

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992441** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.31

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.10.17

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДЕНОВИРУСА

(31) 61/715,206; 61/785,287

(32) 2012.10.17; 2013.03.14

(33) US

(62) 201590747; 2013.10.17

(71) Заявитель:
ВАСКЮЛАР БАЙОДЖЕНИКС ЛТД.
(IL)

(72) Изобретатель:
Брейтбарт Эйал, Леубитц Андреа,
Фейге Эрез (IL), Пенсон Ричард (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение предлагает способ снижения или уменьшения размера опухоли, или устранения опухоли, или ингибирования, уменьшения или снижения неоваскуляризации или ангиогенеза в опухоли у пациента, путем введения аденовирус-содержащей нуклеотидной конструкции, которая содержит Fas-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток. Изобретение также предлагает гомогенную популяцию аденовируса, содержащего Fas-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, и способы ее применения.

A1

201992441

201992441

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДЕНОВИРУСА

Уровень техники изобретения

Область изобретения

[0001] Настоящее изобретение относится к биологии рака, иммунологии и фармакологии. Более конкретно, оно относится к способам лечения заболеваний или расстройств, связанных с гинекологическим раком, путем введения нуклеотидной конструкции, экспрессирующей продукт Fas-химерного трансгена, или гомогенной популяции нуклеотидной конструкции.

Уровень техники

[0002] Гинекологические раки клинически агрессивны, как правило, развиваются в тканях женских половых органов и связаны с неблагоприятным исходом. Указанные опухоли включают раковые заболевания яичников, матки, фаллопиевых труб и шейки матки, а также злокачественные смешанные опухоли Мюллера (МММТ). В редких случаях МММТ также могут развиваться в брюшной полости женских особей (в выстилке стенки брюшной полости).

[0003] Гинекологические раки трудно обнаружить и часто их диагностируют, когда они находятся на поздней стадии развития. Рак яичников составляет примерно три процента от раковых заболеваний у женщин. Хотя рак яичников занимает девятое место среди наиболее распространенных раковых заболеваний у женщин, он является пятой по значимости причиной связанной с раком смертности женщин и представляет собой смертельно опасный гинекологический рак. 2012. Рак яичников является чувствительным к химиотерапии и характеризуется высокой скоростью ответа на платину и таксановые терапевтические средства. Однако, несмотря на прогресс в области разработки и доставки терапевтических средств, при лечении указанных видов рака остаются такие проблемы, как рецидивы раковых заболеваний и устойчивость к химиотерапии. Несмотря на сильнодействующую первичную терапию и высокий уровень первоначального ответа, у большинства женщин с запущенным раком яичников наблюдаются рецидивы и развивается устойчивость к лекарственным средствам.

При указанных запущенных состояниях болезни степень ответа на последующую химиотерапию значительно уменьшается, что свидетельствует о настоятельной потребности в разработке более совершенных терапевтических средств и стратегий лечения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает способ снижения или уменьшения размера опухоли, или прекращения или замедления роста опухоли у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества нуклеотидной конструкции, которая содержит Fas-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, где продукт Fas-химерного гена, кодируемый конструкцией нуклеиновой кислоты, снижает или уменьшает размер опухоли, или устраняет опухоль у пациента, и где опухоль связана с гинекологическим раком у женщин, или с его метастазами. Настоящее изобретение также предлагает способ ингибирования, уменьшения или снижения неоваскуляризации или ангиогенеза в опухоли, включающий введение пациенту, страдающему от опухоли, эффективного количества нуклеотидной конструкции, которая содержит Fas-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, где продукт Fas-химерного гена, кодируемый конструкцией нуклеиновой кислоты, ингибирует, снижает или уменьшает неоваскуляризацию, или ангиогенез в опухоли, и где опухоль связана с гинекологическим раком у женщин, или с его метастазами. Кроме того, изобретение предлагает способ лечения или профилактики опухоли, связанной с заболеванием, или порожденной заболеванием, включающим рак Мюллера, рак яичников, рак брюшной полости, рак фаллопиевой трубы или папиллярную серозную карциному матки у пациента, включающий введение эффективного количества нуклеотидной конструкции, которая содержит Fas-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, где продукт Fas-химерного гена, кодируемый конструкцией нуклеиновой кислоты, обеспечивает лечение или предотвращение гинекологического рака у женщин, или его метастазирования. В одном варианте осуществления опухоль или ее метастазы

уменьшаются в размере, или исчезают после введения, или рост опухоли. В другом варианте осуществления опухоль, или ее метастазы, уменьшаются таким образом, что максимальный диаметр (LD) опухоли уменьшается, по меньшей мере, примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с LD до введения. В других вариантах осуществления гинекологический рак у женщин связан с заболеванием, или порожден заболеванием, включающим рак Мюллера, рак яичников, рак брюшной полости, рак фаллопиевой трубы или папиллярную серозную карциному матки, или их сочетания или метастазы.

[0005] В некоторых вариантах осуществления пациент получал предварительную терапию на основе платины. В одном примере у пациента наблюдается рецидив платина-устойчивого рака. В другом примере у пациента с рецидивом платина-устойчивого рака, или с рецидивом таксан-устойчивого рака, наблюдается прогрессирующая опухоль через шесть месяцев после завершения или получения терапии на основе платины, или терапии на основе таксана.

[0006] В некоторых вариантах осуществления у пациента отсутствует антитело против аденовируса, или не вырабатывается антитело против аденовируса.

[0007] В других вариантах осуществления способы настоящего изобретения дополнительно включают введение эффективного количества одного или нескольких химиотерапевтических средств. Одно или несколько химиотерапевтических средств можно вводить до введения, одновременно с введением, или после введения нуклеотидной конструкции. В конкретном варианте осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой паклитаксел.

[0008] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная конструкция, предназначенная для применения в способе настоящего изобретения, представляет собой аденовирус. В одном примере аденовирус экспрессирует продукт Fas-химерного гена, содержащий внеклеточный домен полипептида рецептора TNF 1 (TNFR1), гибридный с трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом полипептида Fas. Полинуклеотид, кодирующий продукт Fas-химерного гена, функционально связан с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, таким как

промотор PPE-L-3X. В конкретном варианте осуществления аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 19.

[0009] Один аспект настоящего изобретения включает нуклеотидную конструкцию, содержащую последовательность SEQ ID NO: 18. В другом аспекте нуклеотидная конструкция дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Fas-химерный белок. В других вариантах осуществления изобретение предлагает вектор, содержащий последовательность SEQ ID NO: 19. Вектор может представлять собой аденовирус.

[0010] В следующих вариантах осуществления изобретение предлагает аденовирус, депонированный в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) под номером 13021201. Чистота аденовируса может составлять, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или 100%. В одном примере изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую аденовирус и фармацевтически приемлемый носитель, где композиция не содержит аденовирус другого типа, например, аденовирус, содержащий последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

[0011] Данное изобретение также предлагает способ ингибирования, уменьшения или снижения ангиогенеза или неоваскуляризации в ткани у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму нуклеотидной конструкции, вектора, аденовируса или композиции. В одном варианте осуществления ткань представляет собой опухоль. В другом варианте осуществления размер опухоли снижается или уменьшается после введения, или рост опухоли замедляется после введения. В других вариантах осуществления опухоль порождается заболеванием, или связана с заболеванием, включающим рак щитовидной железы, нейроэндокринный рак, глиобластому, гинекологический рак женщин, а также любые их сочетания или метастазы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ/ФИГУР

[0012] На фиг.1 показана средняя опухолевая масса (ось Y) у мышей, несущих карциному легких Льюиса, которые получали среду, VB111 1E9 (109 вирусных частиц (VP) VB-111), VB111 1E11 (1011 VP VB-111), ComLow (20 мг/кг карбоплатин + 10 мг/кг алимта), ComHigh (50 мг/кг карбоплатин + 30 мг/кг алимта), VB111 1E9 + ComLow (VB-111 109 VP + 20 мг/кг карбоплатин + 10 мг/кг алимта), VB111 1E9 + ComHigh (VB-111 109 VP + 50 мг/кг карбоплатин + 30 мг/кг алимта), VB111 1E11 + ComLow (VB-111 1011 VP + 20 мг/кг карбоплатин + 10 мг/кг Алимта) и VB111 1E11 + ComHigh (VB-111 1011 VP + 50 мг/кг карбоплатин + 30 мг/кг алимта) (ось x).

[0013] На фиг.2 показана коробчатая диаграмма, демонстрирующая среднюю опухолевую массу (ось y) у мышей, несущих карциному легких Льюиса, которые получали среду (1), VB111 1E9 (109 вирусных частиц (VP) VB-111) (2), VB111 1E11 (1011 VP VB-111) (3), ComLow (20 мг/кг карбоплатин + 10 мг/кг алимта) (4), ComHigh (50 мг/кг карбоплатин + 30 мг/кг алимта) (5), VB111 1E9 + ComLow (VB-111 109 VP + 20 мг/кг карбоплатин + 10 мг/кг алимта) (6), VB111 1E9 + ComHigh (VB-111 109 VP + 50 мг/кг карбоплатин + 30 мг/кг алимта) (7), VB111 1E11 + ComLow (VB-111 1011 VP + 20 мг/кг карбоплатин + 10 мг/кг Алимта) (8) и VB111 1E11 + ComHigh (VB-111 1011 VP + 50 мг/кг карбоплатин + 30 мг/кг алимта) (9) (ось x).

[0014] На фиг.3 показана схема сочетанной терапии с использованием аденовируса, содержащего FAS-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток (например, VB-111), и паклитаксела. Примерно 3×10^{12} VP или 1×10^{13} VP VB-111 вводят каждые восемь недель, а паклитаксел вводят один раз в неделю.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0015] Если не указано иначе, все используемые здесь технические и научные термины имеют традиционные значения, известные рядовым специалистам в области, к которой принадлежит

данное изобретение. В случае конфликта настоящая заявка проверяется вместе с определениями. Если контекст не требует иного толкования, термины, используемые в единственном числе, включают множественное число, а термины, используемые во множественном числе, включают единственное число. Все публикации, патенты и другие упомянутые здесь ссылки включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны как включенные в качестве ссылки.

[0016] Ниже описаны способы и материалы, подходящие для осуществления или тестирования настоящего изобретения, хотя можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания и из формулы изобретения.

[0017] Нижеследующие термины и определения приведены для дополнительной характеристики настоящего изобретения.

[0018] В данном описании термин "антитело" обозначает интактный иммуноглобулин или его антиген-связывающий фрагмент. Антитела настоящего изобретения могут относиться к любому изотипу или классу (например, М, D, G, Е и А), или к любому подклассу (например, G1-4, A1-2), и могут содержать легкую цепь каппа (κ) или лямбда (λ).

[0019] Термин "эффективное количество" в данном описании относится к количеству, которое при применении в нужных дозах и в течение необходимых периодов времени позволяет достичь желательного результата. Желательный результат может включать в себя, например, уменьшение или подавление неоваскуляризации или ангиогенеза *in vitro* или *in vivo*. Эффективное количество не должно приводить к полному устранению неоваскуляризации или ангиогенеза.

[0020] Термин "терапевтически эффективное количество" в данном описании относится к количеству, которое при применении

в нужных дозах и в течение необходимых периодов времени позволяет достичь желательного терапевтического результата. Терапевтический результат может включать в себя, например, уменьшение симптомов, регрессию или стабилизацию размера опухоли по данным рентгеновской визуализации, увеличение длительности выживания, улучшение подвижности и т.п. Терапевтический результат не обязательно должен означать "излечение".

[0021] В данном описании термин "профилактически эффективное количество" относится к количеству, которое при применении в нужных дозах и в течение необходимых периодов времени позволяет достичь желательного профилактического результата. Поскольку профилактическую дозу вводят индивидуумам до проявления заболевания, или на его ранней стадии, профилактически эффективное количество, как правило, ниже, чем терапевтически эффективное количество.

[0022] Термин "полинуклеотид" или "нуклеотид" относится к одной нуклеиновой кислоте, или к нескольким нуклеиновым кислотам, и включает выделенную молекулу или нуклеотидную конструкцию, такой как матричная РНК (мРНК) или плазмидная ДНК (пДНК). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит традиционную фосфодиэфирную связь, или нетрадиционную связь (такую как амидная связь, например, присутствующая в пептидо-нуклеиновых кислотах (PNA)).

[0023] Термины "полинуклеотид", "нуклеотид", "нуклеиновая кислота", которые в данном описании могут использоваться как взаимозаменяемые, включают нуклеотидную последовательность полноразмерной кДНК, в том числе нетранслируемые 5'- и 3'-последовательности, кодирующие последовательности, а также фрагменты, эпитопы, домены и варианты указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Полинуклеотид может включать в себя любой полирибонуклеотид или полидезоксирибонуклеотид, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Например, полинуклеотиды могут содержать одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно-

и двухцепочечных участков, одно- и двухцепочечную РНК, и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных участков, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут включать в себя одноцепочечные или, чаще, двухцепочечные участки, или смесь одно- и двухцепочечных участков. Кроме того, полинуклеотиды могут содержать трехцепочечные участки, представляющие собой РНК или ДНК, или и РНК, и ДНК. Полинуклеотиды могут также содержать одно или несколько модифицированных оснований, или ДНК- или РНК-скелеты, модифицированные с целью придания стабильности, или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК можно ввести разнообразные модификации; следовательно, термин "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

[0024] В соответствии с настоящим изобретением полипептид может состоять из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями, или модифицированными пептидными связями, т.е. пептидными изостерами, и может содержать аминокислоты, отличные от 20 кодируемых генами аминокислот (например, неприродные аминокислоты). Полипептиды настоящего изобретения можно модифицировать либо посредством природного процесса, такого как посттрансляционный процессинг, либо с помощью химических методов модификации, хорошо известных в данной области техники. Такие модификации подробно описаны в базовых текстах и в более детальных монографиях, а также в обширной научной литературе. Модификации могут присутствовать в любом участке полипептида, в том числе, в пептидном остове, в боковых цепях аминокислот и на амино- или карбокси-концах. Следует иметь в виду, что один и тот же тип модификации может присутствовать в одинаковой или разной степени в нескольких участках конкретного полипептида. Кроме того, данный полипептид может содержать модификации нескольких типов. Полипептиды могут разветвляться, например, в результате убиквитинирования, и они могут быть циклическими, содержащими или не содержащими разветвления. Циклические, разветвленные, и разветвленные

циклические полипептиды могут образовываться в результате посттрансляционных природных процессов, или их можно получить посредством методов синтеза. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, сшивку, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, ПЭГиление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование. (См., например, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan et al, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)).

[0025] Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог", используемые в применении к любому полипептиду или полинуклеотиду настоящего изобретения, включают любые полипептиды или полинуклеотиды, которые сохраняют, по меньшей мере, некоторые из активностей природного полипептида или полинуклеотида, то есть, способные функционировать как один из природных полипептидов или полинуклеотидов. Например, "фрагмент", "вариант", "производное" или "аналог" рецептора фактора некроза опухоли 1 (TNFR1) проявляет некоторые из активностей природного полноразмерного TNFR1, например, обладает способностью связываться с лигандом TNFR1, таким как TNF-альфа или лимфотоксин. В другом примере "фрагмент",

"вариант", "производное" или "аналог" полипептида FAS проявляет некоторые из активностей природного полноразмерного полипептида FAS, например, обладает способностью индуцировать апоптоз. В других примерах "фрагмент", "вариант", "производное" или "аналог" промотора, специфичного для эндотелиальных клеток, может индуцировать специфичную для эндотелиальных клеток экспрессию гена, функционально связанного с промотором. Другие неограничивающие примеры разных фрагментов, вариантов, аналогов или производных полипептидов TNFR1, FAS, а также промоторов, специфичных для эндотелиальных клеток, описаны ниже.

[0026] В настоящем изобретении термин "фрагмент полипептида" или "фрагмент белка" относится к короткой аминокислотной последовательности полипептида. Фрагменты белка или полипептида могут быть "отдельными", или они могут входить в состав более крупного полипептида, частью которого является фрагмент. Типичные примеры полипептидных фрагментов настоящего изобретения, включают, например, фрагменты, содержащие примерно 5 аминокислот, примерно 10 аминокислот, примерно 15 аминокислот, примерно 20 аминокислот, примерно 30 аминокислот, примерно 40 аминокислот, примерно 50 аминокислот, примерно 60 аминокислот, примерно 70 аминокислот, примерно 80 аминокислот, примерно 90 аминокислот и примерно 100 аминокислот.

[0027] "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену аминокислотного остатка на аминокислотный остаток, содержащий подобную боковую цепь. В области техники выделяют семейства аминокислотных остатков с подобными боковыми цепями, которые включают семейства аминокислотных остатков, содержащих основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Так, если

аминокислота в полипептиде заменена другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, замена считается консервативной. В другом варианте осуществления можно провести консервативную замену последовательности аминокислот на структурно подобную последовательность, которая отличается порядком и/или составом членов семейств боковых цепей.

[0028] Термин "процент идентичности последовательностей", используемый в применении к двум полинуклеотидным или полипептидным последовательностям, относится к числу идентичных совпадающих положений последовательностей в окне сравнения, с учетом добавлений или делеций (т.е. пробелов), которые нужно ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающие положения последовательности-мишени и стандартной последовательности представляют собой любые положения, в которых находятся идентичные нуклеотидные или аминокислотные остатки. Пробелы, представленные в последовательности-мишени, не учитываются, так как пробелы не содержат нуклеотиды или аминокислоты. Подобным образом, пробелы, представленные в стандартной последовательности, не учитываются, так как учитываются нуклеотиды или аминокислоты последовательности-мишени, а не нуклеотиды или аминокислоты стандартной последовательности.

[0029] Процент идентичности последовательностей рассчитывают путем определения числа положений в обеих последовательностях, в которых присутствуют идентичные аминокислотные остатки или нуклеотидные основания, с получением числа совпадающих положений, с последующим делением числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножением результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Сравнение двух последовательностей и определение процента их идентичности можно проводить с помощью программного обеспечения, доступного как для использования онлайн, так и для загрузки. Подходящее программное обеспечение для выравнивания белковых и нуклеотидных последовательностей можно получить из разных источников. Подходящей программой для определения процента

идентичности последовательностей является `bl2seq`, часть набора программ BLAST, который можно приобрести на веб-сайте BLAST Национального центра правительства США по биотехнологической информации (blast.ncbi.nlm.nih.gov). `bl2seq` выполняет сравнение двух последовательностей, используя алгоритм BLASTN или BLASTP. BLASTN используется для сравнения нуклеотидных последовательностей, а BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Другие подходящие программы включают, например, `Needle`, `Stretcher`, `Water` или `Matcher`, часть набора биоинформационных программ EMBOSS, которые также можно приобрести на веб-сайте Европейского института биоинформатики (EBI) www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[0030] Разные участки одной полинуклеотидной или полипептидной целевой последовательности, которую сравнивают со стандартной полинуклеотидной или полипептидной последовательностью, могут характеризоваться своими собственными процентами идентичности последовательностей. Следует отметить, что значение процента идентичности последовательностей округляют с точностью до одной десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляют до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляются до 80,2. Кроме того, необходимо отметить, что значение длины всегда является целым числом.

[0031] Для специалиста в данной области очевидно, что генерирование выравнивания последовательностей с целью вычисления процента идентичности последовательностей не ограничивается исключительно бинарными сравнениями последовательность-последовательность, управляемыми данными по исходной последовательности. Можно проводить выравнивание нескольких последовательностей. Подходящей программой для выравнивания нескольких последовательности является `ClustalW2`, которую можно приобрести на www.clustal.org. Другой подходящей программой является `MUSCLE`, доступная на www.drive5.com/muscle/. `ClustalW2` и `MUSCLE` также можно приобрести, например, в EBI.

[0032] Следует также отметить, что выравнивание

последовательностей можно проводить путем объединения данных по последовательности с данными из других источников, такими как структурные данные (например, результаты кристаллографического анализа структуры белков), функциональные данные (например, расположение мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, которая объединяет разные данные для генерирования выравнивания нескольких последовательностей, является T-Coffee, доступная на www.tcoffee.org, и, кроме того, ее можно приобрести, например, в EBI. Также следует понимать, что конечное выравнивание, используемое для расчета процента идентичности последовательностей, можно проверять либо автоматически, либо вручную.

[0033] В данном описании термины "связанный", "гибридизованный", "гибридизация", "химерный" и "химера" используются как взаимозаменяемые. Указанные термины относятся к соединению двух или более элементов или компонентов, посредством любых способов, включающих в себя химическую конъюгацию или рекомбинантные методы. Термин "гибридизация в рамке считывания" относится к соединению двух или более открытых рамок считывания (ORF) с получением непрерывной более длинной ORF, так, чтобы сохранить правильную рамку считывания исходных ORF. Таким образом, полученный рекомбинантный гибридный или химерный белок представляет собой один белок, содержащий два сегмента или более, которые соответствуют полипептидам, кодируемым исходными ORF (причем в природе указанные сегменты обычно так не соединяются). Хотя полученная таким образом рамка считывания является непрерывной по всем гибридизованным сегментам, указанные сегменты могут быть физически или пространственно разделены, например, линкерной последовательностью, находящейся в рамке считывания.

[0034] Термины "гетерологичный" и "гетерологичный фрагмент" относятся к полинуклеотиду, полипептиду, или другому фрагменту, полученному от индивидуума, отличного от индивидуума, от которого получен сравниваемый фрагмент. Например, гетерологичный полипептид может быть получен синтетическим путем, или он может быть получен из индивидуума

другого вида, из клеток индивидуума другого типа, или же из клеток такого же или другого типа другого индивидуума. В одном аспекте гетерологичный фрагмент может представлять собой полипептид, гибридизованный с другим полипептидом с получением гибридного полипептида или белка. В другом аспекте гетерологичный фрагмент может отличаться от полипептида и представлять собой, например, ПЭГ, конъюгированный с полипептидом или белком.

[0035] В применении к полипептидам термины "линейная последовательность" или "последовательность" относятся к порядку аминокислот в полипептиде в направлении от amino-конца к карбокси-концу, где остатки, которые примыкают друг к другу в последовательности, являются смежными в первичной структуре полипептида.

[0036] Термин "экспрессия" в данном описании относится к процессу, посредством которого ген продуцирует биохимический продукт, такой как РНК или полипептид. Процесс включает любое проявление функционального присутствия гена в клетке, включающее в себя, без ограничения, нокдаун гена, а также временную экспрессию и стабильную экспрессию. Данный термин включает, без ограничения, транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или любой другой продукт РНК, а также трансляцию таких мРНК в полипептид (полипептиды). Если конечный целевой продукт представляет собой биохимический продукт, экспрессия включает образование указанного биохимического продукта, а также любых его предшественников.

II. Нуклеотидные конструкции, содержащие FAS-химерный ген и промотор, специфичный для эндотелиальных клеток

[0037] Настоящее изобретение предлагает способы снижения или уменьшения размера опухоли гинекологического рака у женщин путем ингибирования, уменьшения или снижения ангиогенеза или неоваскуляризации в опухоли, включающий введение нуклеотидной конструкции, экспрессирующей FAS-химерный белок. Ген, кодирующий FAS-химерный белок (или генный продукт), в

соответствии с настоящим изобретением может быть связан с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, который управляет экспрессией продукта FAS-химерного гена в эндотелиальных клетках. Экспрессия такого цитотоксического генного продукта может быть полезной в ситуации, когда избыточная неоваскуляризация или чрезмерный рост кровеносных сосудов являются не желательными, например, в опухоли.

[0038] Настоящее изобретение также предлагает гомогенную популяцию нуклеотидной конструкции, содержащей FAS-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток.

А. FAS-химера

[0039] FAS-химерный белок, экспрессируемый нуклеотидной конструкцией настоящего изобретения, содержит, по меньшей мере, два полипептида "рецепторов смерти", полученные из разных белков. Первый полипептид FAS-химерного белка содержит лиганд-связывающий домен рецептора фактора некроза опухоли 1 (TNFR1). Второй полипептид FAS-химерного белка содержит эффекторный домен полипептида FAS.

[0040] Лиганд-связывающий домен TNFR1 может представлять собой любой домен, способный связываться с лигандом TNFR1. В одном варианте осуществления лиганд TNFR1 представляет собой TNF- α . В другом варианте осуществления лиганд TNFR1 представляет собой лимфотоксин- α . Лиганд-связывающий домен TNFR1 может представлять собой внеклеточный домен TNFR1, или любые его фрагменты, варианты, производные или аналоги. Неограничивающие примеры лиганд-связывающего домена TNFR1 приведены ниже.

[0041] Эффекторный домен полипептида FAS, подходящий для применения в настоящем изобретении, включает любой домен FAS, способный образовывать индуцирующий смерть сигнальный комплекс (DISC) и посредством его вызывать апоптоз. В одном варианте осуществления эффекторный домен полипептида FAS включает внутриклеточный домен, трансмембранный домен, или и тот, и другой. Не ограничивающие примеры эффекторных доменов

полипептида FAS описаны ниже.

[0042] TNFR1 и полипептид FAS могут соединяться пептидной связью или посредством линкера. Линкер, соединяющий лиганд-связывающий домен TNFR1 с эффекторным доменом FAS, может представлять собой полипептидный линкер, или непептидный линкер. Например, линкер, используемый для получения FAS-химерного белка, может содержать один или несколько остатков глицина, серина, лейцина, или любые их сочетания. В одном варианте осуществления линкер, подходящий для применения в настоящем изобретении, содержит Ser-Leu. В другом варианте осуществления линкер, подходящий для применения в настоящем изобретении, содержит (GGGS)*n*, (Denise et al. J. Biol. Chem. 277: 35035-35043 (2002)), где *n* может обозначать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большее число (SEQ ID NO: 27).

1. Рецептор фактора некроза опухоли 1

[0043] Полноразмерный полипептид человеческого TNFR1 содержит 455 аминокислот в длину и также известен как TNF-R1, рецептор фактора некроза опухолей типа I (TNFRI), TNFR-I, TNFRSF1A, TNFAR, p55, P60 или CD120a. Известно, что природный человеческий полипептид TNFR1 связывает TNF- α или гомотримерный лимфотоксин- α . Связывание TNF- α с внеклеточным доменом приводит к гомотримеризации TNFR1, который затем специфически взаимодействует с доменом смерти ассоциированного с рецептором фактора некроза опухолей типа 1 белка домена смерти (TRADD). Разные взаимодействующие с TRADD белки, такие как фактор, ассоциированный с рецептором TNF (TRAFS), взаимодействующая с рецептором серин/треонин-специфичная протеинкиназа 1 (RIPK1), и Fas-ассоциированный белок, содержащий домен смерти (FADD), участвуют в образовании комплекса посредством их ассоциации с TRADD. Комплекс активирует, по меньшей мере, два разных сигнальных каскада, сигнальный путь апоптоза и сигнальный путь NF-каппа-B.

[0044] Полипептидная последовательность, содержащая 455 а.к., описанная как полипептидная последовательность человеческого TNFR1, имеет идентификационный номер PI 9438-1 в

базе данных UniProtKB. Указанная полипептидная последовательность человеческого TNFR1 обозначается здесь как изоформа А и описывается в SEQ ID NO: 2. Последовательность SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 2. Полипептидная последовательность, содержащая 108 а.к., описанная как изоформа полипептидной последовательности человеческого TNFR1, имеет идентификационный номер PI 9438-2 в базе данных UniProtKB. Полипептид размером 108 а.к. содержит аминокислоты от 1 до 108 изоформы А (SEQ ID NO: 2) и обозначается здесь как изоформа В. Другой вариант полипептида человеческого TNFR1, содержащий 232 а.к., имеет идентификационный номер PI 9438-3 в базе данных UniProtKB. Полипептид размером 232 а.к. содержит аминокислоты от 1 до 232 изоформы А (SEQ ID NO: 2) и обозначается здесь как изоформа С. Другие природные варианты человеческого TNFR1 включают, без ограничения, полипептид TNFR1 изоформ А, В и С, содержащий одну или несколько мутаций, выбранных из группы, включающей H51Q, C59R, C59S, C62G, C62Y, P75L, T79M, C81F, C99S, S115G, C117R, C117Y, R121P, R121Q, P305T и любые их сочетания. Другие известные варианты TNFR1 включают изоформы полипептида TNFR1 В и С, содержащие L13LILPQ, K255E, S286G, R394L, 412:пропуск, GPAA443-446APP, или любые их сочетания.

[0045] В таблице 1 показаны аминокислотная последовательность человеческого TNFR1 дикого типа и нуклеотидная последовательность, кодирующая TNFR1 дикого типа.

Таблица 1

Последовательности TNFR1

SEQ ID No.	Последовательности
Аминокислотная последовательность TNFR1 (SEQ ID NO: 2)	MGLSTVPDLLLPVLLELLVGYPYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNISICT KCHKGTLYLNDCPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTTVLLPLVIFFGLCLLSLFFIGLMYRYQRWK SKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTTKPLAPNPSFSPTPGFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTYT PGDCPNFAAPRREVAPPYQGADPILATALASDPIPNPLQKWEDSAHKPQSLDTPATLY AVVENVPPLRWKEFVRRRLGLSDHEIDRLQLNGRCLREAQYSMLATWRRRTPRREATLEL LGRVLRDMDLLGCLEDIEEALCGPAALPPAPSLLR

Нуклеотидная последовательность, кодирующая TNFR1 (SEQ ID NO: 1)	Atgggcctctccaccgtgacctgctgctgctgccgctgggtgctcctggagctgttggtg Ggaatataccccctcaggggttattggactggtccctcacctaggggacagggagaagaga Gatagtgtgtgtccccaaggaaaatatccaccctcaaaataattcgatttgctgtacc Aagtgccacaaaaggaacctacttgtaaatgactgtccaggcccgggcaggatacggac Tgcagggagtgtgagagcggtccttcaccgcttcagaaaaccacctcagacactgcctc Agctgctccaaatgccgaaaggaaatgggtcaggtggagatctcttcttgacagtggaac Cgggacaccgtgtgtggctgcaggaagaaccagtaccggcattattggagtgaacacctt Ttccagtgttcaattgcagcctctgacctcaatgggaccgtgcacctctcctgccaggag Aaacagaacaccgtgtgcacctgccatgcaggtttctttctaagagaaaacgagtgtgtc Tcctgtagtaactgtaagaaaagcctggagtgcacgaagtgtgcctacccagattgag Aatgttaagggaactgaggactcaggcaccacagtgtgttgccctggtcattttcttt Ggtctttgccttttatccctcctcttcattggtttaatgtatcgctaccaacgggtggaag Tccaagctctactccattgtttgtgggaaatcgacacctgaaaaagagggggagcttgaa Ggaactactactaagcccctggcccaaaccgaagcttcagtcccactccaggcttcacc Cccaccctgggcttcagtcccgtgccaggttcacacctcacctccagctccacctatacc Cccggtgactgtcccaactttgcggctccccgcagagaggtggcaccacctatcagggg Gctgaccccatccttgcgacagccctcgctccgaccccatcccaaccccccttcagaag Tgggaggacagcgcccaagccacagagcctagacactgatgacccgcgacgctgtac Gccgtggtggagaacgtgcccccggttcgctggaaggaattcgtgcggcgccctagggctg Agcgaccacgagatcgatcggtggagctgcagaacgggcgctgctgcgcgagggcgaa Tacagcatgctggcgacctggaggcggcgacgcgcggcgagggccacgctggagctg Ctgggacgctgctccgcgacatggacctgctgggctgctggaggacatcgaggaggcg ctttgcggccccgcgcctccgcggcgcccagctcttctcaga
Аминокислотная последовательность лиганда, связывающегося с доменом TNFR1 (SEQ ID NO: 4)	MGLSTVPDLLLPLVLLELLVGIYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNSICCT KCHKGTLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMQVEISSCTVD RDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLP

Нуклеотидная последовательность, кодирующая лиганд, связывающийся с доменом TNFR1 (SEQ ID NO: 3)	atgggcctct ccaccgtgcc tgacctgctg ctgccgctgg tgctcctgga gctgttggtg ggaatataacc cctcaggggt tattggactg gtccctcacc taggggacag ggagaagaga gatagtgtgt gtccccaagg aaaatatatc caccctcaaa ataattcgat ttgctgtacc aagtgcaca aaggaaccta cttgtacaat gactgtccag gcccggggca ggatacggac tgcagggagt gtgagagcgg ctcttcacc gcttcagaaa accacctcag acactgcctc agctgctcca aatgccgaaa ggaaatgggt caggtggaga tctcttcttg cacagtggac cgggacaccg tgtgtggctg caggaagaac cagtaccggc attattggag tgaaaacctt ttccagtgtc tcaattgcag cctctgcctc aatgggaccg tgcacctctc ctgccaggag aaacagaaca ccgtgtgcac ctgccatgca ggtttctttc taagagaaaa cgagtgtgtc tctgtagta actgtaagaa aagcctggag tgcacgaagt tgtgcctacc a
--	---

Также описаны полипептидная последовательность мышино TNFR1 и ее варианты. Полипептид мышино TNFR1, содержащий 454 а.к., можно найти в базе данных UniProtKB под идентификационным номером P25118. Известные полипептиды TNFR1, полученные из других животных, включают, без ограничения, крысиный (например, P22934 в базе данных UniProtKB), бычий (например, 019131 в базе UniProtKB), свиной (например, P50555 в базе данных UniProtKB), или лошадиный (например, D1MH71 в базе данных UniProtKB).

