеспособность, иммунофенотип незрелых и зрелых опухолеспецифических ДК, высокая функциональная активность, отсутствие в вакцине ксеногенной сыворотки и инфекционных агентов на всех этапах дифференцировки, криоконсервации, разморозки и готовой лекарственной формы аутологичной ДК-вакцины.

Глава 1

Дендритные клетки (ДК) и их роль в противоопухолевом иммунитете (обзор литературы)

Первое упоминание о ДК (клетки с многочисленными отростками, ветвями) относится к 1868 г., когда Пауль Лангерганс впервые обнаружил их в эпидермисе и описал как «дендриты». Однако на тот момент не было сведений относительно их функций, в литературе обсуждался вопрос об их принадлежности к нервной системе.

В 1973 г. американские иммунологи Ральф Стейман и З. Кох обнаружили редкий тип клеток в селезенке мышей, которые обладали способностью индуцировать выраженный иммунный ответ (Steinman R., Cohn Z., 1973, 1975). Эти работы заложили фундамент современных представлений о ДК. Вместе с тем, изучение ДК началось только в 90-е годы XX века.

К наиболее важным достижениям этого периода относят разработку методов получения ДК из моноцитов периферической крови и костномозговых предшественников *in vitro*, что привело к значительному расширению возможности изучения ДК, и открыло эру клинического применения дендритноклеточных вакцин (ДК-вакцин). Среди других достижений этого периода заслуживает внимание изучение различных типов ДК и их дифференцировка, установление роли ДК в регуляции клеточного и гуморального врожденного и адаптивного иммунного ответа, изучение ДК в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний.

1.1. Фенотипическая и функциональная гетерогенность ДК

ДК редко встречаются среди лейкоцитов периферической крови (менее 1%) и обычно демонстрируют сложную фенотипическую и функциональную гетерогенность популяции. Субпопуляции ДК активно исследуются. Установлено, что ДК очень мощные «профессиональные» антиген представляющие клетки (АПК), которые отвечают за захват, обработку и представление антигена Т-клеткам, тем самым запускают первичные и вторичные иммунные реакции (Banchereau J. et al., 2000; Ueno H. et al., 2010; Palucka K, Banchereau J., 2013).

Неоднородность ДК отражается на четырех уровнях: 1) предшественники, 2) анатомическая локализация, 3) функции и 4) конечный результат иммунной реакции (Lin Kah-Wai et al., 2006). В последние несколько лет проводятся попытки классифицировать ДК по разнообразию их фенотипа, функциональному анализу, но до сих пор не установлена полная модель.

ДК широко представлены в организме человека: клетки Лангерганса в эпидермисе, ДК периферической крови, лимфоидной и нелимфоидной ткани, интердигитатные ДК, ДК зародышевого центра лимфатического узла, плазмцитоподобный домен лимфоидной ткани и т.д. (Hart D.N., 1998; Vandenabeele S. et al., 2001; Pletinckx K. et al., 2011; 2013). Обнаружены иммуногенные и толерогенные зрелые и незрелые иммунофенотипы. В тимусе зрелые ДК вызывают толерантность тимоцитов к собственным тканевым антигенам путем негативной селекции. Имеется много исследований по субтипам плазмцитоподобных ДК в лимфоидной ткани мыши и немного исследований по данному типу ДК в тимусе человека. S. Vandenabeele и др. (2001) выделил две популяции ДК в тимусе: более 65% ассоциированы с иммунофенотипом плазмцитоподобных ДК ($CD11b^-CD33^{lo}CD45^{lo}$) и менее 35% отнесены к миелоидным ДК ($CD11b^+CD33^{hi}CD45^{hi}$). В более поздних работах ДК представлены как зрелые и незрелые, $CD11b^-$ продуцирующие IL-12 и $CD11b^+$ не продуцирующие IL-12.

В работах N. Vermare представлены аналогичные результаты, описаны три субпопуляции ДК тимуса: 1) $CD11c^-$ плазмцитоподобные ДК, продуцирующие INF- α ; 2) $CD11c^+$ незрелые миелоидные ДК; и 3) зрелые интердигитатные плазмцитоподобные ДК. Однако L. Wu и соавт. (2005) в результате исследования миндалин человека и зародышевых центров лимфоидной ткани описали пять типов ДК, в т.ч. три интердигитатных подтипа, плазмцитоподобные и ДК зародышевого центра.

Небольшое количество ДК в тканях и органах, трудность выделения способствовали изучению их в условиях *in vitro*. Многие результаты были получены на культурах ДК вне их естественной жизнедеятельности и имеют определенные отличия в зависимости от экспериментальных моделей (Duraisingham S.S. et al., 2010; López-Bravo M. et al., 2013).

Интерес к анатомо-функциональной активности различных подтипов ДК способствовал разделению их на:

- фолликулярные ДК (изучается происхождение);
- лимфоидные ДК (ассоциируют с лимфопозом);
- миелоидные (моноцитопоз) – миелоидные ДК1 и ДК2;
- плазмцитоподобные ДК – основные продуценты интерферона 1-го типа (INF- α , β).

В тоже время многие авторы наиболее часто выделяют два основных типа ДК: 1) $CD11c^+CD123^{lo}$ миелоидные ДК и 2) $CD11c^-CD123^{hi}$ лимфоидные ДК, на основе пути их развития (Robinson S.P. et al., 1999; O'Neill D.W. et al., 2003; Redecke V. et al., 2013). Функционально миелоидные ДК – иммуногены, запускают иммунный ответ; лимфоидные ДК – вызывают иммунологическую толерантность. Однако, T. Ito и соавт. (1999) выделили 3

типа ДК периферической крови: 1) $CD1a^+CD11c^+$ и отнесли их к предшественникам клеток Лангерганса; 2) $CD1a^-CD11c^+$ моноцитарные интерстициальные предшественники; 3) $CD1a^-CD11c^-$ плазмоцитоидные ДК. В более поздних работах А. Dzionek и соавт. (2000), описали новые маркеры для плазмоцитоидных ДК периферической крови: BDCA-1 (CD1c) и BDCA-3 (CD141) среди субпопуляций миелоидного происхождения и BDCA-2 (CD303) и BDCA-4 (CD304), характерные для лимфоидных / плазмацитоидных ДК.

Было показано, что BDCA-1 (CD1c) антиген экспрессируется на субпопуляции ДК человека, которые по морфологическим признакам сходны с моноцитами периферической крови. Эти клетки охарактеризованы как $CD4^+$, Lin^- , $CD11c^{bright}$, $CD123^{dim}$, $CD45RO^+$, $CD2^+$ с выраженной экспрессией миелоидных маркеров ($CD13^+$, $CD33^+$). Кроме того, они экспрессируют Fc рецепторы (CD32, CD64, FcεRI).

BDCA-2⁺ клетки обладают специфичностью и выявляются на лимфоидных (плазмацитоидных) ДК человека в сочетании с экспрессией $CD4^+$, Lin^- , $CD11c^-$, $CD123^{bright}$, $CD45RA^+$, $CD2^-$ без миелоидных компонентов ($CD13^-CD33^-$) и Fc рецепторов. Эти клетки циркулируют в периферической крови и мигрируют в лимфоидные и нелимфоидные ткани (Jähn P.S. et al., 2010).

BDCA-3 антиген экспрессируется на $CD11c^+$, $CD123^-$ миелоидных ДК.

BDCA-4⁺ ДК соответствуют иммунофенотипу лимфоидных / плазмацитоидных ДК с высокой экспрессией $CD123^{hi}$ и отсутствием на клетках $CD11c$ миелоидного антигена.

Вместе с тем в литературе обсуждается характеристика ДК периферической крови по экспрессии других маркеров, таким как CD33, CD16, CD2, CD1, CD85, IL-3Ra, и т.д. К.Р. MacDonald и соавт. (2002) использовали широкий спектр моноклональных антител (MoAb) и выделили пять неперекрывающихся подтипов ДК периферической крови с различным уровнем экспрессии CD123, CD1b/c, CD16, BDCA-3 и CD34 антигенов. Несомненно, это исследование увеличило специфику и расширило классификацию ДК периферической крови, однако, их функции и этап развития не были определены.

В результате многочисленных исследований и детализации иммунофенотипа различных типов и субтипов ДК, миелоидный путь развития ДК не вызывает сомнения. Периферические $CD14^+$ моноциты являются общим предшественником для макрофагов и ДК, в том числе полученных в экспериментах *in vitro*. На их основе изучается противоопухолевый иммунитет, и разрабатываются противоопухолевые вакцины.

1.2. Миелоидные ДК: иммунофенотип и функциональная активность

Миелоидные ДК происходят из клеток-предшественников костного мозга, циркулируют в периферической крови, мигрируют в ткани и дифференцируются в незрелые

ДК. При распознавании чужеродных антигенов созревающие ДК мигрируют в лимфоидные органы, секретируют цитокины и инициируют иммунный ответ (McLellan AD, Kämpgen E., 2000; Steinbrink K., 2009). Миелоидные ДК обладают выраженной антиген представляющей функцией, играют решающую роль в активации врожденного и адаптивного иммунного ответа, стимулируют Т-, НК и В-клетки, но могут регулировать нарушения в активации иммунного ответа, способствовать развитию толерантности и, таким образом, предотвращать аутоиммунные заболевания.

Миелоидные ДК экспрессируют высокий уровень МНС (МНС от англ. *Major Histocompatibility Complex*) молекул главного комплекса гистосовместимости, ко-стимулирующие молекулы (CD40, CD80, CD86) и адгезионные молекулы (CD11a, CD15s, CD18, CD29, CD44, CD49d, CD50, CD54), которые необходимы для образования иммунологического синапса и наиболее полной активации Т-лимфоцитов (Lin Kah-Wai et al., 2006; 2010). На ДК периферической крови не выявляются линейноспецифические антигены, но их распознают по высокой экспрессии МНС II класса (HLA DR^{hi}) антигенов и отсутствию клональных маркеров, таких как CD8, TCR (Т-клеточного рецептора) и Т-клеточного линейного маркера CD90; В-клеточных антигенов CD10 и CD20; линейного маркера CD56 для НК-клеток; моноцитарного антигена CD14; гранулоцитарной клеточной линии с экспрессией CD15 и CD35 и гликофорина для эритроидной линии (Olweus J. et al., 1997; Takeuchi S, Furue M., 2007). Циркулирующие ДК периферической крови могут быть или ДК-предшественниками, мигрирующими из костного мозга в периферические ткани, или созревающими ДК, нагруженными антигеном на пути в периферические лимфоидные органы (Romo L.F. et al., 2001; Xin H.M. et al., 2009).

М.В. Lutz и G. Schuler (2002) предложили выделять промежуточную группу ДК, полузрелую, толерогенную, на клетках которой обнаруживается высокий уровень МНС II и ко-стимулирующих молекул, но в отличие от зрелых ДК, полузрелые формы характеризуются низким уровнем продукции ИЛ-1 β , ИЛ-6, TNF- α и ИЛ-12. Частичное созревание ДК в результате положительной регуляции МНС и ко-стимулирующих молекул, встреча с Т-клетками в их анатомических Т-зависимых зонах лимфатических узлов способствовала укреплению термина «полузрелые» ДК. В исследованиях К.Н. Mills и Р. VcGuirk (2004), D. Braun и соавт. (2006), G. Frick и соавт. (2010), Р.А. Morel и М.С. Turner (2011) убедительно показана толерогенная направленность иммунного ответа «полузрелыми» формами миелоидных ДК.

Кроме того, показаны количественные различия в экспрессии генов в «полузрелых» и «зрелых» ДК. К. Pletinckx и соавт. (2011) сравнили экспрессию генов в «полузрелых» ДК (TNF) с полностью зрелыми ДК под воздействием липополисахарида (LPS). Авторы

получили, главным образом, количественные различия между этими формами. Общим оказалась экспрессия только 24 генов провоспалительных цитокинов, характерных для «полузрелых» ДК от почти 5000 генов, регулируемых LPS в зрелых ДК (Pletinckx K. et al., 2011; 2013).

1.3. Миелоидные ДК и противоопухолевый иммунный ответ

Эффективность противоопухолевого иммунного ответа определяется балансом Th1/Th2 лимфоцитов (Th – Т хелперы 1-го и 2-го типа) и продуцируемых ими цитокинов. ДК стимулируют образование Th1 и Th2 клеток в результате регуляции отрицательной обратной связи. Th1 лимфоциты продуцируют интерферон-гамма (INF- γ), поддерживают активность ДК1 и клеточный тип иммунного ответа; Th2 продуцируют IL-4, угнетают функциональную активность предшественников ДК в инициации образования Th2 клеток и гуморального типа иммунного ответа. Таким образом, хотя IL-4 стимулирует дифференцировку наивных Т-клеток в Th2, его влияние не связывают со стимуляцией образования Th2 и ДК2 АПК. Высокая экспрессия костимулирующих сигналов CD80 и CD86 на зрелых ДК одновременно с распознаванием Т-клеточным рецептором иммуногенного пептидного фрагмента антигена в контексте МНС молекул на ДК, секреция ДК IL-12, стимулирующего Т-клеточные реакции, в частности дифференцировку клеток Th1 и продукцией ими IFN- γ и других воспалительных цитокинов.

Иммунная система обладает выраженной способностью элиминировать опухолевые клетки. На мышинных экспериментальных моделях показано, что генерация защитного противоопухолевого иммунитета зависит от презентации опухолеассоциированных антигенов (ОАА) ДК.

Процесс распознавания ОАА незрелыми дендритными клетками происходит на основе рецепторного аппарата (Fc-рецепторы, С-лектины, Toll-подобные рецепторы (TLR), рецепторы для компонентов комплимента и др.). На миелоидных ДК наиболее полно представлены С-лектины и TLR. В функциональной активности ДК важное значение имеют рецепторы лектинового типа (DEC-205 или CD205, макрофагальный маннозный рецептор или CD206, лангерин или CD207, DC-SIGN или CD209). С-лектины - это трансмембранные белковые молекулы, взаимодействующие со специфическими углеводсодержащими структурами ОАА и играющие ключевую роль в осуществлении межклеточных контактов. Важной особенностью DC-SIGN (CD209) рецептора является его способность связываться с молекулой межклеточной адгезии ICAM-3 – лигандом β_2 – интегринов, что определяет его участие в процессах сосудистого роллинга и миграции миелоидных предшественников дендритных клеток из кровотока в ткани. DC-SIGN: DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin

(специфичный для дендритных клеток ICAM-3-связывающий неинтегрин) (Svajger U et al., 2010; Garcia-Vallejo J.J. et al., 2013). Присутствие С-лектиновых молекул на поверхности дендритных клеток дает им возможность, в отличие от многих других клеток организма, осуществлять большую работу по эндоцитозу. Созревание ДК сопровождается быстрым снижением поверхностной экспрессии рецепторов к воспалительным хемокинам, а вместо них экспрессируются рецепторы хемокинов, направляющих клетки в лимфатические узлы. Важную роль среди этих рецепторов отводят CCR7 – рецептору к лимфоидным (конституциональным) хемокинам CCL19 и CCL21. Кроме того, сами ДК продуцируют CCL19, который привлекает наивные Т-лимфоциты в непосредственную близость к ДК для презентации антигенов.

Антигены, поступившие экзогенным (эндосомальным) и эндогенным (протеосомальным) путем презентуются в составе молекул главного комплекса гистосовместимости МНС (от англ. *Major Histocompatibility Complex*), которые распознают в антигенах определенные последовательности аминокислот, более короткие, чем те, которые распознаются Т-клеточными рецепторами (Говалло В.И., 1971; Петров Р.В., 1976; Воробьев А.А., 1982; Зарцкая Ю.М., 1983; Alajez N.M. et al., 2005; Deng L. et al., 2007).

Между антигенпрезентирующей ДК и антигенспецифическим Т-лимфоцитом образуется иммунный синапс – сложный комплекс молекул адгезии, антигенпредставления и коstimуляции, в котором происходит обмен информации между двумя клетками (рис. 1).

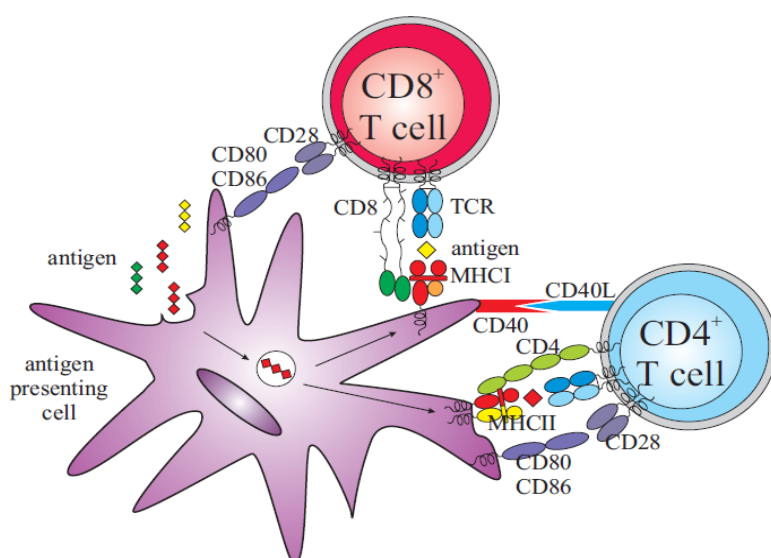


Рис.1. Взаимодействие CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцита с антигенпрезентирующей клеткой (ДК).

В процессе активации Т-клеток и образовании иммунологического синапса, наряду с CD3- и CD28-молекулами, важную роль отводят рецептору трансферрина (CD71), который в

исследованиях А. Batista и соавт. (2004) снижал межклеточную кооперацию Т-лимфоцитов и АПК в присутствии специфических анти-CD71 моноклональных антител (МКА).

1.4. Миелоидные ДК и противоопухолевая вакциноterapia

По современным представлениям, снижение противоопухолевого иммунобиологического надзора при развитии опухоли связано с нарушением функции периферических ДК (Diao J. et al., 2010). Эти дефекты обусловлены, прежде всего, снижением экспрессии молекул I и II класса главного комплекса гистосовместимости (МНС), ответственного за презентацию ОАА, и костимулирующих молекул CD80 и CD86, регулирующих активность Т-лимфоцитов (Syme R. et al., 2005; Amigorena S., Savina A., 2010). Существует предположение, что это связано с факторами, продуцируемыми опухолевыми клетками. Действительно, в эксперименте получены данные, свидетельствующие о том, что развитие опухоли у экспериментальных животных приводит к нарушению созревания ДК, снижению экспрессии молекул МНС II класса на их поверхности (Kim R. et al., 2006; Tourkova I.L. et al., 2007). При этом вакцинация мышей ДК, выращенных из костномозговых предшественников *ex vivo*, тормозит рост опухоли, а введение зрелых ДК из селезенки, не оказывает на него влияния. Было также показано, что супернатант опухолевых клеток снижает способность ДК контролировать цитотоксическую функцию аллогенных Т-клеток, только в том случае, когда с ними инкубировали созревающие ДК, полученные из костного мозга, а не зрелые клетки, полученные из селезенки экспериментального животного с опухолью (Gabrilovich D.I., Hurlwitz A., 2008).

При изучении функциональной активности ДК у больных с диссеминированной карциномой молочной железы было показано, что зрелые ДК этих больных не способны стимулировать цитотоксичность Т-клеток, в то время как способность Т-лимфоцитов подвергаться аллогенной стимуляции не была нарушена. При этом ДК, дифференцированные в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина-4 (IL-4) из костномозговых предшественников этих же больных, демонстрировали нормальный уровень функциональной активности или очень высокий при стимуляции специфическими ОАА, в том числе аутологичными опухолевыми клетками в апоптозе (Allan C.P. et al., 2004).

Положение о том, что прогрессирующе растущая опухоль является следствием иммунологической недостаточности и что своевременная коррекция такой недостаточности может обеспечить контроль над опухолевым ростом, открывает реальные перспективы эффективной иммунотерапии при злокачественных опухолях у человека. Учитывая центральную роль ДК и CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в противоопухолевом

иммунном ответе в организме, наиболее подходящими для этой цели могут оказаться вакцины на основе ДК пациента с генетически индивидуальной опухолью (Bergman P.J., 2007; 2010; Kawakami Y. et al., 2008).

Правила безопасности требуют, чтобы новые иммунотерапевтические методы изучались у пациентов с распространенным опухолевым процессом, устойчивых к стандартным методам лечения или в случае их отсутствия. Эти исследования определяют токсичность, иммунологическую и клиническую эффективность. Однако даже самый оптимальный иммунный ответ, в конечном счете, может не преодолеть опухолевую прогрессию. Поэтому важным является проведение безопасных исследований у пациентов с наименьшим распространением опухолевого процесса, у которых реально можно оценить клиническую и иммунологическую эффективность, разработать дальнейшую тактику использования противоопухолевых вакцин.

Трудным аспектом иммунологических протоколов является идентификация иммунологических маркеров, которые коррелируют с клинической эффективностью. В настоящее время для исследования поствакцинального иммунного ответа используют оценку «bystander effect» (эффект свидетеля) в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) *in vivo*, ELISpot-тест, тетрамерный анализ *in vitro*. Реакция ГЗТ развивается через 24 ч в месте введения опухолевых антигенов или зрелых ДК, вследствие инфильтрации кожи Т-хелперами, ЦТЛ, специфичными к антигену, представленному местными АПК, секретирующие цитокины, повышающие сосудистую проницаемость и привлекающие другие клетки воспаления (Janeway C. et al., 2011). Иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами CD1a, CD3, CD4, CD8, CD14, CD20, CD83, CD86 кожных биоптатов реакции ГЗТ позволяет выявлять привлечение активированных ДК, ЦТЛ, В-лимфоцитов, макрофагов, Т-хелперов (de Vries I.J et al., 2005).

Изучение продукции цитокинов (IFN- γ , Gr- β , IL-4, TNF- α) опухоль-специфическими Т-лимфоцитами в ELISpot-тесте, визуализация активированных Т-лимфоцитов при помощи проточного цитофлюориметрического анализа с использованием меченного комплекса пептид-МНС, который специфично связывается с Т-клеточным рецептором лимфоцита и реакция гиперчувствительности замедленного типа, далеко не всегда сопровождается регрессом опухоли. Отсутствие такой корреляции между иммунологической и клинической эффективностью иммунотерапии (в том числе вакцинотерапии) даже при достижении «bystander effect's» является одной из нерешенных проблем биотерапии злокачественных опухолей.

Показателем эффективности является объективный клинический ответ, безрецидивная выживаемость и время до прогрессирования, но для этого требуется достаточно много времени. Поэтому возникает необходимость в поиске «суррогатных маркеров», коррелирующих с клинической эффективностью.

Прогрессу вакцинации против инфекционных болезней способствовало определение уровня антител как «суррогатных маркеров», видимо, прогресс вакцинации против рака может быть связан с углубленным изучением «суррогатных маркеров» Т-клеточных реакций вакцинированных лиц. Кроме того, клиническая оценка эффективности вакцинотерапии злокачественных опухолей еще недостаточно изучена и нуждается в разработке критериев включения и исключения в исследование, большей градации в оценке клинического эффекта. Например, увеличение времени до прогрессирования у ряда пациентов с IV стадией меланомы кожи может быть менее претенциозным, но более существенным клиническим признаком, чем совсем небольшое число пациентов с полным регрессом опухоли.

Кроме того, еще остаются неизученными механизмы, способствующие разрушению опухоли у пациентов с полным объективным ответом. Т-клетки некоторых пациентов не могут развивать адекватный иммунный ответ на сложные опухолеассоциированные антигены *in vivo*. Однако эксперименты *in vitro* демонстрируют, что Т-клетки большинства пациентов отвечают на индукцию сложных меланомаассоциированных антигенов и дифференцируются в ЦТЛ. В то же время, даже если Т-клетки отвечают *in vivo*, у пациентов с прогрессированием заболевания опухолевое микроокружение может увеличить агрессивность и способствовать элиминации опухоль-специфических Т-клеток *in situ* (Mantovani A. et al., 2008). Ответом на этот вопрос может быть дальнейшее изучение CD4⁺ Т-клеточного иммунитета. Не исключено, что у пациентов с прогрессирующим опухолевым ростом могут быть нарушения в системе CD4⁺ Т-клеток, которые влияют на индукцию антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток. В противоположность этому, прогрессия опухоли может быть ассоциирована с регуляторными клетками, такими как NKT- или Tr1-клетки (Zhang C. et al., 2006; Terabe M., Berzofsky J.A., 2007). Предполагается, что эти иммунокомпетентные клетки регулируются различными субпопуляциями ДК (Ullrich E. et al., 2008). Поэтому крайне важно изучение генерации субпопуляций ДК с различными линейными признаками (миелоидные, плазмцитойдные), полученных из моноцитов в присутствии GM-CSF, IL-4, IL-6, IFN- α или выращенных из костномозговых предшественников в присутствии GM-CSF.

Вместе с тем, ДК, генерированные *ex vivo* как вакцина с помощью различных методов, представляют собой различные клеточные популяции, и это, несомненно, затрудняет оценку клинической и иммунологической эффективности ДК-вакцины (Guida M., Colucci G., 2007; Kochenderfer J.N., Gress R.E., 2007; Kawakami Y. et al., 2008). Прогресс в области эффективного клинического использования ДК требует стандартизации апробированных методов с целью дальнейшего изучения у больных с максимальным уменьшением объема опухолевой массы (циторедуктивные операции), минимальной остаточной болезнью, достаточной иммунокомпетентностью.

1.5. Требования надлежащей лабораторной практики (GLP) в получении противоопухолевых дендритноклеточных вакцин

По данным отраслевой целевой программы «Создание биомедицинской платформы злокачественных новообразований», представленной на рассмотрение Департаментом инновационной политики и науки Минздравсоцразвития РФ в июле 2011 года, в настоящее время в России не развита полноценная инфраструктура и кадровое обеспечение, отвечающее требованиям GLP для проведения крупномасштабных биомедицинских НИР. Разработка системных подходов в области создания банков биологического материала для онкологических исследований является задачей международного уровня. Нестандартизованная работа научных и клинических лабораторий является серьезным препятствием для совместного проведения научных исследований с зарубежными научными центрами и затрудняет обобщение современных достижений. Переход российских доклинических и клинических исследований на международные стандарты GLP и GCP (*good clinical practice*) диктует необходимость разработки стандартов.

Сложность системы ДК требует исключительной ответственности и осторожности при манипуляции с этими клетками, а расширяющееся использование вакцин на основе аутологичных ДК - стандартизации методов получения, активации, введения, клинической и иммунологической оценки (разработки методических рекомендаций и оформление стандартных операционных процедур (СОПов).

Правила надлежащей лабораторной практики распространяются на работу фармакологических, токсикологических и других лабораторий биологического профиля и имеют целью обеспечение приемлемости научных исследований на этапе доклинического изучения новых препаратов. Требования GLP регламентируют весь «жизненный цикл» лекарственного средства: изготовление, изучение и контроль качества, лечебное применение. Все три этапа правильной практики необходимо рассматривать, как единый механизм достижения эффективности системы качества.

Важность разработки СОПов подчеркивается и в документах, определяющих требования к качественной клинической практике (GCP), там это обусловлено целью добиться наибольшей достоверности получаемой информации путем ее унификации и формализации.

В настоящее время в мире проводятся значительные количества клинических исследований вакцин на основе дендритных клеток для лечения различных онкологических нозологий и накоплен достаточный опыт по клинической и иммунологической эффективности, чтобы считать ДК-вакцинотерапию перспективным и достойным дальнейшего изучения методом. Однако, результаты клинических исследований противоречивы, возможно из-за отсутствия стандартизированных протоколов получения вакцин на основе аутологичных ДК. Процесс приготовления вакцин на основе ДК состоит из нескольких этапов, что требует разработать критерии оценки контроля качества препарата ДК, в основу которого будет заложен контроль: получения предшественников ДК, дифференцировки ДК *in vitro*, жизнеспособности ДК, иммунофенотипических характеристик вакцинных ДК, стерильность вакцинного препарата и др.

Характеристика гемопоэтических предшественников дендритных клеток (ДК) при получении их из стимулированного гранулоцитарно-колониестимулирующим фактором (Г-КСФ) и нестимулированного свежевыделенного или криоконсервированного лейкофезного материала или периферической крови больных злокачественными опухолями требует научно-обоснованного изучения уровня экспрессии миелоидных дифференцировочных антигенов, отражающих степень зрелости (качества) клеточного субпродукта (Papatriantafyllou M., 2011; Wong K.L. et al., 2011).

Большинство классических антигенпрезентирующих клеток (АПК), включая макрофаги, клетки Лангерганса, интрадигитатные и дендритные клетки, присутствуют в организме уже при рождении (Lijima N. et al., 2007; Bordon Y., 2011). По всей вероятности, основная их масса образуется из стволовых клеток костного мозга. Возможно, они происходят из одной и той же колониеобразующей единицы гранулоцитов, эритроцитов, мегакариоцитов, макрофагов (КОЭ-ГЭММ), дающей начало всем клеткам рядов дифференцировки гемопоэтической стволовой клетки (ГСК), за исключением клеток лимфоидного ряда. Другая возможность состоит в том, что АПК образуются из разных стволовых клеток и по разным направлениям дифференцировки (Ziegler-Heitbrock L. et al., 2010; Senju S. et al., 2011).

Однонаправленная дифференцировка стволовых клеток в моноциты или ДК обусловлена появлением у них на разной стадии развития рецепторов для специфических факторов роста и дифференцировки (Bordon Y., 2010; Dorshking K., 2010). По мере

созревания в их цитоплазме и на поверхности появляются и исчезают маркеры дифференцировки, увеличивается экспрессия молекул МНС II класса. Наиболее важная роль отводится экспрессии CD34, CD33, CD14, CD11 и HLA-DR антигенам, участвующих в созревании и активации миелоидных предшественников ДК, формировании врожденного иммунитета (Ярилин А.А., 2010; Clanchy F.I. et al., 2006; Gorczyca W. et al., 2011).

В связи с этим, актуальным становится разработка лабораторной методики оценки и контроля качества экспрессии вышеперечисленных антигенов в свежевыделенном, криоконсервированном или криоконцентрированном лейкоцитарном материале больных злокачественными опухолями.

Изучение дифференцировки дендритных клеток (ДК) из миелоидных предшественников аферезного материала и периферической крови *ex vivo* с использованием различных питательных сред, сывороток, ростовых факторов и факторов дифференцировки для создания противоопухолевых вакцин становится важной стратегической задачей, и действия по ее реализации представляют исследования условий инкубации/культивирования моноцитов *in vitro* (среды, ростовые факторы, опухолевые антигены) (Cheryl L-L. Chiang. et al., 2011). Наблюдения за изменением формы, миграцией, экспрессией линейноспецифических и дифференцировочных антигенов с использованием инновационных подходов позволят определить оптимальные условия культивирования моноцитов, созревание вакцинных ДК, что приведет к снижению затрат при их производстве.

При получении терапевтических ДК-вакцин важную роль играют ростовые факторы, выбор которых для каждой лекарственной формы ДК (зрелые, незрелые, иммуногенные, толерогенные) основан на оценке иммунобиологических и технологических характеристик, изучении их влияния на эффективность, безопасность и стабильность лекарственной формы. Большое число ДК может быть получено *in vitro* в присутствии соответствующих цитокинов из адгезивной мононуклеарной фракции периферической крови или CD-34+ предшественников. Чаще всего в клинических исследованиях используют протокол получения ДК путем дифференцировки моноцитов периферической крови в присутствии GM-CSF и IL-4 в течение 5-7 дней (незрелые ДК) с последующей стимуляцией их созревания в течение 48 часов с различными ростовыми факторами (зрелые ДК) (Turner B. et al., 1999; Hettihewa L. M. et al., 2011). Для полного созревания к незрелым дендритным клеткам добавляют индукторы дифференцировки. На сегодняшний день известно довольно много ростовых факторов вызывающих дифференцировку дендритных клеток: CD40 - лиганд, кондиционированная среда моноцитов, липополисахарид и др. В экспериментальной и клинической практике часто используют фактор некроза опухоли- α (TNF- α),

интерлейкина-6 (IL-6) и простагландин E (ПГЕ₂) (Dieckmann D. et al., 2005). Между тем было показано, что для дифференцировки дендритных клеток достаточно присутствие только ФНОα и ПГЕ₂ (Cella M. et al., 1997; Ridolfi R. et al., 2004). Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) гликопротеин, гемопоэтический ростовой фактор, который регулирует образование функционирование иммунокомпетентных клеток: дендритных клеток, макрофагов, гранулоцитов. *In vitro* GM-CSF используется для увеличения выхода незрелых ДК из моноцитов периферической крови человека. В 1990 г. Koch F. и соавторы впервые продемонстрировали образование клеток с фенотипическими и функциональными свойствами, типичными для ДК, из гемопоэтических предшественников CD34⁺ с использованием GM-CSF и TNF-α (Mukherji B. et al., 1997). Кроме того, по данным различных авторов используют широкий спектр ростовых факторов для дифференцировки и созревания ДК (Zou G.M., Tam Y.K., 2002). Такие цитокины как IL-2, IL-6, IL-7, IL-13 (Piemonti L. et al., 1995; Lopez M. et al., 1997), IL-15 и фактор роста гепатоцитов (Ovali E. et al., 2000) в комбинации или отдельно могут способствовать дифференцировки ДК из моноцитов или CD34⁺ клеток. Особый интерес представляют данными об ускоренном созревании ДК в присутствии интерферона-альфа (IFN-α) (Korthals M. et al., 2007). IFN-α острофазный провосполительный цитокин является главным сигналом для дифференцировки и созревания ДК, *in vitro* обеспечивает быструю дифференцировку моноцитов крови, предварительно культивируемых в среде с GM-CSF (Banchereau J., et al. 2001; Felzmann T. et al. 2005; Xia CQ. et al. 2007; Dudek A.M. et al. 2013). Для дифференцировки ДК из моноцитов периферической крови чаще используют GM-CSF в сочетании с IL-4 и их синергизм в индукции созревания (Justin A. et al., 2005; Hettihewa L.M., 2011). ИЛ-4 участвует в развитии костномозговых клеток-предшественников. Один ИЛ-4 не изменяет интенсивность пролиферации этих клеток, но усиливает митотические процессы в сочетании с другими ростовыми факторами. ИЛ-4 в сочетании с GM-CSF обеспечивает более активное размножение клеток гранулоцитарного и моноцитарного ростков дифференцировки. При этом используются различные концентрации IL-4 и GM-CSF без достаточно обоснованной аргументации, что свидетельствует о различном диапазоне их активности. Использование широкого спектра ростовых факторов для дифференцировки ДК может приводить к получению разнообразных по фенотипам и функциям субпопуляций ДК.

Активация ДК. В поиске эффективных вакцин предложены разнообразные методы активации антигенпрезентирующих клеток (АПК) с целью преодоления иммунологической толерантности. Основными из этих методов являются:

- а) использование вирусных, бактериальных векторов;

- б) активация ДК синтетическими белками или пептидами, для этого необходимо проводить HLA-типирование больных, так как пептидные последовательности могут взаимодействовать только с соответствующими аллельными формами МНС;
- в) нагрузка ДК опухолевыми антигенами (сокультивирование с опухолевыми клетками или их лизатами) (Somersan S. et al., 2001; Brusa D. et al., 2008);
- г) трансфекция ДК с использованием ДНК или РНК (Palena C. et al., 2006).

Созревание ДК означает изменение функции клетки с захвата, фиксации и переработки антигена на антигенпрезентацию. Зрелые ДК превращают антиген в иммуногенную форму, экспрессируют необходимые цитокины и костимулирующие молекулы, обеспечивая, таким образом, инициацию специфического приобретенного иммунитета. Достаточно сложная методика получения и манипуляций с ДК требует не только использования дорогого оборудования, реактивов, трудоемких методов производства, высококвалифицированного персонала, но и, контроля и стандартизации. Кроме того, требуется разработка критериев и параметров стандартизации как компонентов, применяемых в производстве вакцины, так и зрелых ДК

Разработка требований по хранению препарата дендритных клеток (ДК) имеет исключительно важное значение для широкого внедрения в лечебную практику противоопухолевых ДК вакцин. Реализация методов криоконсервации ДК вакцин стала возможной благодаря теоретическим разработкам проблем криобиологии, а также техническому прогрессу в области создания специальной аппаратуры для замораживания и хранения клеток и тканей при низкой и ультранизкой температуре (Нео Y.J. et al., 2009; Buhl T. et al., 2012). В результате фундаментальных исследований и разработки теоретических основ криоконсервирования вакцинных ДК, изучения реакций живых клеток на воздействие ультранизких температур, экспрессию поверхностных антигенов и продукцию цитокинов, были разработаны методы защиты клеток от повреждающего действия замораживания, изучены возможности осуществления обратимости жизнедеятельности замороженных ДК, выявлены оптимальные криозащитные среды, разработаны способы криоконсервации, которые диктуют необходимость разработки требований по хранению препарата ДК (Nicolette C.A. et al., 2007; Butterfield L.H., 2013).

Суммируя приведенные данные литературы, можно сделать следующее заключение. Во-первых, данные о взаимодействии опухоли с Т-лимфоцитами, НК-клетками, макрофагами, ДК достаточно разноречивы. В отличие от ранних работ, в которых состоянию этих клеток отводилась ведущая роль в противоопухолевом иммунитете, в работах последних лет более пристально изучаются возможные воздействия на иммунную систему с

помощью специфических противоопухолевых вакцин. Во-вторых, эффективность неспецифической противоопухолевой иммунотерапии, как одного из методов лечения злокачественного образования, рассматривается уже не только с точки зрения непосредственных цитотоксических эффектов, но и с учетом иммуномодулирующих эффектов адъюванта антигенспецифических противоопухолевых вакцин. Выраженность таких эффектов зависит от многих параметров, характеризующих и сам вакцинный препарат, и клиничко-биологические свойства опухоли, и состояние иммунной системы пациента с опухолью. Пока очевидно лишь, что различные иммунокомпетентные клетки неоднозначно реагируют на одни и те же вакцины, что, вероятно, и определяет иммуномодулирующие эффекты. Это может найти отражение в количестве иммунокомпетентных клеток и их отдельных субпопуляций, в уровне функциональной активности. Поэтому наблюдение за различными иммунокомпетентными клетками при проведении вакцинотерапии представляется актуальным и практически значимым.

Кроме того, следует выделить отсутствие в доступной литературе сведений об особенностях иммунитета у больных с солидными опухолями в связи с приготовлением аутологичных вакцин на основе дендритных клеток, наряду с биологическими особенностями опухоли, может определить их взаимоотношение, клиническое течение заболевания и прогноз.

Наконец, следует отметить неизученную проблему получения оптимального количества, выращивания и активации в соответствующих условиях *in vitro* ДК, которые становятся важным стратегическим направлением развития противоопухолевой иммунотерапии.

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1. Материалы

В соответствии с задачами исследования работа была разделена на 2 части: лабораторная и клиническая.

В исследование включено 42 больных меланомой кожи, получавших лечение в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2008 по 2013 г. (9 больных меланомой кожи III стадии и 33 больных – IV стадии). Произведена оценка иммунологической и клинической эффективности: 1) вакцины на основе зрелых периферических дендритных клеток (ДКВ) у 28 больных с гистологически верифицированным диагнозом меланомы кожи, 13 мужчин и 15 женщин, средний возраст больных составил 53,7 (от 24 до 74 лет); 2) вакцины на основе незрелых костномозговых ДК с фотодинамической терапией (ФДК-вакцинотерапия) у 14 больных, 11 мужчин и 3 женщины, средний возраст пациентов составил 46 лет (от 25 до 64 лет). От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования. Объектом исследования были образцы биологического материала, изученные в ходе всех этапов проведения исследования (рис. 2): 1) мононуклеары (МНК) периферической крови (146 образцов); 2) МНК лейкоцитарного материала (18 образцов); 3) незрелые костномозговые ДК (134 образца); 4) незрелые ДК периферической крови (125 образцов); 5) образцы аутологичной опухоли; 6) аллогенные клеточные линии меланомы кожи человека, полученные в лаборатории иммунотерапии опухолей отдела терапевтической онкологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, депонированные во Всероссийской Коллекции клеточных культур позвоночных (НИИ цитологии РАН) (4 клеточные линии); 6) зрелые вакцинные ДК (226 образцов); 7) сыворотка и плазма периферической крови (96 образцов). Образцы МНК периферической крови доноров-контрольная группа (36 образцов).

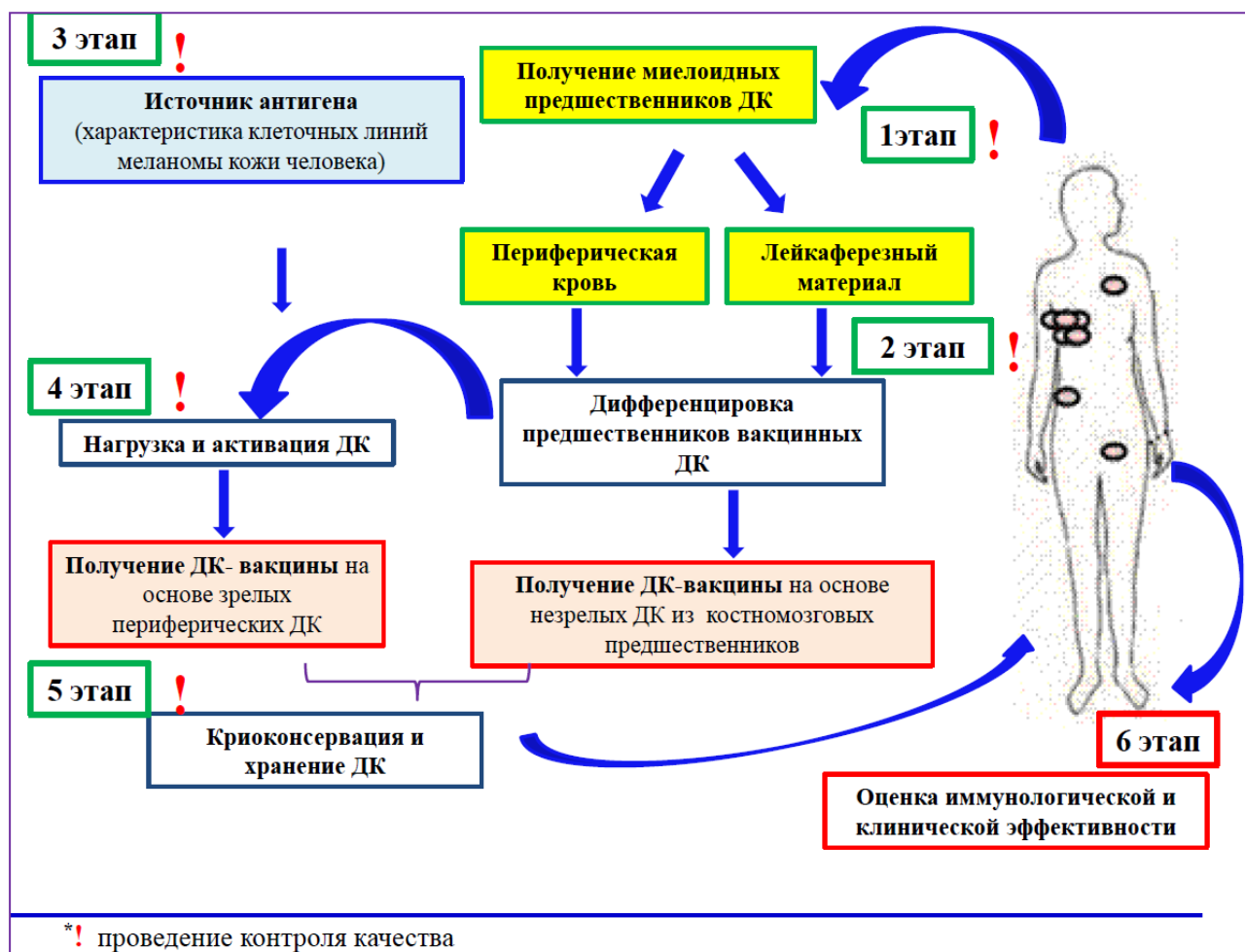


Рис. 2. Схема получения вакцины на основе дендритных клеток.

Характеристика пациентов, получавших противоопухолевую вакцинотерапию на основе миелоидных дендритных клеток

Для отбора больных использовали общепринятые в клинической практике критерии включения и невключения.

Критерии включения в исследование:

- возраст ≥ 18 лет;
- морфологически подтвержденный диагноз диссеминированной меланомы кожи;
- проведение ранее стандартной лекарственной терапии (для больных IV стадии);
- наличие поверхностных опухолевых очагов, доступных для лазерного облучения, размер которых достаточен для введения 1 мл ДК-вакцин (для ФДК);
- ECOG оценка 0 – 1;

- адекватная сердечная функция (\leq XCH II ФК класс по NYHA), гипертоническая болезнь \leq II стадии или артериальная гипертензия \leq 2 степени;
- адекватная гемопоэтическая функция: абсолютное содержание нейтрофилов (ANC) $\geq 1,5 \times 10^9$ /л; тромбоциты $\geq 100 \times 10^9$ /л; уровень гемоглобина ≥ 90 г/л;
- адекватная функция печени (отсутствие повышения трансаминаз и билирубина более 1 ст. (NCICTCAE v4.0), за исключением пациентов с метастатическим поражением печени у которых допустима 2 ст. повышения указанных показателей);
- адекватная функция почек: креатинин в периферической крови ≤ 115 мкмоль/л или клиренс более 50 мл/мин;
- согласие пациенток применять надежные методы контрацепции на протяжении всего исследования;
- наличие добровольно подписанного пациентом информированного согласия на использование медицинской технологии.

Критерии невключения в исследование:

- наличие метастазов в головном мозге или его оболочках (за исключением больных после стереотаксической лучевой терапии);
- вторичный (приобретенный) иммунодефицит (по клинико-лабораторным данным), включая заболевания, приводящие к иммунодефициту, в т.ч. системное использование кортикостероидов или других иммуносупрессивных препаратов;
- неконтролируемое инфекционное заболевание или другое тяжелое сопутствующее заболевание;
- состояния, которые, по мнению исследователя, могут привести к невыполнению процедур исследования или риску НЯ в ходе исследования чрезмерным;
- несоблюдение больным процедур исследования или наличие препятствий к их соблюдению;
- беременность и лактация;
- участие в любом клиническом исследовании лекарственного или иммунобиологического препарата;
- аллергическая реакция на компоненты терапии.

Все пациенты произвольным образом включались в когорты, получавшие один из изучаемых методов терапии. Схема исследования представлена на рис. 3.



Рис. 3. Схема проведения исследования.

Характеристика пациентов, получавших противоопухолевую вакцинотерапию на основе миелоидных дендритных клеток представлена в табл. 1. Перед началом вакцинотерапии все пациенты подвергались хирургическому лечению. 7 пациентов (25 %) получили химиотерапию дакарбазином, 13 (46%) – иммунотерапию интерфероном- α , 1 пациенту (4%) проводилась лучевая терапия. Все пациенты прошли комплексное обследование: стандартные клинические, лучевые и лабораторные методы исследования.

