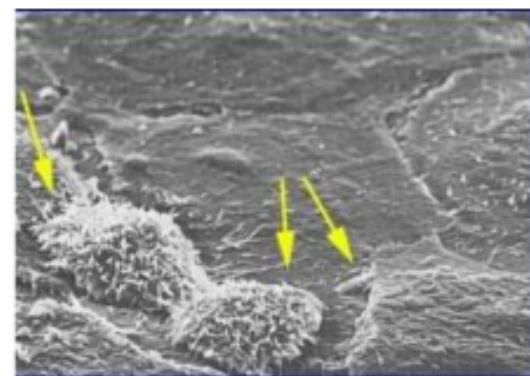
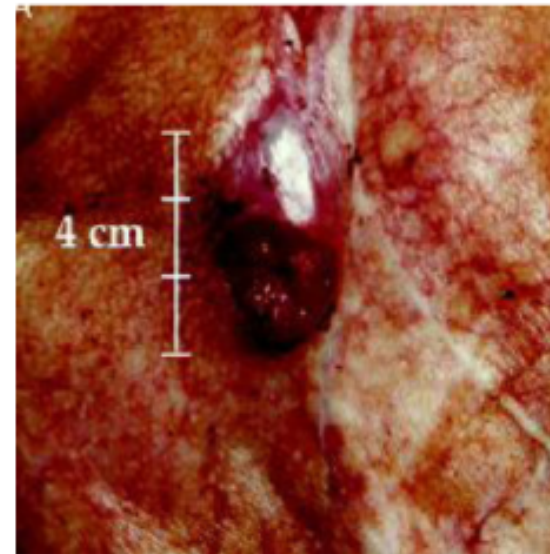


Доклиническое исследование и ограниченные
клинические испытания безопасности препарата
мутантного аденовируса "Канцеролизин".

Перспективные подходы к
усилению эффективности онколитических вирусов



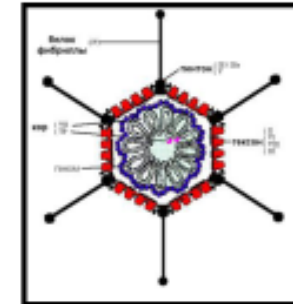
- Клетки многих типов злокачественных новообразований человека (примерно 50%) являются дефектными по гену белка p53.
- Не функциональность p53 ассоциируется с повышенной устойчивостью к химио- и радиотерапии.
- Проблема поиска эффективных средств для терапии p53-дефектных опухолей чрезвычайно актуальна.



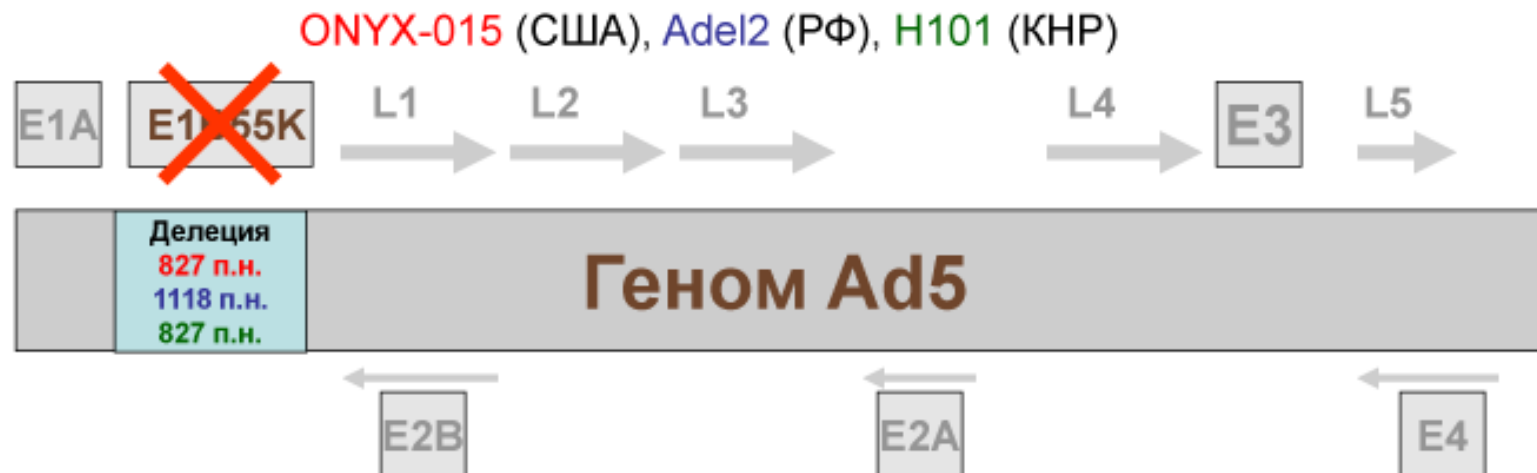
A431 – p53-дефектные клетки
эпидермальной карциномы человека

Аденовирус человека 5-го серотипа

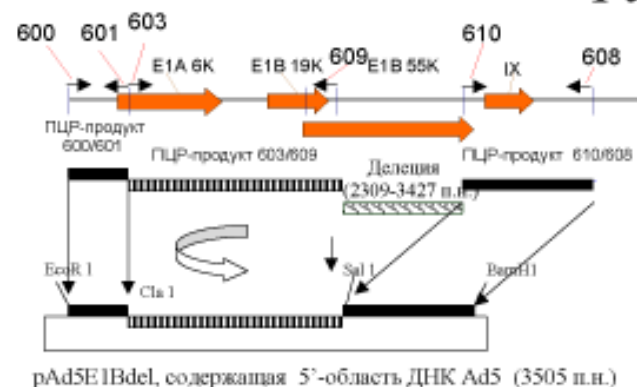
Семейство - Adenoviridae Род – Mastadenovirus



- Аденовирусы кодируют белки, которые связывают и инактивируют клеточный p53, что позволяет вирусу эффективно реплицироваться.
- Дикий тип аденовируса продуцирующий эти белки может успешно реплицироваться и лизировать широкий спектр клеток человека, как с нормальным, так и с дефектным p53.
- Аденовирусные мутанты дефектные по генам кодирующим эти белки должны быть ограничены в репликации в нормальных клетках, но сохранять способность к эффективной репликации в p53-дефектных опухолевых клетках.



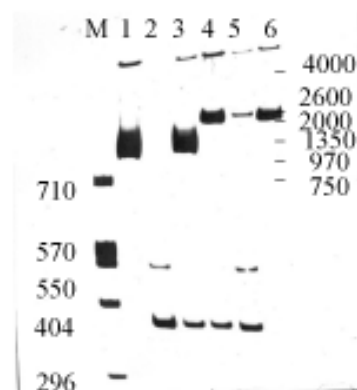
Конструирование мутантного дефектного по гену белка E1B55K аденовируса



рAd5E1Bdel, содержащая 5'-область ДНК Ad5 (3505 п.н.)

Гомологическая рекомбинация между Ad5 ДНК-Cla I и
плазмидой рAd5E1Bdel-EcoR I

**Конструирование мутанта Adel2 аденовируса 5-го
серотипа с делецией в гене E1B 55K**



ПЦР-анализ ДНК Adel2.

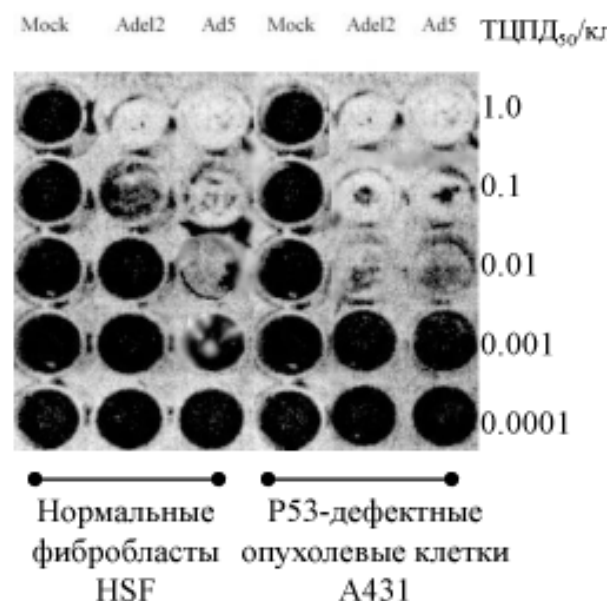
В качестве матрицы использовали: 1- плазмидную рAd5E1Bdel
ДНК, 2- ДНК контрольных клеток, 3- ДНК мутанта Adel2, 4,5,6- ДНК дикого
типа Ad5, М-маркер.

