



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120036** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)**A61K 35/66** (2015.01)

A61P 43/00

C12R 1/145 (2006.01)**A61K 35/742** (2015.01)**A61K 39/08** (2006.01)**C07K 14/33** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2015 10523**
(22) Дата подання заявки: **28.03.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.09.2019**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/806,497**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **29.03.2013**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.05.2016, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.09.2019, Бюл.№ 18**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2014/032196, 28.03.2014**

(72) Винахідник(и):
Саха Саурабх (US),
Чжоу Шибін (US),
Вогельштейн Берт (US),
Кінзлер Кеннет У. (US)
(73) Власник(и):
БАЙОМЕД ВЕЛЛІ ДІСКАВЕРІЗ, ІНК.,
4520 Main Street, 16th Floor Kansas City,
Missouri 64111, United States of America
(US),
ДЗЕ ДЖОНС ХОПКІНС ЮНІВЕРСІТІ,
3400 N. Charles Street, Baltimore, MD 21218,
United States of America (US)
(74) Представник:
Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Erika L Krick et al: "Evaluation of Clostridium novyi-NT spores in dogs with naturally occurring tumors", American journal of veterinary research, 01.01.2012, P. 112, [знайдений 10.08.2018] Знайдений в <<http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/ajvr.73.1.112>>
Dang Long H et al: "Targeting vascular and avascular compartments of tumors with C. novyi-NT and anti-microtubule agents", Cancer biology & therapy, Landes Bioscience, US, vol. 3, no. 3, 01.03.2004, P. 326-337

(54) C. Novyi-NT для лікування солідних пухлин людини**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу лікування або полегшення впливу солідної пухлини, що присутня у людини, який включає введення людині в пухлину одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) C. Novyi-NT, що містить 1×10^3 - 1×10^6 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або розчині.

UA 120036 C2

Галузь техніки, до якої належить винахід

У даному винаході пропонуються, зокрема, способи лікування або ослаблення впливу солідної пухлини, що присутня у людини, циторедукції солідної пухлини, що присутня у людини, мікроскопічно точного вирізування пухлинних клітин у людини і знищення солідної пухлини, що присутня у людини. Надаються також одиниці доз КУО *C. novyi* і набори.

Передресне посилання на споріднені заявки

Даний винахід просить пріоритет за попередньою заявкою США з реєстраційним номером 61/806497, поданою 29 березня 2013 р., повний зміст якої включено як посилання.

Рівень техніки

Стратегії, що успішно спрямовані на знищення злоякісних новоутворень людини, використовують розходження між нормальними і злоякісними тканинами (Dang et al., 2001). Такі розходження можуть бути знайдені на молекулярному рівні, як це спостерігається у випадку генетичних аберацій, або більш глобально у випадку фізіологічних аберацій у пухлині.

Відомо, що злоякісні солідні пухлини звичайно складаються з некротичної центральної маси і життєздатної периферичної маси. Терапевтичні втручання на сьогодні зосереджені на добре васкуляризованій зовнішній масі пухлини, але лише деякі з них спрямовані на внутрішню гіпоксичну масу (Jain et al., 2001). Внутрішня маса пухлини має унікальні характеристики, що відрізняють її від нормальних тканин. Центральна маса має погане кровопостачання і, отже, дефіцит поживних речовин і кисню. У місці активного некрозу клітин відсутність функціонуючого кровопостачання обмежує кліренс токсичних зруйнованих клітин і приводить до низького рН. Таке середовище не підходить для росту більшості клітин людини, але є багатим середовищем для росту визначених анаеробних бактерій. Понад шістьдесят років тому ця концепція змусила дослідників вводити спори *Clostridium histolyticum* тваринам-пухлиноносіям (Parker et al., 1947). Примітно, що бактерії проростали тільки в некротичній центральній масі пухлини і розріджували пухлини. У 1950-х і 1960-х роках спори *Clostridium butyricum* вводили хворим із різними дуже запущеними солідними злоякісними пухлинами (Mose, 1967; Mose, 1972). У багатьох хворих спостерігалася істотне проростання і руйнування значної частини їхніх пухлин, але дуже погане самопочуття цих хворих і запущена стадія захворювання робили важким їх клінічне ведення, і відсутність повних клінічних відповідей послабили подальше переслідування цієї мети.

Успішне лікування солідних пухлин залишається в медицині недосягнутою метою. Таким чином, існує потреба в пошуку способів лікування солідних пухлин. Даний винахід спрямований на задоволення цієї й іншої потреб.

Короткий виклад суті винаходу

Одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб лікування або ослаблення впливу солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) *C. novyi*, що включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або в розчині.

Іншим варіантом здійснення даного винаходу є спосіб циторедукції солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину одиниці дози КУО *C. novyi*, що включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або в розчині.

Додатковим варіантом здійснення даного винаходу є спосіб циторедукції солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину протягом від одного до чотирьох циклів одиниці дози спор *C. novyi* NT, що включають приблизно 1×10^4 спор на цикл, причому кожна одиниця дози *C. novyi* NT суспендована у фармацевтично прийнятному носії або в розчині.

Додатковим варіантом здійснення даного винаходу є спосіб лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину протягом від одного до чотирьох циклів одиниці дози спор *C. novyi* NT, що включають приблизно 1×10^4 спор на цикл, причому кожна одиниця дози *C. novyi* NT суспендована у фармацевтично прийнятному носії або в розчині.

Іншим варіантом здійснення даного винаходу є спосіб знищення солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину одиниці дози КУО *C. novyi*, що включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або в розчині, де пухлина знищується, залишаючи край нормальної тканини.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу пропонується одиниця дози КУО *C. novyi*. Ця одиниця дози включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО у фармацевтично прийнятному носії або в розчині, які є ефективними для лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що присутня у людини.

У додатковому варіанті здійснення даного винаходу пропонується набір для лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що присутня у людини. Цей набір включає одиницю дози КУО С. повуї, що включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО у фармацевтично прийнятному носії або в розчині, і інструкції з використання набору.

5 В іншому варіанті здійснення даного винаходу пропонується спосіб мікроскопічно точного видалення пухлинних клітин у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) С. повуї NT, що включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або в розчині.

10 В іншому варіанті здійснення даного винаходу пропонується спосіб лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що метастазувала в одне або більше місць організму людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) С. повуї NT, що включає щонайменше приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або в розчині.

Короткий опис фігур

15 На фігурах 1А-В показані різні зображення остеосарком собак на правому дистальному радіусі/ліктьовій кістці випробовуваних індивідумів «Саші» (фігура 1А) і «Семпсона» (фігура 1В) після променевої терапії і внутрішньовенного (в./в.) введення С. повуї NT.

На фігурі 2А показані криві Каплана-Мейера, що демонструють виживаність щурів F433 Fisher після ортотопічної імплантації сингенної лінії клітин гліоми (F98). Зовнішня лінія - спори С. повуї-NT вводили в пухлину через 12-15 днів після імплантації пухлини. Внутрішня лінія - контроль. На фігурі 2В показана біolumінесценція (система візуалізації Xenogen) у трьох ілюстративних щурів F433 Fisher після ортотопічної імплантації клітинної лінії F98 гліоми. Зображення, отримані в 0 день (попереднє лікування - день введення спор С. повуї-NT), у 1 день після ІТ введення спор С. повуї-NT, і в 2 день після ІТ введення спор С. повуї-NT. На фігурі 2С показана активність люциферази (кількість у мільйонах) у 0 день (попереднє лікування), у 1 день після ІТ введення спор С. повуї-NT і в 2 день після ІТ введення спор С. повуї-NT.

25 На фігурах 3А-В і 4А-В показані пророслі бактерії С. повуї-NT у межах мікроскопічних ушкоджень пухлини мозку. На цих фігурах забарвлення по Граму виявило вегетативні бактерії С. повуї-NT (білі або чорні голівки стрілок), локалізовані в тканинах пухлини (Т) і в зірчастій мікроінвазії (S), але не в нормальній тканині головного мозку (Br). Фігура 3А являє собою збільшення в 100 разів, що показує границю розділу пухлини і нормального мозку. Фігура 3В являє собою збільшення в 400 разів, що показує границю розділу пухлини і нормального мозку. Фігура 4А являє собою збільшення в 100 разів, що показує границю розділу нормального мозку, пухлини і зірчастої мікроінвазії пухлинної тканини. Фігура 4В являє собою збільшення в 400 разів, що показує проростання С. повуї-NT у зірчасте мікроінвазивне ураження.

Фігура 5 являє собою таблицю зведених даних секвенованих зразків.

Фігура 6 являє собою таблицю змін кількості копій у саркомах собаки.

На фігурі 7А-Г представлені фотографічні зображення КТ від собаки 11-R01, що показують часткову відповідь на лікування С. повуї-NT. Зображення охоплюють час від попереднього лікування до 70 дня після першої ІТ дози спор С. повуї-NT. На фігурі 7А показане зображення пухлини периферичної нервової оболонки після попереднього лікування. На фігурі 7В показане формування абсцесу на 3-й день дослідження в об'ємі, що обмежується пухлиною. На фігурі 7С показана медична санація рани після спонтанного розриву абсцесу і виділення некротичного і гнійного матеріалу, що дає можливість загоєння вторинним натягом. На фігурі 7Д показано, що рана загоїлася повністю на 70 день дослідження, і відзначалося зниження найдовшого діаметра пухлини на 77,6%. На фігурі 7Е представлено КТ зображення після попереднього лікування, зроблене за 4 дні до першого лікування, що показує поширеність пухлини (кружки) на перетинанні вушної раковини і черепа. На фігурі 7Г представлено КТ зображення після лікування на 10 день дослідження, що демонструє майже повну циторедукцію пухлини.

50 Фігури 8А-Д являють собою фотографічні і КТ зображення собаки 04-R03, що демонструють повну відповідь на лікування С. повуї-NT. Зображення охоплюють час від попереднього лікування до 60 дня після першої ІТ дози спор С. повуї-NT. На фігурі 8А показане зображення саркоми м'яких тканин після попереднього лікування. На фігурі 8В показаний абсцес, що локалізується в пухлині, сформований на 15-й день дослідження, через 1 день після третьої дози спор С. повуї-NT. На фігурі 8С показано, що циторедукція пухлини була повною на 27 день дослідження і була сформована здорова грануляційна тканина. На фігурі 8Д показано, що рана повністю загоїлася на 60 день дослідження, і ніякої залишкової пухлини не помічено (повна відповідь). Фігура 8Е являє собою КТ зображення при попередньому лікуванні, зроблене за 5 днів до першого лікування, що демонструє поширеність пухлини (кружки) на передпліччя. На

фігурі 8F представлено КТ зображення після лікування на 62 день дослідження, що демонструє повну втрату пухлинної маси.

На фігурі 9 показаний розмір пухлини собаки 11-R01 від початкового ІТ дозування спорами С. повуї NT до завершення клінічного курсу.

5 На фігурі 10A показано фотографічні (верхні панелі) і КТ зображення (нижні панелі) саркоми м'яких тканин собаки в тестованого випробовуваного «Дрейка» (04-R01) після ІТ дозування спор С. повуї NT. Зони, обмежені кружками в КТ зображеннях, указують розташування пухлини. На фігурі 10B показаний розмір пухлини Дрейка від первісного ІТ дозування С. повуї NT, протягом трьох наступних доз до завершення клінічного курсу.

10 На фігурі 11 показаний розмір пухлини собаки 04-R03 від первісного ІТ дозування спор С. повуї NT, протягом двох наступних циклів до завершення клінічного курсу.

На фігурі 12A показаний розмір пухлини у восьми випробовуваних індивідуумів (11-R02, 04-R02, 26-R01, 16-R02, 04-R05, 16-R03, 11-R04 і 04-R06) протягом клінічного курсу, при якому було проведено чотири цикли ІТ введення спор С. повуї NT. На фігурі 12B показаний розмір пухлини в трьох випробовуваних індивідуумів (04-R08, 01-R02 і 10-R02), для яких були недоступні дані повного клінічного курсу в зв'язку з необхідною ампутацією або припиненням збирання даних.

На фігурі 13 показана схема введення в пухлини при дослідженні за допомогою ІТ лікування, розкритого в прикладах 6 і 7.

20 На фігурах 14A-D показані КТ і МРТ зображення хворої людини. На фігурі 14A показане КТ зображення з контрастуванням на 3 день, що демонструє докази збирання повітря усередині і поза медулярною зоною. На фігурі 14B показане МРТ зображення після попереднього лікування (T1 з контрастуванням гадолінієм) правої верхньої плечової кістки, що демонструє масу з підвищеною контрастністю, що включає м'яку тканину і, можливо, прилеглу кістку. На фігурі 14C показане МРТ зображення на 4 день після лікування, що демонструє зменшення підвищеної контрастності в пухлинній масі порівняно з вихідним. На фігурі 14D показане МРТ зображення на 29 день після лікування, що демонструють гомогенну масу без підвищеної контрастності з виниклим некрозом. Пухлина виділена наконечниками стрілок.

30 На фігурах 15A-D показаний великий некроз пухлини в хворій людини, яку лікували спорами С. повуї-NT. На фігурах 15A і 15B показана біопсія пухлини до лікування, що демонструє життєздатність пухлинних клітин (лейоміосаркоми), збільшення 40х (A) і 100х (B), відповідно. На фігурах 15C і 15D показана біопсія пухлини після лікування через 4 дні після ІТ введення спор С. повуї-NT, що демонструє великий некроз пухлинних клітин, збільшення 40х (A) і 100х (B), відповідно.

35 На фігурах 16A-D показані різні аспекти процедури ІТ введення з використанням тризубої голки. На фігурі 16A представлена фотографія тризубої голки. На фігурах 16B і 16C показані зображення комп'ютерної томографії (КТ) в зоні спрямованої ін'єкції до і після введення голки. На фігурі 16D показане збільшене зображення тризубої голки. На фігурі 16E показане зображення КТ із накладенням вимірів для визначення точок введення голки.

40 Докладний опис винаходу

Один варіант здійснення даного винаходу стосується способу лікування або ослаблення впливу солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) С. повуї, що включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або в розчині.

45 При використанні в даному документі терміни «лікувати», «лікування», «терапія» і їхні граматичні варіанти позначають вплив на індивідуального суб'єкта {наприклад, хворої людини} за допомогою протоколу, схеми, процесу або засобу, при яких бажано одержати фізіологічну відповідь або результат у цього індивідуума, наприклад, у хворого. Зокрема, способи і композиції за даним винаходом можуть бути використані для уповільнення розвитку симптомів хвороби або затримки початку захворювання або стану, припинення або прогресії розвитку захворювання. Проте, оскільки кожен індивідуум, що піддається лікуванню, може не відповісти на конкретні протокол, режим, процес або засіб лікування, лікування не вимагає того, щоб бажана фізіологічна відповідь або результат була досягнута в усіх до єдиного індивідуумів або суб'єктів, наприклад, у хворого, у популяції. Відповідно, даний індивідуум або суб'єкт, наприклад, хворий, популяція, може не реагувати або неадекватно реагувати на лікування.

50 При використанні в даному документі терміни «поліпшити», «поліпшення» і їхні граматичні варіанти позначають зниження важкості симптомів захворювання в індивідуума.

60 При використанні в даному документі «солідна пухлина» позначає аномальну масу клітин, що ростуть. Солідні пухлини можуть виникати в будь-якій частині тіла. Солідні пухлини можуть бути раковими (злоякісними) або нераковими (доброякісними). Приклади солідних пухлин за

даним винаходом включають адренкортикальну карциному, анальну пухлину/рак, пухлину/рак сечового міхура, пухлини/рак кістки (наприклад, остеосаркому), пухлину мозку, пухлину/рак молочної залози, карциноїдну пухлину, карциному, пухлину/рак шийки матки, пухлину/рак товстої кишки, пухлину/рак ендометрія, пухлину/рак стравоходу, пухлину/рак позапечічкових жовчних проток, сімейство пухлин Юїнга, пухлину екстракраніальних зародкових клітин, пухлину/рак очного яблука, пухлину/рак жовчного міхура, пухлину/рак шлунка, пухлину зародкових клітин, гестаційну трофобластну пухлину, пухлину/рак голови і шиї, гіпофарингеальну пухлину/рак, карциному острівкових клітин, пухлину/рак нирки, пухлину/рак гортані, лейоміосаркому, лейкоз, пухлину/рак губи і порожнини рота, пухлину/рак печінки (наприклад, гепатоцелюлярну карциному), пухлину/рак легень, лімфому, злоякісну мезотеліому, карциному клітин Меркеля, фунгоїдний мікоз, мієлодиспластичний синдром, мієлопроліферативні захворювання, пухлину/рак носоглотки, нейробластому, пухлину/рак ротової порожнини, пухлину/рак ротоглотки, остеосаркому, пухлину/рак епітелію яєчників, пухлину зародкових клітин яєчників, пухлину/рак підшлункової залози, пухлину/рак придаткових пазух і порожнини носа, пухлину/рак парашитовидної залози, пухлину/рак статевого члена, пухлину/рак гіпофіза, неоплазму плазматичних клітин, пухлину/рак простати, рабдоміосаркому, пухлину/рак прямої кишки, пухлину/рак ниркових клітин, пухлину/рак перехідних клітин ниркової миски і сечоводу, пухлину/рак слинних залоз, синдром Сезарі, пухлини шкіри (наприклад, шкірну Т-клітинну лімфому, саркому Капоші, пухлину тучних клітин, і меланому), пухлину/рак тонкої кишки, саркому м'яких тканин, пухлину/рак шлунка, пухлину/рак яєчок, тимому, пухлину/рак щитовидної залози, пухлину/рак уретри, пухлину/рак матки, пухлину/рак піхви, пухлину/рак вульви і пухлину Вільмса. Переважно солідна пухлина вибрана з групи, що складається із саркоми м'яких тканин, гепатоцелюлярної карциноми, раку молочної залози, раку підшлункової залози і меланоми. Більш переважно солідна пухлина являє собою лейоміосаркому, таку як заочеревинна лейоміосаркома.

Використовуваний у даному документі термін «одиниця дози» позначає кількість ліків, що вводяться індивідууму, наприклад, людині, у разовій дозі.

При використанні в даному документі «*C. novyi*» позначає бактерій, що належать до штаму *Clostridium novyi*, або бактерій, що походять від нього. *Clostridium novyi*, що може бути отримана комерційно, наприклад, від ATCC (#19402), являє собою грампозитивну анаеробну бактерію. Бактерії, що походять від *Clostridium novyi*, можуть бути отримані, наприклад, шляхом скринінгу нативної *Clostridium novyi* на клони, що мають специфічні характеристики. Переважними бактеріями *C. novyi* є бактерії, що є нетоксичними або мінімально токсичними для індивідуума, такого як свавець, наприклад, людина. Наприклад, переважні *C. novyi*, *C. novyi* NT являють собою бактерії, що походять від нативної *Clostridium novyi*, які втратили свій ген єдиного системного токсину (α -токсину), наприклад, у процесі генетичної інженерії або в результаті процедури відбору. *C. novyi* NT можуть бути отримані, наприклад, за допомогою процедури, розкритої в статті Dang et al., 2001 і патенті США No. 7344710. Таким чином, даний винахід включає бактерії *C. novyi*, а також *C. novyi* NT.

Фармакокінетичні дослідження показали, що спори *C. novyi* NT, якщо їх вводили внутрішньовенно, швидко виводяться з кровотоку (більше 99% спор виводиться протягом 1 години) і переходять у ретикулоендотеліальну систему. Довгострокові дослідження розподілу показують, що ці спори в остаточному підсумку виводяться з усіх тканин протягом одного року. *C. novyi* NT, що доставляються у вигляді спор (у стадії спокою), проростають (переходять від спор до вегетативної стадії) при впливі зон гіпоксії пухлин. Таким чином, токсичність *C. novyi* NT, як очікується, буде більш високою в пухлиноносіїв, ніж у здорових індивідуумів.

Здорові миші і кролики не показали ніяких очевидних клінічних ознак (захворюваності, смертності або клінічної картини) токсичності незалежно від дози лікування при внутрішньовенному введенні *C. novyi* NT. Проте, дослідження тканин при розтині трупів показало як макроскопічні, так і мікроскопічні запальні зміни, що, як передбачається, залежать від дози лікування. Ці зміни головним чином у печінці, селезінці і надниркових залозах були виявлені при дозах 5×10^8 спор/кг або більше. Здорові тварини, які одержували більш низькі дози, не характеризувалися макроскопічними або мікроскопічними відхиленнями при розтині. У тварин, які одержували високі дози, результат запалення був очевидним уже на 28-й день, і всі ознаки запалення були відсутні у всіх тварин через один рік після введення. Для визначення того, чи будуть спори *C. novyi* NT проростати в непухлинній гіпоксичній тканині, у дослідженнях старих мишей з атеросклеротичними бляшками й експериментальними інфарктами міокарда лікували *C. novyi* NT. Не виявлено ніяких доказів локалізації або проростання спор у цих судинних ураженнях. На закінчення дослідження ніяких клінічних або патологічних відхилень (крім вже існуючих серцево-судинних уражень) не було відзначено в цих мишей. Ці дослідження

показали, що *C. novyi* NT не викликають явної клінічної токсичності і викликають мінімальну патологічну токсичність у здорових тварин.

Внутрішньовенне (в./в.) введення спор імунокомпетентним мишам-пухлиноносіям приводить до лізису пухлини й інтенсивної запальної реакції. У мишей звичайно спостерігається один із трьох результатів: одна підгрупа мишей (25-35%) виліковується (не спостерігається рецидиву пухлини після одного року спостереження) і виробляє довгострокову стійкість до вихідної пухлини (Agrawal et al., 2004). В іншій підгрупі (65-75%) спостерігається повна клінічна відповідь, але в них відбувається рецидив з повторним ростом первинної пухлини. Нарешті, у підгрупі, що залишилася (від 0 до 20% залежно від експерименту), пухлина піддається руйнуванню, але розвивається істотна клінічна токсичність через 2-5 днів після початку терапії. Відносно прості заходи, такі як гідратація, є адекватними для зниження цієї токсичності, часто повністю усуваючи її ознаки. Дослідження, проведені на більш великих тваринах (кроликах), демонструють ті ж ступені лікування і рецидивів при лікуванні *C. novyi* NT, але не виявляють загрозливу життєво клінічну токсичність, що спостерігається в підгрупі мишей. Смерть, пов'язана з лікуванням, спостерігалася в мишей-пухлиноносіїв, але не в кроликів, яких лікували спорами *C. novyi* NT (Diaz et al., 2005). У цих дослідженнях токсичність була пов'язана як з дозою спор, так і з розміром пухлини. У померлих мишей не було відзначено ніяких конкретних клініко-лабораторних або патологічних уражень органів-мішеней і єдиною значущою ознакою була гепатоспленомегалія. Виліковані миші мали рідкісні залишкові запальні зміни в печінці і селезінці, але в інших відношеннях не відрізнялися від тварин без лікування. Ці дослідження показують, що токсичність у тварин-пухлиноносіїв може бути вираженою (смерть) у мишей з великими пухлинами, але була мінімальною в більш великих тварин (кроликів), і керованою в мишей за допомогою гідратації або антибіотиків.