[0047] Полноразмерный TNFR1 можно расщепить на две цепи, (1) член 1A суперсемейства рецепторов TNF, мембранная форма (содержащий аминокислоты от 22 до 455 полноразмерного TNFR1) и (2) TNF-связывающий белок 1 (TBPI) (содержащий аминокислоты от 41 до 291 полноразмерного TNFR1). Полипептид полноразмерного человеческого TNFR1 содержит сигнальную последовательность (аминокислоты от 1 до 21 последовательности SEQ ID NO: 2), внеклеточный домен (аминокислоты от 22 до 211 последовательности SEQ ID NO: 2), трансмембранный домен (аминокислоты от 212 до 234 последовательности SEQ ID NO: 2) и цитоплазматический домен (аминокислоты от 235 до 455 последовательности SEQ ID NO: 2). Внеклеточный домен TNFR1 содержит четыре участка цистеиновых повторов, TNFR-Cys1 (аминокислоты от 43 до 82 последовательности SEQ ID NO: 2), TNFR-Cys2 (аминокислоты от 83 до 125 последовательности SEQ ID NO: 2), TNFR-Cys3 (аминокислоты от 126 до 166

последовательности SEQ ID NO: 2) и TNFR-Cys4 (аминокислоты от 167 до 196 последовательности SEQ ID NO: 2).

[0048] Для специалиста в данной области очевидно, что начальные и конечные остатки перечисленных выше доменов могут варьировать в зависимости от используемой программы компьютерного моделирования или способа определения домена. Таким образом, разные функциональные домены TNFR1 могут отличаться от определенных выше.

[0049] В одном варианте осуществления лиганд-связывающий домен TNFR1, подходящий для получения FAS-химерного белка включает, в основном одержит, или содержит внеклеточный домен TNFR1, или любой его фрагмент, вариант, производное или аналог, где внеклеточный домен TNFR1, или любой его фрагмент, вариант, производное или аналог связывается с TNF- α . В другом варианте осуществления лиганд-связывающий домен TNFR1 содержит TNFR-Cys1; TNFR-Cys2; TNFR-Cys3; TNFR-Cys4; TNFR-Cys1 и TNFR-Cys2; TNFR-Cys1 и TNFR-Cys3; TNFR-Cys1 и TNFR-Cys4; TNFR-Cys2 и TNFR-Cys3; TNFR-Cys2 и TNFR-Cys4; TNFR-Cys3 и TNFR-Cys4; TNFR-Cys1, TNFR-Cys2 и TNFR-Cys3; TNFR-Cys1, TNFR-Cys2 и TNFR-Cys4; TNFR-Cys2, TNFR-Cys3 и TNFR-Cys4; или TNFR-Cys1, TNFR-Cys2, TNFR-Cys3 и TNFR-Cys4. В других вариантах осуществления лиганд-связывающий домен TNFR1, входящий в состав FAS-химерного белка, содержит TNF-связывающий белок I. В следующих вариантах осуществления лиганд-связывающий домен TNFR1, входящий в состав FAS-химерного белка, включает, в основном содержит или содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, содержащей аминокислоты 22-190, аминокислоты 22-191, аминокислоты 22-192, аминокислоты 22-193, аминокислоты 22-194, аминокислоты 22-195, аминокислоты 22-196, аминокислоты 22-197, аминокислоты 22-198, аминокислоты 22-199, аминокислоты 22-200, аминокислоты 22-201, аминокислоты 22-202, аминокислоты 22-203, аминокислоты 22-204, аминокислоты 22-205, аминокислоты 22-206, аминокислоты 22-207, аминокислоты 22-208, аминокислоты 22-209, аминокислоты 22-210, или аминокислоты 22-

211 последовательности SEQ ID NO: 2, где лиганд-связывающий домен связывается с лигандом TNFR1, таким как TNF- α .

[0050] В других вариантах осуществления лиганд-связывающий домен TNFR1 дополнительно содержит сигнальный пептид. Одним из примеров подходящих сигнальных пептидов является сигнальный пептид TNFR1, например, включающий аминокислоты 1-21 последовательности SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления лиганд-связывающий домен FAS-химерного генного продукта включает, по существу содержит, или содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, содержащей аминокислоты 1-190, аминокислоты 1-191, аминокислоты 1-192, аминокислоты 1-193, аминокислоты 1-194, аминокислоты 1-195, аминокислоты 1-196, аминокислоты 1-197, аминокислоты 1-198, аминокислоты 1-199, аминокислоты 1-200, аминокислоты 1-201, аминокислоты 1-202, аминокислоты 1-203, аминокислоты 1-204, аминокислоты 1-205, аминокислоты 1-206, аминокислоты 1-207, аминокислоты 1-208, аминокислоты 1-209, аминокислоты 1-210, или аминокислоты 1-211 последовательности SEQ ID NO: 2, где лиганд-связывающий домен связывается с лигандом TNFR1, таким как TNF- α . В конкретном варианте осуществления лиганд-связывающий домен TNFR1, входящий в состав FAS-химерного белка, включает, в основном содержит или содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4, где лиганд-связывающий домен связывается с лигандом TNFR1, таким как TNF- α .

[0051] В следующих вариантах осуществления лиганд-связывающий домен TNFR1 кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO: 3.

[0052] В других вариантах осуществления лиганд-связывающий домен TNFR1, входящий в состав FAS-химерного белка, включает, в основном содержит или содержит аминокислотную

последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, содержащей аминокислоты 22-108 последовательности SEQ ID NO: 2 (TNFR1, изоформа B), аминокислоты 22-232 последовательности SEQ ID NO: 2 (TNFR1, изоформа C), или аминокислоты 44-291 последовательности SEQ ID NO: 2 (TBP1), где лиганд-связывающий домен связывается с лигандом TNFR1, таким как TNF- α .

2. Полипептид FAS

[0053] Полноразмерный полипептид человеческого FAS содержит 335 аминокислот в длину и также известен как член 6 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, антиген Apo-1, апоптоз-опосредующий поверхностный антиген FAS, рецептора FASLG или CD95. Природный полипептид FAS является рецептором TNFSF6/FASLG. При связывании полипептид FAS с лигандом FAS (FasL) взаимодействие между FAS и FasL приводит к образованию смерть-индуцирующего сигнального комплекса (DISC), который содержит FADD, каспазу-8 и каспазу-10. В клетках некоторых типов (тип I), процессированная каспаза-8 непосредственно активирует другие члены семейства каспаз и запускает выполнение апоптоза клетки. В клетках других типов (тип II) FAS-DISC инициирует цикл обратной связи, что приводит к постепенному увеличению высвобождения проапоптозных факторов из митохондрий и усиление активации каспазы-8. FAS-опосредованный апоптоз может участвовать в индукции периферической толерантности, антиген-стимулированного суицида зрелых клеток, или того и другого.

[0054] Полипептидную последовательность, содержащую 335 а.к., описанную как полипептидная последовательность человеческого FAS, можно найти в базе данных UniProtKB под идентификационным номером P25445-1. Данная полипептидная последовательность человеческого FAS обозначается здесь как SEQ ID NO: 6. Последовательность SEQ ID NO: 5 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 6. Нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид FAS, также известна как APT1, FAS1 или TNFRSF6. Полноразмерный

полипептид FAS содержит сигнальный пептид (аминокислоты от 1 до 25 последовательности SEQ ID NO: 6), внеклеточный домен (аминокислоты от 26 до 173 последовательности SEQ ID NO: 6), трансмембранный домен (аминокислоты от 174 до 190 последовательности SEQ ID NO: 6) и внутриклеточного (или цитоплазматический) домен (аминокислоты от 191 до 335 последовательности SEQ ID NO: 6). Внутриклеточный домен содержит домен смерти (например, аминокислоты 230-314 последовательности SEQ ID NO: 6).

[0055] Для специалиста в данной области очевидно, что начальные и конечные остатки перечисленных выше доменов могут варьировать в зависимости от используемой программы компьютерного моделирования или способа определения домена. Таким образом, разные функциональные домены FAS могут отличаться от определенных выше. В таблице 2 приведены аминокислотная последовательность человеческого FAS дикого типа и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок FAS.

Таблица 2

Последовательности FAS

	Последовательности
Аминокислотная последовательность человеческого белка FAS (SEQ ID NO: 6)	MLGIWTLPLVLTSSVARLSSKSVNAQVTDINSKGLLELRKTVTTVETQNLLEGLHHGQFCH KPCPPGERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTDKANHSSKCRRCRLCDEGHGLEVEINCT RTQNTKCRCKPNFFCNSTVCEHCDPCTKCEHGIKECTLTSTNTKCKEEGSRNLGWLCLL LLPIPLIVVVKRKEVQKTCRKHRENQGSHESTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVM TLSQVKGfVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWNQLHGKKEAYDTLIKDLKK ANLCTLAEKIQTIILKDITSSENSNFRNEIQSLV
Нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность человеческого FAS (SEQ ID NO: 5)	Atgctgggcatctggaccctcctacctctggttcttacgtctggtgctagattatcgtcc Aaaagtgttaatgcccaagtgactgacatcaactccaagggattggaattgaggaagact Gttactacagttgagactcagaacttggaaggcctgcatcatgatggccaattctgccat Aagccctgtcctccaggtgaaaggaaagctagggactgcacagtcaatggggatgaacca Gactgctgcccctgccaaagggaaggagtacacagacaaagcccatttttcttccaaa Tgcagaagatgtagattgtgtgatgaaggacatggcttagaagtggaaataaactgcacc Cggaccacagaataccaagtgcagatgtaaaccaaaacttttttgtaactctactgtatgt Gaacactgtgacccttgaccaaagtgaacatggaatcatcaaggaatgcacactcacc Agcaacaccaagtgcaaagaggaaggatccagatctaacttgggggtggctttgtcttctt

	Cttttgccaatccactaattgtttgggtgaagagaaaggaagtacagaaaacatgcaga Aagcacagaaaggaaaaccaagggttctcatgaatctccaactttaaatcctgaaacagtg Gcaataaatttatctgatgttgacttgagtaaatatcaccactattgctggagtcagt Acactaagtcaagttaaaggctttgttcgaaagaatgggtgtcaatgaagccaaaatagat Gagatcaagaatgacaatgtccaagacacagcagaaacagaaagttcaactgcttcgtaat Tggcatcaacttcatggaaagaaagaagcgtatgacacattgattaaagatctcaaaaaa Gccaatctttgtactcttgcagagaaaattcagactatcatcctcaaggacattactagt Gactcagaaaattcaaacttcagaaatgaaatccaaagcttggtctag
Амино- кислотная последо- вательность эффекторного домена FAS (SEQ ID NO: 8)	GSRSNLGLCLLLLPIPLIVVVKRKEVQKTCRKHRRKENQGS HESPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTTAGVMTLSQVKGFVR KNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAY DTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEIQ SLV
Нуклео- тидная последо- вательность, кодирующая эффекторный домен FAS (SEQ ID NO: 7)	Aggatccagatctaacttgggggtggctttgtcttcttctttgccaatccactaatt Gtttgggtgaagagaaaggaagtacagaaaacatgcagaaagcacagaaaggaaaacc Aaggttctcatgaatctccaaccttaaatcctgaaacagtggaataaatttatctga Tgttgacttgagtaaatatcaccactattgctggagtcagtacactaagtcaagtt Aaaggctttgttcgaaagaatgggtgtcaatgaagccaaaatagatgagatcaagaatg Acaatgtccaagacacagcagaaacagaaagttcaactgcttcgtaattggcatcaact Tcatggaaagaaagaagcgtatgacacattgattaaagatctcaaaaaagccaatctt Tgtactcttgcagagaaaattcagactatcatcctcaaggacattactagtgactcag aaaattcaaacttcagaaatgaaatccaaagcttggtctag

[0056] Также описаны полипептидная последовательность мышинового FAS и ее варианты. Полипептид мышинового FAS, содержащий 327 а.к. можно найти в базе данных UniProtKB под идентификационным номером P25446. Известные полипептиды FAS, полученные из других животных, включают, без ограничения, включают полипептиды, полученные из старосветской мартышки (например, Q9BDN4 в базе данных UniProtKB), макаки-резуса (например, Q9BDP2 в базе данных UniProtKB), крысы (например, Q63199 в базе данных UniProtKB) или коровы (например, P51867 в базе данных UniProtKB).

[0057] На основании изменения последовательности полипептида FAS рядовой специалист в данной области может идентифицировать вариации последовательности в эффекторном

домене полипептида FAS. Например, природные варианты эффекторных доменов FAS могут содержать одну или несколько замен или мутаций, выбранных из C178R, L180F, P183L, I184V, T198I, Y232C, T241K, T241P, V249L, R250P, R250Q, G253D, G253S, N255D, A257D, I259R, D260G, D260V, D260Y, I262S, N264K, T270I, T270K, E272G, E272K, L278F, K299N, T305I, I310S, или любые их сочетания.

[0058] В одном варианте осуществления эффекторный домен полипептида FAS, подходящий для применения в настоящем изобретении, содержит домен смерти полипептида FAS. В другом варианте осуществления эффекторный домен полипептида FAS включает, в основном содержит, или содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 230-314 последовательности SEQ ID NO: 6. В других вариантах осуществления эффекторный домен полипептида FAS содержит внутриклеточный домен полипептида FAS. В других вариантах осуществления эффекторный домен полипептида FAS содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, содержащей аминокислоты 185-335, аминокислоты 186-335, аминокислоты 187-335, аминокислоты 188-335, аминокислоты 189-335, аминокислоты 190-335, аминокислоты 191-335, аминокислоты 192-335, аминокислоты 193-335, аминокислоты 194-335, аминокислоты 195-335, аминокислоты 196-335, аминокислоты 197-335, аминокислоты 198-335, аминокислоты 199-335 последовательности SEQ ID NO: 6.

[0059] В следующих вариантах осуществления эффекторный домен полипептида FAS дополнительно содержит трансмембранный домен полипептида FAS. В других вариантах осуществления эффекторный домен полипептида FAS содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 174-335 последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен полипептида FAS дополнительно содержит примерно десять, примерно девять, примерно восемь,

примерно семь, примерно шесть, примерно пять аминокислот, примерно четыре, примерно три, примерно две аминокислоты, или примерно одну аминокислоту из С-концевого участка внеклеточного домена FAS. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен полипептида FAS содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, содержащей аминокислоты 179-335, аминокислоты 178-335, аминокислоты 177-335, аминокислоты 176-335, аминокислоты 175-335, аминокислоты 174-335, аминокислоты 173-335, аминокислоты 172-335, аминокислоты 171-335, аминокислоты 170-335, аминокислоты 169-335, аминокислоты 168-335, аминокислоты 167-335, аминокислоты 166-335, аминокислоты 165-335, аминокислоты 164-335 или аминокислоты 163-335 последовательности SEQ ID NO: 6, где эффекторный домен образует смерть-индуцирующий сигнальный комплекс (DISC), активирует каспазу 8 или индуцирует апоптоз.

[0060] В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен полипептида FAS включает, в основном содержит, или содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 8, где эффекторный домен образует смерть-индуцирующий сигнальный комплекс (DISC), активирует каспазу 8 или индуцирует апоптоз.

[0061] В других вариантах осуществления эффекторный домен полипептида FAS кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности SEQ ID NO: 7.

[0062] В одном варианте осуществления продукт FAS-химерного гена настоящего изобретения включает, в основном содержит или содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 10, где продукт FAS-химерного гена индуцирует апоптоз. В другом варианте осуществления продукт FAS-химерного гена кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

или 100% идентичной SEQ ID NO: 9, где продукт FAS-химерного гена индуцирует апоптоз.

В. Промотор, специфичный для эндотелиальных клеток

[0063] Нуклеотидная конструкция, содержащая FAS-химерный ген, дополнительно содержит один или несколько элементов, контролирующих экспрессию, подходящих для регуляции экспрессии функционально связанного Fas-химерного гена. Элементы, контролирующие экспрессию, включают, без ограничения, промоторы, сигналы секреции и другие регуляторные элементы.

[0064] Нуклеотидная конструкция, подходящая для применения в настоящем изобретении, содержит промотор, специфичный для эндотелиальных клеток, который обеспечивает экспрессию FAS-химерного белка в эндотелиальных клетках, индуцируя таким образом апоптоз эндотелиальных клеток.

[0065] В целях настоящего изобретения промотор, специфичный для эндотелиальных клеток, может содержать один или несколько цис-регуляторных элементов, которые улучшают специфичность промоторов в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим цис-регуляторные элементы. В одном примере цис-регуляторный элемент содержит энхансер. В другом аспекте цис-регуляторный элемент содержит элемент, отвечающий на гипоксию. В других примерах, цис-регуляторный элемент включает как энхансер, так и элемент, отвечающий на гипоксию.

[0066] В одном варианте осуществления энхансер, подходящий для применения в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 (комплементарную последовательности SEQ ID NO: 11), где энхансер повышает специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансер. Энхансер может также содержать дополнительную нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14 (комплементарную последовательности SEQ ID NO: 13).

[0067] В другом варианте осуществления энхансер, подходящий для применения в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14 (комплементарную последовательности SEQ ID NO: 13), где энхансер повышает специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансер. Энхансер может дополнительно содержать другую нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 (комплементарную последовательности SEQ ID NO: 11).

[0068] В других вариантах осуществления энхансер, подходящий для применения в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16 (комплементарную последовательности SEQ ID NO: 15), где энхансер повышает специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансер. В других вариантах осуществления энхансер, используемый для получения нуклеотидной конструкции, содержит последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16, или ее любые фрагменты, варианты, производные или аналоги, где фрагменты, варианты, производные или аналоги повышают специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансер.

[0069] В некоторых вариантах осуществления энхансер, подходящий для применения в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23, где энхансер повышает специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансер. В других вариантах осуществления энхансер,

используемый для получения нуклеотидной конструкции, содержит последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23, или любые ее фрагменты, варианты, производные или аналоги, где фрагменты, варианты, производные, или аналоги повышают специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансер.

[0070] В других вариантах осуществления энхансер, подходящий для применения в настоящем изобретении, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, где энхансер повышает специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансер. В других вариантах осуществления, энхансер, используемый для получения нуклеотидной конструкции, содержит последовательность SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, или любые ее фрагменты, варианты, производные или аналоги, где фрагменты, варианты, производные, или аналоги повышают специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансер.

[0071] В таблице 3 приведены разные энхансерные последовательности, подходящие для применения в настоящем изобретении.

Таблица 3

Энхансерные элементы и промотеры, специфичные для
эндотелиальных клеток

SEQ ID NOs	Последовательности
SEQ ID NO: 11	ctggaggggtg actttgcttc tggagccagt acttcatact tttcatt
SEQ ID NO: 12	aatgaaaagt atgaagtact ggctccagaa gcaaagtcac cctccag
SEQ ID NO: 13	gtacttcata cttttcattc caatgggggtg actttgcttc tgga
SEQ ID NO: 14	tccagaagca aagtcacccc attggaatga aaagtatgaa gtac

SEQ ID NO: 15	Энхансерный элемент 3X ctccagaagcaaaagtcaccccatcgaatgaaaagatgaagtacaatgaaaagatgaagt actggctccagaagcaaaagtcacccctccagaagcaaaagtcaccccatcgaatgaaaagat gaagtac
SEQ ID NO: 16	Энхансерный элемент 3X (Последовательность, комплементарная SEQ ID NO: 15) gtacttcatacttttcattccaatggggtgactttgcttctggagggtgactttgcttctgg agccagtacttcatacttttcattgtacttcatacttttcattccaatggggtgactttgct tctggag
SEQ ID NO: 17	Промотор PPE-1 gtacgtgtacttctgatcggcgatactaggagataaggatgtgcctgacaaaaccacattg ttgttggttatcattattatttagttttccttccttgctaactcctgacggaatctttctcac ctcaaagtcgaagtaacttttagtttagaaaagacttggtggaaggggtggtggtggaaaagta gggtgatcttccaaactaatctggttccccgccccagtagctgggattcaagagcgaa gagtggggatcgtcccttggttgatcagaaagacataaaaaggaaaatcaagtgaacaatga tcagccccacctccacccccacccccctgcgcgcgcacaatacaatctatttaattgtacttc atacttttcattccaatggggtgactttgcttctggagaaactcttgattcttgaactctgg ggctggcagctagcaaaaggggaagcgggctgctgctctctgcaggttctgcagcgggtctct gtctagtgggtgttttcttttcttagccctgccctggattgtcagacggcgggctctgc ctctgaagttagccgtgatttcctctagagccgggtcttatctctggctgcacgttgccctgt gggtgactaatcacacaataacattgtttagggtggaatgaagtcagagctgtttaccccc actctataggggttcaatataaaaaggcggcgagaactgtccgagtcagaagcgttcctgc accggcgtgagagcctgaccgggtctgctccgctgtccttgcgcgctgectcccggtgce cgcgacgctttcgccccagtggaagggccacttgctgcggccgc
SEQ ID NO: 18	Промотор PPE-L-3X gtacgtgtacttctgatcggcgatactaggagataaggatgtgcctgacaaaaccacattg ttgttggttatcattattatttagttttccttccttgctaactcctgacggaatctttctcac ctcaaagtcgaagtaacttttagtttagaaaagacttggtggaaggggtggtggtggaaaagta gggtgatcttccaaactaatctggttccccgccccagtagctgggattcaagagcgaa gagtggggatcgtcccttggttgatcagaaagacataaaaaggaaaatcaagtgaacaatga tcagccccacctccacccccacccccctgcgcgcgcacaatacaatctatttaattgtacttc atacttttcattccaatggggtgactttgcttctggagaaactcttgattcttgaactctgg ggctggcagctagcctccagaagcaaaagtcaccccatcgaatgaaaagatgaagtacaat gaaaagatgaagtaactggctccagaagcaaaagtcacccctccagaagcaaaagtcaccccat ggaatgaaaagatgaagtagcctagcaaaaggggaagcgggctgctgctctctgcaggttc tgacagcgggtctctgtctagtgggtgttttcttttcttagccctgccctggattgtcagac ggcgggctctgctctgaagttagccgtgatttcctctagagccgggtcttatctctggct gcacgttgccctgtgggtgactaatcacacaataacattgtttagggtggaatgaagtcaga gctgtttacccccactctataggggttcaatataaaaaggcggcgagaactgtccgagtc gaagcgttcctgcaccggcgtgagagcctgaccgggtctgctccgctgtccttgcgcgctg cctcccggtgcccgcgacgctttcgccccagtggaagggccacttgctgcggccgc

SEQ ID NO: 22	ggtgactttg cttctggag
SEQ ID NO: 23	ctccagaagcaaaagtcacc
SEQ ID NO: 24	gtacttcata cttttcatt
SEQ ID NO: 25	aatgaaaagtatgaagtac
SEQ ID NO: 26	Элемент, отвечающий на гипоксию gcacgt

[0072] Энхансер настоящего изобретения может быть связан с промотором выше или ниже его по ходу считывания, или его можно вставить между двух нуклеотидов промотора. В настоящем изобретении в качестве промотора, специфичного для эндотелиальных клеток, можно использовать любые промоторы, известные в данной области техники. Например, промоторы, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают специфичные для эндотелия промоторы: промотор препроэндоотелина-1 (промотор PPE-1), US 2010/0282634, опубликованный 11 ноября 2010; и WO 2011/083464, опубликованный 14 июля 2011); промотор PPE-L-3X (патент США № 7579327, патент США № 8071740, US 8039261, US 2010/0282634, US 2007/0286845, WO 2011/083464, и WO 2011/083466); промоторы TIE-1 (S79347, S79346) и TIE-2 (U53603) [Sato TN, Proc Natl Acad Sci USA 1993 15 октября; 90 (20): 9355-8], промотор эндоглина [Y11653; Rius C, Blood 1998 Dec 15; 92(12): 4677-90], фактор фон Виллебранда [AF152417; Collins CJ Proc Natl Acad Sci USA 1987 Jul; 84(13): 4393-7], промотора KDR/flk-1 [X89777, X89776; Ronicke V, Circ Res 1996 Aug; 79(2): 277-85], промотор FLT-1 [D64016 AJ224863; Morishita K: J Biol Chem 1995 Nov 17; 270(46): 27948-53], промотор Egr-1 [AJ245926; Sukhatme VP, Oncogene Res 1987 Sep-Oct; 1(4): 343-55], промотор Е-селектина [Y12462; Collins T J Biol Chem 1991 Feb 5; 266(4): 2466-73], промоторы молекул адгезии эндотелиальных клеток: ICAM-1 [X84737; Horley KJ EMBO J 1989 Oct; 8(10):2889-96], промоторы VCAM-1 [M92431; Iademarco MF, J Biol Chem 1992 Aug 15; 267(23): 16323-9], PECAM-1 [AJ313330 X96849; CD31, Newman PJ, Science 1990 Mar 9; 247(4947): 1219-22; 247 (4947): 1219-

22], элементы, специфичные для сосудов гладкой мускулатуры: промотор CARG box X53154 и карбоксипептидаза-подобного белка аорты (ACLP), промотор [AF332596; Layne MD, Circ Res. 2002; 90: 728-736] и промотор гена-1, экспрессирующегося преимущественно в аорте [Yen-Hsu Chen J. Biol. Chem, vol. 276, Issue 50, 47658-47663, December 14, 2001], где все указанные документы включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей их полноте.

[0073] В одном варианте осуществления промотор, связанный с энхансером, специфичным для эндотелиальных клеток, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 17, где промотор, связанный с энхансером, индуцирует специфичную для эндотелиальных клеток экспрессию гена, функционально связанного с промотором. В другом варианте осуществления промотор, связанный с энхансером, специфичным для эндотелиальных клеток, содержит фрагмент, вариант, производное или аналог промотора PPE-1 дикого типа, где указанный фрагмент, вариант, производное или аналог индуцирует специфичную для эндотелиальных клеток экспрессию гена, функционально связанного с промотором. В одном примере специфичный для эндотелиальных клеток энхансер может быть вставлен между нуклеотидными остатками 442 и 449 последовательности SEQ ID NO: 17.

[0074] В других вариантах осуществления специфичный для эндотелиальных клеток промотор содержит элемент, отвечающий на гипоксию. Элемент, отвечающий на гипоксию (HRE), расположен в антисмысловой цепи промотора эндотелина-1. Данный элемент представляет собой связывающий участок гипоксия-индуцируемого фактора-1, который необходим для положительной регуляции промотора эндотелина-1 (человеческого, крысиного и мышинного гена) под действием гипоксии. Гипоксия является сильным сигналом, индуцирующим экспрессию нескольких генов, включающих в себя эритропоэтин (Epo), VEGF, а также разные гликолитические ферменты. Сердцевинная последовательность (8 пар оснований) является консервативной для всех генов, отвечающих за гипоксические состояния, а фланкирующие участки у разных генов

являются разными. Элемент ET-I, отвечающий на гипоксию, расположен между GAT A-2 и участками связывания AP-1. В одном примере элемент, отвечающий на гипоксию, содержит последовательность SEQ ID NO: 26, ее фрагмент, вариант, производное или аналог.

[0075] В других вариантах осуществления специфичный для эндотелиальных клеток промотор, подходящий для применения в настоящем изобретении, включает, в основном содержит, или содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 18, где промотор, связанный с энхансером, индуцирует специфичную для эндотелиальных клеток экспрессию гена, функционально связанного с промотором. В другом варианте осуществления специфичный для эндотелиальных клеток промотор содержит фрагмент, вариант, производное или аналог последовательности SEQ ID NO: 18, где фрагмент, вариант, производное или аналог индуцирует специфичную для эндотелиальных клеток экспрессию гена, функционально связанного с промотором.

[0076] Другие варианты специфичных для эндотелиальных клеток промоторов можно найти на WO2011/083464, WO2011/083466, WO2012 и/052423, которые включены в данное описание в качестве ссылки во всей их полноте.

[0077] Настоящее изобретение также относится к новой промоторной последовательности, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17. В одном примере промотор дополнительно содержит специфичный для эндотелиальных клеток энхансер. В одном примере специфичный для эндотелиальных клеток энхансер содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, или любые фрагменты, производные, варианты или аналоги указанных последовательностей, где указанные фрагменты, производные, варианты или аналоги повышают специфичность промотора в отношении эндотелиальных клеток по сравнению с промотором, не содержащим энхансера. В другом примере промотор содержит

нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 18. Изобретение предлагает нуклеотидную конструкцию, содержащую новый промотор и гетерологичную нуклеотидную последовательность. В одном варианте осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанный здесь FAS-химерный белок. В другом варианте осуществления гетерологичная нуклеотидная последовательность содержит последовательность аденовируса.

С. Вектор

[0078] Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему нуклеотидную конструкцию, включающую в себя FAS-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток. В целях настоящего изобретения можно использовать многочисленные векторные системы. Например, разные системы доставки вирусного гена, подходящие для осуществления данного аспекта изобретения, включают, без ограничения, аденовирусный вектор, альфавирусный вектор, энтеровирусный вектор, пестивирусный вектор, лентивирусный вектор, бакуловирусный вектор, герпесвирусный вектор, вектор на основе вируса Эпштейна-Барра, паповавирусный вектор, поксвирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, аденоассоциированный вирусный вектор и вектор на основе вируса простого герпеса.

[0079] В другом варианте осуществления вектор, содержащий FAS-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, представляет собой аденовирус. Например, аденовирус может представлять собой один или несколько из человеческих аденовирусов разновидностей А (серотипы 12, 18 и 31), В (серотипы 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50 и 55), С (серотипы 1, 2, 5, 6 и 57), D (8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54 и 56), Е (серотип 4), F (серотип 40 и 41) или С (серотип 52). В конкретном варианте осуществления аденовирус настоящего изобретения представляет собой человеческий аденовирус серотипа 5. В некоторых вариантах осуществления аденовирус, используемый в генной терапии, представляет собой рекомбинантный

нереплицирующийся аденовирус, который не содержит участок E1 и участок E3. В некоторых вариантах осуществления аденовирус настоящего изобретения представляет собой условно реплицирующийся аденовирус, который не содержит участок E3, но содержит участок E1.

D. Биологическое депонирование

[0080] Биологические образцы помещают на хранение в Европейскую коллекцию клеточных культур (ECACC), расположенную в Коллекциях культур Агентства по защите здоровья, Агентство по защите здоровья, микробиологический отдел, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, UK, в соответствии с Будапештским договором и в соответствии с 37 CFR § 1.808. Образцы депонированных материалов станут доступны для общественности после выдачи патента. Объем описанного и заявленного здесь изобретения не ограничивается депонированным штаммом, поскольку депонированный вариант осуществления предназначен только для иллюстрации изобретения.

Штамм	№ доступа в ECACC	Дата депонирования
VB-111	13021201	12 февраля 2013 г

III. Способы лечения с использованием аденовируса, обеспечивающего экспрессию FAS-химерного белка

[0081] Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к способам применения нуклеотидной конструкции, экспрессирующей FAS-химерный белок, или аденовируса, содержащего нуклеотидную конструкцию. В одном аспекте нуклеотидную конструкцию, экспрессирующую FAS-химерный белок, или аденовирус, содержащий нуклеотидную конструкцию, используют для снижения или уменьшения размера опухоли, или устранения опухоли у индивидуума, где указанный FAS-химерный белок, кодируемый нуклеотидной конструкцией, снижает или уменьшает размер опухоли, или замедляет скорость роста опухоли, или предотвращает появление новых метастазов опухоли, или устраняет опухоль у индивидуума, и где опухоль порождена или связана с гинекологическим раком женщин, или его метастазами. Указанные эффекты можно определить с помощью радиологических

диагностических анализов (таких как КТ) и/или анализа опухолевых маркеров (такого как определение уровня СА-125 в крови). В другом аспекте нуклеотидную конструкцию, экспрессирующую FAS-химерный белок, или аденовирус, содержащий нуклеотидную конструкцию, можно использовать для ингибирования, уменьшения или снижения неоваскуляризации или ангиогенеза в опухоли, где FAS-химерный белок, кодируемый нуклеотидной конструкцией, ингибирует, снижает или уменьшает неоваскуляризацию или ангиогенез в опухоли, и где опухоль порождена или связана с гинекологическим раком женщин, или его метастазами. В других аспектах нуклеотидную конструкцию, экспрессирующую FAS-химерный белок, или аденовирус, содержащий нуклеотидную конструкцию, можно использовать для лечения или профилактики опухоли, порожденной или связанной с гинекологическим раком женщин, или его метастазами, у индивидуума, где FAS-химерный белок, кодируемый нуклеотидной конструкцией, обеспечивает лечение или профилактику гинекологического рака у женщин, или его метастаз.