Цитолитическое действие мутантного дефектного по гену белка E1B55K аденовируса Adel2 и аденовируса дикого типа на опухолевые p53-дефектные и нормальные клетки человека.

Вирус	Титр(ТЦПД ₅₀ /мл)					
	293	SW480	A431	HEp2	HSF	HSEF
Ad5	2.0x10 ⁹	3.0x10 ⁸	3.0x10 ⁵	5.0x10 ⁸	9.5x10 ⁵	5.0x10 ⁶
Adel2	2.0x10 ⁹	2.5x10 ⁸	1.5x10 ⁵	4.0x10 ⁸	1.0x10 ⁴	1.5x10 ⁵
Adel3	2.0x10 ⁹	5.0x10 ²	<10	2.5x10 ²	<10	70

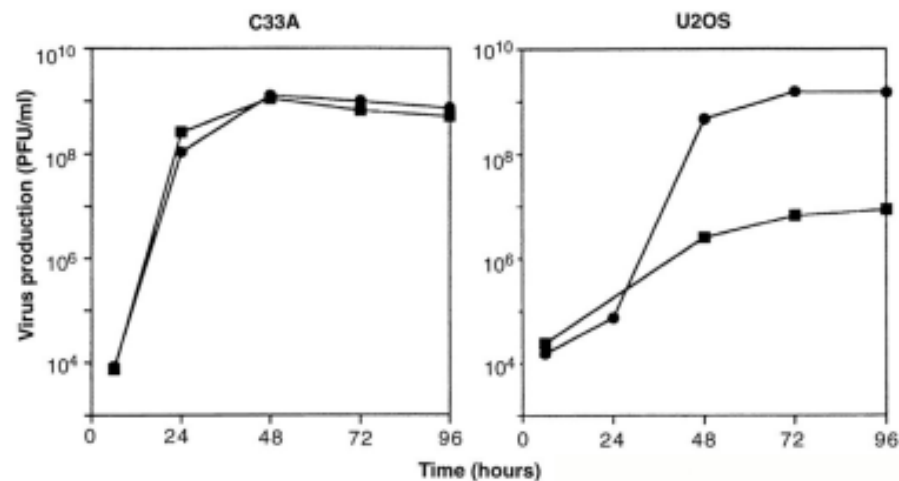
Примечание:

Перед проведением опыта вирусные препараты оттитровали на клетках 293 и привели к одному титру 2.0x10⁹ ТЦПД₅₀/мл. Монослои p53-дефектных опухолевых (SW480, A431 и HEp2) и нормальных (HSF и HSEF) клеток (96-луночные микропланшеты) инфицировали стандартными 10-кратными разведениями вирусов. Инфекционный титр выражали через ТЦПД₅₀/мл.



ONYX-015 (dl1520) *in vitro*

A

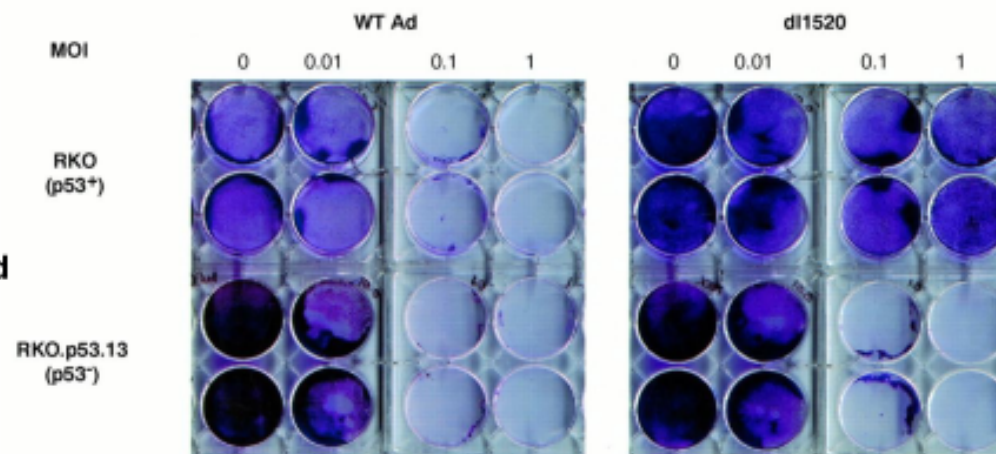


Эффективность репликации
dl1520 (■) и дикого типа аденовируса
(WT Ad) (●) in p53- и p53+ клетках.

C33A (карцинома шейки матки, p53-)
U2OS (остеосаркома, p53+)

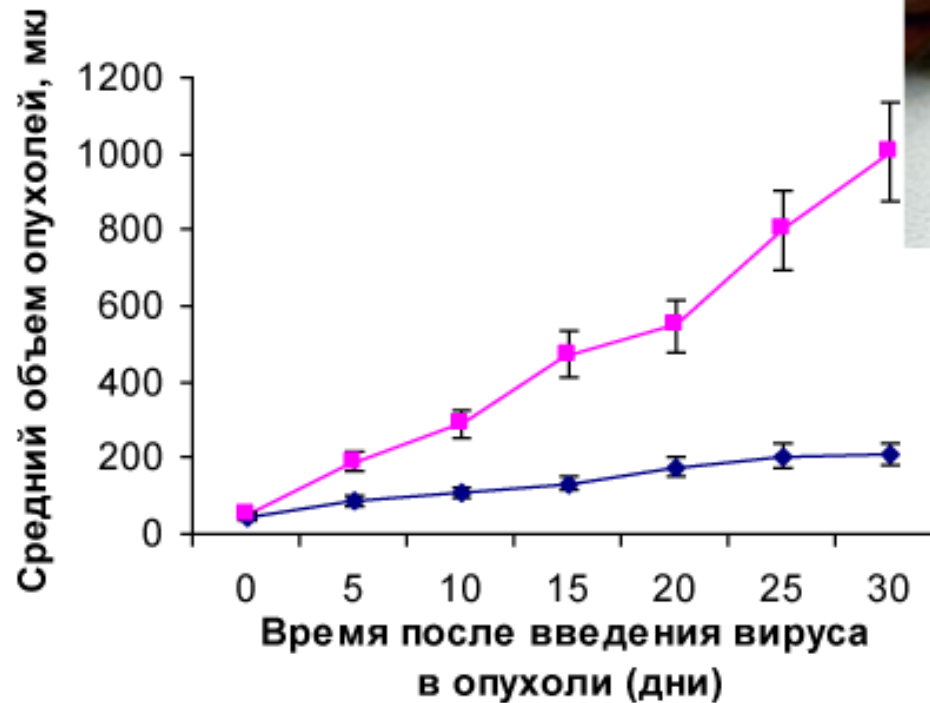
Литический эффект dl1520 и WT Ad
на RKO и RKO.p53.13 клетки.

RKO –карцинома толстой кишки



J R Bischoff et al. Science 1996;274:373-376

Противоопухолевая активность Adel2 *in vivo*.



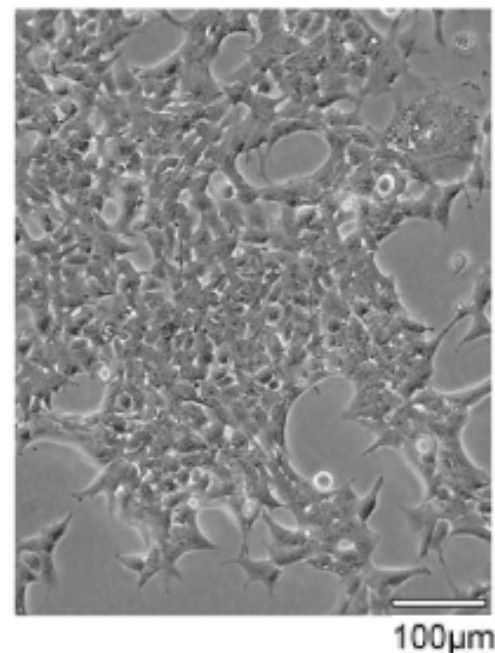
A431- клетки эпидермоидной карциномы человека (10^7 клеток в 150 μ l DMEM) инъецировали подкожно в боковую поверхность бестимусных nu/nu мышей. В опухоли, достигшие объема 40-60 мкл ($n=5$), вводили 10^9 ТЦПД₅₀ Adel2 в 20 мкл фосфатно-солевого буфера ежедневно в течение 5 дней (◆). В контрольные опухоли ($n=5$) по той же схеме вводили инактивированный ультрафиолетовым излучением Adel2 (■).

