

- (11) Patento numeris: **6677** (51) Int. Cl. (2019.01): **C12N 5/00**
A61K 35/00
- (21) Paraiškos numeris: **2019 512**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2019-04-18**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2019-10-25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2019-11-11**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Adas DARINSKAS, LT
- (73) Patento savininkas:
Adas DARINSKAS, Turniškių g. 13-8, 10104 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Gediminas PRANEVIČIUS, Advokatų profesinė bendrija IP FORMA, Užupio g.30, LT-01203 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Citokinais indukuotų / aktyvuotų kimerinių ląstelių (CIK) gavimo iš periferinio kraujo, kaulų čiulpų arba aferezės produkto būdas ir jų panaudojimas

- (57) Referatas:

Išradimas skirtas medicinos sričiai, konkrečiai – citokinais indukuotų kimerinių ląstelių išgavimui iš periferinio kraujo arba kaulų čiulpų arba aferezės produkto, jų aktyvavimui, dauginimui ir panaudojimui imunoterapijoje, siekiant sunaikinti arba sumažinti onkologinį procesą ar jo metastazavimą, taip pat naikinti metastazes, užkertant kelią naujų navikinių darinių susiformavimui, pasitelkiant kimerines ląsteles ir jų produkuojamus imunologiškai aktyvius baltymus. Periferinis kraujas arba kraujo aferezatas arba kaulų čiulpų aspiratas yra separuojamas, išskiriant tik mononuklearinių ląstelių frakciją, ši frakcija yra išsėjama ląstelių auginimo terpėje ant specialaus bioreaktoriaus, kuriame auginama iki 17-20 parų. Auginant ląsteles reaktoriuje, matuojamas gliukozės suvartojimas, tai atspindi ląstelių augimo aktyvumą ir parodo laiką kada jau galima stabdyti gamybą ir rinkti ląsteles šaldymui ir tolesniam naudojimui. Terpė nupilama, surenkamos ląstelės, jos yra skaičiuojamos ir šaldomos dozėmis po 0,5-5,0 mlrd. ląstelių šaldymo terpėje su autologiniu paciento serumu.

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas skirtas medicinos sričiai, konkrečiai – citokinais indukuotų kilerinių ląstelių išgavimui iš periferinio kraujo arba kaulų čiulpų arba aferezės produkto, jų aktyvavimui, dauginimui ir panaudojimui imunoterapijoje, siekiant sunaikinti arba sumažinti onkologinį procesą ar jo metastazavimą, taip pat naikinti metastazes, užkertant kelią naujų navikinių darinių susiformavimui, pasitelkiant kilerines ląsteles ir jų produkuojamus imunologiškai aktyvius baltymus.

TECHNIKOS LYGIS

Prieš daugiau nei du dešimtmečius, įrodžius, kad imuninė sistema gali atpažinti ir eliminuoti vėžines ląsteles, didelis dėmesys skirtas imuninių ląstelių tyrimams, mėginant išsiaiškinti kokį poveikį jos turi vėžio genezei. Dabar jau yra žinoma, kad su vėžiu kovoja tiek įgimtas, tiek įgytas imunitetas [Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: An equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84: 988-93]. Nepaisant didelės kovojančių ląstelių įvairovės, vėžys, pasitelkdamas savo gynybinius mechanizmus, išvengia sunaikinimo [Dunn GP, Old LJ, and Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 2004a; 22: 329-60].

Dėl imuninės sistemos spaudimo, vėžys, norėdamas išlikti, įgyja savybių, mažinančių jo imunogeniškumą, ir (arba) slopina imuninės sistemos komponentus [Chen DS and Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013; 39: 1-10]. Pastebėjus, kad geresnę prognozę turi pacientai, kuriems dėl infekcijos buvo sužadinta imuninė sistema, pradėta taikyti imunoterapija [Cann SAH, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: A place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal* 2003; 79: 672-80], kurios tikslas yra aktyvinti imunines ląsteles ar tikslingai jas nukreipti į vėžinių ląstelių sunaikinimą.

Imunoterapija turi didelį pranašumą prieš tradicinius gydymo metodus, kadangi yra didesnio specifiškumo ir nesukelia sveikų ląstelių žūties [Eggermont LJ, Paulis LE, Tel J, Figdor CG. Towards efficient cancer immunotherapy: Advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends in Biotechnology* 2014; 32 (9): 456-65]. Vienas iš ląstelinės imunoterapijos komponentų yra natūralūs kileriai (NK). Tai ląstelinio imuniteto ląstelės, kurių funkcija yra tiek tiesiogiai, tiek per prisijungusias