[0082] Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения или уменьшения размера опухоли, или ее метастаз, устранения опухоли или ее метастаз, или замедления роста опухоли, или ее метастаз, у индивидуума, включающий введение пациенту эффективного количества нуклеотидной конструкции, содержащей FAS-химерный ген, функционально связанный со специфичным для эндотелиальных клеток промотором, или аденовируса, содержащего нуклеотидную конструкцию, где продукт Fas-химерного гена, кодируемый нуклеотидной конструкцией, снижает или уменьшает размер опухоли, или ее метастаз, или устраняет опухоль или ее метастазы у индивидуума, и где опухоль или ее метастазы порождены или связаны с гинекологическим раком у женщин. В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ ингибирования, уменьшения или снижения неоваскуляризации или ангиогенеза в опухоли или ее метастазах, включающий введение индивидууму, страдающего от опухоли или ее метастазов, эффективного количества нуклеотидной конструкции, или

аденовируса, содержащего нуклеотидную конструкцию, которая содержит FAS-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, где продукт FAS-химерного гена, кодируемый нуклеотидной конструкцией, ингибирует, уменьшает или снижает неоваскуляризацию или ангиогенез в опухоли или ее метастазах, и где опухоль или ее метастазы порождены или связаны с гинекологическим раком у женщин. В других аспектах изобретение предлагает способ лечения или профилактики опухоли или ее метастаз, порожденных или связанных с гинекологическим раком, у индивидуума, включающий введение эффективного количества нуклеотидной конструкции, содержащей FAS-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, где продукт FAS-химерного гена, кодируемый нуклеотидной конструкцией, обеспечивает лечение или профилактику гинекологического рака у пациента. В других вариантах осуществления опухоль, связанная с гинекологическим раком или его метастазами, уменьшается в размере или исчезает после введения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение размера опухоли или ее метастаз включает уменьшение самого длинного диаметра (LD) опухоли, по меньшей мере, примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% по сравнению с LD до введения. В некоторых вариантах осуществления изобретение предлагает способ стабилизации заболевания или расстройства, связанного с гинекологическим раком у женщин. Например, изобретение включает способ профилактики или замедления дальнейшего роста опухоли, связанной с гинекологическим раком у женщин. В других вариантах осуществления настоящее изобретение позволяет уменьшить объем злокачественной перитонеальной жидкости, такой как асцит, уменьшить боль у индивидуума, увеличить выживаемость индивидуума, или достичь любых сочетаний указанных эффектов. В других вариантах осуществления аденовирус настоящего изобретения после введения индивидууму продлевает общую выживаемость индивидуума. В других вариантах осуществления аденовирус настоящего изобретения после введении индивидууму увеличивает выживаемость индивидуума при отсутствии

прогрессирования заболевания.

[0083] В одном варианте осуществления гинекологический рак у женщин может представлять собой рак Мюллера, рак яичника, рак брюшной полости, рака фаллопиевой трубы, папиллярный серозный рак матки, а также их метастазы и любые сочетания. В другом варианте осуществления гинекологический рака у женщин может представлять собой рак шейки матки, рак эндометрия, гестационную трофобластическую болезнь, рак матки, рак вульвы, их метастазы или любые сочетания. В других вариантах осуществления гинекологический рак у женщин включает любые злокачественный рост, возникающий в гинекологической ткани, например, в матке, яичниках, фаллопиевых трубах, шейке матки, яйцеклетках, поддерживающих клетках, или любых их сочетаниях. В некоторых вариантах осуществления опухоль, порожденная или связанная с гинекологическим раком у женщин, может быть выбрана из группы, включающей поверхностную эпителиально-стромальную опухоль (аденокарциному), папиллярную серозную цистаденокарциному, эндометриоидную опухоль, серозную цистаденокарциному, папиллярную опухоль, муцинозную цистаденокарциному, прозрачноклеточную опухоль яичников, коллоидную аденокарциному, цистаденокарциному, карциному, опухоль стромы полового тяжа яичников, опухоль зародышевых клеток, тератому, дисгерминому, эпидермоидную (плоскоклеточную) карциному, опухоль Бреннера, их метастазы или любые сочетания.

[0084] Рак Мюллера в соответствии с настоящим изобретением включает злокачественную смешанную опухоль Мюллера, также известную как злокачественная смешанная мезодермальная опухоль, МММТ, и карциносаркома. МММТ представляет собой злокачественное новообразование, которое можно обнаружить в матке, яичниках, фаллопиевых трубах и других частях тела, содержащее как карциноматозные (эпителиальная ткань), так и саркоматозные (соединительная ткань) компоненты. Данное заболевание подразделяют на два типа, гомологичный (при котором саркоматозный компонент образуется из тканей, присутствующих в матке, таких как эндометриальные, фиброзные и/или гладкомышечные ткани) и гетерологичный тип (при котором

поражаются ткани, не относящиеся к матке, такие как хрящ, скелетные мышцы и/или кости). МММТ составляет от двух до пяти процентов всех опухолей тела матки и встречается преимущественно у женщин в постменопаузе со средним возрастом 66 лет.

[0085] Рак яичников включает любую злокачественную опухоль яичника. Большую часть (более 90%) случаев рака яичников относят к "эпителиальному" раку, который предположительно возникает на поверхности (в эпителии) яичника. Однако фаллопиевы трубы также могут быть источником некоторых раковых опухолей яичников. Поскольку яичники и трубы тесно связаны друг с другом, считается, что упомянутые фаллопиевы раковые клетки могут имитировать рак яичников. Другие типы рака могут возникнуть из яйцеклеток (герминогенные опухоли) или поддерживающих клеток. В некоторых вариантах осуществления рак яичника является вторичным раком, результатом метастазирования первичного рака, возникшего в других частях тела. Примерно 7% случаев рака яичников связано с метастазами, тогда как остальные случаи представляют собой первичные раковые опухоли. Распространенные первичные раковые опухоли включают рак молочной железы и рак двенадцатиперстной кишки.

[0086] Рак или карцинома брюшной полости также известен как: серозный поверхностный папиллярный рак, первичная карцинома брюшной полости, экстраовариальная серозная карцинома, первичная серозная папиллярная карцинома, или псаммоматозная карцинома. Данный рак исторически классифицируется как "карцинома неизвестного происхождения" (CUP). Первичный перитонеальный рак (PPC или PPCa) представляет собой рак клеток, выстилающих брюшину, или брюшную полость. Гистоморфологические и молекулярно-биологические характеристики свидетельствуют о том, что серозные карциномы, которые включают серозную карциному яичника, серозную карциному матки, серозную карциному фаллопиевых труб, серозную карциному шейки матки и первичную перитонеальную серозную карциному, в действительности относятся к одному типу.

[0087] Первичный рак фаллопиевых труб (PFTC), часто

называемый просто трубный рак, представляет собой злокачественную опухоль, которая возникает в фаллопиевой трубе. Трубный рак считается относительно редким первичным раком у женщин и составляет от 1 до 2 процентов от всех гинекологических раков.

[0088] Серозная карцинома матки (ОСК), также известная как папиллярная серозная карцинома матки (UPSC) и серозная аденокарцинома матки, является нераспространенной формой рака эндометрия, которая обычно развивается у женщин в постменопаузе. Данное заболевание, как правило, диагностируют путем биопсии эндометрия, на необходимость которой указывает маточное кровотечение в менопаузе. В отличие от более распространенной эндометриоидной аденокарциномы эндометрия с низкой степенью дедифференцировки, USC не развиваются в результате гиперплазии эндометрия и не является гормон-чувствительной. Она возникает в условиях атрофии эндометрия и классифицируется как рак эндометрия типа II.

[0089] Термин "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент", или "млекопитающее", относится к любому субъекту, в частности к млекопитающему, у которого присутствует или может развиться, по меньшей мере, одна опухоль, порожденная или связанная с перитонеальным раком или гинекологическим раком у женских особей. В одном варианте осуществления индивидуумом является человек. В другом варианте осуществления индивидуумом является больной раком.

[0090] В одном варианте осуществления настоящего изобретения индивидуум предварительно получил терапию на основе платины. Такая предварительная терапия на основе платины включает, без ограничения, применение цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, недаплатина, сатраплатина, пикоплатина, тетранитрата триплатина или ароплатина. Противоопухолевые средства на основе платины вызывают сшивку ДНК как монаддукта, межцепочечную сшивку, внутрицепочечную сшивку или сшивку ДНК-белок. В основном они действуют на соседнее N-7 положение гуанина с образованием 1,2-внутрицепочечной поперечной связи. Указанная сшивка ингибирует репарацию ДНК и/или синтез ДНК в

раковых клетках. Противоопухолевые средства на основе платины иногда называют "средства, подобные алкилирующим", поскольку они оказывают действие, подобное действию алкилирующих противоопухолевых средств, хотя они не содержат алкильную группу. В некоторых вариантах осуществления предварительная терапия на основе платины включает применение цисплатина, также известного как цисплатина или цис-диаминдихлорплатина (II), (CDDP) (торговое наименование цисплатин, название марки Платин, поставляется Cadila Healthcare в соответствии с Оранжевой книгой FDA). Цисплатин вводят внутривенно путем краткосрочной инфузии в физиологическом растворе для обработки солидных злокачественных опухолей. Его используют для лечения разных видов рака, включающих в себя саркомы, некоторые карциномы (например, мелкоклеточный рак легких и рак яичников), лимфомы и герминогенные опухоли.

[0091] В других вариантах осуществления индивидуум получил предварительную терапию на основе таксана. Таксаны, которые представляют собой дитерпены, продуцируемые растениями рода *Taxus* (тис), широко используются в качестве химиотерапевтических средств. В настоящее время таксаны можно синтезировать искусственно. Таксановые средства включают, без ограничения, паклитаксел (TAXOL®) и доцетаксел (TAXOTERE®).

[0092] В одном аспекте таксан можно гибридизовать или связать с гетерологичным фрагментом. Такой гетерологичный фрагмент может повысить растворимость таксанового препарата или уменьшить токсичность таксана. Например, таксан можно гибридизовать или связать с альбумином: альбумин-связанный паклитаксел (ABRAXANE®, также называемый nab-паклитаксел) представляет собой альтернативный препарат, в котором паклитаксел связан с альбуминовыми наночастицами.

[0093] Применение синтетических способов получения паклитаксела привело к разработке доцетаксела. Доцетаксел имеет такой же набор клинических применений, как и паклитаксел, и продается под торговым названием TAXOTERE®.

[0094] В другом аспекте таксан, подходящий для применения в настоящем изобретении, включает, без ограничения,

паклитаксел, 10-деацетилбаккатин III, баккатин III, паклитаксел С и 7-эпипаклитаксел из скорлупы и листьев орешника.

[0095] В других вариантах осуществления индивидуум получил не более трех, не более двух, или не более одного предварительного курса химиотерапии. Предварительный курс химиотерапии может включать в себя терапию на основе платины или терапию на основе таксана. В других вариантах осуществления индивидуум получил не более 3 предварительных курсов химиотерапии по поводу рецидивирующего рака.

[0096] В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой пациента, страдающего от рецидивирующего платина-устойчивого рака или платина-резистентного заболевания. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой пациента, страдающего от рецидивирующего таксан-устойчивого рака. В одном аспекте рецидивирующий платина-устойчивый рак или рецидивирующий таксан-устойчивый рак включает опухоль, прогрессирующую во время лечения препаратом платины или таксана, в течение примерно одного месяца, в течение примерно двух месяцев, в течение примерно трех месяцев, примерно четырех месяцев, примерно пяти месяцев, примерно шести месяцев, примерно семи месяцев, примерно восьми месяцев, примерно девяти месяцев, примерно десяти месяцев, примерно 11 месяцев или примерно 12 месяцев после завершения или получения терапии на основе платины или терапии на основе таксана. В конкретном варианте осуществления рецидивирующий платина-устойчивый рак или рецидивирующий таксан-устойчивый рак включает опухоль, прогрессирующую в течение шести месяцев после завершения или приема терапии на основе платины или терапии на основе таксана. Рецидивирующий платина-устойчивый рак или рецидивирующий таксан-устойчивый рак можно диагностировать с использованием Критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST), путем измерения одного или нескольких опухолевых маркеров, таких как СА-125, физического обследования, переоценки или плановой вторичной хирургической ревизии методом лапаротомии, и/или с помощью одного или нескольких визуализирующих методов исследования (таких как

рентгенологическое обследование, КТ или МРТ).

[0097] RECIST представляет собой набор опубликованных правил, которые позволяют определить в процессе лечения состояние пациента, страдающего от рака: улучшающееся ("пациент отвечает на лечение"), такое же ("стабильное состояние") или ухудшающееся ("прогрессирование заболевания"). Новые критерии были опубликованы в феврале 2000 года в рамках международного сотрудничества при участии Европейской организации по исследованию и лечению рака (EORTC), Национального института рака (NCI) США и группы клинических испытаний Национального института рака Канады. RECIST 1.1, опубликованный в январе 2009 года, содержит обновление исходных критериев. В большинстве клинических исследований по оценке объективного ответа солидных опухолей на лечение рака используют RECIST.

[0098] В некоторых вариантах осуществления индивидуум может содержать опухолевый маркер, такой как СА-125. В одном аспекте после введения терапевтического средства уровень экспрессии СА-125 у индивидуума снижается, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 55%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 65%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 75%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 85%, по меньшей мере, примерно на 90%, или, по меньшей мере, примерно на 100% по сравнению с уровнем экспрессии СА-125 до введения.

[0100] В некоторых вариантах осуществления индивидуум получал только один курс терапии на основе платины по поводу рецидивирующего платина-чувствительного заболевания, с последующим интервалом отдыха от введения платины, составляющим менее шести месяцев.

[0101] В других вариантах осуществления индивидуум имеет показатель общего состояния 0-1 в соответствии с критериями Восточной объединенной онкологической группы США (ECOG). ECOG предоставляет шкалу или критерии для оценки прогрессирования

заболевания пациента, влияния заболевания на повседневную жизнь пациента и определения подходящего лечения и прогноза. В таблице 4 приведены показатели общего состояния в соответствии с ECOG:

Таблица 4

Показатели общего состояния по ECOG*

Оценка	ECOG
0	Пациент полностью активный и способен выполнять все функции, которые выполнял до заболевания, без ограничения
1	Пациент проявляет ограниченную физическую активность, но является амбулаторным больным и может выполнять легкую или сидячую работу, например, легкую работу по дому или работу в офисе
2	Пациент является амбулаторным больным и способен обслуживать себя, но не в состоянии выполнять какую-либо трудовую деятельность. Проводит на ногах более 50% от времени бодрствования
3	Способность к уходу за собой ограничена, пациент прикован к постели или креслу в течение более 50% от времени бодрствования
4	Пациент полностью нетрудоспособен. Не в состоянии обслуживать себя. Полностью прикован к постели или креслу
5	Пациент мертв

*В соответствии с Am. J. Clin. Oncol.: Oken, M.M., Creech, R.H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T.E., McFadden, E. T., Carbone, P.P.: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group.

[0102] В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет функцию костного мозга, сравнимую с функцией костного мозга индивидуума, не имеющего рака. Функции костного мозга, сравнимые с функциями костного мозга индивидуума, не имеющего рака, включают, без ограничения, его активность как основного кроветворного органа и первичной лимфоидной ткани и способность

продуцировать клетки крови, такие как эритроциты, гранулоциты, моноциты, лимфоциты и тромбоциты. Подробное описание структуры и функции костного мозга можно найти в Jain, C, 1986b, Schahn 's Veterinary Hematology, The hematopoietic system (Lea and Febiger, Philadelphia, PA), 4, pp 350-387; Weiss and Geduldig, 1991, Blood 78:975-90; Wickramasinghe, 1992, in Histology for Pathologists, Bone marrow, ed Sternberg SS (Raven Press, New York), pp 1-31; Picker and Siegelman, 1999, in Fundamental Immunology, Lymphoid tissues and organs, ed Paul WE (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA), 4, pp 479-531; Hoffman et al., 2000, Hematology Basic Principals and Practice (Churchill Livingstone, New York), 3; Abboud and Lichtman, 2001, in Williams' Hematology, Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment, eds Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U (McGraw-Hill, New York), 6, pp 29-58, где каждая из указанных публикаций включена в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

[0103] В других вариантах осуществления пациент имеет гематологическую функцию, сравнимую с гематологической функцией индивидуума, не имеющего рака, где показатель гематологической функции выбран из группы, включающей:

а. Абсолютное число нейтрофилов (ANC) равно или превышает $1000/\text{мм}^3$;

б. Число тромбоцитов (PLT) равно или превышает $100000/\text{мм}^3$;

с. Протромбиновое время (PT) меньше, чем $1,2 \times$ верхний предел нормы (ULN) в секундах;

д. Тромбопластиновое время (PTT) меньше, чем $1,2 \times$ ULN в секундах, при этом, если PTT выше, чем ULN, пациент является отрицательным по волчаночному антикоагулянту (LAC); и

е. любые их сочетания.

[0104] В других вариантах осуществления пациент характеризуется функцией органа, сравнимой с функцией органа индивидуума, не имеющего рака, где функцию органа анализируют, используя традиционные критерии токсичности, выбранные из группы, включающей:

а. невропатия меньше или равна 1 по шкале общих критериев токсичности;

б. не более 30% основных участков, содержащих костный мозг, получают предварительное облучение;

с. содержание сывороточной глутамино-щавелевоуксусной трансаминазы, сывороточной аланинаминотрансферазы или щелочной фосфатазы составляет менее $2,5 \times$ верхний предел нормы (ULN) или менее $5 \times$ ULN;

д. уровень билирубина меньше или равен $1,5 \times$ ULN;

е. уровень креатинина меньше или равен $1,5 \times$ ULN;

ф. протеинурия менее 2+ по тест-полоске при скрининге, или отношение белка мочи креатинина менее 1,0; и

г. любые их сочетания.

[0105] В следующих вариантах осуществления индивидуума восстанавливают после острой токсичности в результате предварительного лечения, такого как химиотерапия, лучевая терапия или биологическая терапия. Однако индивидуум может нуждаться в восстановлении после невропатии 1 степени, анемии любой степени или алопеции.

[0106] В некоторых вариантах осуществления индивидуум предварительно получает анти-ангиогенное средство. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума отсутствует ранее существующая гастроинтестинальная (ЖКТ) перфорация, обструкция желудочно-кишечного тракта, или индивидуум ранее не проходил визуализирующего исследования кишечника. В других вариантах осуществления у индивидуума отсутствует активное, нелеченное психическое заболевание или неврологические симптомы, требующие лечения (допускается сенсорная невропатия I степени), отсутствуют нелеченные метастазы в центральной нервной системе или в головном мозге, деменция или существенное изменение психического статуса, который препятствует пониманию и/или получению информированного согласия, у пациента также отсутствует какая-либо известная гиперчувствительность к Cremophor EL, и, кроме того, отсутствуют данные по неконтролируемым бактериальным, вирусным или грибковым

инфекциям, или любые их сочетания. В других вариантах осуществления индивидуум является подходящим для настоящего изобретения, если у индивидуума ранее наблюдалась реакция на паклитаксел, но при повторном введении индивидуум стал хорошо переносить препарат.

[0107] Индивидуума, подходящего с точки зрения настоящего изобретения, можно идентифицировать путем измерения биомаркера плазмы или биомаркера клеточной поверхности для антиангиогенной терапии. В одном варианте осуществления в плазме индивидуума, подходящего для осуществления изобретения, присутствует биомаркер, который включает, без ограничения, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), белок биосинтеза фосфатидилинозитол-гликанов класса F (PIGF), растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 (sVEGFR-1), sVEGFR-2, sVEGFR-3, основной фактор роста фибробластов (bFGF), интерлейкин- 1β (IL- 1β), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли (TNF- α), фактор фон Виллебранда (vWF), растворимая c-kit (c-kit), стромальный фактор 1α (SDF 1α), альфа-фетопротеин (AFP), а также любые их сочетания. В другом варианте осуществления у индивидуума, подходящего для осуществления изобретения, присутствует биомаркер клеточной поверхности, который включает, без ограничения, CD31, CD34, CD45, CD133, рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR-1), VEGFR-2, или любые их сочетания.

[0108] Известно, что присутствие или образование нейтрализующих антител может затруднить эффективный перенос гена при втором введении вируса. В одном варианте осуществления у индивидуума отсутствует уже существующая гуморальная иммунная реакция на аденовирус. В другом варианте осуществления у индивидуума не развивается гуморальный иммунный ответ против аденовируса после его введения.

[0109] В некоторых аспектах настоящего изобретения у индивидуума отсутствует волчаночный антикоагулянт (LAC, также известный как волчаночное антитело, LA, или волчаночный ингибитор). Наличие LAC можно определить с помощью любых

известных способов, например, с помощью LAC-теста или APLA-теста. LAC представляет собой иммуноглобулин, который связывается с фосфолипидами и белками, ассоциированными с клеточной мембраной. Joussen, J., et al, in Documenta Ophthalmologica, 2008, Volume 117, Number 3, Pages 263-265, Retinal Vascular Disease, S. J. Ryan (eds), Springer, 2007, 780 p, 1040, ISBN: 978-3-540-29541-9. LAC представляет собой протромботическое средство; то есть, присутствие антитела LAC ускоряет образование тромбов *in vivo*. Присутствие указанных антител в ходе лабораторных испытаний вызывает увеличение aPTT. Предположительно присутствие данных антител препятствует использованию фосфолипидов для индуцирования коагуляции *in vitro*. Полагают, что данные антитела взаимодействуют с фосфолипидами мембран тромбоцитов *in vivo*, повышая адгезию и агрегацию тромбоцитов; что обуславливает протромботические характеристики указанных антител *in vivo*. Таким образом, LAC действует *in vivo* как коагулянт.

IV. Гомогенная популяция аденовируса, экспрессирующего FAS-хиимеру

[0110] Настоящее изобретение также предлагает гомогенную популяцию аденовируса, содержащего SEQ ID NO: 19, или аденовируса, депонированного в ECACC под номером 13021201. Термин "гомогенный" в данном описании относится к одной популяции аденовируса, не содержащей примесей гетерологичных аденовирусов, содержащих другие последовательности. Примеры гетерологичного аденовируса включают, без ограничения, аденовирус, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

[0111] Аденовирус, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и аденовирус, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21, были ранее описаны в международных заявках № PCT/IL2011/00007 и PCT/IL2011/00009, опубликованных 14 июля 2011 как WO2011/083464 и WO2011/083466, соответственно, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей полноте.

[0112] Настоящее изобретение предлагает аденовирус,

содержащий последовательность SEQ ID NO: 19 (35208 п.о.), которая содержит два нуклеотидных остатка, отличающихся от соответствующих остатков SEQ ID NO: 20 (35203 п.о.) и SEQ ID NO: 21. Два несовпадения (т.е. Gly→Ала) в SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21 присутствуют в положениях нуклеотидных остатков 501 и 1255. Кроме того, SEQ ID NO: 19 содержит дополнительный тимидин в нуклеотидном положении 33624 и четыре дополнительные пары оснований на 3'-конце. А SEQ ID NO: 21 содержит дополнительный участок E1, кодирующий аминокислотную последовательность.

[0113] SEQ ID NO: 19 содержит нуклеотидную последовательность промотора, специфичного для эндотелиальных клеток (то есть, промотора PPE-L-3х), в положениях 458-1444 последовательности SEQ ID NO: 18, и нуклеотидную последовательность, кодирующую FAS-химерный белок, в положениях 1469-2569 последовательности SEQ ID NO: 9.

[0114] В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает композицию, включающую в себя аденовирус, содержащий FAS-химерный ген, функционально связанный с промотором, специфичным для эндотелиальных клеток, где аденовирус не содержит SEQ ID NO: 20, и не содержит SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления настоящее изобретение представляет собой композицию, включающую в себя аденовирус, содержащий SEQ ID NO: 19, или аденовирус, депонированный в ЕСАСС под № 13021201, где композиция не содержит аденовирус, содержащий SEQ ID NO: 20, и не содержит аденовирус, содержащий SEQ ID NO: 21.

[0115] В другом варианте осуществления композиция включает аденовирус, содержащий нуклеотидные остатки 458-2569 последовательности SEQ ID NO: 19, где композиция не содержит аденовирус, содержащий нуклеотидные остатки 458-2569 последовательности SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

[0116] В других вариантах осуществления композиция настоящего изобретения включает аденовирус, содержащий нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную

последовательности SEQ ID NO: 19, где нуклеотидная последовательность отличается от SEQ ID NO: 20, и от SEQ ID NO: 21, и где композиция не включает аденовирус, содержащий SEQ ID NO: 20, и не включает аденовирус, содержащий SEQ ID NO: 21.

[0117] В других вариантах осуществления композиция настоящего изобретения включает аденовирус, содержащий SEQ ID NO: 19, или аденовирус, депонированный в ECACC под № 13021201, где чистота аденовируса составляет, по меньшей мере, примерно 51%, по меньшей мере, примерно 55%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, примерно 99%, или примерно 100%. Используемый здесь термин "чистый" обозначает степень гомогенности, т.е. отсутствия гетерологичных аденовирусов. Например, композиция с чистотой примерно 51%, включающая в себя аденовирус, содержащий последовательность SEQ ID NO: 19, содержит примерно 51% аденовируса, содержащего SEQ ID NO: 19, и примерно 49% аденовируса, содержащего гетерологичную последовательность, например, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21. Композиция настоящего изобретения может содержать другие ингредиенты, включающие в себя, без ограничения, фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, модификатор тоничности, или любых необходимые для композиции ингредиенты.

[0118] В некоторых вариантах осуществления изобретение предлагает способ выделения или очистки гомогенной популяции нуклеотидной конструкции. В других вариантах осуществления изобретение предлагает способ удаления гетерологичных популяций аденовируса, например, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, или того и другого, из композиции, включающей аденовирус, содержащий SEQ ID NO: 19, или нуклеотидную конструкцию, депонированную в ECACC под № 13021201.

[0119] Изобретение также предлагает способ снижения или уменьшения размера опухоли, или уменьшения скорости роста опухоли, или устранения опухоли у индивидуума, включающий

введение индивидууму эффективного количества гомогенной популяции аденовируса или композиции, содержащей гомогенную популяцию аденовируса. Данное изобретение также предлагает способ ингибирования, уменьшения или снижения неоваскуляризации или ангиогенеза в опухоли, включающий введение индивидууму, имеющему опухоль, эффективного количества гомогенной популяции аденовируса или композиции, содержащей гомогенную популяцию аденовируса. Кроме того, изобретение предлагает способ лечения или профилактики опухоли, порожденной или связанной с раком, у индивидуума, включающий введение эффективного количества гомогенной популяции аденовируса или композиции, содержащей гомогенную популяцию аденовируса.

[0120] Изобретение предлагает способ снижения или уменьшения размера опухоли, или уменьшения скорости роста опухоли, или устранения опухоли у индивидуума, включающий многократное введение индивидууму эффективного количества гомогенной популяции аденовируса или композиции, содержащей гомогенную популяцию аденовируса, без введения гетерогенной популяции аденовируса, содержащей SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, или композиции, содержащей гетерогенную популяцию аденовируса. Изобретение также предлагает способ ингибирования, уменьшения или снижения неоваскуляризации или ангиогенеза в опухоли, включающий многократное введение индивидууму, имеющему опухоль, эффективного количества гомогенной популяции аденовируса или композиции, содержащей гомогенную популяцию аденовируса, без введения гетерогенной популяции аденовируса, содержащей SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, или композиции, содержащей гетерогенную популяцию аденовируса. Кроме того, изобретение предлагает способ лечения или профилактики опухоли, порожденной или связанной с раком, у индивидуума, включающий многократное введение эффективного количества гомогенной популяции аденовируса или композиции, содержащей гомогенную популяцию аденовируса, без введения гетерогенной популяции аденовируса, содержащей SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, или композиции, содержащей гетерогенную популяцию аденовируса.

[0121] Опухоль, которую можно уменьшить, подавить или

лечить с помощью гомогенной популяции аденовируса или композиции, может представлять собой солидную опухоль, первичную опухоль или метастатическую опухоль. Термин "метастатический" или "метастазы" относится к опухолевым клеткам, которые способны создать вторичные очаги опухолевого повреждения в других частях или органах.

[0122] В других вариантах осуществления гомогенная популяция настоящего изобретения при введении индивидууму, нуждающемуся в этом, продлевает общую выживаемость индивидуума. В других вариантах осуществления гомогенная популяция настоящего изобретения при введении индивидууму, нуждающемуся в этом, продлевает выживаемость индивидуума при отсутствии прогрессирования заболевания.

[0123] Термин "солидная опухоль" включает, без ограничения, саркому, меланому, карциному или другую злокачественную солидную опухоль. Термин "саркома" относится к опухоли, которая состоит из вещества, подобного эмбриональной соединительной ткани и, как правило, содержит плотно упакованные клетки, погруженные в фибриллярное или гомогенное вещество. Саркома включает, без ограничения, такие опухоли, как хондросаркома, фибросаркома, лимфосаркома, меланосаркома, миксосаркома, остеосаркома, саркома Абернети, инфильтрирующая липома, липосаркома, альвеолярная саркома мягких тканей, амелобластосаркома, ботриоидная саркома, гранулоцитарная саркома, хориокарцинома, эмбриональная саркома, опухоль Вильмса, эндометриальная саркома, стромальная саркома, саркома Юинга, фасциальная саркома, фибробластная саркома, гигантоклеточная саркома, гранулоцитарная саркома, саркома Ходжкина, идиопатическая множественная геморрагическая саркома, иммунобластная В-клеточная саркома, лимфома, иммунобластная Т-клеточная саркома, саркома Йенсена, саркома Капоши, саркома клеток Купфера, ангиосаркома, лейкосаркома, злокачественная мезенхимальная саркома, паростальная саркома, ретикулоцитарная саркома, саркома Рауса, листовидная цистосаркома, синовиальная саркома и телеангиэктатическая саркома.

[0124] Термин "меланома" относится к опухоли, возникающей

из меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы включают такие опухоли, как асра -лентиго-меланома, амеланотическая меланома, доброкачественная ювенильная меланома, меланома Клаудмана, меланома S91, меланома Хардинга-Пасси, ювенильная меланома, меланома типа злокачественного лентиго, злокачественная меланома, метастатическая меланома, узелковая меланома, подногтевая меланома и поверхностная распространяющаяся меланома.

[0125] Термин "карцинома" относится к злокачественному новообразованию, состоящему из эпителиальных клеток, которые имеют тенденцию к инфильтрации окружающих тканей и приводят к образованию метастазов. Примеры карциномы включают такие опухоли, как ацинарная аденокарцинома, аденокарцинома, аденокистозная карцинома, железисто-кистозная карцинома, аденоматозная карцинома, карцинома коры надпочечников, альвеолярная карцинома, альвеолярно-клеточная карцинома, базалиома, базально-клеточная карцинома, базалиома, базоспиноцеллюлярная карцинома, бронхоальвеолярная карцинома, бронхиолярная карцинома, бронхогенная карцинома, мозговидная карцинома, холангиоцеллюлярная карцинома, хориокарцинома, коллоидная карцинома, угевидная карцинома, карцинома тела матки, решетчатая карцинома, карцинома "en cuirasse" (склеродермоподобная форма), рак кожи, карцинома цилиндрического эпителия, карцинома цилиндрических клеток, протоковая карцинома, твердая карцинома, эмбриональная карцинома, мозговидная карцинома, эпидермоидная карцинома, злокачественная эпителиома, экзофитная карцинома, карцинома из язвы, фиброзная карцинома, студенистая карцинома, слизеобразующая карцинома, гигантоклеточная карцинома, гигантоклеточный рак, аденокарцинома, гранулезоклеточная карцинома, базально-клеточная эпителиома, гематоидная карцинома, гепатоцеллюлярная карцинома, карцинома из клеток Гюртля, гиалиновая карцинома, гипернефроидная карцинома, детская тератокарцинома, карцинома *in situ*, внутриэпидермальная карцинома, внутриэпителиальная карцинома, карцинома Кромпечера,

карцинома из клеток Кульчицкого, крупноклеточная карцинома, лентикулярная карцинома, лентикулярный рак, липоматозная карцинома, лимфоэпителиальная карцинома, медуллярная карцинома, мозговидная карцинома, меланотическая карцинома, карцинома molle, коллоидная карцинома, слизеобразующая карцинома, мукоцеллюлярная карцинома, мукоэпидермоидная карцинома, карцинома слизистой оболочки, мукозная карцинома, миксоматозная карцинома, назофарингеальная карцинома, овсяно-клеточная карцинома, оссифицирующая карцинома, остеοидная карцинома, папиллярная карцинома, перипортальная карцинома, преинвазивная карцинома, шиловидно-клеточная карцинома, слизеобразующая карцинома, почечно-клеточная карцинома почек, резервноклеточная карцинома, саркомоподобная карцинома, шнайдерова карцинома, скirrрозная карцинома, карцинома мошонки, перстневидно-клеточная карцинома, недифференцированная карцинома, мелкоклеточная карцинома, соленоидная карцинома, карцинома из сферических клеток, веретенноклеточная карцинома, губчатая карцинома, сквамозно-клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, нитевидная карцинома, телеангиэктатическая карцинома, карцинома из гладкомышечных волокон и сосудистой ткани, переходноклеточная карцинома, карцинома туберозная, туберозный рак, бородавчатая карцинома и ворсистая карцинома.