Нормативные документы регламентирующие проведение доклинических исследований МИБП

- СП 3.3.2.561-96. 3.3.2. Медицинские иммунобиологические препараты. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарные правила
- Методические указания «Аттестация перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов».-РД-42-28-10-89.-МЗ СССР.-М.-1989 г.
- Методические указания «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения». РД42-28-8-89.-МЗ СССР.-М.-1989 г.
- Методические указания «Медицинские иммунобиологические препараты. Основные термины и определения» РД 42-28-24-88.
- Правила лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003)
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ Минздрава РФ. М., 2005 г.

Аттестация культуры клеток НЕК 293

Культура клеток НЕК 293 получена в результате искусственной иммортализации посредством трансформации генами E1A и E1B аденовируса человека 5-го серотипа диплоидной культуры клеток почки эмбриона человека (Graham FL, et al. 1977). Данная клеточная культура являющаяся высокопродуктивной в отношении аденовирусной инфекции широко используется за рубежом для получения и производственного культивирования дефектных по ранним генам рекомбинантных вариантов аденовирусов и сконструированных на их основе аденовирусных векторов. Культура клеток НЕК 293 представляет собой наиболее оптимальный субстрат для культивирования дефектного по гену E1B55K мутантного штамма Adel2, так как экспрессия аденовирусного гена E1B клетками будет обеспечивать условия для его полноценной репликации с высокой урожайностью.



Аттестация культуры клеток НЕК 293

- Применение перевиваемых клеточных линий для производства медицинских иммунобиологических препаратов основано на системе посевных клеток. Создан посевной банк клеток НЕК 293 на уровне 15-го пассажа в количестве 240 ампул. На основе посевного банка был получен рабочий банк на 17-ом пассаже, состоящий из 241 ампулы. Количество клеток в ампуле составляло $6,0 \times 10^6$. При восстановлении после криоконсервации в среднем до 85% клеток оставались жизнеспособными.
- Установлено, что клетки НЕК 293 посевного и рабочего банков имеют кариотип, свойственный донору линии, длительное культивирование клеток в течение 20 последовательных пассажей не влияет на частоту встречаемости полиплоидов.
- С использованием микробиологических, вирусологических и молекулярно-биологических методов показано, что клетки посевного и рабочего банков свободны от бактерий, грибов, микоплазм и вирусов.

Аттестация культуры клеток НЕК 293

- Установлено, что клетки НЕК 293 посевного и рабочего банков не онкогенны.
- Определены оптимальные условия культивирования клеток НЕК 293, показана ее высокая вируспродуктивная эффективность в отношении мутантного штамма аденовируса Adel2, отработана методология получения препаративных количеств Adel2.
- Посевной и рабочий банки культуры клеток НЕК 293 аттестованы для производства препаратов, предназначенных для лечения онкологических больных (протокол №14 от 28.10.03. заседания Ученого Совета ГИСК им. Л.А. Тарасевича; протокол №9 от 20.11.03. Комитета МИБП).

ПАСПОРТ

на посевной банк культуры клеток НЕК 293.

1	Наименование линии	- 293
2	Шифр коллекционный	- 273
3	Запас клеток	
3.1	Количество ампул	- 240
3.2	Кол-во клеток в ампуле	- $5,0 \times 10^6$
4	Номер пассажа	- 15
5	Видовая принадлежность	- Человек
6	История получения	-
6.1	Кем и когда получена линия	- Получена в 1977 г. [Graham F.L., Smiley J., Russell W.S., Nairn R./J. gen. Virol. – 1977. – Vol. 36.-P. 59-74]. В коллекцию НИИ КК ГНЦВБ “Вектор” линия клеток поступила 23.04.01 г. из Национального института Здоровья на 5 пассаже.
6.2	Донор	- Эмбрион человека
6.3	Источник ткани	- Почка
7	Культуральные свойства	
7.1	Тип роста	- Эпителиоподобный
7.2	Способ культивирования	- Монослой
7.3	Условия культивирования	- Питательная среда Игла MEM – 90%, сыворотка крови плодов коровы – 10%. Метод снятия – 0,25% раствор трипсина и 0,02% раствор Версена в соотношении 1:1,5. Посевная доза – 10^3 кл/мл, кратность посева – 1:4, частота пассирования 2 раза в неделю. Температура культивирования - 37°C.
7.4	Условия хранения	
7.4.1	Среда для замораживания	- Питательная среда Игла MEM – 80%, сыворотка крови плодов коровы – 10%, глицерин – 10%.
7.4.2	Режим замораживания	- 96% спирт этиловый с жидким азотом, снижение температуры на 1°C в минуту до 25°C, затем быстрое замораживание до минус 70°C.
7.4.3	Режим хранения	- При температуре минус 196°C в жидком азоте.
7.5	Восстановление культуры после замораживания	- Ампулы помещают в водяную баню при температуре 37°C - 40°C. Клеточную суспензию вносят в 0,5 л матрас. Жизнеспособность – 82%.
8	Контроль контаминации	
8.1	Бактериями, грибами	- Не обнаружено.
8.2	Микоплазмами	- Не обнаружено.
8.3	Вирусами	- Не обнаружено.
9	Чувствительность к вирусу	- Чувствительна ко многим вирусам семейства Adenoviridae.

Канцеролизин



В соответствии с разработанным и утвержденным экспериментально производственным регламентом «Приготовление препарата лечебного противоракового вирусного живого культурального очищенного концентрированного жидкого (“Канцеролизин”)» (инструкция по приготовлению и контролю) [Сергеев А.Н. и др., 2001] были получены 3 экспериментально-произдственных серии препарата

Показатели качества препарата

Показатель	Метод	Нормы	Показатели по 3 сериям препарата
1 Внешний вид	Визуально	Должен представлять собой бесцветную или слегка опалесцирующую жидкость без хлопьев и посторонних включений	Представляет собой бесцветную или слегка опалесцирующую жидкость без хлопьев и посторонних включений
2 Герметичность ампул, флаконов	Визуальный, МУК 4.1/4.2.588-96, с.63	Соответствует требованиям	Герметичны

Показатель	Метод	Нормы	Показатели по 3 сериям препарата
3 Механические включения	Визуальный МУК 4.1/4.2.5 88-96, с.126	Должны отсутствовать	Отсутствуют
4 pH	Потенциометрический, ГФХI, вып.1, с.113	7,8-8,0	7,9; 7,9; 8,0
5 Подлинность	ПЦР	При использовании видоспецифичных (по последовательности аденовируса человека 5-го серотипа GenBank NC0010960) олигонуклеотидных праймеров 605 и 608, обеспечивающих амплификацию фрагмента 2048-4582 п.о. аденовирусного генома и ДНК Adel2, в качестве матрицы должен амплифицироваться фрагмент длиной 1416 п.о. с делецией 1118 п.о. в последовательности гена E1B55K.	При использовании видоспецифичных (по последовательности аденовируса человека 5-го серотипа GenBank NC0010960) олигонуклеотидных праймеров 605 и 608, обеспечивающих амплификацию фрагмента 2048-4582 п.о. аденовирусного генома и ДНК Adel2, в качестве матрицы амплифицируется фрагмент длиной 1416 п.о. с делецией 1118 п.о. в последовательности гена E1B55K.
6 Содержание клеточной ДНК, пкг/см ³	МУК 4.1/4.2.5 88-96, с. 95	менее 100	40; 50; 70

Показатель	Метод	Нормы	Показатели по 3 сериям препарата
7 Концентрация бычьего сывороточного альбумина, нг/см ³	МУК 4.1/4.2.588-96, с. 95	менее 50	10; 10;30
8 Концентрация общего белка, мкг/см ³	МУК 4.1/4.2.588-96, с. 72	Не более 9	2; 3; 6
9 Стерильность	ГФ XI, вып.2 и МУК 4.1/4.2.588-96, с. 25	Должен быть стерильным	Стерильны
10. Пирогенность	ГФ X1, вып. 2, с. 183.	Должен быть апирогенен для кроликов в дозе 1,0 мл/животное	Апирогенны
11 Безвредность	РД42-28-8-89	Должен быть нетоксичен (безвреден) для морских свинок и белых мышей в дозе 10 ⁹ ТСД ₅₀	Нетоксичны
12 Специфическая активность,	РД42-28-8-89	10 ⁹ - 10 ¹⁰ ТЦД ₅₀ /мл	10 ^{9,0} ; 10 ^{9,2} ; 10 ^{9,5} ТЦД ₅₀ /мл

ПРИЛОЖЕНИЕ
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Департамента Государственного контроля качества,
эффективности, безопасности лекарственных средств и
медицинской техники Минздрава России

"___" _____ 200__ г.