signalines molekulės (antikūnai) atpažinti pakitusias savas ląsteles ir jas sunaikinti. Ši savybė gali būti pritaikoma kovoje su vėžiniais susirgimais. Kadangi vėžinė ląstelė yra ta pati nuosava ląstelė, tik su pasikeitusiais MHC I komplekso antigenais, NK ląstelės geba jas atskirti, identifikuoti ir sunaikinti [Kuby Immunology 8th edition 2019; ISBN-10: 1-4641-8978-1]. Pačios NK ląstelės nėra priskiriamos T ląstelių grupei. Natūralūs citotoksiškumo receptoriai tiesiogiai gali dalyvauti apoptozės proceso paleidime po to, kai prisijungia prie taip vadinamo FAS ligando, kuris parodo, kad ląstelė pakitusi (infekuota virusu ar vėžinė). MHC priklausomi receptoriai dalyvauja apoptozės proceso paleidime. NK ląstelė pati susireguliuoja, priklausomai nuo esamų ant ląstelės-taikinio signalų kiekio ir stiprumo, kaip jai elgtis: ar žudyti, ar ignoruoti ląstelę-taikinį [Terunuma H, Deng X, Dewan Z, Fujimoto S, Yamamoto N. Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *Int Rev Immunol.* 2008;27(3):93-110]. Todėl NK ląstelės elgsenoje yra svarbios aktyvacinės ir inhibitorinės molekulės, tokios kaip: Ly49, NCR, CD16 (aktyvacinės), ir inhibitorinės: KIR, CD94/NGK2, ILT arba LIR, Ly49 ir kt. [Iannello A, Debbeche O, Samarani S, Ahmad A. Antiviral NK cell responses in HIV infection: I. NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS. *J Leukoc Biol.* 2008 Jul;84(1):1-26. doi: 10.1189/jlb.0907650. Epub 2008 Apr 3].

Funkciškai NK ląstelės gali lizuoti savo taikinį per citolitinių granulių išskyrimą. Savo citoplazmoje NK ląstelės turi granules, kuriose yra uždarytos įvairios proteazės ir perforinai, žinomi kaip granzimai. Šios medžiagos paleistos į išorę gali lizuoti šalia esančias ląsteles arba sukelti šalia esančių ląstelių apoptozę. Lizės ir apoptozės sunaikinimo būdai taip pat yra svarbūs imunologiniu požiūriu, toliau priklausomai nuo vykstančio proceso pasijungia kitos imuninės sistemos ląstelės, tokios kaip neutrofilai, makrofagai [Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Nov;2(11):850-61]. Kitas būdas – atpažinti taikinį yra per prisijungusius antikūnus, ši savybė svarbi taikant NK ląsteles kartu su monokloniniais antikūnais, jų terapinis poveikis tokiu atveju gali tik sustiprėti. Prisijungusį antikūną NK ląstelės atpažįsta per CD16 receptorių, kurį pačios ir ekspresuoja. Šis receptorių, susijungęs su antikūno Fc galu, aktyvuoja NK ląsteles ir jos pradeda lizės procesą atpalaiduodamos granzimus. Taip pat NK ląstelės yra jautrios citokinams, tokios