Таблица 1. Характеристика пациентов, получавших противоопухолевую вакцинотерапию на основе миелоидных дендритных клеток

Характеристика	Количество пациентов				
	ДКВ			ФДК	Всего
	лечебная	адьювантная	Всего	лечебная	
Всего больных	19	9	28	14	42
Пол:					
мужчины	11 (55%)	2 (22%)	13 (46%)	11 (79%)	24 (57%)
женщины	8 (45%)	7 (78%)	15 (54%)	3 (21%)	18 (43%)

Характеристика	Количество пациентов				
	ДКВ			ФДК	Всего
	лечебная	адьювантная	Всего	лечебная	
Всего больных	19	9	28	14	42
Средний возраст, годы (диапазон)	51,8 (24-74)	58,4 (47-62)	53,7 (24-74)	46 (25-64)	
Предшествующее лечение:					
• хирургическое	17 (89%)	9 (100%)	26 (93%)	14 (100%)	40 (95%)
• химиотерапия	7 (36%)	0	7 (25%)	3 (21%)	10 (24%)
• иммунотерапия	12 (63%)	1 (11%)	13(46%)	6 (42 %)	19 (45%)
• лучевая терапия	1 (5%)	0	1 (4%)	2 (14%)	3 (7%)
Локализация метастазов до начала терапии					
• нет	0	9	9	0	9
• лимфатические узлы	5	0	5	11	16
• кожа и мягкие ткани	13	0	13	11	24
• кости	1	0	1	2	3
• легкие	2	0	2	6	8
• надпочечники	5	0	5	0	5
• печень	2	0	2	4	6
• селезенка	3	0	3	0	3
• головной мозг	0	0	0	1	1
• прочие органы	1	0	1	1	2
Стадия заболевания					
• IIВ	0	4	4	0	4
• IIIС	0	7	7	0	7
• IVА	8	0	8	4	12
• IVВ	4	0	4	2	6
• IVС	5	0	5	8	11

Как видно из таблицы, вакциноterapia проводилась у больных из групп с неблагоприятным прогнозом: более половины пролеченных пациентов, получавших адьювантную иммунотерапию имели IIIС стадию. У 59% больных, получавших лечебную вакциноterapia во 2-й и последующих линиях лечения наблюдалось метастатическое поражение внутренних органов.

Больным, получавшим ДКВ, проводили забор крови перед каждой нечетной вакциной. После получения стандартизированного препарата производили введение аутологичных зрелых ДК внутрикожно паравертебрально в 4 точки. Вакцину вводили внутрикожно паравертебрально в дозе 5-10 млн. клеток на одну инъекцию с интервалом для 1-й, 2-й вакцинации – 2 нед, для 3-й, 4-й вакцинации – 3 нед и 5-12 вакцинации – 4

недели. Перед 1, 3, 5, 7 и 12-й вакцинацией за 3 дня до введения вакцины в/в в течение 2 ч вводился циклофосфамид в дозе 300 мг/м².

Перед началом лечения больных, получавших ФДК-вакцинотерапию, проводили мобилизацию предшественников ДК из костного мозга в периферическую кровь с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSF (5 мкг/кг массы тела подкожно в течение 4-5 дней), операцию афереза, дифференцировку ДК в течение 5 дней в безсывороточной сбалансированной питательной среде «CellGro DC» (CellGenix, Германия) в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF, 72 нг/мл, Фармсинтез, Россия) и ИЛ-4 (45 нг/мл, CellGenix, Германия), сеанса фотодинамической терапии и 5-дневного цикла внутриопухолевого введения аутологичных ДК (10⁶/кг массы тела пациента) в предварительно ФДТ-облученный метастатический очаг. Интервал между циклами терапии составлял 21 день.

Для элиминации иммуносупрессирующей популяции Т-лимфоцитов за 3 дня до начала лечения вводили циклофосфамид (ЦФ) в дозе 300 мг внутримышечно.

Исследование иммунологических показателей проводили перед каждым циклом вакцинотерапии с помощью метода проточной цитофлюориметрии, ELISpot-анализа и клеточного иммуноферментного анализа (ИФА).

Для оценки клинической эффективности вакцинотерапии использовали критерии RECIST v1.1 (Приложение 1). Оценка нежелательных явлений проводилась по шкале токсичности СТС АЕ v.3.

2.2. Методы

Работу с ДК человека проводили в условиях стерильного модуля с жестким режимом, использованием потолочных воздушных фильтров HEPA/ULPA (ультравысокая очистка), обладающих эффективностью 99,9995% по частицам размером 0,12 микрон. Рабочее место оснащено ламинарно-поточным шкафом с вертикальным потоком воздуха, для создания в рабочей зоне стерильной среды (II класс биологической защиты).

Использовали:

- сепаратор компонентов крови «COBE Spectra» (Gambro BCT, Inc., США);
- ламинарно-поточный бокс (Faster, Германия) – степень очистки рабочей зоны бокса соответствует классу II биологической опасности;
- рефрижераторная центрифуга «Labofuge 400R» - применяется для центрифугирования суспензии МНК и ДК (Thermo Electron LED GmbH, Германия);

- автоматический счетчик клеток «Countess» (Invitrogen, США) определяет количество живых и мертвых клеток, а также общее количество клеток, используя трипановый синий;
- проточный лазерный цитофлуориметр BD «FACSCalibur» (BD Bioscience, США) для клинических, лабораторных, биологических и медицинских научных исследований; медимашина с разовыми стерильными наборами ножей и клеточных фильтров (медиконы, филконы) для дезагрегации образцов опухолевой ткани (Dako, Дания);
- инкубатор медицинский «Heracel» для культивирования клеток в атмосфере 5% CO₂, (Thermo Electron LTD GmbH, Германия);
- аппарат лазерный медицинский «Латус-2», с длиной волны 661-662 нм и мощностью 2,0 Вт используется для проведения лечения методом ФДТ, (Актус, Россия);
- инвертированный микроскоп с цифровой камерой (Leica DMIL, Германия) и микроскоп для лабораторных исследований универсальный с проходящим и отраженным светом «Axio Imager M1», набором опций для наблюдения и записи изображений объектов в различных режимах контраста, с модулем для флуоресцентного анализа (Carl Zeiss, Германия);
- система для ELISpot-анализа (Carl Zeiss, Германия) с микроскопом AxioImager, цифровой камерой высокого разрешения и специализированным программным обеспечением;
- фотометр «Multiskan EX» (Thermo Electron Corporation, США) для всех типов колориметрических измерений;
- система наблюдения за живыми клетками «Cell-IQ» (Chip Man Technologies, Финляндия), предназначена для изучения изменений клеточной морфологии в течение длительного времени (часы и дни), проведения кинетического анализа (с возможностью перевода данных в графическую или табличную формы);
- лабораторный холодильник -20 °С и +4°С для хранения питательных сред и растворов «ПОЗиС» (Россия), морозильная камера -70°С, холодильный шкаф -35 °С, (Sanyo, Япония);
- программный криоамортизатор «Ice-Cube 14S», (SY-Lab Gerate GmbH, Австрия) с контролируемой скоростью охлаждения; стационарные и переносные бункеры для хранения криоконсервированного биоматериала в жидком азоте (-196°С);

- криохранилище Банка долговременного хранения биологического материала НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова;
- механические и электронные, одноканальные и многоканальные дозаторы mLINE, объемом 1-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 500-5000 μ l (Biohit, Финляндия);
- сбалансированная бессывороточная среда «CellGro DC» (CellGenix, Германия) для дифференцировки миелоидных предшественников в ДК в условиях GLP (произведена в условиях GMP); культуральная среда RPMI-1640 (Биолот, РФ); полная питательная среда DMEM-F12 (Биолот, РФ) с добавлением 20% телячьей эмбриональной сыворотки, глутамина, пенициллина, стрептомицина, трансферрина (5 мкг/мл), инсулина (5 мкг/мл), селена (5нг/мл); трипсина раствор 0,25% (Биолот, РФ); версена раствор 0,02%, стерильный (Биолот, РФ); градиент плотности «Ficoll-Paque Premium» (GE Healthcare, Великобритания);
- официальная сыворотка АВ человека IV группы (Sigma, США); телячья эмбриональная сыворотка тестирована на отсутствие микоплазм и вирусов (Биолот, РФ); бессывороточная криосреда (Биолот, Россия) для работы в условиях GLP;
- антибиотики, L-глутамин для клеточных культур (Sigma, США); суплемент жидкий для культуральной среды SITE+3 (Sigma, США); суплемент жидкий для культуральной среды ITS (Sigma, США); диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma, США); трипановый синий (Sigma, США);
- ростовые факторы и факторы дифференцировки GM-CSF (CellGenix, Германия), GM-CSF (Фармсинтез, Россия), IL-4 (CellGenix, Германия), TNF- α (BD, США), IFN- α «Роферон-А» (Roche, Швейцария) для работы в условиях GLP, произведены в условиях GMP;
- фотосенсибилизатор «Фотодитазин» (Вета-Гранд, Россия);
- набор моноклональных антител конъюгированных с флюорохромами к поверхностным антигенам гемопоэтических клеток человека CD11c, HLA DR, CD14, CD19, CD3, CD4, CD8, CD33, CD34, CD16, CD56, CD45; дендритных клеток CD83, CD1a, CD80, CD86, CD14, CCR7, CD209, HLA-DR (BD Biosciences, США); опухолевых клеток NY-ESO-1, MAGE, BAGE, GAGE (Santa Cruz Biotechnology, США) для иммунофенотипирования методом проточной цитометрии, «BD Biosciences» (США);

- моноклональные антитела к линейным антигенам миелоидных клеток, моноцитов, Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, незрелых, зрелых и активированных ДК (CD11c, CD14, CD3, CD19, CD20, CD16, CD56, HLA DR, CD1a, CD83, CD80; моноклональные антитела к опухолевым антигенам S100, tyrosinase, MITF, MAGE1, NY-ESO-1, MART/MelanA, CD63. (DAKO, Дания; Novocastra, Великобритания) для иммунофенотипирования непрямым иммуноцитохимическим методом с использованием систем визуализации «In vision» и «Novostain detection kit NCL-RTU-D» (DAKO, Дания; Novocastra, Великобритания);
- стерильная разовая лабораторная посуда: культуральные флаконы для клеточных культур на 25 см², 75 см², 175 см² активированная поверхность культивирования, вентилируемая крышка с гидрофобной фильтрующей мембраной 0,2 мкм (Sarstedt, Германия); вакутейнеры наполнитель EDTA «Vacutest Kima srl» (Италия); криопробирки на 1,5 мл, 4,5 мл Nunc «CryoTube» (Thermo Fisher Scientific, США) и центрифужные пробирки 15 мл, 50 мл (Sarstedt, Германия); серологические пипетки на 2 мл, 5 мл, 10 мл, 25 мл (Sarstedt, Германия); наконечники на 100 мкл, 300 мкл, 1000 и 5000 мкл (Biohit, Финляндия); стекла для культивирования клеток (BD Falcon, США).

2.2.1. Получение костномозговых и периферических дендритных клеток

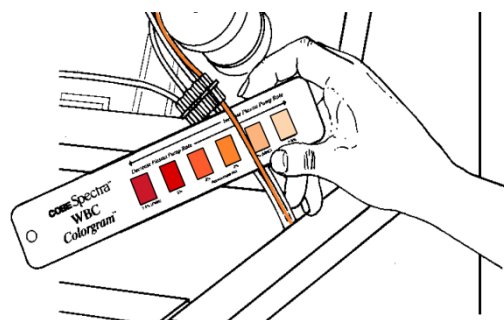
Миелоидные предшественники получали из лейкоферезного материала и периферической крови. Аферез костномозговых предшественников периферической крови проводили на аппарате CobeSpectra. Использовали программу афереза с визуальным контролем качества во время процедуры по цветовой шкале для исключения примеси эритроцитов периферической крови (рис. 4 А и Б). Это является обязательным условием при выделении миелоидных предшественников ДК. Разделение крови происходит в 2 этапа, в полностью автоматическом режиме: 1-й - отделение эритроцитов и лейкоцитов от плазмы с тромбоцитами и накопление МНК в определенной зоне камеры, и 2-й – продавливание МНК плазмой в сборный контейнер (плазма отсекается от попадания в контейнер). Принцип разделения периферической крови основан на различной плотности клеток и скорости их осаждения за счет различного размера. Разделение происходит при непрерывном центрифугировании путем отбора требуемых слоев расслоившейся клеточной массы и плазмы. Оставшиеся компоненты возвращаются пациенту.

Для получения $2,4-6,2 \times 10^{10}$ миелоидных предшественников (гемопозитические стволовые клетки, ранние предшественники моноцитопоза, дендрцитопоза, моноциты) производили забор от 200 до 220 мл лейкоферезного материала, в зависимости от выхода в периферическую кровь предшественников ДК, мобилизованных с помощью G-CSF(5 мкг/кг массы тела подкожно в течение 4-5 дней). Периферические миелоидные предшественники получали с помощью венопункции 120 мл венозной крови, что позволяет выделять $100-200 \times 10^6$ клеток.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартным методом, путем центрифугирования в градиенте плотности «Ficoll-Paque Premium» «GE Healthcare» (Великобритания) согласно Voum, 1968. Моноциты (CD14⁺) выделяли методом адгезии на пластике.



А



Б

Рис. 4. Аферез миелоидных предшественников ДК с использованием системы Cobe Spectra (А). Использование цветовой шкалы для контроля качества аферезного продукта (Б).

2.2.2. Дифференцировка дендритных клеток из миелоидных предшественников *ex vivo*

Методика приготовления вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных РТА⁺ опухолевым лизатом, представлена на рис. 5.

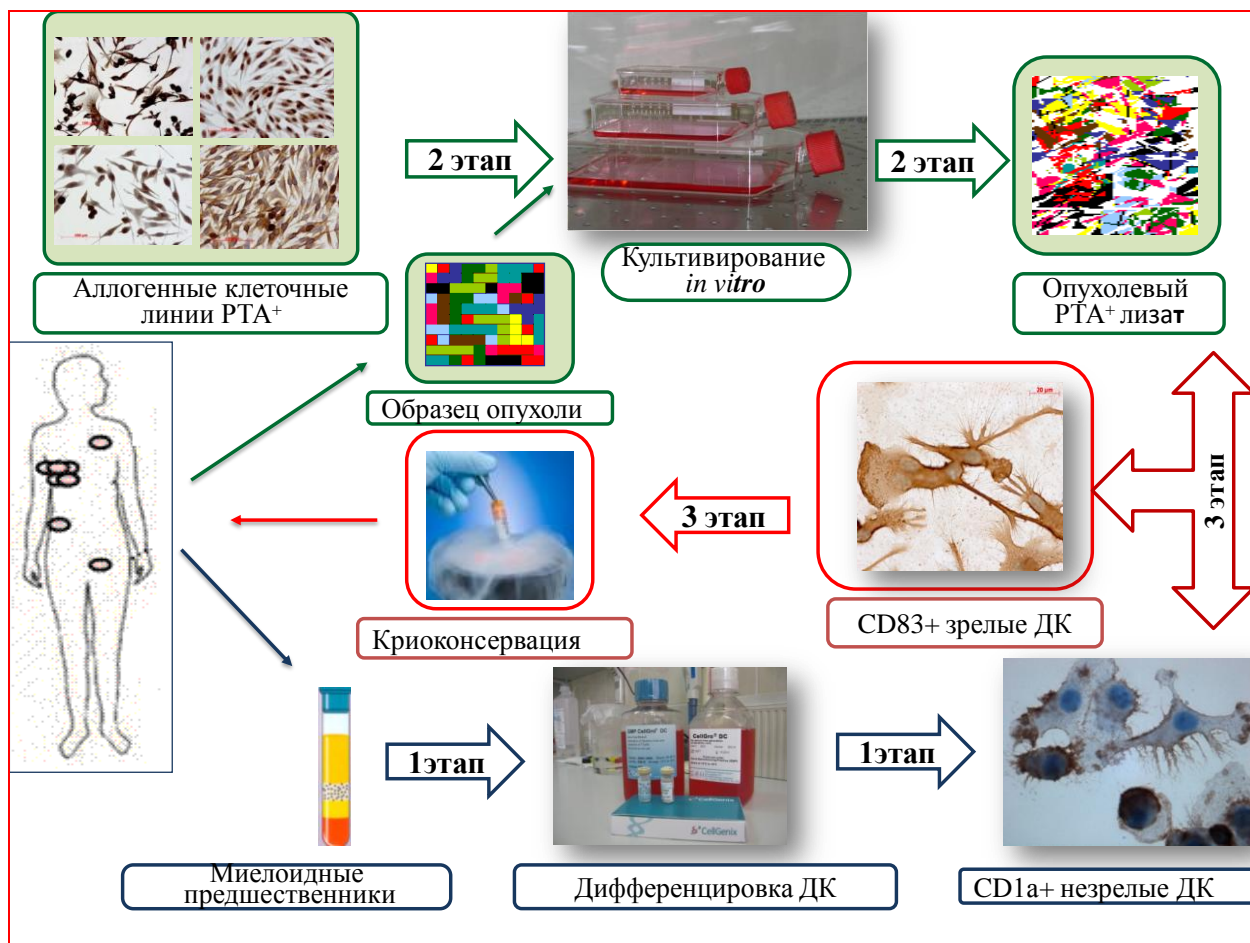


Рис. 5. Приготовление вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных РТА⁺ лизатом.

Периферическую венозную кровь помещали в стерильные 50-мл пробирки и разбавляли равным объемом питательной среды RPMI-1640, после чего проводили центрифугирование в градиенте плотности «Ficoll-Paque Premium» в 15-мл стерильных центрифужных пробирках при 1500 об/мин в течение 40 мин при комнатной температуре. Во время центрифугирования эритроциты и гранулоциты оседают на дно пробирки, а на границе раздела фаз находятся мононуклеарные клетки (МНК).

Прозрачный слой среды, расположенный непосредственно над опалесцирующим слоем МНК удаляли, МНК собирали по всей площади сечения пробирки. При этом достигается примерно 1000-кратная очистка МНК от других клеток.

Взвесь МНК вносили в стерильные 15-мл центрифужные пробирки и разбавляли не менее чем четырехкратным избытком неполной питательной среды RPMI-1640, тщательно ресуспендировали. Отмывали МНК в неполной питательной среде RPMI-1640 двукратным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин.

Проводили подсчет и оценку жизнеспособности МНК с помощью автоматического счетчика клеток «Countess™» и 0,4% трипанового синего, получали 10-15x10⁶ и более клеток, с жизнеспособностью не менее 98%.

Для получения ДК из МНК периферической крови, последние помещали в неполную питательную среду RPMI-1640 (посевная доза 5x10⁶ кл/мл) и 2 плоскодонных культуральных флакона 75 см² с вентилируемыми пробками. Инкубировали в условиях контролируемого 5% CO₂ и 98% влажности при 37°C.

Через 2 часа среду с неприлипшими клетками (преимущественно лимфоцитами) аккуратно отбирали, а к клеткам адгезированным на пластике, (преимущественно моноцитам) добавляли свежую бессывороточную среду «CellGro DC». Ростовые факторы и факторы дифференцировки – GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20-45 нг/мл) (CellGenix, Германия) вносили на 1-й, 3-й и 5-й дни культивирования.

На 7-е сутки культивирования для созревания ДК вносили опухолевые антигены, исходя из соотношения 1 ДК:3 лизированные опухолевые клетки, ростовые факторы – GM-CSF, IL-4 и TNF-α. Инкубацию проводили в течение 48 часов.

Через 48 часов ДК собирали, осаждали центрифугированием, отмывали в 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия, содержащего 10% альбумина человека, производили подсчет и оценку жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток «Countess» и 0,4% трипанового синего.

Для приготовления ДК вакцины 1/2 клеток (от 5 до 10x10⁶) ресуспендировали в 1,5 мл 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего 10% альбумина человека, переносили в ампулу и доставляли в клиническое отделение для введения больному. Другую 1/2 ДК криоконсервировали и хранили в жидком азоте до следующей вакцинации.

Методика приготовления вакцины на основе незрелых костномозговых предшественников ДК представлена на рис. 6.

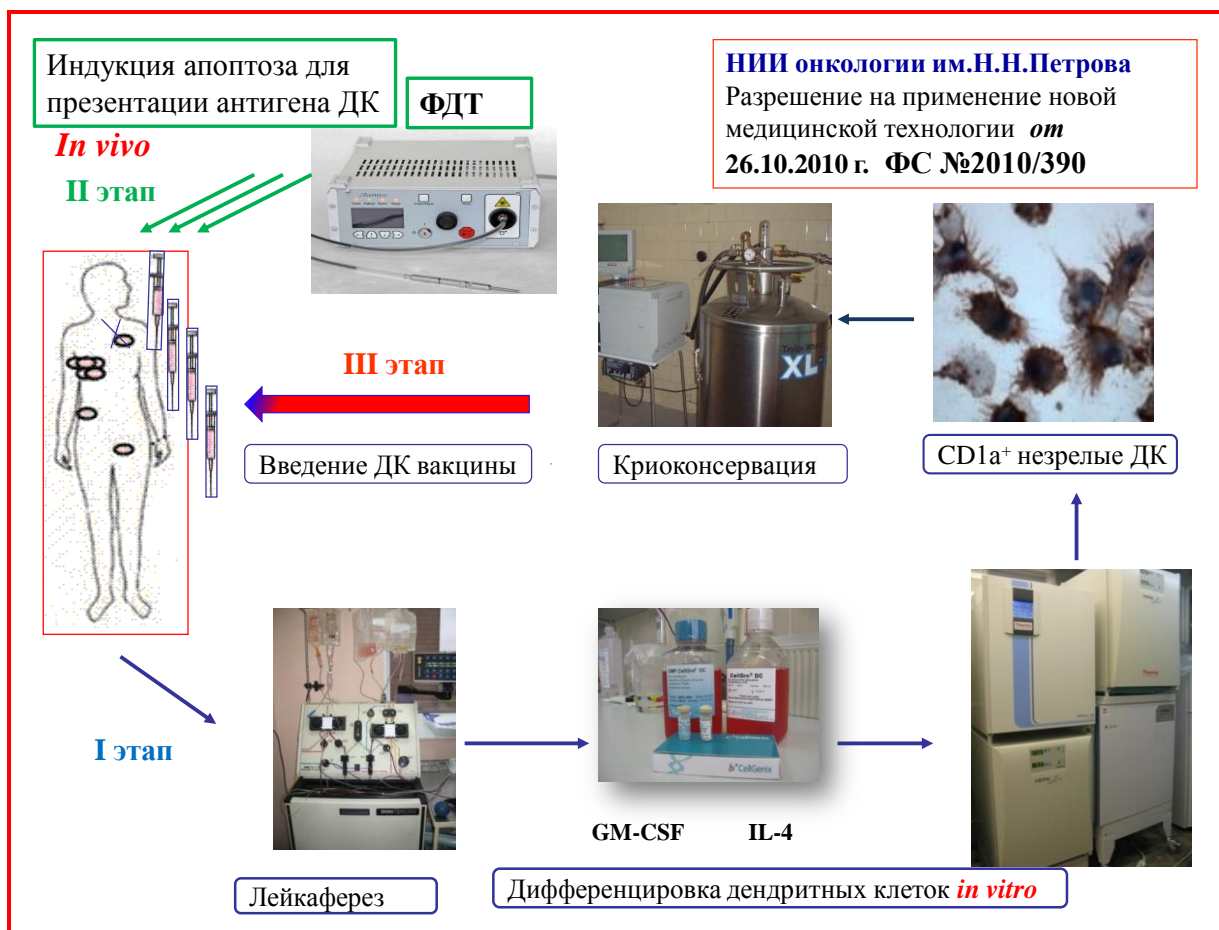


Рис. 6. Приготовление вакцины на основе незрелых костномозговых предшественников ДК.

1. Суспензию МНК помещали в стерильные 50-мл пробирки и разбавляли равным объемом питательной среды RPMI-1640.
2. 10 мл разбавленной клеточной суспензии наслаивали на 3 мл градиента плотности «Ficoll-Paque Premium» в 15-мл стерильных центрифужных пробирках. Центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 мин при комнатной температуре.
3. Прозрачный слой среды, расположенный непосредственно над опалесцирующим слоем МНК, удаляли, МНК собирали по всей площади сечения пробирки.
4. МНК (5×10^6 клеток в 1 мл) помещали в свежую питательную среду RPMI-1640 с 2мМ L-глутамина и плоскодонные культуральные флаконы 75 см³ для адгезионных культур с вентилируемыми пробками, культивировали при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности в течение 2 часов с целью получения адгезионной культуры моноцитов.
5. Неадгезивные клетки (лимфоциты), около $6,2 \times 10^9$ (56%) удаляли и криоконсервировали, прикрепившиеся клетки, около $4,8 \times 10^9$ (44%) отмывали неполной питательной средой RPMI-1640.

6. Дифференцировку МНК в незрелые ДК проводили в сбалансированной безсывороточной среде «CellGro DC», произведенной в условиях GMP и рекомендованной для культивирования ДК человека.
7. Ростовые факторы и факторы дифференцировки – GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20-45 нг/мл) вносили на 1-й и 3-й день культивирования.
8. На 5-й день культивирования ДК собирали пастеровской пипеткой, незначительную часть прикрепившихся клеток снимали скрепером, отмывали двукратным центрифугированием в 10 мл 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%), при 1000 об/мин в течение 10 мин.
9. Производили подсчет, оценку жизнеспособности, определяли иммунофенотип и уровень дифференцировки. При соблюдении вышеуказанных условий получали 5×10^9 и более клеток; жизнеспособность не менее 98%, с иммунофенотипом несенсибилизированных (незрелых) ДК – $CD14^-/CD1a^+/CD83^-$. Это количество криоконсервировали и использовали для 4-х или более 5-дневных циклов вакцинациотерапии.

Прижизненное исследование ДК проводили на всех этапах культивирования с помощью инвертированного микроскопа и системы наблюдения за живыми клетками Cell-IQ v.2 (Chip Man Technologies, Финляндия) (рис. 7 А и Б). Экспрессию наиболее значимых антигенов на зрелых ДК исследовали с помощью моноклональных антител и светового микроскопа или проточного цитофлюориметра BD FACSCalibur (tm) (BD Biosciense). При соблюдении вышеуказанных условий получали $10-20 \times 10^6$ клеток, с жизнеспособностью не менее 98% и иммунофенотипом зрелых ДК ($CD14^-$, $CD1a^{low}$, $CD83^{high}$, $HLA-DR^{high}$, $CD80^{high}$, $CD86^{high}$, $CCR7^{high}$). Это количество ДК использовали для 2-х вакцинаций.

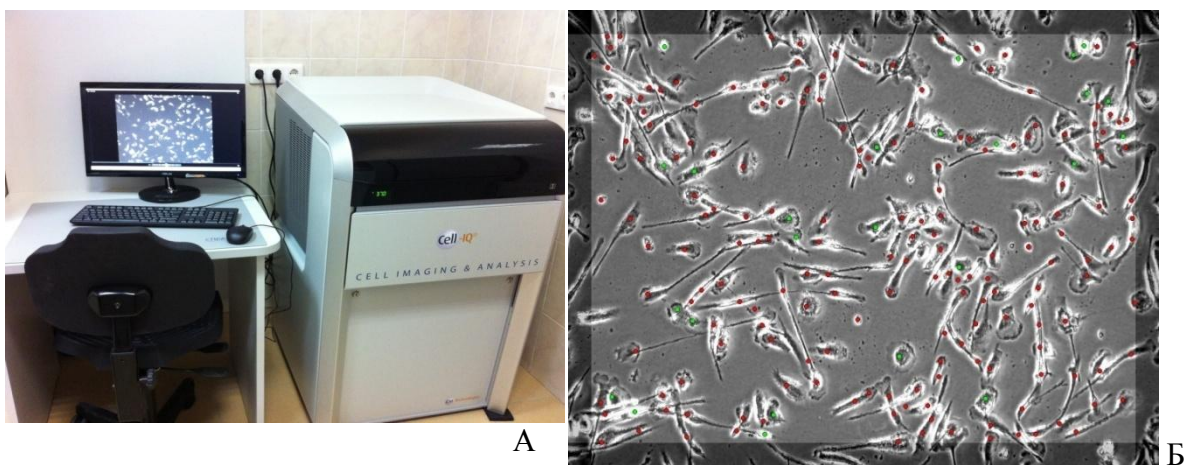


Рис. 7. Система наблюдения за живыми клетками Cell- IQ v.2 (Chip Man Technologies, Финляндия) (А) и количественная оценка созревания дендритных клеток в процессе приготовления индивидуальной вакцины больной М., 54 г. x10 (Б).

2.2.3. Приготовление опухолевого лизата содержащего раково-тестикулярные антигены

1. Клетки Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520 культивировали в пластиковых флаконах в полной питательной среде DMEM/F12 с 20% телячьей эмбриональной сыворотки с добавлением глутамина, пенициллина, стрептомицина, трансферрина (5 мкг/мл), инсулина (5 мкг/мл), селена (5нг/мл), в условиях контролируемого 5% CO₂ и 98% влажности при 37°C. При достижении конфлюэнтного монослоя, производили пересев клеток и дальнейшее пассирование культуры с рассевом 1:2 или 1:4 (определяли индивидуально для каждой культуры клеток).
2. Производили отбор проб для подсчета, оценки жизнеспособности, бактериалогического исследования культуральной среды, определения иммунофенотипа клеток и уровня продукции иммуносупрессирующих факторов. Для приготовления опухолевого лизата клетки Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520 смешивали в равных пропорциях и проводили:
 - а) 6 последовательных циклов моментального замораживания до -196°C и оттаивания до комнатной температуры в фосфатно-солевом буфере без криопротектора (качество лизиса клеток контролировали с помощью 0,1% трипанового синего и светового микроскопа);
 - б) осаждение клеточного детрита центрифугированием (10 мин, 3000 об./мин);
 - в) фильтрацию надосадочной фракции через миллипоровый фильтр (0,2 мкм);
 - д) расфасовку РТА⁺ опухолевого лизата в криопробирки и хранение при -20°C до использования.

2.2.4. Криоконсервация миелоидных предшественников и вакцинных дендритных клеток

Криоконсервировали миелоидные предшественники и вакцинные ДК с помощью программного замораживателя «Computer Freezer «Ice-Cube 14S» (Австрия) с контролируемой скоростью охлаждения, которая составляет $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от $+4^{\circ}\text{C}$ до -4°C , и $-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от -40 до -12°C . Для этого клетки помещали в криосреду (90% аутологичной плазмы и 10% ДМСО, 90% сыворотки АВ человека и 10% ДМСО или бессывороточная криосреда) и индивидуально маркированные криопробирки. После чего клетки переносили в индивидуальные контейнеры с жидким азотом (-196°C) и хранили в криобанке до использования.

2.2.5. Размораживание миелоидных предшественников и вакцинных дендритных клеток

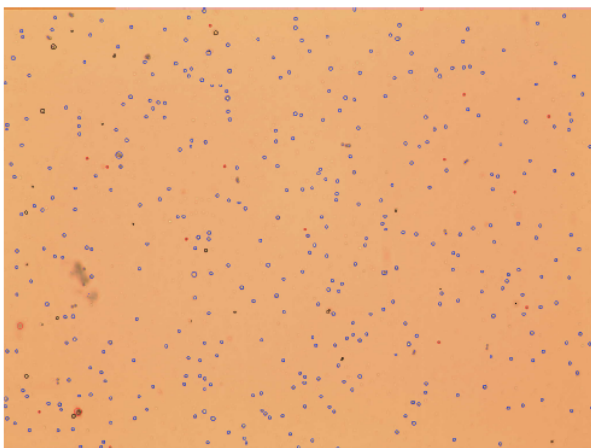
Криопробирку с ДК помещали на 3 мин в водяную баню $+42^{\circ}\text{C}$, далее ex tempore переносили в стерильную 15-мл пробирку и разбавляли не менее чем десятикратным избытком 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%). Отмывали ДК двукратным центрифугированием (1000 об/мин в течение 10 мин) в 10 мл 0,9% изотонического раствора NaCl, производили подсчет и оценку жизнеспособности. В результате получали контрольное криоконсервированное количество ДК, с жизнеспособностью не менее 96%, переносили в ампулу и доставляли в клиническое отделение для введения больному.

2.2.6. Оценка количества и жизнеспособности (миелоидных предшественников, вакцинных дендритных клеток, мононуклеаров, опухолевых клеток)

Подсчет и оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток «Countess» и трипанового синего, получали от $1,0-4,0 \times 10^6$ в 1 мл клеток, жизнеспособность – не менее 95% (рис. 8).

1. Смешивали 10 мкл суспензии клеток и 10 мкл 0,4% раствора трипанового синего, который окрашивает только мёртвые клетки;
2. полученный образец вносили в камеру рабочего слайда и вставляли в прибор;
3. Countess[®] выводит увеличенное изображение образца на экран, обрабатывает и отображает на экране результаты, которые можно сохранить в электронном виде.

File Name : MON_F
Date : Nov. 26, 2012 14:58

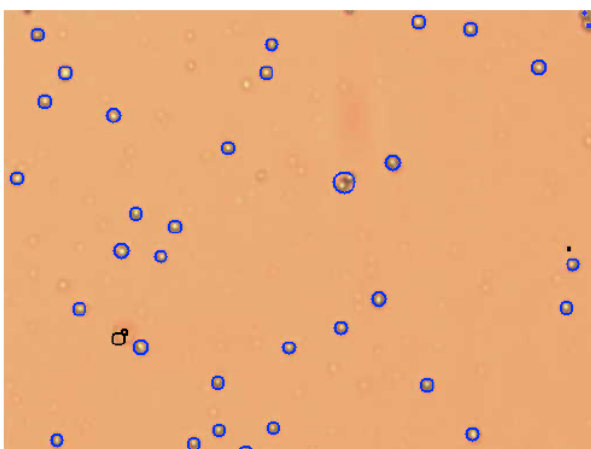


Results

Total cell concentration : 2.1×10^6 cells/mL
Viable cell concentration : 2.0×10^6 cells/mL
Dead cell concentration : 8.6×10^4 cells/mL
Viability : 96%
Average viable cell size : 8.4 μ m
Average dead cell size : 8.6 μ m
Total Cells Counted : 419
Viable Cells Counted : 402
Dead Cells Counted : 17

Parameters applied

Sensitivity : 87.5
Min Cell Size: 6 μ m
Max Cell Size: 60 μ m
Circularity: 80
Gating Applied: 6 μ m - 60 μ m



Cell Size Graph

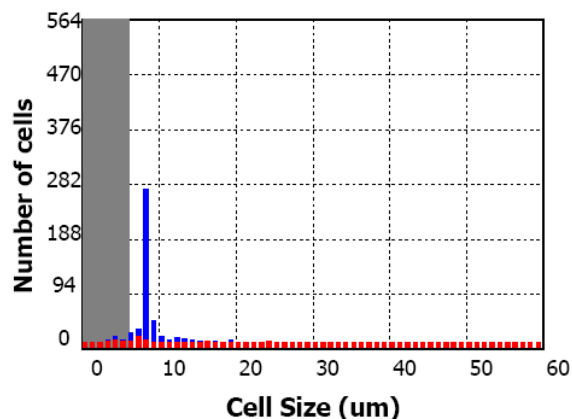


Рис. 8. Анализ количества и жизнеспособности свежевыделенных МНК на автоматическом счетчике клеток «Countess» (Invitrogen, США).

Лабораторное прижизненное исследование аутологичных (индивидуальных) ДК проводили на всех этапах культивирования с помощью инвертированного микроскопа, экспрессию наиболее значимых антигенов на вакцинных ДК исследовали с помощью моноклональных антител, светового микроскопа и проточного цитофлуориметра.

2.2.7. Иммуноцитохимическая характеристика дендритных клеток

Для иммуноцитохимической оценки полученных ДК проводили цитологическую и иммунологическую верификацию ДК, изучали тип роста клеток. Для этого ДК: 1) выращивали на культуральных стеклах (BD, США); 2) фиксировали с помощью ацетона; 3) окрашивали моноклональными антителами к линейным антигенам миелоидных клеток, моноцитов, Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток, незрелых, зрелых и активированных ДК (CD11c, CD14, CD3, CD19, CD20, CD16, CD56, HLA DR, CD1a, CD83, CD80 (DAKO, Дания; Novocastra, Великобритания) с помощью непрямого иммуноцитохимического метода и системы визуализации «In vision» и «Novostain detection kit NCL-RTU-D» (DAKO, Дания; Novocastra, Великобритания) (рис. 9).

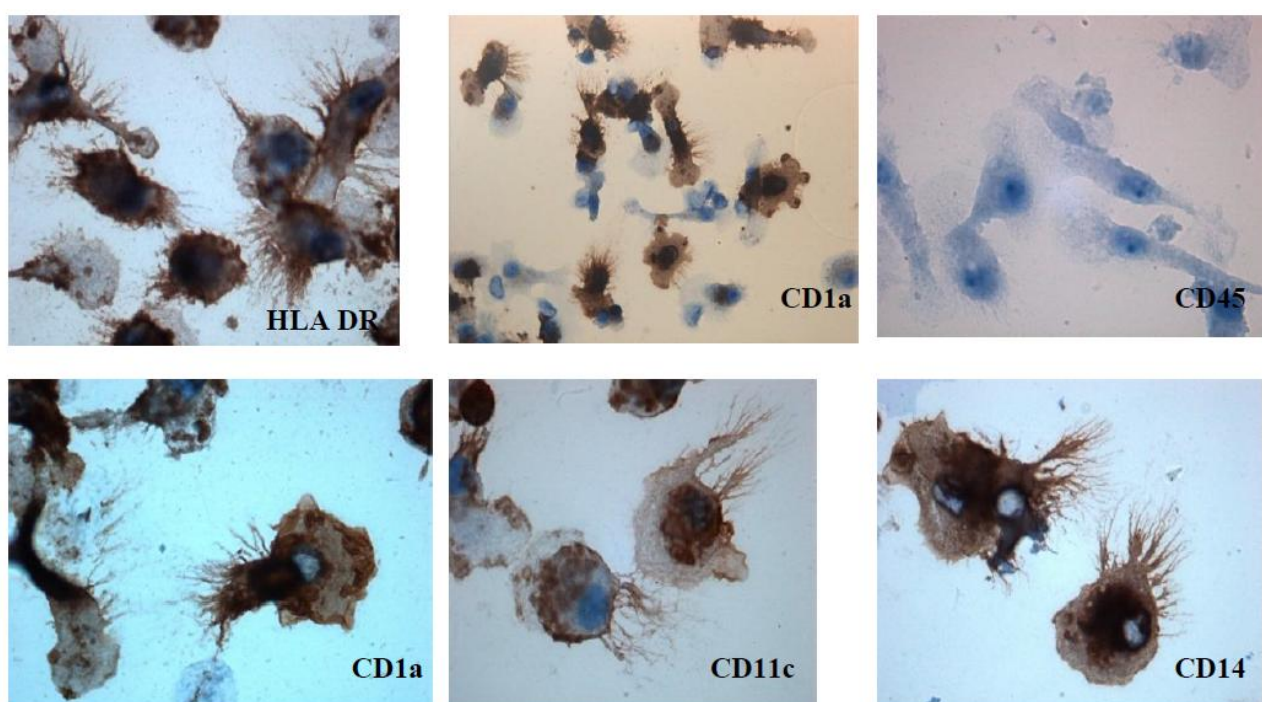


Рис. 9. Незрелые ДК больного Г., 50 лет, дифференцированные из костномозговых предшественников *in vitro*, экспрессирующие CD45, CD11c, HLA DR, CD1a антигены (световой микроскоп, 100x и 40x)

2.2.8. Иммунофенотипический анализ миелоидных предшественников, вакцинных дендритных клеток, опухолевых клеток

Иммунофенотипический анализ проводили на проточном лазерном цитофлуориметре BD FACSCalibur (tm) (BD Bioscience). ДК после культивирования двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере, осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин. Далее, 1×10^6 клеток инкубировали со специфическими моноклональными антителами (20 мкл/1 образец) anti-CD83-PE-Cy5, anti-CD1a-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CD209-FITC и изотипическим контролем (BD Biosciences, США)

при комнатной температуре в течение 30 мин, в темном месте. Обработка результатов проводили с использованием программного обеспечения CellQuest Pro (tm). Изучение экспрессии антигенов проводили на образцах ДК, дифференцированных из МНК лейкоцитарного продукта или периферической крови в присутствии GM-CSF и IL-4 (рис.10).

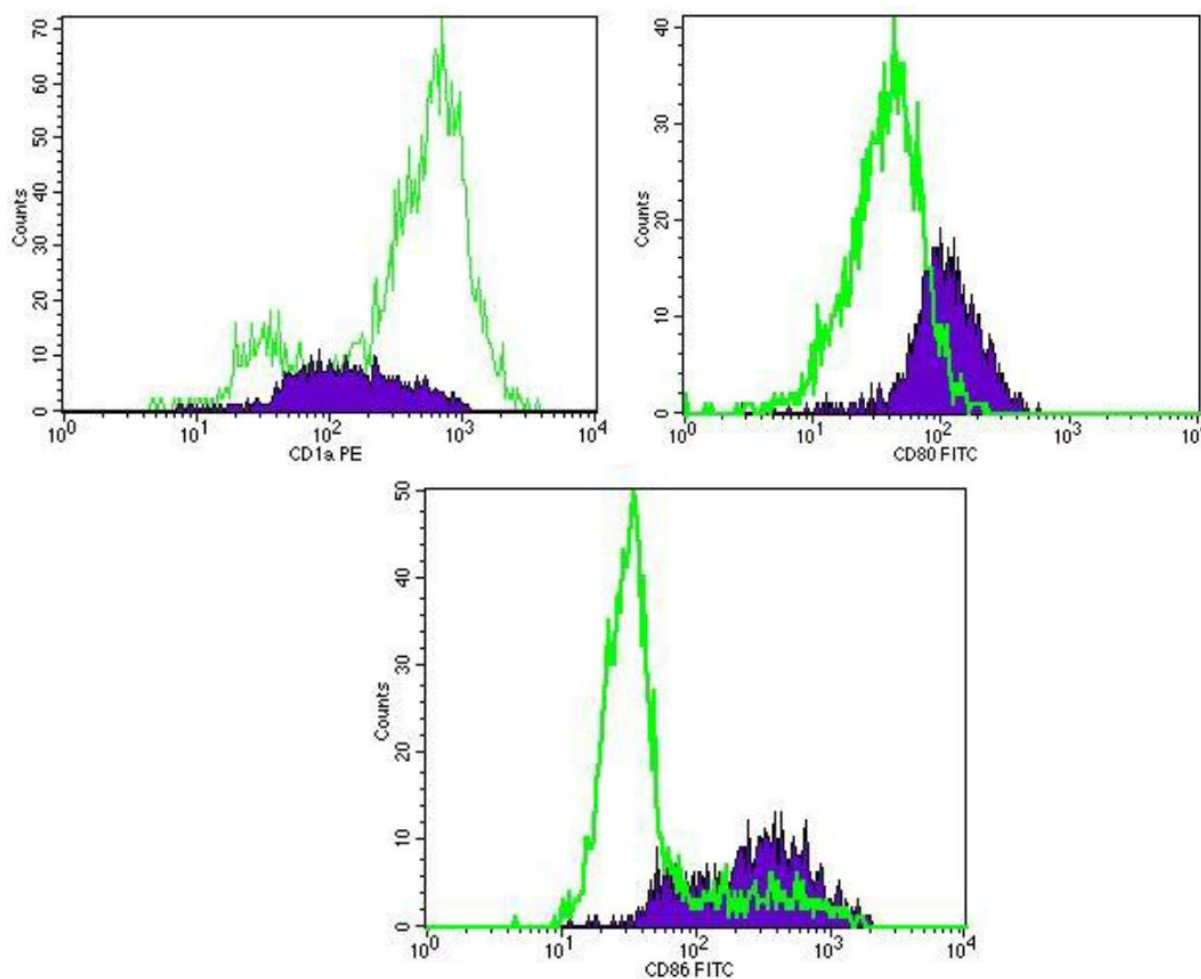


Рис. 10. Незрелые ДК больного Г., 50 лет, дифференцированные из костномозговых предшественников *in vitro*, экспрессирующие CD1a, CD80, CD86 антигены (проточный цитофлюориметр BD FACSCalibur, США).

Оценка специфического поствакцинального иммунного ответа

Для изучения специфической активации Т-клеток и выявления РГА-специфических антител (IgG) у пациентов перед каждой вакцинацией производили забор крови на исследования (ELISpot анализ, клеточный ИФА). Схема забора образцов периферической крови представлена на рис. 11.

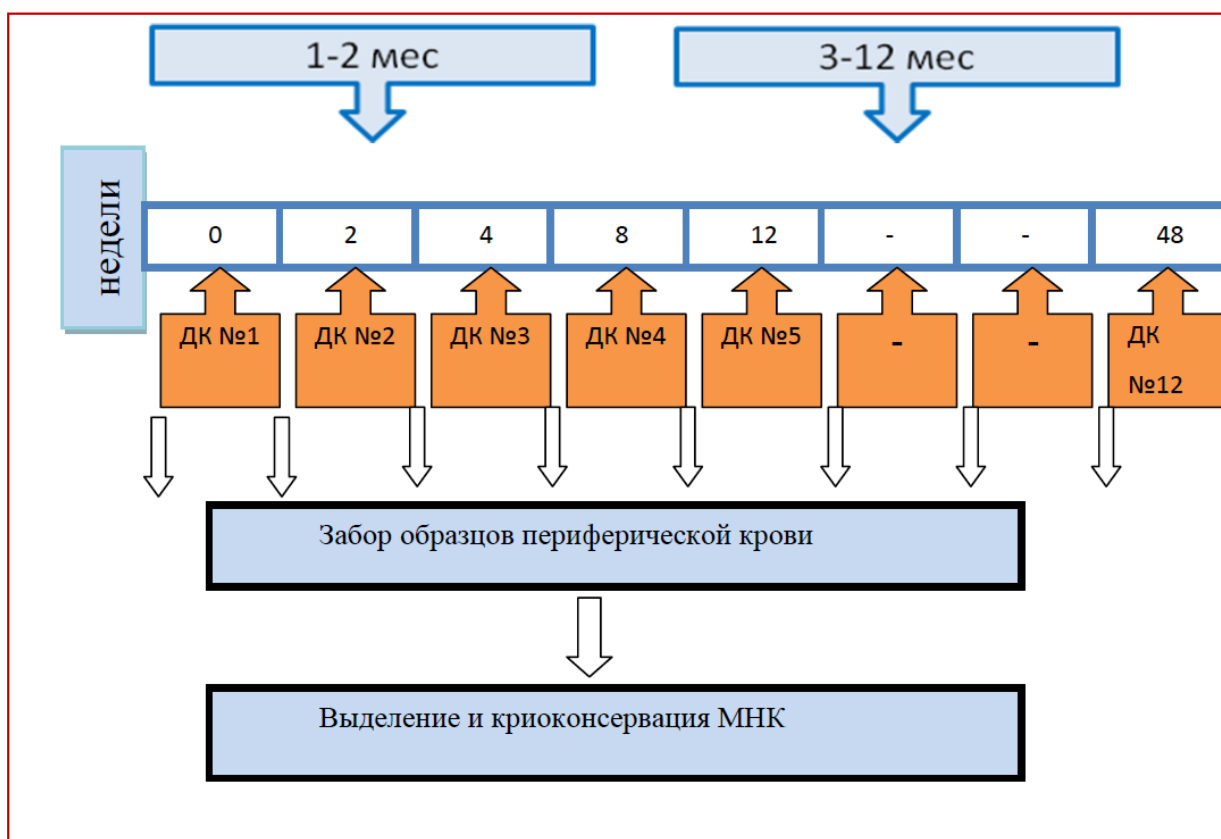


Рис. 11. Схема забора образцов периферической крови у больных диссеминированной меланомой кожи, получавших дендритноклеточную вакцилотерапию.

2.2.9. Мониторинг специфического поствакцинального иммунного ответа (ELISpot анализ)

Предварительно за 24 часа до постановки метода производили размораживание необходимых образцов МНК на водяной бане. Отмывали МНК в неполной питательной среде RPMI-1640 двукратным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин и оставляли на ночь при 37С в 5% CO₂-инкубаторе. Производили подсчет и оценку жизнеспособности, в работу брали образцы МНК с жизнеспособностью не менее 70%.

Исследуемые образцы МНК добавляли в лунки планшеты (триплетами), с предварительно сорбированными антителами к соответствующему цитокину (anti-human INF- γ , Gr- β) в концентрации 100 тыс. клеток/лунку. Для стимуляции максимального уровня специфической продукции цитокинов добавляли ростовые факторы Т-клеток (IL-7, IL-12) в различных сочетаниях (Балдуева И.А. и др., 2010; Нехаева Т.Л. и др., 2010). Мишенями для

активации специфических Т-клеток был коктейль из 4-х аллогенных клеточных линий меланомы (Mel 226, Mel 263, Mel 253, Mel 515), экспрессирующих РТА (NY-ESO-1, MAGE, HAGE, GAGE), их лизат и синтетические пептиды (ГНЦ Институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург), которые соответствовали антигенному профилю аутологичной опухоли.