Дополнительные виды рака, которые можно ингибировать или лечить с помощью настоящего изобретения, включают, например, лейкоз, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, нейробластому, рак молочной железы, рак яичника, рак легкого, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, мелкоклеточные опухоли легких, первичные опухоли головного мозга, рак желудка, рак толстой кишки, злокачественную инсуланому поджелудочной железы, карциноидный синдром, рак мочевого пузыря, предраковые поражения кожи, рак яичка, лимфомы, рак щитовидной железы, папиллярной рак щитовидной железы, нейробластому, нейроэндокринный рак, рак пищевода, рак мочеполового тракта, злокачественная гиперкальциемия, рак шейки матки, рак эндометрия, рак коры надпочечников, рак предстательной железы, рак Мюллера, рак

яичника, рак брюшной полости, рак фаллопиевой трубы или папиллярный серозный рак матки.

V. Фармацевтические композиции

[0127] Изобретение также предлагает фармацевтическую композицию, содержащую нуклеотидную конструкцию, экспрессирующую FAS-химерный белок, используемый в способах настоящего изобретения, аденовирус, содержащий нуклеотидную конструкцию, или гомогенную популяцию аденовируса. Фармацевтическая композиция может предназначаться для введения млекопитающим, в том числе человеку. Фармацевтические композиции, используемые в способах настоящего изобретения, содержат фармацевтически приемлемые носители, включающие в себя, например, ионообменные средства, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протамина сульфат, динатрия гидрофосфат, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин. В одном варианте осуществления композицию получают с добавлением солевого раствора.

[0128] Композиции настоящего изобретения можно вводить любым подходящим способом, таким как парентеральное введение (которое включает подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутрисуставные, внутрисиновиальные, интрастернальные, интратекальные, внутрипеченочные, нутриочаговые и внутричерепные инъекции или инфузии), интравентрикулярное введение, пероральное введение, введение путем ингаляции, местное введение, ректальное введение, назальное введение, трансбуккальное введение, вагинальное введение или введение посредством имплантированного резервуара. Как описано выше,

композиция, включающая в себя нуклеотидную конструкцию, которая содержит FAS-химерный ген, или гомогенную популяцию аденовируса, обеспечивает экспрессию продукта FAS-химерного гена в эндотелиальной клетке и посредством этого индуцирует апоптоз эндотелиальной клетки. Соответственно, композиция может ингибировать, снижать или уменьшать размер опухоли или ее метастаз путем подавления неоваскуляризации и/или ангиогенеза опухолевых эндотелиальных клеток. Таким образом, в одном варианте осуществления композиция доставляется системно или локально. Для системной или местной доставки фармацевтической композиции, содержащей нуклеотидную конструкцию, аденовирус или гомогенную популяцию аденовируса, можно использовать механическое устройство, такое как игла, канюля или хирургический инструмент.

[0129] Стерильные инъекционные формы композиций, используемых в способах настоящего изобретения, могут представлять собой водные или масляные суспензии. Указанные суспензии можно получить в соответствии со способами, известными в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств. Стерильный инъекционный препарат также может включать в себя стерильные инъекционные растворы или суспензии в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, такие как суспензия в 1,3-бутандиоле. Подходящие для применения приемлемые носители и растворители включают воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды часто используют стерильные нелетучие масла. Для данной цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включающее в себя синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, можно использовать для получения инъекционных препаратов, так же как и природные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, в особенности их полиоксиэтилированные варианты. Указанные масляные растворы или суспензии также могут содержать

длинноцепочечный спирт в качестве разбавителя или диспергирующее средство, такое как карбоксиметилцеллюлоза или аналогичные диспергирующие средства, которые часто используют для получения фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включающих в себя эмульсии и суспензии. Для получения композиций также можно использовать поверхностно-активные вещества, такие как твины, спаны и других эмульгаторы или усилители биодоступности, которые обычно используются в производстве фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм.

[0130] Парентеральные композиции можно вводить в виде разовой болюсной дозы, путем инфузии, или в виде нагрузочной болюсной дозы с последующим введением поддерживающей дозы. Указанные композиции можно вводить с конкретными фиксированными или переменными интервалами, например, один раз в день, или "по необходимости".

[0131] Некоторые фармацевтические композиции, используемые в способах настоящего изобретения, можно вводить перорально в виде приемлемой лекарственной формы, включающей, например, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. Некоторые фармацевтические композиции также можно вводить в виде назального аэрозоля или посредством ингаляции. Такие композиции можно получить в виде растворов в физиологическом растворе с добавлением бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов абсорбции для повышения биодоступности, и/или других традиционных солюбилизующих или диспергирующих средств.

[0132] Количество нуклеотидной конструкции, экспрессирующей FAS-химерный белок, аденовируса, содержащего нуклеотидную конструкцию, или гомогенной популяции аденовируса, которое можно объединить с материалами-носителями с получением стандартной лекарственной формы, может варьировать в зависимости от хозяина, подлежащего лечению, типа используемого полипептида и конкретного способа введения. Композицию можно вводить в виде одной дозы, нескольких доз или в течение определенного периода времени путем инфузии. Режимы дозирования

также можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желательный ответ (например, терапевтический или профилактический ответ).

[0133] В одном варианте осуществления композицию, которая содержит нуклеотидную конструкцию, экспрессирующую FAS-химерный белок, аденовирус или однородную популяцию аденовируса в 1 день вводят путем инфузии (первая доза) и затем вводят одну или несколько последующих доз, например, с интервалом в одну неделю, с интервалом в две недели, с интервалом в три недели, с интервалом в четыре недели, с интервалом в пять недель, с интервалом в шесть недель, с интервалом в семь недель, с интервалом в восемь недель, с интервалом в девять недель, с интервалом в десять недель, с интервалом в 11 недель, или с интервалом в 12 недель. В другом варианте осуществления композицию, которая содержит нуклеотидную конструкцию, экспрессирующую FAS-химерный белок, аденовирус или однородную популяцию аденовируса в 1 день вводят путем инфузии (первая доза) и затем вводят одну или несколько последующих доз, например, с интервалом в две недели, с интервалом в один месяц, с интервалом в два месяца, с интервалом в три месяца, с интервалом в четыре месяца, с интервалом в пять месяцев или с интервалом в шесть месяцев.

[0134] В способах настоящего изобретения используют "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" композиции, которая содержит нуклеотидную конструкцию, экспрессирующую FAS-химерный белок, аденовирус, содержащий нуклеотидную конструкцию, или однородную популяцию аденовируса. Указанное эффективное количество или терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и масса индивидуума. Эффективным количеством или терапевтически эффективным количеством также является количество, при котором терапевтически полезные эффекты преобладают над токсическими или вредными эффектами.

[0135] Конкретная доза и схема лечения для любого конкретного пациента зависят от множества факторов, включающих

в себя состав используемой композиции, возраст пациента, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету, а также время введения, скорость экскреции, сочетание лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Оценка таких факторов медицинским персоналом относится к компетенции рядовых специалистов в данной области техники. Количество также зависит от индивидуальных особенностей пациента, подлежащего лечению, пути введения, типа композиции, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и желательного эффекта. Нужно количество можно определить с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

[0136] Эффективное количество аденовируса, содержащего нуклеотидную конструкцию, кодирующую FAS-химеру, или гомогенной популяции аденовируса, содержащего нуклеотидную конструкцию, кодирующую FAS-химерный белок, может включать в себя любые подходящие дозы. В одном варианте осуществления эффективное количество аденовируса, или гомогенной популяции аденовируса, составляет, по меньшей мере, примерно 10^9 VP, по меньшей мере, примерно 10^{10} VP, по меньшей мере, примерно 10^{11} VP, по меньшей мере, примерно 10^{12} VP или, по меньшей мере, примерно 10^{13} VP на отдельного индивидуума. В другом варианте осуществления эффективное количество аденовируса, или гомогенной популяции аденовируса, составляет, по меньшей мере, примерно 1×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 2×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 3×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 4×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 5×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 6×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 7×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 8×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 9×10^{12} VP, или, по меньшей мере, примерно 1×10^{13} VP на отдельного индивидуума. В других вариантах осуществления эффективное количество аденовируса, или гомогенной популяции аденовируса, составляет примерно от 10^9 до 10^{15} VP, от 10^{10} до 10^{14} VP, примерно от 10^{11} до 10^{13} VP, или примерно от 10^{12} до 10^{13} VP, или примерно от 3×10^{12} до 10^{13} VP на отдельного индивидуума.

[0137] В других аспектах эффективное количество аденовируса, экспрессирующего FAS-химерный белок, или гомогенной популяции аденовируса, увеличивают, если первая доза не вызывает какой-либо токсичности. Например, первая доза аденовируса, экспрессирующего FAS-химерный белок, или гомогенной популяции аденовируса, может составлять, по меньшей мере, примерно 1×10^9 VP, примерно 1×10^{10} VP, по меньшей мере, примерно 1×10^{11} VP, по меньшей мере, примерно 1×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 2×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 3×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 4×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 5×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 6×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 7×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 8×10^{12} VP, или, по меньшей мере, примерно 9×10^{12} VP на отдельного индивидуума, а вторая доза, или последующие дозы аденовируса, экспрессирующего FAS-химерный белок, могут составлять, по меньшей мере, примерно 5×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 6×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 7×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 8×10^{12} VP, или, по меньшей мере, примерно 9×10^{12} VP, по меньшей мере, примерно 1×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 2×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 3×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 4×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 5×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 6×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 7×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 8×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 9×10^{13} VP, по меньшей мере, примерно 1×10^{14} VP на отдельного индивидуума. В конкретном примере первая доза аденовируса, экспрессирующего FAS-химерный белок, или гомогенной популяции аденовируса составляет примерно 3×10^{12} VP на отдельного индивидуума, а вторая доза аденовирусной конструкции, экспрессирующей FAS-химеру, составляет примерно 1×10^{13} VP на отдельного индивидуума. Кроме того, эффективное количество аденовируса, экспрессирующего белок FAS-химеры или гомогенной популяции аденовируса можно уменьшить, если конкретная доза вызывает

дозолимитирующую токсичность.

[0138] Композицию, содержащую аденовирус или гомогенную популяцию аденовируса, можно вводить индивидууму в течение примерно 10 минут, примерно 20 минут, примерно 30 минут, примерно 40 минут, примерно 50 минут, примерно 60 минут, примерно 70 минут, примерно 80 минут, примерно 90 минут, примерно 100 минут, примерно 110 минут или примерно 120 минут. В одном варианте осуществления нуклеотидную конструкцию настоящего изобретения вводят внутривенно путем инфузии в течение не более чем 60 минут. В другом варианте осуществления композицию, содержащую аденовирус или гомогенную популяцию аденовируса, вводят путем инфузии со скоростью 1 мл/мин в случае доз, равных или меньших 3×10^{12} VP на отдельного индивидуума. Если доза составляет более 3×10^{12} VP на отдельного индивидуума, первые 10 мл композиции, содержащей аденовирус или гомогенную популяцию аденовируса, вводят путем инфузии со скоростью 1 мл/мин и затем остаток дозы вводят со скоростью 3 мл/мин.

[0139] В состав композиций, используемых в способах настоящего изобретения, также можно включить дополнительные активные соединения. Например, нуклеотидная конструкция, кодирующая продукт FAS-химерного гена, или гомогенная популяция нуклеотидной конструкции может входить в состав одной композиции и/или ее можно вводить вместе с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами.

[0140] Изобретение охватывает любой подходящий способ доставки нуклеотидной конструкции, кодирующей продукт FAS-химерного гена, или гомогенной популяции нуклеотидной конструкции, в выбранную ткань-мишень, включающий болюсную инъекцию водного раствора или имплантацию системы, обеспечивающей контролируемое высвобождение. Использование имплантата, обеспечивающего контролируемое высвобождение, уменьшает потребность в повторном введении.

[0141] Нуклеотидную конструкцию, кодирующую продукт Fas-химерного гена, аденовирус, содержащий нуклеотидную

конструкцию, или однородную популяцию аденовируса, можно вводить путем инфузии непосредственно в опухоль. Известны разные имплантаты, подходящие для непосредственной инфузии соединений в опухоль и обеспечивающие эффективную доставку терапевтических соединений больным женщинам, страдающим от гинекологического рака.

[0142] Композиции также могут содержать нуклеотидную конструкцию, кодирующую продукт Fas-химерного гена, аденовирус, содержащий нуклеотидную конструкцию, или однородную популяцию аденовируса, диспергированные в биосовместимом материале-носителе, который функционирует как подходящая система доставки или поддержки соединений. Подходящие примеры носителей, обеспечивающих замедленное высвобождение, включают полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, таких как суппозитории или капсулы. Имплантируемые или микрокапсульные матрицы, обеспечивающие замедленное высвобождение, включают полилактиды (патент США № 3773319; EP 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al, Biopolymers 22: 547-56 (1985)); поли(2-гидроксиэтилметакрилат), сополимер этилена и винилацетата (Langer et al, J, Biomed. Mater. Res. 75: 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech. 72: 98-105 (1982)) или поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988).

[0143] В соответствии со способами настоящего изобретения, введение нуклеотидной конструкции, аденовируса, или гомогенной популяции аденовируса можно объединить с введением одного или нескольких химиотерапевтических средств. Химиотерапевтическое средство можно вводить до, одновременно или после введения аденовируса, экспрессирующего FAS-химерный белок или гомогенную популяцию аденовируса.

[0144] Одно или несколько химиотерапевтических средств, которые можно вводить совместно с аденовирусом настоящего изобретения, включают, без ограничения, ацивицин; акларубицин; акодазола гидрохлорид; акронин; адриамицин; адозелезин; алдеслейкин; алимта; алтретамин; амбомицин; аметантрона ацетат; аминоклутетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин;

аспарагиназа; асперлин; азацитидин; азетепа; азотомицин; батимастат; бензодепа; бикалутамид; бисантрена гидрохлорид; биснафида димезилат; бевацизумаб, бизелезин; блеомицина сульфат; бреквинар натрия; бропиримин; бусульфан; кактиномицин; калустерон; карацемид; карбетимер; карбоплатин, кармустин; карубицина гидрохлорид; карзелезин; цедефингол; хлорамбуцил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; криснатола мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; даунорубицина гидрохлорид; децитабин; десормаплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; диазиквон; доцетаксел; доксорубицин; доксорубицина гидрохлорид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромостанолон пропионат; дуазомицин; эдатрексат; эфлорнитина гидрохлорид; элсамитруцин; энлоплатин; энпромат; эпипропидин; эпирубицина гидрохлорид; эрбулозол; эзорубицина гидрохлорид; эстрамустин; эстрамустинфосфат натрия; этанидазол; этопозид; этопозидфосфат; этоприн; фадрозол гидрохлорид; фазарабин; фенретинид; флоксуридин; флударабина фосфат; фторурацил; флюороцитабин; фосквидон; фострицин натрия; гемцитабин; гемцитабина гидрохлорид; гидроксимочевина; идарубицина гидрохлорид; ифосфамид; илмофосин; интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа-n1; интерферон альфа-n3; интерферон бета-1a; интерферон гамма-1b; ипроплатин; гидрохлорид иринотекана; ланреотида ацетат; летрозол; лейпролида ацетат; лиарозол гидрохлорид; лометрексол натрия; ломустин; лозоксантрона гидрохлорид; мазопрокол; майтансин; мехлоретамин гидрохлорид; мегестрола ацетат; меленгестрола ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрия; метоприн; метуредеп; митиндомид; митокарцин; митокромин; митогиллин; митомалцин; митомицин; митоспер; митотан; митоксантрона гидрохлорид; микофенолокислота; нокодазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; пазотиниб; паклитаксел; пегаспаргаза; пелиомицин; пентамустин; пепломицина сульфат; перфосфамид; пипоброман; пипосульфан; пироксантрона гидрохлорид; пликамицин; пломестан; порфимер натрия; порфирамицин; преднимустин; прокарбазина гидрохлорид; пурамицин; пурамицина гидрохлорид; пиразофурин;

рибоприн; роглетимид; сафингол; сафингола гидрохлорид; семустин; симтразен; сорафиниб; спарфосат натрия; спарзомицин; спирогермания гидрохлорид; спиромустин; спироплатин; стрептонигрин; стрептозоцин; сулофенур; сунитиниб; талисомицин; таксол; текогалан натрия; тегафур; телоксантрона гидрохлорид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепа; тиазофурин; тирапазамин; топотекана гидрохлорид; торемифена цитрат; трестолона ацетат; трицирибина фосфат; триметрексат; триметрексата глюкуронат; трипторелин; тубулозола гидрохлорид; урамустин; уредепа; вапреотид; вертепорфин; винбластина сульфат; винкристина сульфат; виндезин; виндезина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлейрозина сульфат; винорелбина тартрат; винросидина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зениплатин; зингостатин; или зорубицина гидрохлорид. Дополнительные противоопухолевые средства включают средства, описанные в главе 52 Antineoplastic Agents (Paul Calabresi and Bruce A. Chabner) и введении к ней, 1202-1263 Goodman and Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc.

[0145] В некоторых вариантах осуществления индивидууму, получающему аденовирус, экспрессирующий FAS-химерный белок, или гомогенную популяцию аденовируса, одновременно назначают курс лучевой терапии. В других вариантах осуществления индивидууму, получающему аденовирус, экспрессирующий FAS-химерный белок, или гомогенную популяцию аденовируса, одновременно вводят два или более химиотерапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, которому вводят аденовирус, экспрессирующий FAS-химерный белок, или гомогенную популяцию аденовируса, одновременно получает химиотерапевтическое средство и лучевую терапию.

[0146] В аспекте настоящего изобретения, связанном с сочетанной терапией, в качестве химиотерапевтического средства можно использовать паклитаксел. В одном аспекте аденовирус, экспрессирующий FAS-химерный белок, или гомогенную популяцию аденовируса можно вводить одновременно с паклитакселем. В другом аспекте, аденовирус, экспрессирующий FAS-химерный белок,

или гомогенную популяцию аденовируса вводят до или после введения паклитаксела. В других вариантах осуществления паклитаксел вводят, по меньшей мере, за 30 минут, по меньшей мере, примерно за час, по меньшей мере, примерно за два часа, по меньшей мере, примерно за три часа, по меньшей мере, примерно за четыре часа, по меньшей мере, примерно за пять часов, по меньшей мере, примерно за шесть часов, по меньшей мере, примерно за семь часов, по меньшей мере, примерно за восемь часов, по меньшей мере, примерно за девять часов, по меньшей мере, примерно за десять часов, по меньшей мере, примерно за 11 часов, по меньшей мере, примерно за 12 часов, по меньшей мере, примерно за 13 часов, по меньшей мере, примерно за 14 часов, по меньшей мере, примерно за 19 часов, по меньшей мере, примерно за 20 часов, по меньшей мере, примерно за 21 час, по меньшей мере, примерно за 22 часа, по меньшей мере, примерно за 23 часа, по меньшей мере, примерно за 24 часа, по меньшей мере, примерно за один день, по меньшей мере, примерно за 36 часов, по меньшей мере, примерно за 2 дня, по меньшей мере, примерно за 60 часов или по меньшей мере, примерно за 3 дня до введения аденовируса, экспрессирующего FAS-химерный белок, или гомогенной популяции аденовируса.

[0147] Химиотерапевтическое средство также можно вводить любыми подходящими способами, например, парентерально, интравентрикулярно, перорально, путем ингаляции, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или посредством имплантированного резервуара. Термин "парентеральный" в соответствии с данным описанием включает подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутрисуставные, внутриартериальные, синовиальные, внутримышечные, интратекальные, внутрипеченочные, внутриочаговые, внутрибрюшинные, внутричерепные инъекции или инфузии.

[0148] Эффективные количества химиотерапевтических средств доступны в данной области техники. Например, в одном аспекте эффективное количество паклитаксела может составлять, по меньшей мере, примерно 10 мг/м², по меньшей мере, примерно 20 мг/м², по меньшей мере, примерно 30 мг/м², по меньшей мере,

примерно 40 мг/м², по меньшей мере, примерно 50 мг/м², по меньшей мере, примерно 60 мг/м², по меньшей мере, примерно 70 мг/м², по меньшей мере, примерно 80 мг/м², по меньшей мере, примерно 90 мг/м², по меньшей мере, примерно 100 мг/м², или, по меньшей мере, примерно 110 мг/м². В другом аспекте эффективное количество паклитаксела составляет примерно от 10 мг/м² до 200 мг/м², примерно от 20 мг/м² до 150 мг/м², примерно от 30 мг/м² до 100 мг/м², или примерно от 40 мг/м² до 80 мг/м². В других аспектах эффективное количество паклитаксела составляет примерно 10 мг/м², примерно 20 мг/м², примерно 30 мг/м², примерно 40 мг/м², примерно 50 мг/м², примерно 60 мг/м², примерно 70 мг/м², примерно 80 мг/м², примерно 90 мг/м², или примерно 100 мг/м².

[0149] В некоторых аспектах, связанных с введением паклитаксела, паклитаксел вводят путем инфузии в течение, по меньшей мере, 10 минут, по меньшей мере, 20 минут, по меньшей мере, 30 минут, по меньшей мере, 40 минут, по меньшей мере, 50 минут, по меньшей мере, 60 минут, по меньшей мере, 70 минут, по меньшей мере, 80 минут, по меньшей мере, 90 минут, по меньшей мере, 100 минут, по меньшей мере, 110 мин, по меньшей мере, 120 минут, по меньшей мере, 150 минут, по меньшей мере, 180 минут, по меньшей мере, 210 минут, по меньшей мере, 240 минут, по меньшей мере, 270 минут, или, по меньшей мере, 300 мин. В конкретном примере паклитаксел вводят путем инфузии в течение, по меньшей мере, одного часа. Инфузию паклитаксела можно проводить с помощью любых способов, известных в данной области. Например, паклитаксел можно вводить через встроенный фильтр, содержащий микропористую мембрану с размером пор не более 0,22 мкм, в течение трех часов.

[0150] В некоторых аспектах паклитаксел вводят путем инфузии на 1 день (в тот же день, в который вводят аденовирус, экспрессирующий FAS-химерный белок, или гомогенную популяцию аденовируса) (то есть, первую дозу) и затем путем инфузии вводят одну или несколько последующих доз, например, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней, каждые семь дней, каждые восемь дней, каждые девять дней,

каждые десять дней, каждые 11 дней, каждые 12 дней, каждые 13 дней или каждые 14 дней. В конкретном примере паклитаксел вводят на 1 день (то есть, первую дозу) и затем используют схему, включающую в себя введение на 8-й день (т.е., второй дозы), 15-й день (т.е., третьей дозы) и 22 день (то есть, четвертой дозы), каждые 28 дней.

[0151] В других аспектах эффективное количество химиотерапевтического агента, вводимого совместно с аденовирусом, экспрессирующим FAS-химерный белок, или с гомогенной популяцией аденовируса, увеличивают, если первая доза не вызывает какой-либо токсичности. Например, первая доза паклитаксела может составлять примерно от 10 мг/м² до 70 мг/м², примерно от 20 мг/м² до 6 мг/м², примерно от 30 мг/м² до 50 мг/м², или примерно 40 мг/м², а вторую дозу или любую последующую дозу можно увеличить примерно на 10 мг/м², примерно на 20 мг/м², примерно на 30 мг/м², примерно на 40 мг/м², примерно на 50 мг/м², примерно на 60 мг/м², примерно на 70 мг/м², или примерно на 80 мг/м². В одном варианте осуществления первая доза паклитаксела составляет примерно 40 мг/м², а вторая доза паклитаксела составляет примерно 80 мг/м². В другом варианте осуществления, первая доза паклитаксела составляет примерно 40 мг/м², вторая доза паклитаксела составляет примерно 80 мг/м² и третья доза паклитаксела составляет примерно 80 мг/м². В других вариантах осуществления первая доза паклитаксела составляет примерно 40 мг/м², вторая доза паклитаксела составляет примерно 80 мг/м², третья доза паклитаксела составляет примерно 80 мг/м² и четвертая доза паклитаксела составляет примерно 80 мг/м².

[0152] Кроме того, эффективное количество паклитаксела можно уменьшить, если первая доза вызывает у индивидуума дозолимитирующую токсичность. Дозолимитирующую токсичность можно определить с использованием любых известных параметров, включающих в себя, например, (1) абсолютное число нейтрофилов (ANC) составляет $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ в течение ≥ 4 дней, или абсолютное число нейтрофилов составляет $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ в совокупности с

сепсисом, или наблюдается лихорадка 3-4 степени ($>100,2^{\circ}\text{F}$), трудно контролируемая жаропонижающими средствами; (2) число тромбоцитов $<10 \times 10^9/\text{л}$ в течение любого периода; (3) любая другая, связанная с лекарственным средством, не печеночная и не гематологическая токсичность >3 степени, или любые их сочетания. Указанные параметры не включают тошноту или рвоту ≥ 3 степени, которую можно контролировать лекарственными средствами (если тошнота и/или рвота не контролируется лекарственными средствами и наблюдается во время первого цикла, считают, что она является показателем DLT) или гипокалиемию ≥ 3 степени, гипонатриемию, гипофосфатемию, гипомagneмию и гипокальциемию, если они легко корректируются, протекают без клинических симптомов, и не сопровождаются медицински значимыми осложнениями (например, изменениями в ЭКГ).

[0153] В одном варианте осуществления первая доза паклитаксела, вводимая на 1 день, составляет $40 \text{ мг}/\text{м}^2$, и, если у индивидуума не наблюдается дозолимитирующая токсичность, вторую дозу, вводимую на 8-й день, и последующие дозы, вводимые на 15 день, 22 день и 28 день, повышают до $80 \text{ мг}/\text{м}^2$. В другом варианте осуществления, если у индивидуума ANC/лекарство составляет $\geq 1000/\text{мм}^3$, индивидууму вводят полную дозу паклитаксела, например, $80 \text{ мг}/\text{м}^2$. Если у индивидуума ANC/лекарство составляет $<1000/\text{мм}^3$, введение паклитаксела прекращают. Если повторно наблюдается ANC $<1000/\text{мм}^3$, дозу паклитаксела можно уменьшить до $60 \text{ мг}/\text{м}^2$. В других вариантах осуществления, если у индивидуума значение числа тромбоцитов/лекарство составляет $\geq 100000/\text{мм}^3$, или после первого введения оно находится в диапазоне $<100000/\text{мм}^3$ и $>75000/\text{мм}^3$, субъекту вводят полную дозу паклитаксела, например, $80 \text{ мг}/\text{м}^2$. Если у индивидуума значение числа тромбоцитов/лекарство составляет $<75000/\text{мм}^3$, введение паклитаксела прекращают. Если у индивидуума повторно наблюдается значение числа тромбоцитов/лекарство $<100000/\text{мм}^3$ и $>75000/\text{мм}^3$, дозу паклитаксела уменьшают до $69 \text{ мг}/\text{м}^2$. В некоторых вариантах, если

у индивидуума регистрируют первый случай невропатии >2 степени, дозу паклитаксела уменьшают по сравнению с полной дозой, например, примерно от 80 мг/м^2 , до примерно 60 мг/м^2 . Если у индивидуума регистрируют второй случай (или продолжение, несмотря на снижение дозы) невропатии >2 степени, дозу паклитаксела уменьшают до 40 мг/м^2 . Если у индивидуума регистрируют третий случай (или продолжение, несмотря на снижение дозы), введение паклитаксела прекращают.

[0154] Данные о том, что паклитаксел вызывает печеночную токсичность, отсутствуют; однако эффект его устранения замедляется у больных с тяжелой дисфункцией печени. Следовательно, дозу паклитаксела у индивидуума с нарушением функции печени можно изменить в соответствии с нижеследующей таблицей.

Таблица 5

Изменение дозы паклитаксела у индивидуумов с дисфункцией
печени

Уровень AST или ALT в сыворотке	Паклитаксел
$<3 \times \text{ULN}$	80 мг/м^2
$\geq 3 \times \text{ULN}$	60 мг/м^2
$\geq 5 \times \text{ULN}$	Приостановка введения лекарства

[0155] Индивидуумам с повышенным уровнем билирубина $>1,5 \text{ мг/дл}$ паклитаксел не дают до тех пор, пока аномальные лабораторные показатели не улучшатся до значения ≤ 1 . После восстановления лечение можно возобновить, используя дозы паклитаксела на один уровень ниже, чем в приведенной выше таблице. Индивидуумы, у которых паклитаксел вызывает токсичность, длящуюся более 2 недель, могут прекратить прием лекарства.

[0156] В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят иммунодепрессант до, одновременно или после введения одного или нескольких химиотерапевтических средств, таких как паклитаксел. В одном варианте осуществления иммунодепрессант, подходящий для введения индивидууму, выбирают из группы,

включающей антагонисты H_2 -рецептора, циметидин, ранитидин, фамотидин, кортикостероиды, дексаметазон, циклоспорин, дифенгидрамин, а также любые их сочетания.

[0157] В других вариантах осуществления способы настоящего изобретения дополнительно включают введение одного или нескольких средств против ангиогенеза до, одновременно или после введения нуклеотидной конструкции, экспрессирующей FAS-химерный белок.

[0158] В некоторых вариантах осуществления индивидууму в соответствии с настоящим изобретением вводят противорвотное средство. Примеры подходящих противорвотных средств включают, без ограничения, антагонисты рецепторов $5-HT_3$ (такие как доласетрон, гранисетрон, ондансетрон, трописетрон, палонсетрон или миртазапин), антагонисты допамина (такие как домперидон, оланзапин, дроперидол, галоперидол, аминазин, дипразин, прохлорперазин, метоклопрамид, ализаприд, или прохлорперазин, компазин, стемзин, буккастем, стеметил или фенотил), антагонисты рецепторов $NK1$ (такие как апрепитант или казопитант), антигистаминные препараты (антагонисты гистаминовых рецепторов H_1) (такие как циклизин, димедрол, дименгидрилат доксиламин, меклозин, прометазин или гидроксизин), каннабиноиды (такие как марихуана, дронабинол, набилон, серии JWH или сативекс), бензодиазепины (такие как мидазолам или лоразепам), антихолинергические средства (такие как гиосцин), стероиды (такие как дексаметазон), триметобензамид, имбирь, эметрол, пропофол, мяту перечную, мусцимол или ажгон, или любые их сочетания. В других вариантах осуществления подходящие противорвотные средства включают дексаметазон, ативан PRN, китрил, компазин, перфеназин, зофран, перфеназин, или любые их сочетания.

[0159] В других вариантах осуществления до, одновременно или после введения нуклеотидной конструкции, кодирующей FAS-химерный белок, вводят жаропонижающие средства. Примеры жаропонижающих средств включают, без ограничения, NSAID (например, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), аспирин, ацетаминофен, метамизол, мелоксикам, феназон, хинин,

или любые их сочетания.

[0160] Способы настоящего изобретения дополнительно включают определение прогрессирования заболевания у индивидуума до или после получения нуклеотидной конструкции, экспрессирующей FAS-химерный белок, или химиотерапевтического средства. В одном варианте осуществления прогрессирование заболевания определяют путем измерения размера опухоли. В другом варианте осуществления прогрессирование заболевания определяют путем измерения экспрессии опухолевого антигена, такого как СА-125. Чтобы определить прогрессирование заболевания, кровь и мочу субъекта собирают до инфузии, в конце инфузии, примерно через три часа после инфузии, и/или примерно через шесть часов после инфузии нуклеотидной конструкции, экспрессирующей продукт Fas-химерного гена. В других вариантах осуществления основные показатели состояния организма индивидуума регистрируют в момент времени 0 минут - 15 минут (непосредственно перед введением дозы), через 30 минут $\pm$ 15 минут после начала введения, через 60 минут $\pm$ 15 минут после начала введения, через четыре часа $\pm$ 15 минут после начала введения, через шесть часов $\pm$ 15 мин после начала введения, при проявлении каких-либо побочных эффектов. Основные показатели состояния организма, подлежащие измерению, включают, без ограничения, систолическое и диастолическое артериальное давление, периферический пульс, температуру тела, частоту дыхания, или любые их сочетания. В следующих вариантах осуществления образцы индивидуума подвергают гематологическому анализу (такому как полный анализ крови, включающий дифференциальный анализ, определение INR и активированного РТТ); анализу коагуляции (такому как определение уровня РТТ); анализу биоразрушения нуклеотидной конструкции, экспрессирующей FAS-химеру; анализу экспрессии ангиогенных и воспалительных биомаркеров (таких как VEGF, PlGF, sVEGFR1, bFGF, IL-1 $\beta\beta$, IL-6, IL-8, TNF- α , sVEGFR2, SDF1 α , CD31, CD34, VEGFR2, фактор Виллебранда и любые их сочетания); анализу экспрессии опухолевого маркера, такого как СА-125, или любым сочетаниям

вышеуказанных анализов.