molekulės kaip IL-12/15/18/2 ir CCL5 aktyvuoja NK ląsteles *in vivo* ir *in vitro*, taip pat interferonai – tiek gama, tiek alfa – aktyvuoja NK ląsteles priešvirusiniam atsakui. NK ląsteles pačios išskiria interferonus ir TNF alfa molekulę, kuri yra svarbi priešvėžinio imuniteto reguliacijoje. NK ląstelės pasižymi ir tikslia savas-svetimas reguliacija per MHC I atpažinimo mechanizmus. Jeigu ląstelė aptikta NK, ląstelės sekretuoja mažesnius nei įprasta MHC I kiekius, NK ląstelės tokias ląsteles sunaikina. Manoma, kad ši funkcija evoliucionavo iš būtinybės kompensuoti T limfocitų funkciją, kuriai sutrikus ar išsekus, nesant NK ląstelių, organizmas gali žūti, todėl NK ląstelės yra labai svarbi įgimto imuniteto dalis, užtikrinanti tvarkingą visų imuninių grandžių reguliaciją ir darbą. Jos yra neatsiejama imuninės sistemos dalis, taip pat jos pasižymi labai gera savybe, jog esant taikiniui ar pereinant į gynybinę funkciją jos nesekretuoja didelių kiekių biologiškai aktyvių citokinų, todėl taikant jas didelėmis terapinėmis dozėmis, tiek kaip padauginus natyvias ląsteles, tiek modifikuotas genetiškai, nebus sukeliamas citokinų atpalaidavimo sindromas, kas būdinga taikant T limfocitų terapijas ar CAR-T ląsteles. Todėl NK ląstelės yra labai patogus įrankis, kuriant genetiškai modifikuotų ląstelių gydymo metodus [vadovėlis: DOI 10.1007/s11523-017-0489-2]. NK ląstelės dažnai neturi tiksliai išreikšto antigeno receptoriaus ir yra dalis įgimto imuniteto, tai reiškia, kad jos gali labai greitai reaguoti į antigeną, be išankstinio apsimokymo prieš jį. Moksliniai duomenys rodo, jog ši savybė yra labai svarbi vėžio išgyvenamumo ir sunaikinimo balanse. Jos gali greitai aptikti pakitusias ląsteles ir jas sunaikinti be išankstinio žinojimo kas jose pakito. Nes, pavyzdžiui, T ląstelėms, kad atpažintų ir reaguotų į taikinį, yra būtina prieš tai būti su juo susidūrus [Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011 Jan 7;331(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687]. Tuo atveju jeigu vėžinė ląstelė nesukelia uždegimo, tai T ląstelės jos neatpažins ir eigoje vystysis vėžinis susirgimas, NK ląstelės šioje grandyje gali pradėti elgtis kaip imunosupresoriai, nes nėra aktyvacijos signalo, tylint T ir kitoms imuninės sistemos ląstelėms (makrofagai, dendritinės, neutrofilai), tačiau pačios NK ląstelės turi ne tik bendrus receptorius citokinams ir įvairioms signalinėms molekulėms, užkuriančioms arba supresuojančioms imuninę funkciją, jos turi alternatyvius receptorius, kurie yra specifiniai vėžinių ląstelių lizei (NKG2D, NKp44, NKp46, NKp30 ir DNAM). Būtent per juos NK ląstelės geba tiesiogiai dalyvauti vėžinio proceso kontrolėje. Jos taip pat sąveikauja su dendritinėmis ląstelėmis, formuodamos kompleksinį imuninį atsaką

[Vadovėlis: doi:10.5772/intechopen.78804, Terunuma H, Deng X, Dewan Z, Fujimoto S, Yamamoto N. Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *Int Rev Immunol*. 2008;27(3):93-110. doi: 10.1080/08830180801911743]. Šią funkciją labai svarbu paminėti, turint omenyje mūsų išradime minimą produktą kaip dendritinėmis ląstelėmis praimuotos NK ląstelės. Šios ląstelės yra praėjusios apmokymo etapus *in vitro* ir gali būti taip, jog jų suleidimas pacientui bus naudingas ūmia reakcija į jo vėžines ląsteles, tačiau šiuo atveju visada išlieka nepataikymo tikimybė, todėl praimuotos NK ląstelės nėra išskiriamos į atskirą produktą, geriausiai yra taikyti mišrią technologiją, tuo metu šansai paveikti naviką tiesiog yra padidinami.

Nepaisant didelės pažangos moksle, naujų vaistų sukūrimo ir naviko biologijos pažinime, vėžys vis dar išlieka viena iš pagrindinių mirties priežasčių ne tik tarp besivystančių, bet ir išsivysčiusiose šalyse. Šiuo metu svarbiausi vėžio gydymo metodai yra trys: chirurgija (naviko pašalinimas), chemoterapija (vaistų vartojimas) ir radioterapija (spindulinis gydymas). Kiekvienas būdas turi apribojimų ar pašalinių poveikių, pvz.: chirurginis gydymas gali būti taikomas, tik šalinant kietą, apčiuopiamą naviką, o problemų kyla dėl nepašalintų pradinio naviko liekanų ar metastazių. Chemoterapija yra grįsta sparčiai besidalijančių ląstelių naikinimu įvairiais citostatikais, tačiau organizme greitai proliferuoja ne tik vėžinės ląstelės, bet ir plaukų folikulų, žarnyno epitelio, kaulų čiulpų ląstelės ir kt. [Aly HAA. Cancer therapy and vaccination. *Journal of Immunological Methods* 2012; 382: 1-23]. Imuninės sistemos ląstelės, pvz.: makrofagai, gali slopinti chemoterapijos efektyvumą priklausomai nuo naviko rūšies. Vienas pirmųjų tyrimų, siekiant išsiaiškinti makrofagų įtaką chemoterapijai, parodė, kad vėžio gydymui skiriamas preparatas doksorubicinas pelėse, susargdintose leukemija ar limfoma, sustiprina priešvėžinį makrofagų poveikį. Kitas pavyzdys yra B ląstelės, kurios netiesiogiai skatina ortotopinės epitelinio audinio karcinomos progresavimą. Chemoterapija, neinhibuojant B ląstelių, yra neveiksminga. Tik kartu su anti-CD20 antikūnais, vaistas paklitakselis yra veiksmingas prieš šios rūšies vėžį [Coffelt SB and de Visser KE. Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. *Trends in Immunology* 2015; 36 (4): 198-216].