В качестве положительного контроля для стимуляция исследуемых образцов МНК использовали поликлональный активатор Т-лимфоцитов фитогемагглютинин («Sigma», США). Клетки инкубировали в условиях контролируемого 5% CO₂ и 98% влажности (CO₂-инкубатор) в течение 24-48 часов для определения продукции INF- γ и Gr- β . Во время инкубации клетки активируются и начинают продуцировать цитокин, который присоединяется к иммобилизованным антителам. По окончании инкубации клетки удаляли, отмывали планшет и добавляли вторичные биотилированные антитела, специфичные к тому же самому цитокину, но направленные к другому эпитопу. Инкубировали 2 часа при комнатной температуре, удаляли не связавшиеся антитела и вносили стрептавидинферментный конъюгат. Далее планшеты отмывали и добавляли субстрат, который образует окрашенное пятно (spot). Реакцию останавливали, промывая планшету дистиллированной водой. Поэтапное изображение постановки исследования представлено на рис. 12.

Визуализацию результатов проводили с помощью автоматизированной системы ELISpot компании Carl Zeiss.

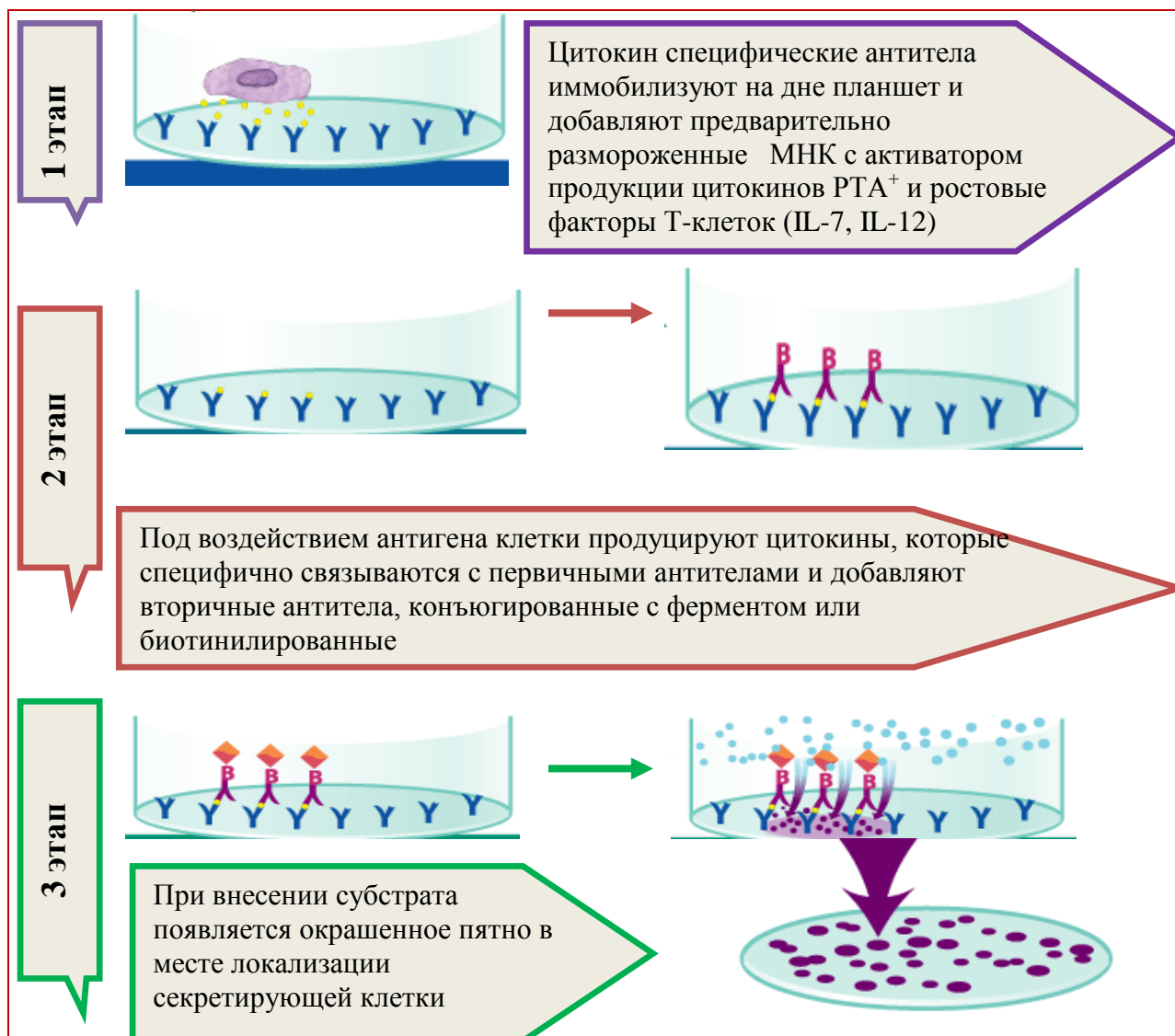


Рис. 12. Постановка ELISpot анализа (в нашей модификации).

2.2.10. Оценка поствакцинального гуморального иммунного ответа (клеточный ИФА)

Для выявления РТА-специфических антител (IgG) в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой кожи в ответ на введение противоопухолевой дендритноклеточной вакцины использовали метод клеточного иммуноферментного анализа (ИФА). Основанный на высокой избирательности и специфичности иммунологической реакции «антиген-антитело». В качестве антигена использовали аллогенные клеточные линии меланомы (Mel 226, Mel 263, Mel 253, Mel 515), экспрессирующие РТА (NY-ESO-1, MAGE, HAGE, GAGE) и/или аутологичные клетки меланомы с экспрессией этих антигенов (Балдуева И.А. и др., 2011; Нехаева Т.Л. и др., 2012). Схема постановки эксперимента для

выявления РТА-специфических антител (IgG) в сыворотке крови больных представлена на рис. 13.

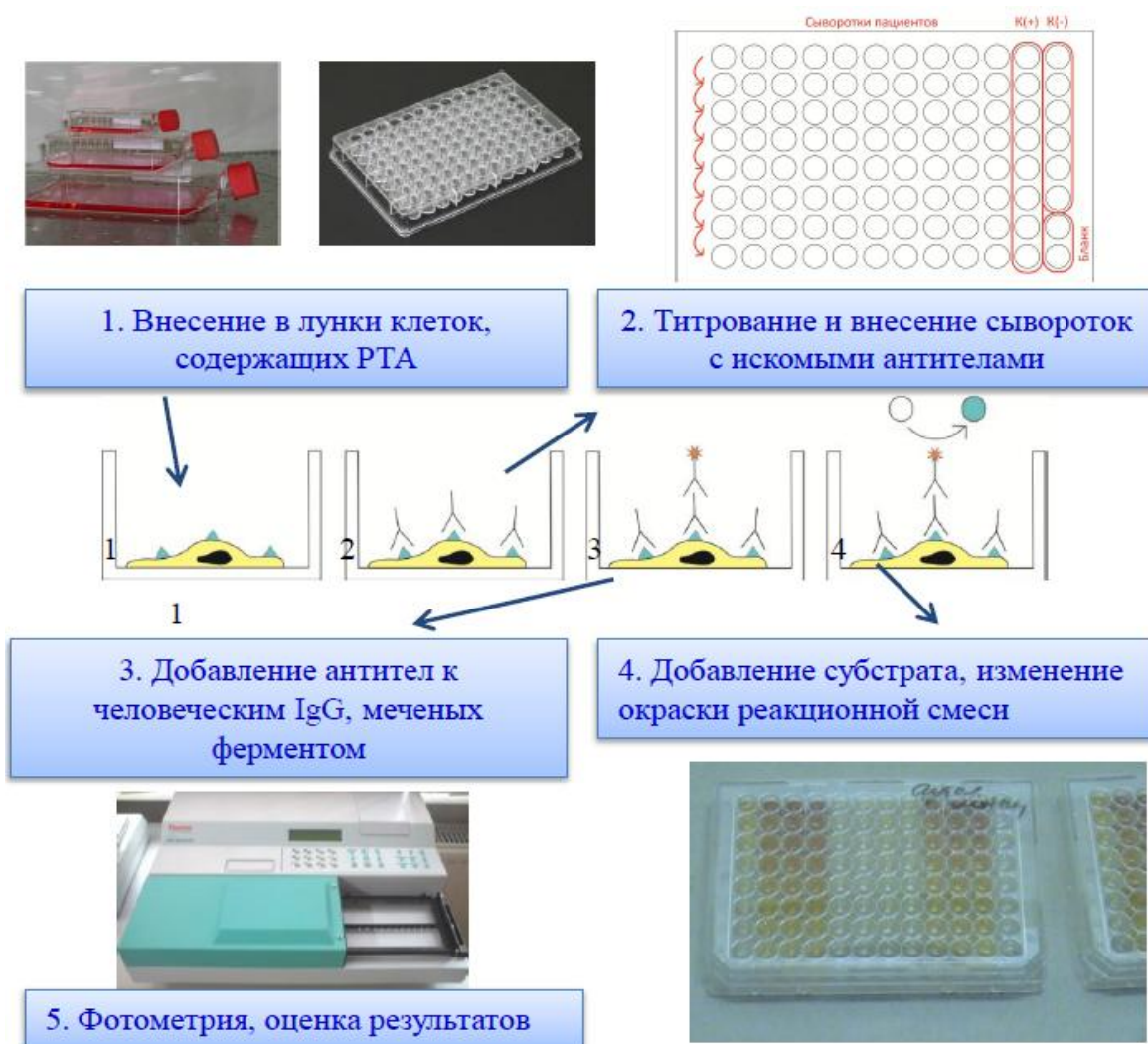


Рис. 13. Постановка клеточного ИФА (в нашей модификации).

- **Нанесение и фиксация культуры опухолевых клеток в планшете**

Предварительно, за 12-24 часа до постановки метода на поверхность лунки культурального планшета «Costar» (Corning Incorporated, США) дублями вносили по 10-20 тыс. в лунку в 100 мкл полной питательной среды DMEM/F12 опухолевых клеток (Mel 226, Mel 263, Mel 253, Mel 515), эксперсирующие РТА (NY-ESO-1, MAGE, VAGE, GAGE) или аутологичные клетки меланомы с экспрессией этих антигенов и оставляли на ночь в условиях 5% CO₂ и 98% влажности при 37°C. Для постановки метода необходимо не менее 70% прикрепившихся клеток. Промывали трижды фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,2) по 200 мкл в лунку, экспозиция 5 мин.

Для фиксации опухолевых клеток вносили по 200 мкл в лунку 4% параформальдегида, экспозиция 25 мин. при комнатной температуре, далее планшет промывали трижды стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ, рН 7,2) по 200 мкл в лунку, экспозиция 5 мин.

- **Разморозка и внесение в лунки планшета исследуемых образцов**

1. Перед началом анализа заполняли протокол исследования, на схеме планшета отображали последовательность внесения проб.
2. Образцы сывороток размораживали при комнатной температуре.
3. Согласно протоколу исследования в лунки нового планшета вносили образцы сывороток. В 1-й ряд планшета вносили по 270 мкл 2% бычьего сывороточного альбумина и 30 мкл исследуемого образца сыворотки в лунку, далее со 2-го по 8 ряд титровали 8-канальным дозатором по 150 мкл в лунку.
4. В планшет с фиксированными опухолевыми клетками переносили разведенные образцы сывороток по 100 мкл в лунку, начиная с меньшего разведения. Помещали в термостат на 1 час при температуре 37°C, затем трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, рН 7,2) по 200 мкл в лунку, экспозиция 5 мин.

- **Для выявления образовавшихся иммунных комплексов**

1. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл антитела (IgG) конъюгированные с ферментом (пероксидаза хрена), инкубировали в течение 1 часа при 37°C и затем трижды промывали ФСБ по 200 мкл в лунку, экспозиция 5 мин.
2. Для проявления цветовой реакции в лунки планшета вносили по 100 мкл субстрата. Субстрат представляет собой 0,2 %-й раствор пероксида водорода и тетраметилбензидина (ТМБ) в цитратном буфере. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента.
3. Абсорбцию регистрировали при длине волны 450 нм после добавления в реакционную смесь стоп-реагента на многопараметровом фотометре «Multiskan EX» (Thermo Electron Corporation, США). Каждое исследование дублировалось.

Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки материалов исследования использовали методы описательной статистики, корреляционного и регрессионного анализа, достоверность различий оценивали методами параметрической (критерии Стьюдента, Фишера) и непараметрической (критерий Вилкоксона) статистики, для определения длительности

времени до прогрессирования (ВДП) заболевания и общей выживаемости (ОВ) применяли метод Каплана-Майера. Обработку результатов проводили с помощью прикладных статистических программ Statgraphics Plus и SPSS for Windows.

Глава 3

Стандартизация методов получения и криоконсервации миелоидных предшественников ДК из аферезного материала и периферической крови

Теоретическим обоснованием использования миелоидных предшественников костного мозга и периферической крови в качестве субстрата для получения ДК *ex vivo* является малоизученный феномен «пластичности», т.е. способность гемопоэтических клеток дифференцироваться в клетки различных типов (Zhao Y. et al., 2003; Wong K.L. et al., 2011). Исследования взаимодействия регуляторных программ, обеспечивающих дифференцировку CD34⁺ гемопоэтических предшественников и CD14⁺ моноцитов в ДК, открывают новые возможности развития стратегий клеточной терапии в онкологии (Nguven X.D. et al., 2002; Clanchy F.I., et al., 2006; Kim W.K. et al., 2010). В связи с этим, актуальным становится разработка и оптимизация лабораторной методики выделения миелоидных предшественников ДК из лейкоконцентрата (аферезного материала) и периферической крови с целью получения большого количества ДК для клинического применения. Изучению этой проблемы посвящено настоящее исследование.

3.1. Стандартизация оптимальных условий выделения МНК и моноцитов из аферезного материала и периферической крови

Аферезный материал получали с помощью аппарата «COBE Spectra» и использования программы выделения фракции МНК периферической крови. Работу с МНК человека проводили в условиях GLP (*Good Laboratory Practice* – Надлежащая лабораторная практика).

Для получения высокообогащенной популяции жизнеспособных МНК в качестве предшественников периферических ДК использовали метод центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium, который позволяет выделить из популяции лейкоцитов 96-98% МНК (рис.14 А и Б). Седиментация в изокинетическом градиенте Ficoll-Paque Premium проводится как на основе плавучей плотности клеток, так и их диаметра, обеспечивает возможность удобного разделения клеток в стерильных условиях с использованием стандартного и доступного в РФ оборудования. При этом в соответствие требованиям GMP и GLP к продукту подобного качества нами были разработаны критерии стандартной операционной процедуры (СОП), представленные в Приложение 2.

МНК ($2-3 \times 10^6$ клеток в 1 мл) помещали в свежую питательную среду RPMI-1640 с 2мМ L-глутамина и плоскодонные культуральные флаконы 75 см³ для адгезионных культур с вентилируемыми пробками, культивировали при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности в

течение 2 часов с целью получения адгезионной культуры, которая подвергалась количественному и качественному анализу.

Для получения ДК из моноцитов необходимо их предварительное прикрепление к твердому субстрату. При культивировании клеток на пластике обнаруживается их тенденция к дифференцировке, что проявляется в изменении морфологии и иммунофенотипа (рис. 14 А и Б).

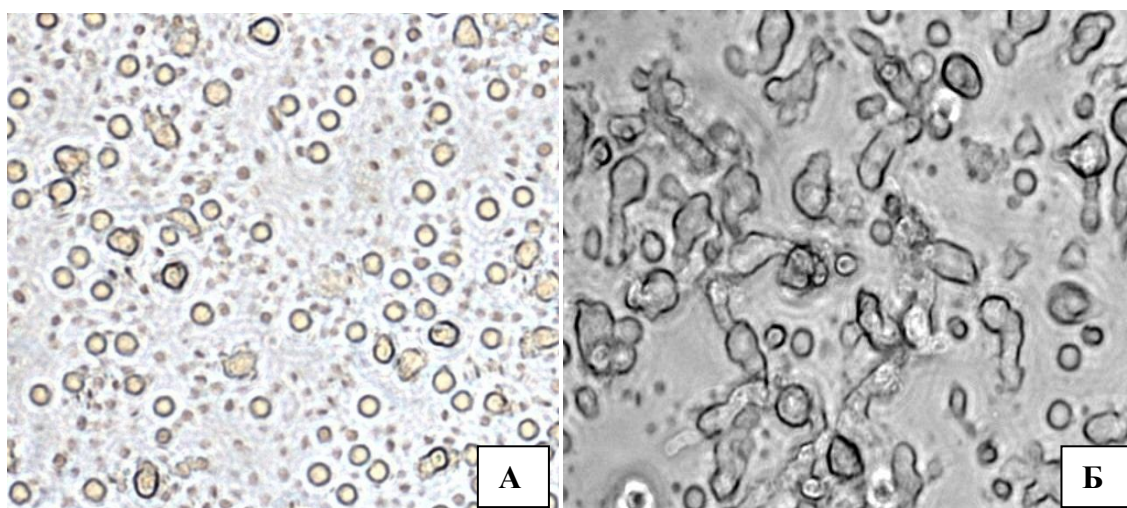


Рис. 14. Прижизненное изображение суспензионной (А) и адгезионной фракции (Б) МНК периферической крови, $\times 400$, инвертированный микроскоп (Leica DMIL, Германия).

Всего в исследование включено 18 образцов лейкоферезного материала и 17 образцов МНК периферической крови больных диссеминированными злокачественными новообразованиями, и 9 образцов периферической крови здоровых лиц (доноры). Оценку качества материала проводили на гематологическом анализаторе крови «SysmexХТ-2000i» (Sysmex, Япония), с помощью светового микроскопа «AxioImager.M1» (CarlZeiss, Германия) и проточного цитофлуориметра «FACSCalibur» с использованием специфических МкАт к CD45, CD14, CD34, CD33, CD13, HLA-DR, CD3, CD19 и изотипического контроля с учетом количества МНК в каждой пробе.

Нами изучалось несколько способов выделения МНК и моноцитов периферической крови (табл. 2-4).

- автоматический метод лейкофереза;
- выделение концентрированного количества МНК в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium;
- адгезия на пластике.

Таблица 2. Основные субпопуляции МНК периферической крови здоровых лиц (доноры) (n=9)

Дифференцировочные антигены	Относительное значение, % M±m, δ	Абсолютное значение, ×10 ⁶ /мл M±m, δ
Моноцитарный гейт		
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁺	91,5±2,11; 5,17	0,68±0,16; 0,51
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁻	8,35±2,11; 5,16	0,083±0,04; 0,11
CD14 ⁺ CD11c ⁻ HLADR ⁺	0	0
CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD33 ⁺	0	0
CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD33 ⁻	0	0
CD14 ⁺ CD34 ⁻ CD33 ⁺	85,5±9,31; 22,81	0,69±0,22; 0,54
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0	0
Лимфоцитарный гейт		
CD3 ⁺ CD19 ⁻	74,66±3,28; 8,04	1,54±0,20; 0,49
CD3 ⁻ CD19 ⁺	11,16±2,46; 6,04	0,24±0,08; 0,19
CD3 ⁺ CD4 ⁺	43,33±1,72; 4,23	0,89±0,12; 0,31
CD3 ⁺ CD8 ⁺	32,5±3,31; 8,12	0,69±0,14; 0,33
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	5,48±3,01; 6,74	0,13±0,09; 0,21
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,15±2,22; 5,43	0,18±0,03; 0,06
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	5,6±1,82; 4,46	0,13±0,06; 0,15
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	2,78±0,48; 1,19	0,051±0,06; 0,02

Примечание: M—среднее значение экспрессии дифференцировочных антигенов, m—ошибка среднего значения, δ—стандартное отклонение.

Таблица 3. Основные субпопуляции моноцитов периферической крови здоровых лиц (доноры), выделенные на градиенте плотности Ficoll-Paque Premium и адгезией на пластике, (n=9)

Дифференцировочные антигены	Периферическая кровь M±m ×10 ⁶ /мл	Градиент плотности, МНК ×10 ⁶ /мл	Число адгезированных моноцитов ×10 ⁶ /мл
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁺	0,68±0,16	6,6	4,7
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁻	0,083±0,04	1,4	1,2
CD14 ⁺ CD34 ⁻ CD33 ⁺	0,69±0,22	8,0	4,3

Международные протоколы получения ДК из моноцитов периферической крови методом адгезии на пластике не учитывали потерю неадгезированных моноцитов, что свидетельствует о недостаточно полном знании субпопуляций моноцитов, дифференцированных в вакцинные ДК. Более того, потеря неадгезированной фракции миелоидных предшественников ДК может отражаться на качестве вакцинного препарата у разных категорий больных.

Таблица 4. Основные субпопуляции моноцитов периферической крови здоровых лиц (доноры), выделенные из МНК в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium, методом адгезии и неадгезированные моноциты (n=9)

Дифференцировочные антигены	Моноциты, выделенные из МНК градиента плотности $\times 10^6/\text{мл}$	Число адгезированных моноцитов $\times 10^6/\text{мл}$	Δ потеря неадгезированных моноцитов %
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁺	6,6	4,7	28,8
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁻	1,4	1,2	14,3
CD45 ⁺ CD34 ⁻ CD33 ⁺	8,0	4,3	46,25

Потерю неадгезированных моноцитов рассчитывали по формуле:

$$\Delta = \frac{\text{МНК град. плотности} - \text{МОН адгез.}}{\text{МНК град. плотности}} \times 100$$

Таблица 5. Основные субпопуляции моноцитов периферической крови больных диссеминированными злокачественными новообразованиями, выделенные из МНК в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium, методом адгезии и неадгезированные моноциты (n=17)

Дифференцировочные антигены	Моноциты, выделенные из МНК градиента плотности $\times 10^6/\text{мл}$	Число адгезированных моноцитов $\times 10^6/\text{мл}$	Δ потеря неадгезированных моноцитов %
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁺	7,3	3,2	56,16
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁻	1,14	0,91	20,17
CD45 ⁺ CD34 ⁻ CD33 ⁺	6,3	2,26	64,12

Как видно из представленных данных в таблице 5, концентрированное количество моноцитов основных субпопуляций МНК, выделенных в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium, обладает различной способностью к адгезии на пластике, что сопровождается их потерей в качестве неадгезированной фракции.

Таким образом, наши исследования показали, что у больных злокачественными новообразованиями содержание адгезированных моноцитов было сниженным по сравнению

с аналогичными образцами, полученными от здоровых лиц (доноры). Потеря неадгезионной фракции миелоидных предшественников ДК (%) составила $46,82 \pm 13,52$ в образцах онкологических больных по сравнению с $29,78 \pm 9,24$ – в группе здоровых лиц (доноры), статистически значимых различий не обнаружено ($p=0,36$; $>0,05$). Это означает, что для дифференцировки ДК можно использовать периферическую кровь онкологических больных.

3.2. Стандартизация оптимальных условий криоконсервации МНК и моноцитов из аферезного материала и периферической крови

Технология получения дендритноклеточных вакцин в ряде случаев предполагает криоконсервацию аутологичных миелоидных предшественников в аферезном материале, периферической крови, моноцитов выделенных в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium МНК или адгезированных на пластике (Cabezudo E. et al., 2000; Strasser E.F., 2010). Для криоконсервации объекта исследования мы использовали: 1) аутологичную плазму; 2) АВ (IV) гр. сыворотки человека; 3) бессывороточную криосреду и 10% диметилсульфоксид.

Суспензию клеток в криосреде, в мешках для глубокой заморозки клеток и тканей (-195), изготовленных из специального пластика (OriGen Biomedical, США) или пропиленовых криопробирках (4,5 мл и 1,8 мл), криоконсервировали с помощью программного замораживателя «Ice-Cube 14S», (SY-Lab Gerate GmbH, Австрия). В ряде экспериментов в качестве первого этапа использовали пенопластовый контейнер с толщиной стенок не менее 15 мм и выдерживали в парах жидкого азота или помещали в холодильную камеру -80°C с последующим хранением в жидкой среде азота (-196°C).

Во всех случаях изучали рецепторы для специфических факторов роста и дифференцировки, так как по мере созревания миелоидных предшественников ДК в их цитоплазме и на поверхности появляются и исчезают маркеры дифференцировки, увеличивается уровень экспрессии молекул МНС II класса. Наиболее важная роль отводится экспрессии CD34, CD33, CD14, CD11c и HLA-DR антигенов (Ярилин А.А., 2010; Clanchy F.I. et al., 2006; Gorczyca W. et al., 2011).

В связи с этим, актуальным становится разработка лабораторной методики оценки и контроля качества экспрессии вышеперечисленных антигенов в свежесыделенном, криоконсервированном или криоконцентрированном (концентрация в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium) лейкоаферезном материале больных злокачественными новообразованиями. Изучению этой проблемы посвящено настоящее исследование.

Было изучено 18 образцов лейкоаферезного материала больных диссеминированными злокачественными новообразованиями, образцы 15 из которых были криоконсервированы с помощью программного замораживания клеток и помещены в криохранилище Банка долговременного хранения биологического материала НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Исследовали содержание основных субпопуляций моноцитов периферической крови в лейкоаферезном материале больных диссеминированными злокачественными новообразованиями до и после криоконсервации, а также субпопуляций моноцитов, концентрированных на градиенте плотности Ficoll-Paque Premium после криоконсервации

(криоконцентрация) с помощью моноклональных антител и проточной цитофлуориметрии (табл. 6).

Таблица 6. Содержание основных субпопуляций моноцитов периферической крови больных диссеминированными злокачественными новообразованиями в лейкоцитарном материале до и после криоконсервации и после криоконцентрации

Дифференцировочные антигены	До криоконсервации, (%) M±m, δ	После криоконсервации, (%) M±m, δ	После криоконцентрации, (%) M±m, δ
Моноцитарный гейт			
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁺	35,66±2,96 δ=5,13	31,75±1,31 δ=2,63	34,25±8,22 δ=16,45
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁻	45,33±2,33 δ=4,04	26±4,98 δ=9,96	17,75±1,75 δ=3,5
CD14 ⁺ CD11c ⁻ HLADR ⁺	0,2±0,2 δ=0,34	1,23±0,44 δ=0,88	0,55±0,05 δ=0,1
CD14 ⁺ CD34 ⁺	0,13±0,08 δ=0,14	0,49±0,11 δ=0,22	0,45±0,1 δ=0,21
CD14 ⁺ CD33 ⁺	70±5,03 δ=8,71	51,75±5,76 δ=11,53	52±8,39 δ=16,79

Примечание: M–среднее значение экспрессии дифференцировочных антигенов, m–ошибка среднего значения, δ–стандартное отклонение.

Как видно из представленных данных содержание изучаемых субпопуляций моноцитов периферической крови в лейкоцитарном материале больных диссеминированными злокачественными новообразованиями до и после криоконсервации, а также после криоконцентрации, претерпевает видимые изменения. Это стало предпосылкой для углубленного изучения обнаруженного феномена в связи с разработкой технологии получения ДК человека контролируемого качества.

Был проведен сравнительный анализ относительного содержания CD14⁺ моноцитов периферической крови в образцах лейкоцитарного материала до и после криоконсервации, который позволил выявить статистически значимое снижение содержания CD14⁺CD11c⁺HLA-DR⁻ клеток [45,33±2,33 и 26±4,98 (p<0,05)] и тенденцию к снижению числа CD14⁺CD33⁺ субпопуляции моноцитов после криоконсервации. Вместе с тем обнаружена тенденция к увеличению содержания клеток, экспрессирующих CD14⁺CD11c⁻HLA-DR⁺ и CD14⁺CD34⁺ антигены, что свидетельствует о влиянии ультранизких температур на экспрессию изучаемых антигенов (табл. 7).

Таблица 7. Содержание основных субпопуляций моноцитов периферической крови больных диссеминированными злокачественными новообразованиями в лейкоферезном материале до и после криоконсервации

Дифференцировочные антигены	До криоконсервации, (%) $M \pm m, \delta$	После криоконсервации, (%) $M \pm m, \delta$	Критерий Фишера (F) уровень значимости (p)
Моноцитарный гейт			
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁺	35,66±2,96 $\delta=5,13$	31,75±1,31 $\delta=2,63$	F=4,32 p=0,09 (>0,05)
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁻	45,33±2,33 $\delta=4,04$	26±4,98 $\delta=9,96$	F=9,68 p=0,02 (<0,05)
CD14 ⁺ CD11c ⁻ HLADR ⁺	0,2±0,2 $\delta=0,34$	1,23±0,44 $\delta=0,88$	F=3,55 p=0,11 (>0,05)
CD14 ⁺ CD34 ⁺	0,13±0,08 $\delta=0,14$	0,49±0,11 $\delta=0,22$	F=5,8 p=0,06 (>0,05)
CD14 ⁺ CD33 ⁺	70±5,03 $\delta=8,71$	51,75±5,76 $\delta=11,53$	F=5,18 p=0,07 (>0,05)

Примечание: M – среднее значение экспрессии дифференцировочных антигенов, m – ошибка среднего значения, δ – стандартное отклонение.

Исследование экспрессии дифференцировочных антигенов на CD14⁺ моноцитах после криоконсервации и криоконцентрации не выявило статистически значимых изменений (табл. 8) и может свидетельствовать о нецелесообразности концентрации моноцитов для повышения качества клеточного субпродукта после криоконцентрации.

Таблица 8. Содержание основных субпопуляций моноцитов периферической крови больных диссеминированными злокачественными новообразованиями в лейкоферезном материале после криоконсервации и криоконцентрации

Дифференцировочные антигены	После криоконсервации, (%) $M \pm m, \delta$	После криоконцентрации, (%) $M \pm m, \delta$	Критерий Фишера (F) уровень значимости (p)
Моноцитарный гейт			
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁺	31,75±1,31 $\delta=2,63$	34,25±8,22 $\delta=16,45$	F=0,08 p=0,77 (>0,05)
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁻	26±4,98 $\delta=9,96$	17,75±1,75 $\delta=3,5$	F=2,43 p=0,16 (>0,05)
CD14 ⁺ CD11c ⁻ HLADR ⁺	1,23±0,44 $\delta=0,88$	0,55±0,05 $\delta=0,1$	F=2,37 p=0,17 (>0,05)

CD14 ⁺ CD34 ⁺	0,49±0,11 δ=0,22	0,45±0,1 δ=0,21	F=0,08 p=0,77 (>0,05)
CD14 ⁺ CD33 ⁺	51,75±5,76 δ=11,53	52±8,39 δ=16,79	F=0,0006 p=0,98 (>0,05)

Примечание: M–среднее значение экспрессии дифференцировочных антигенов, m–ошибка среднего значения, δ–стандартное отклонение.

Сравнительный анализ относительного содержания основных субпопуляций моноцитов периферической крови у больных диссеминированными злокачественными новообразованиями в лейкоферезном продукте после криоконсервации и криоконцентрации представлен в табл. 9.

Таблица 9. Содержание основных субпопуляций моноцитов периферической крови больных диссеминированными злокачественными новообразованиями в лейкоферезном материале до криоконсервации и после криоконцентрации

Дифференцировочные антигены	До криоконсервации, (%) M±m, δ	После криоконцентрации, (%) M±m, δ	Критерий Фишера (F) уровень значимости (p)
Моноцитарный гейт			
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁺	35,66±2,96 δ=5,13	34,25±8,22 δ=16,45	F=0,72 p=0,43 (>0,05)
CD14 ⁺ CD11c ⁺ HLADR ⁻	45,33±2,33 δ=4,04	17,75±1,75 δ=3,5	F=93,94 p=0,0001 (<0,05)
CD14 ⁺ CD11c ⁻ HLADR ⁺	0,2±0,2 δ=0,34	0,55±0,05 δ=0,1	F=3,88 p=0,1 (>0,05)
CD14 ⁺ CD34 ⁺	0,13±0,08 δ=0,14	0,45±0,1 δ=0,21	F=5,01 p=0,07 (>0,05)
CD14 ⁺ CD33 ⁺	70±5,03 δ=8,71	52±8,39 δ=16,79	F=2,78 p=0,15 (>0,05)

Примечание: M–среднее значение экспрессии дифференцировочных антигенов, m–ошибка среднего значения, δ–стандартное отклонение.

Полученные данные отражают статистически значимое снижение числа CD14⁺CD11c⁺HLA-DR⁻ клеток [45,33±2,33 и 17,75±1,75 (p=0,0001)] в образцах после криоконцентрации, что наряду с тенденцией к увеличению содержания моноцитов с экспрессией CD14⁺CD11c⁻HLA-DR⁺ молекул (0,2±0,2 и 0,55±0,05 соответственно) и CD14⁺CD34⁺ антигенов (0,13±0,08 и 0,45±0,1 соответственно) может свидетельствовать о неоднозначном влиянии ультранизких температур на экспрессию дифференцировочных миелоидных антигенов и увеличении числа клеток с повышенным потенциалом к дальнейшей дифференцировке.

Несомненно, эти качественные характеристики субпопуляций моноцитов периферической крови могут быть положены в основу лабораторной оценки контроля качества клеточного субпродукта при производстве противоопухолевых

дендритноклеточных вакцин. При этом в соответствии с требованиями GMP и GLP к продукту подобного качества нами были разработаны критерии стандартной операционной процедуры (СОП), представленные в Приложении 3.

Таким образом, установлено:

- моноциты периферической крови больных диссеминированными злокачественными новообразованиями обладают различной способностью к адгезии на пластике и происходит их потеря в качестве неадгезированных моноцитов от 14,3% ($CD14^+CD11c^+HLADR^-$) до 46,3% ($CD45^+CD34^-CD33^+$);
- разделение популяции $CD14^+$ моноцитов в соответствии с экспрессией антигена
- $HLADR^+$ приводит к разграничению по экспрессии $CD11c^+$ и $CD33^+$ антигенов как по количеству моноцитов, концентрированных на градиенте плотности Ficoll-Paque Premium, так и методом адгезии на пластике;
- криоконсервация и криоконцентрация лейкоферезного материала сопровождается статистически значимым снижением числа $CD14^+CD11c^+HLA-DR^-$ клеток ($p=0,0001$), что наряду с тенденцией к увеличению содержания моноцитов, экспрессирующих $CD14^+CD11c^-HLA-DR^+$ и $CD14^+CD34^+$ антигены, свидетельствует об увеличении числа клеток с повышенным потенциалом к дальнейшей дифференцировке.

Глава 4

Оптимизация и стандартизация условий дифференцировки вакцинных ДК

Дифференцировка вакцинных ДК из миелоидных предшественников аферезного материала и периферической крови *ex vivo* с использованием различных питательных сред, сывороток, ростовых факторов и факторов дифференцировки в ряде случаев препятствует получению стандартного клеточного продукта охарактеризованного качества (Figdor C.G. et al., 2004; Draube A. et al., 2010; Chiang C.L. et al., 2011). В частности, появление на фармацевтическом рынке GM-CSF отечественного производства «Неостим» (Фармсинтез, Россия) для клинического применения, позволяет заменить дорогостоящий импортный аналог GM-CSF (CellGenix, Германия), используемый до настоящего времени, и в 4 раза снизить стоимость дендритноклеточной вакцины. Вместе с тем предполагаемый технологический переход не изучен. Более того, не определена оптимальная экономически обоснованная концентрация IL-4 в присутствии которого осуществляется дифференцировка ДК из миелоидных предшественников. В более чем 200 клинических исследованиях (1998-2013 г.г.) были использованы различные концентрации IL-4, чаще от 6,75 нг/мл до 180 нг/мл без достаточно аргументированного обоснования (Bohnenkamp H.R. et al., 2003; Ning J. et al., 2011). Несомненно, это затрудняет стандартизацию производства противоопухолевых дендритноклеточных вакцин и определяет проблему научного поиска оптимизации и стандартизации условий дифференцировки и активации вакцинных ДК для опухолеспецифического лечения больных злокачественными новообразованиями.

4.1. Изучение влияния ростового фактора GM-CSF импортного (GM-CSF¹) и отечественного (GM-CSF²) производства на дифференцировку ДК *ex vivo*

Дифференцировку ДК из адгезионной фракции МНК периферической крови больных злокачественными новообразованиями проводили в сбалансированной бессывороточной среде CellGro DC, приготовленной в условиях надлежащей производственной практики GMP (CellGenix, Германия), адгезионных культуральных флаконах с вентилируемыми крышками (Sarstedt, Германия) в условиях CO₂ инкубатора «Heracel» (Termo Electron LTD GmbH, Германия) при 37°C, 5% CO₂ и 98% влажности.

Ростовые факторы вносили на 1-й, 3-й и 5-й день культивирования (незрелые ДК₍₇₎). На 7-й день вносили коктейль лизированных охарактеризованных аутологичных и/или аллогенных опухолевых клеток (клеточные линии Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520), экспрессирующих иммуногенные РТА (NY-ESO-1⁺, MAGE⁺, BAGE⁺, GAGE⁺) и фактор

некроза опухоли (TNF α) 20 нг/мл (BD, США). Инкубацию с опухолевым лизатом проводили в течение 48 ч для получения зрелых ДК₍₉₎.

Подсчет количества и оценку жизнеспособности ДК осуществляли с помощью автоматического счетчика клеток «Countess» и 0,4 % трипанового синего. Экспрессию линейноспецифических и дифференцировочных антигенов на зрелых ДК изучали методом: 1) иммуноцитохимического окрашивания (моноклональные антитела и система визуализации «In vision»; 2) лазерной проточной цитофлюориметрии BD FACSCalibur (tm) и напрямую меченых флюорохромами моноклональных антител (anti-CD83-PE-Cy5, anti-CD1a-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CCR7-FITC, anti-HLA-DR-Per CP-Cy5.5). В последнем случае использовали программное обеспечение CellQuest Pro (tm).

Изучали влияние GM-CSF¹ импортного производства (контроль) и GM-CSF² отечественного производства (опыт) ранее установленной концентрации 72 нг/мл в сочетании с IL-4 (45 нг/мл) на экспрессию CD14, CD1a, CD83, CD80, CD86, CCR7, HLA-DR антигенов зрелых ДК (табл. 10).

Таблица 10. Иммунофенотип зрелых ДК, дифференцированных в присутствии GM-CSF импортного (контроль) и отечественного (опыт) производства

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	GM-CSF ¹ (контроль) (%) M \pm m, δ (n=16)	GM-CSF ² (опыт) (%) M \pm m, δ (n=20)	Критерий Фишера (F) уровень значимости (p) достоверность различий
CD14 ⁺	6,12 \pm 2,34; 5,17	2,02 \pm 0,91; 3,18	F=3,91 p=0,07 (>0,05)
CD1a ⁺	20,08 \pm 9,13; 23,01	24,03 \pm 9,11; 26,22	F=0,07 p=0,79 (>0,05)
CD83 ⁺	66,14 \pm 4,21; 10,12	82,15 \pm 6,07; 18,34	F=3,85 p=0,07 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	13,23 \pm 6,16; 15,32	13,11 \pm 5,01; 15,12	F=0,001 p=0,97 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	8,12 \pm 4,21; 11,15	10,12 \pm 4,06; 13,10	F=0,08 p=0,78 (>0,05)
CD1a ⁻ CD83 ⁺	59,41 \pm 7,26; 17,16	72,22 \pm 9,12; 27,15	F=1,10 p=0,31 (>0,05)
CD83 ⁺ CD86 ⁺	51,24 \pm 6,12; 15,16	47,05 \pm 7,11; 21,14	F=0,11 p=0,74 (>0,05)
CD83 ⁺ CD80 ⁺	65,25 \pm 4,12; 9,06	78,23 \pm 5,07; 15,10	F=3,63 p=0,08 (>0,05)
CCR7 ⁺	82,56 \pm 11,31; 28,31	83,23 \pm 8,02; 24,14	F=0,01 p=0,94 (>0,05)
CCR7 ⁺ CD83 ⁺	64,14 \pm 7,16;	76,16 \pm 9,13;	F=0,74

	13,05	23,43	p=0,41 (>0,05)
HLA DR ⁺	91,31±5,33; 12,14	93,03±2,11; 6,23	F=0,17 p=0,68 (>0,05)

Примечание: М – среднее значение экспрессии антигенов, m – ошибка среднего значения, δ – стандартное отклонение; концентрация GM-CSF (72 нг/мл), IL-4 (45 нг/мл).

Как видно из представленных данных в опытных образцах (GM-CSF²) наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии маркеров зрелых ДК по сравнению с контрольными образцами (GM-CSF¹): CD83⁺ (82,15±6,07 и 66,14±4,21 соответственно), CD1a⁻CD83⁺ (72,22±9,12 и 59,41±7,26 соответственно); увеличение клеток с экспрессией костимулирующего и хемокинового сигнала: CD83⁺CD80⁺ (78,23±5,07 и 65,25±4,12 соответственно) и CCR7⁺CD83⁺ (76,16±9,13 и 64,14±7,16 соответственно). Вместе с тем эти показатели не различались столь достоверно (>0,05), но свидетельствовали о способности клеток-мишеней достаточно убедительно отвечать на стимулы одной величины.

Таким образом, в результате сравнения влияния GM-CSF импортного и отечественного производства на экспрессию антигенов дифференцировки зрелых ДК было установлено, что они обладают сходным фармакологическим воздействием. Для снижения стоимости дендритноклеточных вакцин целесообразно использовать GM-CSF отечественного производства.

4.2. Изучение влияния различных концентраций IL-4 на дифференцировку ДК ex vivo

С целью снижения стоимости дендритноклеточных вакцин и рационального использования IL-4, произведенного в условиях GMP (CellGenix, Германия), было изучено его влияние на экспрессию CD1a⁺, CD209⁺, CD40⁺, HLA-DR⁺, CD86⁺, CD80⁺ антигенов на незрелых и зрелых ДК. Эффективность IL-4 оценивали в диапазоне концентраций от 5 до 45 нг/мл. Контрольный образец ДК не содержал IL-4 и был получен в присутствии ростового фактора GM-CSF (72 нг/мл).

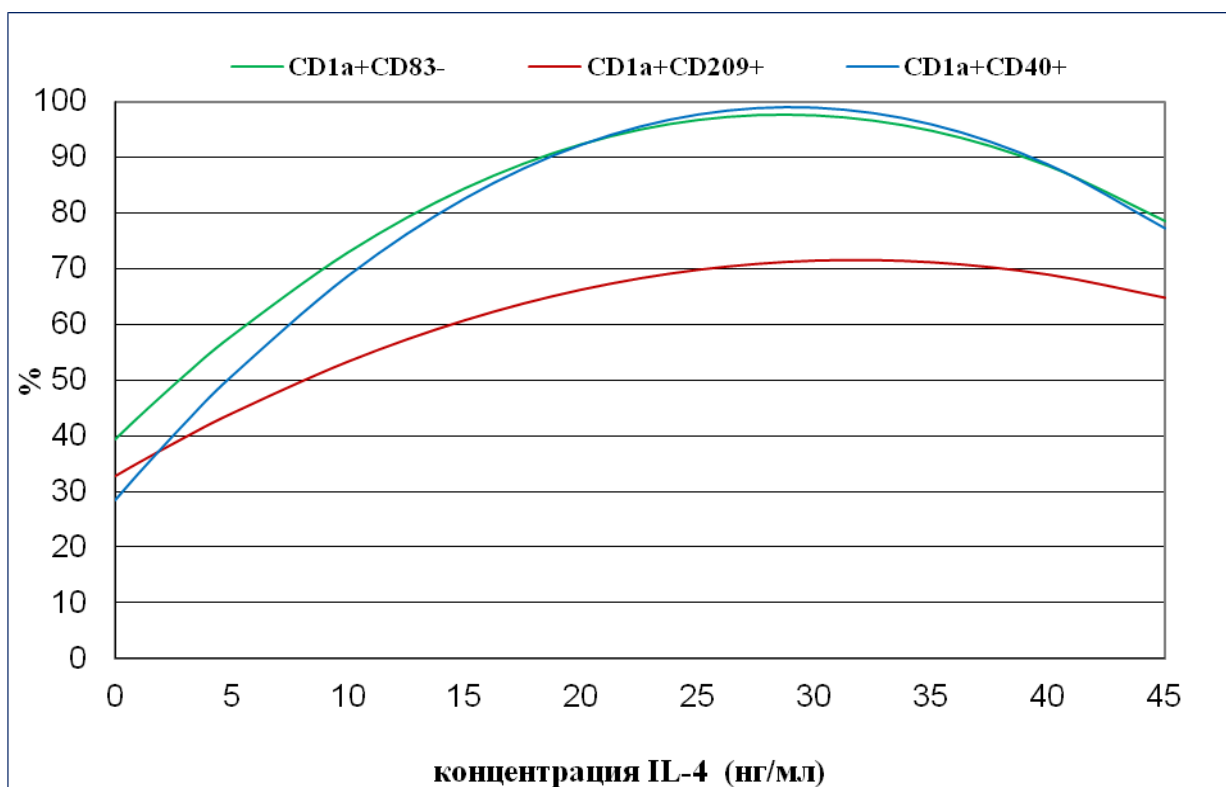


Рис. 15 А. Экспрессия CD1a, CD83, CD209 и CD40 антигенов на незрелых ДК в диапазоне концентрации IL-4 от 5 до 45 нг/мл.

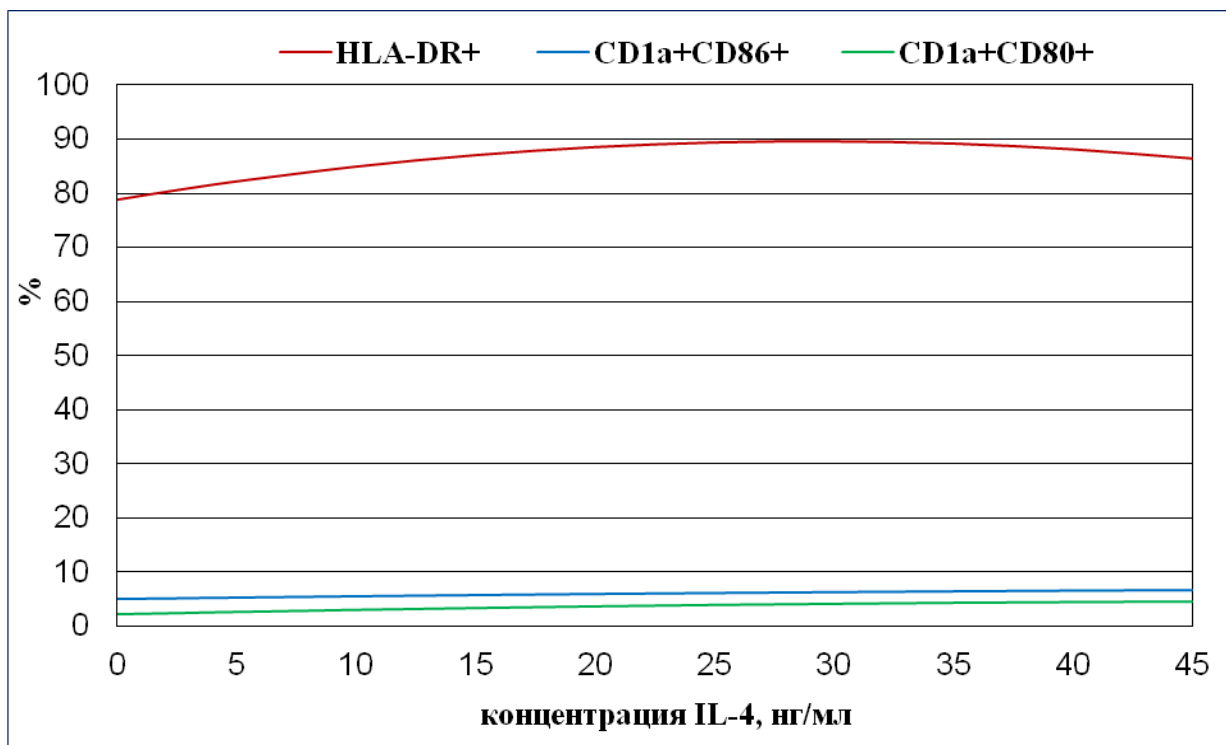


Рис. 15 Б. Экспрессия CD1a, HLA-DR, CD80 и CD86 антигенов на незрелых ДК в диапазоне концентрации IL-4 от 5 до 45 нг/мл.