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА
ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"

Препарат лечебный противораковый ("Канцеролизин")

**Препарат лечебный противораковый вирусный живой культуральный очищенный
концентрированный жидкий**

Вводится впервые

Срок введения установлен
с "___" _____ 200__ г.

Срок действия
до "___" _____ 200__ г.

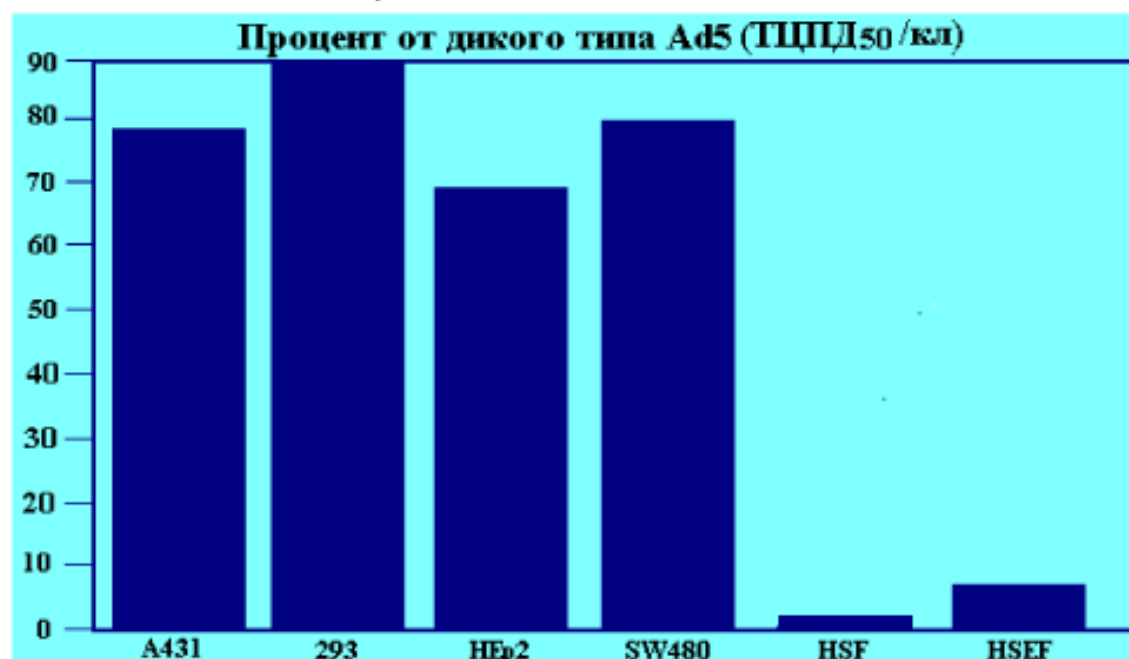
Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на препарат, который представляет собой мутантный аденовирус 5-о серотипа, штамм Adel2, выращенный на перевиваемой культуре клеток 293, очищенный ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия. В ампуле содержится от $1 \cdot 10^9$ до $1 \cdot 10^{10}$ на 1 см^3 50%-х тканевых цитопатических доз (ТЦД₅₀) мутантного аденовируса, что составляет одну лечебную дозу.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

Доклиническое исследование специфической активности шт. Adel2 в составе экспериментально-производственных серий препарата «Канцеролизин»

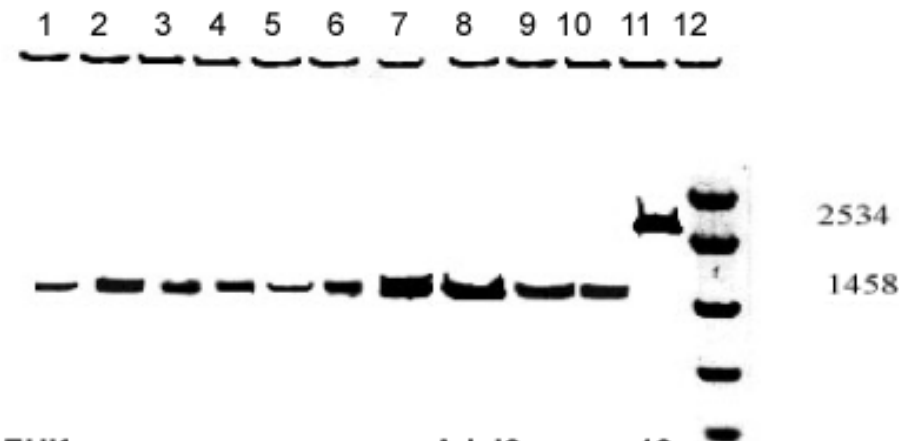
Селективная репликативная активность in vitro



Нормальные фибробласты и р53-дефектные опухолевые клетки человека были инфицированы Adel2 или диким типом аденовируса с множественностью 1 ТЦПД50/кл. Количество Adel2, продуцированного через 48 ч после инфицирования, нормализовали по количеству дикого типа аденовируса, продуцированного в той же клеточной линии за тот же период времени.

р53- дефектные опухолевые клетки: A431- эпидермоидная карцинома человека, SW480- аденокарцинома толстой кишки человека, HEP2 – эпидермоидная карцинома гортани человека. Нормальные клетки: HSF- фибробласты кожи человека, HSEF – эмбриональные фибробласты кожи человека.

Генетическая стабильность при пассировании



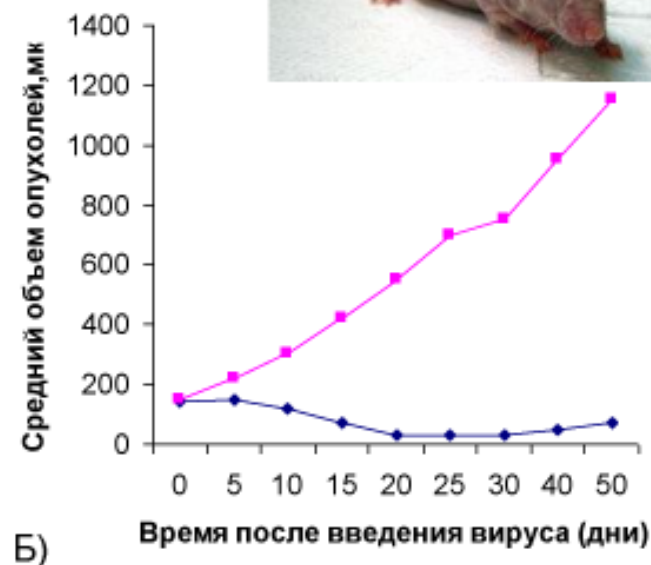
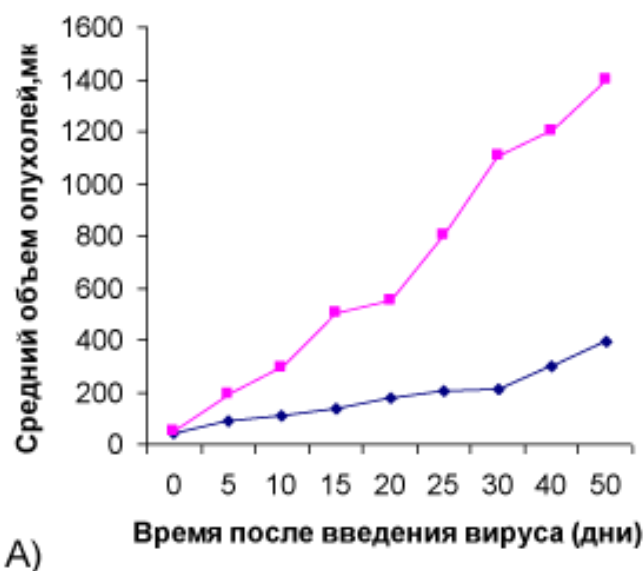
ПЦР-анализ ДНК мутантного варианта Adel2 после 18 последовательных пассажей на культуре клеток HEK 293

В качестве матрицы использовались: ДНК, выделенные из отдельных клонов Adel2 (дорожки 1-10), ДНК дикого типа аденовируса 5-го серотипа (дорожка 11). Дорожка 12- маркер молекулярной массы.

Стабильность биологических свойств при пассировании

Показано, что мутантный вариант Adel2 после 5, 10 и 18-ти последовательных пассажей на культуре комплементарных клеток HEK293, сохранил способность к селективной репликации в культурах р53-дефектных опухолевых клеток человека.

Противоопухолевая активность препарата Канцеролизин *in vivo*.