Norint pasiekti geresnių rezultatų, yra taikomas kombinuotas kelių metodų gydymas. Gydymas tradiciniais chemoterapijos metodais yra kenksmingas, kadangi

yra pažeidžiamos ir sveikos ląstelės, todėl tikimasi didelių pasiekimų, pradėjus plačiai taikyti imunoterapiją, specifiskai nukreiptą prieš vėžines ląsteles. Imunoterapija – vėžio gydymo metodas, kuomet imuninės sistemos komponentai yra aktyviai arba pasyviai suaktyvinami ir nukreipiami piktybinių ląstelių sunaikinimui. Dėl didesnio specifiskumo yra išvengiama pašalinių poveikių, kuriuos sukelia įprasti gydymo metodai [Eggermont LJ, Paulis LE, Tel J, Figdor CG. Towards efficient cancer immunotherapy: Advances in developing artificial antigen-presenting cells. Trends in Biotechnology 2014; 32 (9): 456-65].

Pirmosios imunoterapijos užuomazgos siekia XIX a. pabaigą, kai W. Coley pastebėjo, kad pacientas, pasiekęs visišką naviko remisiją, prieš tai persirgo ūmia streptokokų sukelta infekcija. Vėliau, sukūręs vakciną iš negyvų *Streptococcus pyogenes* ir *Serratia marcescens* bakterijų, pradėjo gydyti neoperuotinu vėžiu (dažniausiai sarkoma) sergančius žmones. Vakcinos paskirtis buvo sužadinti imuninę sistemą [Cann SAH, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: A place in history or in the future. Postgraduate Medical Journal 2003; 79: 672-80; Parish CR. Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. Immunology and Cell Biology 2003; 81: 106-13]. Maždaug tuo pat metu R. Pearl pranešė, kad tuberkuliozė turi priešvėžinį poveikį, todėl sugalvota vėžio gydymui panaudoti vakciną, taikomą tuberkuliozės gydymui – BCG (baccille Calmette-Guérin). BCG vakcina šiuo metu yra vienintelė bakterinės kilmės vakcina, taikoma imunoterapijoje neinvazinio šlapimo pūslės vėžio gydyme [Mayer G. Immunology – chapter one: innate (non-specific) immunity. Microbiology and Immunology On-Line Textbook. University of South Carolina School of Medicine. <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/innate.htm> [cituota 2015 05 01].; Cann SAH, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: A place in history or in the future. Postgraduate Medical Journal 2003; 79: 672-80]. Plaučių vėžio imunoterapijoje BCG yra taikoma tik kaip adjuvantas imuninės sistemos stimuliavimui [Raez LE, Fein S, Podack ER. Lung Cancer Immunotherapy. Clinical Medicine & Research 2005; 3 (4): 221-8].

Antigenų, susijusių su naviku (TAA), atradimas paskatino specifinės imunoterapijos vystymą [Parish CR. Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. Immunology and Cell Biology 2003; 81: 106-13; Wayteck L, Breckpot K, Demeester J, De Smedt SC, Raemdonck K. A personalized view on cancer

immunotherapy. *Cancer Letters* 2014; 352: 113-25], kurios tikslas yra sužadinti imuninės sistemos atsaką į naviką [Bluestone JA, Small EJ. The future of cancer treatment: Will it include immunotherapy? *Cancer Cell* 2012; 22: 7-8], žinant, kad efektyvus imuninis atsakas neišsivysto dėl sumažėjusio imuninių ląstelių atpažinimo, silpno naviko imunogeniškumo ir imunosupresinės naviko aplinkos [Kumar S and Mason M. Principles of cancer treatment by immunotherapy. *Surgery* 2012; 30 (4): 198-202].

Pagal veikimą naviko imunoterapija yra skirstoma į pasyviąją ir aktyviąją. Pasyvioji imunoterapija apima visas imunologiškai aktyvias medžiagas, imunomoduliuojančias ląsteles ir nepriklauso nuo paties paciento imuninės sistemos funkcionavimo, kadangi jam yra pateikiamos ląstelės, pasižyminčios priešvėžiniu poveikiu [Aly HAA. Cancer therapy and vaccination. *Journal of Immunological Methods* 2012; 382: 1-23]. Toliau pasyviąją imunoterapiją galima smulkiau suskirstyti į terapiją monokloniniais antikūnais, stimuliuojančiais citokinais ir adoptyviomis T ląstelėmis [Wayteck L, Breckpot K, Demeester J, De Smedt SC, Raemdonck K. A personalized view on cancer immunotherapy. *Cancer Letters* 2014; 352: 113-25]. Pagal kito šaltinio skirstymą prie pasyviosios imunoterapijos dar yra priskiriama kaulų čiulpų transplantacija [Zavala VA and Kalergis AM. New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. *Immunology* 2015].