Анализ экспрессии изучаемых маркеров (рис. 15 А и Б) на незрелых ДК не выявил статистически значимых изменений в увеличении концентрации ИЛ-4 от 20 до 45 нг/мл. На основе однофакторного регрессионного анализа были получены полиномиальные модели второго порядка: $Y_i = A_0 + A_1 \times C + A_2 \times C^2$ (1), где: Y_i – уровень экспрессии иммунофенотипического маркера (%), соответственно для: $Y_1(CD1a^+CD83^-)$, $Y_2(CD1a^+CD86^+)$, $Y_3(CD1a^+CD80^+)$, $Y_4(CD1a^+CD40^+)$, $Y_5(CD1a^+CD209^+)$, $Y_6(HLA-DR^+)$; A_0 , A_1 , A_2 – численные значения коэффициентов моделей; C – концентрация ИЛ-4, нг/мл. Коэффициенты детерминации моделей (R^2) составили от 70,0 до 82,0. Это свидетельствует о возможности корректного применения выражения (1) для определения зависимости изменений соответствующей величины (Y_i) от параметра (C).

Таким образом, для дифференцировки ДК *ex vivo* оптимальная концентрация ИЛ-4 находится в интервале от 5 до 20 нг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации не приводит к значимому повышению уровня экспрессии изучаемых маркеров. Установление этого факта позволит уменьшить расход ИЛ-4 импортного производства от 3 до 5 раз.

4.3. Изучение влияния IFN- α на дифференцировку ДК *ex vivo*

С целью повышения эффективности бюджетных расходов на лечение больных злокачественными новообразованиями и снижения стоимости дендритноклеточных вакцин нами был изучен аналог ИЛ-4 – интерферон-альфа (IFN- α), который в последнее время рассматривается как фактор, способствующий ускоренному созреванию ДК в сочетании с GM-CSF (Della B.S. et al., 2004; Parlato S. et al., 2011) (табл. 11).

Таблица 11. Иммунофенотип незрелых ДК, дифференцированных в присутствии GM-CSF + ИЛ-4 (ДК1) и GM-CSF + IFN- α (ДК2)

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	ДК1 M \pm m; δ (n=18)	ДК2 M \pm m; δ (n=20)	Критерий Фишера (F); уровень значимости (p)	Критерий Стьюдента (T), уровень значимости (p)
CD11c ⁺	94,88 \pm 2,95; 8,85	96,42 \pm 1,28; 3,4	F = 0,18 p = 0,67 (>0,05)	T=0,47 p=0,64 (>0,05)
CD14 ⁺	0	23,28 \pm 2,94; 7,78	-	-
HLA-DR ⁺	94,55 \pm 0,94; 2,83	91,14 \pm 4,78; 12,66	F = 0,62 p = 0,44 (>0,05)	T=0,69 p=0,59 (>0,05)
CD1a ⁺	76,78 \pm 4,15; 12,47	52,28 \pm 6,67; 16,65	F = 10,62 p = 0,006 (<0,05)	T=3,11 p=0,01 (<0,05)

CD83 ⁺	2,67±1,61; 4,82	25,14±4,95; 13,10	F = 22,88 p = 0,0002 (<0,05)	T=4,31 p=0,003(<0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	75,55±4,43; 13,31	37±4,68; 12,39	F = 35,04 p = 0,000 (<0,05)	T=5,97 p=0,000 (<0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	1,22±0,76; 2,28	17,71±4,03; 10,67	F = 20,68 p = 0,0004 (<0,05)	T=4,02 p=0,006 (<0,05)
CD1a ⁻ CD83 ⁺	1,44±0,85; 2,55	7,42±1,46; 3,86	F = 13,91 p = 0,002 (<0,05)	T=3,53 p=0,005 (<0,05)
CD1a ⁺ CD86 ⁺	17,33±5,43; 16,3	18,42±4,6; 12,17	F = 0,02 p = 0,88 (>0,05)	T=0,15 p=0,43 (>0,05)
CD1a ⁺ CD80 ⁺	2,44±0,86; 2,6	11,28±2,15; 5,7	F = 17,26 p = 0,0009 (<0,05)	T=3,81 p=0,005 (<0,05)
CD1a ⁺ CD209 ⁺	64,66±6,69; 23,09	17,57±5,33; 14,11	F = 22,38 p = 0,0003 (<0,05)	T=5,02 p=0,0002 (<0,05)

При анализе результатов иммунофенотипирования незрелых ДК, дифференцированных из миелоидных предшественников в присутствии GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (15 нг/мл) – ДК1; GM-CSF (72 нг/мл) и IFN-α (90 нг/мл) – ДК2 (Korthals M. et al., 2007) на 7-й день культивирования было установлено, что популяция ДК2 содержит клетки с экспрессией моноцитарного компонента CD14 (23,28±2,94) по сравнению с отсутствием подобных клеток в популяции ДК1, дифференцированных в присутствии IL-4. Кроме того, в популяции ДК2 наблюдается статистически значимое снижение количества незрелых CD1a⁺ ДК (52,28±6,67) по сравнению с ДК1 (76,78±4,15) (p<0,05) и увеличение зрелых CD83⁺ ДК [25,14±4,95 и 2,67±1,61 (p<0,05) соответственно]. При этом имело место значимое различие в числе клеток с костимулирующим сигналом CD80⁺ [11,28±2,15 и 2,44±0,86 (p<0,05) соответственно] и миграционной способностью CD1a⁺CD209⁺ ДК [17,57±5,33 и 64,66±6,69 (p<0,05) соответственно]. Это подтверждает ускоренное созревание ДК под воздействием IFN-α в изучаемый период наблюдения и является некорректным при изготовлении противоопухолевых дендритноклеточных вакцин, так как иммунофенотип незрелых ДК должен приближаться к значениям CD14⁻CD1a⁺CD83⁻, что в большей степени соответствует характеристике ДК, дифференцированных в присутствии IL-4 (ДК1).

Интерес представило изучение динамики экспрессии антигенов ДК, дифференцированных в присутствии GM-CSF и IFN-α в более ранний период наблюдения, 4-й день культивирования (табл. 12).

Таблица 12. Иммунофенотип незрелых ДК, дифференцированных в присутствии GM-CSF и IFN-α на 4-й (ДК₄) и 7-й (ДК₇) день культивирования

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	ДК ₄ (%) M±m, δ	ДК ₇ (%) M±m, δ	Критерий Фишера (F); уровень	Критерий Стьюдента (T), уровень
---	----------------------------------	----------------------------------	------------------------------------	---------------------------------------

	(n=14)	(n=20)	значимости (p)	значимости (p)
CD11c ⁺	95,01±1,02; 2,71	96,42±1,28; 3,4	F = 0,75 p = 0,4 (>0,05)	T=1,93 p=0,08 (>0,05)
CD14 ⁺	20,85±1,92; 5,08	23,28±2,94; 7,78	F = 0,47 p = 0,51 (>0,05)	T=0,69 p=0,51 (>0,05)
HLA-DR ⁺	94,33±0,61; 1,5	91,14±4,78; 12,66	F = 0,37 p = 0,55 (>0,05)	T=0,66 p=0,53 (>0,05)
CD1a ⁺	51,02±3,55; 9,39	52,28±6,67; 16,65	F = 0,03 p = 0,86 (>0,05)	T=0,17 p=0,86 (>0,05)
CD83 ⁺	22,42±2,72; 7,20	25,14±4,95; 13,10	F = 0,23 p = 0,63 (>0,05)	T=0,32 p=0,64 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	43,14±3,12; 8,25	37±4,68; 12,39	F = 1,19 p = 0,29 (>0,05)	T=1,09 p=0,31 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	8±1,41; 3,74	17,71±4,03; 10,67	F = 5,16 p = 0,04 (<0,05)	T = 0,02 p = 0,05 (<0,05)
CD1a ⁻ CD83 ⁺	14,57±2,03; 5,38	7,42±1,46; 3,86	F = 8,14 p = 0,014 (<0,05)	T=2,85 p=0,016 (<0,05)
CD1a ⁺ CD86 ⁺	13,71±2,24; 5,93	18,42±4,6; 12,17	F = 0,84 p = 0,37 (>0,05)	T=0,92 p=0,38 (>0,05)
CD1a ⁺ CD80 ⁺	10,42±1,65; 4,39	11,28±2,15; 5,7	F = 0,09 p = 0,75 (>0,05)	T=0,32 p=0,76 (>0,05)
CD1a ⁺ CD209 ⁺	10,71±3,24; 8,59	17,57±5,33; 14,11	F = 1,21 p = 0,29 (>0,05)	T=1,09 p=0,29 (>0,05)

Анализ динамики изменения экспрессии ключевых CD14, CD1a и CD83 антигенов на 4-й и 7-й день культивирования в присутствии GM-CSF и IFN- α не выявил статистически значимых отличий, что свидетельствует о некорректном использовании незрелых ДК₄ и ДК₇ в качестве субпродукта при получении противоопухолевых дендритноклеточных вакцин. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о преимуществе П-4 в дифференцировке ДК из миелоидных предшественников *ex vivo* по сравнению с IFN- α в изучаемый период наблюдения (4-й и 7-й день).

4.4. Изучение влияния питательных сред на дифференцировку и созревание ДК

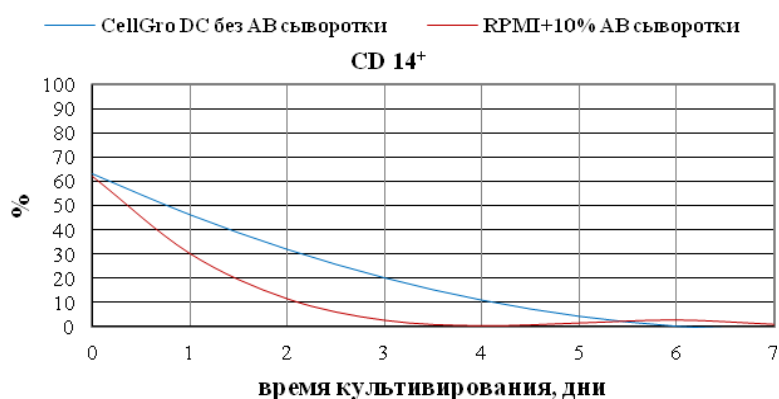
Для дифференцировки и созревания ДК *ex vivo* используются различные питательные среды: AIM-V, RPMI-1640, DMEM, X-VIVO 15, CellGroDC, при необходимости обогащенные от 2 до 10% плазмой крови, сывороткой (аутологичной или аллогенной), очищенными белками (сывороточный альбумин, телячья эмбриональная сыворотка), сывороткой АВ человека (Tuschong L. et al., 2002; Kadri N et al., 2007; Lindroos B. et al., 2009).

В настоящей работе было проведено сравнительное исследование использования разных типов питательных сред. Бессывороточная среда CellGro DC (CellGenix, Германия), изготовленная в условиях GMP стандартов, стерильная, которая в своем составе содержит

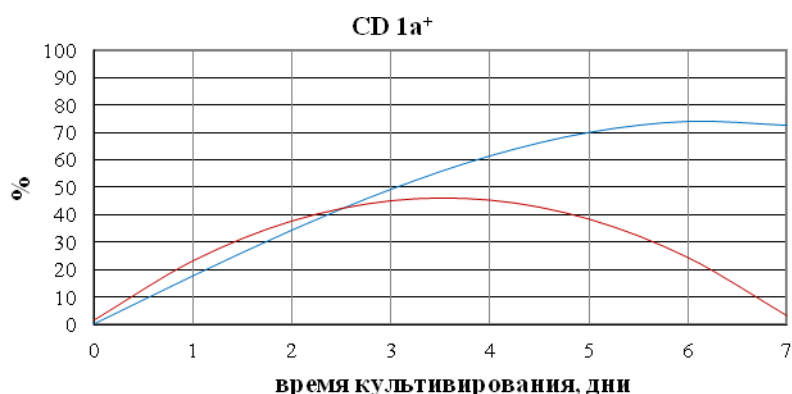
смесь солей, аминокислот, витаминов и глюкозы, растворенных в очищенной воде и стерилизованных фильтрованием и предназначена для культивирования в монослое и суспензии ДК человека и традиционно используемой питательной среды RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки АВ человека. Вместе с тем применение CellGro DC среды для дифференцировки ДК человека с целью производства дендритноклеточных вакцин, стандартизации метода требует изучения ее безопасности и эффективности на основе: 1) экспрессии антигенов дифференцировки незрелых и зрелых ДК; 2) сравнения с более обогащенной DC средой и другими питательными средами.

4.4.1. Оценка иммунофенотипа ДК, дифференцированных на различных питательных средах: контроль качества

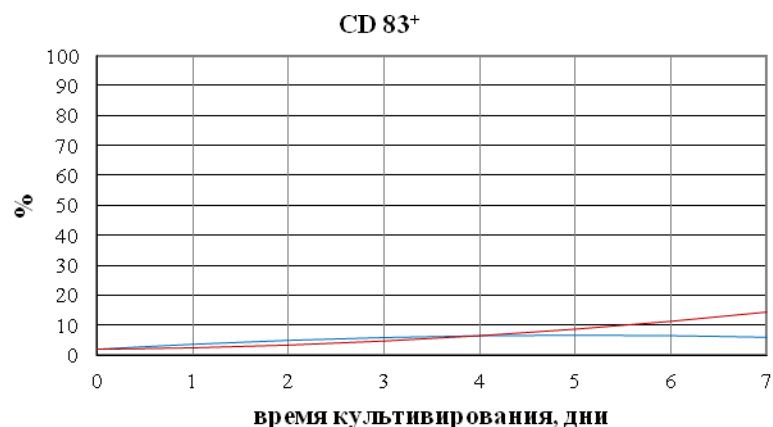
В этом разделе работы изучали динамику экспрессии CD14, CD1a, CD83 и CD86 антигенов на ДК, дифференцированных на различных питательных средах ежедневно с 1-го по 7-й день культивирования (рис. 16 А, Б, В, Г).



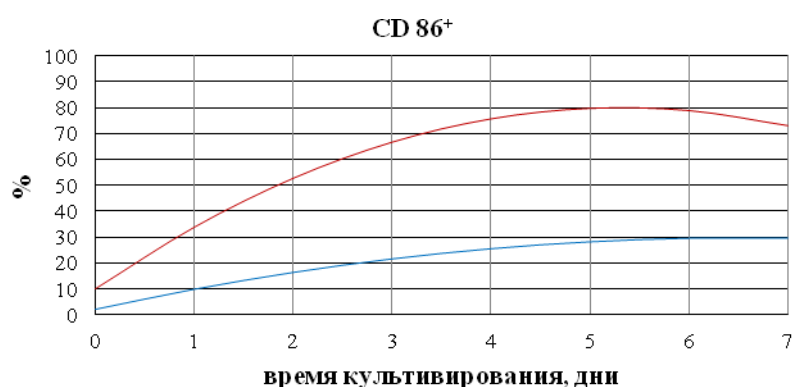
А



Б



В



Г

Рис. 16 А, Б, В, Г. Динамика изменений экспрессии дифференцировочных антигенов CD14, CD1a, CD83 и CD86 на ДК в процессе культивирования на различных питательных средах.

Изучение динамики изменений экспрессии дифференцировочных антигенов CD14, CD1a, CD83 и CD86 в указанном временном интервале проводили на основе однофакторного регрессионного анализа. При этом были использованы полиномиальные модели второго и третьего порядка: $Y_1 = A_0 + A_1 \times t + A_2 \times t^2$ (2), $Y_1 = A_0 + A_1 \times t + A_2 \times t^2 + A_3 \times t^3$ (3), где Y_1 – уровень экспрессии соответствующего дифференцировочного антигена миелоидных предшественников ДК культивируемых на питательных средах с/без АВ сыворотки (%); A_0, A_1, A_2, A_3 – численные значения коэффициентов моделей; t – время культивирования, дни.

В результате вычислений для оценки изменений экспрессии антигенов на бессывороточной среде CellGro DC получены выражения:

$$Y_1 (CD14^+) = 62,91 - 18,06 \times t + 1,27 \times t^2 \quad (4); \quad Y_2 (CD1a^+) = 0,5 + 17,65 \times t - 0,15 \times t^3 \quad (5);$$

$$Y_3 (CD83^+) = 2,01 + 1,82 \times t - 0,18 \times t^2 \quad (6); \quad Y_4 (CD86^+) = 2,35 + 8,28 \times t - 0,62 \times t^2 \quad (7).$$

Для оценки динамики экспрессии антигенов в образцах питательной среды CellGro DC с АВ сывороткой получены выражения:

$Y_5 (CD14^+) = 61,95 - 39,46 \times t + 8,17 \times t^2 - 0,54 \times t^3$ (8); $Y_6 (CD1a^+) = 1,92 + 25,14 \times t - 3,56 \times t^2$ (9); $Y_7 (CD83^+) = 1,75 + 0,29 \times t + 0,22 \times t^2$ (10); $Y_8 (CD86^+) = 10,27 + 26,29 \times t - 2,47 \times t^2$ (11).

Статистический анализ выражений (4-11) показывает, что коэффициенты детерминации (R^2) находятся в интервале от 93,29 до 99,98, величина критерия Фишера (F) – от 20,85 до 67,69, уровень значимости (p) – от 0,0002 до 0,017 (<0,05). Это свидетельствует об информационной способности и достоверности моделей (4-11), описывающих изменения уровня экспрессии исследованных дифференцировочных антигенов на различных питательных средах в динамике наблюдения (t) от 0 до 7 дней.

Анализ экспрессии антигена зрелых миелоидных предшественников ДК – CD14 и дифференцировочного антигена незрелых ДК – CD1a при культивировании в среде RPMI-1640 + 10% АВ сыворотки демонстрирует относительно быстрое начало дифференцировки ДК с 1-го – 2-го дня культивирования. Вместе с тем наряду с отсутствием экспрессии CD14 на 3-й – 4-й день наблюдения, уже к 4-му дню нарастает уровень экспрессии CD1a антигена, костимулирующего сигнала CD86 и экспрессии CD83 антигена (маркер зрелых ДК), что может свидетельствовать об их ускоренном неспецифическом созревании. При дальнейшем наблюдении к 7-му дню созревания ДК происходит утрата экспрессии CD1a антигена, что отражает их низкую функциональную (антигенпоглощающую) активность на данном этапе дифференцировки.

При культивировании миелоидных предшественников в среде CellGro DC без АВ сыворотки наблюдается постепенная утрата экспрессии CD14 антигена к 7-му дню культивирования, на фоне быстро возрастающего числа ДК с экспрессией CD1a антигена, до максимальных значений в указанный период наблюдения. Экспрессия костимулирующего сигнала CD86 и маркера зрелых ДК – CD83 антигена повышается незначительно. Графическое изображение описанных данных представлено на рис. 17 и 18.

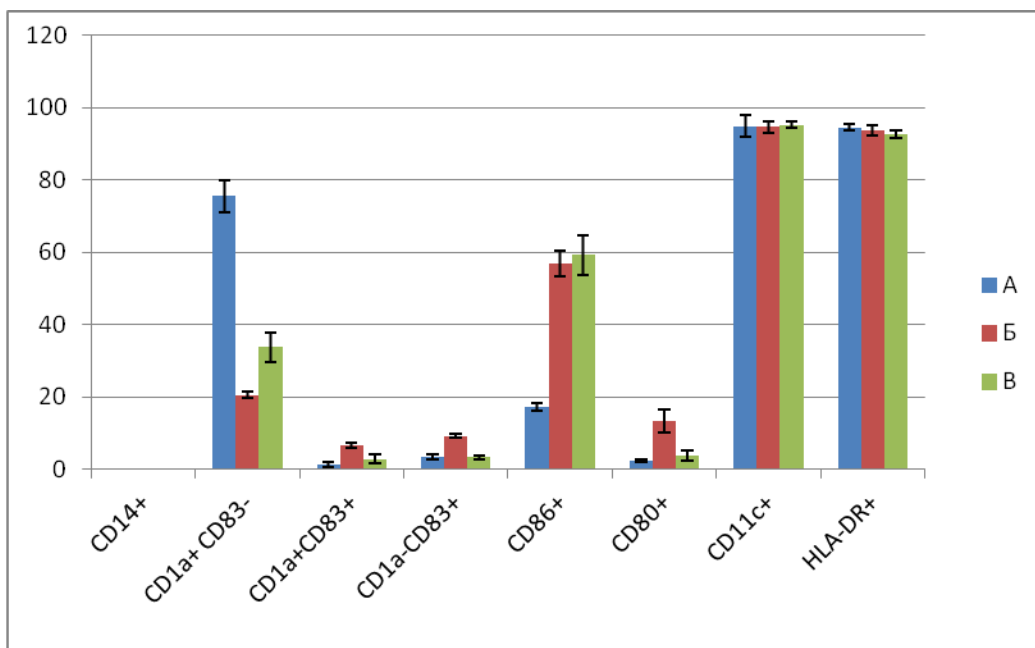


Рис. 17. Экспрессия линейноспецифических и дифференцировочных антигенов на незрелых ДК₇, дифференцированных на различных питательных средах: А) CellGro DC без АВ сыворотки; Б) RPMI + 10% АВ сыворотки; В) CellGro DC + 2% АВ сыворотки.

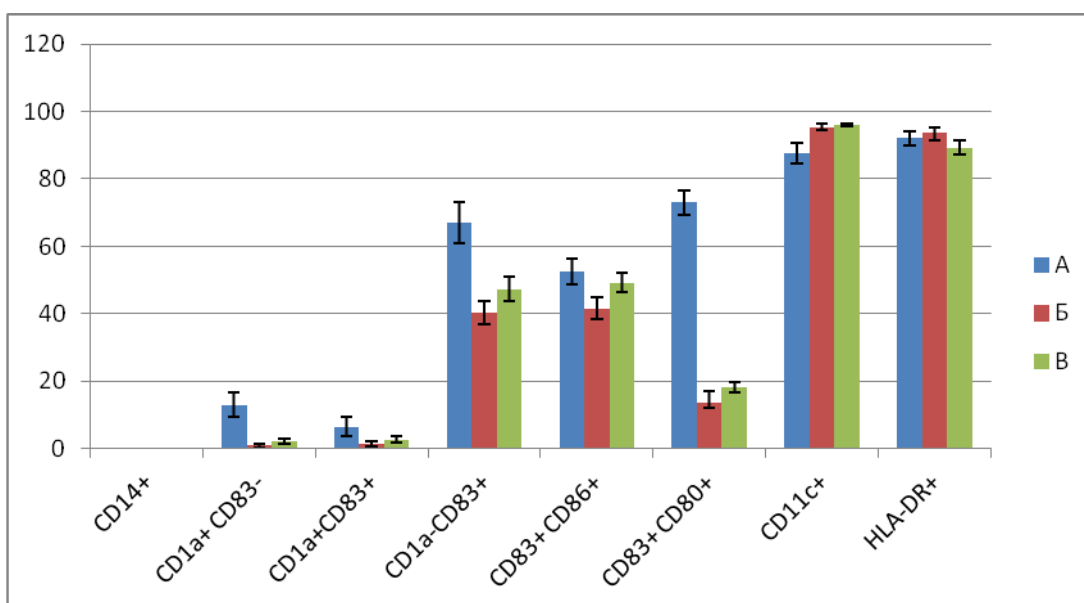


Рис. 18. Экспрессия линейноспецифических и дифференцировочных антигенов на зрелых ДК₉, дифференцированных на различных питательных средах: А) CellGro DC без АВ сыворотки; Б) RPMI + 10% АВ сыворотки; В) CellGro DC + 2% АВ сыворотки.

Полученные данные свидетельствует о преимуществе в использовании сбалансированной бессывороточной питательной среды CellGro DC без добавления АВ сыворотки по сравнению с добавлением 2% АВ сыворотки и средой RPMI-1640 + 10% АВ сыворотки в указанный период наблюдения.

Таким образом, изученные в настоящем разделе количественные и качественные характеристики субпопуляций миелоидных предшественников ДК могут быть положены в основу лабораторной оценки контроля качества клеточного субпродукта при производстве противоопухолевых дендритноклеточных вакцин (Приложение 4):

- GM-CSF импортного и отечественного производства обладает сходным фармакологическим воздействием на миелоидные предшественники ДК. Использование GM-CSF отечественного производства приводит к снижению стоимости дендритноклеточных вакцин в 4 раза.
- для дифференцировки ДК *ex vivo* оптимальная концентрация IL-4 находится в интервале от 5 до 20 нг/мл. Установление этого факта позволит уменьшить расход IL-4 импортного производства от 3 до 5 раз;
- сбалансированная бессывороточная питательная среда CellGro DC является оптимальной для дифференцировки ДК человека и производства противоопухолевых дендритноклеточных вакцин.

Глава 5

Оптимизация и стандартизация условий нагрузки и активации ДК

Для создания высокоэффективных противоопухолевых дендритноклеточных вакцин необходимым условием становится изучение специфичности опухолеассоциированных антигенов (ОАА), используемых для нагрузки и активации ДК, и их способность вызывать выраженный и устойчивый иммунный ответ.

Потенциальными мишенями, способными индуцировать специфический иммунный ответ являются антигены, экспрессированные на аутологичной опухоли. Вместе с тем известно, что недостаточная иммуногенность аутологичных ОАА и противоопухолевых вакцин на основе аутологичных опухолевых клеток связана с генетической нестабильностью трансформированных клеток *in vivo* и при культивировании первичных и метастатических клеточных культур *in vitro* (Моисеенко В.М. и соавт., 2008).

В результате поиска иммуногенных антигенов были обнаружены РТА, которые в норме экспрессируются в ткани яичек, плаценте, отсутствуют в нормальных тканях и их экспрессия выявлена в различных опухолях человека (Caballero O.L., Chen Y.T., 2009). Поддержание клеточных линий опухолей человека, экспрессирующих РТА, полученных в Лаборатории клеточных технологий Отделения химиотерапии и инновационных технологий НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, (Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520) и депонированных во Всероссийской Коллекции клеточных культур позвоночных (НИИ цитологии РАН), а также их дальнейшее изучение с целью получения охарактеризованного и стандартизованного лизата РТА⁺ для нагрузки ДК становится важным этапом настоящего исследования.

5.1. Характеристика клеточных линий меланомы кожи человека, экспрессирующих РТА

В качестве источника РТА нами были отобраны 4 стабильно растущие адгезионные клеточные линии меланомы кожи человека (Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520) с неограниченным пролиферативным потенциалом (рис. 19 А, Б, В, Г). С целью подтверждения исходных характеристик клеточных линий и проведения контроля над уровнем экспрессии РТА изучали морфологию клеток, тип роста, скорость деления и иммунофенотип.

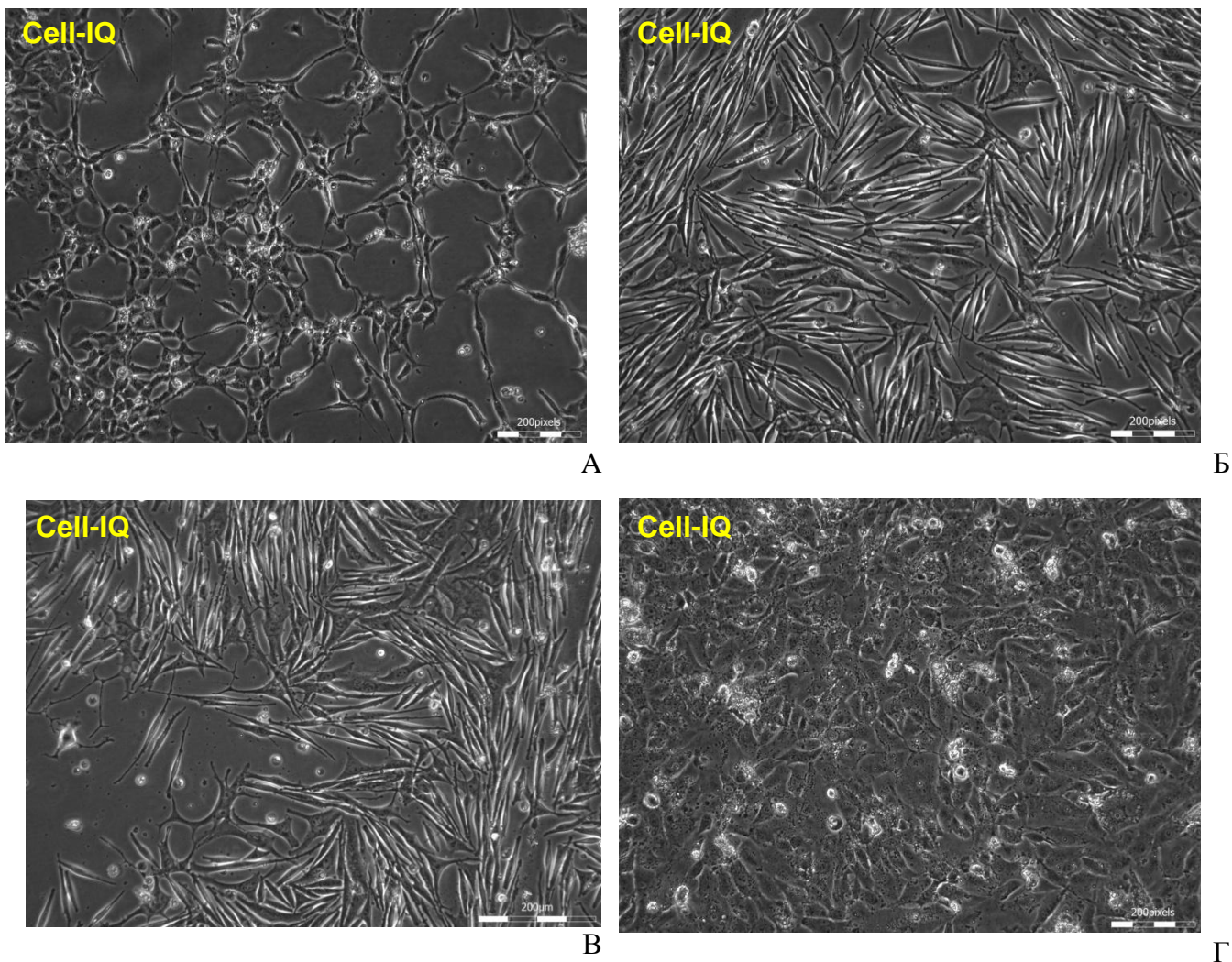


Рис. 19. Прижизненное изображение клеточных линий меланомы кожи: Mel 226 (А), Mel 515 (Б), Mel 520 (В), Mel 519 (Г) в Системе наблюдения за живыми клеточными культурами Cell- IQ v.2, (Chip Man Technologies, Финляндия).

Экспрессию РТА, дифференцировочных антигенов и молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA от *Human Leukocyte Antigen*) изучали с использованием: 1) метода непрямого иммуноцитохимического окрашивания [МкАт к белкам S100, tyrosinase, MITF, MAGE1, NY-ESO-1, MART/MelanA, CD63 и др. и системы визуализации Detection Kit NCL-RTU-D (Novocastra, Великобритания)]; 2) лазерной проточной цитофлуориметрии BD FACSCalibur (tm) (BD Bioscience) и метода непрямого мечения первых антител (МкАт к NY-ESO-1, MAGE, BAGE) крысиными анти-мышинными антителами с FITC и использованием изотипического контроля вторых антител.

В первом случае образцы опухолевых клеток: 1) высаживали на культуральные стекла (BD Falcon, США); 2) фиксировали с помощью абсолютного метанола; 3) проводили иммуноцитохимическое окрашивание. Результаты исследования представлены в табл. 13.

Таблица 13. Экспрессия РТА, дифференцировочных антигенов и HLA антигенов на клеточных линиях меланомы кожи человека

Дифференцировочные, РТА, HLA антигены	Клеточные линии меланомы человека: пассаж, экспрессия (%)			
	Mel 226, 50 пассаж	Mel 515, 102 пассаж	Mel 520, 71 пассаж	Mel 519, 45 пассаж
CD63	100	100	100	100
MAGE1	90	100	100	80
Melan A	100	40	100	90
TRP-1	90	0	10	100
Tyros	100	100	90	0
CD146	100	0	100	90
MITF	100	0	100	100
HMB-45	90	100	40	100
S100	100	0	100	20
HLA I	100	100	100	100
HLA II	0	90	0	0
Ki-67	98	98	98	98
VEGF	0	0	0	0
NY-ESO-1	75	100	100	98

Анализ экспрессии изучаемых антигенов на клеточных линиях меланомы кожи человека выявил высокую экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса (HLA-A, B, C), РТА (MAGE1, NY-ESO-1) и антигенов Ki-67, CD63 во всех исследованных образцах (75-100%). На 3-х клеточных линиях выявлена высокая экспрессия дифференцировочных антигенов HMB45, MelanA/MART1, Tyrosinase, CD146, HMB-45, MITF. Антиген главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) был выявлен на клеточной линии меланомы Mel 515 (90%).

Опухолевые клетки способны синтезировать и выделять в окружающую среду целый спектр разнообразных молекул – иммуносупрессирующих факторов (VEGF, TGF β , MIP A, IL-10 и др), которые могут оказывать блокирующее действие на развитие иммунного ответа. Мы исследовали содержание этих факторов в супернатантах отобранных клеточных линий в процессе культивирования (Данилова А.Б. и соавт., 2010, 2011). Отобранные клеточные линии продуцировали минимальные количества иммуносупрессирующих факторов и не имели контаминации фибробластами. Иллюстрации результатов иммуноцитохимического окрашивания клеточных линий меланомы Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520 представлены на рис. 20.

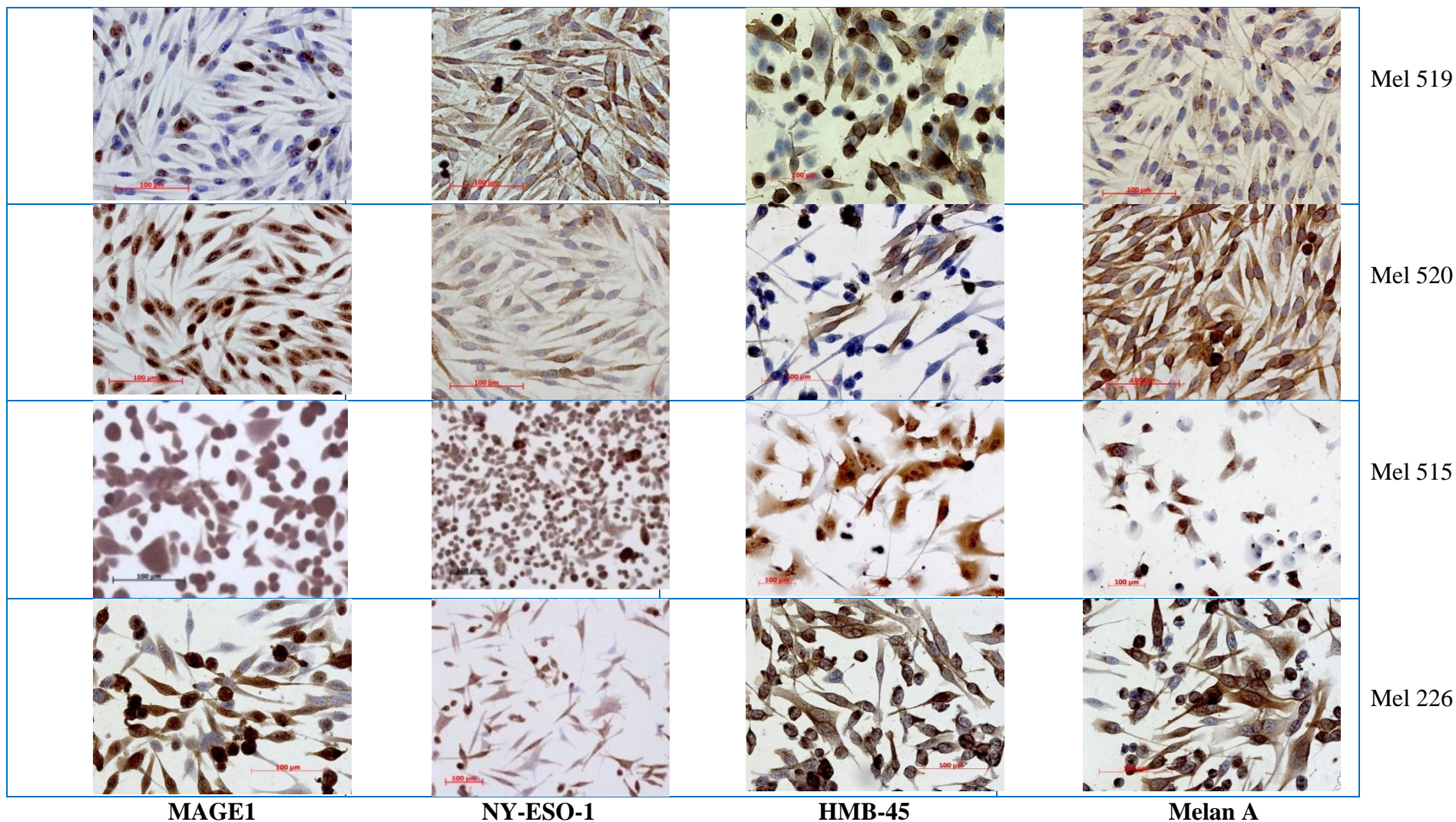
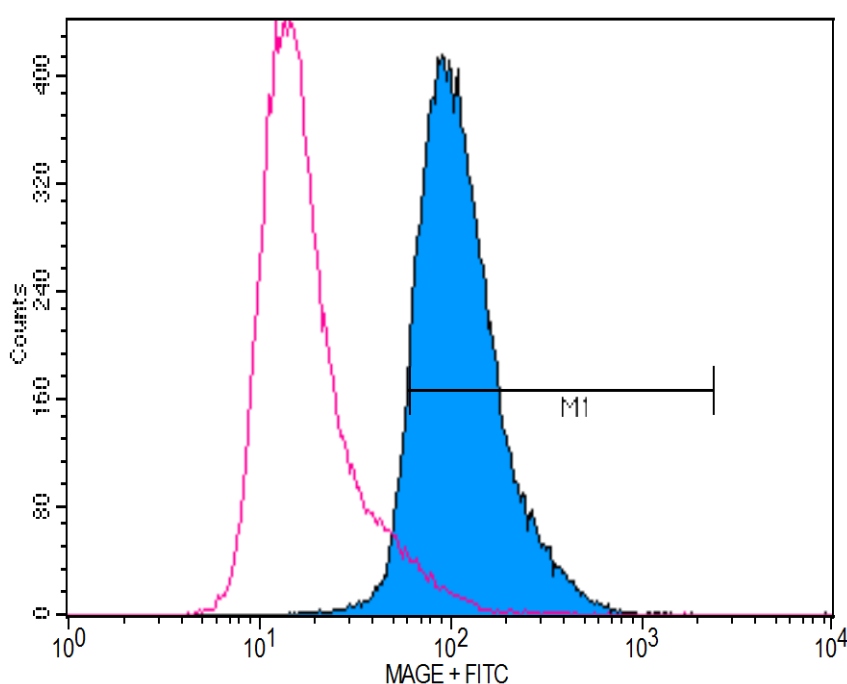
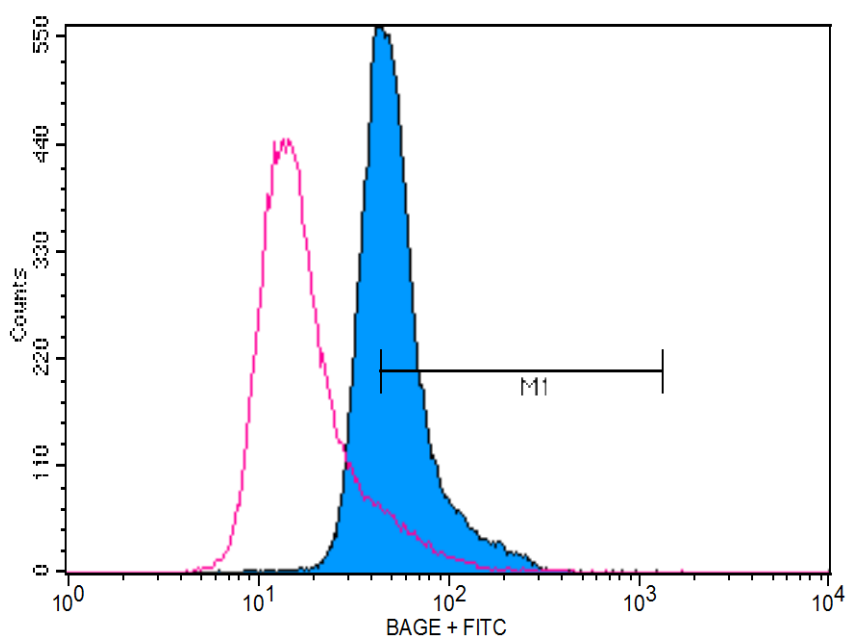


Рис. 20. Иммуноцитохимическое выявление антигенов MAGE1, NY-ESO-1, HMB45, Melan A клеточных линий на меланоме кожи с помощью соответствующих МкАт и системы визуализации «Novostain Detection Kit NCL-RTU-D» (Novocastra, Великобритания). Докрашивание ядер клеток гематоксилином Майера.

Результаты исследования экспрессии ключевых РТА на клеточных линиях меланомы кожи методом проточной цитофлуориметрии представлены в табл. 14 и на рис. 21.

Таблица 14. Экспрессия РТА антигенов на клеточных линиях меланомы кожи человека

РТА антигены	Клеточные линии меланомы человека: пассаж, экспрессия (%)			
	Mel 226, 144-й пассаж	Mel 515, 219-й пассаж	Mel 520, 158-й пассаж	Mel 519, 91-й пассаж
NY-ESO-1	6,74	19,56	37,39	14,96
MAGE	49,72	92,08	44,08	96,95
BAGE	55,38	62,24	0	14,99



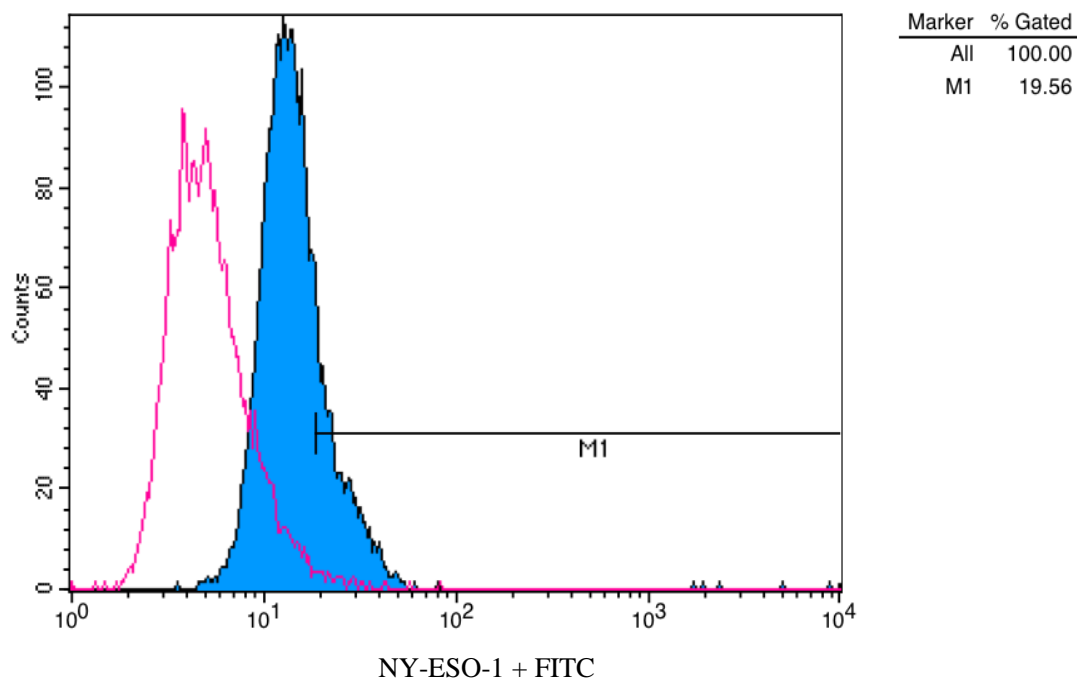


Рис. 21. Гистограммы распределения клеток линии Mel 515 по интенсивности флуоресценции: красная кривая – отрицательный контроль, синяя кривая – положительное окрашивание МкАт.

5.2. Нагрузка и активация незрелых CD14⁻CD1a⁺CD83⁻ ДК

ДК нагружали РТА⁺ содержащим опухолевым лизатом. Для нагрузки 10⁷ незрелых ДК использовали лизат, полученный из 30⁷ клеток 4-х клеточных линий РТА⁺ меланомы кожи (Балдуева И.А., 2008). Для приготовления опухолевого лизата клетки Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520 наращивали, смешивали в равных пропорциях и проводили:

- 1) 6 последовательных циклов моментального замораживания до -196°C и оттаивания до комнатной температуры в фосфатно-солевом буфере без криопротектора (качество лизиса клеток контролировали с помощью 0,1% трипанового синего и светового микроскопа);
- 2) осаждение клеточного детрита центрифугированием (10 мин, 3000 об./мин);
- 3) фильтрацию надосадочной фракции через миллипорный фильтр (0,2 мкм);
- 4) расфасовку РТА⁺ опухолевого лизата в криобирки и хранение при -20°C до использования.

Для созревания и активации CD14⁻CD1a⁺CD83⁻ ДК опухолевый РТА⁺ лизат и TNF- α 20 нг/мл вносили в питательную среду на 7-е сутки культивирования. Инкубацию с

опухолевым лизатом проводили в течение 48 ч. При соблюдении вышеуказанных условий получали ДК с иммунофенотипом $CD14^-/CD1a^-/CD83^+/CD80^+/CD86^+ HLA DR^+$, жизнеспособность не менее 98% (рис. 22 А и Б).

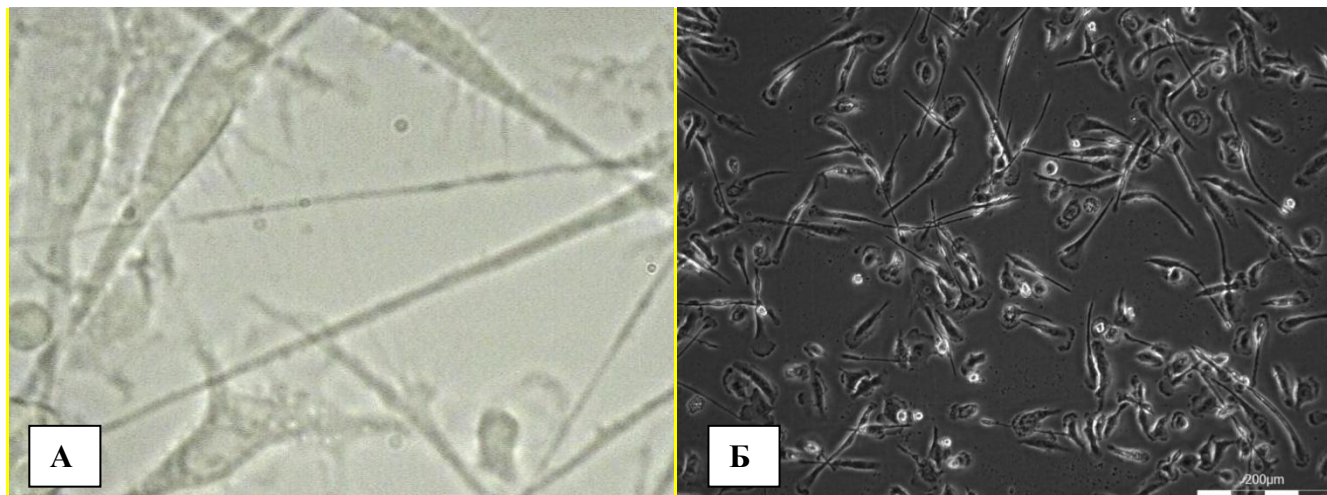


Рис. 22. Зрелые (вакцинные) ДК, полученные из моноцитов периферической крови. Прижизненное изображение: инвертированный микроскоп (Leuca DMIL, Германия), x 400 (А) и система наблюдения за живыми клетками Cell- IQ v.2 (Chip Man Technologies, Финляндия) x10 (Б), 9-й день культивирования.