Попередня робота з використанням спор *C. novyi* NT, що вводяться внутрішньовенно (1×10^9 спор/м²), як єдиного агента в собак-пухлиноносіїв, не виявила загрозливої життєво токсичності. Собак підтримували на інфузійній терапії (2-4 мл/кг/година) протягом декількох днів після лікування, що може зменшити токсичність. На жаль, не було ніяких вимірних відповідей пухлин на лікування.

При застосуванні в даному описі «колонієутворювальні одиниці» («КУО») позначають життєздатні форми бактерій, які створюють сукупності клітин (або колонії). Такі життєздатні форми включають вегетативні і спорові форми, і в даний винахід включаються обидві форми, використовувані окремо або в сполученні. Аналізи колонієутворювальних одиниць відомі в даній галузі техніки. Дивися, наприклад, Breed et al., 1916. Середовища для підтримання росту *C. novyi* комерційно доступні, наприклад, посилене клостридіальне середовище (RCM) від Difco (BD, Franklin Lakes, NJ). Як викладено вище, одиниця дози включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 , наприклад, приблизно 1×10^3 - 1×10^4 , приблизно 1×10^4 - 1×10^5 , приблизно 1×10^5 - 1×10^6 або приблизно 1×10^6 - 1×10^7 КУО *C. novyi*.

В одному аспекті цього варіанта здійснення одиниця дози включає приблизно 1×10^6 - 1×10^7 КУО *C. novyi*. В іншому аспекті цього варіанта здійснення одиниця дози включає приблизно 1×10^4 КУО *C. novyi*. Дивовижно, що дози, описані в даному документі, для лікування людини раптом виявилися нижче, ніж можна було б очікувати при простій екстраполяції використовуваних винахідниками моделей, що не є гризунами, при використанні 1/6 від найвищих доз без важкої токсичності не в гризунів (HNSTD), як це характерно для вихідної терапевтичної дози за онкологічними показниками. Дивися, наприклад, Senderowicz, A.M., "Information needed to conduct first-in human oncology trials in the United States: a view from a former FDA medical reviewer." Clin. Cane. Res., 2010, 16:1719-25.

Переважно, у даному винаході *C. novyi* являє собою *C. novyi* NT.

В іншому аспекті цього варіанта здійснення одиниця дози включає приблизно 1×10^6 - 1×10^7 спор *C. novyi* NT. У ще одному аспекті цього варіанта здійснення одиниця дози включає приблизно 1×10^4 спор *C. novyi* NT.

У додатковому аспекті цього варіанта здійснення стадія введення включає ін'єкцію одиниці дози в єдине місце в пухлині. В іншому аспекті цього варіанта здійснення стадія введення включає ін'єкцію одиниці дози в множинні індивідуальні місця, наприклад, у 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше 10 унікальних місць у пухлині. Переважно, стадія введення включає ін'єкцію одиниці дози в 1-5 індивідуальних місць у пухлині, наприклад, у розташуванні, показаному на фігурі 13. В іншому переважному варіанті здійснення стадія введення включає ін'єкцію одиниці дози в 5 або більше індивідуальних місць у пухлині. Ін'єкції в множинні місця можуть здійснюватися, як описано в даному документі, переважно за допомогою багатозубої голки, такої як Quadra-Fuse® (Rex-Medical, Conshohocken, PA). У даному винаході стадія введення, як відзначалося вище, включає ін'єкції безпосередньо в пухлину, але також розглядаються й інші

способи введення активного агента, такого як С. повуї або С. повуї NT, у пухлину. Такі методи включають імплантацію, черезшкірну доставку і доставку через слизову оболонку.

В іншому аспекті цього варіанта здійснення спосіб додатково включає введення людині з множиною циклів лікування, наприклад, з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 або більше 30 циклами, причому кожен цикл лікування включає ін'єкцію однієї одиниці дози КУО С. повуї, наприклад, однієї одиниці дози спор С. повуї NT у солідну пухлину. Переважно, введення здійснюють протягом 1-10 циклів лікування. Більш переважно, введення здійснюють протягом 2-4 циклів лікування. Інтервал між кожним циклом лікування може варіюватися. В одному переважному варіанті здійснення інтервал між кожним циклом лікування складає приблизно 5-100 днів. В іншому переважному варіанті здійснення інтервал між кожним циклом лікування складає приблизно 7 днів.

У додатковому аспекті цього варіанта здійснення спосіб додатково включає внутрішньовенне (в./в.) введення рідини людині до, під час і/або після кожного введення КУО С. повуї, таких як спори С. повуї NT. В./в. рідини для гідратації хворих розкриті в даному документі і добре відомі в даній галузі техніки. Такі рідини можуть являти собою рідини, що ізотонічні крові, такі як, наприклад, 0,9% розчин хлориду натрію або розчин Рингера з лактатом.

В іншому аспекті цього варіанта здійснення спосіб додатково включає проведення людині першого курсу антибіотиків протягом періоду часу й у дозуванні, що є ефективними для лікування або полегшення несприятливого побічного ефекту, викликаного КУО С. повуї, такими як спори С. повуї NT. У даному винаході несприятлива побічна дія (або несприятлива подія, використовувана взаємозамінно з несприятливим побічним ефектом) може включати, але не обмежується цим, інфекції (такі як викликувані відкритими ранами), блювання, кров'янисте випорожнення і лихоманку.

В одному переважному варіанті здійснення антибіотики вводять протягом двох тижнів після введення С. повуї. Необмежуючі приклади таких антибіотиків включають амоксицилін, клавуланат, метронідазол і їх сполучення.

В іншому переважному варіанті здійснення спосіб додатково включає проведення людині другого курсу антибіотиків протягом періоду часу й у дозуванні, що є ефективними для лікування або полегшення несприятливого побічного ефекту, викликаного С. повуї. Другий курс антибіотиків може бути початий після завершення першого курсу антибіотиків і здійснюватися протягом 1-6 місяців, наприклад, протягом 3-х місяців. Переважно, антибіотик, використовуваний у другому курсі, являє собою доксициклін, але може бути використаний будь-який антибіотик, схвалений професійним лікарем.

У ще одному аспекті цього варіанта здійснення спосіб додатково включає використання протоколу супутнього лікування за допомогою, наприклад, одержання людиною терапевтичного засобу, вибраного з групи, що складається з хіміотерапії, променевої терапії, імунотерапії і їхнього сполучення.

С. повуї, наприклад, спори С. повуї NT, і протираковий агент(и), використовуваний(и) у терапії при супутньому лікуванні, можна вводити людині або одночасно, або в різні моменти часу, що лікар вважатиме найбільш доцільним. Якщо С. повуї, наприклад, спори С. повуї NT, і інший протираковий агент(и) вводять у різні моменти часу, наприклад, шляхом послідовного введення, то С. повуї, наприклад, спори С. повуї NT, можна вводити людині перед іншим протираковим агентом. Як альтернатива, інший протираковий агент(и) може бути введений людині до С. повуї, наприклад, спор С. повуї NT.

При застосуванні в даному документі «хіміотерапія» позначає будь-який терапевтичний режим, що є сумісним з С. повуї, наприклад, С. повуї NT, з лікуванням за даним винаходом і при якому використовуються цитотоксичні і/або цитостатичні агенти проти ракових клітин або клітин, що зв'язані з раковими клітинами або підтримують їх. У переважному варіанті здійснення хіміотерапія включає введення людині агента, вибраного з групи, що складається з антиметаболіту, інгібітору мікротрубочок, агента, що ушкоджує ДНК, антибіотика, агента проти ангиогенезу, агента, що руйнує судини, молекулярно спрямованого агента і їхніх сполучень.

При застосуванні в даному описі «антиметаболіт» являє собою речовину, що знижує або інгібує використання клітинами хімічної речовини, що є частиною нормального обміну речовин. Необмежуючі приклади антиметаболітних агентів або їхніх аналогів відповідно до даного винаходу включають антифолати, інгібітори пуринів, інгібітори піримідинів і їх сполучення.

При застосуванні в даному описі «антифолат» являє собою речовину, що змінює, зменшує або інгібує використання фолієвої кислоти (вітамін В9) клітинами. Необмежуючі приклади антифолатів включають метотрексат (Duramed Pharmaceuticals, Inc.), пеметрексед (Eli Lilly), пралатрексат (Srectrum Pharmaceuticals), аміноптерин (Sigma Aldrich), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

Використовуваний у даному документі термін «пурин» являє собою сполуку, що містить конденсовані шестичленне і п'ятичленне азотовмісні кільця. Необмежуючі приклади пуринів, що важливі для клітинного метаболізму, включають аденін, гуанін, гіпоксантин і ксантин. «Інгібітор пуринів» являє собою речовину, що змінює, зменшує або пригнічує утворення пурину або використання пурину клітиною. Необмежуючі приклади інгібіторів пуринів включають метотрексат (Duramed Pharmaceuticals, Inc.), пеметрексед (Eli Lilly), гідроксисечовину (Bristol-Myers Squibb), 2-меркаптопурин (Sigma-Aldrich), 6-меркаптопурин (Sigma-Aldrich), флударабін (Ben Venue Laboratories), клофарабін (Genzyme Corp.) неларабін (GlaxoSmithKline), пралатрексат (Spectrum Pharmaceuticals), 6-тіогуанін (Gate Pharmaceuticals), фородезин (BioCryst Pharmaceuticals), пентостатин (Bedford Laboratories), сапацитабін (Cyclacel Pharmaceuticals, Inc.), аміноптерин (Sigma Aldrich), азатіоприн (GlaxoSmithKline), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

При застосуванні в даному документі «піримідин» являє собою сполуку, що містить шестичленне азотовмісне кільце. Необмежуючі приклади піримідинів, що важливі для клітинного метаболізму, включають урацил, тимін, цитозин і оротову кислоту. «Інгібітор піримідинів» являє собою речовину, що змінює, зменшує або пригнічує утворення піримідину або використання піримідину клітиною. Необмежуючі приклади інгібіторів піримідинів включають 5-фторурацил (Tocris Bioscience), тегафур (LGM Pharma), капецитабін (Xeloda) (Roche), кладрибін (LGM Pharma), гемцитабін (Eli Lilly), цитарабін (Bedford Laboratories), децитабін (Eisai Inc.), флоксуридин (Bedford Laboratories), 5-азацитидин (Pharmion Pharmaceuticals), доксифлуридин (Cayman Chemicals), тіарабін (Access Pharmaceuticals), троксацитабін (SGX Pharmaceuticals), ралтитрексед (AstraZeneca), кармофур (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), 6-азаурацил (MP Biomedicals, LLC), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

У переважному аспекті даного винаходу антиметаболітний агент вибраний із групи, що складається з 5-фторурацилу (Tocris Bioscience), тегафуру (LGM Pharma), капецитабіну (Xeloda) (Roche), кладрибіну (LGM Pharma), метотрексату (Duramed Pharmaceuticals, Inc.), пеметрекседу (Eli Lilly), гідроксисечовини (Bristol-Myers Squibb), 2-меркаптопурину (Sigma-Aldrich), 6-меркаптопурину (Sigma-Aldrich), флударабіну (Ben Venue Laboratories), гемцитабіну (Eli Lilly), клофарабіну (Genzyme Corp.), цитарабіну (Bedford Laboratories), децитабіну (Eisai Inc.), флоксуридину (Bedford Laboratories), неларабіну (GlaxoSmithKline), пралатрексату (Spectrum Pharmaceuticals), 6-тіогуаніну (Gate Pharmaceuticals), 5-азацитидину (Pharmion Pharmaceuticals), доксифлуридину (Cayman chemicals), фородезину (BioCryst Pharmaceuticals), пентостатину (Bedford Laboratories), сапацитабіну (Cyclacel Pharmaceuticals, Inc.), тіарабіну (Access Pharmaceuticals), троксацитабіну (SGX Pharmaceuticals), ралтитрекседу (AstraZeneca), аміноптерину (Sigma Aldrich), кармофуру (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), азатіоприну (GlaxoSmithKline), 6-азаурацилу (MP Biomedicals, LLC), їхніх фармацевтично прийнятних солей і їхніх сполучень.

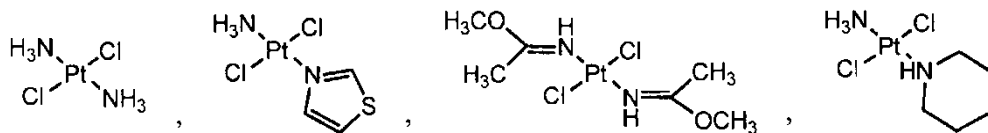
Використовуваний у даному документі термін «інгібітор мікротрубочок» являє собою речовину, що порушує функціонування мікротрубочки, наприклад, полімеризацію або деполімеризацію окремих одиниць мікротрубочок. В одному аспекті даного винаходу інгібітор мікротрубочок може бути вибраний із групи, що складається з агента, який дестабілізує мікротрубочки, агента, що стабілізує мікротрубочки, і їхніх сполучень. Інгібітор мікротрубочок за даним винаходом може бути також вибраний із групи, що складається з таксану, алкалоїду барвінку, епотилону і їхніх сполучень. Необмежуючі приклади інгібіторів мікротрубочок відповідно до даного винаходу включають BT-062 (Biotest), HMN-214 (D. Western Therapeutics), ерибуліну мезилат (Eisai), віндезин (Eli Lilly), EC-1069 (Endocyte), EC-1456 (Endocyte), EC-531 (Endocyte), вінтафолід (Endocyte), 2-метоксіестрадіол (EntreMed), GTx-230 (GTx), трастузумаб-емтансин (Hoffman-La Roche), кролібулін (Immune Pharmaceuticals), кон'югати D1302A-майтансиноїду (ImmunoGen), IMG-529 (ImmunoGen), лорвотузумаб-мертанзин (ImmunoGen), SAR-3419 (ImmunoGen), SAR-566658 (ImmunoGen), IMP-03138 (Impact Therapeutics), сполучення топотекану/вінкристину (LipoCure), BPH-8 (Molecular Discovery Systems), фосбретабуліну трометамін (OXiGENE), естрамустину фосфат натрію (Pfizer), вінкрисин (Pierre Fabre), вінфлуїн (Pierre Fabre), вінорелбін (Pierre Fabre), RX-21101 (Rexahn), кабазитаксел (Sanofi), STA-9584 (Synta Pharmaceuticals), вінбластин, епотилон А, патупілон (Novartis), іксабенілон (Bristol-Myers Squibb), епотилон D (Kosan Biosciences), паклітаксел (Bristol-Myers Squibb), доцетаксел (Sanofi-Aventis), HAI абраксан, DJ-927 (Daiichi Sankyo), дискодермолід (CAS No: 127943-53-7), елеутеробін (CAS No.: 174545-76-7), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

Агенти, що ушкоджують ДНК, за даним винаходом включають, але не обмежуються цим, алкілюючі агенти, агенти на основі платини, інтеркалюючі агенти й інгібітори реплікації ДНК.

При застосуванні в даному описі термін «алкілюючий агент» являє собою речовину, що додає одну або більше алкільних груп (C_nH_m , де n і m являють собою цілі числа) до нуклеїнової кислоти. У даному винаході алкілюючий агент вибраний із групи, що складається з азотистих іпритів, похідних нітрозосечовини, алкілсульфонатів, триазинів, етиленімінів і їхніх сполучень.

- 5 Необмежуючі приклади азотистих іпритів включають мехлоретамін (Lundbeck), хлорамбуцил (GlaxoSmithKline), циклофосфамід (Mead Johnson Co.), бендамустин (Astellas), іфосфамід (Baxter International), мелфалан (Ligand), мелфалану флуфенамід (Oncopeptides) і їхні фармацевтично прийнятні солі. Необмежуючі приклади похідних нітрозосечовини включають стрептозоцин (Teva), кармустин (Eisai), ломустин (Sanofi) і їхні фармацевтично прийнятні солі.
- 10 Необмежуючі приклади алкілсульфонатів включають бусульфан (Jazz Pharmaceuticals) і його фармацевтично прийнятні солі. Необмежуючі приклади триазинів включають дакарбазин (Bayer), темозоломід (Cancer Research Technology) і їхні фармацевтично прийнятні солі. Необмежуючі приклади етиленімінів включають тіотепу (Bedford Laboratories), алтретамін (MGI Pharma) і їхні фармацевтично прийнятні солі.
- 15 (Access), AC-225 BC-8 (Actinium Pharmaceuticals), ALF-2111 (Alfact Innovation), трофосфамід (Baxter International), MDX-1203 (Bristol-Myers Squibb), тіоуреїдобутиронітрил (CellCeutix), мітобронітол (Chinoin), мітолактол (Chinoin), німустин (Daiichi Sankyo), глүфосфамід (Eleison Pharmaceuticals), сполучення HuMax-TAC і PBD ADC (Genmab), BP-C1 (Meabco), треосульфат (Medac), ніфуртимокс (Metronomx), імпросульфату тозилат (Mitsubishi Tanabe Pharma), ранімустин (Mitsubishi Tanabe Pharma), ND-01 (NanoCarrier), HH-1 (Nordic Nanovector), сполучення клітин 22P1G і іфосфаміду (Nuvilex), естрамустину фосфат (Pfizer), преднімустин (Pfizer), лурбінектедин (PharmaMar), трабектедин (PharmaMar), алтретамін (Sanofi), SGN-CD33A (Seattle Genetics), фотемустин (Servier), недаплатин (Shionogi), гептаплатин (Sk Holdings), апазіхон (Spectrum Pharmaceuticals), CG-2000 (Spirogen), TLK-58747 (Telik), ларомустин (Vion Pharmaceuticals), прокарбазин (Alkem Laboratories Ltd.) і їхні фармацевтично прийнятні солі.

- Використовуваний у даному документі термін «агент на основі платини» являє собою протиракову речовину, яка містить металеву платину, і аналоги таких речовин. Платина може знаходитися в будь-якому стані окислювання. Агенти на основі платини за даним винаходом включають, але не обмежуються цим, похідні 1,2-діаміноциклогексану (DACH), комплекси фенантроїмідазолу Pt (II), сполуки платини IV, бі- і три-ядерні сполуки платини, деметилкантаридин-інтегровані комплекси платини, сполуки, кон'юговані з платиною, наночастинки і полімерні міцели цисплатину, стерично утруднені комплекси платини, оксалиплатин (Debiopharm), сатраплатин (Johnson Matthey), BBR3464 (Novuspharma S.p.A.), ZD0473 (Astra Zeneca), цисплатин (Nippon Kayaku), JM-11 (Johnson Matthey), PAD (цис-дихлорбісциклопентиламін платини (II)), MBA ((транс-1,2-діаміноциклогексан)бісбромацетато платини (II)), PHM ((1,2-циклогександіамін)малонато платини (II)), SHP ((1,2-циклогександіамін)сульфато платини (II)), нео-PHM ((транс-R,R-1,2-циклогександіамін)малонато платини (II)), нео-SHP ((транс-R,R-1,2-циклогександіамін)сульфато платини (II)), JM-82 (Johnson Matthey), PYP ((1,2-циклогександіамін)біспіруватато платини (II)), PHIC ((1,2-циклогександіамін)ізоцитратато платини (II)), TRK-710 ((транс-R,R-1,2-циклогександіамін)[3-ацетил-5-метил-2,4(3H,5H)-фурандіонато] платини (II)), BOP ((1,2-циклооктандіамін)бісбромацетато платини (II)), JM-40 (Johnson Matthey), енлоплатин (UnionPharma), зеніплатин (LGM Pharma), CI-973 (Parke-Davis), лобаплатин (Zentaris AG/Hainan Tianwang International Pharmaceutical), циклоплатам (LGM Pharma), WA2114R (мібоплатин/лобаплатин) (Chembest Research Laboratories, Ltd.) гептаплатин (SKI2053R) (SK Chemicals), TNO-6 (спіроплатин) (Haihang Industry Co., Ltd.), ормаплатин (тетраплатин) (LGM Pharma), JM-9 (іпроплатин) (Johnson Matthey), BBR3610 (Novuspharma S.p.A.), BBR3005 (Novuspharma S.p.A.), BBR3571 (Novuspharma S.p.A.), BBR3537 (Novuspharma S.p.A.), ароплатин (L-NDDP) (BOC Sciences), Pt-ACRAMTU (([Pt(en) Cl(ACRAMTU-S)](NO₃)₂ (en = етан-1, 2-діамін, ACRAMTU = 1-[2-(-акридин-9-іл)етил]-1,3-диметилтіосечовина))), навантажені цисплатином ліпосоми (LiPlasomes), SPI-077 (Alza), ліпоплатин (Regulon), ліпоксал (Regulon), карбоплатин (Johnson Matthey), недаплатин (Shionogi Seiyaku), міриплатину гідрат (Dainippon Sumitomo Pharma), ормаплатин (LGM Pharma), енлоплатин (Lederle Laboratories), CI973 (Parke-Davis), ПЕГильований цисплатин, ПЕГильований карбоплатин, ПЕГильований оксалиплатин, трансплатин (транс-діамінодихлорплатина (II); змішаний Z:транс-[PtCl₂{Z-HN=C(OMe)Me}(NH₃)]), CD-37 (гібридна молекула естрадіол-платина (II)), пікоплатин (Poniard Pharmaceuticals),



АН44 (Komeda et al., 2006; Harris et al., 2005; Qu et al., 2004), триплатин NC (Harris et al., 2005; Qu et al., 2004), ProLindac (Access), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

При застосуванні в даному описі термін «інтеркалюючий агент» включає, але не обмежується цим, доксорубіцин (адріаміцин), даунорубіцин, ідарубіцин, мітоксантрон, їхні фармацевтично прийнятні солі, проліки і їхні сполучення.