[0161] У индивидуумов, подходящих для лечения с помощью способов настоящего изобретения, традиционными методами определяют наличие лихорадки и нейтропении. Индивидуумы должны восстановиться после лихорадки и проявлений активной инфекции до возобновления терапии. В некоторых вариантах осуществления индивидуумам, которые не принимают факторы роста, во время следующего цикла добавляют нейпоген или невласту. Индивидуумам, принимающим нейпоген в дозе 5 мкг/кг/день, можно увеличить дозу до 10 мкг/кг по той же схеме.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Конструирование и клонирование вирусного вектора

[0162] Вектор конструируют, используя каркас, содержащий большую часть генома аденовируса типа 5, и частично гомологичный адаптерной плазмиде, способной к рекомбинации.

[0163] Ранний транскрипционный элемент E1 удаляют из каркаса плазмиды и проводят дополнительную модификацию путем удаления pWE25 и участка маркера селекции, отвечающего за устойчивость к Amp.

[0164] Адаптерную плазмиду, содержащую последовательности Ad5, промотора CMV, MCS и полиА SV40, модифицируют путем удаления промотора CMV и промотора PPE-1, а также путем вставки фрагмента Fas-c, используя расщепление рестриктазами. Для конструирования аденовирусного вектора используют модифицированный промотор PPE-1 (PPE-L-3X, SEQ ID NO: 18) и Fas-химерный трансген (Fas-c, SEQ ID NO: 9). Элемент PPE-1-(3X)-Fas-c (2115 п.о.) конструируют на основе элемента PPE-1-(3X)-luc. Этот элемент содержит промотор мышинового препроэндоцитина PPE-1-(3X) размером 1,4 т.о., ген люциферазы, участок полиА SV40, и первый интрон мышинового гена ET-1, полученный из плазмиды pEL8 (8848 п.о.), как описано Harats и др (Harats D. et al., JCI, 1995). Кассету PPE-3-Luc извлекают из плазмиды pEL8 с помощью фермента рестрикции BamHI. Ген люциферазы заменяют на ген Fas-c [который содержит внеклеточный и внутримембранный домены человеческого TNF-R1 (рецептор

фактора некроза опухоли 1, SEQ ID NO: 4), а также внутриклеточный домен Fas (p55) (SEQ ID NO: 8) (Boldin et al, JBC, 1995)] с получением кассеты PPE-L-3x-Fas-c.

[0165] Плазмида PPE-1(3x)-Fas-c - Затем кассету вводят в каркас плазмиды, используя расщепление рестриктазами, и получают плазмиду PPE-1(3x)-Fas-c.

[0166] Плазмида адаптер-PPE-1(3x)-Fas-c - Элемент PPE-L-3x-Fas-c извлекают из конструкции плазмиды PPE-L-3x-Fas-c первого поколения и амплифицируют с использованием праймеров ПЦР, обеспечивающих введение участков рестрикции SnaB1 и EcoR1 на 5'-конце и 3'-конце соответственно. Указанные участки используют для клонирования фрагмента PPE-Fas-c в адапторной плазмиде, содержащей участки расщепления SnaB1 и EcoR1, с получением плазмиды адаптер-PPE-L-3x-Fas-c, используемой для трансфекции клеток-хозяев (таких как клетки PER.C6).

Пример 2

Эффективность и безопасность VB-111 у мышей с метастатической карциномой легких Льюиса (LLC)

Краткое описание

[0167] В этом исследовании мышинные модели LLC получают VB-111 (109 или 1011 вирусных частиц (VP)), карбоплатин (20 или 50 мг/кг) и алипта (10 или 30 мг/кг), или сочетания указанных низкомолекулярных средств и аденовектора.

[0168] Введение VB-111 в обеих дозах позволяет достичь 100% выживания. Введение низких доз химиотерапевтического средства приводит небольшому снижению выживания (94,1%), которое подобно снижению, наблюдающемуся при введении среды (93,8%). Однако введение высоких доз химиотерапевтического средства приводит к наибольшему снижению процента выживания (50%). При применении сочетанной терапии достигают более низкого выживания, чем при введении только VB-111 (64%-93%).

[0169] Массы органов (сердце, почки и головной мозг) в основном сходны у особей из разных групп. Некоторые различия между группами наблюдаются по массам печени, селезенки и яичек, причем, как правило, более высокие массы наблюдаются у особей, получающих одну высокую дозу VB-111, или любое сочетание с этой

дозой.

[0170] Существенные различия в функции печени по сравнению с введением среды отсутствуют. Как правило, сочетанная терапия не вызывает более высокой токсичности, чем составляющие ее отдельные терапии.

[0171] Сочетание 109 VB-111 + высокая доза химиотерапевтического средства является гораздо более эффективным, чем одно химиотерапевтическое средство в высокой дозе. Кроме того, сочетанное лечение приводит к повышению средних и медианных значений опухолевой массы по сравнению с введением только 109 VB-111 (1,5 и 5 раз для среднего и медианного значения, соответственно), хотя результаты не являются статистически значимыми. Этот эффект может приобрести статистическую значимость при проведении испытаний на более крупных группах.

[0172] Сочетание 109 VB-111 + высокая доза химиотерапевтического средства вызывает снижение опухолевой массы, подобное наблюдаемому в результате введения 1011 VB-111, поскольку значимое различие между этими двумя группами отсутствует. Указанное значимое сходство с эффектом от введения 1011 VB-111 не наблюдается при введении только 109 VB-111.

[0173] Применение сочетания 109 VB-111 + высокая доза химиотерапевтического средства позволяет снизить дозу VB-111 при сохранении высокой эффективности и повысить низкую эффективность используемых по отдельности химиотерапевтических средств карбоплатин и алипта.

Введение

[0174] Карцинома легких Льюиса (LLC) является широко используемой мышинной моделью метастазирования (Varda-Bloom et al., 2001). Данное исследование проводят с целью определения потенциального синергизма VB-111 и традиционного химиотерапевтического средства (такого как карбоплатин и алипта), используемых в сочетанной терапии: чтобы определить эффективность разовой дозы VB-111 (109 или 1011 VP/мышь), используемого в качестве единственного лекарственного средства или в сочетании с многократным внутрибрюшинным введением

карбоплатина (20 или 50 мг/кг) и алипта (10 или 30 мг/кг), а также для оценки и характеристики безопасности и переносимости VB-111, используемого в качестве единственного лекарственного средства или в сочетании с упомянутым выше химиотерапевтическим средством.

[0175] Схема исследования приведена в таблице 6.

Таблица 6

Схема исследования

Исследуемые группы и основные сроки	Животных подразделяют на 9 групп следующим образом:			
		Вводимое средство	Доза (вр/мышь)	Число животных
	Группа 1	VB-111	10^{11}	15
	Группа 2	VB-111	10^9	15
	Группа 3	VB-111 Карбоплатин+ Алипта	10^{11} 20 мг/кг+ 10 мг/кг	15
	Группа 4	VB-111 Карбоплатин+ Алипта	10^{19} 20 мг/кг+ 10 мг/кг	13
	Группа 4	Карбоплатин+ Алипта	20 мг/кг+ 10 мг/кг	16
	Группа 6	VB-111 Карбоплатин+ Алипта	10^{11} 50 мг/кг+ 30 мг/кг	15
	Группа 7	VB-111 Карбоплатин+ Алипта	10^9 50 мг/кг+ 30 мг/кг	14
	Группа 8	VB-111 Карбоплатин+ Алипта	10^{11} 50 мг/кг+ 30 мг/кг	14
	Группа 9	Среда	-	16

	Каждое животное получает одну инъекцию дозы VB-111 или среды в случайном порядке на 0 день $\pm$ 1,5 дней после первичного удаления опухоли. 2 дозы карбоплатина вводят на 5-6 дни, 10 доз алимта вводят, начиная с 5 дня. Животных обследуют с целью оценки безопасности и эффективности на протяжении всего исследования до дня умерщвления, который наступает, когда умирает 5-ое контрольное животное (группа 9).
Продолжительность исследования	Примерно 1 месяц, начиная с 0 момента времени.
Животные	133 самца мышей C57B16 (возраст 11-13 недель), у которых ожидается развитие метастаз в легких, после введения клеток карциномы легких Льюиса D122 в подушечки левой стопы и удаления первичной опухоли (ампутации дистального сегмента конечности).
Тестируемые средства и композиции	VB-111: Аденовирус 5, из которого удален E1, частично удален E3, и который содержит промотор PPE-1(3x) и Fas-химерный трансген, в среде (см. ниже). Среда: PBS+10% глицерин. Алимта: Пеметрексед, 500 мг порошка. Карбоплатин: "ЕВЕВЕ" 10 мг/мл.
Дозировка	VB-111 вводят в хвостовую вену мыши в общем объеме 100 мкл, 20 или 50 мг/кг. Карбоплатин вводят в двух дозах на 5-6 дни, 0,1 мл в.б., и 10 доз алимта по 10 или 30 мг/кг вводят, начиная с 5 дня, 0,1 мл, в.б.

Оценка безопасности	Общее состояние здоровья всех животных отслеживают ежедневно на протяжении всего исследования. Массу животных и клинические симптомы регистрируют перед началом исследования, после резекции первичной опухоли, на 0 день (день введения лекарства) и затем еженедельно до конца исследования. Лабораторные анализы включают химический анализ образцов крови (для проверки функции печени), взятых у 5 мышей/группу в конце исследования. Основные органы (печень, селезенка, сердце, почки, легкие, гонады и мозг) анализируют после умерщвления животных (5 мышей/группу).
Оценка эффективности	Эффект лечения оценивают после смерти каждого животного по массе легкого и по опухолевой массе.
Статистика	Опытные группы сравнивают, используя однофакторный ANOVA, путем сравнения масс органов, опухолевых масс и показателей функции печени. Чтобы определить группу или группы, которые отличаются от других, проводят процедуру множественного сравнения Данна (GPT 16 день, GOT 16 день и опухолевая масса). Массы тел в каждой группе на 0 день сравнивают с массами тел в день умерщвления (парный t-тест). Чтобы определить эффективность, группы анализируют, используя однофакторный ANOVA. Если критерий нормальности нельзя определить, используют метод Данна. Кроме того, проводят индивидуальные сравнения среди двух групп с помощью теста Манна-Уитни.

Материалы и методы

Тестирование и справочные материалы

Название: VB-111 (PPE-fas)

Химическое название: Не указано

Активные компоненты: аденовируса 5, E1 удален, E3 частичного удален, содержит промотор PPE-1(3x) и fas-химерный трансген

Среда: PBS и глицерин

Поставщик: VBL

Физическое состояние: Жидкость

Условия хранения: $\leq -65^{\circ}\text{C}$, в криогенных флаконах

Приготовление препарата: в день обработки флакон оттаивают и перемешивают путем переворачивания

Название: карбоплатин

Химическое название: Ebewe

Среда: вода для инъекций

Поставщик: Ebewe

Физическое состояние: Жидкость (450 мг/45 мл)

Условия хранения: КТ

Название: алимта

Химическое название: пеметрексед

Среда: вода для инъекций

Поставщик: Lilly

Физическое состояние: порошок

Условия хранения: КТ:

Контроль:

Название: PBS+10% глицерина

Поставщик: VBL

Физическое состояние: Жидкость

Условия хранения: $\leq -65^{\circ}\text{C}$, в криогенных флаконах

Приготовление препарата: в день обработки флакон оттаивают и держат на льду в течение не более 30 минут.

[0176] Клетки карциномы легких Льюиса D122 оттаивают. В первый день клетки собирают, суспендируют до конечной концентрации $5 \times 10^5/50$ мкл и вводят в подушечку стопы левой

ноги. Диаметр опухоли измеряют с помощью циркуля через пять дней после инъекции. Затем его измеряют еженедельно до достижения 5 мм и затем ежедневно до ампутации по достижению 7 мм (определяют как день -5). После умерщвления собирают мозг, сердце, печень, селезенку, почки и яички, взвешивают и анализируют по следующим параметрам: цвет и структура интактного органа, присутствие поражения или каких-либо доказательств метастазирования внутри органа (после получения срезов). Лабораторные анализы функции печени (уровни GOT и GPT в крови) проводят на образцах, полученных от 5 мышей/группу на 5 день $\pm$ 1 и в конце исследования (16 день).

[0177] Все процедуры на животных одобрены "Комитетом по содержанию и использованию животных" медицинского центра "ШИБА", Тель-ха-Шомер. Проводят слепое плацебо-контролируемое исследование. Мыши C57B16 получают клетки карциномы легких Льюиса (D122) путем подкожной инъекции в подушечку стопы левой ноги. Когда ткань опухоли достигает диаметра 7 мм (примерно через 3 недели после введения клеток), подушечку стопы с первичной опухолью удаляют под анестезией. Этот день определяют как день -5. 0 День представляет собой день первого введения лекарственного средства, через 5 дней после резекции первичной опухоли. Мышей случайным образом распределяют в разные экспериментальные группы на 0 день, как описано в приведенной ниже таблице. Тестируемый аденовирусный вектор или контрольное вещество вводят в хвостовую вену в общем объеме 100 мкл на мышшь. Суточную дозу карбоплатина и алименты вводят в.б. в общем объеме 100 мкл на мышшь в.

[0178] Животных обследуют с целью анализа безопасности и эффективности (как описано ниже в схеме анализов) на протяжении всего исследования вплоть до умерщвления. Смерть каждого животного во время исследования регистрируют и стараются определить причину смерти. День умерщвления для каждой мышши устанавливают следующим образом: когда 5-ая из контрольных мышшей (получающих PBS+10% глицерина, группа 9) умирает от метастаз, определяют число дней, прошедших после 0 дня (первое в.в. введение среды). Указанное число дней используют для

определения дня умерщвления для всех живых мышей (то есть, если 5 контрольная мышь умирает на 16-й день, каждую мышь умерщвляют, когда она доживает до своего собственного 16 дня).

[0179] Схема анализов эффектов приведена в таблице 7.

Таблица 7

Схема анализов

Параметр	Способ	День исследования					
		<-5	-5 Резекция первичной опухоли	0	5±1	С этого времени еженеде льно ±1	Оконча ние
Ширина первичной опухоли	Циркуль	Начиная с 5 дня после инъекции D122 каждые 5 дней до достижения 5 мм, затем ежедневно					
Масса тела	-	√	После резекции определяют основную массу без ступни	√		√	√
Клинические симптомы	См. ниже*	√	√	√	√	√	√
Химический анализ крови (на функцию печени) **	SM 30-20-06				√		√
Общее состояние здоровья	SOP 10-25-01	√	√	√	√	√	√

Масса легких	Взвешивание						√
Анализ основных органов**	Визуальное обследование и окрашивание аномальных тканей						√

*Кожа, шерсть, слизистые мембраны, дыхание, неврологический контроль, тремор, слюноотделение, диарея, соматомоторная активность, летаргия, судороги, аномальное поведение, сон, кома.

**От 5 мышей из группы.

Результаты

[0180] В группах мышей, получающих только VB-111 в дозах 109 и 1011 VP, все животные доживают до 16 дня. Как показано в таблице 8, сочетанное лечение приводит к уменьшению выживаемости, хотя самый низкий процент выживаемости наблюдается у мышей, получающих высокую дозу химиотерапевтического средства.

Таблица 8

Смертность на 16-й день

Группа	Общее число животных (n)	Число выживших животных (n)	Выживаемость (%)
Среда	16	15	93,8%
VB-111 10 ⁹ VP	15	15	100%
VB-111 10 ¹¹ VP	15	15	100%
Карбоплатин 20 мг/кг + Алимта 10 мг/кг	17	16	94,1%
Карбоплатин 50 мг/кг + Алимта 30 мг/кг	14	7	50%
VB-111 109 VP + Карбоплатин 20 мг/кг + Алимта 10 мг/кг	13	11	84,6%

VB-111 109 VP + Карбоплатин 50 мг/кг + Алимта 30 мг/кг	14	9	64,3%
VB-111 1011 VP + Карбоплатин 20 мг/кг + Алимта 10 мг/кг	15	12	80%
VB-111 1011 VP + Карбоплатин 50 мг/кг + Алимта 30 мг/кг	15	14	93,3%

Чтобы определить эффективность, в день умерщвления взвешивают легкие. Масса нормальных легких составляет ~0,2 г. Опухолевую массу определяют как массу легких минус 0,2 г. Среднее и медианное значения опухолевой массы показаны в таблице 9.

Таблица 9

Среднее и медианное значения опухолевой массы

Номер группы	Способ лечения	Средняя опухолевая масса (г) $\pm$ SD	Медианное значение (г)
1	VB111 10^{11}	0,10 $\pm$ 0,04	0,10
2	VB111 10^9	0,34 $\pm$ 0,21	0,40
8	Высокая доза химиотерапевтического средства	0,48 $\pm$ 0,15	0,50
5	Низкая доза химиотерапевтического средства	0,49 $\pm$ 0,34	0,50
6	VB111 10^{11} + высокая доза химиотерапевтического средства	0,22 $\pm$ 0,16	0,20
7	VB111 10^9 + высокая доза химиотерапевтического средства	0,20 $\pm$ 0,24	0,08

3	VB111 10^{11} + низкая доза химиотерапевтического средства	$0,47 \pm 0,26$	0,46
4	VB111 10^9 + низкая доза химиотерапевтического средства	$0,53 \pm 0,30$	0,62
9	Среда	$1,00 \pm 0,20$	0,90

[0182] Как показано на фиг.1, все способы лечения приводят к уменьшению опухолевой массы по сравнению с введением среды. На фигуре 1 показано, что в группах, получающих E11, E9 + высокая доза химиотерапевтического средства и E11 + высокая доза химиотерапевтического средства, средняя опухолевая масса ниже, чем в других экспериментальных группах.

[0183] Проводят несколько статистических сравнений значений эффективности. С помощью однофакторного метода ANOVA определяют статистически значимое превышение опухолевой массы в группе, получающей среду ($p = <0,001$), по сравнению с другими группами, за исключением группы, получающей сочетание VB E9 + низкая доза химиотерапевтического средства. Наблюдается значимое уменьшение опухолевой массы в группе, получающей VB-111 1E11, по сравнению с группами, получающими химиотерапевтические средства, и с группами, получающими сочетанную терапию с низкой дозой химиотерапевтического средства. При использовании теста Манна Уитни с индивидуальными сравнениями среди двух групп определяют значимое уменьшение опухолевой массы в группе, получающей VB-111 E11, по сравнению с другими группами, за исключением группы, получающей E9 + высокая доза химиотерапевтического средства. В группе, получающей E9 + высокая доза химиотерапевтического средства, наблюдается значимое снижение по сравнению с другими группами, за исключением групп, получающих E11, E9 и E11 + высокая доза химиотерапевтического средства. Результаты приведены на фигуре 2 в виде коробчатой диаграммы.

Заключение

[0184] Введение VB-111 в обеих дозах обеспечивает 100%

выживаемость. Введение низких доз химиотерапевтических средств приводит к небольшому снижению выживаемости (94,1%), которое подобно снижению, наблюдающемуся при введении среды (93,8%). Однако введение высоких доз химиотерапевтического средства приводит к наибольшему снижению процента выживания (50%). При применении сочетанной терапии достигают более низкого выживания, чем при введении только VB-111 (64%-93%).

[0185] Массы органов (сердце, почки и головной мозг) в основном сходны у особей из разных групп. Некоторые различия между группами наблюдаются по массам печени, селезенки и яичек, причем, как правило, более высокие массы наблюдаются у особей, получающих одну высокую дозу VB-111, или любое сочетание с этой дозой.

[0186] Существенные различия в функции печени по сравнению с введением среды отсутствуют. Как правило, сочетанная терапия не вызывает более высокой токсичности, чем составляющие ее отдельные терапии.

[0187] Сочетание 109 VB-111 + высокая доза химиотерапевтического средства является гораздо более эффективным, чем одно химиотерапевтическое средство в высокой дозе. Кроме того, сочетанное лечение приводит к повышению средних и медианных значений опухолевой массы по сравнению с введением только 109 VB-111 (1,5 и 5 раз для среднего и медианного значения, соответственно), хотя результаты не являются статистически значимыми. Этот эффект может приобрести статистическую значимость при проведении испытаний на более крупных группах.

[0188] Сочетание 109 VB-111 + высокая доза химиотерапевтического средства вызывает снижение опухолевой массы, подобное наблюдаемому в результате введения E11, поскольку значимое различие между этими двумя группами отсутствует (что можно определить на коробчатой диаграмме и с помощью статистического сравнения Манна-Уитни). Указанное значимое сходство с эффектом от введения 1011 VB-111 не наблюдается при введении только 109 VB-111.

[0189] Применение сочетания 109 VB-111 + высокая доза

химиотерапевтического средства позволяет снизить дозу VB-111 при сохранении высокой эффективности и повысить низкую эффективность используемых по отдельности химиотерапевтических средств карбоплатин и алипта.

[0190] В группе, получающей 109 VB-111 + высокая доза химиотерапевтического средства, и выживаемость, и масса снижаются меньше, чем в группе, получающей только высокую дозу химиотерапевтического средства: выживаемость - 64% и 50%, соответственно, потеря массы - 9,7% и 11,6%, соответственно. По массам тестируемых органов различия в двух указанных группах отсутствуют.

Пример 3

Введение химерной молекулы Ad5PPE-L-3X-Fas в сочетании с паклитакселом

[0191] Перспективное, открытое исследование с увеличением дозы, фаза I/II, проводят в нескольких центрах (2 центра) с целью определения безопасности и эффективности введения AD5PPE-L-3x-Fas-химеры (VB-111) в клинической практике, где такие параметры, как токсичность, побочные эффекты, титр антител, биораспределение, прогрессирование заболевания, рецидив заболевания и выживаемость, регистрируют у пациентов, несущих солидные первичные и метастатические опухоли (такие как рецидивирующий рак эпителия яичников, опухоль фаллопиевой трубы, первичная опухоль брюшной полости, МММТ и папиллярные серозные мюллеровы опухоли), и получающих путем внутривенной инфузии разные дозы химерного аденовирусного вектора Ad5PPE-L-3x-Fas в сочетании с паклитакселом.

[0192] Также оценивают влияние VB-111 на образование антител против аденовирусного вектора, ответ опухоли, ангиогенез и уровень биомаркеров.

МАТЕРИАЛЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Цели исследования

[0193] Рабочая гипотеза заключается в том, что VB-111 в сочетании с еженедельным введением паклитаксела обуславливает приемлемые уровни токсичности и степени ответа, или клиническое улучшение, достаточное для того, чтобы гарантировать

возможность проведения анализа в будущем.

Основные цели

[0194] 1. Определение токсичности ограниченного числа доз сочетания VB-111 и вводимого еженедельно паклитаксела, охватывающих предполагаемые эффективные дозы.

[0195] 2. Исследование эффективности (ответ RECIST, CA-125-ответ и выживаемость при отсутствии прогрессирования (PFS)) в расширенной группе, получающей оптимально переносимую дозу сочетания VB-111 и вводимого еженедельно паклитаксела.

Дополнительные цели

[0196] Исследование прогностических маркеров токсичности и ответа.

Обзор схемы исследования и анализа

[0197] В данном открытом, одноцентровом исследовании, фаза I/II, объединяют VB-111, вводимый путем инфузии на 1 день каждого 2-ого 28-дневного цикла, с паклитакселом в дозе 40-80 мг/м², еженедельно вводимым путем инфузии в течение 1 часа на 1, 8, 15 и 22 день каждого 28-дневного цикла, чтобы выяснить, может ли это сочетание увеличить степень ответа по сравнению с историческим контролем в указанной популяции, получающей предварительное лечение. Пациенты могут продолжать терапию при наличии улучшения и вносить в нее изменения, делая запланированные перерывы в приеме паклитаксела, чтобы избежать избыточной невропатии, но они не должны прерывать проведение инфузий VB-111. Исследование проводят по 2-стадийной схеме Симона и при условии ≥ 2 ответов на 10 пациентов участие в исследовании продолжается.

Исследуемая популяция:

[0198] В исследовании участвуют индивидуумы, страдающие от рецидивирующего рака эпителия яичников, рака фаллопиевых труб, первичной опухоли брюшной полости, МММТ и папиллярной серозной муллеровой опухоли.

Запланированное число пациентов, участвующих в исследовании

[0199] В соответствии со схемой исследования требуется от

2 до 42 пациентов с запущенным раком (максимум 6 в группах повышения дозы (= 18 пациентов) и до 29 пациентов на уровень дозы MTD, чтобы оценивать корреляционные/специальные исследования, а также для подтверждения безопасности.

Выбор пациентов

[0200] Составляют схему фазы I/II для определения степени ответа в соответствии с критериями RECIST и уровня CA-125 (межгрупповой маркер гинекологического рака (GCIG)), описания профиля безопасности и характеристики неблагоприятных событий и токсичности. Исследование фазы I включает схему 3+3 для 3 уровней доз. Для исследования фазы II набирают до 10 пациентов на первой стадии, в том числе участников групп уровней доз 2 и 3, которые получают полную дозу химиотерапевтического средства. Если наблюдается, по меньшей мере, два ответа, дополнительно набирают 19 пациентов в расширенную группу, содержащую максимум 29 участников. Анализ эффективности используют для оценки степени ответа. Проводят анализ безопасности и, если имеют место 2 или более случаев перфорации ЖКТ со степенью ≥ 3 на первой стадии, или 3 случая в любой момент, исследование закрывают.

Критерии для включения индивидуумов в экспериментальную группу:

[0201] 1. Возраст пациента >18 .

[0202] 2. Гистологически подтвержденные рак эпителия яичников, брюшной полости или фаллопиевой трубы, а также папиллярные серозные карциномы матки (UPSC) и гинекологические МММТ.

[0203] 3. Допускается до 3 ранее проведенных курсов химиотерапии по поводу метастатического заболевания.

[0204] 4. Пациенты должны предварительно получать платину или терапию на основе платины.

[0205] 5. Оценка состояния по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) 0-1.

[0206] 6. Платина-устойчивое или резистентное заболевание определяют как прогрессирующее с использованием результатов

визуализации или анализа СА-125 в течение 6 месяцев после завершения или во время приема платина- и таксан-содержащей терапии (первичное или вторичное – то есть пациенты могут получать только терапию на основе платины по поводу рецидивирующего платина-чувствительного заболевания с последующим отдыхом от введения платины <6 месяцев).

[0207] 7. Требуется наличие заболевания, измеряемого или оцениваемого с использованием RECIST или СА-125 (чтобы стандартизировать соответствие требованиям, если некоторые пациенты подходят по результатам как RECIST, так и СА-125, оценка по RECIST превалирует).

[0208] 8. Адекватная функция костного мозга.

[0209] 9. Адекватные гематологические функции:

i. ANC $\geq 1000/\text{мм}^3$

ii. PLT $\geq 100000/\text{мм}^3$

iii. PT и PTT (секунды) $< 1,2 \times \text{ULN}$ (индивидуумы с PTT $> \text{ULN}$ должны иметь отрицательный LAC)

[0210] 10. Адекватные функции органов:

a. Степень СТС невропатии меньше или равна 1.

b. Предварительное облучение не должно затрагивать $\geq 30\%$ основных участков, содержащих костный мозг (таз, поясничный отдел позвоночника)

c. SGOT/SGPT/щелочная фосфатаза $\leq 2,5 \times \text{ULN}$ или $< 5 \times \text{ULN}$ для документально подтвержденных метастазов в печени

d. Билирубин $\leq 1,5 \times \text{ULN}$

e. Креатинин $\leq 1,5 \times \text{ULN}$

f. Протеинурия $< 2+$ по тест-полоске при скрининге, или UPC (отношение белка мочи креатинина) $< 1,0$.

[0211] 11. Пациент должен восстановиться после острой токсичности от предыдущего лечения, включающего в себя лучевую терапию, химиотерапию, биологическую терапию, за исключением невропатии 1 степени, или анемии и алопеции любой степени.

[0212] 12. Предварительное лечение антиангиогенным средством не является показателем для исключения.

[0213] 13. У индивидуума отсутствует ранее существовавшая перфорация ЖКТ, обструкция ЖКТ, или индивидуум ранее не проходил визуализирующего исследования кишечника.

[0214] 14. У индивидуума отсутствует активное, нелеченное психическое заболевание или неврологические симптомы, требующие лечения (допускается сенсорная невропатия I степени). Отсутствуют нелеченные метастазы в центральной нервной системе или в головном мозге. Отсутствуют деменция или существенное изменение психического статуса, которое препятствует пониманию и/или получению информированного согласия.

[0215] 15. У пациентов отсутствует какая-либо известная гиперчувствительность к Cremophor® EL. Однако участники являются подходящими, если у них ранее наблюдалась реакция на паклитаксел, но затем развилась способность переносить препарат при повторном введении.

[0216] 16. Отсутствуют данные по неконтролируемым бактериальным, вирусным или грибковым инфекциям.

[0217] 17. Пациенты не получали другую терапию, проходящую клинические испытания, в течение последних 30 дней перед введением дозы.

[0218] 18. Пациент должен быть достаточно компетентным, чтобы дать информированное согласие.

Критерии для исключения индивидуумов из экспериментальной группы:

[0219] 1. Более 3 предыдущих курсов химиотерапии по поводу рецидивирующего рака.

[0220] 2. Отсутствие активной злокачественной опухоли, отличной от поверхностного базальноклеточного и поверхностного плоскоклеточного рака, или карциномы шейки матки *in situ* в течение последних 2 лет. Пациенты, у которых диагностируют сопутствующую мюллерову опухоль (как правило, рак эндометрия), не исключаются. Пациенты с малоопасным (локализованным, невоспалительным) раком молочной железы, диагностируемым в течение 2 лет, получающие терапию, направленную на излечение, не исключаются.

[0221] 3. Несогласие с проведением исследования и/или последующих процедур.

[0222] 4. Ожидаемая продолжительность жизни меньше 3 месяцев.

[0223] 5. Общие критерии токсичности (СТС) невропатия 1 или более высокой степени (моторная или сенсорная), возникшая в результате сопутствующих заболеваний, отличных от последствий предварительного введения таксана, таких как диабет.

[0224] 6. Сексуально активные женщины детородного возраста, хотя они и редко участвуют в исследовании, должны использовать эффективные методы контрацепции в течение исследования, так, чтобы свести к минимуму риск неудачи. До включения в исследование женщины детородного возраста должны быть предупреждены о необходимости избегать беременность во время участия в испытании и о потенциальных факторах риска для непреднамеренной беременности. Все женщины детородного возраста должны иметь отрицательный тест на беременность в течение 14 дней до первого приема исследуемого продукта. Если тест на беременность положительный, пациент не должен получать исследуемый продукт и не должен участвовать в исследовании.

[0225] 7. Недостаточно контролируемая гипертензия.

[0226] 8. Предшествующая история гипертонического криза или гипертонической энцефалопатии.

[0227] 9. Застойная сердечная недостаточность II или более высокой степени по шкале Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).

[0228] 10. История развития инфаркта миокарда или нестабильной стенокардии в течение 6 месяцев до 1 дня исследования.

[0229] 11. История развития инсульта или преходящей ишемической атаки в течение 6 месяцев до 1 дня.

[0230] 12. Известная болезнь ЦНС, за исключением леченых метастазов в головном мозге: Леченые метастазы в головном мозге определяют как не имеющие признаков прогрессирования или кровоизлияния после лечения при отсутствии текущей потребности в дексаметазоне, что устанавливается путем клинического

обследования и визуализации головного мозга (МРТ или КТ) в период проведения скрининга. Допускается прием противосудорожных средств (в постоянной дозе). Лечение метастазов в головном мозге может включать в себя облучение целого мозга (WBRT), радиохирургию (RS; гамма-нож, с использованием LINAC или его эквивалента) или их сочетание, по усмотрению лечащего врача. Пациенты с метастазами в ЦНС, перенесшие нейрохирургическую резекцию или биопсию головного мозга в течение 3 месяцев до 1 дня, исключаются из исследования.

[0231] 13. Серьезное сосудистое заболевание (такое как аневризма аорты, требующая реконструктивного хирургического вмешательства, или перенесенный в последнее время периферический артериальный тромбоз) в течение 6 месяцев до 1 дня.

[0232] 14. Кровохарканье ($>1/2$ чайной ложки ярко-красной крови на эпизод) в течение 1 месяца до 1 дня.

[0233] 15. Свидетельства наличия геморрагического диатеза или серьезной коагулопатии (при отсутствии терапевтических антикоагулянтов).

[0234] 16. Серьезное хирургическое вмешательство, открытая биопсия или сильное травматическое повреждение в течение 28 дней до 1 дня, или необходимость серьезного хирургического вмешательства в течение периода исследования.

[0235] 17. Пункционная биопсия или другие незначительные хирургические процедуры, за исключением размещения устройств доступа к сосудам в течение 7 дней до 1 дня.