А431 - клетки эпидермоидной карциномы человека (А) и SW480 – клетки аденокарциномы толстой кишки человека (Б) (10^7 клеток в 150 μ l DMEM) инъецировали подкожно в боковую поверхность бестимусных пу/пу мышей. В опухоли, достигшие объема 40-60 мкл ($n=5$), вводили 10^9 ТЦПД₅₀ препарата Канцеролизин в 20 мкл фосфатно-солевого буфера ежедневно в течение 5 дней (◆). В контрольные опухоли ($n=5$) по той же схеме вводили инактивированный ультрафиолетовым излучением препарат Канцеролизин (□).

Противоопухолевая активность препарата Канцеролизин *in vivo*.



К
о
н
т
р
о
л
ь



О
п
ы
т





Доклиническое исследование безвредности экспериментально-производственных серий препарата «Канцеролизин»

Определение пирогенности

Определение «острой» токсичности – однократное введение препарата в дозе 5×10^9 ТЦД₅₀ (клинические проявления и патоморфологическое исследование органов лабораторных животных (головной и спинной мозг, легкие, печень, почки, надпочечники, желудок, тонкий и толстый кишечник, поджелудочная железа, тимус, эпифиз, щитовидная железа, селезенка, лимфатические узлы региональные и ткань в месте введения препарата



Определение «хронической» токсичности – многократное введение препарата (5-10) в дозе 5×10^9 ТЦД₅₀ (клинические проявления и патоморфологическое исследование органов лабораторных животных)



Определение влияния на центральную нервную систему

Исследование иммунологической безопасности (исследование гематологических показателей, морфологическое исследование органов иммунной системы, исследование функциональной активности иммунокомпетентных клеток, определение аллергизирующего действия и аутоиммунных реакций организма



**Ограниченные клинические испытания
безопасности препарата «Канцеролизин» у
больных плоскоклеточным раком,
локализованным в области головы и шеи, и
диссеминированной меланомой кожи**

По результатам доклинических исследований и на основании проекта Протокола клинических испытаний «Канцеролизина» было получено разрешение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития №80 от 27 февраля 2007 г. на проведение клинических испытаний этого препарата на ограниченной группе онкологических пациентов.

Пациенты

№ Код	Возраст	Диагноз
№1 К.В.Н.	37	Рак слизистой левой щеки. Состояние после радикального курса химио-лучевой терапии.
№2 Д.А.В.	50	Меланома кожи боковой грудной стенки с подмышечной лимфаденэктомией справа; метастазы в шейно-надключичные, подключичные, аксиллярные л/у справа; состояние после химиотерапии.
№3 В.А.И.	78	Рак гортани, состояние после ларингэктомии.
№4 С.В.В.	56	Опухоль гортаноглотки с переходом на гортань, мтс в л/у шеи справа.
№5 Ч.Т.Н.	51	Меланома кожи левого нижнего века с множественными мягкотканными метастазами в л/у узлы и легкие; прогрессирование заболевания на фоне хирургического, иммунотерапевтического, химиотерапевтического лечения.

Пациенты

№ Код	Возраст	Диагноз
№6 Т.С.А.	53	Рак гортаноглотки. Метастазы в лимфоузлы шеи слева. Состояние после лучевой терапии в сентябре 2006-январе 2007. Состояние после трех курсов полихимиотерапии
№7 В.В.Н.	58	Меланома кожи левой подколенной области с метастазами в паховые л/у слева. Состояние после хирургического лечения и химиотерапии. Прогрессирование. Мтс в мягкие ткани левого бедра, подколенной области слева. Состояние после бихимиотерапии. Прогрессирование. МТс в парааортальные л/у. Состояние в процессе полихимиотерапии.
№8 Б.Р.Т.	71	Меланома кожи левой стопы, состояние после хирургического лечения. Прогрессирование: рост опухоли, метастазы в кожу, пахово-подвздошные лимфоузлы, состояние после пахово-подвздошно-бедренной лимфаденэктомии. Прогрессирование: метастазы в кожу левой голени, стопы, бедра, состояние после полихимиотерапии.

До применения препарата Канцеролизин все пациенты исчерпали стандартные виды лечения.

Для включения в клинический протокол по исследованию безопасности препарата «Канцеролизин» всеми пациентами подписано информированное согласие.

Введение препарата осуществлялось интратуморально или посредством обкалывания метастатических очагов курсами (каждый курс по 5 дней, с 2-х недельными интервалами). Трем пациентам (№1-№3) препарат «Канцеролизин» вводился в дозе $10^{8,0}$ ТЦД₅₀ мутантного аденовируса Adel2 на инъекцию, пяти пациентам (№4-№8) в дозе $10^{9,0}$ ТЦД₅₀.

Четыре пациента (№4, 6, 7 и 8) получили 3 курса введения препарата, два пациента (№3 и 5) 2 курса, один пациент (№2) 4 курса, один пациент (№1) 1 курс.

Кроме клинического и лабораторно-инструментального обследования пациентов в исследовании определяли:
наличие аденовируса в крови пациентов,
наличие и титры антител к аденовирусу в крови пациентов,
наличие мутаций в гене p53 в ДНК выделенных из опухолевых клеток (биопсийный материал) и клеток крови пациентов).

ИНДИВИДУАЛЬНАЯ КАРТА КЛИНИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ

Код больного 2_дав_ № и/б 06/21278_ Лечение препаратом «Канцеролизин», серия № 4Начато 21.05.07Закончено 20.08.07

Дата и серия препарата предыдущего курса лечения _____

Параметр		Срок обследования после первого введения (курс), сутки																									
				0	1	2	3	4	Две недели перерыв		0	1	2	3	4	Две недели перерыв		0	1	2	3	4	Две недел и перер ыв		0	1	
				21.05 .07				25.05. .07				13.06 .07.					19.06 .07									23.07 .07.	
Температура тела	утро			36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	38.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.9	36.9
	вечер			36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	36.6	38.6	38.6
Частота пульса				70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Артериальное давление				125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	125/70 0 0	
Недомогание				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Головная боль				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Слабость				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Нарушение сна				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Потливость				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Насморк¹				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Кашель¹				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Боль в горле¹				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Слезотечение¹				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Конъюнктивит¹				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Нарушение аппетита				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Тошнота				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Тошнота				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Рвота				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Боли в животе				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Расстройства стула¹				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Прочие жалобы				нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Увеличение регионарных лимфоузлов																											
Местная реакция кожи	гиперемия в точках введения, мм			нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	инфильтрат в точках введения, мм			нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	некроз			нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	боль			нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
	размер опухоли			15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см	15см
	прочие проявления			нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет

Примечание 1 – при наличии проводится определение в отделении вирусологическое (наличие аденовирусов 5 серотипа) и бактериологическое

Комментарии

Примечание 1 – при наличии проводится определение в отделении вирусологическое (наличие аденовирусов 5 серотипа) и бактериологическое

Комментарии

**Карта для оценки переносимости препарата «Канцеролизин»
(заполняет врач)**

Код больного **2** дав ____ № и/б 06/21278

Лечение препаратом «Канцеролизин», серия № 4

Путь введения: ____ интратуморально

Общий анализ крови (Заполняется для каждого курса лечения)

Анализ мочи от 21.05.2007 и от 20.08.2007 – **без патологии**

ЭКГ от 21.05.2007 и от 20.08.2007 – **без патологии**

Микробиологическое и серологическое обследование (Заполняется при необходимости для каждого курса лечения)

Показатель	Дата обследования					Норма
	До введения 18.04.07	30.05.07	13.06.07	30.07.07		
Гемоглобин	13.7	13.7	14.5	12.7		13-16 г/дл
Эритроциты	4.17	4.2	4.4	4.0		4- 5.6x10E ¹² /л
Лейкоциты	5.8	5.7	6.8	6.6		4-8.8 x 10E ⁹ /л
Лимфоциты	32	31	30	28.5		19-37%
Эозинофилы	2	-	5	5.4		0.5-5%
Базофилы	0	-	1	0.7		0-1%
Тромбоциты	193	189	184	205		180-320 x 10 ⁹ /л

Показатель	Дата обследования					Норма
	До введения 18.04.07	30.05.07	13.06.07	18.07.05	30.07.07	
Билирубин общий прямой непрямой	27	16.9 4.71 12.19		15 4.15 10.95	13.2 3.8	<20,5ммоль/л <5,1 ммоль/л
АСТ	22	47	34	22	22	<40 Е/л
АЛТ	25	119	50	21	23	<35 Е/л
ЛДГ	309	359	413	444	478	230-460 Ед/л
Щелочная фосфатаза	252	301	303	291	336	98-279 Ед/л
Мочевина	5.9	8.6	6.75	8.07	6.5	2,5-8,3ммоль/л
Глюкоза	5.2	5.3	4.8	4.5	5.4	3,3-5,6 ммоль/л
Мочевая к-та	387	342.7	298	271	284	202-416 мкм/л
креатинин	90	97.2	98	79	99.8	53-106 мкмоль/л

Карта для оценки переносимости препарата «Канцеролизин»

(заполняет врач)

Код больного _____ 2 _____ дав № и/б _____ 06_/21278

Лечение препаратом «Канцеролизин», серия № 4

Путь введения: _____ интратуморально _____

Ультразвуковое исследование

До введения препарата «Канцеролизин» _____ 15.05.07

Заключение

Печень не увеличена; в надкл.обл. л/у от 1.2 до 1.8 см; в подключичной обл. 0.7-0.9. В области п/о рубца и мягких тканей передней грудной клетки справа бугристое образование с элементами распада в центре 17.5x13.3см

Ультразвуковое исследование (по показаниям)

В течение месяца после курса введения препарата «Канцеролизин»

Заклучение

Ультразвуковое исследование 5 июля 2007г.