Признаком функциональной активности ДК было повышение уровня экспрессии костимулирующих молекул CD80, CD86, молекулы адгезии CD209, антигена CD83, характерных для зрелых ДК.

5.3. Оценка дифференцировки ДК по уровню экспрессии иммунофенотипических маркеров на разных стадиях созревания ДК

На предыдущем этапе исследований мы показали эффективность применения ростового фактора GM-CSF отечественного производства (Фармсинтез, Россия) в сочетании с IL-4 (CellGenix, Германия). При этом было установлено, что оптимальный интервал концентрации IL-4 для дифференцировки ДК находится в пределах от 5 до 20 нг/мл. В связи с этим, дальнейший анализ был основан на изучении иммунофенотипа вакцинных ДК на разных стадиях созревания при фиксированных значениях ростовых факторов GM-CSF (Фармсинтез, Россия) - 72 нг/мл и IL-4 (CellGenix, Германия) - 20 нг/мл. Результаты исследования представлены в табл. 15.

Таблица 15. Иммунофенотип вакцинных ДК на разных стадиях созревания

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	ДК незрелые (7-й день) (%) $M \pm m$, δ	ДК зрелые (9-й день) (%) $M \pm m$, δ	Критерий Фишера (F), уровень значимости (p)
---	--	--	--

	(n=18)	(n=23)	
CD1a ⁺	76,78±4,15; 12,47	22,33±6,12; 23,91	F=25,73 p=0,0001 (<0,05)
CD14 ⁺	0	0	F=0,25 p=0,62 (>0,05)
CD83 ⁺	2,67±1,61; 4,82	75,66±4,33; 16,79	F=159,62 p=0,0001 (<0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	75,55±4,43; 13,31	13,01±3,69; 14,3	F=113,14 p=0,0001 (<0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	1,22±0,76; 2,28	6,53±2,02; 7,82	F=3,88 p=0,06 (>0,05)
CD1a ⁻ CD83 ⁺	1,44±0,85; 2,55	66,94±6,18; 23,96	F=65,58 p=0,0001 (<0,05)
CD83 ⁺ CD86 ⁺	8,01±2,02; 6,24	49,11±5,03; 19,32	F=31,56 p=0,00001 (<0,05)
CD83 ⁺ CD80 ⁺	31,01±12,02; 31,11	73,03±4,02; 14,34	F=19,57 p=0,0003 (<0,05)
CCR7 ⁺	63,03±14,1; 38,32	82,02±6,01; 25,18	F=2,04 p=0,17 (>0,05)
HLA-DR ⁺	94,55±0,94; 2,83	92,02±2,02; 9,02	F=0,59 p=0,45 (>0,05)

Примечание: М – среднее значение экспрессии иммунофенотипического маркера, m – ошибка среднего значения, δ – стандартное отклонение.

Результаты исследования показывают, что дифференцировка моноцитов периферической крови в ДК сопровождается появлением молекулы CD1a (76,78±4,15) и утратой CD14 антигена. Созревание ДК характеризуются высокой экспрессией маркера дифференцировки CD83 (75,66±4,33) и утратой CD1a антигена (22,33±6,12), а также статистически достоверным усилением экспрессии костимулирующих молекул CD80 [31,01±12,02 до 73,03±4,02 (p=0,0003)] и CD86 [8,01±2,02 до 49,11±5,03 (p=0,00001)]. Высокий уровень экспрессии молекул хемокинового рецептора (CCR7), обеспечивающего миграцию созревающих ДК в лимфатические узлы и белков, участвующих в презентации антигена (HLA DR) на 7-й и 9-й день культивирования свидетельствует о зрелости ДК.

Степень зрелости ДК определяли по коэкспрессии антигенов CD1a и CD83. Анализ результатов свидетельствует о снижении содержания незрелых ДК (CD1a⁺CD83⁻) с 75,55±4,43 до 13,01±3,69 (p=0,0001) и увеличении зрелых ДК (CD1a⁻CD83⁺) с 1,44±0,85 до 66,94±6,18 (p=0,0001) ДК к 9-му дню культивирования. Низкое содержание ДК промежуточной степени зрелости (CD1a⁺CD83⁺), в указанные сроки, свидетельствует об их высокой функциональной активности.

С помощью иммуноцитохимического анализа экспрессии ключевых антител на вакцинных ДК, была выявлена экспрессия маркеров активированных ДК (HLA DR^{high}, CD1a^{low}, CD80^{high}, CD86^{high}) на 65–80% клетках (рис. 23).

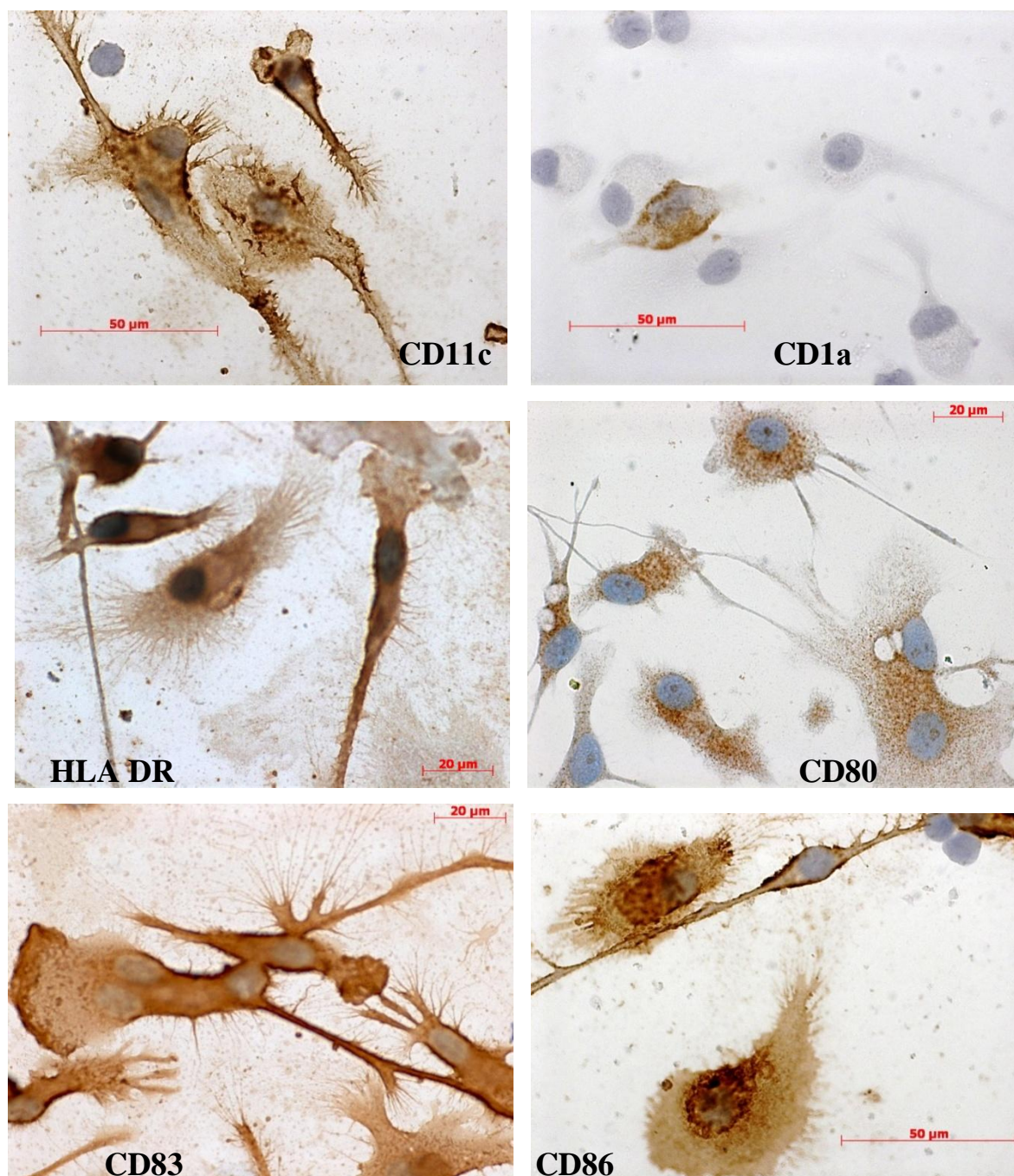


Рис. 23. Иммунофенотип зрелых вакцинных ДК (CD1a⁻, CD83⁺, CD11c⁺, HLA-DR⁺, CD86⁺), дифференцированных *in vitro* в присутствии ростового фактора GM-SCF (Фармсинтез, Россия) и IL-4 (CellGenix, Германия), нагруженных РТА⁺ опухолевым лизатом и активированных TNF-α (BD, США), световой микроскоп.

Таким образом, зрелые CD14⁻, CD1a^{low}, CD83^{high}, HLA-DR^{high}, CD80^{high}, CD86^{high}, CCR7^{high} ДК, дифференцированные из моноцитов периферической крови в присутствии

изученных концентраций GM-CSF и IL-4, обладают выраженной функциональной активностью, определяемой по экспрессии молекул активации, миграции и костимулирующих сигналов. При этом в соответствии требованиям GMP и GLP к продукту подобного качества нами были разработаны критерии стандартной операционной процедуры (СОП), представленные в Приложении 5, 6.

Глава 6

Стандартизация условий криоконсервации и хранения вакцинных ДК в соответствии с иммунофенотипом, требованиями надлежащей лабораторной и клинической практики

Одним из неперенных условий криоконсервации ДК является хранение их в условиях ультранизких температур жидкого азота (-196°C), так как при этом не расходуются энергетические ресурсы и не накапливаются конечные продукты обмена веществ (Усс А.Л. и соавт., 2003; Vakken А.М., 2006). Реализация методов криоконсервации дендритноклеточных вакцин стала возможной благодаря теоретическим разработкам проблем криобиологии, а также техническому прогрессу в области создания специальной аппаратуры для замораживания и хранения клеток и тканей при ультранизких температурах (Vakken А.М. et al., 2003).

Наряду с температурным фактором большое значение имеют специальные консервирующие среды, которые также обеспечивают оптимальные условия хранения. В нашей работе были изучены криосреды содержащие: 1) 90% аутологичной плазмы и 10% диметилсульфоксида (ДМСО); 2) 90% сыворотки АВ человека и 10% ДМСО; 3) бессывороточная криосреда.

6.1. Оценка жизнеспособности ДК до и после криоконсервации в ультранизких температурах

ДК помещали в изучаемую криосреду и индивидуально маркированные 4,5 мл криопробирки (Nunc «CryoTube», США). Криоконсервировали с помощью программного криозамораживателя «Ice-Cube 14S», (SY-Lab Gerate GmbH, Австрия) с контролируемой скоростью охлаждения, которая составляет $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от $+4^{\circ}\text{C}$ до -4°C , и $-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от -4° до -12°C . Далее переносили в индивидуальные контейнеры с жидким азотом (-196°C) и помещали в криохранилище Банка долговременного хранения биологического материала НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова технологий до использования.

Основной принцип успешного криоконсервирования и размораживания – медленное замораживание и быстрый отогрев. В качестве общего руководства ДК должны быть охлаждены со скоростью 1°C до 3°C в минуту и подвергнуты быстрому оттаиванию при 42°C на водяной бане в течение 3-х минутного непрерывного покачивания (Vakken А.М. et al., 2003).

Для оттаивания криопробирку с дендритноклеточной вакциной помещали на 3 мин в водяную баню $+42^{\circ}\text{C}$, далее *ex tempore* переносили в стерильную 50-мл пробирку и

разбавляли не менее чем десятикратным избытком 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%), тщательно ресуспендировали.

ДМСО обладает выраженной токсичностью, поэтому после оттаивания клеток его необходимо удалить очень быстро. Более того, в результате криоповреждений в цитоплазме появляются вредные вещества. Отмывка клеток имеет большое значение для их выживания и функциональной активности (Попов А.С., 2008). ДК отмывали двукратным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин. Подсчет и оценку жизнеспособности производили с помощью автоматического счетчика клеток «Countess», и 0,4 % трипанового синего. Получали контрольное криоконсервированное количество ДК, жизнеспособность – не менее 93% (табл. 16 и рис. 24).

Таблица 16. Жизнеспособность ДК, дифференцированных из миелоидных предшественников периферической крови до и после криоконсервации в ультранизких температурах

Жизнеспособность ДК до криоконсервации (%), M ± m; δ (n= 28)	Жизнеспособность ДК после криоконсервации (%), M ± m; δ (n=32)	Критерий Фишера (F), уровень значимости (p)
97,14±0,27; 1,02	93,75±0,42; 1,91	F = 36,34 p = 0,000 (<0,05)

Анализ жизнеспособности ДК, дифференцированных из миелоидных предшественников периферической крови, после криоконсервации и оттаивания выявил сниженное содержание жизнеспособных ДК по сравнению с числом ДК до криоконсервации [93,75±0,42 и с 97,14±0,27 (p<0,05) соответственно].

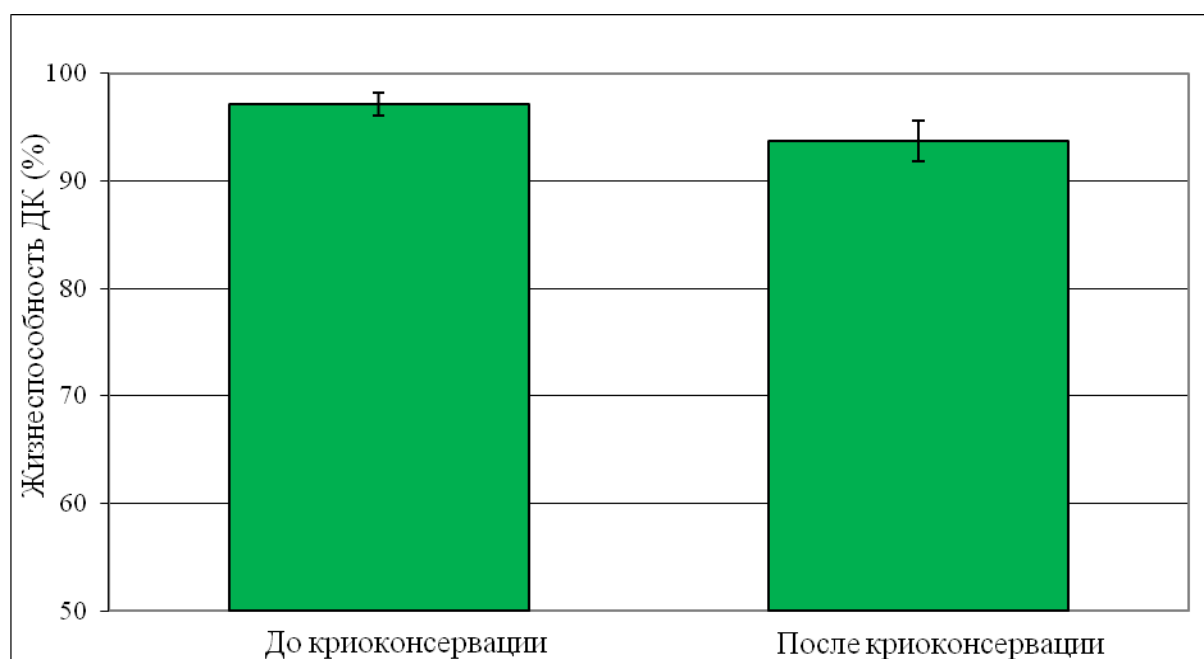


Рис. 24. Жизнеспособность ДК (%), дифференцированных из миелоидных предшественников в периферической крови до и после криоконсервации в ультранизких температурах.

6.2. Продолжительное хранение криоконсервированной дендритноклеточной вакцины: контроль качества

Время хранения дендритноклеточной вакцины при температурах выше 0°C ограничивается 24 ч., что далеко не всегда отвечает практическим требованиям. Поэтому в настоящее время общепринятыми становятся методы криоконсервации дендритноклеточных вакцин в режиме криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток, с последующим хранением при температуре -196°C (Абдулкадыров К.М. и соавт., 2006; Berz D. et al., 2007).

В нашем исследовании криоконсервированные ДК хранили в криопробирках объемом 1,8 или 4,5 мл с ввинчивающимися крышками в жидкой фазе азота, в криокомплексе для клеточных культур отделения химиотерапии и инновационных технологий. Длительная эксплуатация криопробирок (Nunc «CryoTube», США) показала, что разработанный способ хранения выдерживает охлаждение от +20° до -196°C и обратный нагрев до +20°C, а также длительное пребывание в контакте с жидким азотом (-196°C) без нарушения герметизации. Брак криопробирок наблюдается в основном при неправильной их эксплуатации (попадание азота внутрь криопробирки).

В связи с появлением в литературе данных о возможной контаминации жидкого азота грибковой и бактериальной флорой, некоторые авторы считают предпочтительным хранение образцов стволовых клеток в парах жидкого азота. Вместе с тем, имеются данные о том, что при загрязнении азота, и жидкий азот, и пары азота являются потенциальным источником микробной контаминации образцов (Berz D. et al., 2007), поэтому необходимо соблюдение ряда мер, предотвращающих или уменьшающих риск контаминации: обследование на микробную загрязненность камер замораживателя и азота в криохранилищах; использование контейнеров, обеспечивающих максимальную герметичность; удаление контейнеров, разгерметизировавшихся при хранении (Грищенко В.И. и соавт., 2000).

Для вакцинных ДК человека допускается использование исключительно сыворотки АВ(IV) гр., произведенной в условиях GMP, или аутологичной плазмы. Не допускается применение ксеногенных сывороток. В большей части наших экспериментов использовалась 90% сыворотки АВ(IV) гр., (Sigma, США) и ДМСО в конечной концентрации 10%. Период наблюдения за вакцинными ДК составил 48 мес. В течение этого времени проводилась оценка жизнеспособности, стерильности, фенотипической стабильности и функциональной активности ДК (рис. 25).

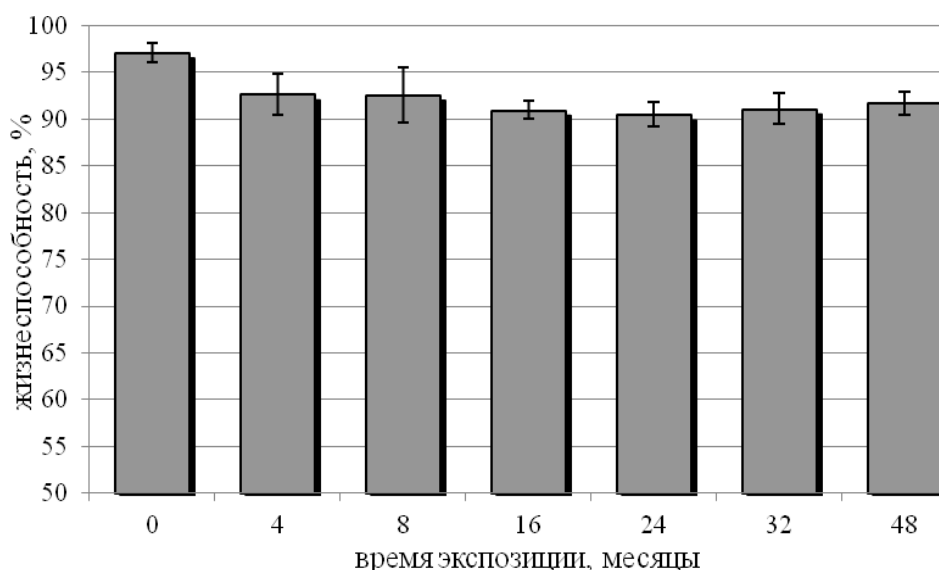


Рис. 25. Динамика жизнеспособности незрелых ДК под воздействием ультранизких температур в условиях непрерывного хранения в жидком азоте (-196°C) в течение 48 мес.

Результаты анализа изменений жизнеспособности ДК в течение 48 мес показывают, что статистически значимое снижение указанной величины происходит на фоне первых 10 месяцев криоконсервации. При этом коэффициент корреляции (r) между жизнеспособностью ДК (%) и временем их криоконсервации (T) в интервале от 0 до 10 месяцев составляет -0,89 ($p=0,044$; $<0,05$). Наличие корреляционной связи позволяет получить количественную оценку изменений жизнеспособности ДК от времени криоконсервации от 0 до 10 месяцев в виде зависимости: $Y = A_0 \times \exp^{A_1 \times T}$ (1) или $Y = 96,171 \times \exp^{-0,005 \times T}$ (2), где: Y – жизнеспособность ДК, %; A_0 и A_1 – коэффициенты для выражения (1) определяемые на основе регрессионного анализа; T – время криоконсервации, месяцы (0, 1, 2, 3...10). Полученные статистические характеристики: коэффициент детерминации выражения (2) ($R^2 = 79,14$), коэффициент корреляции ($r = -0,88$), критерий Фишера ($F=11,38$) и уровень значимости ($p = 0,043$, $<0,05$) свидетельствуют о возможности применения однофакторной регрессионной модели (2) модели для корректной оценки изменений величины (Y) от времени криоконсервации (T) в интервале от 0 до 10 месяцев. Графическая интерпретация выражения (2) представлена на рис. 26.

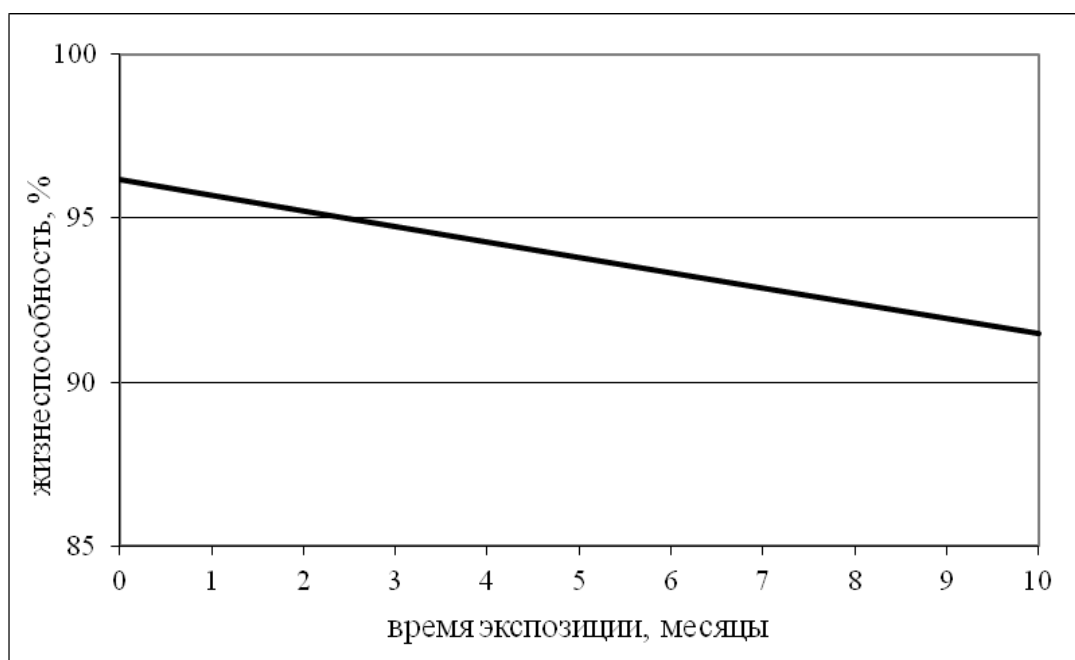


Рис. 26. Динамика жизнеспособности незрелых ДК под воздействием ультранизких температур в условиях непрерывного хранения в жидком азоте (-196°С) в течение 10 мес.

Анализ изменений жизнеспособности незрелых ДК в интервале времени криохранения от 10 до 48 мес выявил отсутствие статистически значимых изменений величины (Y, %), Это свидетельствует о сохранении жизнеспособности незрелых ДК под воздействием ультранизких температур в условиях непрерывного хранения в жидком азоте (-196°С).

Как видно из представленных данных, жизнеспособность образцов ДК до криоконсервации составила 97,4±0,3% с незначительным снижением этого показателя до 90,5±0,7 к 24 мес. и сохранения близкого к этому уровню значения (91,8±0,6) к 48 мес. хранения.

Кроме того, была изучена экспрессия дифференцировочных и линейноспецифических антигенов на ДК до криоконсервации и после хранения в жидком азоте (-196°С) (табл. 17).

Таблица 17. Экспрессия дифференцировочных и линейноспецифических антигенов на вакцинных ДК до криоконсервации и после хранения в жидком азоте

Дифференцировочные/линейноспецифические антигены	До криоконсервации (%) M±m, δ (n=24)	После криоконсервации (%) M±m, δ (n=26)	Критерий Фишера (F) уровень значимости (p) достоверность различий
CD11c ⁺	69,1±7,28; 23,02	66,76±5,38; 19,5	F = 0,07 p = 0,79 (>0,05)
CD14 ⁺	6,8±1,59; 5,02	6,75±1,57; 5,45	F = 0,02 p = 0,87 (>0,05)

HLA-DR ⁺	93,66±2,72; 4,72	95,33±1,85; 3,21	F = 0,25 p = 0,64 (>0,05)
CD1a ⁺	24,03±6,92; 21,88	22,84±9,11; 26,22	F = 0,06 p = 0,93 (>0,05)
CD83 ⁺	86,6±2,51; 7,96	79,15±2,61; 9,42	F = 4,02 p = 0,006 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	1,1±0,72; 2,28	2,03±0,78; 2,81	F = 0,73 p = 0,4 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	21,7±6,31; 19,96	20,8±5,67; 20,45	F = 0,01 p = 0,91 (>0,05)
CD1a ⁻ CD83 ⁺	64,1±6,97; 22,04	58,84±6,22; 22,46	F = 0,49 p = 0,49 (>0,05)
CD83 ⁺ CD86 ⁺	79,0±1,22; 3,85	72,92±2,6; 9,39	F = 3,67 p = 0,06 (>0,05)
CD83 ⁺ CD80 ⁺	60,0±5,06; 16,01	52,46±3,59; 12,97	F = 1,55 p = 0,22 (>0,05)

Результаты исследования свидетельствуют об отсутствии значимого (>0,05) усиления или снижения экспрессии изучаемых антигенов и отсутствии отрицательного влияния ультранизкой температуры на хранение и дальнейшее клиническое использование дендритноклеточных вакцин.

6.3. Оценка возможности использования бессывороточной среды для криоконсервации и хранения ДК

В настоящее время на рынке появились криосреды специально разработанные для криоконсервации клеток, культивируемых в бессывороточной среде. Это безбелковые среды, не содержащие в своем составе животных компонентов, обеспечивающие высокую жизнеспособность клеток при оттаивании.

В данном разделе исследования мы сравнили использование различных сред для криоконсервации ДК: а) бессывороточная криосреда (Биолот, Россия); б) 90% сыворотка АВ человека (Sigma, США) с добавлением 10% ДМСО. Результаты анализа представлены в табл. 18 и 19.

Таблица 18. Жизнеспособность ДК до и после криоконсервации в среде, содержащей сыворотку АВ человека, на 7-й день хранения (n=18)

Обозначение статистических характеристик	Жизнеспособность ДК до криоконсервации (%)	Жизнеспособность ДК после криоконсервации (%)
Среднее значение и его ошибка, M±m	94,4 ± 0,93	93,0 ± 1,0
Стандартное отклонение, δ	2,07	2,24
Дисперсия, D	4,3	5,0

Т-критерий, уровень значимости, р	1,51 0,21 (>0,05)
--------------------------------------	----------------------

Таблица 19. Жизнеспособность ДК до и после криоконсервации в бессывороточной среде, на 7-й день хранения (n=20)

Обозначение статистических характеристик	Жизнеспособность ДК до криоконсервации (%)	Жизнеспособность ДК после криоконсервации (%)
Среднее значение и его ошибка, $M \pm m$	96,0 ± 0,84	94,6 ± 0,81
Стандартное отклонение, δ	1,87	1,82
Дисперсия, D	3,5	3,3
Т-критерий, уровень значимости, р	1,09 0,34 (>0,05)	

Результаты, представленные в табл. 3 и 4 показывают, что статистически значимых различий в жизнеспособности ДК до криоконсервации и после оттаивания в среде содержащей сыворотку и в бессывороточной криосреде (Биолот, Россия) не обнаружено ($p > 0,05$). Это означает, что для хранения ДК могут быть использованы бессывороточные среды.

6.4. Оценка функциональной активности криоконсервированных вакцинных ДК

Изучение функциональной активности и иммуногенности вакцинных ДК до и после криоконсервации, хранения в условиях ультранизкой температуры (-196°C) проводили с помощью ELISpot-теста.

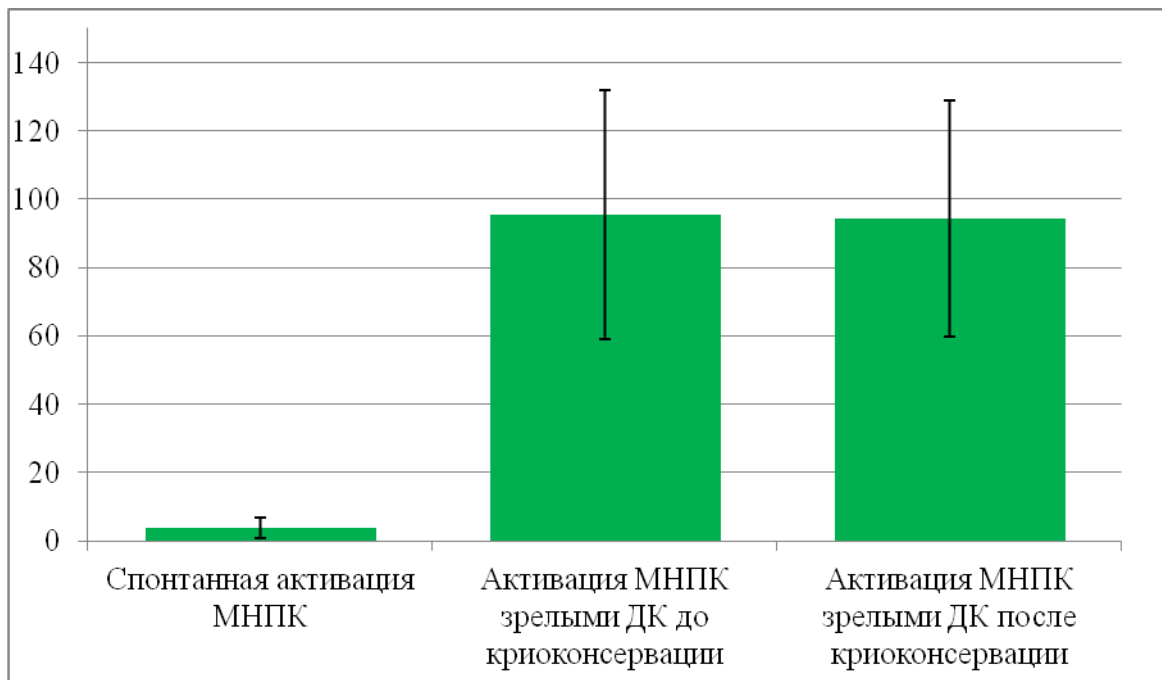
ELISpot-тест (Enzyme-Linked ImmunoSpot) разработан С. Czerkinsky в 1983 г., является высокочувствительной модификацией метода иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющий определять число клеток, секретирующих определенный тип цитокина или иммуноглобулина (Ig) на уровне единичной клетки.

Иммуногенность вакцинных ДК (до и после криоконсервации) изучали с помощью ELISpot-теста на основании изменений числа IFN- γ -секретирующих клеток в ответ на стимуляцию ДК опухолевыми антигенами *in vitro*.

Визуализацию результатов проводили с использованием автоматизированной системы **ELISpot** (рис. 27).



Рис. 27. Автоматизированная система ELISpot (Carl Zeiss, Германия) в работе в лаборатории клеточных технологий НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова.



* МНПК- мононуклеары периферической крови

Рис. 28. Количество IFN- γ –секретирующих клеток (IFN γ -Spot/10⁵ cells) в ELISpot-тесте при стимуляции лимфоцитов зрелыми ДК до и после криоконсервации.



Рис. 29. Продукция IFN- γ –секретирующих иммунокомпетентных клеток периферической крови в ELISpot-тесте.

Исследование выявило статистически значимые различия при активации вакцинными ДК лимфоцитов периферической крови по сравнению с отрицательным контролем (спонтанная активация). Вместе с тем, различия в количестве IFN- γ –секретирующих иммунокомпетентных клеток (рис. 28, 29) при активации ДК до и после их криоконсервации были статистически незначимыми ($95,5 \pm 11,02$, $p=0,94$ и $94,4 \pm 11,48$, $p>0,05$; $F=0,005$ соответственно). Следовательно, криоконсервация и хранение вакцинных ДК в условиях ультранизких температур не оказывают отрицательного влияния на их функциональную активность, активацию лимфоцитов *in vitro* и, по всей вероятности, активацию лимфоцитов *in vivo*. При этом в соответствие требованиям GMP и GLP к продукту подобного качества нами были разработаны критерии стандартной операционной процедуры (СОП), представленные в Приложение 7.

6.5. Скрининг вакцинного препарата ДК на наличие инфекционных агентов: контроль качества

Контроль стерильности вакцинного препарата производили в соответствии с Приказом МЗ СССР №720 от 31.07.1978 «Об улучшении медицинской помощи больным с гнойными хирургическими заболеваниями и усилению мероприятий по борьбе с внутрибольничной инфекцией». Для этого образцы культуры ДК отбирали на бактериологический анализ на 7-й (ДК незрелые) и 9-й (ДК зрелые) дни культивирования. На

первом этапе бактериологического анализа осуществляли посев забранного материала на питательные среды, инкубировали 10 дней, при температуре 37°C и/или в течение 5 дней в гематологическом бактериологическом анализаторе (рис. 30 А, Б).

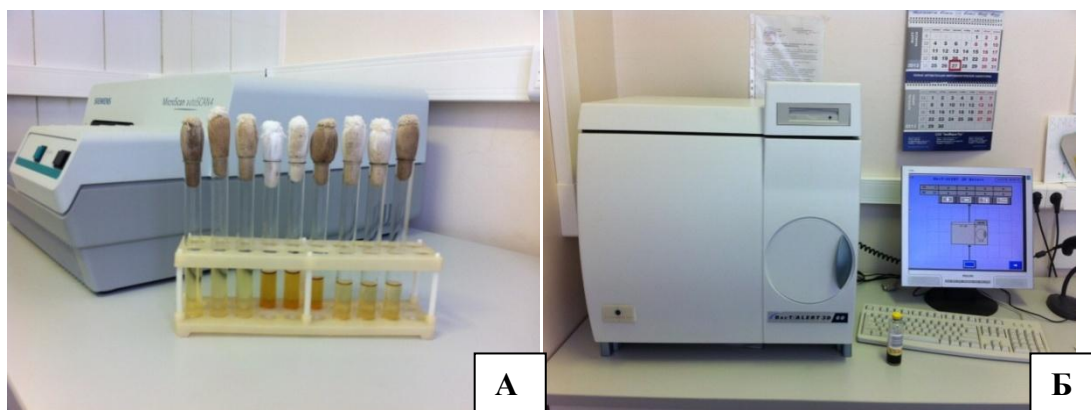


Рис. 30. Бактериологический анализ образцов дендритноклеточных вакцин в лаборатории бактериологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (врач-бактериолог Т.Ю. Галунова). А) Питательные среды: тиогликолевая среда, бульон Сабуро, сахарный бульон; Б) Бактериологический анализатор «ВасТ Alert», (Biomérieux, Франция).

На втором этапе бактериологического анализа производили высев на плотные дифференциально-диагностические среды (мясо-пептонный агар 5%, желточно-солевой агар, среда Эндо, агар Сабуро) с последующей инкубацией при 37°C, в течение 24 ч. Идентификацию микроорганизмов осуществляли на автоматическом бактериологическом анализаторе (рис. 31 А, Б).

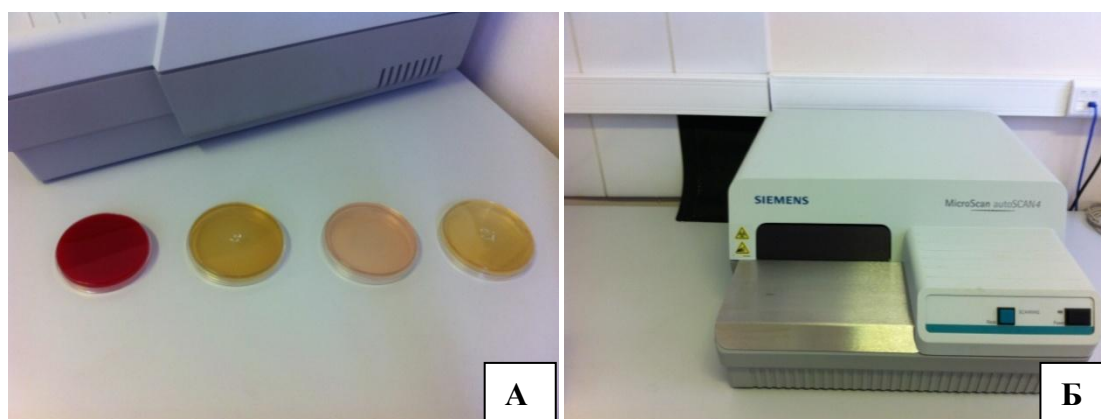


Рис. 31. Бактериологический анализ образцов дендритноклеточных вакцин в лаборатории бактериологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (врач-бактериолог Т.Ю. Галунова). А) Плотные дифференциально-диагностические среды (мясо-пептонный агар 5% желточно-солевой агар, среда Эндо, агар Сабуро); Б) бактериологический анализатор «MicroScan», (Siemens, Германия).

Весь период наблюдения вакцинные ДК были без признаков микробного загрязнения.

6.6. Организация лаборатории длительного хранения криоконсервированных дендритноклеточных вакцин (криогенная лаборатория)

Основные условия при организации лаборатории длительного хранения дендритноклеточных вакцин: 1) необходимая аппаратура и криогенное оборудование; 2) соответствующее помещение для рационального размещения в нем оборудования; 3) наличие технического и медицинского персонала, обеспечивающего бесперебойную работу криогенной лаборатории; 4) регулярное и бесперебойное обеспечение жидким азотом; 5) техническое обслуживание и уход за оборудованием; 6) система документации: учет поступления, хранения и выдачи дендритноклеточной вакцины. Помещение для криогенной лаборатории обычно располагается на первом этаже или в цоколе здания (удобство подачи извне жидкого азота в аппараты). Помещение должно быть сухим, с достаточным количеством света, иметь достаточную (2-кратную) вентиляцию, водопровод и подвод электроэнергии (220-380 Вт).

Основным аппаратом для длительного хранения в замороженном состоянии дендритноклеточной вакцины является стационарный бункер (хранилище) емкостью 500 л: масса пустого бункера 530 кг (рис. 32).



Рис. 32. Стационарные бункеры для содержания дендритноклеточной вакцины в криохранилище Банка долговременного хранения биологического материала НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Кроме того, используются переносные бункеры для краткосрочного хранения вакцинного препарата, представленные на рис. 33.



Рис. 33. Переносные бункеры для краткосрочного содержания дендритноклеточной вакцины в криохранилище Банка долговременного хранения биологического материала НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова

Количество жидкого азота, испаряющегося из бункера (при температуре окружающей среды 20°C), 2,2% в сутки.

Аппараты для замораживания дендритноклеточной вакцины представляют собой металлические емкости: первая – для замораживания, заполняется жидким азотом, имеет отводную трубку для выделения паров азота; вторая – камера, в которую помещаются криопробирки с ДК-вакциной. Замораживание осуществляется автоматически с помощью компьютеризированной системы криоконсервации (рис. 34).



Рис. 34. Система для криоконсервации дендритноклеточной вакцины «Ice-Cube 14S» (SY-Lab Gerate GmbH, Австрия) в криохранилище Банка долговременного хранения биологического материала НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова.

В последние годы разработано новое криогенное оборудование – биокомплекс, работающее на основе жидкого азота. В биокомплекс включено новое усовершенствованное хранилище «К-1000», представляющее собой криогенную камеру с автоматическим добавлением жидкого азота, предназначенную для хранения 1000-1200 контейнеров, погруженных в жидкий азот (-196°C).

Таким образом, в результате исследования нами разработаны требования по хранению препарата ДК, в основу которых заложены:

1. Хранение препарата ДК в условиях ультранизкой температуры (-196°C) в криохранилище криогенной лаборатории.
2. Наличие технического и медицинского персонала, обеспечивающего бесперебойную работу криогенной лаборатории.
3. Регулярное и бесперебойное обеспечение жидким азотом.
4. Техническое обслуживание и уход за оборудованием.
5. Криоконсервация ДК с использованием компьютеризированного криогенного оборудования.
6. Использование криозащитной среды, содержащей не менее 20% сыворотки АВ (IV) группы человека, 10% ДМСО.
7. Контроль образца препарата ДК после криоконсервации и хранения на исследование:
 - жизнеспособности
 - стерильности
 - иммуногенности.
8. Система документации: учет поступления, хранения и выдачи препарата ДК-вакцины.

Глава 7
Активная специфическая иммунотерапия (вакциноterapia) аутологичными костномозговыми и периферическими ДК больных диссеминированной меланомой кожи

В данном разделе работы представлены результаты клинических и иммунологических исследований по применению активной специфической иммунотерапии с помощью вакцины на основе зрелых периферических ДК (ДКВ) у 28 больных, получивших 181 введение вакцины (от 2 до 20 у каждого больного) и вакцины на основе аутологичных костномозговых предшественников дендритных клеток, сенсibilизированных фотомодифицированными опухолевыми клетками (ФДК) у 14 больных меланомой кожи, получивших 172 введения незрелых ДК в 37 циклах терапии (от 1 до 6 у каждого больного). Медиана наблюдения за больными составляет 356 дней, средняя длительность наблюдения - 442 дня.

7.1. Оценка безопасности вакциноterapia аутологичными ДК

Серьезных нежелательных явлений (НЯ), НЯ 4 степени не наблюдалось как при лечении ДКВ, так и при использовании ФДК вакцины.

Среди НЯ 3 ст. при ДКВ отмечена лишь одна аллергическая реакция (4% больных, 0,5% введений вакцины). При использовании ФДК-вакцины наблюдались 1 случай лихорадки 3 ст. и 1 случай усиления болевого синдрома (7% больных, 2,7% циклов лечения). Первое осложнение может быть обусловлено высоким содержанием вводимых ДК (при использовании ФДК по сравнению с ДКВ) и как следствие, более выраженному системному воспалительному ответу. Последнее осложнение, вероятно, связано с внутриопухолевым введением незрелых ДК, что сопровождается выраженной воспалительной реакцией и, как следствие, усилением отека в очаге, что может привести к усилению ноцицептивной боли. Основные НЯ 1-2 ст. представлены в табл. 20.

Таблица 20. НЯ 1-2 ст. у больных диссеминированной меланомой кожи, получавших вакциноterapia

НЯ	ДКВ (218 введений)		ФДК (172 введения)	
	1 ст.	2 ст.	1 ст.	2 ст.
Аллергическая реакция	0	0	0	1
Артралгии	0	0	0	1
Болевой синдром	0	0	2	1
Гипотония	0	0	4	0
Гипертония	1	0	0	0
Головокружение	1	0	1	0
Гриппоподобный синдром	6	0	13	0
Зуд	1	0	1	0
Лихорадка	0	0	2	6
Миалгии	3	0	0	1

Повышение АЛТ	2	0	4	
Повышение АСТ	0	0	4	
Повышение билирубина	1	0	1	1
Всего	15	0	32	11

Как видно из представленных данных, основными НЯ 1-2 ст. были лихорадка, слабость и гриппоподобный синдром. Все наблюдавшиеся НЯ, встречавшиеся у больных, являются следствием активации иммунной системы на фоне проводимой активной специфической иммунотерапии (вакцинотерапии). Вместе с тем, введение незрелых ДК в опухолевый очаг после проведения ФДТ чаще сопровождается развитием НЯ 1-2 ст.: вероятность развития НЯ 1-2 ст. при лечении ДКВ составляет 6,88 (95% ДИ 3,91 – 10,61) %, а при ФДК 25 (95% ДИ 18,53 – 31,47) %.

7.2. Оценка клинической эффективности вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками

Оценка эффективности лечения проводилась с использованием показателей частоты объективных ответов (при наличии опухолевых очагов до начала терапии), времени до прогрессирования заболевания и общей выживаемости больных. Сравнение клинической эффективности ДКВ и ФДК представлено в табл. 21.

Таблица 21. Эффективность терапии с использованием ДКВ и ФДК у больных меланомой кожи

Показатель		Вакцинотерапия		
		ДКВ адьювантная n=9	ДКВ лечебная n=19	ФДК лечебная n=14
ЧР	абсолютные значения	-	1	2
	(%)	-	5	15
	95% ДИ	-	0-15	2-39
СЗ	абсолютные значения	-	6	5
	(%)	-	32	39
	95% ДИ	-	11-52	12-65
КЭ	абсолютные значения	-	7	7
	(%)	-	37	54
	95% ДИ	-	15-59	21-78
ПЗ	абсолютные значения	-	12	6
	(%)	-	63	46
	95% ДИ	-	41-83	19-73
ВДП	дни	402	72	108
	95% ДИ	2-802	45-98	68-147

1-летнее ВДП	%	56	15	8
	95% ДИ	23-88	3-33	0-30
ОВ	дни	Не достигнута	420	334
	95% ДИ		282-557	43-624
1-летняя ОВ	%	100	40	33
	95% ДИ	0	19-61	7-60

Примечание: ЧР-частичный регресс, ПЗ-прогрессирование заболевания, СЗ- стабилизация заболевания; ОВ- общая выживаемость, ВДП-время до прогрессирования; КЭ – клинический эффект 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

Как видно из представленных данных, как при использовании ДКВ, так и при использовании ФДК отмечены объективные ответы на лечение. Эффективность примененных методик была сопоставима как при использовании ДКВ, так и при применении метода ФДК. Вместе с тем, следует отметить тенденцию к большей эффективности ФДК вакцины, для подтверждения значимости которой мощности данного исследования было недостаточно (сопоставление данных методик не входило в основные задачи исследования).

Иммунологический эффект вакцинотерапии на основе аутологичных ДК у больных с разным характером вакцинотерапии (принципиально разные показания и цели лечения при использовании препарата в адъювантном и лечебном режимах) предполагает, что воздействие на иммунную систему может быть одинаковым. Вместе с тем, лечение получали 2 группы пациентов – с отсутствием видимых опухолевых очагов и с их наличием (III и IV стадии, соответственно). Цели терапии также были различны при использовании адъювантного и лечебного режимов. Поэтому, для анализа иммунологических параметров у больных с разным характером вакцинотерапии, был введен показатель *достаточности* или *недостаточности* клинического эффекта. Под *достаточным* клиническим эффектом понимали развитие объективного ответа или стабилизации заболевания длительностью более 6 мес. у больных, получавших лечебную вакцинотерапию и более 1 года у больных, получавших адъювантное лечение. Все другие варианты клинического ответа на терапию расценивались как *недостаточные*. Такое деление больных хорошо отражало течение заболевания у пролеченных больных, как это показано на рис. 35.