[0236] 18. Свищ в брюшной полости или перфорация желудочно-кишечного тракта в течение 6 месяцев до 1 дня.

[0237] 19. Текущие признаки и симптомы кишечной непроходимости.

[0238] 20. Текущая зависимость от в.в. гидратации или полного парентерального питания (TPN).

[0239] 21. Серьезная, незаживающая рана, активная язва или нелеченый перелом кости.

[0240] 22. Пациенты, получавшие антиангиогенную терапию в

течение предыдущих 4 недель по поводу TKI, или терапию на основе антитела или пептидного антитела в течение предыдущих 6 недель.

[0241] 23. Пациенты, нуждающиеся в лечении иммунодепрессантами, включающем в себя применение циклоспорина, или имеющие историю хронического применения одного из иммунодепрессантов в течение последних 4 недель до начала исследования. Допускается прием постоянной дозы кортикостероидов (например, начинающийся, по меньшей мере, за 2 недели до начала исследования).

Композиция: AD5-PPE-L-3X-FAS-ХИМЕРА

[0242] Ad5-PPE-L-3X-FAS-химера (SEQ ID NO: 19) представляет собой разрушающее сосуда генно-терапевтическое средство, включающее в себя нереплицирующийся аденовирусный вектор (Ad5, E1 удален), который содержит модифицированный мышинный промотор препроэндоотелина (PPE-l-3x, SEQ ID NO: 18) и FAS-химерный трансген [содержащий гены Fas и человеческого рецептора фактора некроза опухоли (TNF)] (SEQ ID NO: 9). Композицию получают в виде стерильного раствора вектора и поставляют в замороженном состоянии (ниже -65°C) в одноразовых флаконах. Каждый флакон содержит 1,1 мл раствора вектора с определенным титром вируса.

Эффективность и фармакодинамические показатели:

Схема лечения

[0243] Пациентам дают Ad5-PPE-l-3X-fas-химеру в сочетании с еженедельным введением паклитаксела. Продолжительность цикла составляет 28 дней. Пациенты получают паклитаксел путем 60-минутной в.в. инфузии один раз в неделю (дни 1, 8, 15 и 22). Ad5-PPE-l-3X-fas-химеру вводят путем внутривенной инфузии в 1 день нечетных циклов, начиная с 1 цикла и затем каждые два цикла. Схема лечения показана на рисунке 3. Уровни доз для фазы I приведены ниже в таблице 10.

Таблица 10

Уровни дозы для компонента, используемого в фазе I1

Уровень дозы	n	Циклы ² VB-111×Q2	Паклитаксел в.в. Q7d
I ³	3-6	3×10^{12} VPs	40 мг/м ²
2	3-6 ⁴	3×10^{12} VPs	80 мг/м ²
3	3-6	$L \times 10^{13}$ VPs	80 мг/м ²
Расширенная группа	29	MTD	MTD

Примечания:

1. Переход к фазе II происходит после определения максимальной переносимой дозы (MTD) или завершения исследования с использованием 3 уровня доз.

2. Обратите внимание, что общая доза вирусных частиц VB-111 для каждого уровня доз отличается от дозы, используемой для индивидуумов, масса которых <50 кг.

3. Повышение дозы у индивидуума планируется для 1 уровня доз. Для индивидуумов, участвующих в испытании 1 уровня доз, на 1 день 2 цикла доза паклитаксела может быть повышена до 80 мг/м², поскольку эту дозу обычно используют в клинике. Если 2 участника испытывают дозолимитирующую токсичность (DLT) в испытаниях 1-го уровня доз, исследование останавливают без определения MTD.

4. Указанные цифры могут включать в себя: (a) индивидуумов, непосредственно участвующих в испытаниях 2 уровня доз и (b) индивидуумов, участвующих в испытаниях 1 уровня доз, у которых доза повышалась до 2 уровня доз на 1 день 2 цикла для оценки DLT во время 3 цикла.

[0244] Следовательно, члены группы фазы I участвуют в испытаниях с использованием модифицированной схемы 3+3, показанной в таблице 11 и описанной ниже.

[0245] Повышение дозы от 1 уровня доз до 2 уровня доз: если у 2 участников DLT относится к 1 уровню доз, исследование завершают, не определяя MTD. На 1 уровне доз планируется повышение дозы паклитаксела у отдельных участников до 80 мг/м²

в 1 день 2 цикла, и эти участники могут быть засчитаны как участники испытаний 2 уровня доз, хотя в 3 цикле 1 уровня доз проводят одновременное введение VB-111 и паклитаксела (т.е. и индивидуумы, участвующие в испытаниях 2 уровня доз, и индивидуумы, участвующие в 3 цикле 1 уровня дозы с повышением дозы паклитаксела до 80 мг/м^2 , будут учитываться как участники испытаний 2 уровня доз, где может быть от 2 до 12 участников, 6 из которых изначально участвуют в испытаниях 1 уровня доз с последующим повышением дозы). Если DLT отсутствует на 2 уровне доз после оценки 3 участников (либо как новых участников испытания 2 уровня доз, либо как участников испытания 1 уровня доз, у которых повышают дозу паклитаксела), исследование переводят на 3 уровень доз. Данная схема применяется только к группам, у которых повышают дозу паклитаксела (чтобы свести к минимуму количество участников, получающих дозу 40 мг/м^2), но не к группам, у которых повышают дозу VB-111.

[0246] Повышение дозы от 2 уровня доз до 3 уровня доз: После того, как 3 участников зачисляют на 2 уровень дозы и наблюдают в течение 14 дней после первоначального введения VB-111 при отсутствии DLT, участники могут быть зачислены в группу испытаний 3 уровня доз (1×10^{13} VP), где, по меньшей мере, 6 участников получают дозу 3×10^{12} VP на 1 и 2 уровнях доз. 2-ую дозу VB-111 3 уровня доз можно давать только после того, как, по меньшей мере, 2 пациента получили дозу 3×10^{12} VP в отсутствии DLT. Кроме того, мониторинг DLT проводят одновременно в параллельных исследованиях VB-111 фазы I/II. Результаты анализа безопасности, полученные в данных исследованиях, используются совместно с этой группой. Если какая-либо DLT наблюдается на 3 уровне дозы, индивидуумы могут продолжать участие в исследовании и получать дополнительную дозу наряду с 2 уровнем дозы VB-111 (3×10^{12} VP).

Правила принятия решений по поводу повышения дозы

Число пациентов с DLT при заданном уровне доз	Правило принятия решения по поводу повышения дозы
0 из 3**	Переход на следующий уровень доз: ** Повышение дозы внутри группы допускается только в том случае, если три участника полностью обследуются на DLT в течение 28 дней исследования 1 уровня доз. Если в течение 4 недель исследования введения начальных доз у трех участников отсутствуют признаки DLT, начинают исследование 2 уровня доз, в котором участвуют 3 участника наряду с тремя индивидуумами, участвующими в испытании с повышением дозы до 2 уровня доз на 5 неделе (1 день 2 цикла). Таким образом, если нарастание протекает медленно, существует возможность, что индивидуумам, участвующим в исследовании 1 уровня дозы, не будут повышать дозу на 5 неделе (1 день 2 цикла) до завершения обследования на DLT в исследовании 1 уровня доз, и что это будет вновь отложено, если в этой группе будут обнаружены случаи DLT.

1 из 3	Введение 3 дополнительных пациентов: Если у 0 из этих 3 дополнительных участников наблюдается DLT, переходят к следующему уровню доз. Если один или несколько из указанных участников испытывают DLT, то повышение дозы останавливают, и дозу ниже той, которая вызывает DLT, принимают за MTD. Если дополнительных участников вводят в исследование 1-го уровня доз, исследование закрывают без определения MTD.
≥ 2	Повышение дозы останавливают и дозу ниже указанной принимают за MTD. Если 2 участника испытывают DLT на 1 уровне доз, исследование закрывают без определения MTD.
≤ 1 из 6 при максимальной вводимой дозе	Данную дозу принимают за MTD и в этой группе рекомендуют введение дозы фазы II.

[0247] С учетом новой природы средства, новых участников вводят последовательно с интервалом, по меньшей мере, в 2 дня после начала участия нового индивидуума в исследовании. Нескольким новым участникам исследования не вводят дозу в один и тот же день. Завершение одного 28-дневного цикла исследования является основой для определения MTD и DLT в каждой экспериментальной группе. Степень токсичности оценивают в соответствии с Общей терминологией критериев нежелательных явлений (CTCAE), версия 4 (доступной в виде загружаемого файла в Интернете: <http://ctep.info.nih.gov>).

Определение дозолимитирующей токсичности (DLT)

[0248] Анализ потенциальной DLT у участников DL1 проводят во время первого цикла (1 цикл), а также во время третьего цикла.

[0249] Токсичность оценивают в соответствии с CTCAE, версия 4.0. Дозолимитирующую токсичность определяют следующим образом:

1. Абсолютное число нейтрофилов (ANC) составляет $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ в течение ≥ 4 дней, или абсолютное число нейтрофилов составляет $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ в совокупности с сепсисом, или наблюдается лихорадка 3-4 степени ($>100,2^\circ\text{F}$), трудно контролируемая жаропонижающими средствами.

2. Число тромбоцитов $<10 \times 10^9/\text{л}$ в течение любого периода.

3. Любая другая, связанная с лекарственным средством, не печеночная и не гематологическая токсичность >3 степени.

Указанные параметры не включают тошноту или рвоту ≥ 3 степени, которую можно контролировать лекарственными средствами (если тошнота и/или рвота не контролируется лекарственными средствами и наблюдается во время первого цикла, считают, что она является показателем DLT) или гипокалиемию ≥ 3 степени, гипонатриемию, гипофосфатемию, гипомagneмию и гипокальциемию, если они легко корректируются, протекают без клинических симптомов, и не сопровождаются медицински значимыми осложнениями (например, изменениями в ЭКГ).

[0253] События лихорадки 3-4 степени, встречающиеся в течение 24 часов после введения VB-111, не относят к показателям DLT, если они отвечают на симптоматическую терапию. Пациенты, у которых наблюдается неприемлемая токсичность и/или прогрессирование, в любой момент времени могут быть удалены из исследования.

Процедуры исследования

Предшествующий лечению анализ:

[0254] Клиницист (MD или NP) оценивает пациентов, отвечающих критериям пригодности. Изучение истории болезни, физическое обследование и регистрацию массы, жизненно важных признаков и ЭКГ проводят в течение 14 дней, предшествующих началу первого цикла лечения. Исследования с целью проведения фоновых измерений, где это применимо, следует проводить в течение 28 дней, предшествующих началу первого цикла лечения.

[0255] Перед любым исследованием, связанным с введением дозы, в 1 день каждого цикла следует снова подтверждать пригодность индивидуумов.

[0256] Нижеследующие анализы нужно проводить в течение 3 дней D1 (за исключением 1 цикла, когда анализы крови можно проводить в течение 14 дней, предшествующих 1 дню):

[0257] 1. Клиническая оценка: история болезни, физическое обследование, анализ жизненно важных показателей (VS) и проверка на риск кровотечения. В другие моменты времени анализ VS можно проводить в соответствии с институциональным стандартом оказания медицинской помощи.

[0258] 2. Гематология: клинический анализ крови с дифференциалом, INR и активированным PTT.

[0259] 3. Коагуляция: В случае, если частичное тромбопластиновое время (PTT) превышает верхнюю границу нормы (ULN), кровь следует проверить на волчаночный антикоагулянт (LAC). Пациенты с удлинённым aPTT не должны получать VB-111 до нормализации aPTT. Для пациентов, положительных по волчаночному антикоагулянту (LAC), требуется получение отрицательного результата для повторного введения дозы VB-111. Чтобы получить устойчивый положительный результат по LAC или антифосфолипидным антителам (APLA), тест необходимо повторить в течение 12 недель после исходного положительного теста.

[0260] 4. Комплексная метаболическая панель: включает анализ электролитов, функции печени (LFTS), азота мочевины крови (BUN)/креатинина (Cr), кальция и магния.

[0261]

5. Моча: собирают для рутинного анализа.

[0262] 6. VB-111-специфические лаборатории: Кровь берут для анализа:

(i) Биораспределения: определение уровня ДНК аденовируса VB-111 и экспрессии трансгена.

(ii) Биомаркеров: биомаркеры для антиангиогенной терапии определяют в периферической крови, полученной от всех пациентов, участвующих в данном исследовании. Плазму анализируют на содержание ангиогенных и воспалительных биомаркеров VEGF, PlGF, sVEGFR1, bFGF, IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α (с использованием многолуночных планшето ELISA, Meso-Scale

Discovery) и sVEGFR2 и SDF1a (с использованием наборов R&D Systems). Число циркулирующих в крови клеток определяют в свежих образцах с помощью стандартного метода проточной цитометрии. Архивные ткани анализируют на CD31, CD34, VEGFR2, и vWF.

(iii) Опухолевый маркер: CA-125

(iv) Антитела: Уровни антител против вируса AD-5 (включающих в себя нейтрализующие антитела).

Исследование с введением путем инфузии:

[0263] ANC должно быть $\geq 1000/\text{мм}^3$, а число тромбоцитов $\geq 100000/\text{мм}^3$ до введения путем инфузии (паклитаксела или VB-111).

Инфузия паклитаксела:

[0264] Противорвотная терапия: противорвотная терапия может включать в себя внутривенное введение 10 мг дексаметазона prn, внутривенное введение 0,5-2,0 мг ативана и/или пероральное введение 10 мг компазина, или пероральное введение 4 мг перфеназина, в соответствии с институциональными стандартами.

[0265] Введение можно проводить в следующей последовательности: паклитаксел и затем VB-111.

[0266] Паклитаксел вводят еженедельно в течение 60 мин в начальной дозе $40-80 \text{ мг}/\text{м}^2$ через встроенный фильтр с микропористой мембраной, размер пор которой не превышает 0,22 мкм.

[0267] Все пациенты должны проходить премедикацию перед введением паклитаксела в целях предотвращения тяжелых реакций гиперчувствительности. Пациентам дают перорально 20 мг дексаметазона ночью перед введением и 20 мг утром в день введения первой дозы, а затем, если паклитаксел хорошо переносится, на 2-й неделе пероральную премедикацию не проводят, только внутривенную, после чего пациента можно отучать от дексаметазона и после 3-й недели больше его не использовать. Типичный режим премедикации включает за 30-60 минут до введения паклитаксела: внутривенное введение (в.в.) 10-20 мг дексаметазона, в.в. 50 мг димедрола (или его

эквивалента) и в.в. 300 мг циметидина или 50 мг ранитидина. В качестве альтернативы можно использовать 20 мг фамотидина в.в. Если у пациента наблюдается реакция гиперчувствительности при введении паклитаксела, дозу дексаметазона можно увеличить по усмотрению исследователя.

1 День нечетных циклов:

[0268] Помимо упомянутых выше, на D1 нечетных циклов проводят нижеследующие процедуры.

Измерение опухолей:

[0269] Перед D1 цикла 1 (в течение периода, составляющего до 1 месяца) и затем каждого нечетного цикла (например, цикла 1, 3, 5 и т.д. = каждые 8 недель) до прогрессирования заболевания, проводят измерение опухолей с помощью КТ грудной клетки, брюшной полости и таза. Измерение проводят до введения препарата, в течение периода, составляющего не более 3 дней.

Исследование с введением лекарства путем инфузии: VB-111

[0270] VB-111 вводят на 1-й день каждого нечетного цикла до прогрессирования заболевания.

[0271] VB-111 следует вводить после паклитаксела. Это основано на парадигме, что в качестве меры предосторожности исследуемое средство следует вводить последним. Предполагается, что последовательность введения не влияет на фармакологические свойства двух средств. Хотя предусматривается введение сразу (в пределах 1 часа) после паклитаксела, вводить можно позднее (в течение 24 часов), если имеются клинические показания.

[0272] Пациенты с более длительным aPТТ не должны получать VB-111 до нормализации aPТТ. Для пациентов, положительных по LAC и/или APLA, требуется получение отрицательных результатов для повторного введения дозы VB-111. Если результат остается положительным, VB-111 не следует вводить. В случае постоянного положительного результата по LAC или APLA, анализ нужно повторять в течение 12 недель, считая от первоначального положительного результата.

[0273] Противовоспалительное лечение: 1000 мг ацетаминофена нужно вводить до введения VB-111, а PRN ацетаминофен после введения. В случае появления у пациентов

лихорадки 3 степени, или по усмотрению следователя, за 10 минут до введения последующих доз VB-111 можно внутривенно ввести 10 мг дексаметазона.

[0274] Получение и инфузия VB-111: После завершения инфузии паклитаксела пациентам на голодный желудок, или потреблявшим только легкую, измельченную на блендере еду, вводят VB-111 в виде разовой дозы 3×10^{12} VP (1-2 уровни доз) или 1×10^{13} VP (3 уровень доз). Пожалуйста, обратите внимание: голодание требуется для того, чтобы избежать рвоты, если у пациента наблюдается сильный озноб, а не обычная слабая и самоизлечивающаяся лихорадка. Но это не является обязательным требованием. Конечный раствор для введения следует вводить не более чем через 60 минут после приготовления. Потребление пищи разрешают через 0,5 часа после приема препарата. Однократную внутривенную инфузию разбавленного VB-111 нужно проводить со следующей скоростью:

1. Для дозы 3×10^{12} VP: 1 мл/мин
2. Для дозы 1×10^{13} VP: 1 мл/мин в течение первых 10 мл, а затем 3 мл/мин до конца инфузии.

Обследование после введения VB-111

[0275] Участники исследования должны наблюдаться в клинике или в учреждении, где проводится инфузия, в течение первых 8 часов после первого введения исследуемого препарата, а затем по клиническим показаниям.

Лабораторные анализы распределения VB-111

[0276] Образцы крови и мочи собирают для определения уровней экспрессии ДНК аденовируса VB-111 в следующие моменты времени:

Кровь:

1. 0 (До введения дозы)
2. В конце инфузии
3. $3 \pm 0,5$ часа
4. $6 \pm 0,5$ часа

Показатели жизненно важных функций:

[0277] Показатели жизненно важных функций (такие как

систолическое и диастолическое артериальное давление, периферический пульс, температура тела, частота дыхания) регистрируют в следующие моменты времени:

1. 0 минут (непосредственно перед введением дозы) (± 15 -минутный диапазон)
 2. через 30 минут после начала введения дозы (± 15 -минутный диапазон)
 3. через 60 минут после начала введения дозы (± 15 -минутный диапазон)
 4. через 4 часа после начала введения дозы (± 15 -минутный диапазон)
 5. через 6 часов после начала введения дозы (± 15 -минутный диапазон)
 6. При проявлении какого-либо неблагоприятного события
- Дни 8, 15 и 22 каждого цикла

[0278] Каждый пациент должен вернуться в клинику натошак для проведения следующих обследований:

1. Показатели жизненно важных функций: систолическое и диастолическое артериальное давление, которые измеряют в положении лежа на спине, периферический пульс, температура тела, частота дыхания.

2. Гематология: клинический анализ крови с дифференциалом, INR и активированным PTT.

3. Коагуляция: если необходимо следить за аномальными уровнями PTT.

4. Моча: собирают для рутинного анализа

[0279] Лабораторные анализы крови проводят на 8-й день 1-6 циклов. Кровь анализируют на:

1. Биораспределение: определяют уровни ДНК аденовируса VB-111 и экспрессию транскена (каждый 2-й цикл после инфузии VB-111)

2. Биомаркеры: плазму анализируют на наличие в кровотоке ангиогенных и воспалительных биомаркеров VEGF, PlGF, sVEGFR1, bFGF, IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF-GC (с использованием многолуночных планшетов ELISA, Meso-Scale Discovery) и sVEGFR2

и SDF1a (с использованием наборов R&D Systems). Число циркулирующих в крови клеток определяют в свежих образцах с помощью стандартного метода проточной цитометрии. Архивные ткани анализируют на CD31, CD34, VEGFR2, и vWF.

3. Опухолевый маркер: CA-125

4. Антитела: Уровни антител против вируса (включающих в себя нейтрализующие антитела).

[0280] Примечание: Комплексная метаболическая панель, включающая в себя определение электролитов, LFTS, BUN/Cr, кальция и магния, требуется только на D1, тогда как LFTS определяют на 1, 8, 15, 22 дни.

[0281] Паклитаксел вводят по описанной выше схеме. ANC должно быть $>1000/\text{мм}^3$, а число тромбоцитов $>100000/\text{мм}^3$

[0282] Противорвотная терапия: противорвотная терапия может включать в себя применение китрила, 750 мкг внутривенно или 1 мг перорально, или зофрана, 10 мг внутривенно или 8 мг перорально, наряду с дексаметазоном, 10 мг внутривенно, а также рgn ативана, 0,5-2,0 мг внутривенно, и/или компазина, 10 мг перорально, или перфеназина, 4 мг перорально, в соответствии с институциональными стандартами.

Визит для завершения исследования

[0283] Индивидуумы получают сочетанную терапию (паклитаксел и VB-111) в соответствии с описанной выше схемой циклов до прогрессирования заболевания.

[0284] После получения последней дозы VB-111 каждый пациент должен вернуться в клинику для конечного обследования и пройти такие же клинические и лабораторные анализы, которые проводят в плановом порядке и в ответ на клинически значимые события, регистрируемые как внеплановые лабораторные исследования. Побочные явления и сопутствующие лекарственные средства следует регистрировать таким же образом, как и ранее в исследовании. Индивидуум подвергается физическому обследованию, которое проводит лечащий врач (MD или NP). Можно сделать ЭКГ.

[0285] Пациенты, которые прекратили участие в исследовании, или у которых наблюдается прогрессирование заболевания, обследуются в клинике или посредством телефонного

контакта на жизнеспособность. Однако после прогрессирования заболевания данные, касающиеся CA125 и RECIST, сохраняются в файлах клинических исследований.

Дополнительные процедуры

Побочные явления

[0286] Полные поддерживающие меры следует использовать для всех пациентов, у которых наблюдаются побочные явления. Все побочные явления, наблюдающиеся после введения лекарства, описывают в индивидуальной регистрационной карте (CRF) наряду с интенсивностью, используемыми терапевтическими мерами, результатом и оценкой отношения к исследуемому препарату. Побочные явления, связанные с введением лекарства, отслеживают до разрешения. Не связанные с лекарством побочные явления отслеживают до разрешения или до конца исследования.

[0287] Общие побочные эффекты включают тошноту, рвоту и потерю аппетита. У пациента также может наблюдаться запор, жидкий стул или диарея. При диарее важно увеличить потребление жидкости. Если диарея принимает тяжелую форму, может потребоваться госпитализация пациента и внутривенное введение жидкости. Введение любого исследуемого продукта включает общий риск появления побочных эффектов. Поскольку VB-111 представляет собой исследуемый продукт, известны не все из его возможных побочных эффектов, оказываемых на организм человека. VB-111 может вызывать все перечисленные ниже побочные эффекты, некоторые из них, или он может не вызывать ни один из перечисленных ниже побочных эффектов. Побочные эффекты включают нежелательные медицинские состояния или ухудшения существующих медицинских состояний, которые могут возникнуть в процессе исследования. Помимо перечисленных ниже возможных побочных эффектов при введении VB-111 отдельно или в сочетании с другими лекарствами могут встречаться неожиданные или необычные побочные эффекты, которые могут принимать серьезную или угрожающую жизни форму. Одной из целей данного исследования является изучение возможных побочных эффектов VB-111. Врач, проводящий исследование, внимательно наблюдает за пациентом в процессе исследования и обсуждает с пациентом все вопросы,

касающиеся рисков, недомоганий и побочных эффектов.

Риски, связанные с VB-111

[0288] Вероятно (вероятность появления симптома составляет более 50%)

- * Гриппоподобные симптомы, такие как лихорадка, боль в мышцах, усталость, озноб,

- * Тошнота

- * Рвота

[0289] Иногда (вероятность появления симптома составляет 1-10%)

- * Запор

- * Аномально высокие уровни ферментов, вырабатываемых печенью, означающие, что печень не функционирует должным образом, и способные вызывать утомляемость и желтуху (пожелтение кожи и глаз). Хотя данные симптомы, как правило, являются слабыми и обратимыми, они могут принять серьезную или угрожающую жизни форму.

- * Увеличение размеров селезенки обычно не вызывает никаких симптомов, но может вызвать боль в животе при разрыве селезенки, и может стать опасным для жизни.

- * Увеличение продукции новых клеток крови костным мозгом, которое может привести к увеличению числа клеток крови, но без повышения риска лейкоза.

- * Аллергическая реакция в участке инъекции (укола), которая может вызвать покраснение и отек

- * Кровотечение

- * Аномально длинные результаты анализа коагуляции (РТТ) и выработка некоторых видов антител (таких как антифосфолипидные антитела), которые могут повлиять на нормальное свертывание крови. Это может привести к тромбозу (образованию сгустка крови) или кровотечению, которые могут требовать лечения и могут находиться в виде серьезной или опасной для жизни формы.

- * Способность к заживлению ран может быть нарушена. Это может привести к инфицированию и может потребовать госпитализации.

- * Повышенное кровяное давление

* Избыток белка в моче. Данный результат лабораторного исследования, как правило, является бессимптомным, но в случае чрезмерной величины может привести к задержке жидкости и отеку ног.

* Головная боль

* Потеря аппетита и потеря веса (анорексия)

* Уменьшение уровня натрия в крови, которое может привести к спутанности сознания, судорогам, утомляемости и снижению уровня сознания.

* Избыток сахара в крови, который в случае тяжелой формы может потребовать госпитализации и срочного лечения.

* Повышенное потоотделение (гипергидроз)

Редко (вероятность появления симптома составляет менее 1%)

* Низкое число красных кровяных клеток, которое может вызвать усталость и одышку. При этом может потребоваться переливание крови.

* Низкое число тромбоцитов, которое может вызвать кровотечение и кровоподтеки. Кровотечение может быть серьезным или опасным для жизни и может потребовать переливания крови.

* Небольшое увеличение белых кровяных клеток (может увеличить риск инфекции)

* Тяжелое кровотечение

* Ухудшение функции почек (острая почечная недостаточность), которое может потребовать лечения и может быть серьезным или опасным для жизни.

* Отек мозга, который может развиваться у пациентов с опухолью, затрагивающей мозг (например, у пациентов с метастазами в головном мозге)

* Диарея

* Осложнения на сердце (кардиальные) и кровеносных сосудах: инфаркт, стенокардия (боль в груди), или образование сгустков крови (тромбоз), которые могут закупорить сосуды, поставляющие кровь к жизненно важным органам, и привести к инсульту или повреждению других органов.

* Застойная сердечная недостаточность – сердце не в состоянии перекачивать кровь должным образом, что может вызвать

слабость и усталость, задержку жидкости и накопление жидкости в легких, приводящее к одышке. Данное состояние может быть серьезным или угрожающим жизни.

Риски, связанные с паклитакселом

Вероятно (вероятность появления симптома составляет более 50%)

- * Аллергическая реакция от легкой до тяжелой, которая может быть опасной для жизни

- * Онемение и боль в руках и ногах, которые иногда ухудшаются при последующем введении лекарства и могут не исчезать после прекращения приема препарата

- * Выпадение волос

- * Боль в мышцах и суставах

- * Усталость

Часто (вероятность появления симптома составляет 10-50%)

- * Тошнота и/или рвота

- * Диарея

- * Язвы в полости рта или горла

- * Головокружение

- * Головные боли

- * Повреждение печени

- * Раздражение кожи и отек при истечении лекарственного средства из вены, в которую его вводят, в окружающую кожу

- * Изменение вкуса

- * Раздражение кожи в участке предыдущего облучения

- * Сыпь

[0292] Иногда (вероятность появления симптома составляет 1-10%)

- * Воспаление толстой кишки, которое может вызвать изменение в движениях кишечника

- * Воспаление поджелудочной железы, которое может вызвать боль в животе, которая длится только в течение короткого времени

- * Ощущение вспышек света или пятен

- * Повреждение почек

- * Повышение в крови уровня формы жира, называемой

триглицеридами (гипертриглицеридемия)

- * Замедление сердечного ритма
- * Нерегулярное сердцебиение

[0293] Редко (вероятность появления симптома составляет менее 1%)

- * Печеночная недостаточность
- * Судороги
- * Спутанность сознания; изменения настроения

Риски, связанные с биопсией:

[0294] Биопсию обычно проводят под контролем визуализирующей техники. Каждая процедура требует отдельного согласия перед проведением биопсии. Риски могут включать в себя:

* Боль и дискомфорт. Степень боли и дискомфорта может варьировать в зависимости от участка проведения биопсии. Эти риски можно обсуждать с врачом, проводящим исследование.

- * Небольшое кровотечение в участке биопсии.
- * Болезненность в участке биопсии.
- * Рубцы в участке биопсии.
- * Редко инфекция в участке биопсии.

[0295] В редких случаях осложнения при биопсии могут быть опасными для жизни. Как и при любой интервенционной процедуре, в результате кровотечения или повреждения органов могут возникнуть другие потенциально опасные осложнения. Указанные осложнения могут потребовать дополнительного хирургического вмешательства.

Риски, связанные с радиологическим сканированием и рентгеновским излучением:

[0296] Во время участия пациента в исследовании для оценки заболевания можно использовать КТ-сканирование. Частота такого обследования относится к стандартной клинической практике. Многолетняя практика показывает, что существует очень низкий риск развития нового рака в результате радиологического анализа и лечения рака. Некоторые типы лекарственных средств или сочетания этих средств с облучением могут немного увеличить риск развития нового рака.

[0297] Возникает небольшой риск при использовании контрастного вещества, которое вводят в вену во время сканирования. Данное вещество может ухудшить функцию почек у людей с уже сниженной функцией почек. Следовательно, функцию почек тщательно контролируют во время участия в данном исследовании. При наличии каких-либо изменений в функции почек пациента могут удалить из исследования.

[0298] Иногда у некоторых людей возникают аллергические реакции (например, крапивница и зуд) на контрастные вещества. Серьезные реакции (например, падение артериального давления, затруднение дыхания или тяжелая аллергическая реакция и смерти) встречаются редко.

Репродуктивные риски:

[0299] Лекарственные средства, используемые в данном исследовании, могут оказывать влияние на плод. Во время участия в данном исследовании пациент не должен становиться беременным, и не должен выкармливать ребенка. Если пациент забеременел, он должен сразу же сообщить об этом врачу. Проводятся консультации по предотвращению беременности для участников исследования мужского или женского пола.

Сопутствующие лекарственные средства

[0300] Ограничения по сопутствующим лекарственным средствам отсутствуют, кроме лекарственных средств, перечисленных в критериях для исключения. Однако VB-111 не следует смешивать с другими препаратами. Прием всех сопутствующих лекарственных средств во время исследования регистрируют от начального момента времени до посещения через 1 месяц после введения последней дозы. Обычные средства регистрируют, указывая название продукта, показания к применению, дозировку, форму продукта, частоту введения, даты начала и окончания приема. Любое продолжающееся сопутствующее лечение регистрируют как таковое и, если срок его прекращения предшествует окончанию исследования, необходимость в его возобновлении отсутствует.

Режимы введения противорвотных средств

[0301] Тошнота считается легким побочным эффектом. Примеры

режимов введения противорвотных средств включают: дексаметазон 4–8 мг перорально, или лоразепам 0,5–1,0 мг, или прохлорперазин 10 мг перорально, или метоклопрамид 10–20 мг, за 30 минут до введения химиотерапевтического средства.

Аспирин

[0302] Индивидуумы с повышенным риском артериальной тромбоэмболии могут начать или продолжить прием низких доз аспирина (≤ 325 мг/сут). Индивидуумов, у которых в процессе исследования развиваются симптомы артериальной ишемии или кровотечения, обследуют на предмет прекращения приема лекарственного средства.

Лечение жаропонижающими средствами

[0303] Введение VB-111 связано с самокупирующейся лихорадкой, которая обычно длится 24 часа после введения дозы, в некоторых случаях слабая лихорадка может продолжаться до 2–3 дней после введения дозы. 1000 мг ацетаминофена вводят за 1–2 часа до VB-111 и PRN ацетаминофен после введения дозы. Пациентам, у которых развивается лихорадка 3 степени, или по усмотрению исследователя, можно ввести внутривенно 10 мг дексаметазона за 10 минут до введения последующей дозы VB-111.

Другие лабораторные анализы

[0304] Лабораторные анализы, сделанные в ответ на клинически значимое событие, регистрируются как внеплановые лабораторные анализы. В случае клинически значимых аномальных лабораторных показателей, анализы повторяют до тех пор, пока значение показателя не вернется в пределы нормы, и/или не будет найдено адекватное объяснение аномалии. Все указанные лабораторные исследования проводят в том же учреждении, что и исследование, за исключением анализа распределения, который отправляют в Независимую центральную лабораторию. Если какой-либо из полученных результатов требует подтверждения, повторный анализ проводят в той же клинической лаборатории, если это возможно. Все клинические лаборатории должны предоставлять свидетельства об аккредитации лаборатории и диапазоны нормальных значений. Если лабораторные анализы безопасности проводят в местных лабораториях, следует приложить все усилия,

чтобы получить свидетельство об аккредитации этих лабораторий и диапазоны нормальных значений для указанных анализов.