Заклучение: Печень не увеличена; в надкл.обл. л/у от 2.5 до 2.2 см; В области п/о рубца и мягких тканей передней грудной клетки справа бугристое образование с элементами распада в центре 17.8x13.5x9.5см

Карта для оценки переносимости препарата «Канцеролизин»

(заполняет врач)

Код больного _____ 2 _____ дав _____ № и/б _____ 06/21278 _____

Лечение препаратом «Канцеролизин», серия № _____

Путь введения: _____ интратуморально _____

Позитронно-эмиссионная томография всего тела (ПЭТ)

До введения препарата «Канцеролизин» _____ 5 апреля 2007г. _____

Заклучение

На серии томограмм всего тела (от мочки уха до верхней трети бедра) определяются патологические очаги гиперметаболической активности в проекции передне-боковых отделов грудной клетки справа. А также в проекции подключичной области справа.
(Кроме того, определяется патологический очаг гиперметаболической активности в проекции верхне-наружного квадранта левой ягодичной области, скорее всего обусловлено воспалительными изменениями).

Титры вируснейтрализующих антител

Дата	Титр антител к аденовирусу 5-го типа в сыворотках крови пациентов				
	№4 С.В.В.	№5 Ч.Т.Н.	№6 Т.С.А.	№7 В.В.Н.	№8 Б.Р.Т.
23.10.07 до 1 цикла	1:20				
06.11.07 до 2 цикла	1:80				
09.11.07 до 1 цикла		1:5			
20.11.07 после 2 цикла	1:80				
03.12.07 до 2 цикла		1:20			
03.12.07 до 3 цикла	1:80				
07.12.07 после 2 цикла		1:80			
07.12.07 после 3 цикла	1:80				
05.03.08 до 1 цикла			1:40		
28.03.08 после 2 цикла			1:80		
18.04.08 после 3 цикла			1:120		
07.04.08 до 1 цикла				1:40	
11.04.08 после 1 цикла				1:40	
21.04.08 до 2 цикла				1:120	
24.04.08 до 1 цикла					1:10
24.04.08 после 2 цикла				1:120	
29.04.08 после 1 цикла					1:40
04.05.08 до 2 цикла					1:80
05.05.08 после 3 цикла				1:120	

Наличие мутаций в гене белка p53.

Код	Наличие или отсутствие мутаций в гене p53 в образцах ДНК, выделенной из опухолевой ткани или клеток крови пациентов	Результат
№1 К.В.Н.	Обнаружены мутации в ДНК, выделенной из клеток крови и опухолевой ткани. Шесть мутаций, приводящих к заменам аминокислот в ex4, ex5 и в ex6.	Положительный
№2 Д.А.В.	В ДНК выделенной из опухолевой ткани обнаружено 8 мутаций в ex4, ex6 и ex7 гена p53, приводящих к замене аминокислот.	Положительный
№3 В.А.И.	Не удалось выделить ДНК из биопсийного материала опухолевой ткани	Не определяли
№4 С.В.В.	Не было обнаружено мутаций в гене белка p53 в ДНК, выделенной из клеток крови	Отрицательный
№5 Ч.Т.Н.	Не было обнаружено мутаций в гене белка p53 в ДНК, выделенной из клеток крови	Отрицательный
№6 Т.С.А.	Не было обнаружено мутаций в гене белка p53 в ДНК, выделенной из клеток крови	Отрицательный
№7 В.В.Н.	Обнаружены 2 мутации в ДНК, выделенной из клеток крови, в значимом участке ex5 гена p53, приводящие к замене двух аминокислот в белке p53.	Положительный
№8 Б.Р.Т.	Обнаружены 2 мутации в ДНК, выделенной из клеток крови, в ex4 и в ex5 гена p53, приводящие, соответственно, к замене двух аминокислот в белке p53.	Положительный

Переносимость лечения

Больной №2 Д.А.В. с диагнозом метастатическая меланома кожи.

При осмотре у пациента справа на грудной клетке пальпируется громадное образование до 15-20 см в диаметре, которое подвергается интратуморальному обкалыванию.

С 21 по 25 мая первый курс.

С 13 июня по 19 июня второй курс.

Со 2 июля по 6 июля третий курс. Отмечена удовлетворительная переносимость, без признаков интоксикации; показатели крови в пределах нормы.

В связи с тем, что у больного при УЗИ состояние расценено как стабилизация (от 5 июля 2007г.), решено продолжить курсы препаратом «Канцеролизин»

С 23 июля по 27 июля проведен четвертый курс препарата

«Канцеролизин». В местах инъекции препарата отмечена легкая гиперемия до 0.5 см; Через 10 часов после введения препарата (после каждой инъекции) у больного отмечался подъем Т до 38; озноб. Других симптомов интоксикации не отмечено; показатели крови в пределах нормы. Однако, у больного в п/операционном шве открылся гнойный свищ. Проводится антибактериальная терапия по месту жительства.

Ф.И.О. врача-исследователя (разборчиво) _____

подпись

Переносимость лечения

Больная 5 Ч.Т.Н. с диссеминированной меланомой кожи нижнего века (множественные мягкотканые метастазы; метастазы в л/у, легкие; прогрессирование заболевания на фоне хирургического, иммунотерапевтического, химиотерапевтического лечения). Больной проведено два курса введения препарата «Канцеролизин», отмечена удовлетворительная переносимость - субфебрильная Т (37.3), небольшая отечность в местах введения. В связи с прогрессированием заболевания (рост всех метастатических очагов другой локализации) лечение препаратом «Канцеролизин» прекращено, больная исключена из протокола.

Ф.И.О. врача-исследователя (разборчиво) _____

Пациент 6 ТСА с диагнозом рак гортаноглотки. Метастазы в лимфоузлы шеи слева. С 05.03.08-18.04.08 проведено три курса. Введение препарата интратуморально в левый и правый надключичный лимфоузел и образование в затылочной области. Переносимость удовлетворительная. Жалоб не предъявляет. Т на фоне первого курса 36.6. Другие показатели без изменений. Гиперемии в местах введения не отмечено. Лимфоузел стал менее болезненный. Образование в затылочной области без динамики. Во время второго курса препарат вводился в надкл. л/узел справа. Отмечается небольшие подъемы Т до 37 (несколько дней). Гиперемии и других изменений в местах введения не отмечено. На фоне введения препарата Канцеролизин токсических проявлений не отмечено.

Ф.И.О. врача-исследователя (разборчиво) _____

Анализ возникновения нежелательных явлений у пациентов

Нежелательные явления	Пациент	Чем обусловлено нежелательное явление
Кровотечение	№1 К.В.Н.	Прогрессированием основного заболевания
Гнойный свищ	№2 Д.А.В.	Тяжестью основного заболевания
Слабость, понижение АД	№3 В.А.И.	Прогрессированием основного заболевания
Повышение уровня ЛДГ в крови	№7 В.В.Н.	Прогрессированием основного заболевания

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК РОССИЙСКИЙ
ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР им. Н.Н. Блохина (РОНЦ им.
Н.Н. Блохина)**

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
(ФГУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»)**

СОГЛАСОВАНО:

Генеральный директор ФГУН ГНЦ
ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,

_____ 2008 г.

УТВЕРЖДАЮ:

Директор НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей,
зам. директора РОНЦ
им. Н.Н. Блохина РАМН,
д.м.н., профессор

_____ А.Ю. Барышников
_____ 2008 г.

ОТЧЕТ

**ОБ ОГРАНИЧЕННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ
БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТА «КАНЦЕРОЛИЗИН» У БОЛЬНЫХ
ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ, ЛОКАЛИЗОВАННЫМ В ОБЛАСТИ
ГОЛОВЫ И ШЕИ, И ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ**

Заключение. Завершено проведение 1-й фазы клинических испытаний препарата «Канцеролизин» при его интратуморальном введении восьми онкологическим пациентам с диагнозами рак в области головы и шеи или диссеминированная меланома кожи.