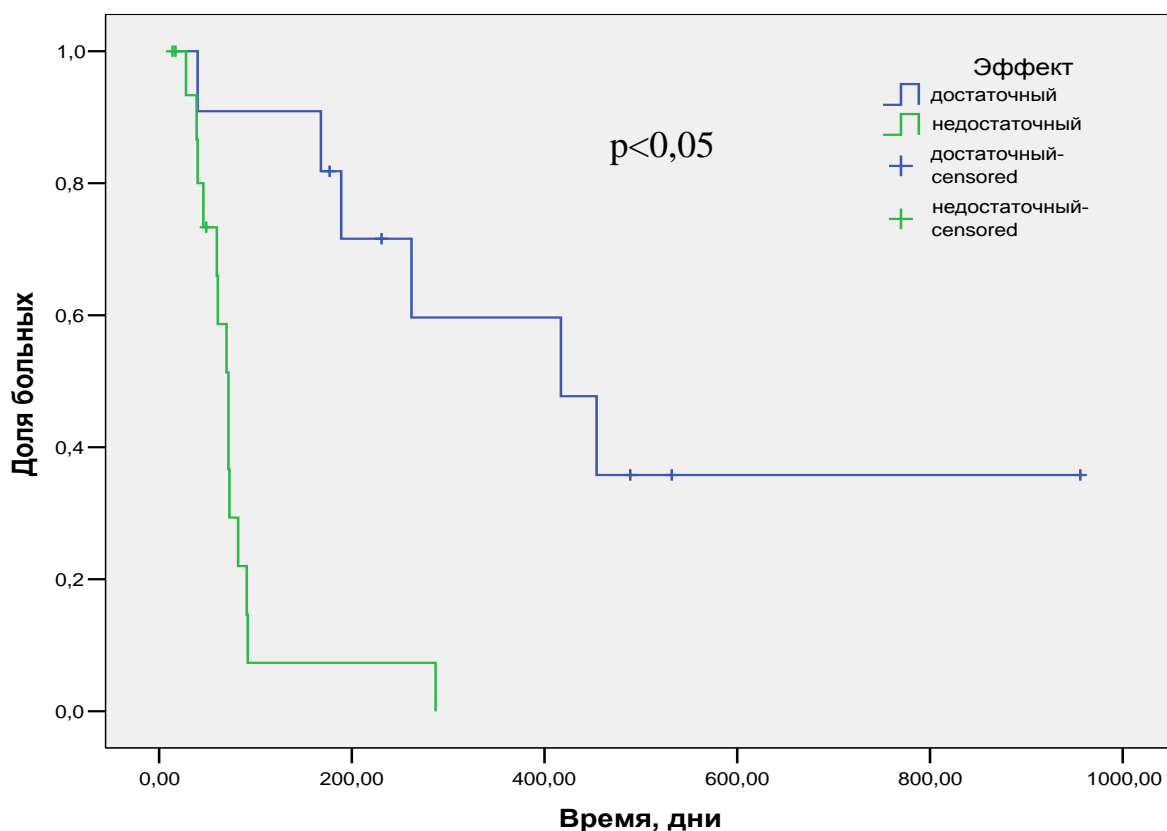


Рис. 35. Время до прогрессирования у больных с достаточным и недостаточным клиническим эффектом.

При оценке взаимосвязи частоты развития клинического ответа на ФДК-вакцинотерапию и продолжительности общей выживаемости было установлено, что данный суррогатный маркер хорошо отражает общую выживаемость (табл. 22 и рис. 36).

Таблица 22. Общая выживаемость больных с диссеминированной меланомой кожи в зависимости от эффективности ФДК-вакцинотерапии ($p=0,014$, тест Log-Rank)

Эффект лечения	Медиана общей выживаемости, дни	95% ДИ, дни
ЧР	764	-
СЗ	334	166-501
ПЗ	107	53-160

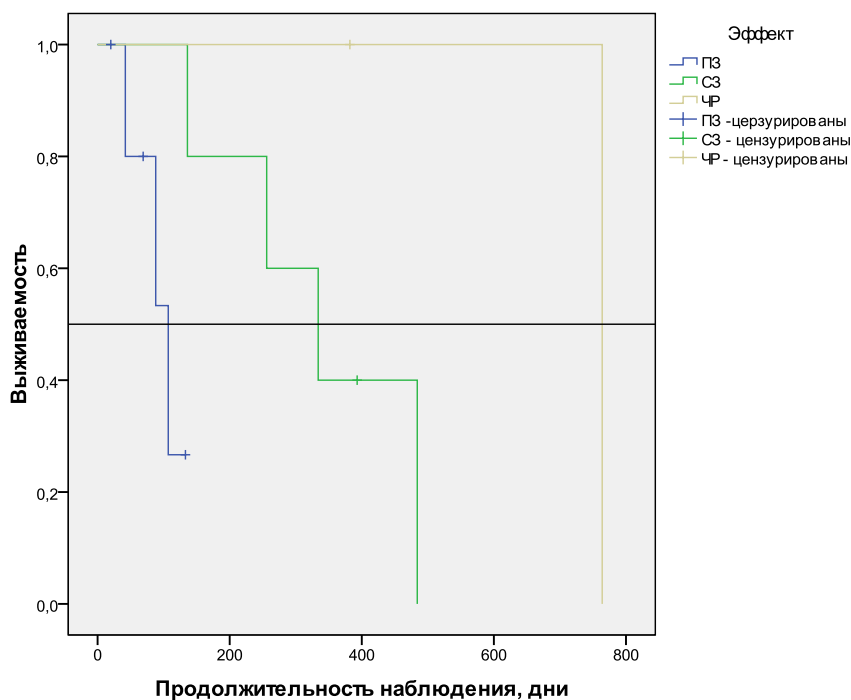


Рис. 36. Выживаемость больных с диссеминированной меланомой кожи в зависимости от клинической эффективности ФДК-вакцинотерапии.

7.3. Оценка иммунологической эффективности терапии

Иммунологическая эффективность терапии оценивали на основании динамики реакций ГЗТ после проведения вакцинации (у больных, получавших ДКВ), а также по содержанию и активности отдельных субпопуляций лимфоцитов и моноцитов в периферической крови.

7.3.1. Оценка реакций ГЗТ у больных на фоне терапии ДКВ

Результаты оценки реакций ГЗТ у больных, получавших ДКВ представлены в табл. 23. При лечении ФДК-вакциной оценки реакции ГЗТ не проводилось в связи с внутриопухолевым введением ДК.

Таблица 23. Динамика реакций ГЗТ у больных на фоне вакцинотерапии на основе аутологичных ДК полученных из моноцитов периферической крови

Группа	Пациент (возраст, пол)	Число вакцинаций (n) / ГЗТ (мм)																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
А	М., 62, ж	0	0	0	0	0	20	Лечение продолжается											
А	Д., 64, м	9	-	-	Лечение остановлено														
А	К., 64, м	7	-	-	-	Лечение остановлено													
А	С., 52, ж	-	-	10	9	Лечение остановлено													

А	Ц., 61, ж	7	16	-	14	-	-	Лечение остановлено											
А	Г., 60, м	0	0	-	-	15	Лечение остановлено												
А	О., 48, ж	12	8	15	5	12	-	8	8	-	10	6	0	-	-	-	Завершено		
А	К., 60, ж	0	18	7	12	7	5	6	-	7	7	3	0	-	-	4	Продолжено		
Л	С., 58, м	6	8	Лечение остановлено															
Л	В., 59, м	16	14	6	0	Лечение остановлено													
Л	Г., 62, ж	16	18	Лечение остановлено															
Л	С., 66, м	18	22	20	8	Лечение остановлено													
Л	Г., 53, м	12	18	16	16	Лечение остановлено													
Л	С., 70, м	15	18	10	12	Лечение остановлено													
Л	Е., 45, м	20	-	-	-	Лечение остановлено													
Л	К., 34, ж	-	-	25	Лечение остановлено														
Л	М., 40, м	5	-	-	-	-	Лечение остановлено												
Л	Ф., 42, м	-	13	-	-	Лечение остановлено													
Л	Л., 56, ж	-	20	-	Лечение остановлено														
Л	Л., 54, м	11	-	25	20	-	Лечение остановлено												
Л	К., 37, м	16	8	17	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Лечение остановлено		
Л	С., 26, ж	17	12	5	10	-	-	-	-	20	-	Лечение остановлено							
Л	Г., 53, м	23	15	11	0	Лечение остановлено													
Л	Д., 64, м	10	18	12	20	-	-	-	-	10	-	20	15	-	-	-	-	25	-
Л	С., 52, ж	10	0	Лечение остановлено															
Л	Ц., 61, ж	7	16	-	14	Лечение остановлено													

Примечание: группа А – адьювантная терапия, Л – ДКВ в лечебном режиме.

Как видно из представленных данных, у пациентов, длительно получавших вакцинотерапию в лечебном режиме, отмечалось достаточно долгое сохранение реакций ГЗТ, тогда как у больных, получавших адьювантную терапию, реакция угасала после 12 вакцинации. При анализе полученных данных не было выявлено статистически значимых изменений в размерах ГЗТ в течение первых 4 вакцинаций ($p > 0,25$), в том числе и при анализе разных групп больных. При сравнении реакций ГЗТ у больных, получавших адьювантную и лечебную терапию, выявлен достоверно меньший размер реакции у больных в адьювантном режиме ($p = 0,005$).

7.3.2. Оценка содержания субпопуляций лимфоцитов у больных, получавших лечение аутологичными ДК

Результаты анализа субпопуляций лимфоцитов и их функциональной активности у больных на фоне лечения ДКВ представлены в табл. 24.

Таблица 24. Динамика показателей неспецифического звена иммунной системы в процессе вакцинотерапии препаратом ДКВ

Показатель	Группа	Вакцинации				(p)
		1	2	3	4	
CD14, 10 ⁹ /л	лечебная терапия	0,26	0,24	0,23	0,19	0,392
	адьювантная терапия	0,38	0,24	0,23	0,22	0,072
	уровень значимости (p)	0,155	0,966	0,607	0,958	
	достаточный клинический эффект	0,28	0,22	0,25	0,17	0,286
	недостаточный клинический эффект	0,33	0,24	0,22	0,24	0,058
	уровень значимости (p)	0,6	1	0,388	0,351	
	все больные	0,3	0,24	0,23	0,2	0,043
CD14, %	лечебная терапия	11,6	11,38	9,2	10,54	0,048
	адьювантная терапия	13,68	7,5	8,67	8,03	0,132
	уровень значимости (p)	0,367	0,106	0,958	0,404	
	достаточный клинический эффект	12,44	8,17	10,83	8,4	0,145
	недостаточный клинический эффект	12,93	11,08	7,9	11,0	0,015
	уровень значимости (p)	0,64	0,244	0,562	0,37	
	все больные	12,43	10,16	9	9,66	0,012
CD16, 10 ⁹ /л	лечебная терапия	0,2	0,19	0,24	0,35	0,095
	адьювантная терапия	0,31	0,39	0,18	0,29	0,081
	уровень значимости (p)	0,041	0,106	0,388	0,594	
	достаточный клинический эффект	0,2	0,22	0,21	0,3	0,994
	недостаточный клинический эффект	0,27	0,22	0,21	0,35	0,682
	уровень значимости (p)	0,77	0,268	0,713	0,463	
	все больные	0,24	0,22	0,21	0,33	0,903
CD16, %	лечебная терапия	10,93	11,38	14,5	17,3	0,248
	адьювантная терапия	15,3	15,5	8,83	15,2	0,273
	уровень значимости (p)	0,041	0,127	0,181	0,594	
	достаточный клинический эффект	12,56	11,83	10,17	17,87	0,145
	недостаточный клинический эффект	12,8	13,07	13,7	15,14	0,701
	уровень значимости (p)	0,77	0,831	0,713	0,463	

Показатель	Группа	Вакцинации				(p)
		1	2	3	4	
	все больные	12,68	12,68	12,37	16,6	
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	лечебная терапия	3,11	5,17	3,54	1,73	0,564
	адьювантная терапия	2,26	3,92	4,52	5,81	0,564
	уровень значимости (p)	0,549	0,804	0,697	0,462	
	достаточный клинический эффект	1,83	2,02	1,97	1,5	0,948
	недостаточный клинический эффект	3,56	6,2	5,31	5,55	0,145
	уровень значимости (p)	0,148	0,417	0,395	0,055	
	все больные	2,86	4,8	3,9	3,17	

Как видно из таблицы, уровень CD14 клеток (моноциты) в процессе терапии имел тенденцию к снижению, преимущественно при оценке относительных показателей их содержания. Данная тенденция прослеживается во всех группах больных, однако, статистической значимости достигает лишь у пациентов, получавших лечебную вакцинотерапию. В этой группе пациентов также отмечена тенденция к повышению уровня CD16+ NK-клеток. Исходные значения этого показателя у больных без признаков опухолевого процесса были выше ($p=0,041$) и характеризовались периодическими колебаниями в процессе вакцинации. Уровень эозинофилов в периферической крови у больных с распространенным процессом имел тенденцию к снижению после 3 вакцинации ($p=0,06$), тогда как при адьювантной терапии наблюдалась обратная тенденция. При сопоставлении данного показателя у больных с достаточным и недостаточным ответом на терапию выявлено значительное повышение уровня данного показателя у последних до лечения и после 2-й вакцинации ($p<0,05$). Уровни лейкоцитов и лимфоцитов не изменялись под воздействием ДКВ ($p>0,1$), однако, наблюдалась тенденция к более высокому уровню данного показателя у больных с недостаточным эффектом вакцинотерапии ($p<0,05$).

7.3.3. Оценка специфического иммунного ответа

Оценка специфического поствакцинального иммунного ответа основана на обнаружении: 1) клона опухолеспецифических Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины: IFN γ , гранзим Б в ELISpot-тесте и 2) В-лимфоцитов, продуцирующих опухолеспецифические антитела (иммуноглобулины) IgG.

Результаты анализа представлены в табл. 25.

Таблица 25. Количество IFN- γ продуцирующих Т- клеток в процессе ДКВ

№ вакцинации, n	IFN γ -Spot, (достаточный клинический эффект), M \pm m, δ	IFN γ -Spot, (недостаточный клинический эффект), M \pm m, δ
1	15,44 \pm 5,79 δ =12,96	30,88 \pm 5,34 δ =15,1
2	21,25 \pm 9,14 δ =18,28	17,11 \pm 4,44 δ =11,74
3	59,2 \pm 14,98 δ =33,49	37,2 \pm 9,59 δ =21,46
4	56,5 \pm 16,95 δ =33,91	22,2 \pm 6,61 δ =14,79
5	73 \pm 31,01 δ =53,7	38 \pm 7,02 δ =9,9

Анализ результатов показал, что происходит статистически достоверное увеличение продукции IFN- γ опухоль-специфическими Т-лимфоцитами от начала лечения (15,44 \pm 5,79 спот/10⁵ МНК) и в процессе ДКВ (73 \pm 31,01 спот/10⁵ МНК после 4-й вакцинации) в группе пациентов с *достаточным* клиническим эффектом (коэффициент корреляции = 0,593; p=0,005). Это свидетельствует об активации поствакцинального специфического иммунного ответа и позволяет использовать этот тест для прогностического алгоритма клинической эффективности ДК вакцины.

Таблица 26. Оценка корреляционной связи между числом вакцинаций ДКВ и количеством IFN- γ продуцирующих Т- клеток у больных диссеминированной меланомой кожи

Наименование показателей	Коэффициент корреляции, r	Уровень значимости, уровень достоверности, p
IFN γ -Spot/ n*, (достаточный клинический эффект)	0,593	0,005 (<0,05)
IFN γ -Spot/n (недостаточный клинический эффект)	0,059	0,771 (>0,05)

Примечание: n* - число вакцинаций; Spot - количество IFN- γ продуцирующих Т- клеток

Отсутствие достоверной корреляционной связи между числом вакцинаций и количеством IFN- γ –секретирующих клеток в группе пациентов с *недостаточным* клиническим эффектом возможно связано с отсутствием адекватного иммунного ответа на вакцинотерапию (табл. 26).

Изучение продукции опухольспецифических антител в тесте ELISA с антигеном NY-ESO1, экспрессировавшимся на поверхности клеток отдельных больных, свидетельствует о статистически значимом нарастании титра у пациентов с достаточным клиническим ответом на лечение ($p < 0,05$).

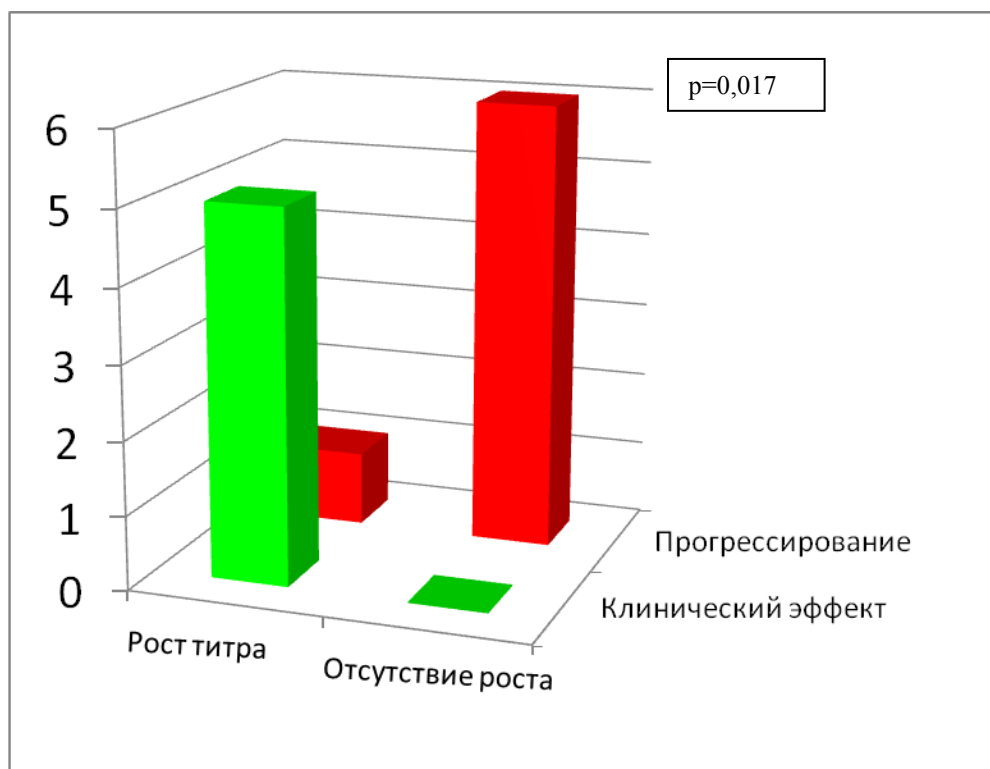


Рис. 37. Оценка клинического эффекта у больных, получавших ДКВ, в зависимости от индукции специфического противоопухолевого иммунного ответа.

Как видно из рис. 37, при отсутствии противоопухолевого иммунного ответа риск прогрессирования в 6 раз превосходил таковой при его развитии (95% ДИ 1,003 – 35,9, $p = 0,023$).

Параметры специфического поствакцинального иммунного ответа у больных, получавших лечебную ФДК, представлены в табл. 27 и 28.

Таблица 27. Изменения показателей специфического противоопухолевого иммунного ответа у больных с диссеминированной меланомой кожи и КЭ в процессе ФДК

Показатель	До начала лечения (*)	После первого цикла ФДК (**)	До начала второго цикла ФДК (***)	Тест Вилкоксона для парных наблюдений	
	$M \pm m$;	$M \pm m$	$M \pm m$	(*_**) Z, p	(*_***) Z, p
Титр специфических IgG	$13,0 \pm 7,9$	$24,0 \pm 10,2$	$16,2 \pm 9,6$	1,184 0,236	2,449 0,014
Количество Gr-β продуцирующих Т-	$31,6 \pm 10,8$	$43,3 \pm 10,1$	$34,3 \pm 15,0$	3,422 0,01	1,976 0,048

клеток					
Количество IFN- γ продуцирующих Т-клеток	53,7 \pm 12,1	52,1 \pm 9,3	53,4 \pm 10,6	0,505 0,613	1,976 0,048

Таблица 28. Изменение показателей специфического противоопухолевого иммунного ответа у больных с диссеминированной меланомой кожи и ПЗ в процессе ФДК

Показатель	До начала лечения (*)	После первого цикла ФДК (**)	До начала второго цикла ФДК (***)	Тест Вилкоксона для парных наблюдений	
	M \pm m;	M \pm m	M \pm m	(*_**) Z, p	(*_***) Z, p
Титр специфических IgG	212, 0 \pm 121,0	66,7 \pm 48,0	240,0 \pm 201,0	0,447 0,655	1,342 0,18
Количество Gr- β продуцирующих Т-клеток	57,4 \pm 20,8	-	59,6 \pm 35,9	-	-
Количество IFN- γ продуцирующих Т-клеток	83,5 \pm 15,3	80,0 \pm 20,0	94,3 \pm 23,4	1,342 0,18	1,604 0,109

У больных с КЭ (1-я группа) в процессе ФДК-вакцинотерапии наблюдается статистически значимое увеличение содержания опухолеспецифических IgG (с 13,0 \pm 7,9 от начала лечения до 16,2 \pm 9,6 ($p < 0,014$) к началу второго цикла ФДК-вакцинотерапии, в отличие от больных с ПЗ (2-я группа) со значительно более высоким уровнем специфических IgG до начала ФДК-вакцинотерапии (212,0 \pm 121,0); снижением этого показателя после 5-дневного цикла вакцинотерапии (66,7 \pm 48,0) и увеличением к началу второго цикла терапии (240,0 \pm 201,0).

Оценка продукции IFN- γ и Gr- β опухолеспецифическими Т-лимфоцитами в исследуемых группах больных, выявила статистически достоверное увеличение продукции Gr- β опухолеспецифическими Т-лимфоцитами у пациентов с КЭ (с 31,57 \pm 10,8 от начала лечения до 43,35 \pm 10,1 после 5-дневного цикла вакцинотерапии и 34,3 \pm 15 к началу второго цикла лечения ($p < 0,048$)) по сравнению с больными с ПЗ, где наблюдалась более высокая продукция Gr- β до начала терапии (57,4 \pm 20,8) и тенденция к увеличению (59,6 \pm 35,9) к началу второго цикла лечения.

Несомненно, это является важным фактором в оценке клинической и иммунологической эффективности изучаемого способа активной специфической иммунотерапии – ФДК-вакцинотерапии больных с диссеминированной меланомой кожи.

Вместе с тем, стимуляция опухолеспецифического иммунного ответа, отраженная в лабораторных тестах, далеко не всегда сопровождается регрессом опухоли. Отсутствие такой корреляции между иммунологической и клинической эффективностью иммунотерапии (в том числе вакцинотерапии) является одной из нерешенных проблем биотерапии злокачественных опухолей.

Таким образом, использование стандартизированных аутологичных ДК показало безопасность (единичные случаи НЯ 3 ст., отсутствие НЯ 4 ст. и СНЯ) и клиническую эффективность в изученных режимах терапии:

- ДКВ (лечебная) частота объективного ответа на лечение у 5% (95% ДИ 0-15%) больных и стабилизации опухолевого процесса еще у 32 % больных, медиана времени до прогрессирования составила 72 (95% ДИ 45-98) дня;
- Использование лечебной ФДК-вакцинотерапии позволяет достичь объективного ответа на лечение у 15% (95% ДИ 2-39%) больных и стабилизации опухолевого процесса еще у 39 % больных, медиана времени до прогрессирования составила 108 (95% ДИ 68-147) дней;
- Медиана времени до прогрессирования при адьювантной (профилактической) ДКВ составляет 402 (95% ДИ 2-802) дня, что также свидетельствует несомненной клинической эффективности метода и сопоставимо с имеющимися способами терапии.

Связь иммунологических изменений с развитием лечебного эффекта ($p < 0,05$) свидетельствует о необходимости мониторинга развития иммунологических реакций в процессе лечения.

Глава 8

Обсуждение результатов исследования

Стратегия создания современных противоопухолевых ДК-вакцин основана на принципах безопасности, специфичности, иммуногенности, воспроизводимости, стабильности, клинической эффективности, в соответствии с регламентирующими правилами и международными стандартами (GMP – *good manufacturing practice*, GLP – *good laboratory practice*, GCP – *good clinical practice*) для производства и клинического применения лекарственных средств. Нами были проведены исследования, на основе которых мы разработали лабораторную методику оценки качества препарата ДК, в основу которого заложен контроль:

- 1) получения миелоидных предшественников ДК;
- 2) дифференцировки ДК *in vitro*;
- 3) жизнеспособности ДК;
- 4) иммунофенотипических характеристик незрелых и зрелых опухолеспецифических вакцинных ДК;
- 4) скрининг вакцинных ДК на наличие инфекционных агентов;
- 5) долговременная криоконсервация вакцинного препарата ДК.

Характеристика гемопозитических предшественников ДК при получении их из стимулированного G-CSF и нестимулированного свежевыделенного или криоконсервированного лейкофезного материала или периферической крови больных злокачественными опухолями требует обоснованного изучения уровня экспрессии миелоидных дифференцировочных антигенов, отражающих степень зрелости (качества) клеточного субпродукта (Wong K.L. et al., 2011; Papatriantafyllou M., 2011).

Однонаправленная дифференцировка стволовых клеток в моноциты или ДК обусловлена появлением у них на разных стадиях развития рецепторов для специфических факторов роста и дифференцировки (Bordon Y., 2010; Dorshking K., 2010). По мере созревания в их цитоплазме и на поверхности появляются и исчезают эти маркеры, увеличивается экспрессия молекул МНС II класса. Наиболее важная роль отводится экспрессии CD34, CD33, CD14, CD11 и HLA-DR антигенам, участвующим в созревании и активации миелоидных предшественников ДК, формировании врожденного иммунитета (Ярилин А.А., 2010; Clanchy F.I.L. et al., 2006; Gorczyca W. et al., 2011).

Одной из экономичных технологий получения ДК-вакцины является метод сепараторного лейкофеза, позволяющий значительно сократить производственный процесс за счет исключения таких стадий, как многократные венопункции, выделение мононуклеаров

на ступенчатом градиенте, получение одной дозы вакцины. Этот метод позволяет повысить доступность и качество аутологичных вакцинных препаратов, инновационных вакцин на основе иммуногенных (противоопухолевых) ДК. Однако на этапе получения аферезного материала для выделения предшественников ДК важным становится иммунофенотипирование МНК лейкоферезной фракции, так как иммуногенная специфичность вакцинных ДК является ключевым моментом в индукции противоопухолевого иммунного ответа. Мы исследовали морфологию и иммунофенотип МНК лейкоферезного концентрата. Наблюдения показали, что лейкоферезный концентрат больных меланомой кожи на 100% состояли из CD45⁺ гемопоэтических клеток. При этом иммунофенотип предшественников ДК, экспрессирующих на своей поверхности антигены: стволовых гемопоэтических клеток (CD45⁺CD34⁺), миелоидных клеток (CD45⁺CD33⁺), моноцитов (CD45⁺CD14⁺) и дендритных клеток (CD45⁺CD1a⁺, CD45⁺CD83⁺) был представлен в значительно большей степени (60,7%), чем клеток лимфоидного ряда (CD45⁺CD3⁺; CD45⁺CD19⁺; CD45⁺CD16⁺, CD56⁺, CD57⁺) (van Lochem E.G. et al., 2004).

Вместе с тем, эти показатели дают только косвенную оценку реальной кроветворной способности костного мозга больных меланомой кожи, получивших 1-3 линии цитотоксического лекарственного лечения. На сегодня не существует абсолютно точных параметров определения достаточности МНК в лейкоферезном концентрате у этой категории больных (Neron S. et al., 2007; Shin J.W. et al., 2008; Yannelli J.R. et al., 2009; Strasser E.F et al., 2010; Weidinger T.M. et al., 2011). Так в работе Strasser E.F., Eckstein R. (2010) по оптимизации процедуры лейкофереза и программного обеспечения для получения достаточного количества предшественников ДК наиболее важным является число предшествующих курсов химиотерапии, период заболевания, объем опухолевой массы.

Для выделения моноцитов из образца периферической крови, лейкоконцентрата или аферезного материала используются различные методы: центрифугирование в градиенте плотности, клеточная адгезия, магнитная селекция CD14⁺-клеток. Однако до настоящего времени остается неразработанной лабораторная методика выделения моноцитов из лейкоконцентрата (лейкоферезного материала) или периферической крови с целью получения большого количества ДК для клинического применения.

До настоящего времени остается неразработанной лабораторная методика выделения моноцитов из лейкоконцентрата (аферезного материала) или периферической крови с целью получения большого количества ДК для клинического применения. Мы изучили несколько способов получения миелоидных предшественников: автоматический метод лейкофереза; выделение концентрированного количества МНК в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium; адгезия на пластике.

В нашем исследовании установлено, что моноциты периферической крови больных меланомой кожи обладают различной способностью к адгезии на пластике и происходит их потеря в качестве неадгезированных моноцитов от 14,3% (CD14⁺CD11c⁺HLADR⁻) до 46,3% (CD45⁺CD34⁻CD33⁺). Кроме того наши исследования показали, что у больных злокачественными новообразованиями содержание адгезированных моноцитов было сниженным по сравнению с аналогичными образцами, полученными от здоровых лиц (доноры). Потеря неадгезионной фракции миелоидных предшественников ДК (%) составила 46,82±13,52 в образцах онкологических больных по сравнению с 29,78±9,24 – в группе здоровых лиц (доноры). Отсутствие статистически значимых различий (p=0,36; >0,05) позволило полагать, что для дифференцировки ДК можно использовать периферическую кровь онкологических больных.

В последнее время придается большое значение изучению характеристик различных субпопуляций моноцитов в связи с их пластичностью и дедифференцировкой в ДК, которые имеют не только теоретический интерес, но и связаны с решением актуальных медицинских задач: лечением злокачественных опухолей, регуляцией иммунологических функций, трансплантацией периферических гемопоэтических стволовых клеток (Metharom P. et al., 2006; Moore A.C. et al., 2012; Solary E., 2012; van Dongen J.J. et al., 2012). На основании уже полученных данных можно судить о том, какую важную роль играет методика выделения моноцитов (Yona S., Jung S., 2009; Ziegler-Heitbrock L. et al., 2009).

Стандартизация оптимальных условий криоконсервации МНК и моноцитов из аферезного материала и периферической крови необходима для дальнейшего использования их в качестве источников миелоидных предшественников ДК. В связи с этим актуальным становится разработка лабораторной методики оценки и контроля качества экспрессии CD34, CD33, CD14, CD11, CD14, HLA-DR антигенов в свежевыделенном, криоконсервированном или криоконцентрированном лейкоаферезном материале больных злокачественными опухолями.

В нашем исследовании проведена лабораторная оценка и контроль качества моноцитарного компонента МНК свежевыделенного и криоконсервированного лейкоаферезного материала, а также выделенного на градиенте плотности Ficoll-Paque Premium криоконсервированного лейкоаферезного материала, используемого в качестве клеточного субпродукта вакцинных ДК. Мы исследовали количество, жизнеспособность, экспрессию CD45⁺, CD14⁺, HLA-DR⁺, CD11c, CD33⁺, CD34⁺ антигенов.

При анализе результатов было установлено, что экспрессия дифференцировочных антигенов на CD14⁺ моноцитах после криоконсервации и криоконцентрации не выявляет статистически значимых изменений, что свидетельствует о нецелесообразности

концентрации моноцитов для повышения качества клеточного субпродукта после криоконцентрации. Кроме того криоконсервация и криоконцентрация лейкоцитарного материала приводит к статистически значимому снижению числа CD14⁺ CD11c⁺ HLA-DR⁻ клеток (p=0,0001), что наряду с тенденцией к увеличению содержания моноцитов, экспрессирующих CD14⁺CD11c⁻HLA-DR⁺ и CD14⁺CD34⁺ антигены, свидетельствует об увеличении количества клеток с повышенным потенциалом к дальнейшей дифференцировке. Этот факт очень важен в контексте дифференцировки моноцитов в ДК и создания противоопухолевых вакцин.

Решающим условием эффективности ДК вакцинотерапии по мнению С. Figdor и соавт. (2011) является оптимизация получения ДК-вакцин, основанная на изучении жизнеспособности, функциональной активности и уровне экспрессии иммунофенотипических маркеров ДК и их предшественников. Характеристика степени зрелости ДК влияет на их функциональную активность. Так в работе Jin Y. И соавт. (2007) показано, что незрелые ДК периферической крови человека могут вызывать толерантность к антигенному стимулу. Незрелые ДК, введенные здоровым добровольцам ингибировали иммунный ответ CD8⁺ Т-клеток, направленный на вирусные пептиды, и стимулировали образование пептид-специфических Т-клеток, продуцирующих иммуносупрессирующий IL-10 или аутореактивные Т-клетки. В противоположность этому, зрелые CD83⁺ ДК вызывали образование высокофункциональных CD83⁺ CD8⁺ Т-клеток и способствовали продукции IFN- γ CD4⁺ Т-клетками (Shevach E.M., 2004; Aerts-Toegaert C. et al., 2007).

Степень зрелости является ключевой характеристикой ДК при использовании в активной специфической иммунотерапии. Поэтому выявление факторов, способствующих созреванию различных субпопуляций ДК, представляет большой теоретический и практический интерес. Таким образом, изучение дифференцировки ДК из миелоидных предшественников для создания противоопухолевых вакцин становится важной стратегической задачей, и для ее реализации необходимы исследования условий инкубации/культивирования моноцитов *in vitro* (среды, ростовые факторы, опухолевые антигены). Наблюдения за изменением формы, миграцией, экспрессией линейноспецифических и дифференцировочных антигенов с использованием инновационных подходов позволяют определить оптимальные условия культивирования моноцитов, созревание вакцинных ДК, что может привести к снижению затрат при их производстве.

В настоящем исследовании нами впервые проведен сравнительный анализ влияния GM-CSF импортного и отечественного производства на экспрессию антигенов дифференцировки зрелых ДК. Было установлено, что они обладают сходным

фармакологическим воздействием и для снижения стоимости ДК вакцин целесообразно использовать GM-CSF отечественного производства. Кроме того, во многих исследованиях используют различные концентрации IL-4, поэтому для рационального использования данного ростового фактора нами было изучено его влияние на экспрессию CD1a⁺, CD209⁺, CD40⁺, HLA-DR⁺, CD86⁺, CD80⁺ антигенов на незрелых и зрелых ДК. С помощью однофакторных полиномиальных моделей второго порядка мы установили оптимальный интервал концентрации IL-4 для дифференцировки ДК от 5 до 20 нг/мл, что дает возможность уменьшить расход IL-4 импортного производства от 3 до 5 раз.

Представленные в литературе данные о возможности быстрой генерации частично зрелых ДК с помощью GM-CSF и IFN- α (Santini S. et al., 2000; 2003; Schiavoni G. Et al., 2013) заинтересовали нас с целью повышения эффективности бюджетных расходов на лечение больных злокачественными новообразованиями и снижения стоимости дендритноклеточных вакцин. На основании данных полученных нами в настоящем исследовании можно сделать вывод об ускоренном созревании ДК под воздействием IFN- α в изучаемый период наблюдения, что является некорректным при изготовлении противоопухолевых ДК вакцин, так как иммунофенотип незрелых ДК должен приближаться к значениям CD14⁻CD1a⁺CD83⁻, что в большей степени соответствует характеристике ДК, дифференцированных в присутствии IL-4.

В настоящей работе было продемонстрировано преимущество в использовании сбалансированной бессывороточной питательной среды CellGro DC без добавления АВ сыворотки по сравнению с добавлением 2% АВ сыворотки и средой RPMI-1640, содержащей 10% искомой сыворотки в указанный период наблюдения. Дифференцировка ДК из моноцитов периферической крови в среде CellGro DC является оптимальной по экспрессии линейноспецифических и дифференцировочных антигенов по сравнению с инкубацией в средах содержащих сыворотку АВ человека ($p < 0,05$). Это позволяет уменьшить производственные затраты при получении ДК-вакцины и минимизирует количество высокомолекулярных белковых веществ, которые, обычно, находятся в готовых вакцинных препаратах, что снижает риск развития нежелательных реакций организма.

Важным этапом изучения процесса создания ДК вакцин является стандартизация активации и нагрузки ДК. «Раково-тестикулярные» гены экспрессированы в опухолях различных гистологических типов и кодируют отдельные строго опухолеспецифические антигены (MAGE, BAGE, GAGE, LAGE, NY-ESO-1). Обычно они определяются в «молчащем» состоянии в нормальных тканях взрослых и экспрессируются в зародышевых клетках яичка мужчин. Эти антигены являются идеальными мишенями для направленного иммунного воздействия в отсутствие опасности развития аутоиммунных реакций. В

настоящее время РТА изучаются и активно используются для создания противоопухолевых вакцин. При использовании РТА для активации незрелых ДК необходимо контролировать уровень экспрессии антигенов на опухолевых клетках и их изменчивость в процессе культивирования.

В этом контексте необходимо остановиться на проблеме существования опухолеспецифических антигенов, экспрессия которых чрезвычайно ограничена в нормальных тканях. В настоящее время на клетках меланомы идентифицированы несколько типов меланоассоциированных антигенов (Parmiani G. et al., 2003). Это протеины, вовлеченные в синтез меланина: MART1/melan A, тирозиназа, TRP1, 2, MITF, которые в норме присутствуют только у меланоцитов. Вторую группу составляют раково-тестикулярные антигены (MAGE, BAGE, GAGE, LAGE, NY-ESO-1), экспрессируемые в ткани яичка и появляющиеся при злокачественной трансформации (Zendman A.J. et al., 2003). Кроме того, на клетках меланомы выявляют белок S100, который не является абсолютно специфичным антигеном для меланомы, так как обнаруживается также в клетках лимфатических узлов, дендритных клетках, макрофагах, а также в клетках нервных волокон. Злокачественные меланоциты синтезируют адгезивные молекулы CD63 и CD146, ассоциированные с процессами метастазирования (Jang H.I., Lee H., 2003) и антиген gp100, представляющий собой чувствительный к нейроминидазе олигосахарид гликоконъюгатов, присутствующих в незрелых меланосомах.

В тоже время, нужно отметить, что по уже имеющимся данным биологические свойства меланомных клеток *in vitro* эволюционируют значительно быстрее. В них накапливаются изменения, благоприятствующие усилению метастатических и инвазивных способностей, такие как потеря ОАА и антигенов МНС I класса, появление или усиление экспрессии антигенов МНС II класса, усиление экспрессии ряда адгезивных молекул (CD146), обеспечивающих подвижность и взаимодействие с другими клетками, например, эндотелием, интенсификация процессов пролиферации (увеличение количества клеток, экспрессирующих антиген Ki-67) (Моисеенко В.М. и др., 2008). Поэтому важно периодически (каждый пятый пассаж) проводить анализ экспрессии антигенов на клеточных линиях меланомы кожи, которые используются как оптимизированный источник РТА и ОАА для нагрузки ДК.

В качестве источника иммуногенных опухолевых антигенов нами были отобраны 4 стабильно растущие клеточные линии меланомы кожи человека (авторские названия: Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520), которые задепонированы в Российской коллекции клеточных культур позвоночных НИИ цитологии РАН. Нами была проведена цитологическая и морфологическая верификация, изучен тип роста, экспрессия ОАА и РТА.

Все исследованные культуры продуцировали минимальные количества иммуносупрессирующих факторов, не имели контаминации фибробластами и были использованы для создания аллогенного коктейля лизированных охарактеризованных опухолевых клеток, которые экспрессировали иммуногены РТА, в том числе NY-ESO-1, MAGE, BAGE, GAGE и использовались нами для нагрузки и активации незрелых ДК в сочетании с TNF- α в концентрации 20 нг/мл. Дифференцировка миелоидных предшественников в ДК сопровождается закономерной сменой фенотипов, в частности, появлением молекулы CD1a и утратой CD14, а созревание ДК ассоциировано с экспрессией молекул CD83 и утратой CD1a, а также повышением экспрессии молекул HLA-DR и CD86, CD80, CCR7. В связи с этим, анализ базировался на изучении иммунофенотипических особенностях вакцинных ДК на разных стадиях созревания.

По уровню экспрессии иммунофенотипических маркеров незрелых и зрелых ДК мы разработали лабораторную методику контроля качества вакцинных ДК, в основу которого заложены следующие параметры:

- 1) иммунофенотипические характеристики незрелых ДК: экспрессия антигена CD1a⁺ (76,78 \pm 4,15) и утрата CD14⁺ антигена;
- 2) иммунофенотипические характеристики зрелых опухолеспецифических вакцинных ДК: наличие дифференцировочного антигена CD83 (75,66 \pm 4,33; p=0,0001), костимулирующего антигена CD80 (73,03 \pm 4,02; p=0,0003) и костимулирующего антигена CD86 (49,11 \pm 5,03; p=0,00001).

Другим актуальным моментом создания ДК вакцин является необходимость криоконсервации и хранения вакцинного препарата после его приготовления для реализации возможности проведения курса вакцинаций в стандартных условиях. Опираясь на предшествующие фундаментальные исследования теоретических основ криоконсервации вакцинных ДК, изучение реакций живых ДК на воздействие ультранизких температур, экспрессии этими клетками поверхностных антигенов и продукции ими цитокинов, способы защиты клеток от повреждающего действия замораживания, мы попытались определить возможности осуществления обратимости жизнедеятельности замороженных ДК, выявить оптимальные криозащитные среды, разработать способы криоконсервации и требования по хранению препарата ДК.

В нашем исследовании анализ жизнеспособности ДК, дифференцированных из миелоидных предшественников периферической крови, после криоконсервации и оттаивания выявил сниженное содержание жизнеспособных ДК по сравнению с числом ДК до криоконсервации [93,75 \pm 0,42 и с 97,14 \pm 0,27 (p<0,05) соответственно]. Результаты изменений жизнеспособности ДК в течение 48 месяцев показывают, что статистически

значимое снижение указанной величины происходит только на фоне первых 10 месяцев криоконсервации. Жизнеспособность образцов ДК до криоконсервации составила $97,4 \pm 0,3\%$ с незначительным снижением этого показателя до $90,5 \pm 0,7$ к 24 мес. и сохранения близкого к этому уровню значения ($91,8 \pm 0,6$) к 48 мес. хранения. Представленные в литературе требования к жизнеспособности ДК после криоконсервации не менее 70% (Figdor S. et. Al., 2004), что свидетельствует о значительном преимуществе жизнеспособности ДК в нашем исследовании.

Разработка требований по хранению препарата ДК имеет исключительно важное значение для широкого внедрения в лечебную практику противоопухолевых ДК вакцин. Одним из непереносимых условий криоконсервации ДК является хранение их в условиях ультранизких температур (-196°C), так как при этом не расходуются энергетические ресурсы и не накапливаются конечные продукты обмена веществ. Наряду с температурным фактором большое значение имеют специальные консервирующие среды, которые также обеспечивают оптимальные условия при криоконсервировании.

Криосреда для вакцинных ДК должна содержать высокую концентрацию сыворотки/белка ($>20\%$). Во многих случаях сыворотка используется в 90%. Вместе с тем для вакцинных ДК человека допускается использование исключительно сыворотки АВ(IV) гр., произведенной в условиях GMP, или аутологичной плазмы. Не допускается применение ксеногенных сывороток. В настоящее время на рынке появилась бессывороточная среда для криоконсервирования клеточных культур. Мы впервые провели сравнительное исследование эффективности криоконсервации в среде с/без сыворотки вакцинных ДК. Статистически значимых различий в жизнеспособности ДК до криоконсервации и после криоконсервации в среде содержащей сыворотку и в бессывороточной среде не было обнаружено ($p > 0,05$). Это означает, что для хранения ДК могут быть использованы бессывороточные среды.

Также мы изучили функциональную активность и иммуногенность вакцинных ДК до и после криоконсервации в условиях ультранизкой температуры (-196°C) с помощью ELISpot-теста. Этот анализ не выявил статистически значимых различий в количестве IFN- γ секретирующих иммунокомпетентных клеток при активации ДК до и после их криоконсервации. Следовательно, криоконсервация и хранение вакцинных ДК в условиях ультранизких температур не оказывают отрицательного влияния на их функциональную активность, активацию лимфоцитов *in vitro* и, по всей вероятности, активацию лимфоцитов *in vivo*.

Таким образом, в результате проведенного исследования нами были разработаны требования по хранению препарата ДК, в основу которых заложены:

1. Хранение препарата ДК в условиях ультранизкой температуры (-196°C) в криохранилище криогенной лаборатории.
2. Наличие технического и медицинского персонала, обеспечивающего бесперебойную работу криогенной лаборатории.
3. Регулярное и бесперебойное обеспечение жидким азотом.
4. Техническое обслуживание и уход за оборудованием.
5. Криоконсервация ДК с использованием компьютеризированного криогенного оборудования.
6. Использование криозащитной среды, содержащей не менее 20% сыворотки АВ (IV) группы человека, 10% ДМСО.
7. Контроль образца препарата ДК после криоконсервации и хранения на исследование жизнеспособности, стерильности, и иммуногенности.
8. Система документации: учет поступления, хранения и выдачи препарата ДК-вакцины.

В настоящем исследовании мы провели оценку клинической и иммунологической эффективности вакцинотерапии на основе аутологичных ДК, генерированных *ex vivo* по оптимизированной и стандартизированной нами технологии.

В нашем исследовании у больных диссеминированной меланомой кожи ДК вакцинотерапия была безопасна и не сопровождалась серьезными нежелательными явлениями. Во многих клинических работах была продемонстрирована безопасность и хорошая переносимость противоопухолевых вакцин на основе ДК. Согласно опубликованным данным Draube A. и соавт. (2011) о проведенных в мире клинических исследованиях (I-II фазы) вакцин, применяющихся для лечения больных раком почки и раком предстательной железы, вакцина на основе аутологичных дендритных клеток является нетоксичной и безопасной. Наиболее часто встречающиеся побочные эффекты при использовании ДК-вакцины:

1. Гриппоподобный синдром: лихорадка, усталость, артралгия, миалгия, потливость.
2. Локальная реакция в месте введения вакцины: зуд, гиперемия, болезненность, индурация.
3. Аллергическая реакция, гиперчувствительность.

Описанные проявления токсичности вакцинотерапии на основе аутологичных ДК минимальны (1-2 ст. СТС АЕ v.3), в отсутствие токсических проявлений 3-4 ст.

Частота достижения объективного ответа в нашем исследовании была низкой: 5% (95% ДИ 0-15%) у больных, получавших ДКВ и 15% (95% ДИ 2-39%) у больных, получавших ФДК-вакцинотерапию. Это может быть связано с рядом причин:

распространенностью опухолевого процесса, наличием метастатического поражения жизненно важных органов (68 %), предшествующим лечением (химио- или лучевой терапией). В результате самый оптимальный иммунный ответ, в конечном счете, может не преодолеть опухолевую прогрессию. Вместе с тем, следует отметить, что использованные критерии оценки объективного ответа на лечение (RECIST 1.1) разрабатывались на основе результатов терапии больных, получавших химиотерапию. Проводимая нами вакциноterapia имеет принципиально другой механизм действия. Необходимость активации иммунной системы приводит к существенной задержке развития ответа на лечение. Поэтому, для большинства исследований с применением ДК для лечения злокачественных опухолей отмечается низкая частота объективных ответов или вовсе их отсутствие. Так в исследованиях Rosenberg S.A. и соавт. (2004) в результатах клинических исследований, проведенных на 440 пациентах частота достижения объективных ответов 2,6%, а по данным Eggermont A.M., опубликованным в 2009 году в 40 различных исследованиях с участием 756 пациентов частота достижения объективных ответов составила 4 %. В 2011 году по результатам проведенного метаанализа в NCI (Национальный институт рака, США) 29 клинических исследований, с участием 906 пациентов частота достижения объективных ответов у 7,7% больных раком предстательной железы и у 12,7% больных раком почки, получавших вакцину на основе аутологичных дендритных клеток. Несомненно, включение в исследование пациентов с наименьшим распространением опухолевого процесса, позволит реально оценить клиническую и иммунологическую эффективность и разработать дальнейшую тактику использования противоопухолевых вакцин.

В нашем исследовании время до прогрессирования заболевания составляет 75 (95% ДИ 45-98) дней у больных, получавших ДКВ (лечебную), 108 (95% ДИ 68-147) дней у больных, получавших ФДК (лечебную) и 402 (95% ДИ 2-802) дня у больных, получавших адьювантное лечение. Медиана общей выживаемости (ОВ) составила при ДКВ (лечебная) 420 (95% ДИ 282-557) дней, ФДК (лечебная) 334 (95% ДИ 43-624) дня. Эти результаты сопоставимы с результатами применения других иммунотерапевтических средств у идентичных категорий больных. Так, в регистрационном исследовании III фазы по изучению терапии пептидной вакцины и ипилимумабом в качестве 2-й линии терапии больных с диссеминированной меланомой кожи медиана ВДП составила 2,8 мес, ОВ- 10,1 мес (O'Day S. et al., 2010). При этом данный препарат статистически значимо увеличивал продолжительность жизни больных и на основании полученных результатов был зарегистрирован для клинического применения.