[0305] ЭКГ делают во время скринингового визита и затем через каждые 6 месяцев, или во время визита по поводу досрочного прекращения участия в исследовании.

Продолжительность исследования

[0306] Каждому пациенту еженедельно вводят паклитаксел, и на каждый второй цикл вводят VB-111. Пациенты участвуют в данном исследовании до прогрессирования заболевания, после чего только тогда их документы будут доступны для сбора данных по CA125 и RECIST.

[0307] Пациенты могут принять решение о прекращении участия в исследовании в любое время. Пациенты, прекратившие участие, все равно должны связаться с врачом и ответить на вопросы о побочных эффектах (АЕ). Все АЕ, независимо от связи с лекарством или болезнью, регистрируют в карте пациента и CRF. На основе профиля токсичности, полученного с помощью доклинических исследований, завершенных к моменту исследования, а также специфичности экспрессии трансгена, один год считается достаточным временем для выявления любой долгосрочной токсичности, которая может возникнуть после лечения. Пациентам, которые прекратили участие в исследовании, или у которых стало прогрессировать заболевание, необходимо связываться с врачом примерно каждые 2 месяца для предоставления данных по выживанию.

Дозолимитирующая токсичность (только циклы 1, 2 и 3)

[0308] Дозолимитирующую токсичность (DLT) определяют в первом цикле исследования, а всех пациентов, которые провоцируют определение DLT в течение указанных циклов, удаляют из исследования. В течение 1 цикла дозу не снижают. DLT характеризуется такими симптомами, как нейтропения IV степени, длящаяся >4 дней ($ANC < 500/\text{мм}^3$), лихорадка и нейтропения (температура $> 100,2^\circ\text{F}$ и $ANC < 500/\text{мм}^3$), тромбоцитопения IV степени (число тромбоцитов $< 25000/\text{мм}^3$) и негематологическая токсичность степени $\geq \text{III}$, за исключением тошноты и рвоты III

степени.

[0309] Случаи лихорадки 3-4 степени, которые происходят в течение 24 часов после введения VB-111, не относят к DLT, если они отвечают на симптоматическую терапию.

[0310] С учетом того, что 80 мг/м² паклитаксела является клинически приемлемой дозой при еженедельном режиме, повышение дозы выше указанного значения не планируют.

Изменение дозы - паклитаксел

[0311] Во время первого цикла фазы исследования с повышением дозы изменение дозы не проводят.

[0312] У пациентов с симптоматической невропатией допускается "недельный перерыв" после обсуждения с руководителем клинических испытаний. Это предполагает использование графика введения 3 из 4 недель, или 7 из 8 недель в случае чередующихся циклов. Если плотность дозы не может поддерживаться при использовании одного из этих графиков, пациент должен быть удален из исследования. Если изменение дозы проводят в рамках графика введения паклитаксела, то дозу VB-111 не меняют, чтобы отслеживать циклы паклитаксела.

[0313] Участники могут оставаться на исследовании при перерывах в ведении лекарства до 3 недель с целью восстановления после токсичности или выполнения социальных обязательств.

[0314] Примечание: После 28 дня, если дозу препарата, вводимую пациенту, уменьшают, увеличение дозы не допускается и пациент должен продолжать участие в исследовании на этой дозе во всех последующих циклах.

[0315] Корректировку дозы осуществляют в соответствии с системой, демонстрирующей наибольшую токсичность по шкале Общей терминологии критериев нежелательных явлений (CTCAE-4).

[0316] Если не указано иначе, изменение дозы в связи с гематологической токсичностью обычно проводят с учетом анализа крови, полученного в течение 72 часов после повторного введения. Дозу паклитаксела определяют в зависимости от ANC (таблица 12), числа тромбоцитов (таблица 13) и невропатии (таблица 14).

Таблица 12

Нейтропения, предварительная недельная доза

ANC/лекарство	Паклитаксел
$\geq 1000 \text{ мм}^3$	Полная доза
$< 1000 \text{ мм}^3$	Поддерживающая доза
Другой случай ANC $< 1000 \text{ мм}^3$	Уменьшение дозы до 60 мг/м^2

Таблица 13

Тромбоцитопения, предварительная недельная доза

Число тромбоцитов/лекарство	Паклитаксел
$\geq 100000 \text{ мм}^3$ или первый случай $< 100000/\text{мм}^3$ и $> 75000/\text{мм}^3$	Полная доза
$< 75000 \text{ мм}^3$	Поддерживающая доза
Второй случай $< 100000/\text{мм}^3$ и $> 75000/\text{мм}^3$	Уменьшение дозы до 60 мг/м^2

Таблица 14

Сенсорная невропатия, схема снижения дозы

Первый случай	1-ое уменьшение дозы - 60 мг/м^2 паклитаксела
Второй случай (или продолжение существования после уменьшения дозы)	2-ое уменьшение дозы - 40 мг/м^2 паклитаксела
Третий случай (или продолжение существования после уменьшения дозы)	Прекращение исследования

[0317] После уменьшения дозу паклитаксела повторно не повышают.

Контролирование длительной миелосуппрессии

[0318] Если тромбоциты или нейтрофилы не восстанавливаются на 28 день, добавляют 7 дней для гематологического восстановления. Пациентов с неполным восстановлением (ANC $< 1000/\text{мм}^3$ или число тромбоцитов $< 100000/\text{мм}^3$) на 35 день удаляют

из исследования.

Контролирование лихорадки и нейтропении

[0319] Лихорадку и нейтропению контролируют у пациентов обычным способом. Пациенты должны восстановиться от лихорадки и активных инфекций до возобновления терапии. Пациентам, которые не получают факторы роста, на следующем цикле добавляют нейпоген или невласту. Пациентам, получающим 5 мкг/кг/день нейпогена, его дозу повышают до 10 мкг/кг при сохранении прежней схемы.

Другая токсичность и корректировка дозы

[0320] Проявление другой токсичности не ожидается, но возможно в данном исследовании. Пациенты, у которых развивается ассоциированная с лекарственным средством негематологическая или не связанная со слизистой оболочкой токсичность III или IV степени, которая не разрешается, или не улучшается до I степени в течение 7 дней следующего цикла, удаляются из исследования. Пациенты, у которых развивается серьезная негематологическая/не связанная со слизистой оболочкой токсичность III или IV степени, которая разрешается, или улучшается до I степени в течение одной недели, считая от начала следующего цикла, могут продолжать участие в исследовании в том случае, если они отвечают на лечение и токсичность, наблюдающаяся у пациентов, контролируется ведущим исследователем.

Уменьшение дозы в связи с аномальными результатами анализа функции печени проводят следующим образом:

[0321] Данные о печеночной токсичности паклитаксела отсутствуют; однако его выделение замедляется у больных с тяжелой дисфункцией печени. Следовательно, дозу паклитаксела у пациентов с нарушением функции печени следует изменить в соответствии с таблицей 15.

Таблица 15

Дозы паклитаксела, установленные с учетом уровней аспартатаминотрансферазы (AST) и аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке

Уровень AST или ALT в сыворотке	Паклитаксел
<3×ULN	80 мг/м ²
>3×ULN	60 мг/м ²
>5×ULN	Поддерживающая доза

[0322] Пациенты с повышенным уровнем билирубина, составляющим >1,5 мг/дл, не должны получать паклитаксел до тех пор, пока аномальные лабораторные показатели не улучшатся до степени <1. Лечение следует возобновлять после восстановления, используя паклитаксел в дозе на один уровень ниже, в соответствии с приведенной выше таблицей, а пациентов, у которых токсичность длится более 2 недель, удаляют из исследования. После уменьшения дозы ее повышение не допускается и пациент продолжает исследование на всех последующих циклах с данной дозой.

[0323] Пациенты с длительным aPTT не должны получать VB-111 до нормализации aPTT. Для пациентов с положительным результатом анализа на волчаночный антикоагулянт (LAC) и/или антифосфолипидные антитела (APLA), требуется получение отрицательных результатов для повторного введения VB-111. Если результат остается положительным, VB-111 больше не вводят. В случае постоянного положительного результата по LAC или APLA тест необходимо повторить в течение 12 недель, считая от первого получения положительного результата.

[0324] Пациенты с серьезной токсичностью, предположительно вторичной по отношению к карциноме яичников (такой как непроходимость кишечника), также удаляются из исследования. В необычных случаях, когда обратимая токсичность 3-4 степени вторична по отношению к карциноме, а пациент чувствует улучшение после химиотерапии, лечащий врач должен

проконсультироваться с руководителем клинических испытаний по поводу возможного продолжения участия пациента в исследовании, поскольку токсичность устранена.

[0325] Следующий цикл лечения может начаться только в том случае, если вся негематологическая токсичность разрешается минимум до I степени.

[0326] Допускается до двух задержек доз, каждая продолжительностью в неделю. В случае устойчивой токсичности пациент исключается из исследования.

Безопасность участников

[0327] Предпринимается ряд мер по обеспечению безопасности пациентов, участвующих в данном исследовании. Указанные меры реализуются посредством критериев исключения и рутинного мониторинга, как описано ниже.

[0328] Пациентов, участвующих в данном исследовании, подвергают клиническому обследованию и стандартным лабораторным анализам до начала исследования и с правильными промежутками времени в процессе исследования. Определение оценки безопасности включает медицинский опрос, регистрацию побочных эффектов, медицинские осмотры, кровяное давление и результаты лабораторных анализов (проведенных в местных лабораториях). Пациентов обследуют на побочные эффекты (всех степеней), тяжелые побочные эффекты и побочные эффекты, требующие прерывания или прекращения приема исследуемого препарата, при каждом посещении в течение всего срока их участия в исследовании. Пациентов, прекративших участие в фазе лечения данного исследования по любой причине, обследуют в течение ~30 дней (28-42 дней) после принятия решения о прекращении лечения.

[0329] Если пациенты, проходящие лечение, требуют плановой радикальной операции, рекомендуется продолжать терапию в течение 2-4 недель перед хирургическим вмешательством.

Критерии повторного лечения

[0330] Корректировку дозы в начале цикла следует проводить с учетом негематологической токсичности или анализов крови, полученных в данное время. Пациенты не должны начинать новый

цикл лечения, если абсолютное число нейтрофилов не будет составлять >1000 клеток/ мм^3 , число тромбоцитов >100000 клеток/ мм^3 , а негематологическая токсичность не улучшится до 1 степени (слабая), или не разрешится.

[0331] Период перед повторным лечением пациентов можно увеличить на срок до трех недель. Если восстановление после токсичности занимает более трех недель, пациенты должны быть удалены из исследования.

[0332] Лечение может продолжаться в присутствии усталости, диареи, алопеции, тошноты 2 степени, если соотношение токсичность:польза является благоприятным для участника и врача.

Композиция паклитаксела, ее поставка, хранение и стабильность

Паклитаксел (NSC #673089)

[0333] Паклитаксел в дозе 40–80 мг/ м^2 вводят путем внутривенной инфузии в течение 1 часа на 1, 8, 15 и 22 дни в течение цикла, составляющего 28 дней. Дозу препарата определяют для максимальной площади тела (BSA) 2,0 м^2 , где BSA рассчитывают исходя из массы, определенной в тот же день.

Композиция

[0334] Паклитаксел поставляют в виде неводного раствора с концентрацией 6 мг/мл во флаконах для нескольких доз, содержащих 30 мг/5 мл, 100 мг/16,7 мл или 300 мг/50 мл паклитаксела. Помимо 6 мг паклитаксела каждый мл стерильного апиrogenного раствора содержит 527 мг очищенного Cremophor® EL (полиоксиэтилированное касторовое масло) и 49,7% (об/об) дегидратированного спирта, USP.

Хранение

[0335] Содержимое закрытых флаконов паклитаксела является стабильным до даты, указанной на упаковке, при хранении от 20 до 25°C (от 68 до 77°F). Требуется защиты от света.

Получение

[0336] Паклитаксел разбавляют перед инфузией. Разбавление паклитаксела проводят с использованием 0,9% раствора хлорида

натрия для инъекций, USP; 5% раствора декстрозы для инъекций, USP; 5% раствора декстрозы и 0,9% раствора хлорида натрия для инъекций, USP; или 5% раствора декстрозы в растворе Рингера до конечной концентрации от 0,3 до 1,2 мг/мл. Растворы являются физически и химически стабильными до 27 часов при комнатной температуре (примерно 25°C/77°F) и комнатных условиях освещения. Чтобы свести к минимуму воздействие на пациента пластификатора DENP, который может вымываться из мешков или наборов для инфузии из ПВХ, разбавленный раствор паклитаксела следует хранить в бутылках (стекло, полипропилен) или пластиковых (полипропилен, полиолефин) мешках и вводить с использованием наборов для введения, контактная поверхность которых покрыта полиэтиленом.

Введение

[0337] Паклитаксел вводят через встроенный фильтр, содержащий микропористую мембрану с размером пор не более 0,22 мкм. При использовании таких фильтровальных устройств, как IVEX-2® или IVEX-HP®, которые содержат короткие впускные и выпускные трубки с покрытием из ПВХ, не наблюдается значительного истекания DENP.

Премедикация

[0338] Все пациенты проходят премедикацию кортикостероидами, дифенгидраминам и H₂-антагонистами перед первым введением паклитаксела, чтобы предотвратить тяжелые реакции гиперчувствительности. Пациенты, у которых наблюдаются тяжелые реакции гиперчувствительности к лекарственному средству, могут нуждаться в повторном проведении премедикации, а при повторном введении лекарства они могут получать разбавленный раствор и медленную инфузию. В случае тяжелых реакций гиперчувствительности на паклитаксел повторное введение не проводят. Если препарат хорошо переносится, или развивается толерантность к кремофору, дексаметазон можно постепенно отменять. Доцетаксел не может быть заменен.

[0339] Побочные эффекты: Наиболее актуальную и полную информацию можно найти на листке-вкладыше в упаковку.

[0340] Поставщик: поставляется как Bristol-Myers Squibb Oncology, так и основными производителями. Дополнительную информацию можно найти в руководстве American Hospital Formulary Service Drug Information, Facts and Comparisons, или на вкладыше в упаковку.

VB-111

Описание

[0341] Исследуемое лекарственное средство поставляется в маркированных криофлаконах (полипропилен) объемом 1,8 мл для каждой испытуемой дозы. Объем содержимого каждого криофлакона составляет 1,1 мл (1012 VP/мл).

Композиция

[0342] Композицию VB-111 получают в виде стерильного раствора вектора. Раствор поставляют в замороженном виде (ниже 65°C), в одноразовых пластиковых флаконах с завинчивающимися крышками. Каждый флакон содержит 1,1 мл раствора вектора с титром вируса 1012 VP/мл или среды (10% раствор глицерина в фосфатно-солевом буфере). Раствор вектора нужно разморозить и держать при температуре 2-8°C в процессе разведения и обработки.

Стабильность и хранение

[0343] Хотя исследования стабильности VB-111 продолжаются, на сегодняшний день его срок годности определяют как 30 месяцев при температуре ниже 65°C. Открытые флаконы и/или флаконы после разведения не следует повторно использовать. VB-111 следует хранить в закрытых флаконах в замороженном состоянии (ниже 65°C) и в защищенном от света месте.

Приготовление препарата

[0344] Препарат VB-111 получают по способу, описанному в таблице 16.

Получение препарата VB-111

Доза	Концентрация во флаконе (VP/мл)	Объем раствора VB-111 в пробирке	Число флаконов с раствором VB-111	Объем отбираемого раствора VB-111 (мл)	Тип шприца для VB-111	Объем физиологического раствора	Тип шприца для физиологического раствора	Общий объем полученного препарата	Объем для введения индивидууму с массой ≥ 50 кг	Объем для введения индивидууму с массой < 50 кг
3×10^{13} VPs Уровни доз 1+2	10^{12}	1,1 мл	3	3 мл 3×1 мл	3 мл	12 мл (2×6 мл)	2×10 мл	15 мл	Общий объем (15 мл)	10,5 мл
1×10^{13} VPs Уровень доз 3	10^{12}	1,1 мл	10	10×1 мл	10 мл	40 мл	*	50 мл	Общий объем (50 мл)	35 мл

* В фармацевтике иногда используют стерильный пустой мешок, в который отдельно добавляют 40 мл NS + 10 мл VB-111, а иногда используют мешок, содержащий 50 мл NS, из которого удаляют избыточный объем и затем добавляют раствор VB-111. Все указанные способы относятся к практике, приемлемой в фармацевтике.

[0345] Весь процесс получения лекарственного препарата проводят при комнатной температуре в помещении BSC типа II. После оттаивания в процессе получения препарата лекарственное средство можно держать до 3 часов в воде со льдом.

[0346] Лекарственное средство разводят при комнатной температуре физиологическим раствором.

[0347] Получение лекарственного препарата и его введение должно быть завершено в кратчайшие сроки, составляющие не более 1 часа.

[0348] Фармацевт, готовящий препарат, должен убедиться,

что информация на контейнере, такая как название продукта, концентрация, номер партии, соответствует исследованию и индивидууму.

[0349] Нужный объем физиологического раствора (при комнатной температуре) помещают в стерильную пластмассовую пробирку. Флаконы с раствором VB-111 оттаивают, потерев их руками в перчатках. Сразу же отбирают 1 мл раствора VB-111 из каждого криофлакона, предназначенного для конкретного индивидуума. Для каждой аликвоты 1 мл VB-111 используют новый шприц. В пластмассовую пробирку, содержащую приготовленный заранее физиологический раствор, добавляют VB-111. После разбавления препарат перемешивают вручную путем вращения содержимого пробирки. Определяют необходимый для инъекции объем с учетом массы пациента и помещают его в шприц, используемый для введения (см. таблицу 16). После завершения подготовки проводят проверку: было ли использовано правильное число исходных ампул и соответствует ли примерно объем оставшейся в пробирках жидкости ожидаемому объему, после чего заполняют журнал учета препарата. После приготовления раствора лекарственного средства очищают участок фармацевтического учреждения, в котором готовили препарат, в соответствии с установленными в фармацевтике правилами.

Инфузия

[0350] 1. Однократную внутривенную инфузию разбавленного VB-111 проводят с помощью шприцевого насоса в соответствии с приведенными ниже инструкциями:

а. Уровни доз 1-2: 3×10^{12} VP (15 или 10,5 мл, в зависимости от массы субъекта) следует вводить со скоростью 1 мл/мин

б. Уровень доз 3: 1×10^{13} VP (50 или 35 мл, в зависимости от массы субъекта)

і. Инфузию проводят со следующей скоростью:

1. 1 мл/мин в течение первых 10 минут

2. 3 мл/мин для оставшегося объема инфузии

[0351] Через 30 минут после завершения ведения индивидуумы

могут принимать обычную пищу.

Прекращение участия индивидуума в исследовании

[0352] Индивидуумы, которые отвечают нижеследующим критериям, должны прекратить прием исследуемых препаратов:

1. Невропатия 3 степени, длящаяся >7 дней
2. Гипертония 4 степени или гипертония 3 степени, не контролируемая с помощью лекарств
3. Нефротический синдром
4. Легочное нарушение степени >2 или кровоизлияние в ЦНС; любое кровотечение 4 или 5 степени.
5. Событие артериальной тромбоэмболии любой степени
6. Застойная сердечная недостаточность 4 степени
7. Гастроинтестинальная перфорация
8. Свищ любой степени
9. Обструкция кишечника любой степени.
10. Расхождение краев раны, требующее медицинского или хирургического вмешательства
11. Нежелание или неспособность субъекта соответствовать требованиям исследования
12. Определение исследователем, что для индивидуума не безопасно далее продолжать лечение
13. Все события 4 степени, которые по мнению исследователя связаны с исследуемым препаратом

Противопоказания

[0353] Исследуемый препарат противопоказан пациентам, у которых ранее наблюдалась тяжелая реакция гиперчувствительности (NCI CTC 3 степени/4 степени) на лекарственное средство, входящее в состав Cremophor® EL (полиоксиэтилированное касторовое масло).

Клинические тесты и процедуры

[0354] Серии клинических анализов и процедур проводят с определенными интервалами на протяжении всего исследования в соответствии с таблицей 17.

Клинические анализы и процедуры

	Скрининг	Лечение		Последующие мероприятия
Оценка	Исходный уровень ^a	D1 каждого цикла	8, 15, 22 дни	Завершение исследования ⁱ
Критерии включения/исключения	X			
Информированное согласие	X			
История болезни; показатели жизненно важных функций (в том числе ВР, HR, масса) [#]	X	X	X	X
Токсичность		X	X	X
Физическое обследование	X	X		X
Общее состояние	X	X		X
Анализ крови с дифференциалом ^b	X	X	X	X
Полная метаболическая панель ^b	X	X	Только LFT	X
Общий анализ мочи ^d	X	X	X	X
Общий анализ мочи ^d	X	X		X
Коагуляция ^e	X	X		X
ЭКГ	X			X
Биораспределение		X* (только нечетные циклы)	X*	X
Ответ опухоли ^f	X	циклы q2c		
Антитела Ad-5		X* (только нечетные циклы)	X ^h	X

Сравнительное исследование/биомаркеры ^g	X	Циклы 1, 2 и затем только нечетные циклы	Цикл 1, 8 день 2-6 циклов	
Дополнительная биопсия опухоли ^h				X
CA-125	X	X		X
Введение паклитаксела		X	X	
Введение VB-111		Только нечетные циклы		!

* Образцы, собираемые в дни введения VB-111 (каждый следующий цикл) до введения, после окончания инфузии, через 6 часов после введения и на 8-й день данного цикла (нечетные циклы) .

^ Образцы, собираемые до введения

Показатели жизненно важных функций регистрируют в дни введения VB-111 до введения дозы и через 30 минут, 60 минут, 4 часа и 6 часов после введения дозы

a: Все физические обследования, а также анализы крови и мочи должны быть проведены в течение 14 дней до регистрации. Радиологические анализы опухолей должны быть проведены в течение 4 недель до начала регистрации.

b: Образцы крови берут в пределах 3 дней от 1, 8, 15, 22 дней всех последующих циклов. Анализ крови с дифференциалом: Анализ крови с дифференциалом и определением числа тромбоцитов; полная метаболический панель включает определение уровня электролитов, LFT, BUN/Cr, кальция и магния. На 8, 15, 22 дни определяют только LFT и делают анализ крови с дифференциалом.

c: Предполагается, что ответ опухоли оценивают на протяжении двух циклов.

d: Если появляется новая, или возрастает существующая протеинурия, может потребоваться суточный анализ мочи. При результате +2 по тест-полоске требуется сбор мочи в течение 24 часов, а при результате +3 по тест-полоске нужно сделать

перерыв в приеме исследуемого средства и провести сбор мочи в течение 24 часов. Общий анализ мочи проводят на 1, 8, 15 и 22 дни, а также по клиническим показаниям, поскольку протеинурия не является следствием введения VB-111.

e: Кровь берут в пределах 3 дней от 1 дня каждого цикла для определения РТ и РТТ. Если величина РТТ превышает ULN, кровь следует проверить на волчаночный антикоагулянт (LAC) и антифосфолипидные антитела (IgG и IgM против бета-2-GP-1 и против кардиолипина).

f: Оценку опухоли можно проводить с использованием институциональных стандартов, таких как анализы ответов опухолей: КТ, МРТ и т.д.

ПРИМЕЧАНИЕ: Оценку опухоли в плановом порядке проводят с регулярными интервалами (каждые 8 недель), которые, как правило, совпадают с каждым 2 циклом, но с фиксированным интервалом, который позволяет более точно определить PFS первичной конечной точки.

g: Специфические биомаркеры определяют перед введением в 1 день 1 цикла, а также на 8, 15, 22 дни 1 цикла, в 1 день 2 цикла, 1 день 3 цикла до введения и затем каждые два цикла до прогрессирования заболевания.

h: Взятие образцов тканей не является обязательной частью исследования, но при необходимости это можно осуществить, если бюджет позволяет проводить биопсию или парацентез с целью получения образцов при отсутствии клинических показаний. Конкретное время для получения таких образцов не указано. См. приведенный ниже раздел Сбор тканей.

i: Данные по завершению исследования должны быть получены в течение одной недели из 30 дней после введения последней дозы исследуемого препарата. Данные по выживаемости можно затем собирать по телефону.

Оценки эффективности и безопасности

Критерии RECIST

[0355] Опухолевый ответ оценивают с использованием критериев RECIST 1.1 в начальный момент и затем каждый следующий цикл, т.е. после 2, 4, 6 и т.д. цикла. Если пациенты

продолжают принимать паклитаксел, формальная оценка будет продолжаться. Независимую оценку результатов визуализации проводят с помощью TumorMetrics.

Измерение опухоли

[0356] Измеримое заболевание: наличие хотя бы одного измеряемого участка поражения. Если измеримое заболевание ограничивается одним участком поражения, его неопластическая природа должна быть подтверждена с помощью цитологического/гистологического анализа.

Измеримые повреждения

[0357] Повреждения, которые можно точно измерить, по меньшей мере, в одном направлении, с самой длинным диаметром $>2,0$ см. По данным спирального КТ-сканирования поражение должно быть $>1,0$ см, по меньшей мере, в одном направлении, и, в случае лимфатических узлов, самый короткий диаметр должен быть $>1,5$ см.

Неизмеримые повреждения

[0358] Все другие повреждения, в том числе мелкие (самый большой диаметр $<2,0$ см по данным традиционных методов, или $<1,0$ см по данным спирального КТ-сканирования) и другие неизмеримые повреждения. К ним относятся: костные повреждения; лептоменингеальная болезнь; асциты; плевральный/перикардальный экссудат; воспалительное заболевание молочной железы; лимфангит кожный/легочный; абдоминальные массы, которые не подтверждаются и не отслеживаются с помощью методов визуализации; а также кистозные повреждения.

[0359] Все измерения должны регистрироваться в метрической форме с использованием линейки или циркуля. Все исходные оценки должны проводиться как можно ближе к началу лечения и не более чем за 4 недели до начала лечения.

[0360] Для характеристики каждого идентифицированного и описанного повреждения в начальный момент и в течение периода наблюдения следует использовать одинаковые методы оценки и техники измерения.

[0361] Клинические повреждения считают измеримыми, только

когда они являются поверхностными (например, кожные узелки, пальпируемые лимфатические узлы). В случае поражения кожи рекомендуется использовать документацию, полученную методом цветной фотографии, которая включает линейку, позволяющую оценить размер повреждений.

Исходная документация по целевым и нецелевым повреждениям

[0362] Все измеримые повреждения, максимум до 5 повреждений каждого из пораженных органов, следует идентифицировать как целевые повреждения, которые нужно регистрировать и измерять в исходный момент.

[0363] Целевые повреждения выбирают на основе их размера (повреждения с более длинным диаметром) и их пригодности для точных многократных измерений (с помощью методов визуализации или клинических анализов).

[0364] Рассчитывают сумму наибольших диаметров (LD) для всех целевых повреждений и регистрируют ее как исходную сумму LD. Исходную сумму LD используют в качестве контроля, чтобы впоследствии характеризовать объективный опухолевый ответ измеримого заболевания.

[0365] Все другие повреждения (или участки заболевания) следует идентифицировать как нецелевые повреждения, которые также следует регистрировать в исходный момент времени. Измерение данных повреждений не требуется, их отмечают как "присутствующие" или "отсутствующие".

Критерии ответа

[0366] Оценка целевых повреждений:

Полный ответ (CR) – исчезновение всех целевых повреждений.

Частичный ответ (PR) – по меньшей мере, 30% уменьшение суммы LD целевых повреждений по сравнению с исходной суммой LD.

Прогрессирующее заболевание (PD) – по меньшей мере, 20% увеличение суммы LD целевых повреждений по сравнению с наименьшей суммой LD, зарегистрированной в начале лечения или после появления одного или нескольких новых повреждений.

Стабильное заболевание (SD) – отсутствие уменьшения, достаточного чтобы отнести заболевание к PR, и отсутствие увеличения, достаточного чтобы отнести заболевание к PD, по

сравнению с наименьшей суммой LD, зарегистрированной в начале лечения.

[0367] Оценка нецелевых повреждений:

Полный ответ (CR) – исчезновение всех нецелевых повреждений и нормализация уровня опухолевого маркера.

Не полный ответ (non-CR)/без прогрессирования (non-PD) – продолжение существования одного или нескольких нецелевых повреждений и/или сохранение уровня опухолевого маркера выше нормы.

Прогрессирующее заболевание (PD) – появление одного или нескольких новых повреждений. Однозначное прогрессирование существующих нецелевых повреждений. В тех случаях, когда четкое прогрессирование нецелевых повреждений встречается лишь изредка, мнение лечащего врача должно превалировать и статус прогрессирующего заболевания должен подтверждаться в дальнейшем группой экспертов (или руководителем исследования/главным исследователем).

Оценка наилучшего общего ответа

[0368] Наилучший общий ответ представляет собой лучший ответ, зарегистрированный с начала лечения до прогрессирования/рецидива заболевания (используя для сравнения с прогрессирующим заболеванием наименьшие размеры, зарегистрированные с начала лечения). Как правило, отнесение к наилучшему ответу пациента делают на основании результатов измерения и подтверждающих критериев, как показано в таблице 18.

Таблица 18

Общие ответы пациента на основании измерений целевых, нецелевых и новых повреждений

Целевые повреждения	Нецелевые повреждения	Новые повреждения	Общий ответ
CR	CR	Отсутствуют	CR
CR	Non-CR/Non-PD	Отсутствуют	PR
PR	Non-PD	Отсутствуют	PR
SD	Non-PD	Отсутствуют	SD

PD	Любой	Присутствуют или отсутствуют	PD
Любой	PD	Присутствуют или отсутствуют	PD
Любой	Любой	Присутствуют	PD

[0369] Состояние пациентов с глобальным ухудшением здоровья, требующим прекращения лечения, при отсутствии в то же время объективных признаков прогрессирования заболевания, классифицируют как "клиническое ухудшение". Все усилия направляют на регистрацию объективного прогрессирования, даже после прекращения лечения.

[0370] В некоторых случаях трудно отличить остаточное заболевание от нормальной ткани. Если оценка полного ответа зависит от данного определения, рекомендуется провести исследование остаточного повреждения (путем тонкоигольного пунктата/биопсии) до подтверждения статуса полного ответа.

[0371] Подтверждение: Чтобы присвоить статус частичного ответа (PR) или полного ответа (CR), изменения размеров опухоли нужно подтверждать повторными исследованиями, которые проводят не менее чем через 4 недели после того, как впервые было установлено соответствие критериям ответа. В случае SD результаты последующих измерений должны соответствовать критериям SD, по меньшей мере один раз после начала исследования при минимальном интервале 6-8 недель.

[0372] Критерии Rustin: Если анализируют только CA125 (при уровне выше 35 ед/мл), ответ чаще классифицируют в соответствии с GCIG, а не с критериями Rustin.

[0373] Определение ответа CA125 по GCIG: Ответ, связанный с CA125, имеет место, если существует, по меньшей мере, 50% уменьшение уровня CA125 по сравнению с образцом, полученным до лечения. Ответ должен подтверждаться и сохраняться в течение, по меньшей мере, 28 дней. Оценку пациентов по уровню CA125 проводят только в том случае, если существует образец, полученный до лечения, который, по меньшей мере, в два раза превышает верхнюю границу нормы в пределах 2 недель до начала

лечения.

[0374] Прогрессирование в соответствии с СА125 имеет место, если существует подтвержденное (зарегистрированное в двух случаях) повышение СА125, или ранее нормальный уровень СА125 повышается до $\geq 2 \times \text{ULN}$, что регистрируют в двух случаях.

Предполагаемые побочные эффекты

[0375] VB-111 вызывает минимальную токсичность в доклинических токсикологических исследованиях на мышах. Наблюдается умеренная анемия, умеренная тромбоцитопения, умеренный лейкоцитоз, увеличение селезенки и гиперплазия костного мозга. Также наблюдается временное повышение уровней ферментов печени, не связанное с клинической патологией. Системное введение аденовирусных векторов хорошо переносится. Гриппоподобные симптомы (лихорадка, усталость, озноб, тошнота и/или рвота) являются наиболее частыми побочными эффектами. Бессимптомное увеличение aPTT и положительный результат по LAC наблюдаются у нескольких пациентов, участвующих в испытаниях фазы I/II. Кроме того, описан один случай тяжелой диареи у пациента, участвующего в фазе II. Большинство введенных внутривенно аденовирусных частиц секвестрируется в печени, что, в свою очередь, вызывает воспалительную реакцию, характеризующуюся острым трансаминитом и повреждением сосудов. Основные побочные эффекты антиангиогенных средств включают нарушения способности к заживлению ран, кровотечение, тромбозмболические и сердечнососудистые события, гипертонию и протеинурию.