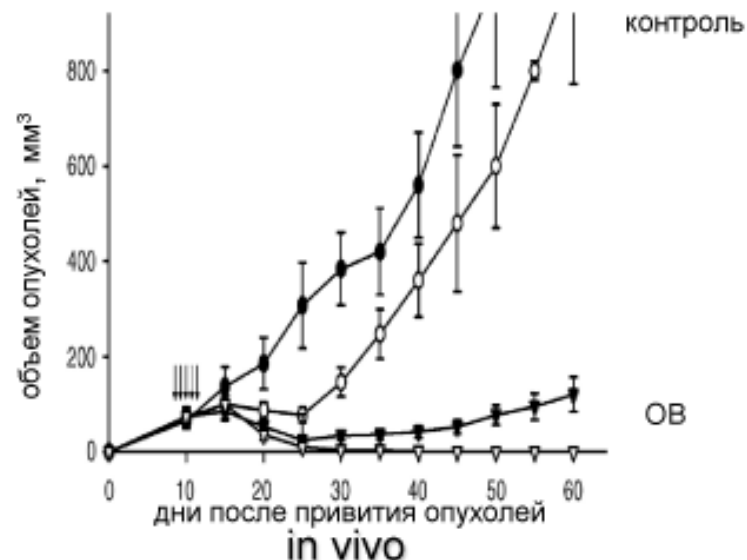
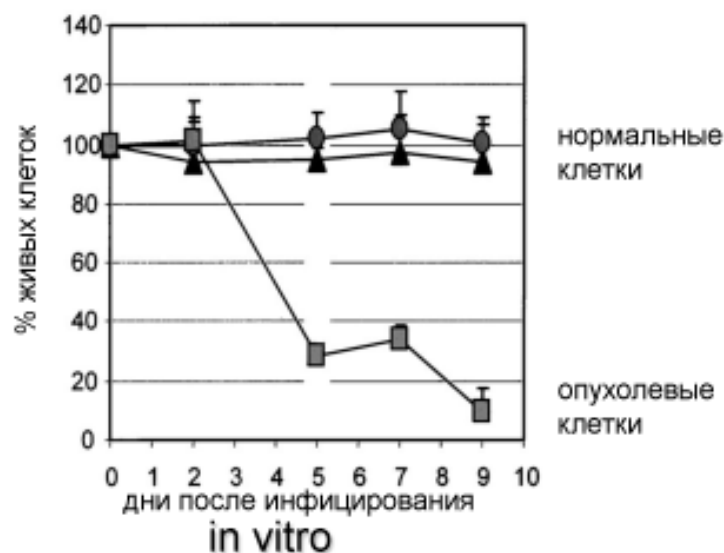
Показано, что при отсутствии аденовируса в крови титры антител к нему в сыворотке крови пациентов, получивших два или три цикла введения максимальной дозы «Канцеролизина», умеренно повышаются относительно исходного уровня.

У 2-х пациентов из 8 были обнаружены мутации гена p53 опухолевых клеток биопсийного материала. У 3-х пациентов были обнаружены мутации гена p53 в ДНК, выделенной из клеток крови.

При проведении 1-й фазы клинических испытаний Канцеролизина была продемонстрирована хорошая переносимость препарата у всех пациентов и стабилизация процесса, по крайней мере, у одного пациента. Показано, что Канцеролизин не обладает токсичностью и реактогенностью при применении его в минимальной и максимальной дозах.

По результатам 1-й фазы клинических испытаний противоопухолевого препарата Канцеролизин был сделан анализ перспективности разработки данного препарата, в соответствии с которым препарат был оценен как перспективный для дальнейшей разработки и проведения 2-й фазы клинических испытаний.

Усиление онколитической эффективности онколитических вирусов (ОВ).



Во множестве доклинических исследований ОВ была показана их высокая противоопухолевая активность как *in vitro*, так и *in vivo* (на модели лабораторных животных с привитыми опухолями человека); эффективность клинического использования ОВ оказалась гораздо скромнее.

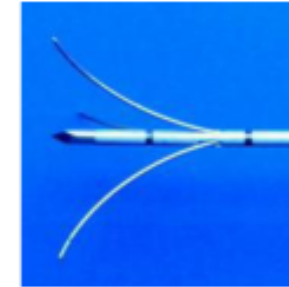
Основные причины несоответствия данных полученных на стадии доклинических и клинических исследований:

- клинические исследования ОВ обычно проводятся с пациентами, которые ранее имели неоднократные раунды противоопухолевой терапии, их опухоли обычно большие, очень сильно компартментализованы, уже имеют некротические участки и рефрактерны к хемо- радиотерапии и представляют собой очень большой контраст по отношению к маленьким подкожным опухолям, которые подвергаются терапии на стадии доклинических исследований. Даже если, вирусный вектор элиминировал все опухолевые клетки в пределах одного компартмента опухоли, фиброзные перегородки и некротические зоны препятствуют его распространению в соседние.
- иммунный ответ. У иммунокомпетентных животных, и как и следовало ожидать, и у пациентов иммунная система элиминирует основную часть вируса к 14 дню после введения. В доклинических исследованиях противоопухолевой эффективности в основном используются иммунодефицитные мыши с привитыми опухолями (immunodeficient mouse-human tumor xenograft model), поэтому эти исследования никак не учитывают воздействие иммунной системы.

Улучшение доставки ОВ

Для повышения эффективности физической доставки ОВ до опухолевых клеток возможно использование следующих подходов:

- инъекция вируса во множество мест опухоли или введение в артерию снабжающую опухоль.
- для увеличения тропизма ОВ к клеткам мишеням используется присоединение одно-цепочечных антител или лигандов для опухолевоспецифичных клеточных рецепторов.
- модификация матрикса опухоли. Например было показано, что глюкозаминогликановый слой покрывающий внутреннюю поверхность мочевого пузыря препятствует аденовирусному аттачменту, удаление этого слоя с использованием детергента перед введением онколитического аденовируса существенно усиливает его эффективность при терапии поверхностного рака мочевого пузыря.
- показана перспективность ОВ экспрессирующих фузогенные белки оболочечных вирусов, способные вызывать слияние мембран смежных клеток, тем самым, усиливая распространение ОВ от клетки к клетке.



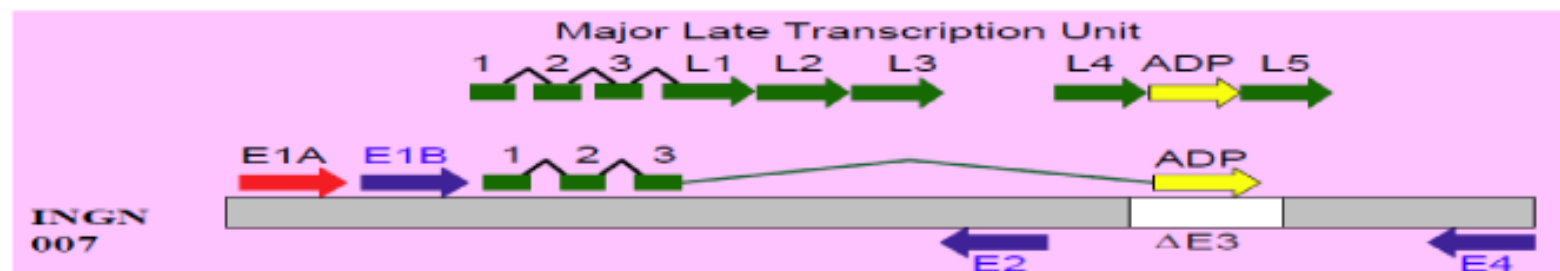
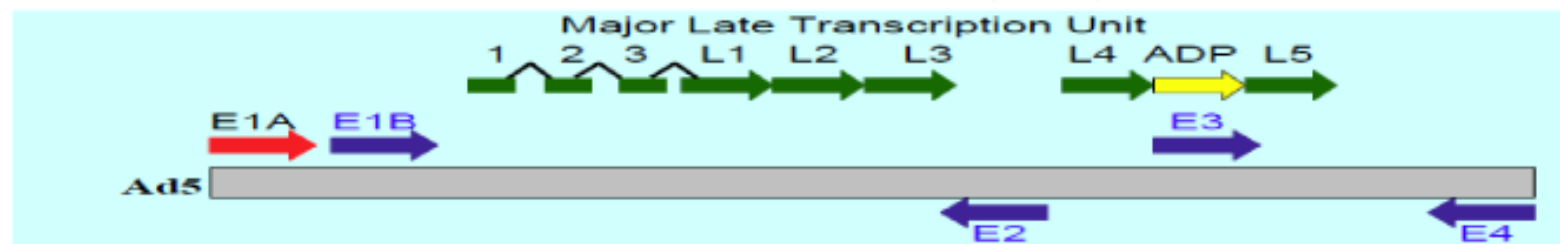
Предотвращение антивирусного иммунного ответа