Необмежуючі приклади інгібіторів реплікації ДНК включають, але не обмежуються цим, інгібітори топоізомерази. Використовуваний у даному документі термін «інгібітор топоізомерази» являє собою речовину, що зменшує експресію або активність топоізомерази. Інгібітори топоізомерази відповідно до даного винаходу можуть інгібувати топоізомеразу I, топоізомеразу II або як топоізомеразу I, так і топоізомеразу II. Необмежуючі приклади інгібіторів топоізомерази I згідно із даним винаходом включають іринотекан (Alchemia), APH-0804 (Aphios), камптотекін (Aphios), козитекан (BioNumerik), топотекан (GlaxoSmithKline), белотекану гідрохлорид (Chon Kun Dang), фіртекан пегол (Enzon), HN-30181A (Hanmi), hRS7-SN-38 (Immunonnedics), лабетузумаб-SN-38 (Immunonnedics), етиринотекан пегол (Nektar Therapeutics), NK-012 (Nippon Kayaku), SER-203 (Serina Therapeutics), проліки симітекану гідрохлорид (Shanghai HaiHe Pharmaceuticals), гіматекан (Sigma-Tau), намітекан (Sigma-Tau), SN-38 (Supratek Pharnna), TCX-388 гідрохлорид (Taiwan Liposome Company), ламеларин D (PharmaMar), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення. Необмежуючі приклади інгібіторів топоізомерази типу II відповідно до даного винаходу включають ADVA-27a (Advanomics), зоптарелін доксорубіцин (Aeterna Zentaris), вальрубіцин (Anthra Pharmaceuticals), разоксан (AstraZeneca), доксорубіцин (Avena Therapeutics), амсакрін (Bristol-Myers Squibb), етопозиду фосфат (Bristol-Myers Squibb), етопозид (Novartis), дексразоксан (Cancer Research Technology), сполучення цитарабіну/даунорубіцину (Celator Pharmaceuticals), CAP7.1 (CellAct Pharma), альдоксорубіцин (CytRx), амрубіцину гідрохлорид (Dainippon Sumitomo Pharma), возароксин (Dainippon Sumitomo Pharma), даунорубіцин (Gilead Sciences), сполучення мілатузумабу/доксорубіцину (Immunomedics), акларубіцин (Kyowa Hakko Kirin), мітоксантрон (Meda), пірарубіцин (Meji), епірубіцин (Pfizer), теніпозид (Novartis), F-14512 (Pierre Fabre), еліптинію ацетат (Sanofi), зорубіцин (Sanofi), дексразоксан (ToroTarget), собузоксан (Zenyaku Kogyo), ідарубіцин (Pfizer), HU-331 (Cayman Chemical), ауринтрикарбонова кислота (Sigma Aldrich), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

Хіміотерапевтичні антибіотики відповідно до даного винаходу включають, але не обмежуються цим, актиноміцин, антрацикліни, валрубіцин, епірубіцин, блеоміцин, плікаміцин, мітоміцин, їхні фармацевтично прийнятні солі, проліки і їхні сполучення.

При застосуванні в даному документі термін «агент проти ангіогенезу» позначає будь-яку сполуку, що запобігає або затримує новоутворення кровоносних судин з існуючих судин. У даному винаході приклади агентів проти ангіогенезу включають, але не обмежуються цим, пегаптаніб, ранібізумаб, бевацизумаб (авастин), карбоксіамідотриазол, TNP-470, CM101, IFN- α , IL-12, тромбоцитарний фактор 4, сурамін, SU5416, тромбоспондин, антагоністи VEGFR, ангіостатичні стероїди і гепарини, фактор, який інгібує ангіогенез, що походить з хряща, інгібітори металопротеїназ матриксу, ангіостатин, ендостатин, 2-метоксіестрадіол, текогалан, пролактин, α , β ₃ інгібітори, ліномід, пастку VEGF, аміностероли, кортизон, інгібітори тирозинкінази, антиангіогенну міРНК, інгібітори системи комплементу, агенти, що руйнують судини, і їх сполучення. Переважно, агент проти ангіогенезу являє собою бевацизумаб.

Антагоністи VEGFR за даним винаходом включають, але не обмежуються цим, пазопаніб, регорафеніб, ленватиніб, сорафеніб, сунітиніб, акситиніб, вандетаніб, кабозантиніб, ваталаніб, семаксаніб, ZD6474, SU6668, AG-013736, AZD2171, AEE788, MF1/MC-18F1, DC101/IMC-1311, рамуцирумаб і мотезаніб. Антагоністи VEGFR можуть також включати інгібітори VEGF, такі як бевацизумаб, афліберцепт, 2C3, r84, пастку VEGF і ранібізумаб.

Ангіостатичні стероїди за даним винаходом включають будь-який стероїд, що інгібує, ослаблює, запобігає ангіогенезу або неоваскуляризації або викликає регресію патологічної васкуляризації. Ангіостатичні стероїди згідно із даним винаходом включають стероїди, що розкриті в Європейській заявці на патент із серійним No. EP1236471 A2, а також ті 20-заміщені стероїди, які розкриті в патенті США із серійним No. 4599331, ті 21-гідрокси-стероїди, що розкриті в патенті США із серійним No. 4771042, ті C₁₁-функціоналізовані стероїди, що описані в міжнародній заявці WO 1987/02672, 6 α -фтор-17 α ,21-дигідрокси-16 α -метилпрегна-4,9(11)-дієн-

3,20-діону 21-ацетат, 6 α -фтор-17 α ,21-дигідрокси-16 β -метилпрегна-4,9(11)-дієн-3,20-діон, 6 α -фтор-17 α ,21-дигідрокси-16 β -метилпрегна-4,9(11)-дієн-3,20-діон-21-фосфонокси і їхні фармацевтично прийнятні солі, гідрокортисон, тетрагідрокортисол, 17 α -гідроксипрогестерон, 11 α -епігідрокортисон, кортексолон, кортикостерон, дезоксикортикостерон, дексаметазон, кортизону 21-ацетат, гідрокортизону 21-фосфат, 17 α -гідрокси-6 α -метилпрегна-4-ен-3,20-діону 17-ацетат, 6 α -фтор-17 α ,21-дигідрокси-16 α -метилпрегна-4,9(11)-дієн-3,20-діон і Δ 9(11)-етіанові складні ефіри, усі вони розкриті в міжнародній заявці із серійним No. WO 1990/015816 A1.

Фактори, які інгібують ангиогенез, отримані з хряща, включають, але не обмежуються цим, пептид тропонін і хондромодулін I.

Інгібітори металопротеїнази матриксу за даним винаходом включають, але не обмежуються цим, сукцинілгідроксамати, такі як маримастат і SC903, сульфонамідгідроксамати, такі як CGS27023A, фосфінамідгідроксамати, карбоксилатні інгібітори, такі як BAY12-9566, тіолові інгібітори, такі як сполука B, аналоги амінометилбензімідазолу, пептиди, такі як регасепін і тетрацикліни, такі як міноциклін.

$\alpha_v\beta_3$ інгібітори включають, але не обмежуються цим, IS20I, пептид P11, EMD 85189 і 66203, пептид RGD, міметики RGD, такі як S 36578-2, ехістатин, антитіла або фрагменти антитіл проти інтегрину $\alpha_v\beta_3$, такі як вітаксин, що спрямовані на позаклітинний домен димеру, цилентид і пептидоміметики, такі як S247.

Антиангіогенні міРНК включають, але не обмежуються цим, міРНК, спрямовані на мРНК, що позитивно регулюються під час ангиогенезу, необов'язково ПЕГільовані міРНК, спрямовані на мРНК VEGF або VEGFR, і міРНК, спрямовані на UPR (чутливий елемент неукладеного білка)-IRE1 α , XBP-1 і мРНК ATF6. Крім того, показано, що міРНК, що мають як мінімум 21 нуклеотид у довжину, незалежно від спрямованості послідовності, пригнічують неоваскуляризацію (Kleinman et al., 2008) і можуть бути включені в антиангіогенні міРНК за даним винаходом.

Інгібітори системи комплементу, включають, але не обмежуються цим, модифіковані природні компоненти комплементу, такі як розчинний рецептор типу 1 комплементу, розчинний рецептор типу 1 комплементу, позбавлений довгого гомологічного повтору-A, розчинний рецептор типу 1-сіаліл Lewis^x, комплементу, рецептор типу 2 комплементу, розчинний фактор, що прискорює розпад, розчинний білковий кофактор мембрани, розчинний CD59, гібрид розчинного фактора, що прискорює розпад, і CD59, гібрид мембранного білкового кофактора і розчинного фактора, що прискорює розпад, інгібітор C1 і рецептор C1q, антитіла, які інгібують комплемент, такі як моноклональне антитіло проти C5 і одноланцюжковий Fv проти C5, синтетичні інгібітори активації комплементу, такі як антагоністичні пептиди й аналоги, спрямовані на рецептор C5a, і природні сполуки, що блокують активацію комплементу, такі як гепарин і споріднені глікозаміногліканові сполуки. Додаткові інгібітори системи комплементу розкриті Makrides (Makrides, 1998).

При застосуванні в даному описі термін «агент, що руйнує судини» означає будь-яку сполуку, що спрямована на існуючу судинну мережу, наприклад, судинну мережу пухлини, ушкоджує або руйнує зазначену судинну мережу і/або викликає некроз центральної маси пухлини. У даному винаході приклади агентів, що руйнують судини, включають, але не обмежуються цим, ABT-751 (Abbott), AVE8062 (Aventis), BCN105 (Bionomics), BMXAA (Antisoma), CA-4-P (Oxigene), CA-1-P (Oxigene), CYT997 (Cytobia), MPC-6827 (Myriad Pharmaceuticals), MN-029 (MediciNova), NPI-2358 (Nereus), Oxi4503 (Oxigene), TZT-1027 (Daichi Pharmaceuticals), ZD6126 (AstraZeneca і Angiogene), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

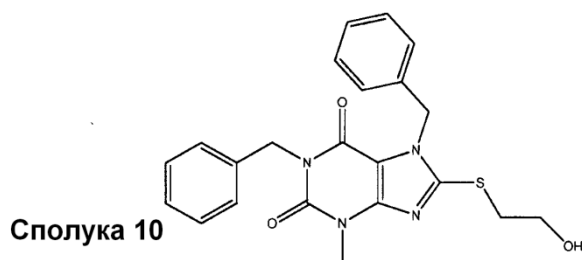
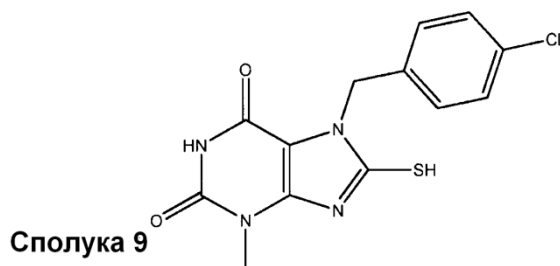
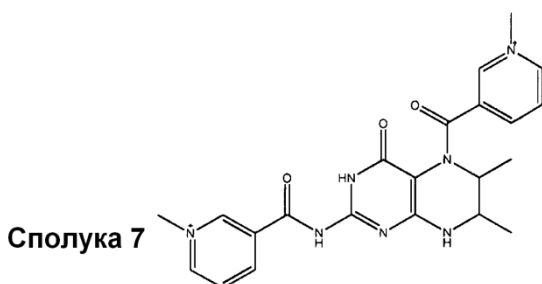
Використовуваний у даному документі термін «молекулярно спрямовуваний агент» являє собою речовину, що втручається у функцію однієї молекули або групи молекул, переважно тих, які залучені в ріст і прогресію пухлини, при введенні індивідууму. Необмежуючі приклади молекулярно спрямовуваних агентів за даним винаходом включають інгібітори передачі сигналу, модулятори експресії генів і інших клітинних функцій, модулятори імунної системи, кон'югати антитіло-ліки (ADCs) і їх сполучення.

Використовуваний у даному документі термін «інгібітор передачі сигналу» являє собою речовину, що порушує передачу інформації між клітинами, наприклад, коли позаклітинна сигнальна молекула активує рецептор клітинної поверхні. Необмежуючі приклади інгібіторів передачі сигналу за даним винаходом включають інгібітори кінази анапластичної лімфоми (ALK), інгібітори B-Raf, інгібітори епідермального фактора росту (EGFRi), інгібітори ERK, інгібітори кінази Janus, інгібітори MEK, інгібітори мішені рапаміцину ссавців (mTor), інгібітори фосфоінозитид-3-кінази (PI3Ki) і інгібітори Ras.

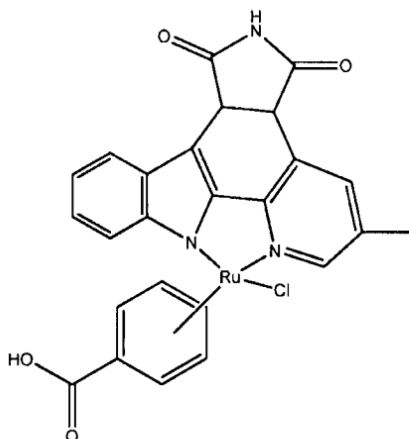
При застосуванні в даному документі «інгібітор кінази анапластичної лімфоми (ALK)» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з ALK, наприклад, шляхом зв'язування з ALK і (ii) зменшує експресію або активність ALK. Необмежуючі приклади інгібіторів кінази

анапластичної лімфоми (ALK) за даним винаходом включають кризотиніб (Pfizer, New York, NY), CH5424802 (Chugai Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), GSK1838705 (GlaxoSmithKline, United Kingdom), Chugai 13d (Chugai Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), CEP28122 (Teva Pharmaceutical Industries, Ltd., Israel), AP26113 (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, MA), цефалон 30 (Teva Pharmaceutical Industries, Ltd., Israel), X-396 (Xcovery, Inc. West Palm Beach, FL), Amgen 36 (Amgen Pharmaceuticals, Thousand Oaks, CA), ASP3026 (Astellas Pharma US, Inc., Northbrook, Illinois) і Amgen 49 (Amgen Pharmaceuticals, Thousand Oaks, CA), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

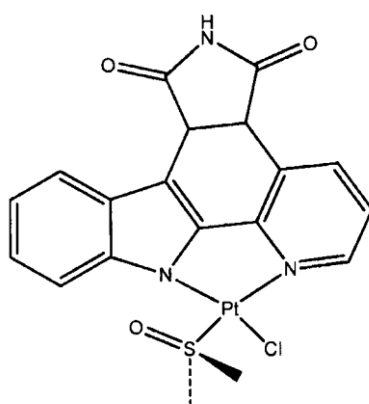
При застосуванні в даному документі «інгібітор B-Raf» за даним винаходом являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з B-Raf, наприклад, шляхом зв'язування з B-Raf і (ii) зменшує експресію або активність B-Raf. Інгібітори B-Raf можуть бути підрозділені на два типи за відповідним їм типом зв'язування. При застосуванні в даному документі інгібітори B-Raf «типу 1» являють собою такі інгібітори, що спрямовані на АТФ-зв'язувальні сайти кінази в її активній конформації. Інгібітори B-Raf «типу 2» являють собою такі інгібітори, що переважно зв'язуються з кіназою у неактивній конформації. Необмежуючі приклади інгібіторів B-Raf типу 1 за даним винаходом включають:



Сполука 13



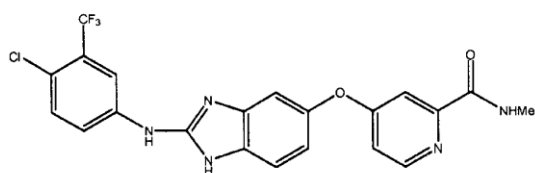
Сполука 14



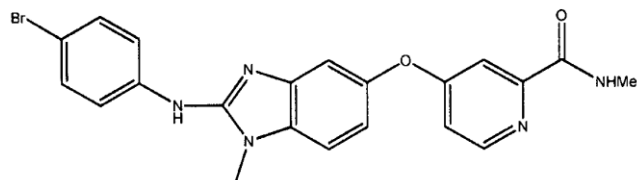
5 Сполука 14 (Id.), дабрафеніб (GlaxoSmithKline), GDC-0879 (Genentech), L-779450 B-Raf (Merck), PLX3202 (Plexxikon), PLX4720 (Plexxikon), CO-590885 (GlaxoSmithKline), CO-699393 (GlaxoSmithKline), вемурафеніб (Plexxikon), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення. Переважно, щоб інгібітор RAF типу 1 являв собою дабрафеніб або його фармацевтично прийнятну сіль.

Необмежуючі приклади інгібіторів B-Raf типу 2 за даним винаходом включають:

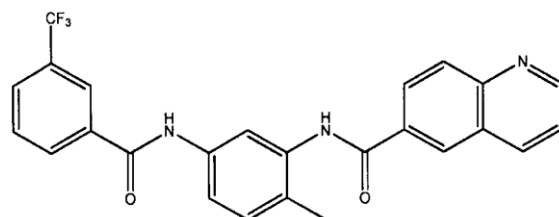
Сполука 15



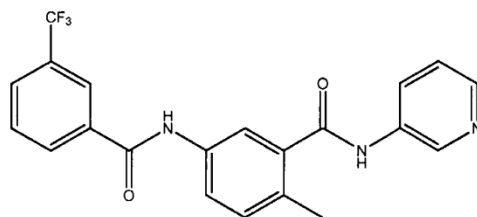
Сполука 16



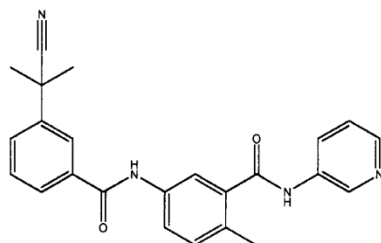
Сполука 18



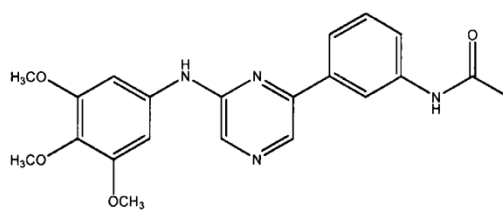
Сполука 19



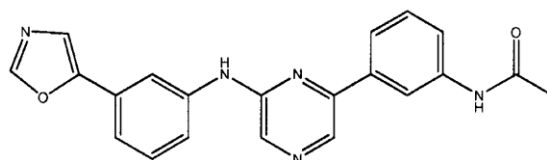
Сполука 20



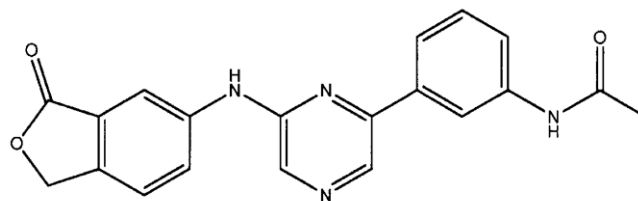
Сполука 21



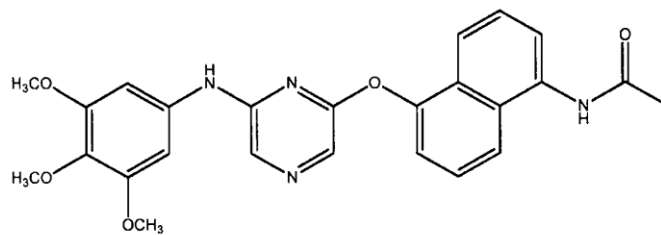
Сполука 22



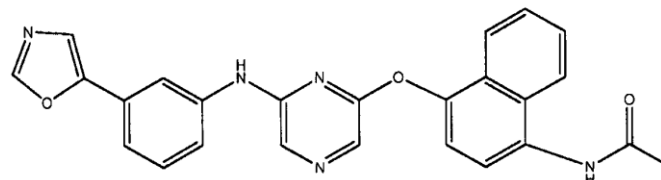
Сполука 23



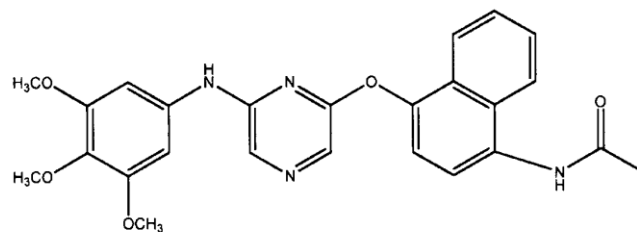
Сполука 24



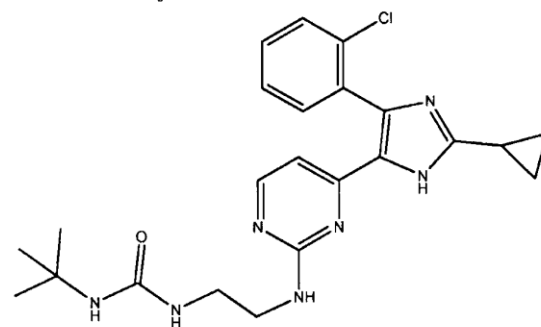
Сполука 25



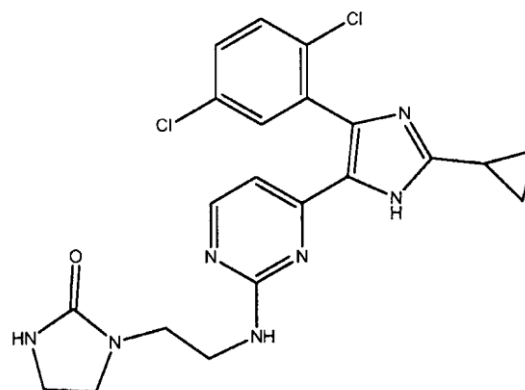
Сполука 26

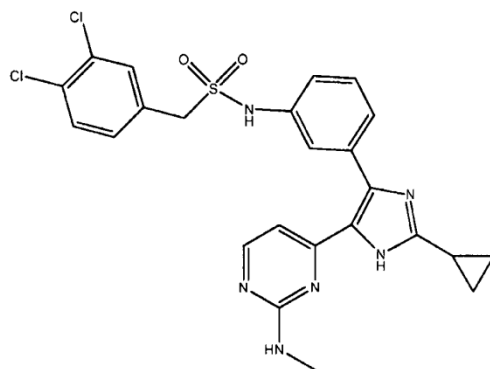


Сполука 27

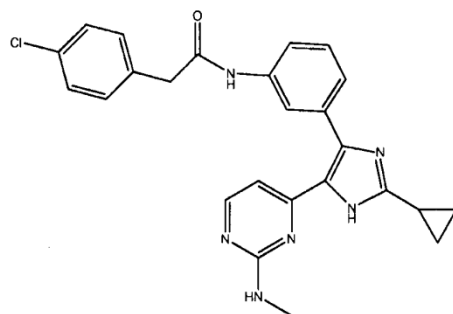


Сполука 28

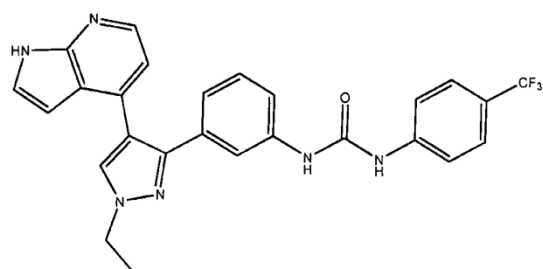




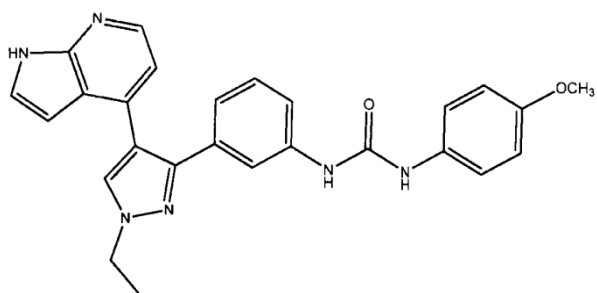
Сполука 30



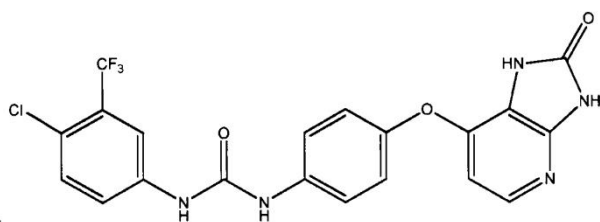
Сполука 31



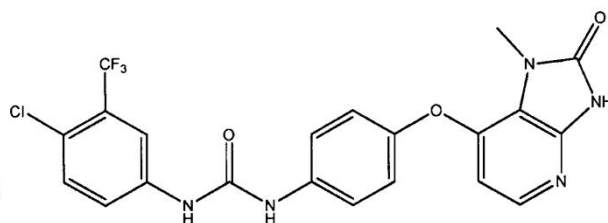
Сполука 32



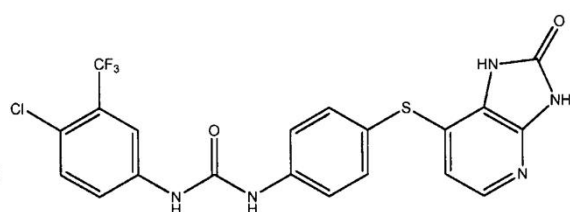
Сполука 33



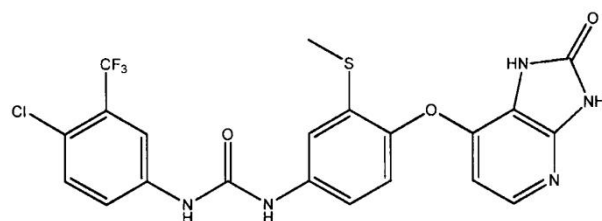
Сполука 34



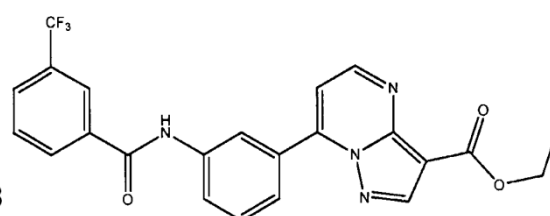
Сполука 35



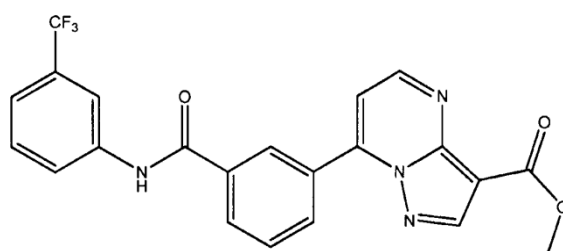
Сполука 36



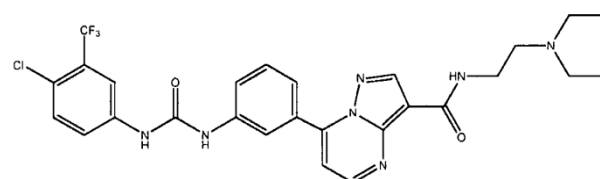
Сполука 37



Сполука 38



Сполука 39



Сполука 40

5 сорафеніб (Onyx Pharmaceuticals), 3M-336372 (AstraZeneca), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