Aktyviajai imunoterapijai yra būtina tinkamai funkcionuojanti paciento imuninė sistema, kadangi gydymo metu kovai su vėžinėmis ląstelėmis yra sužadinami recipiento imuniniai mechanizmai. Aktyviajai imunoterapijai yra priskiriamos įvairios vakcinos: BCG, peptidinės, DNR, dendritinių ląstelių ir kt., kurios turėtų būti kiek galima mažiau toksiškos organizmui, galėtų sukelti priešvėžinį imuninį atsaką ne tik prieš pirminį naviką, bet ir prieš metastazes, kurių poveikyje susidarytų imuninė atmintis, apsauganti nuo ligos atsinaujinimo [Moingeon P. Cancer vaccines. *Vaccine* 2001; 19: 1305-26.; Yannelli JR and Wroblewski JM. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 2004; 23: 97-113].

TRUMPAS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Citokinais indukuotų ląstelių dauginimas yra globali problema, šios ląstelės labai priklauso nuo donoro, jo esamos būklės, taikytų ankstesnių gydymo schemų ir kitų neapibrėžtų / nežinomų parametrų. Mūsų sukurtas ląstelių dauginimo metodas yra išskirtinis tuo, kad gaunamas ganėtinai stabilus ląstelių skaičius preparate su

dideliu NK ląstelių kiekiu jame. Taip pat ląstelių gamybai naudojamas unikalus mišinys aktyvuojančių molekulių, išlaikomas specifinis aktyvacijos periodas ir proliferacijos periodas, skirtas ląstelių kryptingam dalinimuisi ir brendimui.

Periferinis kraujas arba kraujo aferezatas arba kaulų čiulpų aspiratas yra separuojamas, išskiriant tik mononuklearinių ląstelių frakciją, ši frakcija yra išsėjama ląstelių auginimo terpėje ant specialaus bioreaktoriaus arba flakono, kuriame auginama iki 17-20 parų. Auginant ląsteles reaktoriuje, matuojamas gliukozės suvartojimas, tai atspindi ląstelių augimo aktyvumą ir parodo laiką kada jau galima stabdyti gamybą ir rinkti ląsteles šaldymui ir tolesniam naudojimui. Terpė nupilama, surenkamos ląstelės, jos yra skaičiuojamos ir šaldomos dozėmis po 0,5-5,0 mlrd. ląstelių šaldymo terpėje su autologiniu paciento serumu. Atliekamas sterilumo tyrimas ir kiti privalomi tyrimai.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

I. Mononuklearinių ląstelių išskyrimas iš kraujo, aferezato, kaulų čiulpų aspirato

Kraujas skiedžiamas hidroetilkrakmolo tirpalu, skirtu infuzijoms kaip plazmos pakaitalas, skiedžiama santykiu 1:1. Sumaišytas tirpalas paliekamas nusistovėti kambario temperatūroje 20-40 min., per tiek laiko paprastai išsiskiria du sluoksniai: apatinis, turtingas eritrocitais, ir viršutinis, kuriame yra eritrocitų, plazmos bei branduolinių kraujo elementų. Viršutinis sluoksnis yra surenkamas į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojamas prie 1000-1500 G 5-15 min. kambario temperatūroje, po centrifugavimo supernatantas yra nupilamas, o nuosėdos suspenduojamos druskos tirpale arba likusiame viršutiniame kraujo / hidroksietilkrakmolo tirpalo mišinyje. Paprastai, esant 50-300 ml kraujo, centrifugatas yra skiedžiamas iki 40 ml baigtinio tūrio. Jeigu kraujo yra daugiau, atitinkamai proporcingai yra skiedžiamas ir centrifugatas. Tuomet į 15 arba 50 ml mėgintuvėlius yra pripilama fikolo arba perkolo tirpalo, kurio tankis yra nuo 1,0 iki 1,12 g/ml. Tirpalo pilama ne daugiau kaip 1/3 mėgintuvėlio tūrio. Ant šio tirpalo pipete iš lėto, palenkus mėgintuvėlį, kuo gulsčiau atsargiai pilamas skiestas ląstelių centrifugatas iki mėgintuvėlio viršaus. Mėgintuvėliai centrifuguojami prie 1100-1500 G 10-20 min. kambario temperatūroje, stabdis nenaudojamas. Po centrifugavimo mėgintuvėliuose matomos trys frakcijos: apačioje – eritrocitų frakcija, virš eritrocitų – mononukleary sluoksnis, plaukiojantis aukščiau fikolo skaidraus sluoksnio, virš mononukleary