Такие показатели эффективности иммунотерапии, как объективный клинический ответ на лечение, безрецидивная выживаемость, время до прогрессирования заболевания,

продолжительность жизни больных являются достаточно поздними (Hoos A. et al., 2010). Отсутствие клинического эффекта не всегда свидетельствует о неэффективности иммунотерапии, как уже было указано выше. Поэтому возникает необходимость в поиске «суррогатных маркеров», коррелирующих с клинической эффективностью.

Активация Т-клеточной системы адаптивного (приобретенного) иммунитета компонентами врожденного иммунитета (ДК), является защитным фактором в преодолении иммуносупрессии и Т-клеточной анергии у больных злокачественными опухолями. При этом роль ДК сводится к доставке информации об опухолеассоциированных (ОАА) в регионарные лимфатические узлы. Последующая активация Т-лимфоцитов, образование опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), чья «профессиональная деятельность» заключается в распознавании РТА с МНС-молекулами на поверхности опухолевых клеток и специфический цитолиз, являются главной задачей при проведении активной специфической иммунотерапии (противоопухолевой ДК-вакцинотерапии). Цитолиз опухолевых клеток осуществляется как напрямую (за счет цитотоксического механизма), так и опосредованно (посредством выработки интерферонов или других цитокинов), что может быть изучено в иммунологических тестах *in vitro*.

В нашем исследовании оценка специфического поствакцинального иммунного ответа основана на обнаружении: 1) клона опухолеспецифических Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины: IFN γ , перфорин, гранзим Б и 2) В-лимфоцитов, продуцирующих опухолеспецифические антитела (иммуноглобулины) IgM и/или IgG.

Обнаружение опухолеспецифических Т-клеток в ELISpot-тесте и выявление специфических антител (IgG) в сыворотке крови больных с диссеминированной меланомой кожи и их рост в процессе вакцинотерапии аутологичными ДК, может рассматриваться как суррогатный маркер специфического поствакцинального иммунного ответа. При этом направленность изменений иммунологических и клинических параметров неоднозначна, но позволяет в целом говорить об усилении антигенспецифического иммунного ответа и его корреляции с клинической эффективностью. Кроме того, результаты ELISpot теста и анализа опухолеспецифического клеточного ИФА поствакцинального иммунного ответа у больных диссеминированной меланомой кожи могут быть использованы для создания алгоритма оценки эффективности вакцинотерапии на основе ДК. В ELISpot-тесте детектируемый продукт в момент анализа находится на поверхности секретирующей клетки, будучи связанным с ее рецепторами, что определяет уникальную высокую чувствительность этого метода. В то же время, стимуляция продукции цитокина происходит *in vitro* непосредственно перед детекцией. В результате метод ELISpot позволяет выявлять 1 цитокин-секретирующую клетку из 100 000 анализируемых клеток, что в 20 – 200 раз точнее стандартного ИФА.

ELISpot-тест широко используется для исследования специфических иммунных реакций при инфекционных, аутоиммунных, аллергических и онкологических заболеваниях (Hoos A. et al., 2007; Janetzki S. et al., 2007).

В нашем исследовании показатели специфического Т-клеточного и гуморального иммунного ответа коррелируют с клинической эффективностью вакцинотерапии, тогда как не было выявлено статистически значимых изменений в размерах ГЗТ в течение первых 4 вакцинаций. К похожим выводам пришли Draube A. и соавт. (2011), которые проводили метаанализ исследований по оценке иммунологического ответа на ДК вакцинотерапию. В этом исследовании была показана, связь между специфическим клеточным иммунным ответом и клинической эффективностью у больных раком почки и раком предстательной железы.

Использование ELISpot теста и анализа опухолеспецифического клеточного ИФА становится важным в мониторинге поствакцинального иммунного ответа у больных меланомой кожи.

В заключение, следует еще раз отметить, что в результате проведенного исследования нами разработана лабораторная методика оценки качества препарата ДК, в основу которого заложен контроль: 1) получения миелоидных периферических предшественников; 2) дифференцировка ДК *in vitro*; 3) нагрузки и активации незрелых CD14⁻CD1a⁺CD83⁻ ДК; 4) контроль жизнеспособности ДК; 5) иммунофенотипические характеристики незрелых и зрелых опухолеспецифических вакцинных ДК; 6) скрининг вакцинных ДК на наличие инфекционных агентов; 7) долговременная криоконсервация вакцинного препарата ДК, что позволяет обосновать целесообразность использования стандартизированных дендритноклеточных вакцин. Кроме того, адаптированы и внедрены в клиническую практику методы лабораторного мониторинга специфического поствакцинального иммунного ответа ELISpot-анализ и клеточный ИФА. Для всех этапов приготовления вакцинных ДК описаны стандартные операционные процедуры.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены и стандартизированы оптимальные условия получения, криоконсервации и хранения аутологичных дендритноклеточных вакцин, нагруженных иммуногенными РГА⁺ антигенами.
2. Анализ иммунофенотипа миелоидных предшественников ДК по уровню экспрессии CD34, CD33, CD14, CD11c, HLA-DR антигенов у больных меланомой кожи выявил различия в адгезионных свойствах и изменение субпопуляционного состава предшественников на фоне криоконсервации и криоконцентрации на градиенте плотности Ficoll-Paque ($p < 0,05$).
3. В результате сравнения влияния GM-CSF (72 нг/мл) импортного и отечественного производства на экспрессию дифференцировочных антигенов ДК (CD14, CD1a, CD83, CD80, CD86, CCR7, HLA-DR) было установлено, что изучаемые цитокины обладают сходными фармакологическими характеристиками ($p > 0,05$). Для снижения затрат на производство аутологичных дендритноклеточных вакцин целесообразно использовать GM-CSF отечественного производства.
4. Исходно высокая концентрация ИЛ-4 (45 нг/мл), используемая для дифференцировки ДК *ex vivo*, представляется фармакологически и экономически необоснованной, так как снижение концентрации ИЛ-4 в интервале от 20 до 5 нг/мл ($p < 0,05$) в сочетании с GM-CSF (72 нг/мл) и ростовой бессывороточной средой «Cell Gro DC» не оказало сколь-нибудь значимого влияния на иммунофенотип и функциональную активность ДК ($p > 0,05$), но привело к снижению затрат на производство дендритноклеточных вакцин.
5. В результате сравнения влияния ИЛ-4 (15 нг/мл) и его предполагаемого аналога IFN- α (90 нг/мл) на дифференцировку ДК (субпопуляция CD1a⁺CD83⁺ и CD1a⁻CD83⁺) в изучаемый период наблюдения (4-й и 7-й день культивирования), были получены данные, свидетельствующие о преимуществе использования ИЛ-4 по сравнению с IFN- α ($p < 0,05$).
6. Анализ жизнеспособности и функциональной активности ДК (ELISpot-анализ), криоконсервированных в среде, содержащей сыворотку, и бессывороточной среде с 10% ДМСО не выявил статистически значимых различий ($p > 0,05$).
7. Бактериологический анализ вакцинных ДК за весь период наблюдения (48 мес) не выявил признаков микробного загрязнения.

8. Использование стандартизированных аутологичных ДК показало безопасность (единичные случаи НЯ 3 ст., отсутствие НЯ 4 ст.) и клиническую эффективность двух изученных режимов терапии [ДКВ (лечебная) - частота объективного ответа на лечение у 5% (95% ДИ 0-15%) больных, СЗ у 32 % больных, медиана ВДП 72 (95% ДИ 45-98) дня; ФДК-вакциноterapia (лечебная) - частота объективного ответа на лечение у 15% (95% ДИ 2-39%) больных, СЗ у 39 % больных, медиана ВДП 108 (95% ДИ 68-147) дней; медиана ВДП при адьювантной ДКВ составляет 402 (95% ДИ 2-802) дня. Связь иммунологических изменений с развитием лечебного эффекта ($p < 0,05$) свидетельствует о необходимости проведения специфического иммунологического мониторинга (ELISpot-анализ, клеточный ИФА).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Селиванов Е.А.* Наш опыт по заготовке, тестированию и хранению гемопоэтических клеток пуповинной крови // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2006. — Т. 3. — № 1. — С. 63—65.
2. *Балдуева И.А.* Разработка, обоснование и оценка современной биотерапии у больных с солидными опухолями: диссертация на соискание ученой степени д-ра мед. наук: СПб., 2008. — 275 с.
3. *Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б. и соавт.* Разработка диагностической панели раково-тестикулярных антигенов для оценки поствакцинального иммунного ответа у больных злокачественными новообразованиями // Рос. биотер. журнал. — 2011. — Т. 1. — С. 67.
4. *Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В. и соавт.* IL-7 в сочетании с IL-12 увеличивает чувствительность ELISPOT-теста поствакцинального T-клеточного иммунного ответа у больных с диссеминированной меланомой кожи (МК) // Русский журнал. — 2010. — Т. 14. — № 1 (29). — С. 15—16.
5. *Воробьев А.А.* Молекулярные основы иммуногенности антигенов. — М.: Медицина, 1982.—272 с.
6. *Говалло В.И.* Иммунология тканевой несовместимости. — М.: Медицина, 1971.—204 с.
7. *Грищенко В.И., Снурников А.С., Кадникова Н.Г. и соавт.* Жидкий азот как потенциальный источник микробной контаминации биологических объектов // Проблемы криобиологии. — 2000. — № 2. — С. 81—85.
8. *Давыдов М.И., Аксель Е.М.* Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2009. — Т. 20. № 3 (77), прил. 1. — С. 153 —156.
9. *Данилова А.Б., Данилов А.О., Фахрутдинова О.Л. и соавт.* Лабораторная оценка TGF β 1, интерлейкина 10, VGEF *in vitro* и *in vivo* у больных солидными опухолями // Вопр. онкол. — 2011. — Т. 57. — № 6. — С. 26—29.
10. *Данилова А.Б., Данилов А.О., Фахрутдинова О.Л. и соавт.* Иммунохимический анализ продукции MICA опухолевыми клетками *in vitro* и *in vivo* в контексте создания и применения противоопухолевых вакцин // Вопр. онкол. — 2010. — Т. 56. — № 5. — С. 576—582.
11. *Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю.* Меланома кожи: стадирование, диагностика и лечение // Русский медицинский журнал. — 2003. — № 11 (11). — С. 658—665.

- 12.
13. *Зарецкая Ю.М.* Клиническая иммуногенетика. — М.: Медицина, 1983.—208 с.
14. *Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. и соавт.* Фенотип иммунокомпетентных клеток и его значение в противоопухолевом иммунном ответе // Вестник РАМН. — 2011. — № 12. — С. 20—25.
15. *Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Демидов Л.В.* Вакциноterapia меланомы дендритными клетками // Рос. биотер. журн.—2007.—№ 3 (6).—С.8 —18.
16. *Моисеенко В.М., Балдуева И.А.* Принципы создания и использования лечебных вакцин в онкологии // Рос. онкол. журн.—2011.—№ 2.—С.49—53.
17. *Моисеенко В.М., Данилова А.Б., Данилов А.О. и соавт.* Иммуноцитохимическое изучение экспрессии антигенов клетками меланомы кожи, культивируемыми для приготовления вакцины // Вопр. онкол. — 2008. — Т. 54 (3). — С. 303—314.
18. *Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В. и соавт.* Активация противоопухолевого иммунитета в ответ на введение аутологичной раково-тестикулярной дендритноклеточной вакцины (ДКВ) у больных диссеминированной меланомой кожи // Петровские чтения 2012: сборник тезисов 8 конференции по фундаментальной онкологии — 2012. — С. 102-104.
19. *Нехаева Т.Л., Новик А.В., Фахрутдинова О.Л.* Мониторинг поствакцинального специфического иммунного ответа у больных с диссеминированными солидными опухолями // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: сборник тезисов X Юбилейной научно-практической конференции молодых ученых. — 2010. — С. 132—133.
20. *Петров Р.В.* Иммунология и иммуногенетика. — М.: Медицина, 1976.—326 с.
21. *Усс А.Л., Мицкевич П.Б., Завгородняя И.Л.* Криоконсервирование клеток человека // Медицинская панорама. — 2003. — № 2. — С. 38—40.
22. *Ярилин А.А.* Иммунология. — М.: ГЭОТАР — Медиа, 2010. —752 с.
23. *Aerts-Toegaert C., Heirman C., Tuyaer S. et al.* CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses // Eur. J. Immunol.—2007. —Vol.37.—P.686—695.
24. *Alajez N.M., Schmielau J., Alter M.D. et al.* Therapeutic potential of a tumor-specific, MHC-unrestricted T-cell receptor expressed on effector cells of the innate and the adoptive immune system through bone marrow transplantation and immune reconstitution // Blood.—2005. — Vol.106. —P.144—149.

25. *Alfaro C., Suarez N., Oñate C. et al.* Dendritic cells take up and present antigens from viable and apoptotic polymorphonuclear leukocytes // PLoS One —2011. — Vol.6(12). — e29300.
26. *Allan C.P., Turtle C.J., Mainwaring P.N. et al.* The immune response to breast cancer, and the case for DC immunotherapy // *Cytotherapy*. —2004. — Vol. 6(2). —P.154—163.
27. *Amigorena S., Savina A.* Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells // *Curr. Opin Immunol.* — 2010. — Vol.22 (1). —P.109—117.
28. *Bakken A.M., Bruserud O., Abrahamsen J.F.* No Differences in Colony Formation of Peripheral Blood Stem Cells Frozen with 5% or 10% Dimethyl Sulfoxide // *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. — 2003. — Vol.12. - P.351-358.
29. *Bakken A.M.* Cryopreserving Human Peripheral Blood Progenitor Cells // *Current Stem Cell Research & Therapy*. — 2006. — Vol. 1 (1) — P. 47—54.
30. *Banchereau J., Briere F., Caux C. et al.* Immunobiology of dendritic cells // *Ann Rev Immunol*. — 2000. — Vol. 18. — P. 767—811.
31. *Banchereau J., Palucka F.K., Dhodapkar M. et al.* Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine // *Cancer Res*. — 2001. —Vol.61.—P. 6451—6458.
32. *Banchereau J., Pulendran B., Steinman R., Pulucka K.* Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? // *J. Exp. Med.*—2000. —Vol.192.—P. 39—44.
33. *Bergman P.J.* Anticancer vaccines // *Vet. Clin. North. Am. Small Animal. Pract.* —2007. — Vol.6. —P.1111—1119.
34. *Bergman P.J.* Cancer immunotherapy // *Vet. Clin. North. Am. Small Animal. Pract.* —2010. — Vol.40 (3). —P.507—525.
35. *Berz D., McCormack E., Winer S. et al.* Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells // *Amer. J. Hem.* — 2007. — Vol. 82 (6). — P. 463—472.
36. *Bohnenkamp H.R., Noll T.* Development of a standardized protocol for reproducible generation of matured monocyte-derived dendritic cells suitable for clinical application // *Cytotechnology*. — 2003. — Vol. 42 (3). — P. 121—131.
37. *Bordon Y.* Dendritic cells: Prime time for monocytes // *Nat. Rev. Immunol.* — 2010. — Vol.11. — P.808—809.
38. *Bordon Y.* Phagocytosis: A synapse for snaps // *Nat. Rev. Immunol.* — 2011. — Vol.11. — P.371—373.
39. *Boyum A.* A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity // *Scand. J. Clin. Lab. Investig* — 1968. — Vol. 97. — P. 51—76.

40. *Braun D., Galibert L., Nakajima T. et al.* Semimature stage: a checkpoint in a dendritic cell maturation program that allows for functional reversion after signal-regulatory protein- α ligation and maturation signals // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177. — P. 8550–8559.
41. *Brusa D., Garetto S., Chiorino G. et al.* Post-apoptotic tumors are more palatable to dendritic cells and enhance their antigen cross-presentation activity // *Vaccine.* — 2008. — Vol. 26 (50). — P. 6422-6432.
42. *Buhl T., Legler T.J., Rosenberger A. et al.* Controlled-rate freezer cryopreservation of highly concentrated peripheral blood mononuclear cells results in higher cell yields and superior autologous T-cell stimulation for dendritic cell-based immunotherapy // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2012. — Vol. 61 (11). — P. 2021-2031.
43. *Butterfield L.H.* Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy Clinical Trials: Are We Making Progress? // *Front Immunol.* — 2013. — Vol. 4. — P. 454-482.
44. *Caballero O.L., Chen Y.T.* Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy // *Cancer Sci.* — 2009. — Vol. 100 (11). — P. 2014 —2020.
45. *Cabezudo E., Dalmases C., Ruz M. et al.* Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function // *Transfusion* — 2000. — Vol. 40 (10). — P. 1223—1227.
46. *Castiello L., Sabatino M., Jin P. et al.* Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view // *Cancer Immunol. Immunother* — 2011. — Vol. 60 (4). — P. 457—466.
47. *Cella M., Engering A., Pinet V., Pietras T., Lanzavecchia A.* Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells // *Nature.* —1997. —Vol.388.— P.782-787.
48. *Chaput N., Taieb J., Scharz N.E.C. et al.* Exosome-based immunotherapy // *J. Immunol. Immunother.* —2004.—Vol.53. —P.234—239.
49. *Chen Y., Hoecker P., Dettke M.* Combination of Cobe AutoPBSC and Gambro Elutra as a platform for monocyte enrichment in dendritic cell (DC) therapy: clinical study // *Clin. Apher.* — 2009. — Vol. 23 (5). — P. 157—162.
50. *Cheryl L-L. Chiang, Dawn A. Maier, Lana E. Kandalaft et al.* Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate // *Journal of Translational Medicine* —2011. — Vol.9.—P. 198-230.
51. *Chiang C.L., Maier D.A., Kandalaft L.E. et al.* Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate // *J. Transl. Med.* — 2011. — Vol. 9. — P. 198—230.

52. *Clanchy F.I., Holloway A.C., Lari R. et al.* Detection and properties of the human proliferative monocyte subpopulation // *J. Leukoc. Biol.* — 2006. — Vol. 79 (4). — P. 757—766.
53. *de Vries I.J., Bernsen M.R., Lesterhuis W.J. et al.* Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome // *J. Clin. Oncol.*—2005.—Vol.23 (24).—P.5779—5787.
54. *Della B.S., Nicola S., Riva A. et al.* Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon-alpha. // *J. Leukoc Biol.* — 2004. — Vol. 75. —P.106—116.
55. *Deng L., Langley R.J., Brown P.H. et al.* Structural basis for the recognition of mutant self by a tumor-specific, MHC class II-restricted T cell receptor // *Nat. Immunol.*—2007.—Vol.8.—P.398—408.
56. *Diao J., Zhao J., Winter E. et al.* Recruitment and differentiation of conventional dendritic cell precursors in tumors // *J. Immunol.* .—2010.—Vol.184(3).—P.1261—1268.
57. *Dieckmann D., Schultz E., Ring B., et al.* Optimizing the exogenous antigen loading of monocyte-derived dendritic cells // *Int. Immunol.* — 2005.—Vol.17.—P.621—408.
58. *Dorshking K.* Not a split decision for human hematopoiesis // *Nat. Immunol.* – 2010. – Vol.11. – P.569–570.
59. *Draube A., Klein-Gonza' lez N., Mattheus S. et al.* Dendritic Cell Based Tumor Vaccination in Prostate and Renal Cell Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis // *PLoS One.*—2010. — Vol.6(4).—P.e18801.
60. *Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P.* Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity // *Front Immunol.*—2013. — Vol.4.— 438—452
61. *Duraisingham SS, Hornig J, Gotch F et al.* CD34-derived human Langerhans cells stimulate a T helper type 2 response independently of extracellular-signal-regulated kinase phosphorylation // *Immunology.* — 2010. — Vol. 131 (2). — P. 210-219.
62. *Dzionek A., Fuchs A., Schmidt P., et al .* BDCA-2, BDCA-3 and BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165. — P. 6037—6046.
63. *Eggermont AM.* Therapeutic vaccines in solid tumours: can they be harmful? // *Eur. J. Cancer.* — 2009. — Vol.45(12).—P.2087 —2090.
64. *Ferlazzo G., Klein J., Paliard X. et al.* Dendritic cells generated from CD34+ progenitor cells with flt3 ligand, c-kit ligand, GM-CSF, IL-4, and TNF-alpha are functional antigen-presenting cells resembling mature monocyte-derived dendritic cells. // *J. Immunother.* — 2000. — Vol. 23 (1). — P. 48—58.

65. *Figdor C.G., de Vries I.J., Lesterhuis W.J. et al.* Dendritic cell immunotherapy: mapping the way // *Nat. Med.* — 2004. — Vol. 10 (5) — P. 475—480.
66. *Frick J. S., Grunebach F., Autenrieth I. B.* Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6 // *Int. J. Med. Microbiol.* — 2010. — Vol. 300. — P. 19—24.
67. *Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y.* The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. // *Trends Immunol.* — 2013. — Vol. 34 (10). — P. 482—488.
68. *Gorczyca W., Sun Z.Y., Cronin W. et al.* Immunophenotypic pattern populations by flow cytometry analysis // *Methods Cell. Biol.* — 2011. — Vol. 103. — P. 221—266.
69. *Guida M., Colucci G.* Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma: is it a therapeutic option yet? // *Ann. Oncol.* —2007. —Vol.18. Suppl. 6—P.149—152.
70. *Harada Y., Yonemitsu Y.* Dramatic improvement of DC-based immunotherapy against various malignancies // *Front Biosci (Landmark Ed)* —2011. —Vol.16.—P.2233—2242.
71. *Heo Y.J., Son C.H., Chung J.S. et al.* The cryopreservation of high concentrated PBMC for dendritic cell (DC)-based cancer immunotherapy // *Cryobiology.* — 2009. — Vol. 58 (2). — P. 203—209.
72. *Hettihewa L. M.* Prolonged expression of MHC class I - peptide expression in bone marrow derived retrovirus transfected matured dendritic cells by continuous centrifugation in the presence of IL-4 // *Indian J Med Res.*—2011. —Vol.134(5).—P. 672—678.
73. *Hoos A., Parmiani G., Hege K. et al.* A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics // *J. Immunother.* — 2007. — Vol. 30 (1). — P. 1—15.
74. *Hoos A., Eggermont A.M., Janetzki S. et al.* Improved endpoints for cancer immunotherapy trials// *J. Nat. Cancer Inst.* — 2010. — Vol. 102 (18). — P. 1388—97.
75. *Ito T., Inaba M., Inaba K. et al .* A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 163. — P. 1409—1419.
76. *Jähn P.S., Zänker K.S., Schmitz J., Dzionek A.* BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation // *Cell Immunol.* — 2010. — Vol. 265(1). — P. 15-22.
77. *Janetzki S., Panageas K.S., Ben-Porat L. et al.* Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI) // *Cancer. Immunol. Immunother.* — 2007. — Vol. 57 (30). — P. 303—315.
78. *Janeway C., Murphy K.* immunobiology: The Immune System. 8th ed. 2011, New York: Garland Science. 888.

79. *Jang H.I., Lee H.* A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells // *Exp.Mol.Med.* —2003. —Vol.35(4). — P.317—323.
80. *Jin Y., Fuller L., Esquenazi V. et al.* Induction of auto-reactive regulatory T cells by stimulation with immature autologous dendritic cells // *Immunol. Invest.*—2007.—Vol.36.—P.213—232.
81. *Justin A., Babita A.* IL-4 is more effective than IL-13 for *in vitro* differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. // *Int Immunol.*—2005. — Vol.1.—P. 312-319.
82. *Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ.* Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity // *J Exp Med.*—2000.—Vol.192.—P.219—245.
83. *Kadri N., Potiron N., Ouary M. et al.* Fetal calf serum-primed dendritic cells induce a strong anti-fetal calf serum immune response and diabetes protection in the non-obese diabetic mouse // *Immunol. Lett.* — 2007. — Vol. 108 (2). — P. 129 —165.
84. *Kawakami Y., Fujita T., Kudo C. et al.* Dendritic cell based personalized immunotherapy based on cancer antigen research // *Front Biosci.* —2008. — Vol.13. —P.1952-1958.
85. *Kim R., Emi M., Tanabe K. et al.* Immunobiology of the sentinel lymph node and its potential role for antitumour immunity // *Lancet Oncol.* —2006. — Vol.7(12). —P.1006-1012.
86. *Kim W.K., Sun Y., Do H. et al.* Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage // *J. Leukocyte. Biol.* — 2010. — Vol. 87 (4). — P. 557—567.
87. *Kochenderfer J.N., Gress R.E.* A comparison and critical analysis of preclinical anticancer vaccination strategies // *Exp. Biol. Med (Maywood).* —2007. — Vol.239. —P.1130—1141.
88. *Koido S., Homma S., Takahara A. et al.* Immunologic monitoring of cellular responses by dendritic tumor cell fusion vaccines // *J. Biomed Biotechnol.* —2011. — Vol.77. —P.1130—1141.
89. *Korthals M., Safaian N., Kronenwett R. et al.* Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis // *J. Transl. Med.* —2007. — Vol.25. —P.5—46.
90. *Lijima N., Linehan M.M., Saeland S. et al.* Vaginal epithelial dendritic cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2007. - Vol.104. - P.19061-19066.
91. *Lin Kah-Wai, Jacek T, Jacek R.* Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity // *J. Cancer Res. Ther.* —2006 — Vol. 2. —P. 35—40.
92. *Lindroos B., Boucher S., Chase L. et al.* Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells *in vitro* // *Cytherapy* — 2009. — Vol. 11 (7). — P. 958—972.

93. *Lopez M., Lemoine F.M., Firat H. et al.* Bone marrow versus peripheral blood progenitor cells CD34 selection in patients with non-Hodgkin's lymphomas: different levels of tumor cell reduction. Implications for autografting // *Blood* — 1997. — Vol. 90 (7). — P. 2830—2838.
94. *López-Bravo M., Minguito de la Escalera M., Domínguez P.M, et al.* IL-4 blocks TH1-polarizing/inflammatory cytokine gene expression during monocyte-derived dendritic cell differentiation through histone hypoacetylation // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2013. — Vol. 132(6). — P. 1409-1419.
95. *Lutz M.B., Schuler G.* Immature, semi-immature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity // *Trend Immunol.* — 2002. — Vol. 23. — P. 445—449.
96. *MacDonald K.P., Munster D.J., Clark G.J. et al.* Characterization of human blood dendritic cell subsets // *Blood* — 2002. — Vol. 100. — P. 4512—4520.
97. *Mackiewicz J., Mackiewicz A.* Design of clinical trials for therapeutic cancer vaccines development // *Eur . J. Pharmacol.* — 2009. — Vol. 625. — P. 84—93.
98. *Mantovani A., Romero P., Palucka A.K., Marincola F.M.* Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment // *Lancet.* —2008. —Vol.371. —P.771—783.
99. *McLellan AD, Kämpgen E.* Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells // *Immunol Lett.* — 2000. — Vol. 72 (2). — P. 101—106.
100. *Metharom, P., Velten F. W., Goerd S.* Highly phagocytic, CD4hi, CD14hi and CD16hi antigen-presenting cells modulated by tumour-conditioned media retain the capacity to mature and induce TH1 T-cell proliferation // *Mol. Immunol.* – 2006. – Vol.43. – P.2070–2082.
101. *Mills K. H., McGuirk P.* Antigen-specific regulatory T cells – their induction and role in infection // *Semin. Immunol.* — 2004. — Vol. 16. — P. 107—117.
102. *Moore A.C., Bixler S.L., Lewis M.G. et al.* Mucosal and peripheral Lin⁺HLA-DR⁺CD11c/123⁻CD13⁻CD14⁻ mononuclear cells are preferentially infected during acute simian immunodeficiency virus infection // *J. Virol.* – 2012. – Vol.86. – P.1069–1078.
103. *Morel P. A., Turner M. S.* Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance // *Immunol. Res.* — 2011. — Vol. 50. — P. 124—129.
104. *Morel P. A., Turner M. S.* Designing the optimal vaccine: the importance of cytokines and dendritic cells // *Open Vaccine J.* — 2010. — Vol. 3. — P. 7—17.
105. *Mukherji B., Chakraborty N., Yamasaki S. et al.* Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide- pulsed autologous antigen presenting cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1995. – Vol. 92. —P. 8078–82.
106. *Murphy J.F.* Trends in cancer immunotherapy // *Clin Med Insights Oncol.* — 2010. — Vol. 14. — P. 67—80.

107. *Neron S., Thibault L., Dussault N. et al.* Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells // *Transfusion.* — 2007. — Vol.47. — P.1241–1249.
108. *Nguyen X.D., Eichler H., Sucker A. et al.* Collection of autologous monocytes for dendritic cell vaccination therapy in metastatic melanoma patients // *Transfusion.* — 2002. — Vol. 42 (4). — P. 428—432.
109. *Nicolette C.A., Healey D., Tcherepanova I. et al.* Dendritic cells for active immunotherapy: optimizing design and manufacture in order to develop commercially and clinically viable products // *Vaccine.* —2007. —Vol.27.—P.47—60.
110. *Ning J., Morgan D., Pamphilon D.* A Rapid Culture Technique Produces Functional Dendritic-Like Cells from Human Acute Myeloid Leukemia Cell Lines // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 2011 — P. 9.
111. *O'Day S., Hodi F.S., McDermott D.F. et al.* A phase III, randomized, double-blind, multicenter study comparing monotherapy with ipilimumab or gp100 peptide vaccine and the combination in patients with previously treated, unresectable stage III or IV melanoma.// *J Clin Oncol.* —2010. —V. 28. —I.18s. — abstr 4.
112. *Oliver C., Jamur M.C.* Immunocytochemical Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) // *Humana Press / Springer science Business Media, New York, London.* — 2010. — 413 p.
113. *Olweus J., BitMansour A., Warnke R. et al.* Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 1997. — Vol. 94. — P. 12551-12556.
114. *O'Neill D.W., Adams S., Bhardwaj N.* Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer // *Blood* — 2003. — Vol. 12. — P. 4392.
115. *Ovali E., Ratip S., Kibaroglu A., Tekelioglu Y. et al.* Role of hepatocyte growth factor in the development of dendritic cells from CD34+ bone marrow cells // *Haematologica* — 2000. — Vol. 85(5). — P. 464-473.
116. *Palena C., Abrams S.I., Schlom J. et al.* Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies // *Adv. Cancer Res.* — 2006. — Vol. 95. — P. 115-145.
117. *Palucka A., Dhodapkar M., Pacesny S. et al.* Single injection of CD34+ progenitor- derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T cell immunity in patients with stage IV melanoma // *J. Immunother* — 2003. —Vol.26.—P.432—439.
118. *Palucka K., Ueno H., Roberts L. et al.* Dendritic cells: are they clinically relevant? // *Cancer J.* — 2010. — Vol. 16(4). — P. 318-324.

119. *Palucka K., Banchereau J.* Human dendritic cell subsets in vaccination // *Curr. Opin. Immunol.* — 2013. — Vol. 25(3). — P. 396—402.
120. *Papatriantafyllou M.* Monocytes: Nudged out of the niche snaps // *Nat. Rev. Immunol.* — 2011. — Vol. 11. — P. 368— 369.
121. *Parlato S., Santini S., Lapenta C. et al.* Expression of CCR-7, MIP-3b, and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells – importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // *Blood.* —2001. —Vol. 98. —P. 3022–3029.
122. *Parmiani G., Castelli C., Rivoltini L. et al.* Immunotherapy of melanoma // *Semin.Cancer Biol.* — 2003. — Vol.13. — P. 391—400
123. *Piemonti L., Bernasconi S., Luini W. et al.* IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF ? // *Eur. Cytokine Netw.* — 1995. — Vol. 6(4). — P. 245—252.
124. *Pletinckx K., Lutz M.B.* Dendritic cells generated with Flt3L and exposed to apoptotic cells lack induction of T cell anergy and Foxp3+ regulatory T cell conversion in vitro // *Immunob.* — 2013. [Epub ahead of print]
125. *Pletinckx K., Stijlemans B., Pavlovic V. et al.* Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or *Trypanosoma brucei* antigens instruct default Th2-cell responses // *Eur. J. Immunol.* — 2011. — Vol. 41. — P. 3479—3494.
126. *Pletinckx K., Döhler A., Pavlovic V., Lutz MB.* Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells // *Front Immunol.* — 2011 — Vol. 27 (2) — P. 39.
127. *Redecke V., Wu R., Zhou J. et al.* Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential // *Nat. Methods.* — 2013. — Vol. 10(8). — P. 795-803.
128. *Ridolfi R., Riccobon A., Galassi R., et al.* Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients // *J. Transl. Med.* — 2004. — Vol.2.—P.27—78.
129. *Ridgway D.* The first 1000 dendritic cell vaccines // *Cancer Invest.* — 2003. — Vol.21(6).—P.873—886.
130. *Robertson N.J., Chai J.G., Millrain M. et al.* Natural regulation of immunity to minor histocompatibility antigens // *J. Immunol.* —2007. —Vol.178. —P.3558—3565.
131. *Robinson S.P., Patterson S., English N., et al.* Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells // *Eur. J. Immunol.* — 1999. — Vol. 29 — P. 1743—1751.
132. *Romo L.F.* In vivo maturation and migration of dendritic cells // *Immunol.* — 2001.— Vol. 102. — P. 255—262.

133. *Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P.* Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines See other articles in PMC that cite the published article // *Nat. Med.* — 2004. — Vol.10(9).—P.909 —924.
134. *Sallusto F., Lanzavecchia A.* Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha // *J. Exp. Med.*. —1994. —Vol. 179(4). —P.1109—1118.
135. *Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P. et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation // *Eur. J. Immunol.* —1998. —Vol.28.— P.2760—2769.
136. *Santini S., Lapenta C., Logozzi M. et al.* Type I Interferon as a powerful adjuvant for monocyte derived dendritic cells development and activity in vitro and in HU-PBL-SCID mice // *J. Exp. Med.* —2000. —Vol. 191. — P. 1777–1788.
137. *Santini S., Puccini T., Lapenta C. et al.* A new type 1 IFN mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // *Stem cells.* —2003. — Vol. 21. — P. 357–362.
138. *Schiavoni G, Mattei F, Gabriele L.* Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross Priming: Impact on Anti-Tumor Response // *Front Immunol.* —2013. — Vol. 4. — P. 483–490.
139. *Senju S., Haruta M., Matsumura K. et al.* Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripoten stem cells aiming at cell therapy // *Gene Therapy.* – 2011. – Vol.18. – P.874–883.
140. *Shevach E.M.* Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells // *Nat. Med.*—2004. — Vol.10.—P.900—901.
141. *Shin J.W., Jin P., Stroncek D.* Effect of leukapheresis on gene expression profiles of donor's peripheral blood mononuclear cells // *Korean. J. Lab. Med.* – 2008. – Vol.28. – P.130–135.
142. *Solary E.* When monocyte life hangs by a thread // *Blood.* – 2012. – Vol.119. – P.2699–2700.
143. *Somersan S., Larsson M., Fonteneau J. et al.* Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells // *J. Immunol.* — 2001.—Vol.167 (9).—P. 4844 — 4852.
144. *Steinbrink K., Mahnke K., Grabbe S. et al.* Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance? // *Hum Immunol.* — 2009. — Vol. 70 (5) — P. 289—293.

145. *Steinman R., Adams J.C., Cohn Z.* Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. morphology, quantitation, tissue distribution - IV. Identification and distribution in mouse spleen // *J. Exp. Med.* — 1975. — Vol. 141 (4). — P. 804—820.
146. *Steinman R., Cohn Z.* Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. morphology, quantitation, tissue distribution - IV. Identification and distribution in mouse spleen // *J. Exp. Med.* — 1973. — Vol. 137 (5). — P. 1142—1162.
147. *Strasser E.F., Eckstein R.* Optimization of leukocyte collection and monocyte isolation for dendritic cell culture // *Transfus. Med. Rev.* — 2010. — Vol. 24 (2). — P. 130—139.
148. *Svajger U., Anderluh M., Jeras M., Obermajer N.* C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity // *Cell Signal.* — 2010. — Vol. 22 (10). — P. 1397—1405.
149. *Syme R., Bajwa R., Robertson L. et al.* Comparison of CD34 and monocyte-derived dendritic cells from mobilized peripheral blood from cancer patients // *Stem Cells.* — 2005. — Vol. 23(1). — P. 74—81.
150. *Takeuchi S, Furue M.* Dendritic cells: ontogeny // *Allergol Int.* — 2007. — Vol. 56 (3). — P. 215—238.
151. *Tereble M., Berzofsky J.A.* NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis // *Trends Immunol.* —2007. —Vol.11. —P.491—496.
152. *Thurner B., Röder C., Dieckmann D. et al.* Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application // *J. Immunol Methods.* —1999. —Vol.223. —P.1—15.
153. *Toh H.C., Wang W.W., Chia W.K. et al.* Clinical Benefit of Allogeneic Melanoma Cell Lysate-Pulsed Autologous Dendritic Cell Vaccine in MAGE-Positive Colorectal Cancer Patients // *Clin Cancer Res.* . —2009. —Vol.15(24). —P.7726—7736.
154. *Tourkova I.L., Shurin G.V., Wei S., Shurin M.R.* Small rho GTPases mediate tumor-induced inhibition of endocytic activity of dendritic cells // *J. Immunol.* —2007. —Vol.178(12). — P.7787—7793.
155. *Tuschong L., Soenen S.L., Blaese R.M. et al.* Immune Response to Fetal Calf Serum by Two Adenosine Deaminase-Deficient Patients After T Cell Gene Therapy // *Hum. Gene Ther.* — 2002. —Vol. 13. — P. 1605—1610.
156. *Tuyaerts S.* Dendritic cell therapy for oncology roundtable conference // *J. Immune Based Ther Vaccines* —Vol. 9(1). — P. 1476—1500.
157. *Ueno H., Schmitt N., Klechevsky E. et al.* Harnessing human dendritic cell subsets for medicine // *Immunol. Rev.* — 2010. — Vol. 234 (1). — P. 199—212.

158. *Ullrich E., Chaput N., Zitvogel L.* Killer dendritic cells and their potential role in immunotherapy // *Horm. Metab. Res.* —2008. —Vol.2. —Pp.75—81.
159. *van Dongen J.J., Lhermitte L., Bottcher S. et al.* EuroFlow antibody panel for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes // *Leukemia.* — 2012. — Vol.26. — P.1908–1975.
160. *Vandenabeele S., Hochrein H., Mavaddat N. et al.* Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations // *Blood.* — 2001. — Vol. 97. — P. 1733—41.
161. *Weidinger T.M., Keller A.K., Weiss D. et al.* Peripheral blood mononuclear cells obtained from leukoreduction system chambers show better viability than those from leukapheresis // *Transfusion.* — 2011. — Vol.51. — P.2047–2049.
162. *Wong K.L., Tai J.J., Wong W.C. et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate and nonclassical human monocyte subsets // *Blood.* — 2011. — Vol. 118 (5). — P. 16—31.
163. *Wu L., Shortman K.* Heterogeneity of thymic dendritic cells // *Semin. Immunol.* — 2005. — Vol. 17. — P. 304—312.
164. *Xia C.Q., Peng R., Annamalai M. et al.* Dendritic cells post-maturation are reprogrammed with heightened IFN-gamma and IL-10 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—2007. — Vol.352.—P.960—965.
165. *Xia CQ., Peng R., Annamalai M., Clare-Salzler MJ. et al.* Dendritic cells post-maturation are reprogrammed with heightened IFN-gamma and IL-10 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2007. —Vol. 352. — P. 960—965.
166. *Xin H.M., Peng Y.Z., Yuan Z.Q. et al.* In vitro maturation and migration of immature dendritic cells after chemokine receptor 7 transfection // *Can J Microbiol.* — 2009. — Vol. 55 (7). — P. 859—866.
167. *Yannelli J.R., Tucker J.A., Hidalgo G. et al.* Characteristics of PBMC obtained from leukapheresis products and tumor biopsies of patients with non-small cell lung cancer // *Oncol. Rep.* — 2009. —Vol.22. —P.1459–1471.
168. *Yona S., Jung S.* Monocytes: subsets, origins and functions // *Curr. Opin. Hematol.* —2009.
169. *Zendman A.J., Ruiter D.J., Van Muijen G.N.* Cancer-testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function // *J.Cell.Physiol.* — 2003. — Vol.194. — P.272—288.
170. *Zhang C., Zhang J., Tian Z.* The regulatory effect of natural killer cells: do “NK-reg cells” exist? // *Cell Mol. Immunol.* —2006. —Vol.4. —P.241—254.
171. *Zhang S., Wang Q., Miao B.* Review: dendritic cell-based vaccine in the treatment of patients with advanced melanoma // *Cancer Biother. Radiopharm.* —2007. —Vol.4. —P.501—507.

172. *Zhao Y., Glesne D., Huberman E.* A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100 (5). — P. 2426—2431.
173. *Zou G.M., Tam Y.K.* Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances // *Eur Cytokine Netw.* —2002. —Vol 13(2). —P.186—199.
174. *Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S. et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood // *Blood.* – 2010. – Vol.116. – e74–e80.
175. *Ziegler-Heitbrock L., Hofer T.P.* Toward a refined definition of monocyte subsets // *Front Immunol* — 2013. — Vol.4. — 4— 23.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Оценка клинической эффективности по шкале RECIST

Полный регресс (ПР) – полное исчезновение всех ранее регистрировавшихся очагов при отсутствии вновь появившихся очагов (размеры патологически измененных лимфатических узлов по короткой оси должны уменьшиться менее 10 мм).

Частичный регресс (ЧР) – уменьшение суммарного диаметра целевых очагов более чем на 30% при отсутствии признаков прогрессирования по неизмеримым очагам и новых очагов либо полный регресс измеримых очагов при сохраняющихся без прогрессирования неизмеримых очагах.

Прогрессирование заболевания (ПЗ) – появление новых очагов или увеличение суммарного диаметра наиболее крупных из измеримых очагов на 20% от минимального их размера за время исследования, либо значительное прогрессирование неизмеримых очагов.

Стабилизация заболевания (СЗ) – все ответы на лечение, не соответствующие ранее перечисленным критериям.

Стандартная операционная процедура

Получение миелоидных предшественников ДК из периферической крови

СОП ЛКТ-05-01-001-2013

Наименование отдела: ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	Номер копии 1
---	----------------------

Согласовано:

Ф.И.О., должность уполномоченного лица	Подпись	Дата
Балдуева И.А. в.н.с.		

Разработано:

Нехаева Т.Л. н.с.		
Отчет об изменениях		

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

1. Назначение и область применения

Данная инструкция предназначена для всех сотрудников лаборатории.

2. Нормативные ссылки

Федеральные законы, рекомендованные стандарты и ведомственные нормативные документы

- 1) Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ. "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации".
- 2) Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).
- 3) Постановление Правительства РФ №1230 от 31.12.2010 "Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно - инфузионной терапии".
- 4) СанПиН 2.1.3.2630 -10 «Санитарно- эпидемиологические требования организациям, осуществляющим медицинскую деятельность».
- 5) СанПиН 3.1.5.2826 - 10 «Профилактика ВИЧ- инфекций».
- 6) СанПиН 2.1.7.2790 -10 «Санитарно- эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
- 7) ГОСТ Р ИСО 15189- 2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
- 8) ГОСТ ISO 9001- 2011 «Системы менеджмента качества. Требования»
- 9) ГОСТ ISO 9000- 2011 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь»

3. Используемые сокращения, термины и определения

МНК – моноклеарные клетки

СОП- стандартная операционная процедура

GMP - надлежащая производственная практика

GLP – надлежащая лабораторная практика

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

4. Принцип метода основан на различии в плотности форменных элементов крови, что позволяет при центрифугировании разделить клетки периферической крови и костного мозга на МНК, это лимфоциты, субпопуляция моноцитов и бластные гемопоэтические клетки, и фракцию, содержащую гранулоциты и эритроциты. МНК обладают меньшей, чем градиент, плотностью и располагаются над градиентом. Плотность гранулоцитов и эритроцитов больше, чем плотность градиента, они проходят через градиент, опускаясь на дно пробирки.

5. Материалы и оборудование

1. Среда для центрифугирования крови «Ficoll-Paque Premium», произведённая в соответствии GMP стандартов, стерильная – раствор состоящий из полисахарида и диатризоата натрия (градиент плотности $1,077 \pm 0,001$ г/мл), предназначенный для выделения лимфоцитов и моноцитов из крови человека, флакон 100 мл, «GE Healthcare» (Великобритания).
2. Питательная среда RPMI-1640 жидкая, с L-глутамином, стерильная, без сывороточная, из полнокомпонентной смеси солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, глутадиона и индикатора кислотности, предназначена для культивирования в монослое и суспензии лейкоцитарных клеток человека, флакон 500 мл, ООО «Биолот» (РФ).
3. Пробирка коническая стерильная емкостью 15 мл и 50 мл, полипропиленовая, с винтовой крышкой, градуированная, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
4. Пипетка Пастера, 153 мм, 5 мл, с градуировкой 3/0.5мл, полиэтиленовая, стерильная, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
5. Пробирка полипропиленовая стерильная Nunc «CryoTube», с винтовым стопором и полиэтиленовой винтовой крышкой, рабочий объём 1,8 мл, - предназначена для низкотемпературного хранения, замораживания и размораживания различных биологических препаратов, в том числе с использование жидкого азота, «Thermo Fisher Scientific» (США).
2. Этиловый спирт (Этанол), раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 90% 100 мл, ООО «Константа-Фарм М» (РФ).
3. Перчатки латексные хирургические, смотровые, стерильные, «Интернэшнл Медикал Продактс».

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

4. Ламинарный шкаф ПА (70% рециркуляция) с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite с частичной вытяжкой и защитным барьером разработаны для защиты, как рабочего материала, так и оператора и окружающей среды от опасности микробной контаминации соответствуют Классу II биологической опасности, «Faster», Германия.
5. Центрифуга рефрижераторная ЦРЛ6-01-«БФА» - оборудование для центрифугирования клеток крови, ОАО «Биофизическая аппаратура» (РФ).
6. Холодильник фармацевтический ХФ-400 «Позис» для хранения питательных сред и растворов при $t=4^0-6^0$ С, ФГУП «ПОЗИС» (РФ).
7. Автоматический счетчик клеток Countess™. Определяет количество живых и мертвых клеток, а также общее количество клеток, используя трипановый синий. Время определения 30 секунд. Объем клеточной суспензии для подсчета 10 мкл. Диапазон измерения от 1×10^4 до 1×10^7 клеток/мл, с оптимальным диапазоном от 1×10^5 до 4×10^6 клеток/мл. Производитель: «Invitrogen» (США).
8. Механические и электронные, одноканальные и многоканальные дозаторы mLINE, объемом 1-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 500-5000 μ l с возможностью установки защитных фильтров в посадочный конус и полного автоклавирования без разбора дозатора, «Biohit» (Финляндия).

6. Требования к условиям окружающей среды

1. Работу с биологическим материалом человека проводят в условиях стерильного модуля “Air Look” (20 м², класс очистки 100 во всех частях рабочей зоны). Рабочее место оснащено ламинарно-поточным шкафом с вертикальным потоком воздуха, для создания в рабочей зоне стерильной среды (II класс биологической защиты).
2. Перед началом работы культуральный бокс и ламинар должны быть просвечены ультрафиолетом не менее 30 минут.
3. Все процедуры должны выполняться в стерильных костюмах, стерильных одноразовых перчатках.
4. Вносимые в ламинар предметы без стерильных упаковок должны обрабатываться 70% спиртом.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

5. Перечень записей

Записи ведутся на бумажном (журнал: «Учет забора материала») и электронном носителе (файл Excel «Учет забора материала», папка «Вакцины» в сервисе облачного хранения пользовательских файлов, с возможностью синхронизации данных между разными пользователями, папка «Dropbox»).

6. Ответственные исполнители

лаборант – исследователь - Дубинина Э.В.

научный сотрудник - Вааль А.И.

7. Квалификация исполнителей

Имеют сертификат врача клинической лабораторной диагностики.