- конструирование наборов однонаправленных онколитических вирусов на основе различных серотипов.
- показана перспективность покрытия вирионов гидрофильными полимерами такими как полиэтилен гликоль (PEG) и поли-N-(гидроксипропил) метакриламид (pHPMA). Такой «щит» защищает вектор от циркулирующих антител и повышает эффективность повторного введения. Перспективно использование лигандов для рецепторов присутствующих в опухолевых клетках или опухолевом эндотелии (EGF, FGF-2, VEGF) для конъюгирования с PEG-покрытыми вирионами для увеличения тропизма вектора к соответствующей опухоли.
- так как, большинство противоопухолевых химиотерапевтических агентов являются иммунодепрессантами, целесообразно учитывать это при разработке комбинированных схем терапии (хемо- и ОВ), т.е. начало курса с хемо- с последующим введением ОВ. Наблюдаемый при проведении клинических исследований синергетический эффект хемо- и ОВ при терапии рефрактерных к химиотерапии опухолей многие исследователи связывают именно с иммуносупрессией пациентов.

Отказ от излишней аттенуации ОВ

на начальной стадии работ по разработке онколитических вирусов приоритет отдавался их безопасности. Репликативную активность ОВ ограничивали опухолевыми клетками посредством модификации вирусного генома. Однако, те же модификации приводили к тому, что полученный онколитический вектор реплицировался в опухолевых клетках менее эффективно чем дикий тип вируса. В настоящее время утверждается мнение, что глубокой аттенуации ОВ не требуется.

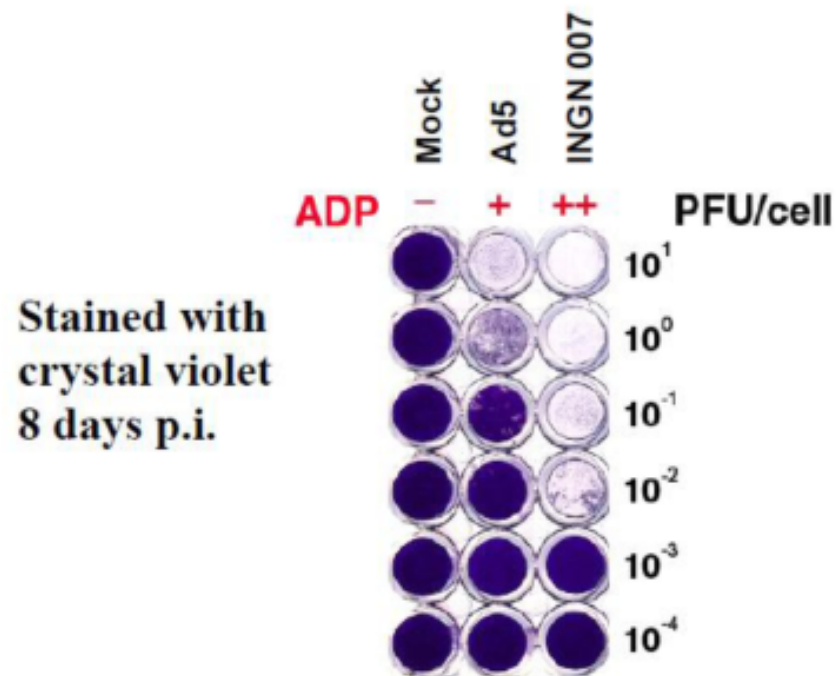
Genome Structure of Natural Adenovirus (Ad5) and Vector INGN 007



Отказ от излишней аттенуации ОВ

INGN 007 Kills Cancer Cells Better than Wild-Type Ad5 Because INGN 007 Overexpresses ADP

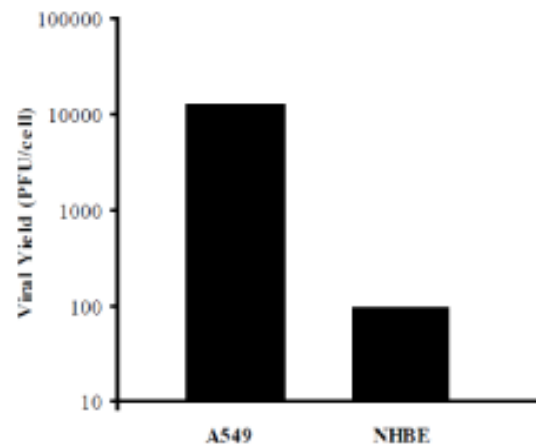
(A549 Human Lung Cancer Cells)



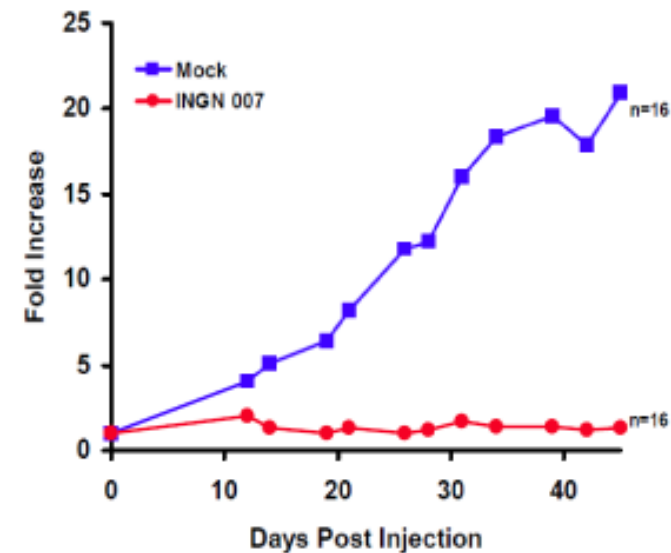
K. Toth et al. Cancer Gene Ther. 2010

Отказ от излишней аттенуации ОВ

INGN 007 Replicates 100-fold Better in Human A549 Lung Cancer Cells than in Primary Human Bronchial Epithelial Cells (NHBE)



INGN 007 Suppresses A549 Human Lung Tumors in “Nude” Mice





Заключение

➤ Сконструирован мутантный вариант аденовируса человека дефектный по гену белка E1B55K Adel2 селективно инфицирующий и лизирующий p53-дефектные опухолевые клетки человека. Показана противоопухолевая активность Adel2 *in vivo* на модели nude мышей с привитыми опухолями человека.

➤ На основе мутантного аденовируса Adel2 разработан кандидатный противоопухолевый препарат «Канцеролизин» Проведено доклиническое исследование экспериментально-производственных серий препарата «Канцеролизин» В соответствии с требованиями СП 3.3.2.561-96 и РД 42-28-10-90 исследовали его специфическую активность, токсичность, специфическую безопасность, аллергизирующее действие и влияние на иммунную систему. Препарат признан безопасным и перспективным для проведения 1-ой фазы клинических исследований.



Заключение

➤ Проведены ограниченные клинические испытания безопасности препарата «Канцеролизин» у больных плоскоклеточным раком, локализованным в области головы и шеи, и диссеминированной меланомой кожи. Продемонстрирована хорошая переносимость препарата у всех 8 пациентов исчерпавших стандартные методы лечения и ингибирование прогрессии опухоли, по крайней мере, у одного пациента. Показано, что Канцеролизин не обладает токсичностью и реактогенностью в использованных дозах и не вызывает клинических проявлений аденовирусной инфекции.

➤ По результатам 1-й фазы клинических испытаний противоопухолевого препарата «Канцеролизин» он оценен как перспективный для дальнейшей разработки и проведения 2-й фазы клинических испытаний.



Заключение

➤ Для повышения эффективности онколитических вирусов в настоящее время в мире активно разрабатываются различные подходы включающие модификацию самих вирусов, улучшение системы доставки, предотвращение элиминации иммунной системой хозяина и др. Все большее распространение получает тенденция к конструированию онколитических вирусов, сочетающих в себе сразу несколько механизмов, обеспечивающих высокую селективность и увеличение эффективности воздействия по отношению к опухолевым клеткам.