skluoksnio – trombocitai kartu su praskiesta hidroksietilkrakmolu plazma. Pipete atsargiai yra surenkamas mononukleary skluoksnis ir supilamas į naujus mėgintuvėlius, kuriuose yra įpilta druskos tirpalo arba ląstelių auginimo terpės. Vyksta ląstelių plovimo nuo gradiento medžiagos (fikolo arba perkolo) etapas. Ląstelės gerai išmaišomos ir centrifuguojamos prie 500-850 G 10-20 min. kambario temperatūroje. Stabdis nenaudojamas. Procedūra gali būti kartojama kelis kartus. Po plovimo ląstelės suskaičiuojamos ir išsėjamos į ląstelių auginimo reaktorių (tūris 1L) arba flakonus (175 cm² ploto), tokiu santykiu: 20-100 milijonų ląstelių ir 100 ml indukuojamosios terpės, skirtos NK ląstelėms, T limfocitams arba dendritinėms ląstelėms auginti su papildomais priedais, kurie gali būti anti CD3 ir (arba) antiCD28 ir (arba) antiCD127 ir (arba) antiCD335 molekulė, bei interferonais, tokie kaip interferonas alfa ir (arba) interferonas gamma, įskaitant visus jų pogrupius. Bioreaktoriai / flakonai yra inkubuojami ląstelių kultūroms skirtuose inkubatoriuose 37 °C temperatūroje ir 5-15 % CO₂ aplinkoje 12-24 valandas. Po inkubacijos, jeigu auginama bioreaktoriuje, pridedama proliferacinės terpės, kurioje yra citokinai, tokie kaip IL-2 ir (arba) IL-15 ir (arba) IL-18. Jeigu dirbama su flakonais, proliferaciją skatinantys citokinai dedami tiesiai į terpę, papildant ją auginimo terpe 25 % nuo viso terpės tūrio. Ląstelės auginamos iki 17-20 parų, stebimas gliukozės ir (arba) laktato kiekis. Auginant flakonuose, terpė keičiama nauja, papildant ją tiek aktyvacinėmis, tiek proliferaciją aktyvuojančiomis molekulėmis. Terpės keičiamas kiekis nusprendžiamas pagal metabolitų suvartojimą / atsiradimą (gliukozė / laktatas). Auginant flakonuose, ląstelės resuspenduojamos pipete (išvengiant didelių ląstelių agregatų). Auginant bioreaktoriuje, matuojami tik metabolitai, ir vizualiai stebimas ląstelių augimas ant reaktoriaus pagrindo. Kuomet gliukozės ar laktato koncentracijos pasiekia kritines ribas (12-13±2 mmol), auginimas yra stabdomas ir ląstelės yra renkamos bei šaldomos. Gaminant praimuotas NK ląsteles, 5-7 auginimo dienoje į ląstelių kultūrą įpilamas 1-10 mln. Autologinių / alogeninių su specifiniu antigenu brandintų denritinių ląstelių. Toliau auginimas nesikeičia. Ląstelės šaldomos koncentracijoje nuo 0,5-5,0 mlrd. Ląstelių / 25 ml terpės skirtos šaldymui. Šaldymo terpė sudaryta iš 10 % DMSO (dimetilsulfoksidas) autologinio paciento serumo arba plazmos. DMSO niekada nėra įmaišomas kaip grynas tirpalas į ląstelių suspensiją, jis maišomas tik praskiestas su serumu. Tirpalai, maišant su DMSO kaista, todėl visi tirpalai atšaldomi, prieš pradedant ląstelių šaldymo procedūrą. Su šaldymo terpe sumaišytos ląstelės yra išpilstomos į šaldymo mėgintuvėlius, kurie dedami į šaldymo

dėžutę arba šaldymo įrenginį ir šaldomi pagal standartinį protokolą $-1\text{ }^{\circ}\text{C/min.}$, patalpinant juos į $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrą porai valandų. Užšaldytas preparatas yra saugomas iki jo sunaudojimo $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ arba $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Iš specialiai atskirai surinkto mėginio yra atliekami būtini ląstelių kokybinių parametrų tyrimai (bakterinės, grybelinės infekcijos, paviršiaus žymenys (CD3/16/56/8/4/69 gali būti pildoma pagal mokslinį progresą), gyvybingumo analizė, endotoksinų ir mikoplazmos tyrimas).