Інші інгібітори B-Raf включають без обмеження AAL881 (Novartis); AB-024 (Ambit Biosciences), ARQ-736 (ArQule), ARQ-761 (ArQule), AZ628 (Axon Medchem BV), BeiGene-283 (BeiGene), BIIB-024 (MLN 2480) (Sunesis & Takeda), інгібітор b RAF (Sareum), інгібітор BRAF-кінази (Selexagen Therapeutics), міPHK BRAF 313 (tacaccagcaagctagatgca) і 253 (ccatctgtagagtcttctctg) (Liu et al., 2007), CTT239065 (Institute of Cancer Research), DP-4978 (Deciphera Pharmaceuticals), HM-95573 (Hanmi), GW 5074 (Sigma Aldrich), ISIS 5132 (Novartis), LEraFAON (NeoPharm, Inc.) LBT613 (Novartis), LGX 818 (Novartis), пазопаніб (GlaxoSmithKline), PLX5568 (Plexxikon), RAF-265 (Novartis), RAF-365 (Novartis), перопафеніб (Bayer Pharmaceuticals Healthcare, Inc.), RO 5126766 (Hoffmann-La Roche), TAK 632 (Takeda), TL-241 (Teligene), XL-281 (Exelixis), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

При застосуванні в даному документі «інгібітор EGFR» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з EGFR, наприклад, шляхом зв'язування з EGFR, і (ii) зменшує експресію або активність EGFR. Необмежуючі приклади інгібіторів EGFR відповідно до даного винаходу включають (+)-аероплізинін-1 (CAS # 28656-91-9), 3-(4-ізопаропілбензиліденіл)-індолін-2-он, ABT-806 (Life Science Pharmaceuticals), AC-480 (Bristol-Myers Squibb), афатиніб (Boehringer Ingelheim), AG 1478 (CAS # 153436-53-4), AG 494 (CAS # 133550-35-3), AG 555 (CAS # 133550-34-2), AG 556 (CAS # 133550-41-1), AG 825 (CAS # 149092-50-2), AG-490 (CAS # 134036-52-5), антрохінонол (Golden Biotechnology), AP-26113 (Ariad), ARRY334543 (CAS # 845272-21-1), AST 1306 (CAS # 897383-62-9), AVL-301 (Celgene), AZD8931 (CAS # 848942-61-0), BIBU 1361 (CAS # 793726-84-8), BIBX 1382 (CAS # 196612-93-8), BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb), BPIQ-I (CAS # 174709-30-9), канертиніб (Pfizer), цетуксимаб (Actavis), ципатиніб (Jiangsu Hengrui Medicine), CL-387785 (Santa Cruz Biotech), сполука 56 (CAS # 171745-13-4), CTX-023 (Cytom Therapeutics), CUDC-101 (Curis), дакомітиніб (Pfizer), DAPH (CAS # 145915-58-8), дафнетин (Santa Cruz Biotech), довітинібу лактат (Novartis), інгібітор EGFR (CAS # 879127-07-8), епітиніб (Hutchison China MediTech), аналог ербстатину (CAS # 63177-57-1), ерлотиніб (Astellas), гефітиніб (AstraZeneca), GT-MAB 5,2 GEX (Glycotope), GW 583340 (CAS # 388082-81-3), GW2974 (CAS # 202272-68-2), HDS 029 (CAS # 881001-19-0), гіперіцин (Santa Cruz Biotech), ікотинібу гідрохлорид (Betapharma), JNJ-26483327 (Johnson & Johnson), JNJ-28871063 (Johnson & Johnson), KD-020 (Kadmon Pharmaceuticals), лапатинібу дитозилат (GlaxoSmithKline), лавендустин А (Sigma), лавендустин С (Sigma), LY-3016859 (Eli Lilly), MEHD-7945A (Hoffman-La Roche), MM-151 (Merrimack), MT-062 (Medisyn Technologies), нецитумумаб (Eli Lilly), нератиніб (Pfizer), німотузумаб (Center of Molecular Immunology), NT-004 (NewGen Therapeutics), пантіумумаб (Amgen), PD 153035 (CAS # 153436-54-5), PD 161570 (CAS # 192705-80-9), PD 168393, PD 174265 (CAS # 216163-53-0), піротиніб (Sihuan Pharmaceuticals), позіотиніб (Hanmi), PP 3 (CAS # 5334-30-5), PR-610 (Proacta), піротиніб (Jiangsu Hengrui Medicine), RG-13022 (CAS # 136831-48-6), риндопептимут (Celldex Therapeutics), RPI-1 (CAS # 269730-03-2), S-222611 (Shionogi), TAK 285 (CAS # 871026-44-7), TAS-2913 (Taiho), теліатиніб (Hutchison China MediTech), тирфостин 47 (RG-50864, AG-213) (CAS # 1 18409-60-2), тирфостин 51 (CAS # 122520-90-5), тирфостин AG 1478 (CAS # 175178-82-2), тирфостин AG 183 (CAS # 126433-07-6), тирфостин AG 528 (CAS # 133550-49-9), тирфостин AG 99 (CAS # 18409-59-9 1), тирфостин B42 (Santa Cruz Biotech), тирфостин B44 (Santa Cruz Biotech), тирфостин RG 14620 (CAS # 136831-49-7), вандетаніб (AstraZeneca), варлїтиніб (Array BioPharma), ваталаніб (Novartis), WZ 3146 (CAS # 1214265-56-1), WZ 4002 (CAS # 1213269-23-8), WZ8040 (CAS # 1214265-57-2), XL-647 (Exelixis), Z-650 (HEC Pharm), ZM 323881 (CAS # 324077-30-7), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення. Переважно інгібітор EGFR вибраний із групи, що складається з панітумумабу, ерлотинібу, їхніх фармацевтично прийнятних солей і їхніх сполучень.

При застосуванні в даному описі «інгібітор ERK» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з ERK, включаючи ERK1 і ERK2, наприклад, шляхом зв'язування з ERK, і (ii) зменшує експресію або активність протеїнкінази ERK. Таким чином, інгібітори, що діють вище ERK, такі як інгібітори MEK і інгібітори RAF, не є інгібіторами ERK відповідно до даного винаходу. Необмежуючі приклади інгібіторів ERK за даним винаходом включають AEZS-131 (Aeterna Zentaris), AEZS-136 (Aeterna Zentaris), SCH-722984 (Merck & Co.) SCH-772984 (Merck & Co.), SCH-900353 (MK-8353) (Merck & Co.), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

Використовуваний у даному документі термін «інгібітор кінази Janus» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з кіназою Janus, наприклад, шляхом зв'язування з кіназою Janus, і (ii) зменшує експресію або активність кінази Janus. Кінази Janus за даним винаходом включають Tyk2, Jak1, Jak2 і Jak3. Необмежуючі приклади інгібіторів кінази Janus за даним винаходом включають руксолїтиніб (Incyte Corporation, Wilmington, DE), барицитиніб (Incyte Corporation, Wilmington, DE), тофацитиніб (Pfizer, New York, NY), VX-509 (Vertex Pharmaceuticals,

Inc., Boston, MA), GLPG0634 (Galapagos NV, Belgium), CEP-33779 (Teva Pharmaceuticals, Israel), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

Використовуваний у даному документі термін «інгібітор MEK» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з MEK, наприклад, шляхом зв'язування з MEK, і (ii) зменшує експресію або активність MEK. Таким чином, інгібітори, що діють вище MEK, такі як інгібітори RAS і інгібітори RAF, не є інгібіторами MEK згідно із даним винаходом. Інгібітори MEK можуть бути підрозділені на два типи залежно від того, чи конкурує інгібітор з АТФ. При застосуванні в даному документі інгібітор MEK «типу 1» являє собою інгібітор, що конкурує з АТФ за зв'язування з MEK. Інгібітор MEK «типу 2» являє собою інгібітор, що не конкурує з АТФ за зв'язування з MEK. Необмежуючі приклади інгібіторів MEK типу 1 відповідно до даного винаходу включають бентамапімод (Merck KGa), L783277 (Merck), RO092210 (Roche), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення. Переважно, інгібітор MEK типу 1 являє собою RO092210 (Roche) або його фармацевтично прийнятну сіль. Необмежуючі приклади інгібіторів MEK типу 2 відповідно до даного винаходу включають токсин сибірської виразки, частину летального фактора токсину сибірської виразки, Arry-142886 (6-(4-бром-2-хлор-феніламіно)-7-фтор-3-метил-3Н-бензоімідазол-5-карбонової кислоти (2-гідроксіетоксі)амід) (Array BioPharma), ARRY-438162 (Array BioPharma), AS-1940477 (Astellas), MEK162 (Array BioPharma), PD 098059 (2-(2'-аміно-3'-метоксифеніл)-оксанафтаден-4-он), PD 184352 (CI-1040), PD-0325901 (Pfizer), пімасертиб (Santhera Pharmaceuticals), рефаметиніб (AstraZeneca), целуметиніб (AZD6244) (AstraZeneca), TAK-733 (Takeda), траметиніб (Japan Tobacco), U0126 (1,4-діаміно-2,3-диціано-1,4-біс(2-амінофенілтіо)бутадієн) (Sigma), RDEA119 (Ardea Biosciences/Bayer), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення. Переважно, інгібітор MEK типу 2 являє собою траметиніб або його фармацевтично прийнятну сіль. Інші інгібітори MEK включають без обмеження антрохінонол (Golden BioTechnology), AS-1940477 (Astellas), AS-703988 (Merck KGa), BI-847325 (Boehringer Ingelheim), E-6201 (Eisai), GDC-0623 (Hoffmann-La Roche), GDC-0973, RG422, RO4987655, RO5126766, SL327, WX-554 (Wilex), поліпептид YopJ, їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

При застосуванні в даному описі «інгібітор mTOR» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з mTOR, наприклад, шляхом зв'язування з mTOR, і (ii) зменшує експресію або активність mTOR. Необмежуючі приклади інгібіторів mTOR відповідно до даного винаходу включають зотаролімус (Abbvie), уміролімус (Biosensors), темсиролімус (Pfizer), сиролімус (Pfizer), сиролімус NanoCrystal (Elan Pharmaceutical Technologies), сиролімус TransDerm (TransDerm), сиролімус-PNP (Samyang), еверолімус (Novartis), біолімус A9 (Biosensors), ридафоролімус (Ariad), рапаміцин, TCD-10023 (Terumo), DE-109 (MacuSight), MC-R001 (MacuSight), MS-R002 (MacuSight), MS-R003 (MacuSight), персейву (MacuSight), XL-765 (Exelixis), хінакрин (Cleveland BioLabs), PKI-587 (Pfizer), PF-04691502 (Pfizer), GDC-0980 (Genentech and Piramed), дактолісін (Novartis), CC-223 (Celgene), PWT-33597 (Pathway Therapeutics), P-7170 (Piramal Life Sciences), LY-3023414 (Eli Lilly), INK-128 (Takeda), GDC-0084 (Genentech), DS-7423 (Daiichi Sankyo), DS-3078 (Daiichi Sankyo), CC-115 (Celgene), CBLC-137 (Cleveland BioLabs), AZD-2014 (AstraZeneca), X-480 (Xcovery), X-414 (Xcovery), EC-0371 (Endocyte), VS-5584 (Verastem), PQR-401 (Piquor), PQR-316 (Piquor), PQR-311 (Piquor), PQR-309 (Piquor), PF-06465603 (Pfizer), NV-128 (Novogen), nPT-MTOR (Biotica Technology), BC-210 (Biotica Technology), WAY-600 (Biotica Technology), WYE-354 (Biotica Technology), WYE-687 (Biotica Technology), LOR-220 (Lorus Therapeutics), HMPL-518 (Hutchison China MediTech), GNE-317 (Genentech), EC-0565 (Endocyte), CC-214 (Celgene) і ABTL-0812 (Ability Pharmaceuticals).

Використовуваний у даному документі термін «інгібітор PI3K» являє собою речовину, що зменшує експресію або активність фосфатидилінозитол-3-кіназ (PI3Ks) або білків каскаду, що лежать нижче, таких як Akt. PI3Ks при активації фосфорилують групу 3'-ОН інозитольного кільця в інозитольних фосфоліпідах з одержанням вторинного посередника фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату (PI-3,4,5-P(3)). Akt взаємодіє з фосфоліпідом, що викликає її транслокацію на внутрішню мембрану, де вона фосфорилується й активується. Активована Akt модулює функцію численних субстратів, залучених у регуляцію виживання клітин, прогресію клітинного циклу і ріст клітин.

Необмежуючі приклади інгібіторів PI3K відповідно до даного винаходу включають A-674563 (CAS # 552325-73-2), AGL 2263, AMG-319 (Amgen, Thousand Oaks, CA), AS-041164 (5-бензо[1,3]діоксол-5-ілметилєн-тіазолідин-2,4-діон), AS-604850 (5-(2,2-дифтор-бензо[1,3]діоксол-5-ілметилєн)тіазолідин-2,4-діон), AS-605240 (5-хіноксилін-6-метилєн-1,3-тіазолідин-2,4-діон), AT7867 (CAS # 857531-00-1), серії бензімідазолів, Genentech (Roche Holdings Inc., South San Francisco, CA), BML-257 (CAS # 32387-96-5), CAL-120 (Gilead Sciences, Foster City, CA), CAL-129 (Gilead Sciences), CAL-130 (Gilead Sciences), CAL-253 (Gilead Sciences), CAL-263 (Gilead

Sciences), CAS # 612847-09-3, CAS # 681281-88-9, CAS # 75747-14-7, CAS # 925681-41-0, CAS # 98510-80-6, CCT128930 (CAS # 885499-61-6), CH5132799 (CAS # 1007207-67-1), CHR-4432 (Chroma therapeutics, Ltd., Abingdon, UK), FPA 124 (CAS # 902779-59-3), GS-1101 (CAL-101) (Gilead Sciences), GSK 690693 (CAS # 937174-76-0), H-89 (CAS # 127243-85-0), хонокіол, 5 IC87114 (Gilead Science) IPI-145 (Intellikine Inc.), KAR-4139 (Karus Therapeutics, Chilworth, UK), KAR-4141 (Karus Therapeutics), KIN-1 (Karus Therapeutics), KT 5720 (CAS # 108068-98-0), мілтефозин, МК-2206 дигідрохлорид (CAS # 1032350-13-2), ML-9 (CAS # 105637-50-1), нальтриндолу гідрохлорид, OXY-111A (NormOxys Inc., Brighton, MA), перифозин, PHT-427 (CAS # 1 1191951-57-1), інгібітор PI3-кінази дельта, Merck KGa (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ), 10 інгібітори PI3-кінази дельта, Genentech (Roche Holdings Inc.), інгібітори PI3-кінази дельта, Incozen (Incozen Therapeutics, Pvt. Ltd., Hyderabad, India), інгібітори-2 PI3-кінази дельта, Incozen (Incozen Therapeutics), інгібітор PI3-кінази, Roche-4 (Roche Holdings Inc.), інгібітори PI3-кінази, Roche (Roche Holdings Inc.), інгібітори PI3-кінази, Roche-5 (Roche Holdings Inc.), інгібітори PI3-кінази альфа/дельта, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd., South San Francisco, CA), 15 інгібітори PI3-кінази дельта, Cellzome (Cellzome AG, Heidelberg, Germany), інгібітори PI3-кінази дельта, Intellikine (Intellikine Inc., La Jolla, CA), інгібітори PI3-кінази дельта, Pathway Therapeutics-1 (Pathway Therapeutics Ltd.), інгібітори PI3-кінази дельта, Pathway Therapeutics-2 (Pathway Therapeutics Ltd.), інгібітори PI3-кінази дельта/гамма, Cellzome (Cellzome AG), інгібітори PI3-кінази дельта/гамма, Cellzome (Cellzome AG), інгібітори PI3-кінази дельта/гамма, Intellikine (Intellikine Inc.), інгібітори PI3-кінази дельта/гамма, Intellikine (Intellikine Inc.), інгібітори PI3-кінази дельта/гамма, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), інгібітори PI3-кінази дельта/гамма, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), інгібітор PI3-кінази гамма, Evotec (Evotec), інгібітор PI3-кінази гамма, Cellzome (Cellzome AG), інгібітори PI3-кінази гамма, Pathway Therapeutics (Pathway Therapeutics Ltd.), інгібітори PI3K дельта/гамма, Intellikine-1 (Intellikine Inc.), інгібітори PI3K дельта/гамма, Intellikine-1 (Intellikine Inc.), піктилісіб (GDC-0941) (Roche Holdings Inc.), PIK-90 (CAS # 677338-12-4), SC-103980 (Pfizer, New York, NY), SF-1126 (Semafore Pharmaceuticals, Indianapolis, IN), SH-5, SH-6, тетрагідрокуркумін, TG100-115 (Targegen Inc., San Diego, CA), трицирибін, X-339 (Xcovery, West Palm Beach, FL), XL-499 (Evotec, Hamburg, Germany), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення. Переважно 30 інгібітор шляху PI3K/Akt являє собою піктилісіб (GDC-0941) або його фармацевтично прийнятну сіль.

Використовуваний у даному документі термін «інгібітор RAS» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з RAS, наприклад, шляхом зв'язування з RAS, і (ii) зменшує експресію або активність RAS. Необмежуючі приклади інгібіторів RAS відповідно до даного винаходу 35 включають інгібітори фарнезилтрансферази (такі як, наприклад, типіфарніб і лонафарніб), невеликі молекули, що містять фарнезилні групи (такі як, наприклад, салірасиб і TLN-4601), DCAI, як описано Maurer (Maurer et al., 2012), Kobe0065 і Kobe2602, як описано Shima (Shima, et al., 2013), і HBS 3 (Patgiri, et al., 2011) і AIK-4 (Allinky), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

40 При застосуванні в даному документі термін «експресія гена» являє собою процес, за допомогою якого інформація з ДНК використовується для утворення поліпептиду. «Модулятор експресії генів і інших клітинних функцій» являє собою речовину, що впливає на експресію генів і іншу активність клітини. Необмежуючі приклади таких модуляторів включають гормони, інгібітори гістондеацетилази (HDACi) і інгібітори циклінзалежної кінази (CDKi), і інгібітори 45 полі(АДФ-рибоза)полімерази (PARP).

У даному винаході термін «гормон» являє собою речовину, секретовану клітинами в одній частині тіла, що впливає на клітини в іншій частині тіла. Необмежуючі приклади гормонів відповідно до даного винаходу включають простагландини, лейкотриєни, простациклін, тромбоксан, амілін, антимюлерів гормон, адипонектин, адренкортикотропний гормон, 50 ангіотензиноген, ангіотензин, вазопресин, атриопептид, мозковий натрійуретичний пептид, кальцитонін, холецистокінін, кортикотропін-релізінг гормон, енцефалін, ендотелін, еритропоетин, фолікулоstimулюючий гормон, галанін, гастрин, грелін, глюкагон, гонадотропін-релізінг-гормон, релізінг-гормон гормону росту, хоріонічний гонадотропін людини, плацентарний лактоген людини, гормон росту, інгібін, інсулін, соматомедин, лептин, ліпотропін, 55 лютеїнізуєчий гормон, меланоцитстимулюючий гормон, мотилін, орексин, окситоцин, панкреатичний поліпептид, паратиреоїдний гормон, пролактин, пролактин-релізінг гормон, релаксин, ренін, секретин, соматостатин, тромбопоетин, тиреотропний гормон, тестостерон, дегідроепіандростерон, андростендіон, дегідротестостерон, альдостерон, естрадіол, естрон, естріол, кортизол, прогестерон, кальцитриол і кальцидіол.