8. Описание метода

- 1) Цельную кровь с антикоагулянтом помещают в стерильные 50-мл пробирки («Sarstedt», Германия) и разбавляют равным объемом питательной среды RPMI-1640 («Биолот», РФ).
- 2) 10 мл разбавленной клеточной суспензии наслаивают на 3 мл градиента плотности «Ficoll-Paque Premium» «GE Healthcare» (Великобритания) в 15-мл стерильных центрифужных пробирках («Sarstedt», Германия).
- 3) Центрифугируют при 1500 об/мин в течение 40 мин при комнатной температуре. Во время центрифугирования эритроциты и гранулоциты оседают на дно пробирки, а на границе раздела фаз находятся МНК.
- 4) Прозрачный слой среды, расположенный непосредственно над опалесцирующим слоем МНК, удаляют, МНК собирают по всей площади сечения пробирки. При этом достигается примерно 1000-кратная очистка МНК от других клеток.
- 5) Взвесь МНК вносят в стерильные 15-мл центрифужные пробирки («Sarstedt», Германия) и разбавляют не менее чем четырехкратным избытком неполной питательной среды RPMI-1640, тщательно ресуспендируют.
- 6) Отмывают МНК в неполной питательной среде RPMI-1640 двукратным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

7) Подсчет и оценку жизнеспособности МНК проводят с помощью автоматического счетчика клеток типа «Countess» и трипанового синего, получают от $1,1 \times 10^{10}$ и более клеток, жизнеспособность – не менее 99%.

9. Литературные источники

Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow
//Scand.J.Clin.Lab.Investig.-1968.-Vol.21-Suppl.97.p.1-9).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Приложение 3

Стандартная операционная процедура

Криоконсервация лейкоферезного материала

СОП ЛКТ-05-01-008-2013

Наименование отдела: ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	Номер копии 1
---	----------------------

Согласовано:

Ф.И.О., должность уполномоченного лица	Подпись	Дата
Балдуева И.А.	в.н.с.	

Разработано:

Нехаева Т.Л.	н.с.	
--------------	------	--

Отчет об изменениях

--	--	--

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

10. Назначение и область применения

Данная инструкция предназначена для всех сотрудников лаборатории.

11. Нормативные ссылки

Федеральные законы, рекомендованные стандарты и ведомственные нормативные документы

1. Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ.
а. "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации".
2. Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).
3. Постановление Правительства РФ №1230 от 31.12.2010 "Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно - инфузионной терапии".
4. СанПиН 2.1.7.2790 -10 «Санитарно- эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
5. ГОСТ Р ИСО 15189- 2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
6. ГОСТ ISO 9001- 2011 «Системы менеджмента качества. Требования»
7. ГОСТ ISO 9000- 2011 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь»
8. ГОСТ 21957-76 Техника криогенная. Термины и определения.
9. ГОСТ 4.129-85 Техника криогенная медицинская. Номенклатура показателей.
10. ГОСТ 9293-74 (ИСО 2435-73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия.

12. Используемые сокращения, термины и определения

ДК – дендритные клетки

ДМСО - диметилсульфоксид

МНК – моноклеарные клетки

СОП- стандартная операционная процедура

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

GMP - надлежащая производственная практика

GLP – надлежащая лабораторная практика

Принцип метода основан на сохранение жизнеспособности при длительном хранении в ультранизких температурах. С использованием двух подходов: а) применение криопротекторов - веществ, которые обладают способностью предупреждать развитие криоповреждений и обеспечивать сохранность клеток в жизнеспособном состоянии после замораживания и размораживания; б) охлаждение с определенной, оптимальной для данного типа клеток скоростью. В качестве криопротектора используют диметилсульфоксид (ДМСО). Механизм его криозащитного действия связан со способностью связывать молекулы воды, что замедляет рост кристаллов льда и препятствует быстрому нарастанию осмолярности среды, это снижает осмотическую нагрузку на клетки. Кроме того, при проникновении через клеточную мембрану, структурируют внутриклеточную воду, что препятствует обезвоживанию клеток. Конечная концентрация ДМСО 10% признана наиболее эффективной для защиты биоматериала при криоконсервации.

13. Материалы и оборудование

1. Пробирка полипропиленовая стерильная Nunc «CryoTube», с винтовым стопором и полиэтиленовой винтовой крышкой, рабочий объем 1,8 мл, - предназначена для низкотемпературного хранения, замораживания и размораживания различных биологических препаратов, в том числе с использованием жидкого азота, (Thermo Fisher Scientific, США).
2. Пробирка полипропиленовая стерильная “CryoTube”, с винтовым стопором и полиэтиленовой винтовой крышкой, рабочий объем 4,5 мл, - предназначена для низкотемпературного хранения, замораживания и размораживания различных биологических препаратов, в том числе с использованием жидкого азота, (Thermo Fisher Scientific, США).
3. Мешки для глубокой заморозки клеток и тканей (криопакеты), одноразовые стерильные системы предназначены для замораживания и хранения компонентов крови, клеток и тканей в жидком азоте или его парах (-195), изготовлены из специального EVA (этилвинилацетат) пластика, сочетающего прочность и

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

4. устойчивость к низким температурам с превосходной прозрачностью и эластичностью, (OriGen Biomedical, США)
5. Перчатки латексные хирургические, смотровые, стерильные, нестерильные, с удлиненной манжетой, с укороченной манжетой, с гладкой поверхностью, с текстурированной поверхностью, опудренные, «Интернэшнл Медикал Продактс».
6. Диметилсульфоксид (ДМСО) используется как криопротектор, добавляется в клеточную среду для предотвращения повреждения клеток при их заморозке и хранении в условиях жидкого азота, стерильный раствор, (Sigma, США).
7. Сыворотка человека АВ (IV) гр., 100 мл, стерильная, (Sigma, США).
8. Этиловый спирт (Этанол), раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 90% 100 мл, ООО «Константа-Фарм М» (РФ).
9. Система для криоконсервации клеток крови, компонентов крови и биологических материалов «Ice-Cube 14S» - полнофункциональная система для криоконсервации предназначена для обеспечения планомерного и точного охлаждения различных биологических объектов до низких и сверхнизких температур, (SY-Lab Gerate GmbH, Австрия).
10. Стационарные и переносные бункеры для хранения криоконсервированного биоматериала в жидком азоте (-196°C).
11. Сепаратор компонентов крови «COBE Spectra», принадлежности и запасные части к нему, наборы для сепарации клеток крови и аутоотрансфузии, «Gambro BCT, Inc.» (США).
12. Механические и электронные, одноканальные и многоканальные дозаторы mLINE, объемом 1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl с возможностью установки защитных фильтров в посадочный конус и полного автоклавирования без разбора дозатора, (Biohit, Финляндия).
13. Ламинарный шкаф ПА (70% рециркуляция) с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite с частичной вытяжкой и защитным барьером разработаны для защиты, как рабочего материала, так и оператора и окружающей среды от опасности микробной контаминации соответствуют Классу II биологической опасности, «Faster», Германия.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

14. Микроскоп биологический инвертированный «Leuca DMIL» - предназначен для исследования малоконтрастных клеточных культур, находящихся в специальной лабораторной посуде в проходящем свете в светлом поле, (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Германия).
15. Центрифуга лабораторная «Labofuge 400R» - применяется для центрифугирования суспензии моноклеарных клеток (МНК) и дендритных клеток (ДК), (Thermo Electron LED GmbH, Германия).
16. Холодильник фармацевтический ХФ-400 «Позис» для хранения питательных сред и растворов при $t=4^0-6^0$ С, , ФГУП (ПОЗиС, РФ).
17. Автоматический счетчик клеток «Countess™». Определяет количество живых и мертвых клеток, а также общее количество клеток, используя трипановый синий. Время определения 30 секунд. Объем клеточной суспензии для подсчета 10 мкл. Диапазон измерения от 1×10^4 до 1×10^7 клеток/мл, с оптимальным диапазоном от 1×10^5 до 4×10^6 клеток/мл. Производитель: (Invitrogen, США).

14. Требования к условиям окружающей среды

1. Работу с биологическим материалом человека проводят в условиях стерильного модуля “Air Lock” (20 м², класс очистки 100 во всех частях рабочей зоны). Рабочее место оснащено ламинарно-поточным шкафом с вертикальным потоком воздуха, для создания в рабочей зоне стерильной среды (II класс биологической защиты).
2. Перед началом работы культуральный бокс и ламинар должны быть просвечены ультрафиолетом не менее 30 минут.
3. Все процедуры должны выполняться в стерильных костюмах, стерильных одноразовых перчатках.
4. Вносимые в ламинар предметы без стерильных упаковок должны обрабатываться 70% спиртом.

15. Перечень записей

Записи ведутся в журнале: «Хранение биоматериала в жидком азоте».

16. Ответственные исполнители

научный сотрудник - Вааль А.И.

научный сотрудник – Нехаева Т.Л.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

17. Квалификация исполнителей

Имеют сертификат врача клинической лабораторной диагностики.

18. Описание метода

1. Полученный материал методом афереза на аппарате «COBE Spectra» (Gambro BCT, США) доставляют в лабораторию в специальном герметичном мешке в термоконтейнере. Образец маркируют, присваивают номер, после чего образец передается в чистые помещения для обработки.
2. Все операции с образцом проводят в замкнутой герметичной системе, исключающей контаминацию биоматериала.
3. Концентрирование клеточной суспензии: мешок с плазмой и клетками помещают в центрифугу (1800-2000 об/мин в течение 10 мин).
4. Охлаждают, помещая в холодильник +4°C на 1 час.
5. Клеточную суспензию с помощью специальных коннекторов переводят в криopakет (мешок для заморозки).
6. Добавляют аутоплазму до общего объема 80-100 мл. Оставшуюся плазму замораживают и хранят при -20°C для последующей реинфузии.
7. Медленно добавляют криопротектор (ДМСО) при постоянном перемешивании (до конечной концентрации 10%).
8. Криopakет герметично запаивают. Конечный объем замораживаемой клеточной суспензии может колебаться от 100 до 200 мл.
9. Одновременно с криopakетом, замораживают отдельно 1-2 криопробирки клеточной суспензии (пробирки-спутники) для выполнения культуральных исследований.
10. Криоконсервируют с помощью программного криозамораживателя типа «Computer Freezer «Ice-Cube 14S» (Австрия) с контролируемой скоростью охлаждения, которая составляет -1°C/мин в диапазоне от +4°C до -4°C, и -5°C/мин в диапазоне от -40 до -12°C.
11. Переносят в индивидуальные контейнеры с жидким азотом (-196°C) и хранят в криокомплексе НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова до использования.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

19. Литературные источники

1. Усс А.Л., Мицкевич П.Б., Завгородняя И.Л. Криоконсервирование клеток человека // Медицинская панорама. – 2003. - №2. - С.38-40.
2. Bakken A.M. Cryopreserving Human Peripheral Blood Progenitor Cells // Current Stem Cell Research & Therapy. – 2006. – Vol.1. - P.47-54.
3. Cilloni D., Garau D., Regazzi E. et al. Primitive hematopoietic progenitors within mobilized blood are spared by uncontrolled rate freezing // Bone Marrow Transplantation. – 1999. - Vol.23. – P.497–503.
4. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34⁺ cells to multimolar dymethyl sulphoxide and effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology. - 2003. - Vol.46. - P.76-87.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Приложение 4

Стандартная операционная процедура

Дифференцировка дендритных клеток

СОП ЛКТ-05-01-003-2013

Наименование отдела: ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	Номер копии 1
---	----------------------

Согласовано:

Ф.И.О., должность уполномоченного лица	Подпись	Дата
Балдуева И.А.	в.н.с.	

Разработано:

Нехаева Т.Л.	н.с.	
--------------	------	--

Отчет об изменениях

--	--	--

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Назначение и область применения

Данная инструкция предназначена для всех сотрудников лаборатории.

Федеральные законы, рекомендованные стандарты и ведомственные нормативные документы

1. Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ.
 - а. "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации".
2. Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).
3. Постановление Правительства РФ №1230 от 31.12.2010 "Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно - инфузионной терапии".
4. СанПиН 2.1.7.2790 -10 «Санитарно- эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
5. ГОСТ Р ИСО 15189- 2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
6. ГОСТ ISO 9001- 2011 «Системы менеджмента качества. Требования»
7. ГОСТ ISO 9000- 2011 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь»

Используемые сокращения, термины и определения

ДК – дендритные клетки

МНК – моноклеарные кл

СОП- стандартная операционная процедура

GMP - надлежащая производственная практика

GLP – надлежащая лабораторная практика

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Принцип метода — незрелые ДК, дифференцируются из моноцитов периферической крови в присутствии рекомендованных концентраций GM-CSF и IL-4, обладают выраженной функциональной активностью, определяемой по экспрессии молекул активации, миграции и костимулирующих сигналов.

Материалы и оборудование

1. Пробирки конические стерильные емкостью 15 мл и 50 мл, полипропиленовые, с винтовой крышкой, градуированные, информационная этикетка обладают стойкостью к действию этанола, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
2. Флаконы для клеточных культур T-75 стерильные, активированная поверхность культивирования – 75 см², объем 250 мл, вентилируемая крышка с гидрофобной фильтрующей мембраной 0,2 мкм – предназначены для культивирования адгезивных дендритных клеток при постоянном газообмене, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
3. Скрепер 25 см, полистирол/полиэтилен, стерильный - устройство для снятия клеток, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
4. Перчатки латексные хирургические, смотровые, стерильные, нестерильные, с удлиненной манжетой, с укороченной манжетой, с гладкой поверхностью, с текстурированной поверхностью, опудренные, «Интернэшнл Медикал Продактс».
5. Питательная среда RPMI-1640 жидкая, с L-глутамином, стерильная, без сывороточная, из полнокомпонентной смеси солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, глутадиона и индикатора кислотности, предназначена для культивирования в монослое и суспензии лейкоцитарных клеток человека, флакон 500 мл, ООО «Биолот» (РФ).
6. Питательная среда «CellGro DC» жидкая, произведённая при GMP условиях, стерильная, бессывороточная – смесь солей, аминокислот, витаминов и глюкозы, растворенная в очищенной воде и стерилизованная фильтрованием, предназначена для культивирования в монослое и суспензии дендритных клеток человека, флакон 500 мл, «CellGenix» (Германия).
7. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) человеческий рекомбинантный, флакон 150 мкг, «Неостим» (Россия).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

8. Интерлейкин-4 (IL-4) человеческий рекомбинантный, произведённый при GMP условиях для использования *ex vivo* - ростовая добавка к питательной среде, белок из группы цитокинов, *in vitro* играет важную роль в регуляции нормальной дифференцировки и жизнеспособности различных клеток, флакон 50 мкг, (CellGenix, Германия).
9. Моноклональные антитела к поверхностным антигенам дендритных клеток напрямую меченые флуорохромами (anti-CD83-PE-Cy5, anti-CD1a-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CCR7-FITC, anti-HLA-DR-Per CP-Cy5.5), реагент для фенотипирования дендритных клеток методом иммунофлуоресценции, «BD Biosciences» (США).
10. Этиловый спирт (Этанол), раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 90% 100 мл, ООО «Константа-Фарм М» (РФ).
11. Механические одноканальные дозаторы mLINE, объемом 2-20 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl с возможностью установки защитных фильтров в посадочный конус и полного автоклавирования без разбора дозатора, «Biohit» (Финляндия).
12. Инкубатор медицинский «Heracel» для культивирования клеток в атмосфере 5% CO₂, «Thermo Electron LTD GmbH», (Германия).
13. Ламинарный шкаф ПА (70% рециркуляция) с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite с частичной вытяжкой и защитным барьером разработаны для защиты, как рабочего материала, так и оператора и окружающей среды от опасности микробной контаминации соответствуют Классу II биологической опасности, «Faster», Германия.
14. Микроскоп биологический инвертированный «Leica DMIL» - предназначен для исследования малококонтрастных клеточных культур, находящихся в специальной лабораторной посуде в проходящем свете в светлом поле, «Leica Microsystems GmbH Wetzlar» (Германия).
15. Центрифуга лабораторная «Labofuge 400R» - применяется для центрифугирования суспензии мононуклеарных клеток (МНК) и дендритных клеток (ДК), «Thermo Electron LED GmbH» (Германия).
16. Холодильник фармацевтический ХФ-400 «Позис» для хранения питательных сред и растворов при t=4⁰-6⁰ С, , ФГУП «ПОЗИС» (РФ).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

17. Автоматический счетчик клеток Countess[™]. Определяет количество живых и мертвых клеток, а также общее количество клеток, используя трипановый синий. Время определения 30 секунд. Объем клеточной суспензии для подсчета 10 мкл. Диапазон измерения от 1×10^4 до 1×10^7 клеток/мл, с оптимальным диапазоном от 1×10^5 до 4×10^6 клеток/мл. Производитель: «Invitrogen» (США).
18. Система для наблюдения за живыми клетками в культуре Cell-IQ (Chip Map Technologies (Финляндия)).

Требования к условиям окружающей среды

1. Работу с биологическим материалом человека проводят в условиях стерильного модуля “Air Lock” (20 м², класс очистки 100 во всех частях рабочей зоны). Рабочее место оснащено ламинарно-поточным шкафом с вертикальным потоком воздуха, для создания в рабочей зоне стерильной среды (II класс биологической защиты).
2. Перед началом работы культуральный бокс и ламинар должны быть просвечены ультрафиолетом не менее 30 минут.
3. Все процедуры должны выполняться в стерильных костюмах, стерильных одноразовых перчатках.
4. Вносимые в ламинар предметы без стерильных упаковок должны обрабатываться 70% спиртом.

Перечень записей

Записи ведутся на бумажном (журнал: «Приготовление ДК-вакцин») и электронном носителе (файл Excel «Приготовление ДК-вакцин»).

Ответственные исполнители

научный сотрудник - Вааль А.И.

научный сотрудник – Нехаева Т.Л.

Квалификация исполнителей

Имеют сертификат врача клинической лабораторной диагностики.

Описание метода

1. После забора периферической венозной крови (СОП ЛКТ-05-01-004-2013) и выделения МНК фракции (СОП ЛКТ-05-01-002-2013), взвесь МНК помещают в

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

неполную питательную среду RPMI-1640 (посевная доза 5×10^6 кл/мл) и 2 плоскодонных культуральных флакона 75 см² с вентилируемыми пробками («Sarstedt», Германия) для выделения адгезивной фракции МНК.

2. Инкубируют в условиях контролируемого 5% CO₂ и 98% влажности при 37°C (CO₂-инкубатор «Heracel» «Termo Electron LTD GmbH», Германия) в течение 1,5-2 часов.
3. Неадгезивные клетки (лимфоциты), около 56% удаляют, прикрепившиеся клетки (моноциты), около 44% отмывают питательной средой RPMI-1640.
4. Дифференцировку МНК в незрелые ДК проводят в сбалансированной бессывороточной среде «CellGro DC» («CellGenix», Германия), произведенной в условиях GMP и рекомендованной для культивирования ДК человека.
5. Ростовые факторы и факторы дифференцировки – GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20 нг/мл) («CellGenix», Германия) вносят на 1-й, 3-й и 5-й дни культивирования.
6. На 7-й день ДК собирают, осаждают центрифугированием, отмывают дважды от трипсина, производят подсчет оценку жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток, типа «Countess» и трипанового синего, определяют иммунофенотип и уровень дифференцировки ДК, бактериалогическое исследование культуральной среды.
7. При соблюдении вышеуказанных условий получают 10-20x10⁶ клеток, с жизнеспособностью не менее 98% и иммунофенотипом незрелых ДК (CD14⁻CD1a⁺CD83⁻).

Литературные источники

1. Моисеенко В.М., Балдуева И.А. Принципы создания и использования лечебных вакцин в онкологии // Рос. онкол. журн.—2011.—№ 2.—С.49-53.
2. Bender A., Sapp M., Schuler G., et al.: Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. J. Immunol. Methods, /996; 196:121
3. Bohnenkamp H.R., Холл Т. Development of a standardized protocol for reproducible generation of matured monocyte-derived dendritic cells suitable for clinical application // Cytotechnology —2003. — Vol.42(3).—P.121—131.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

4. Cheryl L-L. Chiang, Dawn A. Maier, Lana E. Kandalaf et al. Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate // Journal of Translational Medicine —2011. — Vol.9.—P. 198-230.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Приложение 5

Стандартная операционная процедура

Приготовление РГА⁺ содержащего опухолевого лизата

СОП ЛКТ-05-01-005-2013

Наименование отдела: ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	Номер копии 1
---	----------------------

Согласовано:

Ф.И.О., должность уполномоченного лица	Подпись	Дата
Балдуева И.А. в.н.с.		

Разработано:

Данилова А.Б. с.н.с.		
-----------------------------	--	--

Отчет об изменениях

--	--	--

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Назначение и область применения

Данная инструкция предназначена для всех сотрудников лаборатории.

Нормативные ссылки

Федеральные законы, рекомендованные стандарты и ведомственные нормативные документы

1. Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ.
а. "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации".
2. Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).
3. Приказ Минздрава СССР от 12 июля 1989 г. N 408 "О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в стране".
4. Постановление Правительства РФ №1230 от 31.12.2010 "Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно - инфузионной терапии".
5. СанПиН 2.1.3.2630 -10 «Санитарно- эпидемиологические требования организациям, осуществляющим медицинскую деятельность».
6. СанПиН 3.1.5.2826 - 10 «Профилактика ВИЧ- инфекций».
7. СанПиН 2.1.7.2790 -10 «Санитарно- эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
8. ГОСТ Р ИСО 15189- 2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
9. ОСТ 42-21-2-85. Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения методы, средства и режимы.

Используемые сокращения, термины и определения

РТА – раково-тестикулярные антигены

СОП- стандартная операционная процедура

GMP - надлежащая производственная практика

GLP – надлежащая лабораторная практика

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Принцип метода

«Раково-тестикулярные» гены экспрессированы в опухолях различных гистологических типов и кодируют отдельные строго опухолеспецифические антигены (MAGE, BAGE, GAGE, LAGE, NY-ESO-1). Эти антигены являются идеальными мишенями для направленного иммунного воздействия в отсутствие опасности развития аутоиммунных реакций. В качестве источника РТА отобраны 4 стабильно растущие адгезивные клеточные линии меланомы кожи человека (Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520) с неограниченным пролиферативным потенциалом.

Материалы и оборудование

1. Питательная среда DMEM/F12 жидкая, стерильная, без сывороточная, из полнокомпонентной смеси солей, аминокислот, витаминов, флакон 500 мл, ООО «Биолот» (РФ).
2. Сыворотка крови плодов коровы жидкая для культур клеток, стерильная, протестирована на отсутствие микоплазм и вирусов, ростовые свойства, цитотоксичность, определены физико-химические показатели: белок, рН, гемоглобин (до 0,5 г/л), флакон 500 мл, ООО «Биолот» (РФ).
3. Трипсина раствор 0,25%, стерильный, флакон 400 мл, ООО «Биолот» (РФ).
4. Версена раствор 0,02%, стерильный, флакон 400 мл, ООО «Биолот» (РФ).
5. Флаконы для клеточных культур Т-175, Т-75, стерильный, активированная поверхность культивирования – 175 см² или 75 см², вентилируемая крышка с гидрофобной фильтрующей мембраной 0,2 мкм – предназначен для культивирования адгезивных клеток при постоянном газообмене, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
6. Пробирка коническая стерильная емкостью 15 мл и 50 мл, полипропиленовая, с винтовой крышкой, градуированная, информационная этикетка обладают стойкостью к действию этанола, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

1. Скрепер 40 см, полистирол/полиэтилен, стерильный - устройство для снятия клеток, регистрационное удостоверение ФС №2005/1174 от 25.08.2005 г., «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
2. Пробирка полипропиленовая стерильная Nunc «CryoTube», с винтовым стопором и полиэтиленовой винтовой крышкой, рабочий объём 1,8 мл, - предназначена для низкотемпературного хранения, замораживания и размораживания различных биологических препаратов, в том числе с использованием жидкого азота, (Thermo Fisher Scientific, США).
3. Диметилсульфоксид (ДМСО) используется как криопротектор, добавляется в клеточную среду для предотвращения повреждения клеток при их заморозке и хранении в условиях жидкого азота, стерильный раствор, стеклянные ампулы из тёмно-коричневого стекла 5 мл, «Sigma» (США).
4. Этиловый спирт (Этанол), раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 90% 100 мл, ООО «Константа-Фарм М» (РФ).
5. Система для криоконсервации клеток крови, компонентов крови и биологических материалов «Ice-Cube 14S» - полнофункциональная система для криоконсервации предназначена для обеспечения планомерного и точного охлаждения различных биологических объектов до низких и сверхнизких температур, «SY-Lab Gerate GmbH» (Австрия).
6. Перчатки латексные хирургические, смотровые, стерильные, нестерильные, с удлиненной манжетой, с укороченной манжетой, с гладкой поверхностью, с текстурированной поверхностью, опудренные, неопудренные, «Интернэшнл Медикал Продактс».
7. Инкубатор медицинский «Heracel» для культивирования клеток в атмосфере 5% CO₂, «Termo Electron LTD GmbH» (Германия).
8. Ламинарный шкаф ПА (70% рециркуляция) с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite с частичной вытяжкой и защитным барьером разработаны для защиты, как рабочего материала, так и оператора и окружающей среды от опасности микробной контаминации соответствуют Классу II биологической опасности, «Faster», Германия
Микроскоп биологический инвертированный «Leuca DMIL» -

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

оборудование для исследования малоконтрастных клеточных культур, находящихся в специальной лабораторной посуде в проходящем свете в светлом поле, «Leica Microsystems GmbH Wetzlar» (Германия).

9. Ультразвукотемпературный замораживатель MDF-U73V – оборудование для хранения крови и её компонентов, вакцин, «Sanyo Elektrik Co» (Япония).
10. Центрифуга рефрижераторная ЦРЛ6-01-«БФА» - оборудование для центрифугирования клеток, ОАО «Биофизическая аппаратура» (РФ).
11. Холодильник фармацевтический ХФ-400 «Позис» для хранения питательных сред и растворов при $t=4^0-6^0$ С, регистрационное удостоверение ФСР № 2009/05705 от 24.09.2009 г., ФГУП «ПОЗиС» (РФ).
12. Система для наблюдения за живыми клетками в культуре Cell-IQ (Chip Man Technologies (Финляндия).
13. Центрифуга лабораторная «Labofuge 400R» - применяется для центрифугирования суспензии мононуклеарных клеток (МНК) и дендритных клеток (ДК), «Thermo Electron LED GmbH» (Германия).
14. Холодильник фармацевтический ХФ-400 «Позис» для хранения питательных сред и растворов при $t=4^0-6^0$ С, , ФГУП «ПОЗиС» (РФ).
15. Автоматический счетчик клеток Countess™. Определяет количество живых и мертвых клеток, а также общее количество клеток, используя трипановый синий. Время определения 30 секунд. Объем клеточной суспензии для подсчета 10 мкл. Диапазон измерения от 1×10^4 до 1×10^7 клеток/мл, с оптимальным диапазоном от 1×10^5 до 4×10^6 клеток/мл. Производитель: «Invitrogen» (США).

Требования к условиям окружающей среды

1. Работу с биологическим материалом человека проводят в условиях стерильного модуля «Air Look» (20 м², класс очистки 100 во всех частях рабочей зоны) с ламинарно-поточными боксами «CAT-R4» (степень чистоты рабочей зоны бокса соответствует требованиям класса II).
2. Перед началом работы культуральный бокс и ламинар должны быть просвечены ультрафиолетом не менее 30 минут.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

3. Все процедуры должны выполняться в стерильных костюмах, стерильных одноразовых перчатках.
4. Вносимые в ламинар предметы без стерильных упаковок должны обрабатываться 70% спиртом.

Перечень записей

Записи ведутся на бумажном (журнал: «Клеточные линии») и электронном носителе (файл Excel «Клеточные линии»).

Ответственные исполнители

старший научный сотрудник – Данилова А.Б.

научный сотрудник - Вааль А.И.

Квалификация исполнителей

Имеют сертификат врача клинической лабораторной диагностики.

Описание метода

1. Клетки Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520 культивируют в пластиковых флаконах в полной питательной среде DMEM/F12 с 20% телячьей эмбриональной сыворотки с добавлением глутамина, пенициллина, стрептомицина, трансферрина (5 мкг/мл), инсулина (5 мкг/мл), селена (5нг/мл), в условиях контролируемого 5% CO₂ и 98% влажности при 37°C (CO₂-инкубатор «Heracel» «Termo Electron LTD GmbH», Германия).
2. При достижении конфлюэнтного монослоя, производят пересев клеток и дальнейшее пассирование культуры с рассевом 1:2 или 1:4 (определяется индивидуально для каждой культуры клеток).
3. Из флакона удаляют культуральную среду, омывают поверхность флакона небольшим количеством ферментативного раствора (трипсин 0,25% и версена 0,02% в равных пропорциях) и затем к клеткам добавляют 1-3 мл этого раствора.
4. Помещают флаконы в CO₂-инкубатор и проводят визуальный контроль состояния клеток.
5. Клетки собирают серологической пипеткой, отмывают двукратным центрифугированием в 10 мл 0,9 % физиологического раствора, при 1000 об/мин в течение 10 мин.
6. Производят отбор проб для подсчета, оценки жизнеспособности, бактериалогического исследования культуральной среды, определения иммунофенотипа клеток и уровня продукции иммуносупрессирующих факторов.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

7. Для приготовления опухолевого лизата клетки Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520 смешивают в равных пропорциях и проводят:
- a) 6 последовательных циклов моментального замораживания до -196°C и оттаивания до комнатной температуры в фосфатно-солевом буфере без криопротектора (качество лизиса клеток контролировали с помощью 0,1% трипанового синего и светового микроскопа);
 - b) осаждение клеточного детрита центрифугированием (10 мин, 3000 об./мин);
 - c) фильтрацию надосадочной фракции через миллипоровый фильтр (0,2 мкм);
 - d) расфасовку РТА⁺ опухолевого лизата в криопробирки по 30 и хранение при -20°C до использования.

Литературные источники

1. Разработка, обоснование и оценка современной биотерапии у больных с солидными опухолями //Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук, СПб., 2008. — 45 с.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Приложение 6

Стандартная операционная процедура

Нагрузка и активация дендритных клеток РГА⁺ содержащим опухолевым лизатом

СОП ЛКТ-05-01-007-2013

Рассылка	Номер копии
Наименование отдела: ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	1

Согласовано:

Ф.И.О., должность уполномоченного лица	Подпись	Дата
Балдуева И.А.	в.н.с.	
<u>Разработано:</u>		
Нехаева Т.Л.	н.с.	
Отчет об изменениях		

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Назначение и область применения

Данная инструкция предназначена для всех сотрудников лаборатории.

Нормативные ссылки

Федеральные законы, рекомендованные стандарты и ведомственные нормативные документы

1. Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ.
а. "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации".
2. Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).
3. Постановление Правительства РФ №1230 от 31.12.2010 "Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно - инфузионной терапии".
4. СанПиН 2.1.7.2790 -10 «Санитарно- эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
5. ГОСТ Р ИСО 15189- 2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
6. ГОСТ ISO 9001- 2011 «Системы менеджмента качества. Требования»
7. ГОСТ ISO 9000- 2011 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь»

20. Используемые сокращения, термины и определения

ДК – дендритные клетки

МНК – моноклеарные клетки

СОП- стандартная операционная процедура

GMP - надлежащая производственная практика

GLP – надлежащая лабораторная практика

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Принцип метода

Для специфического созревания и активации CD14⁺CD1a⁺CD83⁻ ДК используют опухолевый РТА⁺ лизат (СОП ЛКТ-05-01-005-2013) и фактор некроза опухоли (TNF- α) 20 нг/мл (BD, США). При соблюдении вышеуказанных условий получают ДК с иммунофенотипом CD14⁺/CD1a⁻/CD83⁺/CD80⁺/CD86⁺ HLA DR⁺, жизнеспособностью не менее 98%.

Материалы и оборудование

1. Пробирки конические стерильные емкостью 15 мл и 50 мл, полипропиленовые, с винтовой крышкой, градуированные, информационная этикетка обладают стойкостью к действию этанола, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
2. Флаконы для клеточных культур Т-75 стерильные, активированная поверхность культивирования – 75 см², объем 250 мл, вентилируемая крышка с гидрофобной фильтрующей мембраной 0,2 мкм – предназначены для культивирования адгезивных дендритных клеток при постоянном газообмене, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
3. Скрепер 25 см, полистирол/полиэтилен, стерильный - устройство для снятия клеток, «Sarstedt AG & Co.» (Германия).
4. Перчатки латексные хирургические, смотровые, стерильные, нестерильные, с удлиненной манжетой, с укороченной манжетой, с гладкой поверхностью, с текстурированной поверхностью, опудренные, «Интернэшнл Медикал Продактс».
5. Питательная среда RPMI-1640 жидкая, с L-глутамином, стерильная, без сывороточная, из полнокомпонентной смеси солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, глютадиона и индикатора кислотности, предназначена для культивирования в монослое и суспензии лейкоцитарных клеток человека, флакон 500 мл, ООО «Биолот» (РФ).
6. Питательная среда «CellGro DC» жидкая, произведённая при GMP условиях, стерильная, без сывороточная – смесь солей, аминокислот, витаминов и глюкозы, растворенная в очищенной воде и стерилизованная фильтрованием, предназначена для культивирования в монослое и суспензии дендритных клеток человека, флакон 500 мл, «CellGenix» (Германия).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

7. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) человеческий рекомбинантный, флакон 150 мкг, «Неостим» (Россия).
8. Интерлейкин-4 (IL-4) человеческий рекомбинантный, произведённый при GMP условиях для использования ex vivo - ростовая добавка к питательной среде, белок из группы цитокинов, in vitro играет важную роль в регуляции нормальной дифференцировки и жизнеспособности различных клеток, флакон 50 мкг, «CellGenix» (Германия).
9. Человеческий рекомбинантный TNF-альфа, флакон 50 мкг. Способствует созреванию дендритных клеток и их миграции из не лимфоидных органов во вторичные лимфоидные органы, «Becton Dickinson and Company» (США).
10. Моноклональные антитела к поверхностным антигенам дендритных клеток напрямую меченые флуорохромами (anti-CD83-PE-Cy5, anti-CD1a-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CCR7-FITC, anti-HLA-DR-Per CP-Cy5.5), реагент для фенотипирования дендритных клеток методом иммунофлюоресценции, «BD Biosciences» (США).
11. Этиловый спирт (Этанол), раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 90% 100 мл, ООО «Константа-Фарм М» (РФ).
12. Механические одноканальные дозаторы mLINE, объемом 2-20 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl с возможностью установки защитных фильтров в посадочный конус и полного автоклавирования без разбора дозатора, «Biohit» (Финляндия).
13. Инкубатор медицинский «Heracel» для культивирования клеток в атмосфере 5% CO₂, «Termo Electron LTD GmbH», (Германия).
14. Ламинарный шкаф ПА (70% рециркуляция) с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite с частичной вытяжкой и защитным барьером разработаны для защиты, как рабочего материала, так и оператора и окружающей среды от опасности микробной контаминации соответствуют Классу II биологической опасности, «Faster», Германия.
15. Микроскоп биологический инвертированный «Leica DMIL» - предназначен для исследования малококонтрастных клеточных культур, находящихся в специальной лабораторной посуде в проходящем свете в светлом поле, «Leica Microsystems GmbH Wetzlar» (Германия).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

16. Центрифуга лабораторная «Labofuge 400R» - применяется для центрифугирования суспензии моноклеарных клеток (МНК) и дендритных клеток (ДК), «Thermo Electron LED GmbH» (Германия).
17. Холодильник фармацевтический ХФ-400 «Позис» для хранения питательных сред и растворов при $t=4^0-6^0$ С, ФГУП «ПОЗиС» (РФ).
18. Автоматический счетчик клеток Countess™. Определяет количество живых и мертвых клеток, а также общее количество клеток, используя трипановый синий. Время определения 30 секунд. Объем клеточной суспензии для подсчета 10 мкл. Диапазон измерения от 1×10^4 до 1×10^7 клеток/мл, с оптимальным диапазоном от 1×10^5 до 4×10^6 клеток/мл. Производитель: «Invitrogen» (США).
19. Система для наблюдения за живыми клетками в культуре Cell-IQ (Chip Man Technologies (Финляндия).

Требования к условиям окружающей среды

1. Работу с биологическим материалом человека проводят в условиях стерильного модуля “Air Look” (20 м², класс очистки 100 во всех частях рабочей зоны). Рабочее место оснащено ламинарно-поточным шкафом с вертикальным потоком воздуха, для создания в рабочей зоне стерильной среды (II класс биологической защиты).
2. Перед началом работы культуральный бокс и ламинар должны быть просвечены ультрафиолетом не менее 30 минут.
3. Все процедуры должны выполняться в стерильных костюмах, стерильных одноразовых перчатках.
4. Вносимые в ламинар предметы без стерильных упаковок должны обрабатываться 70% спиртом.

Перечень записей

Записи ведутся на бумажном (журнал: «Приготовление ДК-вакцин») и электронном носителе (файл Excel «Приготовление ДК-вакцин»).

Ответственные исполнители

научный сотрудник - Вааль А.И.
научный сотрудник – Нехаева Т.Л.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Квалификация исполнителей

Имеют сертификат врача клинической лабораторной диагностики.

Описание метода

1. Для нагрузки и активации незрелых CD14⁻CD1a⁺CD83⁻ ДК (СОП ЛКТ-05-01-003-2013) на седьмые сутки культивирования ДК собирают, осаждают центрифугированием, отмывают дважды от трипсина.
2. Производят подсчет, оценку жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток, типа «Countess» и 0,4% трипанового синего, определяют иммунофенотип и уровень дифференцировки ДК, бактериалогическое исследование культуральной среды, получают 10-20x10⁶ клеток, с жизнеспособностью не менее 98% и иммунофенотипом незрелых ДК (CD14⁻CD1a⁺CD83⁻).
3. В питательную среду вносят опухолевый РТА⁺ лизат (СОП ЛКТ-05-01-005-2013). Для нагрузки 10⁶ незрелых ДК используют лизат, полученный из 30⁶ клеток 4-х клеточных линий РТА⁺ меланомы кожи и фактор некроза опухоли (TNF-α) 20 нг/мл (BD, США).
4. Инкубируют в условиях контролируемого 5% CO₂ и 98% влажности при 37°C (CO₂-инкубатор «Heracel» «Termo Electron LTD GmbH», Германия) в течение 48 часов.
5. При соблюдении вышеуказанных условий получают ДК с иммунофенотипом CD14⁻/CD1a⁺/CD83⁻/CD80⁺/CD86⁺ HLA DR⁺, жизнеспособностью не менее 98%.

Литературные источники

1. Моисеенко В.М., Балдуева И.А. Принципы создания и использования лечебных вакцин в онкологии // [Рос. онкол. журн.](#)—2011.—[№ 2](#).—С.49-53.
2. Bender A., Sapp M., Schuler G., et al.: Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. J. Immunol. Methods, /996; 196:121
3. Bohnenkamp H.R , [Нолл](#) Т. Development of a standardized protocol for reproducible generation of matured monocyte-derived dendritic cells suitable for clinical application // Cytotechnology —2003. — Vol.42(3).—P.121—131.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

4. Cheryl L-L. Chiang, Dawn A. Maier, Lana E. Kandalaf et al. Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate // Journal of Translational Medicine —2011. — Vol.9.—P. 198-230.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Приложение 7

Стандартная операционная процедура

Криоконсервация и размораживание вакцинных дендритных клеток

СОП ЛКТ-05-01-009-2013

Наименование отдела: ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	Номер копии 1
---	----------------------

Согласовано:

Ф.И.О., должность уполномоченного лица	Подпись	Дата
Балдуева И.А.	в.н.с.	

Разработано:

Нехаева Т.Л.	н.с.	
--------------	------	--

Отчет об изменениях

--	--	--

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Назначение и область применения

Данная инструкция предназначена для всех сотрудников лаборатории.

Нормативные ссылки

Федеральные законы, рекомендованные стандарты и ведомственные нормативные документы

1. Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ.
а. "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации".
2. Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).
3. Постановление Правительства РФ №1230 от 31.12.2010 "Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно - инфузионной терапии".
4. СанПиН 2.1.7.2790 -10 «Санитарно- эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
5. ГОСТ Р ИСО 15189- 2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
6. ГОСТ ISO 9001- 2011 «Системы менеджмента качества. Требования»
7. ГОСТ ISO 9000- 2011 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь»
8. ГОСТ 21957-76 Техника криогенная. Термины и определения.
9. ГОСТ 4.129-85 Техника криогенная медицинская. Номенклатура показателей.
10. ГОСТ 9293-74 (ИСО 2435-73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия.

Используемые сокращения, термины и определения

ДК – дендритные клетки

ДМСО - диметилсульфоксид

МНК – моноклеарные клетки

СОП- стандартная операционная процедура

GMP - надлежащая производственная практика

GLP – надлежащая лабораторная практика

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Принцип метода основан на сохранение жизнеспособности при длительном хранении в ультранизких температурах. С использованием двух подходов: а) применение криопротекторов - веществ, которые обладают способностью предупреждать развитие криоповреждений и обеспечивать сохранность клеток в жизнеспособном состоянии после замораживания и размораживания; б) охлаждение с определенной, оптимальной для данного типа клеток скоростью. В качестве криопротектора используют диметилсульфоксид (ДМСО). Механизм его криозащитного действия связан со способностью связывать молекулы воды, что замедляет рост кристаллов льда и препятствует быстрому нарастанию осмолярности среды, это снижает осмотическую нагрузку на клетки. Кроме того, при проникновении через клеточную мембрану, структурируют внутриклеточную воду, что препятствует обезвоживанию клеток. Конечная концентрация ДМСО 10% признана наиболее эффективной для защиты биоматериала при криоконсервации.

Материалы и оборудование

18. Пробирка полипропиленовая стерильная Nunc «CryoTube», с винтовым стопором и полиэтиленовой винтовой крышкой, рабочий объем 1,8 мл, - предназначена для низкотемпературного хранения, замораживания и размораживания различных биологических препаратов, в том числе с использованием жидкого азота, (Thermo Fisher Scientific, США).
19. Пробирка полипропиленовая стерильная «CryoTube», с винтовым стопором и полиэтиленовой винтовой крышкой, рабочий объем 4,5 мл, - предназначена для низкотемпературного хранения, замораживания и размораживания различных биологических препаратов, в том числе с использованием жидкого азота, (Thermo Fisher Scientific, США).
20. Перчатки латексные хирургические, смотровые, стерильные, нестерильные, с удлиненной манжетой, с укороченной манжетой, с гладкой поверхностью, с текстурированной поверхностью, опудренные, «Интернэшнл Медикал Продактс».
21. Диметилсульфоксид (ДМСО) используется как криопротектор, добавляется в клеточную среду для предотвращения повреждения клеток при их заморозке и хранении в условиях жидкого азота, стерильный раствор, (Sigma, США).
22. Сыворотка человека АВ (IV) гр., 100 мл, стерильная, (Sigma, США).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

23. Бессывороточная криосреда для заморозки клеток, 30 мл, стерильная, (Биолот, Россия).
24. Этиловый спирт (Этанол), раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 90% 100 мл, ООО «Константа-Фарм М» (РФ).
25. Система для криоконсервации клеток крови, компонентов крови и биологических материалов «Ice-Cube 14S» - полнофункциональная система для криоконсервации предназначена для обеспечения планомерного и точного охлаждения различных биологических объектов до низких и сверхнизких температур, (SY-Lab Gerate GmbH, Австрия).
26. Стационарные и переносные бункеры для хранения криоконсервированного биоматериала в жидком азоте (-196°C).
27. Механические и электронные, одноканальные и многоканальные дозаторы mLINe, объемом 1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl с возможностью установки защитных фильтров в посадочный конус и полного автоклавирования без разбора дозатора, (Biohit, Финляндия).
28. Ламинарный шкаф ПА (70% рециркуляция) с вертикальным потоком воздуха SafeFAST Elite с частичной вытяжкой и защитным барьером разработаны для защиты, как рабочего материала, так и оператора и окружающей среды от опасности микробной контаминации соответствуют Классу II биологической опасности, «Faster», Германия.
29. Микроскоп биологический инвертированный «Leica DMIL» - предназначен для исследования малококонтрастных клеточных культур, находящихся в специальной лабораторной посуде в проходящем свете в светлом поле, (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Германия).
30. Центрифуга лабораторная «Labofuge 400R» - применяется для центрифугирования суспензии мононуклеарных клеток (МНК) и дендритных клеток (ДК), (Thermo Electron LED GmbH, Германия).
31. Холодильник фармацевтический ХФ-400 «Позис» для хранения питательных сред и растворов при $t=4^0-6^0$ С, , ФГУП (ПОЗиС, РФ).
32. Автоматический счетчик клеток «Countess™». Определяет количество живых и мертвых клеток, а также общее количество клеток, используя трипановый синий.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Время определения 30 секунд. Объем клеточной суспензии для подсчета 10 мкл. Диапазон измерения от 1×10^4 до 1×10^7 клеток/мл, с оптимальным диапазоном от 1×10^5 до 4×10^6 клеток/мл. Производитель: (Invitrogen, США).

Требования к условиям окружающей среды

1. Работу с биологическим материалом человека проводят в условиях стерильного модуля “Air Look” (20 м², класс очистки 100 во всех частях рабочей зоны). Рабочее место оснащено ламинарно-поточным шкафом с вертикальным потоком воздуха, для создания в рабочей зоне стерильной среды (II класс биологической защиты).
2. Перед началом работы культуральный бокс и ламинар должны быть просвечены ультрафиолетом не менее 30 минут.
3. Все процедуры должны выполняться в стерильных костюмах, стерильных одноразовых перчатках.
4. Вносимые в ламинар предметы без стерильных упаковок должны обрабатываться 70% спиртом.

Перечень записей

Записи ведутся в журнале: «Хранение биоматериала в жидком азоте».

Ответственные исполнители

научный сотрудник - Вааль А.И.

научный сотрудник – Нехаева Т.Л.

Квалификация исполнителей

Имеют сертификат врача клинической лабораторной диагностики.

Описание метода

Криоконсервация ДК

1. ДК помещают в криосреду и индивидуально маркированные криопробирки («Sarstedt AG & Co.», Германия).
2. Криоконсервируют с помощью программного криозамораживателя типа «Computer Freezer «Ice-Cube 14S» (Австрия) с контролируемой скоростью охлаждения, которая составляет $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от $+4^{\circ}\text{C}$ до -4°C , и $-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от -40 до -12°C .

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

3. Криоконсервируют с помощью программного криозамораживателя типа «Computer Freezer «Ice-Cube 14S» (Австрия) с контролируемой скоростью охлаждения, которая составляет $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от $+4^{\circ}\text{C}$ до -4°C , и $-5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от -40 до -12°C .
4. Переносят в индивидуальные контейнеры с жидким азотом (-196°C) и хранят в криокомплексе НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова до использования.

Размораживание ДК

1. Криопробирку с клетками помещают на 3 мин в водяную баню $+42^{\circ}\text{C}$, далее ex tempore переносят в стерильную 15-мл пробирку и разбавляют не менее чем десятикратным избытком 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%).
2. Отмывают ДК двукратным центрифугированием в 10 мл 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%), при 1000 об/мин в течение 10 мин.
3. Производят подсчет и оценку жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток, типа «Countess» и трипанового синего. Получают контрольное криоконсервированное количество ДК, жизнеспособность – не менее 98%.

Литературные источники

1. Усс А.Л., Мицкевич П.Б., Завгородняя И.Л. Криоконсервирование клеток человека // Медицинская панорама. – 2003. - №2. - С.38-40.
2. Bakken A.M. Cryopreserving Human Peripheral Blood Progenitor Cells // Current Stem Cell Research & Therapy. – 2006. – Vol.1. - P.47-54.
3. Cilloni D., Garau D., Regazzi E. et al. Primitive hematopoietic progenitors within mobilized blood are spared by uncontrolled rate freezing // Bone Marrow Transplantation. – 1999. - Vol.23. – P.497–503.
4. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34⁺ cells to multimolar dymethyl sulphoxide and effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology. - 2003. - Vol.46. - P.76-87.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции:
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	№ страницы:
Подразделение: ЛКТ-05-01-000-2014	№ копии: 1