II. CIK atšildymas ir suleidimas

Užšaldytas mėgintuvėlis / maišelis ištraukiamas iš šaldymo vietos ir nedelsiant yra patalpinamas į indą su šiltu $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandeniu. Atšildoma iki kol ledas visiškai ištirps ir pripilamas toks pats tūris fiziologinio skysčio arba autologinio serumo, jeigu yra vietos maišelyje, jeigu maišelis yra 25 ml, tai lašinama tiesiai iš maišelio į veną, likus 5-10 % tūrio į maišelį steriliai pripilama dar 20 ml fiziologinio skysčio, preparatas toliau sulašinamas kol maišelyje neliks skysčio. Lašinama intraveniškai 5 ml/min greičiu. Stebima paciento būseną, pasireiškus galvos skausmams ar pykinimui, lašinimo greitis sumažinamas iki 2 ml/min. Neigiamos reakcijos į CIK preparato taikymą pasireiškia retai, dažniausiai tai būna aukšta temperatūra, galvos skausmas, kas praeina be papildomo vaistinio įsikišimo per 30-45 minutes. Esant labai aukštai temperatūrai, reikia naudoti acetaminofeną (500 mg tab. *per os*) iškart po lašinimo, jeigu tai pirmas kartas, jeigu antras kartas – tai 30 minučių iki lašinimo. Lašinama per sistemą su tinkleliu ir ne plonesne nei 23 G adata.

CIK taikymo indikacijos ir gydymo pavyzdžiai

Indikacijos procedūrai atlikti:

Karcinomų, sarkomų ir kraujo vėžių (skystųjų navikų) 1-os, 2-os, 3-ios, 4-os stadijų onkologiniai susirgimai.

Ligoniams taikyto gydymo CIK ląstelėmis pavyzdžiai ir jų rezultatai:

Ligonė A.A. IV stadijos metastazuojanti kolorektalinė karcinoma, taikomas gydymas chemoterapija, tirozinkinazės inhibitoriais, paciento išgyvenamumo prognozė – 2-3 mėn. Taikytas gydymas autologinėmis CIK ląstelėmis nuo 2018 metų. Atlikti 7 CIK kursai po 1,0 mlrd. Ląstelių i.v. CIK taikoma tarpuose tarp

chemoterapijų. Pacientas yra stabilioje būsenoje, liga neprogresuoja, dingo ascitas, būklė gera.

Ligonė R.P., 2014 m. diagnozuotas krūties vėžys, taikytas chirurginis gydymas, chemoterapija, 2017 metais navikas metastazavo į plaučius ir kepenis, 2018 į smegenis, prognozė bloga, navikai operuoti kur chirurgiškai įmanoma, 2018 metais pradėtas taikyti imunoterapinis gydymas CIK preparatu. Suleista iki 2019 metų balandžio mėnesio 8 CIK kursai po 1,0 mlrd. ląstelių i.v. Šiai dienai pacientė stabili, liga neprogresuoja, vėžio žymenys "tyli", būklė gera.

Ligonė R.R., 2011 metais diagnozuota sarkoma, plitimas labai greitas, auglys išplito į kaulus, kepenis, plaučius, gydymas chemoterapija, radioterapija ligą sulaikė, 2017 prasidėjo aktyvus ligos progresas. Nuo 2018 metų taikyta CIK terapija. 8 kursai po 1,0 mlrd. ląstelių i.v., ligos progresavimas apstojo, metastazės plaučiuose kalcifikavosi, progresavimas visur liovėsi, išskyrus dubens kaulo vieną metastazę, kitos metastazės pradėjo nykti, stebimi daugybiniai uždegiminiai procesai metastazėse. 2019 metų balandžio mėnesį liga laikoma stabilia, paciento būklė gera.

Ligonis V.S., 2018 metais diagnozuota skrandžio karcinoma G3, IV stadija, metastazės pilvaplėvėje. Taikyta operacinis gydymas ir chemoterapija, tarpuose CIK imunoterapija. Atlikti 9 CIK kursai po 1,0-1,5 mlrd. ląstelių i.v. Pacientas 2019 metų balandžio mėnesiui yra stabilus, metastazių plitimas ir naujų atsiradimas nestebimas, pilvaplėvės metastazės nyksta.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Citokinais indukuotų / aktyvuotų ląstelių (CIK) gavimo iš periferinio kraujo, aferezės produkto ar kaulų čiulpų aspirato būdas, apimantis NK (natūralių kilių) ląstelių išgavimą ir brandinimą, besiskiriantis tuo, kad:

a) išskiriama tik mononuklearinių ląstelių frakcija, separuojant periferinį kraują arba kraujo aferezatą arba kaulų čiulpų aspiratą,

b) ši frakcija išsėjama ląstelių auginimo terpėje į bioreaktorių arba ląstelių kultūrų flakonus ir inkubuojama parą aktyvacinėje terpėje,

c) po inkubacijos bioreaktoriai arba flakonai užpilami proliferacine terpe ir kultivuojami iki 20 parų,

d) po 5-7 parų ląstelės praimuojamos dendritinėmis paciento ląstelėmis tikslesniam taikinio identifikavimui,

e) baigus auginimą, ląstelės praplaunamos ir užšaldomos naudojimui paruoštomis dozėmis šaldymo terpėje su autologiniu paciento serumu,

f) prieš naudojimą, užšaldytas maišelis / mėgintuvėlis patalpinamas į indą su šiltu +37 °C temperatūros vandeniu, atšildomas iki ledo visiškai ištirps ir pripilamas toks pats tūris fiziologinio skysčio arba autologinio serumo.