Корреляционные исследования

Распределение

[0376] Для анализа распределения образцы крови собирают у всех пациентов согласно Приложению I. Анализ указанных образцов с целью определения уровня аденовируса и транскена VB-111 проводят в группе с максимальной переносимостью дозы, или в группе, получающей самую высокую дозу. Распределение анализируют путем определения в крови уровней вирусной ДНК и транскена методами колич. ПЦР и колич. ОТ-ПЦР, соответственно,

в определенные моменты времени после введения дозы. Образцы собирают у всех пациентов в заданные моменты времени. Анализ проводят в образцах, взятых у пациентов, начиная с пациентов, получающих самые высокие дозы, и затем у пациентов, получающих более низкие дозы. Образцы, в которых вирусная ДНК не детектируется после введения, не тестируют на уровень транскена и не анализируют в более поздние моменты времени.

АНТИТЕЛА

[0377] Образцы сыворотки собирают для анализа уровней антител (общие IgG и нейтрализующие антитела) против аденовируса.

Антигенные биомаркеры

[0378] На сегодняшний день отсутствуют биомаркеры для антиангиогенной терапии, но идентифицировано несколько биомаркеров-кандидатов [Jain 2009]. Их определяют в образцах периферической крови, полученных от всех пациентов, участвующих в данном исследовании. Плазму анализируют на присутствие ангиогенных и воспалительных биомаркеров VEGF, PlGF, sVEGFR1, bFGF, IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α (с использованием многолуночных планшетов ELISA, Meso-Scale Discovery), а также sVEGFR2 и SDF1a (с использованием наборов R&D Systems), образцы анализируют с двойными повторами, используя традиционные методы [Horowitz Clinical Ovarian Cancer 2011 года, в печати]. Число циркулирующих в крови клеток определяют в свежих образцах с помощью стандартного метода проточной цитометрии. Конечный результат количественного анализа демонстрирует изменение во фракции циркулирующих CD34brightCD45dim CPC или моноцитов VEGFR2+CD45+ среди моноклеарных клеток после лечения, как описано ранее [Horowitz Clinical Ovarian Cancer 2011 года, в печати]. Архивные ткани анализируют на CD31, CD34, VEGFR2 и vWF.

Сбор тканей

[0379] Взятие образцов тканей не является обязательной частью исследования, но при необходимости это можно осуществить, если бюджет позволяет проводить биопсию или

парацентез с целью получения образцов. Конкретное время для получения таких образцов не указано. Оптимальным считается время от одного до двух месяцев после введения первой дозы VB-111. Ожидается, что 20-50% участников могут иметь подходящие участки для безопасной биопсии или асциты, доступные для парацентеза.

Описание статистических методов

[0380] MTD для VB-111 определяют с использованием стандартной схемы "3+3". То есть, 3 пациента сначала получают определенный уровень дозы. Если более чем один пациент испытывает DLT, увеличение дозы останавливают и предыдущий более низкий уровень дозы принимают за MTD. Если DLT отсутствует, начинают увеличение дозы до следующего, более высокого уровня. Если наблюдается один случай DLT, на тот же уровень дозы вводят 3 дополнительных пациентов. Дозу VB-111 повышают до следующего, более высокого уровня, если ни один из 3 указанных пациентов не испытывает DLT, однако, если один или несколько пациентов испытывают DLT, повышение дозы прекращают и MTD определяют как предыдущий более низкий уровень дозы. В соответствии с данной схемой повышения дозы таблица 19 демонстрирует вероятность повышения дозы до следующего более высокого уровня для разных гипотетических значений встречаемости исходной токсичности.

Таблица 19

Вероятность повышения дозы VB-111 с учетом DLT

Фактическая встречаемость DLT	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%
Вероятность повышения дозы	0,91	0,71	0,49	0,31	0,17	0,08	0,03

[0381] Как видно из таблицы 19, вероятность повышения дозы сочетания составляет >71%, если исходный риск DLT составляет <20%, и вероятность повышения дозы >91%, если исходный риск <10%. И наоборот, вероятность повышения дозы составляет не более 17%, если исходный риск DLT >50% и вероятность <8%, если

риск >60%.

[0382] Оценка объективного ответа, в основном, имеет описательный характер. Как правило, рассчитывают степень общего ответа и соответствующий 95% доверительный интервал.

[0383] В одном аспекте фазы II указанной схемы определяют степени ответов в соответствии с критериями RECIST или CA125 (по критериям GCIG, но не Rustin), описывают профиль безопасности и характеризуют побочные эффекты и токсичность. Тридцать процентов выбирают как целевую степень ответа на основе описанных ответов на введение сочетания химиотерапевтическое средство-антиангиогенное средство у больных с рецидивирующим раком яичников, как правило, в диапазоне 20-25%.

[0384] Схема исследования представляет собой двухстадийную оптимальную схему, на 1 стадии которой изначально участвуют 10 пациентов. Они включают участников, которые начинают участие в фазе I с дозы паклитаксела 80 мг/м² (т.е. участники испытаний 2 и 3 уровней доз). От двух до шести пациентов участвуют в группах DL-2 и 3 фазы I исследования, и от восьми до четырех пациентов участвуют на первой стадии фазы II до предварительного анализа эффективности. Если наблюдается один ответ, или ответ отсутствует, набор участников прекращается. И наоборот, если наблюдается два или более ответов, то зачисляют еще 19 участников (т.е. максимально возможное число участников = 29) в фазу II (общее число участников тогда будет составлять в первой фазе 2-18, которые перекрываются с 0-29 участниками фазы II). Если наблюдается пять или меньше ответов, то дальнейшее исследование данной терапии не является оправданным.

[0385] Если фактический RR <10%, шанс прекращения исследования на 1 стадии составляет, по меньшей мере, 74%. Если фактический RR >30%, шанс прекращения исследования на 1 стадии составляет <15%. Результат конечного анализа составляет 80% для отклонения H0: RR <10% в поддержку H1: RR >30% при встречаемости целевой ошибки типа 1 5%.

[0386] Исследование прекращают, если на I стадии

наблюдается более 2 перфораций ЖКТ IV степени. При возникновении 3 перфораций ЖКТ в любое время испытание завершают. Если предположить, что фактическая встречаемость перфораций ЖКТ составляет 4%, вероятность появления более 2 событий на I стадии составляет 6,2%, а вероятность появления более 3 событий на протяжении всего испытания составляет 2,7%.

[0387] Количественные и полу-количественные данные, такие как данные ИНС, рассматривают как предварительные экспериментальные данные с использованием описательной статистики и непараметрического анализа в попытке исследовать корреляции, признавая, что указанные размеры выборки являются не достаточными, чтобы сделать окончательные выводы, однако преимущество использования одинакового набора анализов в многочисленных исследованиях позволяет выявить наиболее полезные потенциальные показатели эффективности и токсичности.

Биомаркеры

[0388] Для оценки воздействия VB-111 на СЕС, как правило, используют непараметрические методы (такие как знаковый ранговый критерий Уилкоксона или критерий суммы рангов) и коррелятивные/прогностические меры, все результаты статистической значимости являются двусторонними и коррективка для множественных сравнений не требуется.

Уровень значимости

[0389] Доверительные интервалы рассчитывают на (двустороннем) 95% уровне достоверности.

Лабораторные анализы

Анализ биомаркеров ангиогенеза (местный)

[0390] Плазму анализируют на присутствие ангиогенных и воспалительных биомаркеров VEGF, PlGF, sVEGFR1, bFGF, IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α (с использованием многолуночных планшетов ELISA, Meso-Scale Discovery), а также sVEGFR2 и SDF1 α (с использованием наборов R&D Systems). Число циркулирующих в крови клеток определяют в свежих образцах с помощью стандартного метода проточной цитометрии. Архивные ткани анализируют на CD31, CD34, VEGFR2 и vWF. Опухолевый маркер: СА-

125. Для каждой временной точки анализируют десять куб.см общей плазмы в пробирках, содержащих ЭДТА, при комнатной температуре.

[0391] Образцы собирают в следующие моменты времени:

1. В начале исследования
2. В 1 цикле: в 1 день до введения исследуемого средства, и на 8, 15 и 22 дни
3. В 1 день 2 цикла до введения исследуемого средства
4. Каждые 2 цикла после начала цикла 3, до введения исследуемого средства, вплоть до прогрессирования заболевания

Анализ антител

[0392] Антитела против вируса Ad-5, включающие в себя IgG и нейтрализующие антитела, собирают для анализа. Образцы собирают в следующие моменты времени:

1. В каждом цикле: на 1, 8, 15 и 22 дни до введения исследуемого средства;
2. Во время последнего визита после завершения исследования.

[0393] Кровь собирают и обрабатывают следующим образом:

1. 6 мл крови собирают в пробирки, не содержащие антикоагулянта.
2. Образцы оставляют стоять при комнатной температуре в течение 1 часа, а затем хранят при 2-8°C в течение ночи, чтобы обеспечить сокращение сгустка.
3. Кровь центрифугируют на следующий день.
4. Примерно 2 мл сыворотки извлекают и разделяют на 4 аликвоты, которые помещают в пробирки (0,5 мл каждая, из общего объема 2 мл в Nalgene 100 1,5 мл) и хранят при -20°C до анализа.

Анализ биораспределения

[0394] Проводят следующие анализы:

1. Биораспределение в крови: экспрессии вирусной ДНК и транскрипта
2. Биораспределение в моче: вирусной ДНК

[0395] Образцы целой крови собирают для анализа биораспределения в следующие моменты времени:

1. На 1 и 8 день каждого нечетного цикла до введения исследуемого средства.

2. В дни введения VB-111:

- а. До инфузии (как и образец в 1 день)
- б. В конце инфузии
- с. $3 \pm 0,5$ часов
- д. $6 \pm 0,5$ часов
- е. Во время последнего в исследовании визита.

[0396] Образцы крови получают следующим образом:

1. Кровь, собранную в каждый момент времени, помещают в 4 пробирки (0,75 мл/пробирку), содержащие ЭДТА.

- а. 2 пробирки для анализа вирусной ДНК
- б. 2 пробирки для анализа экспрессии трансгена

2. Пробирки маркируют, указывая номера пациентов, инициалы, дату и время сбора образцов, и хранят в морозильной камере при температуре не выше -70°C .

[0397] Образцы мочи получают следующим образом:

1. Два образца мочи объемом 1–2 мл отбирают из общего собранного объема

2. Образцы мочи и общие собранные объемы хранят в замороженном виде до последующих анализов.

Результаты

[0398] VB-111 вводят шести пациентам, каждый из которых страдает от рака фаллопиевых труб или рака эпителия яичников в течение, по меньшей мере, одного года до включения в исследование, в дозе 3×10^{12} VP в сочетании с паклитакселом (40 мг или 80 мг) на индивидуума, как показано на фиг.3. У пациентов отсутствуют какие-либо серьезные побочные эффекты, связанные с VB-111. Дозолимитирующая токсичность не наблюдается.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный аденовирус, депонированный в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) под номером 13021201, при этом композиция содержит буфер.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая аденовирусный вектор, который содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19, при этом композиция содержит буфер.

3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где чистота аденовируса составляет, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100%.

4. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-3, где буфер содержит одно или более из буферных веществ, выбранных из группы, состоящей из фосфатов, глицина, сорбиновой кислоты, сорбата калия, смесей неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воды, солей, протамина сульфата, динатрия гидрофосфата, гидрофосфата калия, хлорида натрия и солей цинка.

5. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-4, где композиция получена в виде стерильной инъекционной формы.

6. Применение фармацевтической композиции по любому из п.п.1-5 для получения лекарственного средства для ингибирования, уменьшения или снижения ангиогенеза или неоваскуляризации в опухоли у индивидуума, нуждающегося в этом.

7. Применение по п.6, где лекарственное средство содержит эффективное количество аденовируса, которое составляет примерно от 10^9 до 10^{15} вирусных частиц.

8. Применение по п.7, где лекарственное средство содержит эффективное количество аденовируса, которое составляет примерно от 10^{12} до 10^{14} вирусных частиц.

9. Применение по любому из п.п.6-8 в комбинации с эффективным количеством одного или нескольких из химиотерапевтических средств или лучевой терапии.

10. Применение по п.9 в комбинации с эффективным количеством не более одного, не более двух, или не более трех химиотерапевтических средств.

11. Применение по п.9 или 10, где одно или несколько химиотерапевтических средств выбраны из группы, состоящей из ацивицина; акларубицина; акодазола гидрохлорида; акронина; адриамицина; адозелезина; алдеслейкина; алимты; алтретамина; амбомицина; аметантрона ацетата; аминоклутетимида; амсакрина; анастрозола; антрамицина; аспарагиназы; асперлина; азацитидина; азетепы; азотомидина; батимастата; бензодепы; бикалутамида; бисантрена гидрохлорида; биснафида димезилата; бевацизумаба, бизелезина; блеомицина сульфата; бреквинара натрия; бропиримина; бусульфана; кактиномицина; калустерона; карацемида; карбетимера; карбоплатина, кармустина; карубицина гидрохлорида; карзелезина; цедефингола; хлорамбуцила; циролемицина; цисплатина; кладрибина; криснатола мезилата; циклофосфамида; цитарабина; дакарбазина; дактиномицина; даунорубицина гидрохлорида; децитабина; дексормаплатина; дезагуанина; дезагуанина мезилата; диазиквона; доцетаксела; доксорубицина; доксорубицина гидрохлорида; дролоксифена; дролоксифена цитрата; дромостанолон пропионата; дуазомидина; эдатрексата; эфлорнитина гидрохлорида; элсамитруцина; энлоплатина; энпромата; эпипропидина; эпирубицина гидрохлорида; эрбулозола; эзорубицина гидрохлорида; эстрамустина; эстрамустинфосфата натрия; этанидазола; этопозид; этопозидфосфата; этоприна; фадрозола гидрохлорида; фазарабина; фенретинида; флоксуридина; флударабина фосфата; фторурацила; флюороцитабина; фосквидона; фострицина натрия; гемцитабина; гемцитабина гидрохлорида; гидроксимочевина; идарубицина гидрохлорида; ифосфамида; илмофосина; интерферона альфа-2a; интерферона альфа-2b; интерферона альфа-n1; интерферона альфа-n3; интерферона бета-1a; интерферона гамма-1b; ипроплатина; гидрохлорида иринотекана; ланреотида ацетата; летрозолола; лейпролида ацетата; лиарозола гидрохлорида; лометрексола натрия; ломустина; лозоксантрона гидрохлорида; мазопрокола; майтансина; мехлоретамина гидрохлорида; мегестрола ацетата;

меленгестрола ацетата; мелфалана; меногадила; меркаптопурина; метотрексата; метотрексата натрия; метоприна; метуредепы; митиндомида; митокарцина; митокромина; митогиллина; митомалцина; митомицина; митоспера; митотана; митоксантрона гидрохлорида; микофенолокислоты; нокодазола; ногаламицина; ормаплатина; оксисурана; пазотиниба; паклитаксела; пегаспаргазы; пелиомицина; пентамустина; пепломицина сульфата; перфосфамида; пипобромана; пипосульфана; пироксантрона гидрохлорида; пликамицина; пломестана; порфимера натрия; порфирамицина; преднимустина; прокарбазина гидрохлорида; пурамицина; пурамицина гидрохлорида; пиразофурина; рибоприн; роглетимида; сафингола; сафингола гидрохлорида; семустина; симтразена; сорафиниба; спарфосата натрия; спарзомицина; спирогермания гидрохлорида; спиромустина; спироплатина; стрептонигрина; стрептозоцина; сулофенура; сунитиниба; талисомицина; таксола; текогалана натрия; тегафура; телоксантрона гидрохлорида; темопорфина; тенипозид; тероксирона; тестолактона; тиамиприна; тиогуанина; тиотепы; тиазофурина; тирапазамина; топотекана гидрохлорида; торемифена цитрата; трестолон ацетата; трицирибина фосфата; триметрексата; триметрексата глюкуроната; трипторелина; тубулозола гидрохлорида; урамустина; уредепы; вапреотида; вертепорфина; винбластина сульфата; винкристина сульфата; виндезина; виндезина сульфата; винепидина сульфата; винглицината сульфата; винлейрозина сульфата; винорелбина тартрата; винросидина сульфата; винзолидина сульфата; ворозола; зениплатина; зиностатина; или зорубицина гидрохлорида.

12. Применение по любому из п.п.9-11, где химиотерапевтическое средство представляет собой паклитаксел.

13. Применение по п.11 или 12, где эффективное количество паклитаксела составляет от, по меньшей мере, примерно 10 мг/м² до, по меньшей мере, примерно 110 мг/м².

14. Применение по любому из п.п.9-11, где химиотерапевтическое средство представляет собой бевацизумаб.

15. Применение по любому из п.п.6-14, где опухоль

(i) порождается заболеванием, или связана с заболеванием,

включающим рак щитовидной железы, нейроэндокринный рак, глиобластому, гинекологический рак у женщин, любые их сочетания или метастазы; или

(ii) порождается или связана с раком легких.

16. Применение по любому из п.п.6-15, где лекарственное средство предназначено для системного введения.

17. Применение по п.16, где системное введение представляет собой подкожное, внутривенное, интраназальное, внутрикожное, внутримышечное, интратекальное, внутрибрюшинное, внутрь мочевого пузыря, интравагинальное, внутриматочное или ректальное.

18. Применение по любому из п.п.6-15, где лекарственное средство предназначено для местного введения.

19. Применение фармацевтической композиции по любому из п.п.1-5 для получения лекарственного средства для продления общей выживаемости индивидуума, нуждающегося в этом, при этом индивидуум имеет опухоль или метастаз, связанные с, или порожденные гинекологическим раком у женщин.

20. Применение по п.19, где лекарственное средство содержит эффективное количество аденовируса, которое составляет примерно от 10^9 до 10^{15} вирусных частиц.

21. Применение по п.20, где лекарственное средство содержит эффективное количество аденовируса, которое составляет примерно от 10^{12} до 10^{14} вирусных частиц.

22. Применение по любому из п.п.19-21 в комбинации с эффективным количеством одного или нескольких из химиотерапевтических средств или лучевой терапии.

23. Применение по п.22 в комбинации с эффективным количеством не более одного, не более двух, или не более трех химиотерапевтических средств.

24. Применение по п.22 или 23, где одно или несколько химиотерапевтических средств выбраны из группы, состоящей из ацивирцина; акларубицина; акодازола гидрохлорида; акронина; адриамина; адозелезина; алдеслейкина; алимты; алтретамина; амбомицина; аметантрона ацетата; аминоклутетимида; амсакрина; анастрозола; антрамицина; аспарагиназы; асперлина; азацитидина;

азетепы; азотомицина; батимастата; бензодепы; бикалутамида; бисантрена гидрохлорида; биснафида димезилата; бевацизумаба, бизелезина; блеомицина сульфата; бреквинара натрия; бропирина; бусульфана; кактиномицина; калустерона; карацемида; карбетимера; карбоплатина, кармустина; карубицина гидрохлорида; карзелезина; цедефингола; хлорамбуцила; циролемицина; цисплатина; кладрибина; криснатола мезилата; циклофосфамида; цитарабина; дакарбазина; дактиномицина; даунорубицина гидрохлорида; децитабина; дексормаплатина; дезагуанина; дезагуанина мезилата; диазиквона; доцетаксела; доксорубицина; доксорубицина гидрохлорида; дролоксифена; дролоксифена цитрата; дромостанолон пропионата; дуазомицина; эдатрексата; эфлорнитина гидрохлорида; элсамитруцина; энлоплатина; энпромата; эпипропидина; эпирубицина гидрохлорида; эрбулозола; эзорубицина гидрохлорида; эстрамустина; эстрамустинфосфата натрия; этанидазола; этопозид; этопозидфосфата; этоприна; фадрозола гидрохлорида; фазарабина; фенретинида; флоксуридина; флударабина фосфата; фторурацила; флюороцитабина; фосквидона; фострицина натрия; гемцитабина; гемцитабина гидрохлорида; гидроксимочевины; идарубицина гидрохлорида; ифосфамида; илмофосина; интерферона альфа-2a; интерферона альфа-2b; интерферона альфа-n1; интерферона альфа-n3; интерферона бета-1a; интерферона гамма-1b; ипроплатина; гидрохлорида иринотекана; ланреотида ацетата; летрозолола; лейпролида ацетата; лиарозолола гидрохлорида; лометрексола натрия; ломустина; лозоксантрона гидрохлорида; мазопрокола; майтансина; мехлоретамин гидрохлорида; мегестрола ацетата; меленгестрола ацетата; мелфалана; меногабрила; меркаптопурина; метотрексата; метотрексата натрия; метоприна; метуредепы; митиндомида; митокарцина; митокромина; митогиллина; митомалцина; митомицина; митоспера; митотана; митоксантрона гидрохлорида; микофенолоксиклоты; нокодазола; ногаламицина; ормаплатина; оксисурана; пазотиниба; паклитаксела; пегаспаргазы; пелиомицина; пентамустина; пепломицина сульфата; перфосфамида; пипобромана; пипосульфана; пироксантрона гидрохлорида; пликамицина; пломестана; порфимера натрия;

порфирамицина; преднимустина; прокарбазина гидрохлорида; пуромицина; пуромицина гидрохлорида; пиразофурина; рибоприна; роглетимида; сафингола; сафингола гидрохлорида; семустина; симтразена; сорафиниба; спарфосата натрия; спарзомицина; спирогермания гидрохлорида; спиромустина; спироплатина; стрептонигрина; стрептозоцина; сулофенура; сунитиниба; талисомицина; таксола; текогалана натрия; тегафура; телоксантрона гидрохлорида; темопорфина; тенипозид; тероксирона; тестолактона; тиамиприна; тиогуанина; тиотепы; тиазофурина; тирапазамина; топотекана гидрохлорида; торемифена цитрата; трестолон ацетата; трицирибина фосфата; триметрекса; триметрекса глюкуроната; трипторелина; тубулозола гидрохлорида; урамустина; уредепы; вапреотида; вертепорфина; винбластин сульфата; винкристин сульфата; виндезин; виндезин сульфата; винепидин сульфата; винглицината сульфата; винлейрозина сульфата; винорелбин тартрат; винросидин сульфата; винзолидин сульфата; ворозол; зениплатин; зиностатин; или зорубин гидрохлорида.

25. Применение по любому из п.п.22-24, где химиотерапевтическое средство представляет собой паклитаксел.

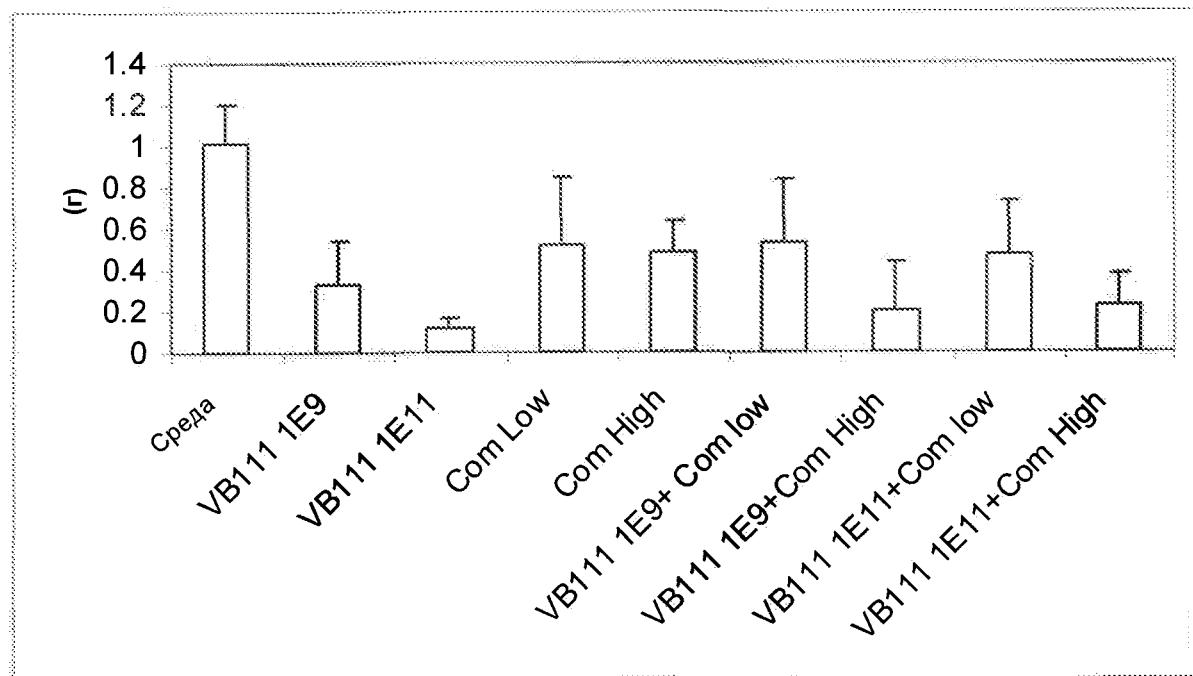
26. Применение по п.24 или 25, где эффективное количество паклитаксела составляет от, по меньшей мере, примерно 10 мг/м² до, по меньшей мере, примерно 110 мг/м².

27. Применение по любому из п.п.22-24, где химиотерапевтическое средство представляет собой бевацизумаб.

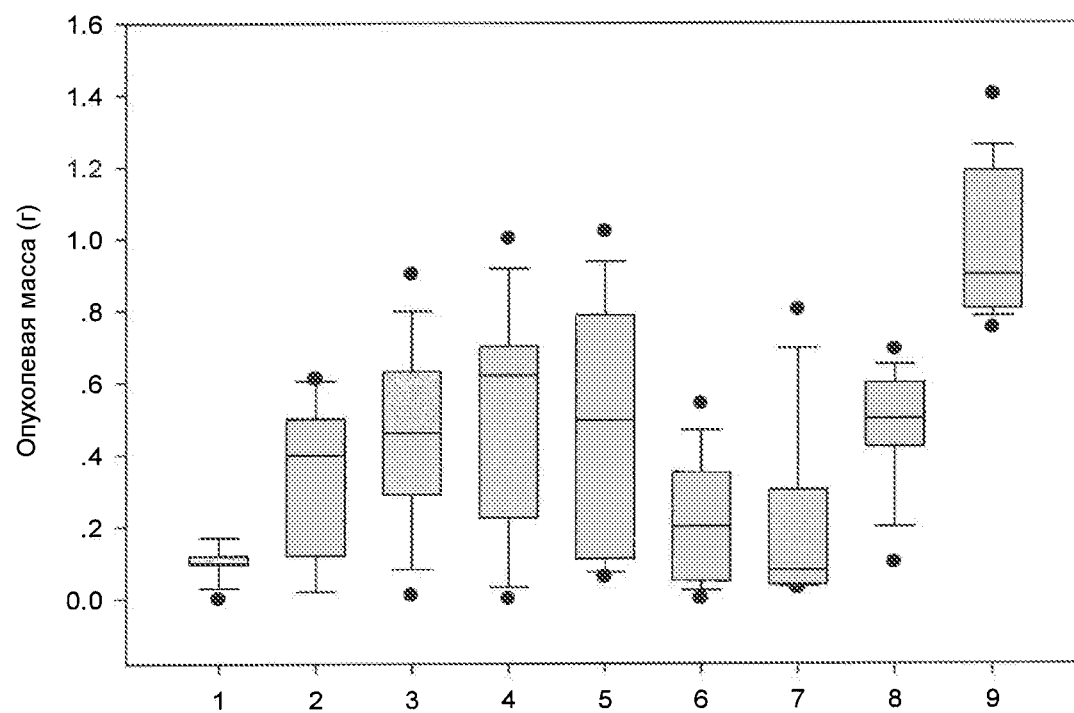
28. Применение по любому из п.п.19-27, где лекарственное средство предназначено для системного введения.

29. Применение по п.29, где системное введение представляет собой подкожное, внутривенное, интраназальное, внутрикожное, внутримышечное, интратекальное, внутрибрюшинное, внутрь мочевого пузыря, интравагинальное, внутриматочное или ректальное.

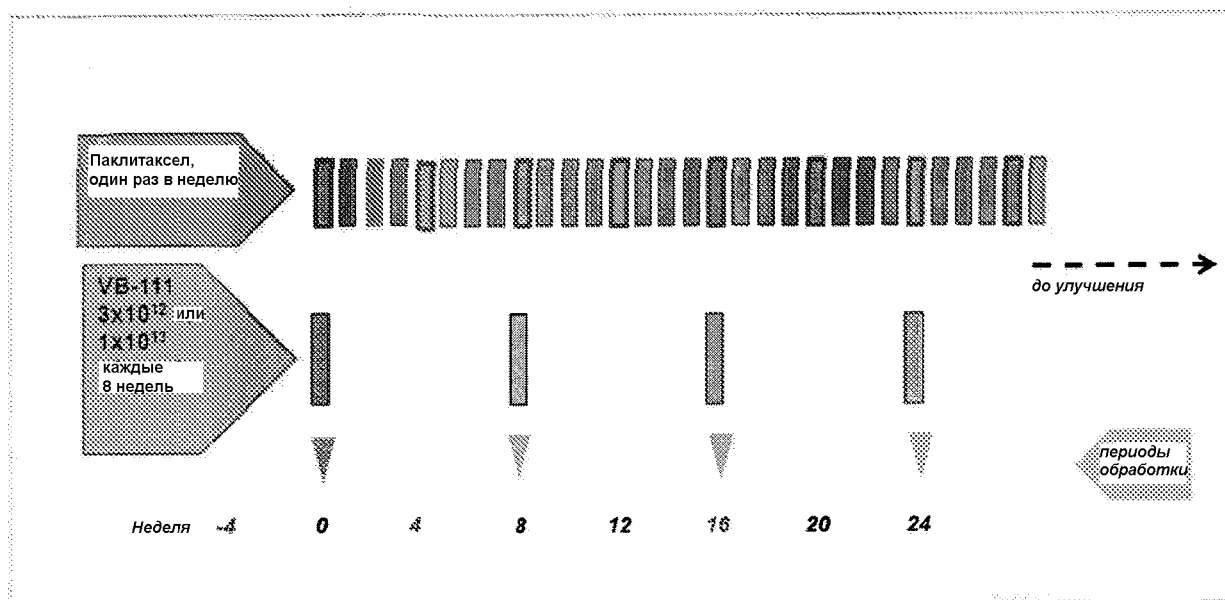
По доверенности



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201992441

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 35/761 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 35/00, 35/761, 48/00; A61P 35/00, 35/04; C12N 5/10, 7/00, 15/00, 15/09, 15/79, 15/861

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Google Patents, Google, PubMed – "ECACC 13021201"

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	EP2128261A1 (SHENZHEN WELL.D GENETIC ENGINEERING CO., LTD) 02.12.2009, реферат	1, 3–29
A	WO2012046943A2 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 12.04.2012, формула, п. 17	1, 3–29
A	WO2011081294A3 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 07.07.2011, формула, п. 14	1, 3–29
A	WO2007049924A1 (BIOINFRA INC.) 03.05.2007, формула, п. 7	1, 3–29
A	KR20120010697A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 06.02.2012, реферат	1, 3–29
A	CN1335398A (SHANGHAI SANWEI BIOTECH CO., LTD) 13.02.2002, реферат	1, 3–29
A	CN101348512A (ZHENGZHOU WEIRUI BIOTECHNOLOGY CO., LTD) 21.01.2009, реферат	1, 3–29
A	UA70909C2 (CANJI INC.) 15.11.2004, реферат, формула	1, 3–29
A	UA00043917C2 (BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 15.01.2002, реферат, формула, пп. 106–110	1, 3–29

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **02/04/2020**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины

Согласовано в электронном виде

КОПИЯ ВЕРНА

Начальник Управления экспертизы

Евразийского патентного ведомства
Евразийской патентной организации

Д. Ю. Рогожин
Дата **10 АПР 2020**

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

201992441

Раздел I. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ, КОГДА НЕКОТОРЫЕ ПУНКТЫ ФОРМУЛЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ НЕ ПОДЛЕЖАТ ПОИСКУ

Настоящий отчет о патентном поиске не охватывает некоторые пункты формулы изобретения по следующим причинам:

1. ☐ пункты формулы изобретения №:
т.к. они относятся к объектам, указанным в правиле 3(3) Патентной инструкции к ЕАПК, а именно:

2. ☐ пункты формулы изобретения №:
т.к. они относятся к части евразийской заявки, которая не отвечает установленным требованиям в такой степени, что по ней невозможно провести полноценный патентный поиск, а именно:

Раздел II. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ НЕСОБЛЮДЕНИЯ ЕДИНСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Единство изобретения не соблюдено по следующим причинам:

Изобретения по пп. 1 и 2 не удовлетворяют требованию единства, поскольку они охарактеризованы различными признаками: изобретение по п. 1 охарактеризовано особым техническим признаком, касающимся депонированного аденовируса ЕСАСС 13021201, тогда как изобретение по п. 2 охарактеризовано особым техническим признаком, касающимся аденовирусного вектора, содержащего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19 [Правило 4 Патентной инструкции к ЕАПК]. Поиск проведен в отношении пунктов 1, 3–29 формулы.