Деякі сполуки впливають на активність визначених гормонів або зупиняють продукцію визначених гормонів. Необмежуючі приклади сполук, що впливають на гормони, відповідно до даного винаходу включають тамоксифен (Nolvadex®), анастрозол (Arimidex®), летрозол (Femara®) і фулвестрант (Faslodex®). Такі сполуки також включаються в позначення гормон за даним винаходом.

При застосуванні в даному описі «інгібітор HDAC» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з HDAC, наприклад, шляхом зв'язування з HDAC, і (ii) зменшує експресію або активність HDAC. Необмежуючі приклади інгібіторів HDAC відповідно до даного винаходу, включають 4SC-201 (4SC AG) 4SC-202 (Takeda), абексिनостат (Celera), AN-1 (Titan Pharmaceuticals, Inc.), апіцидин (Merck & Co., Inc.) AP-42 (Arno Therapeutics), ARQ-700RP (ArQule), авуган (ToroTarget AC), азелаїнова кислота-1-гідроксамат-9-анілід (AANA), беліностат (ToroTarget), бутират (Enzo Life Sciences, Inc.), CG-1255 (Errant Gene Therapeutics, LLC), CG-1521 (Errant Gene Therapeutics, LLC), CG-200745 (CrystalGenomics, Inc.), хідамід (Shanzhen Chipscreen Biosciences), CHR-3996 (Chroma Therapeutics), CRA-024781 (Pharmacocyclics), CS-3158 (Shanzhen Chipscreen Biosciences), CU-903 (Curis), DAC-60 (Genextra), ентиностат (Bayer), складний ефір гіалуронової кислоти і масляної кислоти (HA-But), IKH-02 (IkerChem), IKH-35 (IkerChem), ITF-2357 (Italfarmaco), ITF-A (Italfarmaco), JNJ-16241199 (Johnson & Johnson), KA-001 (Karus Therapeutics), KAR-3000 (Karus Therapeutics), KD-5150 (Kalypsys), KD-5170 (Kalypsys), KLYP-278 (Kalypsys), KLYP-298 (Kalypsys), KLYP-319 (Kalypsys), KLYP-722 (Kalypsys), біс-гідроксамід м-карбоксицинамової кислоти (CBHA), MG-2856 (MethylGene), MG-3290 (MethylGene), MG-4230 (MethylGene), MG-4915 (MethylGene), MG-5026 (MethylGene), MGCD-0103 (MethylGene Inc.) мосетиностат (MethylGene), MS-27-275 (Schering AG), NBM-HD-1 (NatureWise), NVP-LAQ824 (Novartis), OCID-4681-S-01 (Orchid Pharmaceuticals), оксамфлатин ((2E)-5-[3-[(фенілсульфоніл)амінофеніл]пент-2-ен-4-іногідроксамова кислота), панобіностат (Novartis), PCI-34051 (Pharmacocyclics), фенілбутират (Enzo Life Sciences, Inc.), півалоїлоксиметилбутират (AH-9, Titan Pharmaceuticals, Inc.), піванекс (Titan Pharmaceuticals, Inc.), праціностат (SBIO), PX-117794 (ToroTarget AC), PXD-118490 (LEO-80140) (ToroTarget AC), піроксамід (субероїл-3-амінопіридинамід гідроксамової кислоти), резміностат (Takeda), RG-2833 (Repligen), риколіностат (Acetylon), ромідепсин (Astellas), CO-1304 (SBIO), SB-1354 (SBIO), SB-623 (Merrion Research I Limited), SB-624 (Merrion Research I Limited), SB-639 (Merrion Research I Limited), SB-939 (SBIO), скриптаїд (N-гідрокси-1,3-діоксо-1H-бенз[де]ізохінолін-2(3H)-гексанамід), SK-7041 (In2Gen/SK Chemical Co.), SK-7068 (In2Gen/SK Chemical Co.), субероїланілід гідроксамової кислоти (SAHA), сульфонамід гідроксамової кислоти, трибутирин (Sigma Aldrich), трихостатин А (TSA) (Sigma Aldrich), вальпроеву кислоту (VPA) (Sigma Aldrich), воріностат (Zolinza), WF-27082B (Fujisawa Pharmaceutical Company, Ltd.), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення. Переважно інгібітор HDAC являє собою ромідепсин, його фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

При застосуванні в даному документі, «CDK» являє собою сімейство протеїнкіназ, що регулюють клітинний цикл. Відомі CDKs включають cdk1, cdk2, cdk3, cdk4, cdk5, cdk6, cdk7, cdk8, cdk9, cdk10 і cdk11. «Інгібітор CDK» являє собою речовину, що (i) безпосередньо взаємодіє з CDK, наприклад, шляхом зв'язування з CDK, і (ii) зменшує експресію або активність CDK. Необмежуючі приклади інгібіторів CDK відповідно до даного винаходу включають 2-гідроксибогемін, 3-АТА, 5-йод-індирубін-3'-моноксим, 9-ціанопаулон, алоїсин А, алстерпаулон 2-ціаноетил, алвоцидиб (Sanofi), AM-5992 (Amgen), амінопурваланол А, арцириафлавін А, AT-7519 (Astex Pharmaceuticals), AZD 5438 (CAS # 602306-29-6), BMS-265246 (CAS # 582315-72-8), BS-181 (CAS # 1092443-52-1), бутиролактон I (CAS # 87414-49-1), інгібітор Cdk/Crk (CAS # 784211-09-2), інгібітор Cdk1/5 (CAS # 40254-90-8), інгібітор II Cdk2 (CAS # 222035-13-4), інгібітор IV Cdk2, NU6140 (CAS # 444723-13-1), інгібітор Cdk4 (CAS # 546102-60-7), інгібітор III Cdk4 (CAS # 265312-55-8), інгібітор IV Cdk4/6 (CAS # 359886-84-3), інгібітор II Cdk9 (CAS # 140651-18-9), CGP 74514A, CR8, CYC-065 (Cyclacel), динацисліб (Ligand), (R)-DRF053 дигідрохлорид (CAS # 1056016-06-8), фаскаплізін, флавопіридол, гіролідін, індирубін, Lee-011 (Astex Pharmaceuticals), LY-2835219 (Eli Lilly), мілциклібу малеат (Nerviano Medical Sciences), MM-D37K (Maxwell Biotech), N9-ізопропілоломоуцин, NSC 625987 (CAS # 141992-47-4), NU2058 (CAS # 161058-83-9), NU6102 (CAS # 444722-95-6), оломоуцин, ON-108600 (Onconova), ON-123300 (Onconova), оксиндол I, P-1446-05 (Piramal), P-276-00 (Piramal), палбоцикліб (Pfizer), PHA-767491 (CAS # 845714-00-3), PHA-793887 (CAS # 718630-59-2), PHA-848125 (CAS # 802539-81-7), пурваланол А, пурваланол В, R547 (CAS # 741713-40-6), RO-3306 (CAS # 872573-93-8), росковітин, SB-1317 (SBIO), SCH 900776 (CAS # 891494-63-6), SEL-120 (Selvita), селіцикліб (Cyclacel), SNS-032 (CAS # 345627-80-7), SU9516 (CAS # 377090-84-1), WHI-P180 (CAS # 211555-08-7), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення. Переважно інгібітор CDK

вибраний із групи, що складається з динациклібу, палбоциклібу, їхніх фармацевтично прийнятних солей і їхніх сполучень.

Використовуваний у даному документі термін «інгібітор полі(АДФ-рибоза)полімерази (PARP)» являє собою речовину, що зменшує експресію або активність полі(АДФ-рибоза)полімераз (PARPs) або білків, що лежать нижче. Необмежуючі приклади інгібіторів полі(АДФ-рибоза)полімерази (PARP) за даним винаходом включають PF01367338 (Pfizer, New York, NY), олапариб (AstraZeneca, United Kingdom), ініпариб (Sanofi-Aventis, Paris, France), веліпариб (Abbott Laboratories, Abbot Park, IL), МК 4827 (Merck, White House Station, NJ), СЕР 9722 (Teva Pharmaceuticals, Israel), LT-673 (Biomarin, San Rafael, CA) і BSI 401 (Sanofi-Aventis, Paris, France), їхні фармацевтично прийнятні солі і їхні сполучення.

У переважному варіанті здійснення хіміотерапія включає введення людині агента, вибраного з групи, що складається з гемцитабіну, таксолу, адриаміцину, іфосфаміду, трабектедину, пазопанібу, абраксану, авастину, еверолімусу і їхніх сполучень.

При застосуванні в даному документі «променева терапія» позначає будь-який терапевтичний режим, що сумісний з С. novyi, наприклад, С. novyi NT, з лікуванням за даним винаходом і при якому індивідуума, наприклад, людину, опромінюють для лікування раку. Променева терапія може бути здійснена, наприклад, у людини за допомогою, наприклад, зовнішнього для організму апарата (дистанційна променева терапія) або радіоактивного матеріалу, введеного в організм (брахітерапія, системна променева терапія).

Дистанційна променева терапія включає, але не обмежується цим, 3-вимірну конформну променеву терапію, променеву терапію з модульованою інтенсивністю, променеву терапію, що керується візуалізацією, томотерапію, стереотаксичну радіохірургію, стереотаксичну променеву терапію організму, протонну терапію й іншу терапію за допомогою пучка заряджених частинок, таку як електронно-променева терапія. Дистанційна променева терапія широко використовуються при лікуванні раку і добре відома фахівцям у даній галузі техніки.

Брахітерапія позначає променеву терапію, що доставляється при імплантації в організм або при розміщенні на тілі індивідуума. Брахітерапія включає, але не обмежується цим, інтерстиціальну брахітерапію, внутрішньопорожнинну брахітерапію і епісклеральну брахітерапію. Методи брахітерапії також широко використовуються при лікуванні раку і добре відомі фахівцям у даній галузі техніки.

Системна променева терапія позначає променеву терапію, що доставляється шляхом ін'єкцій або шляхом прийому індивідуумом. Одним із прикладів системної променевої терапії є терапія радіоактивним йодом. Радіоактивний йод являє собою молекулу радіоактивного ізотопу йоду, що є безпечною й ефективною для використання в індивідуума, такого як, наприклад, людина. Необмежуючі приклади радіоактивного йоду відповідно до даного винаходу можуть бути вибрані з групи, що складається з ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I і їхнього сполучення. Переважно, радіоактивний йод являє собою ^{131}I .

При застосуванні в даному документі термін «імунотерапія» позначає будь-який протираковий терапевтичний режим, що є сумісним з С. novyi, наприклад, С. novyi NT, з лікуванням за даним винаходом і який використовує речовину, що змінює імунну відповідь, збільшуючи або зменшуючи здатність імунної системи продукувати антитіла або сенсibilізовані клітини, що розпізнають антиген, що ініціює їхню продукцію, і взаємодіють з ним. Імунотерапія може здійснюватися рекомбінантними, синтетичними або природними препаратами, включаючи цитокіни, кортикостероїди, цитотоксичні агенти, тимозин і імуноглобуліни. Деякі агенти імунотерапії природним чином присутні в організмі, а деякі з них є у фармакологічних препаратах. Приклади агентів імунотерапії включають, але не обмежуються цим, гранулоцит-колонієстимулюючий фактор (G-CSF), інтерферони, іміквімод і фракції клітинних мембран з бактерій, IL-2, IL-7, IL-12, CCL3, CCL26, CXCL7 і синтетичні цитозин фосфат-гуанозин (CpG).

В одному переважному варіанті здійснення імунотерапія включає введення людині інгібітору імунної контрольної точки. При застосуванні в даному описі «інгібітор імунної контрольної точки» позначає речовину, що блокує активність молекул, що беруть участь в ослабленні імунної відповіді. Такі молекули включають, наприклад, антиген 4, асоційований з цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTLA-4), і білок 1 програмованої загибелі клітин (PD-1). Інгібітори імунної контрольної точки за даним винаходом включають, але не обмежуються цим, іпілімумаб (Bristol-Myers Squibb), тремелімумаб (Pfizer), MDX-1106 (Medarex, Inc.), МК3475 (Merck), CT-011 (CureTech, Ltd), AMP-224 (Amplimmune), MDX-1105 (Medarex, Inc.), IMP321 (Immutep S.A.) і MGA271 (MacroGenics).

У додатковому аспекті цього варіанта здійснення терапія за даним винаходом за допомогою С. novyi, наприклад, С. novyi NT, є ефективною проти, наприклад, солідних пухлин, що стійкі до

терапії, вибраної з групи, що складається з хіміотерапії, променевої терапії, імунотерапії і їхнього сполучення.

В іншому аспекті цього варіанта здійснення солідна пухлина несприйнятлива до стандартної терапії або солідна пухлина не доступна для стандартної терапії, однак терапія С. повуї, наприклад, С. повуї НТ, за даним винаходом є ефективною проти такої пухлини.

При застосуванні в даному документі терміни «стійка» і «несприйнятлива» використовуються взаємозамінно. Така, що є «несприйнятною» до терапії, означає, що попередня терапія або варіанти терапії мала/мали низьку ефективність, наприклад, при лікуванні раку або знищенні ракових клітин, порівняно з тим же індивідумом до виникнення стійкості до терапії.

При застосуванні в даному документі, термін «стандартна терапія» позначає ті методи лікування, що загальноприйняті фахівцями в галузі медицини як придатні для лікування конкретного типу раку, переважно конкретної солідної пухлини. Стандартні методи лікування можуть бути однаковими або різними для різних типів пухлин. Стандартні методи лікування, як правило, затверджуються різними регулюючими структурами, такими як, наприклад, Управління з контролю за харчовими продуктами і медикаментами США.

В іншому аспекті цього варіанта здійснення спосіб викликає сильну локалізовану запальну відповідь і адаптивну імунну відповідь у людини.

При застосуванні в даному документі «запальна реакція» являє собою місцеву відповідь на ураження клітин, патогени або подразники, що може включати, але не обмежується цим, дилатацію капілярів, інфільтрацію лейкоцитами, набряк, почервоніння, жар, свербіж, біль, втрату функції і їх сполучень.

При застосуванні в даному описі «адаптивна імунна відповідь» залучає В- і Т-клітини імунної системи індивідума. Під впливом патогенної речовини, наприклад, ракової клітини, В-клітини можуть продукувати антитіла проти патогенних антигенів у патогенній речовині, а Т-клітини можуть набути здатність спрямовано діяти на патогени для їхнього можливого руйнування. Деякі популяції В- і Т-клітин, специфічні для даного антигену, зберігаються імунною системою і «прикликаються» у випадку наступного впливу патогенного антигену. Адаптивна імунна відповідь, таким чином, є стійкою і забезпечує імунну систему індивідума-хазяїна постійною можливістю пізнання і руйнування даного патогенного антигенпрезентуючого патогену.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб циторедукції солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині усередину пухлини одиниці дози КУО С. повуї, переважно С. повуї НТ, що містить приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або в розчині.

При застосуванні в даному документі «циторедукція» солідної пухлини означає зменшення розміру або кількості ракових клітин у солідній пухлині. Така процедура є паліативною і може бути використана для підвищення ефективності терапії, включаючи променеву терапію, хіміотерапію або ампутацію. У цьому варіанті здійснення солідні пухлини являють собою викладене вище. Переважно солідна пухлина вибрана з групи, що складається із саркоми м'яких тканин, гепатоцелюлярної карциноми, раку молочної залози, раку підшлункової залози і меланоми. Більш переважно солідна пухлина являє собою лейоміосаркому, таку як заочеревинна лейоміосаркома.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб циторедукції солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину протягом від одного до чотирьох циклів одиниці дози спор С. повуї НТ, що включає приблизно 1×10^4 спор на цикл, причому кожна одиниця дози С. повуї НТ суспендується у фармацевтично прийнятному носії або розчині. У цьому варіанті здійснення типи солідних пухлин являють собою викладене вище. Переважно солідна пухлина вибрана з групи, що складається із саркоми м'яких тканин, гепатоцелюлярної карциноми, раку молочної залози, раку підшлункової залози і меланоми.

Ще один варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині протягом від одного до чотирьох циклів одиниці дози спор С. повуї НТ, що включає приблизно 1×10^4 спор на цикл, причому кожна одиниця дози спор С. повуї НТ суспендується у фармацевтично прийнятному носії або розчині. Різні типи солідних пухлин являють собою викладене вище. Переважно солідна пухлина вибрана з групи, що складається із саркоми м'яких тканин, гепатоцелюлярної карциноми, раку молочної залози, раку підшлункової залози і меланоми.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб знищення солідної пухлини, що присутня у людини. Цей спосіб включає введення людині усередину пухлини одиниці дози КУО С. повуї, переважно С. повуї НТ, що містить приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у

фармацевтично прийнятному носії або розчині, де пухлина знищується, залишаючи краї нормальної тканини.

При застосуванні в даному документі «знищення» солідної пухлини означає, що при даному способі видалається вся солідна пухлина. У цьому способі після проведення лікування край нормальної тканини залишається навколо зони, де була пухлина. У цьому варіанті здійснення типи солідних пухлин являють собою викладене вище. Переважно солідна пухлина являє собою саркому. Більш переважно солідна пухлина являє собою лейоміосаркому, таку як заочеревинна лейоміосаркома.

У ще одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується одиниця дози КУО С. повуї. Ця одиниця дози включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО у фармацевтично прийнятному носії або в розчині, що є ефективними для лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що присутня у людини. Як викладено вище, КУО С. повуї можуть бути у вегетативній формі і формі спор.

В одному аспекті цього варіанта здійснення С. повуї являють собою С. повуї NT. Переважно одиниця дози включає приблизно 1×10^4 - 1×10^7 спор С. повуї NT, наприклад, приблизно 1×10^6 - 1×10^7 спор С. повуї NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині. Переважно одиниця дози включає приблизно 1×10^4 спор С. повуї NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині.

У додатковому варіанті здійснення даного винаходу пропонується набір для лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що присутня у людини. Цей набір включає одиницю дози КУО С. повуї, що включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО у фармацевтично прийнятному носії або розчині й інструкції із застосування набору. Набір може бути розділений на один або більше відсіків, і може мати один або більше контейнерів з різними реагентами. Набір може бути додатково адаптований для забезпечення зберігання і транспортування кожного компонента.

В одному аспекті цього варіанта здійснення винаходу набір додатково включає один або більше антибіотиків, що ефективні для лікування або полегшення несприятливого побічного ефекту, викликаного КУО С. повуї. КУО можуть бути у вегетативній формі і формі спор. Придатні антибіотики являють собою викладене вище. Переважно набір додатково включає 1-4 одиниці дози С. повуї для проведення 1-4 циклів лікування.

В іншому аспекті цього варіанта здійснення С. повуї являють собою С. повуї NT. Переважно одиниця дози включає приблизно 1×10^4 - 1×10^7 спор С. повуї NT, наприклад, приблизно 1×10^6 - 1×10^7 спор С. повуї NT або приблизно 1×10^4 спор С. повуї NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині. Також переважно, щоб набір додатково включав 1-4 одиниці дози спор С. повуї NT для проведення 1-4 циклів лікування.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб мікроскопічно точного видалення пухлинних клітин у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) С. повуї NT, що включає приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або розчині.

При застосуванні в даному документі «мікроскопічно точне видалення» позначає видалення тканини-мішені в індивідумі, наприклад, патогенної тканини, причому зазначене видалення є особливо специфічним на клітинному рівні для патогенної тканини, при цьому, не роблячи шкоди або викликаючи мінімальну шкоду в прилеглий «здоровій» тканині. Видалення тканини-мішені може являти собою, але не обмежується цим, апоптоз, некроз і лізис клітин. Цей варіант здійснення може бути досягнутий за допомогою точної доставки, наприклад, спор С. повуї NT за винаходом за допомогою введення в пухлину, що керується КТ, з використанням, наприклад, багатозубого пристрою доставки, такого як багатозуба голка.

У даному винаході спори С. повуї, такі як спори С. повуї NT, доставляються індивідуму, наприклад хворій людині, усередину пухлини за допомогою будь-якого терапевтично придатного способу. Наприклад, спори С. повуї NT можуть бути доставлені за допомогою єдиної голки, використовуваної в одному або більше місцях пухлини. Альтернативно, багатозубий носій для доставки, такий як багатозуба голка, може бути використаний для доставки, наприклад, спор С. повуї NT до пухлини. Доставка, наприклад, спор може здійснюватися на ту саму або різну глибину в одне або більше місць пухлини. Вибраними засобами доставки можна користатися вручну або контролювати за допомогою електронного керування. Носії для доставки можуть розташовуватися і/або переміщуватися на поверхні або усередині пухлини вручну або через пристрій з дистанційним керуванням, і зображення місця ін'єкції може бути збільшене за допомогою різних методів візуалізації, відомих у даній галузі техніки, таких як КТ. Багатозубі пристрої доставки, що можуть бути використані в даному винаході, включають пристрої, розкриті, наприклад, у McGuckin, Jr. et al., патентах США Nos. 6905480 і 7331947, що включені в даний документ як посилання.

Ще один варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що характеризується метастазами в одному або більше місць у людини. Цей спосіб включає введення людині в пухлину одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) $C. novyi$ NT, що включає щонайменше приблизно 1×10^3 - 1×10^7 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або розчині. Переважно щоб щонайменше одне місце метастазування знаходилося віддалено від вихідної солідної пухлини.

При застосуванні в даному документі «метастаз» і його граматичні варіанти позначає поширення патогенних клітин, тобто пухлинних клітин, з вихідної, первинної зони тіла, до вторинної зони тіла. Метастази можуть бути місцевими або віддаленими залежно від відстані від місця вихідної первинної пухлини. Чи є метастази місцевими або віддаленими, може бути визначено лікуючим лікарем. Наприклад, клітини раку молочної залози, що поширилися в мозок, являють собою віддалений метастаз, у той час як поширення клітин раку молочної залози в пахвові лімфатичні вузли є місцевим метастазом.

У даному винаході «ефективна кількість» або «терапевтично ефективна кількість» сполуки або композиції, розкритих у даному документі, являє собою кількість такої сполуки або композиції, що є достатньою для здійснення лікувальних або бажаних результатів при введенні індивідууму, як описано в даному документі. Ефективні одиниці лікарських форм, шляхи введення і величина дозування відповідають описаному в даному документі або модифікуються медичним працівником. Фахівцям у даній галузі техніки очевидно, що величина дозування буде варіюватися залежно від способу введення, швидкості виведення, тривалості лікування, ідентичності будь-яких інших ліків, що вводяться, віку і розмірів хворого і тому подібних факторів, добре відомих в галузі медицини. У цілому придатна доза композиції відповідно до винаходу буде являти собою таку кількість композиції, що є найменшою дозою, ефективною для одержання бажаного ефекту. Ефективна доза композиції за даним винаходом описана вище. Крім того, композицію за даним винаходом можна вводити в сполученні з іншими варіантами лікування.