2. Būdas pagal 1 punkto stadiją a), besiskiriantis tuo, kad

- praskiedžia kraują hidroetilkrakmolo tirpalu santykiu 1:1 ir palieka nusistovėti kambario temperatūroje 20-40 min., kol išsiskiria du sluoksniai: apatinis, turtingas eritrocitais, ir viršutinis, kuriame yra eritrocitų, plazmos bei branduolinių kraujo elementų;

- viršutinį sluoksnį surenka į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguoja prie 1000-1500 g pagreičiu 5-15 min. kambario temperatūroje, po centrifugavimo susidariusį supernatantą nupila, o nuosėdas suspenduoja druskos tirpale arba likusiame viršutiniame kraujo / idroksietilkrakmolo tirpalo mišinyje, 50-300 ml kraujo praskiedžiant iki 40 ml tūrio;

- į 15 ml arba 50 ml tūrio mėgintuvėlius pripila fikolo arba perkolo tirpalo, kurio tankis yra 1,0-1,12 g/ml, tirpalo pilama ne daugiau kaip 1/3 mėgintuvėlio tūrio;

- ant šio tirpalo pipete iš lėto, palenkus mėgintuvėlį, kuo gulsčiau pila skiestą

ląstelių centrifugatą iki mėgintuvėlio viršaus;

- mėgintuvėlius centrifuguoja 1100-1500 g pagreičiu 10-20 min. kambario temperatūroje, nenaudojant stabdžio;

- atsargiai pipete surenka mononuklearų sluoksnį, po centrifugavimo susidariusį tarp apatinio eritrocitų sluoksnio ir viršutinio trombocitų sluoksnio, ir supila į naujus mėgintuvėlius, kuriuose yra įpilta druskos tirpalo arba ląstelių auginimo terpės;

- praplauna ląsteles nuo gradiento medžiagos, gerai išmaišo ir centrifuguoja prie 500-850 g pagreičiu 10-20 min. kambario temperatūroje, nenaudojant stabdžio;

- procedūrą, reikalui esant, kartoja kelis kartus.

3. Būdas pagal 1 punkto stadiją b), besiskiriantis tuo, kad

- praplautas ląsteles suskaičiuoja ir išsėja į bioreaktorių arba ląstelių auginimo flakonus santykiu 100 000-500 000 ląstelių/cm² ir užpila 100 ml terpe, skirta auginti T limfocitus;

- flakonus inkubuoja ląstelių kultūroms skirtuose inkubatoriuose 37 °C temperatūroje ir 5-15 % CO₂ aplinkoje 24 valandas su aktyvacine terpe.

4. Būdas pagal 1 punkto stadiją c), besiskiriantis tuo, kad

po inkubacijos su aktyvacine terpe bioreaktoriai / flakonai užpilami proliferacine terpe ir auginami iki 20 parų.

5. Būdas pagal 1 punkto stadiją d), besiskiriantis tuo, kad

praimuojant ląsteles, 5-7 parą ląstelės gali būti papildomai aktyvuojamos su autologinėmis dendritinėmis ląstelėmis, įpilant į flakoną ar bioreaktorių 1-10 mln. subrandintų dendritinių ląstelių.

6. Būdas pagal 1 punkto stadiją e), besiskiriantis tuo, kad

- surenka terpę į mėgintuvėlius, ant flakonų užpila PBS tirpalo ir atplauna ląsteles;

ląsteles surenka, flakonus praskalauja du kartus PBS arba druskos tirpalu, viską surenka į mėgintuvėlius ir centrifuguoja 450-800 g pagreičiu 10 min. +4 °C temperatūroje;

- išcentrifuguotas ląsteles suskaičiuoja ir užšaldo naudojimui paruoštomis

dozėmis po 0,5-5,0 mlrd. ląstelių / 25 ml šaldymo terpės, sudarytos iš 10 % DMSO (dimetilsulfoksido) autologinio paciento serumo arba plazmos;

- ląsteles, sumaišytas su šaldymo terpe, išpilsto į šaldymo mėgintuvėlius / maišelius, kurie dedami į šaldymo dėžutę ir šaldomi porą valandų $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ greičiu.

7. CIK ląstelės, gautos būdu pagal 1-6 punktus, skirtos panaudoti imunoterapijoje karcinomų, sarkomų ir kraujo vėžių (skystųjų navikų) 1-os, 2-os, 3-ios, 4-tos stadijų onkologinių susirgimų gydymui.