Композиції за винаходом включають один або більше активних інгредієнтів у суміші з одним або більше фармацевтично прийнятними носіями і необов'язково з одним або більше іншими сполуками, ліками, інгредієнтами і/або речовинами. Незалежно від вибраного шляху введення агенти/сполуки за даним винаходом складають у вигляді фармацевтично прийнятних одиниць лікарських форм традиційними способами, відомими фахівцям у даній галузі техніки. Дивися, наприклад, Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21st Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.).

Фармацевтично прийнятні носії або розчини добре відомі в даній галузі техніки (дивися, наприклад, Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21st Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.) і Національному формулярі (American Pharmaceutical Association)) і включають цукри (наприклад, лактозу, сахарозу, маніт і сорбіт), крохмалі, препарати целюлози, фосфати кальцію (наприклад, дикальційфосфат, трикальційфосфат і вторинний кислий фосфат кальцію), цитрат натрію, воду, водні розчини (наприклад, фізіологічний розчин, хлорид натрію для ін'єкцій, розчин Рингера для ін'єкцій, розчин декстрози для ін'єкцій, розчин декстрози і хлориду натрію для ін'єкцій, розчин Рингера з лактатом для ін'єкцій), спирти (наприклад, етиловий спирт, пропіловий спирт і бензиловий спирт), багатоатомні спирти (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і поліетиленгліколь), органічні складні ефіри (наприклад, етилолеат і тригліцериди), біорозкладані полімери (наприклад, полілактид-полігліколід, полі(ортоєфіри) і полі(ангідриди)), еластомерні матрикси, ліпосоми, мікросфери, олії (наприклад, кукурудзяна олія, олія зародків пшениці, маслинова, касторова, кунжутна, бавовняна й арахісова олія), олія какао, віск (наприклад, віск для супозиторіїв), парафіни, силікони, тальк, силіцилат і т. д. Кожен фармацевтично прийнятний носій або розчин, використовуваний в одиниці дози відповідно до даного винаходу, повинен бути «прийнятним» у сенсі сумісності з іншими інгредієнтами складу і не шкідливим для індивідуума. Носії або розчини, придатні для вибраної одиниці лікарської форми і способу введення, наприклад, IT, добре відомі в даній галузі техніки, і прийнятні носії або розчини для вибраної одиниці лікарської форми і способу введення можуть бути визначені фахівцем у даній галузі техніки.

Одиниці дози за винаходом можуть необов'язково містити додаткові інгредієнти і/або речовини, звичайно використовувані у фармацевтичних композиціях. Ці інгредієнти і речовини добре відомі в даній галузі техніки і включають (1) наповнювачі або розріджувачі, такі як крохмалі, лактоза, сахароза, глюкоза, маніт і кремнієва кислота; (2) зв'язувальні речовини, такі як карбоксиметилцелюлоза, альгірати, желатин, полівінілпіролідон, гідроксипропілметилцелюлоза, сахароза і гуміарабік; (3) зволожувачі, такі як гліцерин; (4) дезінтегруючі агенти, такі як агар-агар, карбонат кальцію, картопляний крохмаль або крохмаль

тапіоки, альгінова кислота, деякі силікати, крохмальгліколят натрію, поперечно зшита натрієва сіль карбоксиметилцелюлози і карбонат натрію; (5) агенти, що сповільнюють розчинення, такі як парафін; (6) прискорювачі всмоктування, такі як четвертинні амонієві сполуки; (7) змочувальні агенти, такі як цетиловий спирт і моностеарат гліцерину; (8) абсорбенти, такі як каолін і
 5 бентонітова глина; (9) змашувальні агенти, такі як тальк, стеарат кальцію, стеарат магнію, тверді поліетиленгліколі і лаурилсульфат натрію; (10) суспендуючі агенти, такі як етоксировані ізостеарилові спирти, поліоксіетиленсорбіт і складні ефіри сорбіту, мікрористалічна целюлоза, метаксидоксид алюмінію, бентоніт, агар-агар і трагакант; (11) забуферувальні агенти; (12) наповнювачі, такі як лактоза, молочні цукри, поліетиленгліколі, тваринні і рослинні жири, олії,
 10 воски, парафіни, олія какао, крохмалі, трагакант, похідні целюлози, поліетиленгліколь, силікони, бентоніти, кремнієва кислота, тальк, саліцилат, оксид цинку, гідроксид алюмінію, силікати кальцію і поліамідний порошок; (13) інертні розріджувачі, такі як вода або інші розчинники; (14) консерванти; (15) поверхнево-активні речовини; (16) диспергуючі агенти; (17) агенти, що контролюють вивільнення, або агенти, що сповільнюють всмоктування, такі як
 15 гідроксипропілметилцелюлоза, інші полімерні матрикси, біорозкладані полімери, ліпосоми, мікросфери, моностеарат алюмінію, желатин і воски; (18) замулювачі; (19) ад'юванти; (20) змочувальні агенти; (21) емульгуючі і суспендуючі агенти; (22), солюбілізуєчі агенти і емульгатори, такі як етиловий спирт, ізопропіловий спирт, етилкарбонат, етилацетат, бензиловий спирт, бензилбензоат, пропіленгліколь, 1,3-бутиленгліколь, олії (зокрема,
 20 бавовняна, арахісова, кукурудзяна, зародків пшениці, маслинова, касторова і кунжутна олії), гліцерин, тетрагідрофуриловий спирт, поліетиленгліколі і складні ефіри жирних кислот і сорбітану; (23) пропеленти, такі як хлорфторвуглеводні і леткі незаміщені вуглеводні, такі як бутан і пропан; (24) антиоксиданти; (25) агенти, що надають складу ізотонічність із кров'ю передбачуваного реципієнта, такі як цукри і хлорид натрію; (26) загусники; (27) покривні агенти,
 25 такі як лецитин; і (28) підсолоджувачі, ароматизатори, барвники, віддушки і консерванти. Кожен такий інгредієнт або речовина повинен бути «прийнятним» у сенсі сумісності з іншими інгредієнтами складу і не шкідливим для індивідуума. Інгредієнти і речовини, придатні для вибраної одиниці лікарської форми і призначеного способу введення, добре відомі в даній галузі техніки, і прийнятні інгредієнти і речовини для вибраної одиниці лікарської форми і способу
 30 введення можуть бути визначені фахівцем у даній галузі техніки.

Рідкі одиниці лікарських форм включають фармацевтично прийнятні емульсії, мікроемульсії, розчини і суспензії. Рідкі одиниці лікарських форм можуть містити придатні інертні розріджувачі, звичайно використовувані в даній галузі техніки. Крім інертних розріджувачів пероральні композиції можуть також включати ад'юванти, такі як змочувальні агенти, емульгатори і
 35 суспендуючі агенти, барвники і консерванти. Суспензії можуть містити суспендуючі агенти.

Одиниці лікарських форм для введення в пухлину включають розчини, дисперсії, суспензії або емульсії, або стерильні порошки. Активний(і) агент(и)/сполука(и) можуть бути змішані в стерильних умовах із придатним фармацевтично прийнятним носієм.

Одиниці дози відповідно до даного винаходу можуть альтернативно включати один або
 40 більше активних агентів, наприклад, КУО С. повуї або спори С. повуї NT у сполученні зі стерильними порошками, що можуть бути відновлені в стерильні ін'єкційні розчини або дисперсії безпосередньо перед використанням, що можуть містити придатні антиоксиданти, буфери, розчинені речовини, що надають композиції ізотонічність із кров'ю передбачуваного реципієнта, або суспендуючі агенти, або загусники. Придатну плинність можна підтримувати,
 45 наприклад, шляхом використання покривних матеріалів, шляхом підтримання необхідного розміру частинок у випадку дисперсій і шляхом використання поверхнево-активних речовин. Ці композиції можуть також містити придатні ад'юванти, такі як змочувальні агенти, емульгатори і диспергуючі агенти. Може бути також бажаним включення ізотонічних агентів. Крім того, пролонговане всмоктування ін'єкційної фармацевтичної форми може бути викликано
 50 включенням агентів, що сповільнюють всмоктування.

Депо-форми, які вводяться в пухлину, можуть бути отримані за допомогою формування мікроінкапсульованих матриксів активного інгредієнта в біорозкладаних полімерах. Швидкість вивільнення активного інгредієнта може контролюватися залежно від відношення активного інгредієнта до полімеру і від природи конкретного використовуваного полімеру. Ін'єктовані депо-
 55 форми також одержують шляхом вміщення активного агента в ліпосоми або мікроемульсії, які сумісні з тканинами організму.

Як відзначено вище, композиції можуть бути представлені в одиничній дозі або в множинних дозах у герметичних контейнерах, наприклад, ампулах і флаконах, і можуть зберігатися в ліофілізованому стані, що вимагає тільки додавання стерильного рідкого носія, наприклад, води
 60 для ін'єкцій, безпосередньо перед використанням. Ін'єкційні розчини, приготовлені для

негайного прийому, і суспензії можуть бути отримані зі стерильних порошків, гранул і таблеток вищеописаного типу.

Наступні приклади призначені для додаткової ілюстрації способів за даним винаходом. Ці приклади є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження об'єму винаходу яким-небудь чином.

Приклади

Приклад 1

Сполучення внутрішньовенного (в./в.) дозування C. novyi NT з опроміненням

Проведено дослідження впливу однократної в./в. дози спор C. novyi NT на собаках зі спонтанними пухлинами після лікування зовнішньою дистанційною променевою терапією.

Одержання і кінцеве складання спор C. novyi NT проводили в Johns Hopkins Development laboratory згідно з наступним способом. Спори C. novyi NT, генеровані по Dang et al., 2001, інокулювали в збагачене середовище для спороутворення і інкубували в анаеробній камері протягом 17-19 днів при 37°C. Спори очищували шляхом послідовного безперервного центрифугування в градієнті перколу з наступним інтенсивним відмиванням фізіологічним розчином, забуференим фосфатом. Спори зберігали при 2-8°C. Спори одержували перед транспортуванням, суспендували в стерильному фізіологічному розчині, забуференому фосфатом, і розводили в 50 мл 0,9% хлориду натрію.

Спори C. novyi NT відновлювали в мішку з 50 мл фізіологічного розчину і доставляли протягом ночі до місця тестування. Доза опромінення складала приблизно 54 Гр і доставлялася як більше 20 фракцій: 11 до в./в. введення C. novyi NT і 9 після введення. Спори C. novyi NT вводили у вигляді однієї ін'єкції в дозі 1×10^9 спор/м² на основі площі поверхні тіла. Перенесення спор у шприц здійснювали на абсорбуючій прокладці з непроникною підкладкою. У мішок вставляли голку 22 калібра з прикріпленим 3-ходовим запірним краном. Штирковий кінець замкнутої системи хіміотерапії (OnGuard™, TEVA Medical Ltd.) приєднували до порту на крані. Вміст мішка повністю спорожнявся в шприц на 60 кубічних сантиметрів (см³), до якого прикріплювали кінець замкнутої системи, що накручується. Спори вводили кожному індивідууму протягом 15 хвилин через в./в. катетер, до якого приєднували штирковий кінець замкнутої системи хіміотерапії. За інфузією слідувало пропускання 10 см³ фізіологічного розчину. За індивідуумом пильно стежили протягом 6 годин після інфузії наступним способом: відслідковували життєвоважливі ознаки, кров'яний тиск і насичення киснем при моніторингу кожні 15 хвилин протягом перших 60 хвилин, потім за допомогою моніторингу кожні 30 хвилин протягом наступних 60 хвилин, потім кожних 60 хвилин для наступних 120 хвилин. Наступні перевірки проводили через кожні 60 хвилин у цілому 6 годин.

Випробовувані були госпіталізовані в перші 3 тижні лікування: 2 тижні для променевої терапії і 1 тиждень після в./в. лікування C. novyi NT. Наступні візити для перевірки відбувалися до 6 місяців після лікування на 1, 2, 3 і 6 місяць. Дивися таблиці 1 і 2 для зразка схем лікування.

Таблиця 1

Розклад перевірок при введенні спор

	Скри- нінг (пе- ред по- чат- ком про- мене- вої те- рапії)	1 день Моні- то- ринг хво- рого про- тягом 6 го- дин після інфу- зії	2 день	3 день	4 день	5 день	8 день ±2 дні	15 день ±2 дні	1 місяць ±3 дні	2 місяці ±3 дні	3 місяці ±14 днів	6 місяців ±14 днів
Інформована згода	×											
Історія хвороби	×											

Продовження таблиці 1

Фізикальне обстеження	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Життєвоважливі ознаки	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Рентген грудної клітки	×						× ¹	× ¹	× ¹	× ¹	× ¹	× ¹
Тонкогоччата аспіраційна біопсія (FNA) для культивування			×	×	×	×	×					
Ультразвук черевної порожнини	×						× ¹	× ¹	× ¹	× ¹	× ¹	× ¹
Рентгенівське опромінення кінцівки (якщо показано)	×						× ¹	× ¹	× ¹	× ¹	× ¹	× ¹
Повний аналіз формових елементів крові (CBC), протромбіновий час/частковий тромбопластиновий час (PT/PTT), хімічний аналіз крові, аналіз сечі	×	×		×		×	×	×	×	×	×	×
Дослідний аналіз крові ²	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Вимірювання і фотографії пухлини		×		×		×	×	×	×	×	×	×
Інфузія спор C. novyi NT		×										
Відповідь							×	×	×	×	×	×
Несприятливі події (AEs)		×		×		×	×	×	×	×	×	×
Супутнє медикаментозне лікування	×	×		×		×	×	×	×	×	×	×

¹Рентген грудної клітки і додаткова візуалізація по клінічних показаннях²Дослідний аналіз крові включає збирання плазми, сироватки, згустка крові і мононуклеарних клітин периферичної крові (клітини від збирання плазми)

Таблиця 2

Календар сумісного лікування опроміненням і С. novyi NT (дні)

Понеділок	Вівторок	Середа	Четвер	П'ятниця	Субота	Неділя
Опромінення, 1 день	Опромін., 2 день	Опромін., 3 день	Опромін., 4 день	Опромін., 5 день		
Опромін., 6 день	Опромін., 7 день	Опромін., 8 день	Опромін., 9 день	Опромін., 10 день		
Спори, 1 день X інфузія X	Опромін., 11 день Спори, 2 день AY	Опромін., 12 день Спори, 3 день X	Опромін., 13 день Спори, 4 день Y	Опромін., 14 день Спори, 5 день X	Спори, 6 день	Спори, 7 день
Опромін., 15 день спори, 8 день X, Y	Опромін., 16 день Спори, 9 день	Опромін., 18 день B Спори, 10 день	Опромін., 19 день B Спори, 11 день	Опромін., 20 день B Спори, 12 день	Спори, 13 день	Спори, 14 день
Спори, 15 день X, Y		Спори, 30 день X, Y		Повторна оцінка пухлини з допомогою КТ через 60 днів після опромінення		Спори, 90 день X, Y
Спори, 180 день X, Z						
А Опромінення може бути перервано більше ніж на один день, але на 11 день опромінення буде відновлено		В Опромінення повинно бути завершене в один із цих днів.		X = CBC, хім. профіль, AST, PT/PT, зразки для дослідного аналізу крові, несприятливі події (AEs), супутнє лікування, вимірювання пухлини, фотографії		
Y= зразки для дослідного аналізу крові				Z= перевірка на метастази в грудній клітці і додаткова візуалізація по показаннях, яка включає ультразвук черевної порожнини		

За станом на 10 вересень 2012 р. п'ять собак лікували наступним способом. З п'яти в 2 розвинувся абсцес, у 1 підтримувалося стабільне захворювання, і 2 загинули або були забиті. У двох випробовуваних, у яких розвивався абсцес, отримані фотографії під час лікування, як показано на фігурах 1A і 1B.

На фігурі 1A показана остеосаркома собаки, локалізована на правому дистальному радіусі/ліктьовій кістці протягом курсу лікування. У випробовуваного індивідуума «Саші» виявлені лихоманка і припухлість на 3 день і розрив абсцесу на 6-й день. Антибіотики були початі на 8 день через відкриту рану, і потім некротичні тканина і кістка були видалені. У Саші було завершено 12 з 19 циклів променевої терапії і за станом на 10 вересня 2012 р. спостерігалася загоєння зі стабільним захворюванням.

На фігурі 1B також зображена остеосаркома собаки, розташована на правому дистальному радіусі/ліктьовій кістці протягом курсу лікування. У випробовуваного індивідуума Семпсона виявлені лихоманка і припухлість на 5 день. На 6 день абсцес розкрився і були початі антибіотики. У Семпсона було завершено 14 з 20 циклів променевої терапії і за станом на 10 вересня 2012 р. спостерігалася загоєння зі стабільним захворюванням.

В інших індивідуумів - Чіпера, Бейлі і Раскіна - отримані різні результати. У Чіпера була сквамозноклітинна карцинома нижньої щелепи зліва. Протягом курсу лікування в Чіпера спостерігалася припухлість у місці пухлини, і він одержав 20 із 20 курсів променевої терапії. За станом на 10 вересня 2012 р. у Чіпера спостерігалася стабільне захворювання.

В іншого індивідуума, Бейлі, була саркома м'яких тканин лівої пахвової зони. Під час лікування Бейлі вмер, маючи сепсис, гостру ниркову недостатність, приховане дисеміноване внутрішньосудинне згортання і зупинку серця. Однак розтин показав, що вся тканина усередині пухлини мертва з відсутністю пухлинних клітин.

В індивідуума, що залишився, Раскіна, представлена остеосаркома проксимальної частини правої плечової кістки. Під час лікування в Раскіна спостерігалася припухлість у місці пухлини, і він завершив повні 20/20 курсів променевої терапії. Однак на 30-й день у місці пухлини спостерігалася продукція великих кількостей гнійного матеріалу й у Раскіна спостерігалася ниркова недостатність. Власник вирішив приспати його, коли нирковий статус не покращився. За станом на 10 вересень 2012 р. результати розтину ще не завершені.

Приклад 2

Введення ІТ спор *C. novyi*-NT, специфічно спрямованих на пухлинну тканину, і тривалість виживаності щурів - Методи

Клітинні лінії і тканинна культура

Клітини лінії F98 гліоми щура трансфікували конструктором люциферази за допомогою лентівірусу, підтримували в середовищі Ігла в модифікації Дульбекко (DMEM), доповненому 10% сироваткою плодів телят (FBS) і 1% пеніциліном і стрептоміцином.

Експерименти на щурах

6-тижневих самок щурів F344 Fisher (маса - 100-150 г) купували в Національного інституту раку. Для процедури імплантації самок щурів F344 Fisher анестезували за допомогою внутрішньочеревинного (в./ч.) введення кетаміну гідрохлориду (75 мг/кг; 100 мг/мл кетаміну HCl; Abbot Laboratories), ксилазину (7,5 мг/кг; 100 мг/мл Xyla-ject; Phoenix Pharmaceutical, Burlingame, CA) і етанолу (14,25%) у стерильному розчині NaCl (0,9%). Клітини гліоми F98 (2×10^4) стереотаксично імплантували через трепанаційний отвір у правій лобовій частці, розташований на 3 мм латеральніше брегми і на 2 мм спереду від неї, як описано раніше (Bai, et al., 2011). Розмір пухлини оцінювали за допомогою інструмента Xenogen при в./ч. введенні 8 мг/щур калієвої солі D-люциферину на 12-й день після імплантації пухлинних клітин. Потім 3 мільйони спор *C. novyi*-NT, отриманих як описано раніше (Dang, et al., 2001, Bettegowda, et al., 2006), стереотаксично вводили у внутрішньочерепну пухлину з використанням тих же координат, що й описані вище, і щури одержували в./ч. 10 мг/кг/день дексаметазону протягом перших 2 днів. За тваринами спостерігали щодня відносно яких-небудь ознак погіршення, в'ялості, нейротоксичності або болю відповідно до керівництва з догляду і використання тварин Джонса Хопкінса. Якщо були присутні симптоми дистресу, починали підтримувальну терапію гідратацією і доксицикліном (навантажувальна доза - 15 мг/кг в./ч., потім - 10 мг/кг кожні 12 годин як підтримувальна доза) і продовжували її протягом 7-денного періоду. Якщо симптоми зберігалися і/або приводили до виснаження, тварин, що вмирають, піддавали евтаназії. Ефективність ІТ введення спор *C. novyi*-NT оцінювали за кривими виживаності Каплана-Мейєра, а також за навантаженням пухлиною, що залишилося, на зрізах головного мозку. Для останнього відбирали мозок після розтину, поміщали у формальдегід і укладали в парафін для додаткових патологічних досліджень. Забарвлені по Граму зрізи контрастували сафраніном, і зрізи, забарвлені H&E, одержували згідно зі стандартними методами керівництва.

Статистичний аналіз

Одержували криві виживаності Каплана-Мейєра й аналізували за допомогою тесту Mantel-Cox, використовуючи GraphPad Prism v.5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Приклад 3

Введення ІТ спор *C. novyi*-NT, специфічно спрямованих на пухлинну тканину, і тривалість виживаності щурів - Результати

Повне хірургічне видалення прогресуючих гліом майже завжди неможливе, і ці пухлини неминуче рецидивують. Хоча цей тип пухлини звичайно не метастазує, не існує високоефективних медичних методів лікування, доступних для її лікування. Тому гліоми, як передбачається, являють собою тип пухлин, для яких місцеве введення спор *C. novyi*-NT може бути терапевтично корисним. Щоб оцінити цю можливість, клітини гліоми F98 щура ортотопічно імплантували 6-тижневим щурам Fisher F433, що привело до місцевих інвазивних пухлин, що швидко ставали фатальними (фігура 2A). Ін'єкція ІТ спор *C. novyi*-NT у пухлині цих щурів привела до їх проростання протягом 24 годин і до швидкого падіння активності люциферази як показника пухлинного навантаження протягом 24-48 годин (фігури 2B і 2C). Проростання *C. novyi*-NT доводилося появою вегетативних форм бактерій. Вражаючи, що *C. novyi*-NT точно локалізувалися в пухлині, і помірно в сусідніх нормальних клітинах тільки на декілька мікронів від неї (фігури 3A і 3B). Крім того, ці вегетативні бактерії, як можна бачити, росли в межах острівців мікроінвазивних пухлинних клітин і одночасно руйнували ці клітини, розташовані в межах нормальної паренхіми мозку (фігури 4A і 4B). Ця бактеріальна біохірургія привела до значної переваги у виживанні в цієї надзвичайно агресивної мишиної моделі (фігура 2A, величина $P < 0,0001$).

Приклад 4

Саркоми м'яких тканин собак, схожі на пухлини людини - Методи
Виділення геномної ДНК для секвенування

Геномну ДНК собак, які беруть участь у порівняльному дослідженні IT введення спор C. novyi-NT, екстрагували з лімфоцитів периферичної крові (PBLs) і фіксованої формаліном, вміщеної в парафін пухлинної тканини з використанням мінінабору QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) відповідно до протоколу виробника.

Секвенування й аналіз за допомогою біоінформатики

Очищення геномної ДНК, конструювання бібліотеки, захоплення екзона, секвенування наступного покоління й аналіз пухлини і нормальних зразків за допомогою біоінформатики здійснювали в Personal Genome Diagnostics (PGDx, Baltimore, MD). Коротко, геномну ДНК із пухлинних і нормальних зразків фрагментували і використовували для створення бібліотеки Illumina TruSeq (Illumina, San Diego, CA). Зони екзонів захоплювали в розчин із використанням набору Agilent Canine All Exon kit відповідно до інструкцій виробника (Agilent, Santa Clara, CA). Секвенування парних кінців, що приводить у результаті до 100 основ від кожного кінця фрагментів, здійснювали з використанням HiSeq 2000 Genome Analyzer (Illumina, San Diego, CA). Теги були вирівняні з еталонною послідовністю собак (CanFam2.0), використовуючи алгоритм Eland програмного забезпечення CASAVA 1.7 (Illumina, San Diego, CA). Фільтр чистоти програмного забезпечення BaseCall Illumina використовували для читання вибраних послідовностей для наступного аналізу. Алгоритм Eland програмного забезпечення CASAVA 1.7 (Illumina, San Diego, CA) потім застосовували для ідентифікації точкових мутацій і невеликих вставок і делецій. Відомі поліморфізми, записані в dbSNP131 (CanFam2.0), виключали з аналізу. Потенційні соматичні мутації відфільтровували і візуально інспектували, як описано раніше (Jones, et al., 2010).

Приклад 5

Саркоми м'яких тканин собак, схожі на пухлини людини - Результати

Доклінічні дослідження протиракових агентів на тваринах часто не відтворюють ефектів, що спостерігаються, у людей. У собак, однак, клінічне застосування терапевтичних агентів викликає токсичність і ефекти, аналогічні тим, що спостерігаються в людей (Paoloni, et al., 2008). Розробка дослідних методів лікування в собак може являти собою ключовий перехід між доклінічними дослідженнями на тваринах і клінічними дослідженнями на людині. Зокрема, саркоми м'яких тканин собак являють собою прекрасну модель, оскільки вони поширені в багатьох порід собак і мають клінічні і гістопатологічні особливості, дуже близькі до сарком м'яких тканин людини (Paoloni, et al., 2008, Vail, et al., 2000). Проте, у той час як останні досягнення в галузі геноміки значно розширили наші знання про генетику раку в людей, порівняно мало відомо про генетичну картину типів раку собак. Отже, щоб визначити, чи є пухлини собак генетично подібними з пухлинами людей, секвенували екзом пухлини і відповідну нормальну ДНК від 11 собак, що беруть участь у порівняльному дослідженні (фігура 5). Цей аналіз включав запит про 30194 номінальних генів, що включають 32,9 мегабаз (Мб) ДНК. У десяти собак були присутні саркоми м'яких тканин (шість пухлин оболонки периферичних нервів), і в однієї була хондробластна остеосаркома. У середньому 15,7 гігабаз (Гб) (діапазон: 8,1-23,3 Гб) генерованої послідовності були зіставлені з геномом, і 92,1% основ у ділянках-мішенях покривалися щонайменше 10 унікальними зчитуваннями в пухлинній ДНК. Аналогічним чином, у середньому 16,3 Гб (діапазон: 14,6-19,7 Гб) послідовності були зіставлені з геномом у нормальній ДНК, і 93,6% основ-мішеней, покривалися щонайменше десятьма унікальними зчитуваннями. Середнє покриття кожної основи-мішені в пухлині було 153-кратним (діапазон: 73-227-кратне), і воно було 152-кратним у відповідних нормальних зразках (діапазон: 130-178-кратне).

При використанні критеріїв суворого аналізу ідентифіковано 156 соматичних мутацій і 28 соматичних змін кількості копій серед 10 сарком м'яких тканин (таблиця 3 і Фігура 6). Діапазон соматичних мутацій — від 0 до 95, у середньому — 14 на пухлину. Поширеність мутацій у саркомах м'яких тканин була низкою, у середньому — 0,47 на Мб (діапазон: 0,00-2,89 на Мб). За винятком викиду одного зразка з 95 соматичними змінами, де спостерігалася середня поширеність 0,21 мутацій на Мб (діапазон: 0,00-0,61 на Мб) (фігура 5), подібно з визначенням швидкості мутацій у педіатричних рабдоїдних пухлинах людини (Lee, et al., 2012) і інших саркомах м'яких тканин (Joseph, et al., 2013). Найбільш розповсюдженим типом соматичної зміни була місенс-мутація з перевагою транзиції С на Т (45,5%) і G на A (34,0%; таблиці 4a і 4b).

Таблиця 3

Соматичні зміни в саркомах собак

ID ви-пад-ку	Тип пух-ли-ни	Символ гена	Опис гена	Номер надхо-дження тран-скрипту	Нуклео-тидне (геномне) по-ложення мутації	Аміно-кис-лотне по-ложення мутації (в білку)	Тип мута-ції	Наслідок	Кон-текст послі-дов-ності (по-ложення мутації Вка-зано як «N»)	% зчи-тува-ння мута-ції
04-R03	STS	CCDC61	Суперспі-ральний домен, що містить 61	ENSCAFT0000006986	chr1_112524782-112524782_C_T	NA	Заміна	Донор сайту сплайсингу	CCCTANC TGGG	0,41
		FAM83B	сімейство зі схожістю послідов-ностей 83, член B	ENSCAFT0000003643	chr12_25277449-25277449_G_T	68V>F	Заміна	Несинонімічне кодування	AAAACNT CCAG	0,39
		Новий ген	Неохарак-теризова-ний білок	ENSCAFT0000006899	chr23_3005035-3005035_T_A	32N>I	Заміна	Несинонімічне кодування	GGTCANT ATTA	0,34
		Новий ген	Неохарак-теризова-ний білок	ENSCAFT00000028936	chr20_55267898-55267898_C_T	323R>X	Заміна	Несинонімічне кодування	AGGAGNG ACGC	0,17
		NUP210	Нуклео-порин 210 кДа	ENSCAFT00000007053	chr20_6644043-6644043_G_T	1627P>T	Заміна	Несинонімічне кодування	GCCCGN GATGG	0,38
		PLMN	Плазміно-ген Важкий ланцюг A плазміну Легкий лан-цюг B плаз-міну	ENSCAFT00000001179	chr1_52549843-52549843_C_T	598G>E	Заміна	Несинонімічне кодування	CGCACNC ACCT	0,28
		UFSP2	UFM1-специ-фічна пепти-даза 2	ENSCAFT00000012105	chr16_48180970-48180970_T_G	271L>R	Заміна	Несинонімічне кодування	TTACCNC AATC	0,61
		ZNFX1	цинковий палець, NFX-1 типу, що міс-тить 1	ENSCAFT00000018115	chr24_38909185-38909185_T_G	1195I>L	Заміна	Несинонімічне кодування	AACAANG TCAT	0,34
16-R03	STS	ANKRD11	домен 11 анкі-ринового повтору	ENSCAFT00000031567	chr5_67220009-67220009_G_A	NA	Заміна	Донор сайту сплайсингу	CCGTGNT GAGT	0,19
		TMEM132B	Трансмем-бранний білок 132B	ENSCAFT00000011029	chr26_7467030-7467030_C_T	198G>D	Заміна	Несинонімічне кодування	ACAACNC GGCC	0,18
16-R02	STS	CAPN6	калпаїн 6	ENSCAFT00000028872	chrX_87423838-87423838_C_T	433R>H	Заміна	Несинонімічне кодування	ATCTGCG GTTC	0,45
		CNGB3	катіонний канал бета-3, керований циклічними нуклеоти-дами	ENSCAFT00000014134	chr29_35801978-35801978_G_A	451R>X	Заміна	Антисмислова	GATTCCG LAGT	0,22
		Новий ген	Неохаракте-ризований білок	ENSCAFT00000035928	chr4_69847894-69847894_C_G	352Y>X	Заміна	Антисмислова	ACCTACT TTGA	0,11
		PLAC8L1	PLAC8-по-дібний 1	ENSCAFT00000010364	chr2_43368179-43368179_C_T	99C>Y	Заміна	Несинонімічне кодування	TGTCACA CTCG	0,2
		AIDA	партнер ак-сину, зв'я-заний з дор-залізацією	ENSCAFT00000021486	chr38_19939874-19939874_A_G	258F>S	Заміна	Несинонімічне кодування	AAGCANAGCAC	0,25

		BRWD3	бромодомен і домен WD повтору, що містить 3	ENSCAFT00000027493	chrX_65189965-65189965_A_C	275S>A	Заміна	Несинонімічне кодування	AGTTGNTGGAC	0,7
		Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000027037	chrX_58551749-58551749_A_G	104K>R	Заміна	Несинонімічне кодування	CCTGANGAATT	0,17
		AFAP1L1	Філамент актину, зв'язаний з 1-подібним білком 1	ENSCAFT00000029078	chr4_62838379-62838379_G_A	425S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	TCTTGNA GAAG	0,25
		ATP7B	АТФаза 2, що транспортує мідь	ENSCAFT00000006859	chr22_3134952-3134952_A_C	288K>Q	Заміна	Несинонімічне кодування	ACCCANAGATG	0,2
		C11orf63	відкрита рамка зчитування 63 хромосоми 11	ENSCAFT00000018556	chr5_14445155-14445155_A_G	55S>P	Заміна	Несинонімічне кодування	CTGGGNC TTAC	0,18
		FIP1L1	FIP1-подібний (S. cerevisiae)	ENSCAFT00000003220	chr13_48967897-48967897_C_	NA	Делеція	Зсув рамки зчитування	AGGTANAGCAG	0,4
		KRT23	кератин 23 (індукований гістондеацетилазою)	ENSCAFT00000025377	chr9_25094298-25094298_A_T	389K>M	Заміна	Несинонімічне кодування	ATCGANG TCAA	0,25
		MLL3	Лейкемія 3 мієлоїдна/лімфоїдна або змішаної лінії диференціювання	ENSCAFT00000007959	chr16_18937990-18937992_TGC_	3177QQ>Q	Делеція	Делеція в рамці зчитування	GCTGTNG CTGC	0,11
		MUC5AC	муцин 5B, що формує олігомерний слиз/гель	ENSCAFT00000015796	chr18_48561759-48561759_G_A	3305G>S	Заміна	Несинонімічне кодування	AGACANG CCCC	0,12
		Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000036128	chr14_61936959-61936959_T	NA	Вставка	Зсув рамки зчитування	CGGTGNC CCAG	0,16
		OR52N1	нюховий рецептор, сімейство 52, підсімейство N, член 1	ENSCAFT00000010210	chr21_32133356-32133356_C_T	239A>T	Заміна	Несинонімічне кодування	GAAGGNC TTCT	0,28
		PREX1	фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат-залежний фактор 1 обміну Rac	ENSCAFT00000017540	chr24_38467733-38467733_C_T	96R>H	Заміна	Несинонімічне кодування	AGGCGN GCACA	0,29
		PRPF39	Гомолог фактора 39 процесингу прем РНК PRP39	ENSCAFT00000022300	chr8_25550886-25550886_T_	NA	Делеція	Зсув рамки зчитування	GAAGANT TTGG	0,24
		Q6W6S1	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000030697	chr9_50634661-50634661_A_T	310S>T	Заміна	Несинонімічне кодування	TTTGNT TTAT	0,27
		TENM2	Трансмембранний білок 2 тневрину	ENSCAFT00000027184	chr4_46714792-46714792_C_T	364R>H	Заміна	Несинонімічне кодування	TTCGGNG GCGG	0,21
		ZNF641	білок цинкового пальця 641	ENSCAFT00000014313	chr27_9390690-9390690_C_T	363P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	CCCCCNC AGTG	0,26
11-R01	STS-PNST	ACTN2	актин, альфа 2	ENSCAFT00000017321	6385028_C_T	90G>E	Заміна	Несинонімічне кодування	TTTTNCT CGG	0,24
		GPR139	рецептор 139, сполучений з G-білком	ENSCAFT00000028634	chr6_28316728-28316728_C_T	132P>L	Заміна	Несинонімічне кодування	CCACCNG CTCA	0,27
		KCNJ16	калієвий канал внутрішнього випрямлення підсімейство J, член 16	ENSCAFT00000017085	chr9_19566120-19566120_G_T	5G>C	Заміна	Несинонімічне кодування	ATTACNG CAGC	0,26
		KCNJ5	калієвий канал внутрішнього випрямлення	ENSCAFT00000016271	chr5_8746471-8746471_C_G	116G>R	Заміна	Несинонімічне кодування	ATCACNC CGGA	0,32

			підсімейство J, член 5							
04-R08	STS-PNST	A11LJ0	інгібітор серпінкової пептидази, монофілітичний таксон А (альфа-1 антипро-теїназа, антитрипсин), попередник члена 1	ENSCAFT00000036554	chr8_66432888-66432888_C_T	194D>N	Заміна	Несинонімічне кодування	GACATNC TCTA	0,42
		AASS	Аміноадипат-семіаль-дегід-синтаза	ENSCAFT00000005673	chr20_56179685-56179685_G_A	66G>S	Заміна	Несинонімічне кодування	AATGCNA CCAAG	0,62
		ABCB10	Касета АТФ-зв'язувальних білків, підсімейство В, (MDR/TAP), член 10	ENSCAFT00000019279	chr4_12734254-12734254_C_T	495R>C	Заміна	Несинонімічне кодування	CAGCTNG CCGCA	0,47
		ACTL9	Актинопо-дібний 9	ENSCAFT00000029470	chr20_56179685-56179685_G_A	363P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	GGGGGN CAGGC	0,37
		ADAM7	ADAM мета-лопеп-тидаз-ний домен 7	ENSCAFT00000014408	chr25_35952270-35952270_C_T	473E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	CACTTNA GGAA	0,31
		ADCYAP1R1	рецептор типу I, поліпептиду 1, що активує аденілат-циклазу (гі-пофізарного)	ENSCAFT00000005018	chr14_46708954-46708954_C_T	448S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	GGCCTNC TTCC	0,63
		ALDH7A1	сімейство 7 альдегідде-гідрогенази, член А1	ENSCAFT00000000904	chr11_18836811-18836811_G_A	523T>I	Заміна	Несинонімічне кодування	TGATANT ACTA	0,3
		ANKLE1	анкіриновий повтор і LEM домен, що містить 1	ENSCAFT00000024464	chr20_48444251-48444251_G_A	74Q>X	Заміна	Антисмислова	CTCCTNG TCTC	0,27
		ARMC9	армадиловий повтор, що містить 9	ENSCAFT00000017508	chr25_46161506-46161506_C_T	296T>I	Заміна	Несинонімічне кодування	TTCAANC ATGT	0,29
		ASPM	гомолог білка, асоційованого з аномальною веретено-видною мікро-цефалією	ENSCAFT00000018114	chr7_8578487-8578487_C_T	1156L>F	Заміна	Несинонімічне кодування	CATTTNTT TGC	0,2
		ATP13A1	АТФаза типу 13A1	ENSCAFT00000022481	chr20_46627633-46627633_C_T	633S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	AATGTNC GTGC	0,2
		ATP2B3	АТФаза, що транспортує Ca ⁺⁺ , член 3 плазми	ENSCAFT00000030531	chrX_124404772-124404772_C_T	22P>L	Заміна	Несинонімічне кодування	GGCCGNC CATG	0,19
		B6EY10	триптофан-5-гідроксилаза 1	ENSCAFT00000014485	chr21_43753174-43753174_C_T	98R>Q	Заміна	Несинонімічне кодування	ATTTTNG GGAC	0,47
		BCAR1	білок 1 стійкості до анти-естрогенів раку молочної залози	ENSCAFT00000031962	chr5_78491554-78491554_C_T	150P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	AGATGNC CCAT	0,28
		BOD1L1	білок 1, подібний 1, біоорієнтації хро-мосом при клітинному розподілі	ENSCAFT00000024431	chr3_69317598-69317598_C_T	2128P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	AACTCNC TGCG	0,29
		BRDT	бромодомен, специфічний для сім'яників	ENSCAFT00000032118	chr6_59977191-59977191_C_T	874E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	ATTTTNTT GAA	0,5
		BRE	Експресова-ний в мозку і	ENSCAFT00000006397	chr17_25386278-25386278_G_T	372Q>H	Заміна	Несинонімічне кодування	AACCAAC CTTC	0,36

		репродуктивних органах (модулятор TNFRSF1A)							
C11orf80	відкрита рамка зчитування 80 хромосоми 11	ENSCAFT00000019460	chr18_53566794-53566794_G_A	206P>L	Заміна	Несинонімічне кодування	TCAGANGCAGA	0,45	
C1orf168	відкрита рамка зчитування 168 хромосоми 1	ENSCAFT00000030112	chr5_55715053-55715053_C_T	219T>I	Заміна	Несинонімічне кодування	AGAAANCCTC	0,26	
C6orf211	відкрита рамка зчитування 211 хромосоми 6	ENSCAFT00000000674	chr1_44848305-44848305_C_T	38R>X	Заміна	Антисмислова	TGCATNCAAT	0,32	
CABP2	білок 2, що зв'язує кальцій	ENSCAFT00000018054	chr18_52987476-52987476_G_A	67G>E	Заміна	Несинонімічне кодування	AGTGGNGCCGG	0,35	
CEP250	центросомний білок 250 кДа	ENSCAFT00000012850	chr24_27405113-27405113_C_T	550L>F	Заміна	Несинонімічне кодування	TCATTNTTCGG	0,6	
CSMD1	множинні домени 1 Cub і Sushi	ENSCAFT00000013685	chr16_58244318-58244318_G_A	1551S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	TCTGGNAATGG	0,48	
CSMD2	множинні домени 2 Cub і Sushi	ENSCAFT00000005882	chr15_11028241-11028241_C_T	728S>L	Заміна	Несинонімічне кодування	GACTTNGCCCA	0,18	
DCDC2	домен дабл-кортину, що містить 2(цитозин-5-)-метилтрансферазу 3 бета ДНК	ENSCAFT00000016283	chr35_25388917-25388917_C_T	192G>E	Заміна	Несинонімічне кодування	GTTTTNCTTCT	0,54	
DNMT3B	2(цитозин-5-)-метилтрансфераза 3 бета ДНК	ENSCAFT00000011678	chr24_25068690-25068690_C_T	61S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	ATTGTNCAAGA	0,26	
EMR2	EGF-подібний модуль, що містить муцино-подібний гормональний рецептор-подібний 2 попередник	ENSCAFT00000025982	chr20_50969425-50969425_C_T	75S>N	Заміна	Несинонімічне кодування	GGCTGNTGAAG	0,43	
EXOC3L1	компонент 3-подібний 1 комплексу екзоцисти	ENSCAFT00000032455	chr5_85189666-85189666_G_A	539R>K	Заміна	Несинонімічне кодування	GGTGANAATCC	0,46	
FCRLB	Fc-подібний рецептор A	ENSCAFT00000020702	chr38_23962106-23962106_C_A	21A>S	Заміна	Несинонімічне кодування	GGCTGNCACAGA	0,14	
FLRT1	Трансмембранний білок 1, фібронектин-лейцин збагачений	ENSCAFT00000023385	chr18_55953743-55953743_C_T	616G>D	Заміна	Несинонімічне кодування	CGGGGNCCTCGG	0,31	
FMR1	білок 1 крихкості/затримки розумового розвитку	ENSCAFT00000030311	chrX_119344481-119344481_C_T	331E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	CCAACNAATTT	0,24	
FMR1	білок 1 крихкості/затримки розумового розвитку	ENSCAFT00000030311	chr14_11685668-11685668_G_A	337S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	AAATTNCTTAC	0,2	
FSCN3	гомолог 3 фасцину, активувальний білок, тестикулярний (Strongylocentrotus purpuratus)	ENSCAFT00000002697	chr12_57775088-57775088_G_A	310R>C	Заміна	Несинонімічне кодування	TGCACNAAGCT	0,48	
FUT9	Альфа-(1,3)-фукозил-	ENSCAFT00000005507	chr1_120363321-120363321_C_T	331E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	TTTGNAATCA	0,28	

		трансфераза							
FXD3	регулятор 3 юнного транспорту, що містить FXD домен	ENSCAFT00000011413	chr1_37098753-37098753_C_T	NA	Заміна	Несинонімічне кодування	TCTCANC ATAG	0,88	
GPR126	рецептор 126, сполучений з G-білком	ENSCAFT00000000457	chr1_37098753-37098753_C_T	415S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	AATTTNC ATAG	0,24	
GPR128	рецептор 128, сполучений з G-білком	ENSCAFT00000014844	chr33_10191962-10191962_C_T	34R>W	Заміна	Несинонімічне кодування	AAGGANG GAGG	0,33	
GPR82	рецептор 82 сполучений з G-білком	ENSCAFT00000022877	chrX_36056586-36056586_C_T	213S>L	Заміна	Несинонімічне кодування	ATTTTNT TTT	0,32	
GRM6	глутаматний рецептор, метаботропний 6	ENSCAFT00000000509	chr11_5596380-5596380_C_T	523P>L	Заміна	Несинонімічне кодування	CCTCCNC TGTG	0,53	
GSX1	гомеобокс 1 GS	ENSCAFT00000010870	chr2b_14841844-14841844_C_T	NA	Заміна	Акцептор сайту сплайсингу	GCTGTNT GGAG	0,36	
GTF2I	загальний транскрипційний фактор Ili	ENSCAFT00000038018	chr6_8807549-8807549_G_A	145Q>X	Заміна	Антисмислова	AGACTNA TCTC	0,43	
HDAC8	гістондеацетилаза 8	ENSCAFT00000027174	chrX_59408793-59408793_G_A	359S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	CGGAANA GAAG	0,71	
HECTD4	Убіквітин-протеїнілаза 4, що містить нест домен E3	ENSCAFT00000014076	chr26_12815851-12815851_C_T	541R>Q	Заміна	Несинонімічне кодування	CTTCCNG CTTG	0,38	
K1C10	кератин, тип 1, цитоскелетний 10	ENSCAFT00000025391	chr9_25194405-25194405_G_A	316E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	AATACNA ACAA	0,3	
KCNQ3	Калієвий потенціал залежний канал, підсімейство G, член 3	ENSCAFT00000035514	chr17_37144629-37144629_G_A	366S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	TGTTGNA TGTT	0,43	
KIF25	член 25 сімейства кінезинів	ENSCAFT00000001345	chr1_58634208-58634208_G_A	509E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	TGTCGNA GCCC	0,33	
LAMB2	ламінін, бета 2 (ламінін S)	ENSCAFT00000018765	chr20_43058275-43058275_C_T	1054P>L	Заміна	Несинонімічне кодування	GTGCCNG TCCA	0,38	
LIMK1	домен LIM кінрази 1	ENSCAFT00000019799	chr6_9274167-9274167_G_A	222R>W	Заміна	Несинонімічне кодування	GATCCNG TCTC	0,6	
LY9	антиген 9 лімфоцитів	ENSCAFT00000020056	chr38_24536297-24536297_C_T	263E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	CGACTNC CCCA	0,58	
MBD5	білок 5 метил-СрG0-зв'язувального домену	ENSCAFT00000008917	chr19_53239621-53239621_C_T	1189P>L	Заміна	Несинонімічне кодування	TGGTCNA GCTA	0,32	
MLF1	фактор 1 мієлоїдної лейкемії	ENSCAFT00000014162	chr23_54989572-54989572_C_T	164A>V	Заміна	Несинонімічне кодування	CCGAGNT CATG	0,33	
NELL1	NEL-подібний 1 (циплят)	ENSCAFT00000015919	chr21_46027895-46027895_G_A	105E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	CTGTCTNA ATGT	0,24	
NF1	Нейрофібромін 1	ENSCAFT00000029545	chr9_44834512-44834512_G_A	1933P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	CCACGNA GTCA	0,48	
Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000021819	chr27_39478508-39478508_G_A	1291E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	GTTCTNA ACTA	0,36	
Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000004310	chr1_106460436-106460436_G_A	314E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	GGGAGNA GAAA	0,47	
Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000028222	chr6_27157711-27157711_C_T	319M>I	Заміна	Несинонімічне кодування	AAAATNA TGCA	0,39	

Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000027418	chr8_56643270-56643270_G_A	395R>C	Заміна	Несинонімічне кодування	TAAACNATCAG	0,38
Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000012946	chr25_30547894-30547894_G_A	397D>N	Заміна	Несинонімічне кодування	GGCATNATGGC	0,31
Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000030235	chrX_115997637-115997637_C_T	6E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	CAATTNGCCAG	0,41
Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000024549	chr6_14378075-14378075_G_A	734S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	TTTTGNAAATT	0,36
Новий ген	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000009040	chr1_116977163-116977163_G_A	56E>X	Заміна	Антисмислова	CACTTNGGAGC	0,17
NTN5	нетрин 5	ENSCAFT00000006331	chr1_110537423-110537423_G_A	259W>X	Заміна	Антисмислова	CTTCTNGACCG	0,17
NUP210L	Нуклеопорин, 210 кДа-подібний	ENSCAFT00000027524	chr7_46057921-46057921_C_T	287P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	GATTTNCTCTG	0,25
NVL	ядерний VCP-подібний	ENSCAFT00000025949	chr7_43088033-43088033_C_T	783S>L	Заміна	Несинонімічне кодування	CTACTNGTGAG	0,16
OLFM4	Олфактомедин 4	ENSCAFT00000038323	chr22_13020301-13020301_G_C	245Q>H	Заміна	Несинонімічне кодування	GTTTCANCTCAA	0,26
OR11H4	нюховий рецептор, сімейство 11, підсімейство H, член 4	ENSCAFT00000008634	chr15_20603710-20603710_G_A	352M>I	Заміна	Несинонімічне кодування	GACATNAATT	0,33
OR11L1	нюховий рецептор, сімейство 11, підсімейство L, член 1	ENSCAFT00000039246	chr14_4576143-4576143_C_T	164S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	GATTTNCAAGT	0,25
PEPB	Попередник пепсину В	ENSCAFT00000031388	chr6_43778633-43778633_G_A	367D>N	Заміна	Несинонімічне кодування	TGGGANA TGTC	0,14
PHKA2	кіназа фосфорілази, альфа 2 (печінка)	ENSCAFT00000020564	chrX_14879295-14879295_C_T	NA	Заміна	Донор сайту сплайсингу	ACTTANTTAT	0,46
PKHD1	білок 1 полікістоза нирки і захворювання печінки (аутосомно-рецесивний)	ENSCAFT00000003416	chr12_22675987-22675987_G_A	1323S>L	Заміна	Несинонімічне кодування	TCACTNAGTTG	0,38
PRDM2	домен PR, що містить 2 з доменом ZNF	ENSCAFT00000025940	chr2_86311966-86311966_G_A	1366P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	GCACGNCAGCG	0,31
PTPRO	Білова тирозинфосфатаза рецепторного типу, O	ENSCAFT00000020369	chr27_34189070-34189070_C_T	309E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	TTTTTNCTGCT	0,57
PTPRZ1	Білова тирозинфосфатаза рецепторного типу, Z поліпептид 1	ENSCAFT00000005646	chr14_62891929-62891929_T_C	1733L>P	Заміна	Несинонімічне кодування	TAAACNTGCAC	0,11
Q28302	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000035111	chr20_54398781-54398781_C_T	202L>F	Заміна	Несинонімічне кодування	AACTCNTCAAC	0,34
Q38IV3	білок 3 множинної стійкості до ліків	ENSCAFT00000027259	chr9_29903253-29903253_G_A	761R>Q	Заміна	Несинонімічне кодування	CCAGCNCAGC	0,47
Q8HYR2	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000019633	chr27_29388021-29388021_A_T	166I>F	Заміна	Несинонімічне кодування	GAAATNTTATA	0,59

		RCC2	регулятор 2 конденсації хромосом	ENSCAFT00000024961	chr2_83776440-83776440_C_T	309P>L	Заміна	Несинонімічне кодування	GGTCCNC CGGC	0,46
		RP1	Регульований киснем білок 1	ENSCAFT00000011204	chr29_9140829-9140829_G_A	1861E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	AATCANA AAGA	0,3
		RTKN2	Ротекін 2	ENSCAFT00000020670	chr4_17382177-17382177_G_A	602S>L	Заміна	Несинонімічне кодування	GCCATNA TCTG	0,29
		SAMD7	Стерильний домен альфа мотиву, що містить 7	ENSCAFT00000023423	chr34_37536386-37536386_G_A	369R>Q	Заміна	Несинонімічне кодування	TCTTCNA AGCA	0,29
		SLAF1	молекула, що активує сигналізацію лімфоцитів	ENSCAFT00000019982	chr38_24863637-24863637_C_T	233S>L	Заміна	Несинонімічне кодування	GTCTTNG GGTG	0,53
		SLC47A2	розчинний носій сімейства 47, член 2	ENSCAFT00000036298	chr5_43495248-43495248_C_T	83S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	AGTTTNC ATAG	0,38
		SULT4A1	Сульфотрансфераза, сімейство 4A, член 1	ENSCAFT00000035674	chr10_24862764-24862764_G_A	72M>I	Заміна	Несинонімічне кодування	TTGATNA ACAT	0,26
		TAF7L	TAF7-подібна РНК-полімераза II, тата-бокс-зв'язувальний білок (TBP)-асоційований фактор, 50 кДа	ENSCAFT00000027954	chrX_78291782-78291782_C_T	366E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	CTTTTNT AAT	0,41
		TBC1D15	сімейство домену TBC1, член 15	ENSCAFT00000000735	chr10_16382190-16382190_C_T	176S>F	Заміна	Несинонімічне кодування	TGACTNT CTTC	0,3
		TLR1	попередник Toll-подібного рецептора 1	ENSCAFT00000037196	chr3_76368607-76368607_G_A	234W>X	Заміна	Антисмислова	GGATGNT CTTA	0,3
		TMEM74	трансмембранний білок 74	ENSCAFT00000001114	chr13_12451185-12451185_G_A	61R>C	Заміна	Несинонімічне кодування	AGGGCNA AGTT	0,34
		TOM1	Мішень туб1 (циплят)	ENSCAFT00000002700	chr10_31874137-31874137_A_C	50V>G	Заміна	Несинонімічне кодування	GCATCNC CTCA	0,36
		TRIM58	Трироздільний мотив, що містить 58	ENSCAFT00000001915	chr14_4533386-4533386_G_C	455T>R	Заміна	Несинонімічне кодування	CGTTTNT TACA	0,23
		TRIM66	Трироздільний мотив, що містить 66	ENSCAFT00000011105	chr21_35253035-35253035_G_A	662L>F	Заміна	Несинонімічне кодування	TGGGANA GGCG	0,43
		TTN	титин	ENSCAFT00000022319	chr36_25212813-25212813_C_T	25277E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	ACTTTNT TAA	0,31
		TTN	титин	ENSCAFT00000022319	chr36_25208898-25208898_G_A	26582P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	GACCGNT TCGC	0,36
		TTN	титин	ENSCAFT00000022319	chr36_25207752-25207752_C_T	26964E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	GTTTNT GCAT	0,32
		TTN	титин	ENSCAFT00000022319	chr36_25363681-25363681_C_T	6209E>K	Заміна	Несинонімічне кодування	GTTCTNG TGAC	0,32
		USP45	Специфічна для убіквітину пептидаза 45	ENSCAFT00000005638	chr12_60682412-60682412_G_A	232P>S	Заміна	Несинонімічне кодування	GGGAGNA AAAA	0,43
04-R04	OSA	ASTN1	астротактин 1	ENSCAFT00000022524	chr7_25651338-25651338_C_T	762A>V	Заміна	Несинонімічне кодування	TGTGNC TTGT	0,26
		ASXL3	Додатковий статевий гребінчато-подібний 3 (дрозофіла)	ENSCAFT00000028551	chr7_59080331-59080331_G_A	1100P>L	Заміна	Несинонімічне кодування	CGGCCN GAGGC	0,33
		FRMPD4	домен 4, що містить	ENSCAFT00000018460	chrX_9178376-9178376_G_A	1180A>T	Заміна	Несинонімічне кодування	TGGACNC GGGC	0,17

			FERM і PDZ							
		MC4R	рецептор 4 меланокортину	ENSCAFT0000000145	chr1_19140979-19140979_G_A	47V>I	Заміна	Несинонімічне кодування	TCTTCNTCTCC	0,33
		MGAM	мальтаза-глюкоамілаза (альфа-глюкозидаза)	ENSCAFT00000006194	chr16_10143723-10143723_T_	NA	Делеція	Зсув рамки зчитування	GGGTGNTTTT	0,24
		NFATC1	ядерний фактор активованих Т-клітин, цитоплазматичний, кальці-нейринзалежний 1	ENSCAFT00000000113	chr1_4124943-4124943_A_G	8V>A	Заміна	Несинонімічне кодування	AAAGGNC TGGA	0,4
		NFE2L3	ядерний фактор (еритроїдного походження 2)-подібний 3	ENSCAFT00000038567	chr14_42452261-42452261_GATCG	NA	Делеція	Зсув рамки зчитування	AAGATNA TGTA	0,3
		TP53	клітинний пухлинний антиген p53	ENSCAFT00000026465	chr5_35558664-35558664_A_G	260F>S	Заміна	Несинонімічне кодування	CCTCANA GCTG	0,54
		PLEKHB1	вмісний гомологічний плекстрину домен, сімейство B (евектини) член 1	ENSCAFT00000009009	chr21_27601782-27601782_C_T	142R>H	Заміна	Несинонімічне кодування	CTCGGNG GCTC	0,43
		PTPN14	Білова Тирозин-фосфатаза нерцепторного типу 14	ENSCAFT00000019934	chr7_15317710-15317710_C_T	911G>R	Заміна	Несинонімічне кодування	CATTGNC TCTT	0,12
		RBBP6	Ретино-Бластомний зв'язувальний білок 6	ENSCAFT00000027846	chr6_24499626-24499626_T_C	1730K>R	Заміна	Несинонімічне кодування	TCTTTNT GCTG	0,3
		TDRD6	Що містить домен тюдора 6	ENSCAFT00000003223	chr12_17857549-17857549_G_A	1517W>X	Заміна	Антисмислова	AACCTCNT ATAA	0,49
		TEX15	експресований в сім'яниках 15	ENSCAFT00000010405	chr16_36456696-36456696_C_T	1265V>F	Заміна	Несинонімічне кодування	TTTCANTT TTG	0,58
		TRAP1	білок 1, асоційований з рецептором TNF	ENSCAFT00000030584	chr6_40616562-40616562_C_A	42A>D	Заміна	Несинонімічне кодування	TCCAGNC CAGT	0,3
04-R02	STS-PNST	KIAA1217	Неохарактеризований білок	ENSCAFT00000006799	chr2_11859851-11859851_G_A	356A>V	Заміна	Несинонімічне кодування	GAGAGNC GGGG	0,45
		MFSD2B	домен, що містить 2B, надсімейства мембранних транспортерів	ENSCAFT00000006341	chr17_21486565-21486565_C_T	494R>C	Заміна	Несинонімічне кодування	GTGCANG TGGG	0,42
		Новий ген	неохарактеризований білок	ENSCAFT00000030447	chrX_123930541-123930541_C_C	327R>P	Заміна	Несинонімічне кодування	AGGGGNC CCGG	0,14
		SLC16A2	розчинний носій сімейства 16, член 2 (транспортер тиреоїдних гормонів)	ENSCAFT00000027229	chrX_60903455-60903455_G_A	72A>T	Заміна	Несинонімічне кодування	CCTTCNC CTCT	0,4
		TERP1	зв'язаний з теломеразою	ENSCAFT00000008693	chr15_20729329-20729329_G_A	1900L>F	Заміна	Несинонімічне кодування	CAGGANG CCCC	0,42

			білок 1							
		XPNPEP 2	X-проліл-аміно-пептидаза (амінопептидаза Р) 2, зв'язаний з мембраною	ENSCAFT000 00029688	chrX_104033303- 104033303_C_T	502R>X	Заміна	антисмислова	CAGGGN GAATG	0,25
01- R02	STS- PNST	ACD	гомолог ад-ренокортикальної дисплазії (миша)	ENSCAFT000 00032411	chr5_84799806- 84799806_C_A	388P>H	Заміна	Несинонімічне кодування	TGGCCNC CTGC	0,13
		ADAMTS 5	ADAM металопротеїназа з мотивом тромбоспандину типу 1, 5	ENSCAFT000 00013627	chr31_25306205- 25306205_G_A	226H>Y	Заміна	Несинонімічне кодування	CTGATNC TGCC	0,13
		ADRB2	бета-2 адренергічний рецептор	ENSCAFT000 00029135	chr4_63253706- 63253706_C_T	76C>Y	Заміна	Несинонімічне кодування	CAGCANA GGCC	0,12
		ATP7B	АТФаза 2, що транспортує мідь	ENSCAFT000 00006859	chr22_3160667- 3160667_G_A	1119V> M	Заміна	Несинонімічне кодування	TGGGCNT GGCC	0,2
		CDK14	Циклін-залежна кінза 14	ENSCAFT000 00003009	chr14_19522937- 19522937_C_T	102R>W	Заміна	Несинонімічне кодування	TCAGGNG GCAC	0,2
		IER5L	білок, подібний негайній ранній відповіді	ENSCAFT000 00031805	chr9_57855189- 57855189_G_A	20S>N	Заміна	Несинонімічне кодування	CCACANC TCCC	0,16
		IRS1	субстрат рецептора інсуліну 1	ENSCAFT000 00016522	chr25_42687032- 42687032_C_T	139S>N	Заміна	Несинонімічне кодування	CCCAGNT GCCG	0,11
		JAG1	зубчатий 1	ENSCAFT000 00009074	chr24_14655994- 14655994_G_A	93S>N	Заміна	Несинонімічне кодування	CTGTANC TTCG	0,11
		JUNB	протоонкоген jun B	ENSCAFT000 00027182	chr20_52362490- 52362490_G_A	77S>L	Заміна	Несинонімічне кодування	GCTCCNA TGAG	0,14
		LMNA	ламін A/C	ENSCAFT000 00026695	chr7_44690367- 44690367_G_A	64T>I	Заміна	Несинонімічне кодування	ACTCGNT CATC	0,15
		MADCA M1	попередник молекули адгезії 1 адресину слизової	ENSCAFT000 00031358	chr20_61126306- 61126306_G_	NA	Делеція	Зсув рамки зчитування	AAAGTNG GGGG	0,27
		MEFV	білок середземно-морської лихоманки	ENSCAFT000 00037775	chr6_41024970- 41024970_C_A	673N>K	Заміна	Несинонімічне кодування	GGAAANA AGAC	0,26
		Новий ген	альдегіддегідрогеназа	ENSCAFT000 00017771	chr18_52833141- 52833141_A_G	250V>A	Заміна	Несинонімічне кодування	ACAGGNC GTAG	0,11
		NRM	нурим (білок мембрани ядерної оболонки)	ENSCAFT000 00000694	chr12_3488483- 3488483_C_T	524S>N	Заміна	Несинонімічне кодування	GGCAGNT GCGG	0,11
		PIM1	протоонкоген серин/треонін-протеїнкіназа pim-1	ENSCAFT000 00002258	chr12_9213964- 9213964_G_A	73G>D	Заміна	Несинонімічне кодування	CCCCGNC TCCT	0,22
		PIM1	протоонкоген серин/треонін-протеїнкіназа pim-1	ENSCAFT000 00002258	chr12_9214807- 9214807_C_T	250H>Y	Заміна	Несинонімічне кодування	ACTGCNA CAAC	0,22
		PIM1	протоонкоген серин/треонін-протеїнкіназа pim-1	ENSCAFT000 00002258	chr12_9214750- 9214750_C_T	231Q>X	Заміна	Антисмислова	CCCTGNA GGAG	0,2
		PTCH1	подібний заплатанному білок 1	ENSCAFT000 00001978	chr1_74305255- 74305255_G_A	73A>T	Заміна	Несинонімічне кодування	GGAAANC TACT	0,16
		TRPS1	білок трихоринофа-	ENSCAFT000 00001274	chr13_18226051- 18226051_C_T	530S>N	Заміна	Несинонімічне кодування	CATGANT GTCC	0,13

			лангеаль-ного син-дrome							
		ZFP36L1	білок 36 цин-кові пальці, подібний C3H типу 1	ENSCAFT000 00026141	chr8_45703888-45703888_C_T	14S>N	Заміна	Несинонімічне кодування	CTTCGNT CAAG	0,13

STS - саркома м'яких тканин;

CTC-PNST - саркома м'яких тканин, пухлина оболонки периферичних нервів;

OSA_c- хондробластна остеосаркома.

Таблиця 4a

Типи соматичних змін, які спостерігаються при саркомах м'яких тканин собак

Тип	Підтип	кількість змін	Процент змін (%)
Заміни	Антисмисловий	11	6
	Безсмисловий (несинонімічний)	135	73
	Акцептор сайту сплайсингу	1	1
	Донор сайту сплайсингу	4	2
Проміжний		151	82
INDELs	Делеція	4	2
	Вставка	1	1
Проміжний		5	3
CNAs	Делеція	0	0
	ампліфікація	28	15
Проміжний		28	15
Сумарний		184	100

INDELs - вставки і делеції;

CNAs – зміни кількості копій

Таблиця 4b

Типи соматичних мутацій в саркомах м'яких тканин собак

Тип соматичної зміни	Кількість	Процент
Делеція 1 п.о.	3	1,9
Делеція 3 п.о.	1	0,6
Делеція 1 п.о.	1	0,6
A:T>C:G	3	1,9
A:T>G:C	4	2,6
A:T>T:A	3	1,9
C:G>A:T	4	2,6
C:G>G:C	2	1,3
C:G>T:A	71	45,5
G:C>A:T	53	34,0
G:C>C:G	3	1,9
G:C>T:A	4	2,6
T:A>A:T	1	0,6
T:A>C:G	1	0,6
T:A>G:C	2	1,3
Всього	156	100

- 5 Ампліфікації і делеції були менш поширені, у середньому по три на пухлину (діапазон: 0-17) (фігура 5). Сім з 10 сарком м'яких тканин не несли ампліфікацій або делецій. Екзом хондробластної остеосаркоми був подібний з екзомами сарком м'яких тканин з 14 соматичними мутаціями і чотирма ампліфікаціями (таблиця 3 і фігура 6).

Одиничні заміни основ ідентифіковані в чотирьох генах-супресорах пухлин, які часто мутують у пухлинах людини (NF1, MLL3, TP53 і PTCH1). Крім того, MDM4, онкоген, що, як показано, піддається ампліфікації, але не точковим мутаціям у ракових захворюваннях людини, як встановлено, ампліфікувався (але не піддавався точковим мутаціям) в одній пухлині собаки (Lee, et al., 2012 p., Barretina, et al., 2010, Chmielecki, et al., 2013, Vogelstein, et al., 2013). Єдині гени, які мутували більш ніж в одній пухлині, являли собою ATP7B (місенс-мутації в двох пухлинах) і AIG1 (ампліфікація в двох пухлинах). Цікаво, що мутації в ATP7B також знайдені в ліпосаркомах людини (Joseph et al., 2013). Двадцять дві з 184 соматичних мутацій у пухлинах собак виникли в генах, що, як показано раніше, мутували в саркомах м'яких тканин людини (таблиця 5).

Таблиця 5

Гени, які мутували в злоякісних пухлинах як людини, так і собаки

Ген	Кількість соматичних змін	Тип зміни	Кількість зразків	Драйверний ген людини або такий, що мутував в саркомі м'яких тканин людини
ANKRD11	1	SBS (сайт сплайсингу)	1	Joseph <i>et al.</i> , 2013
ATP7B	2	SBS (місенс-мутація)	2	Joseph <i>et al.</i> , 2013
BRDT	1	SBS (місенс-мутація)	1	Chmielecki <i>et al.</i> , 2013
BRWD3	1	SBS (місенс-мутація)	1	Joseph <i>et al.</i> , 2013
CSMD2	1	SBS (місенс-мутація)	1	Joseph <i>et al.</i> , 2013
FCRLB	1	SBS (місенс-мутація)	1	Lee <i>et al.</i> , 2012
IRS1	1	SBS (місенс-мутація)	1	Barretina <i>et al.</i> , 2010
LIMK1	1	SBS (місенс-мутація)	1	Lee <i>et al.</i> , 2012
MBD5	1	Делеція	1	Lee <i>et al.</i> , 2012
MLL3	1	SBS (місенс-мутація)	1	Vogelstein <i>et al.</i> , 2013
NF1	1	SBS (місенс-мутація)	1	Barretina <i>et al.</i> , 2010
PKHD1	1	SBS (місенс-мутація)	1	Lee <i>et al.</i> , 2012
PTCH1	1	SBS (місенс-мутація)	1	Vogelstein <i>et al.</i> , 2013
PTPRZ1	1	SBS (місенс-мутація)	1	Chmielecki <i>et al.</i> , 2013
RP1	1	SBS (місенс-мутація)	1	Chmielecki <i>et al.</i> , 2013
TTN	4	ампліфікація	1	Chmielecki <i>et al.</i> , 2013
MDM4	1	ампліфікація	1	Vogelstein <i>et al.</i> , 2013
CNTN2	1	ампліфікація	1	Chmielecki <i>et al.</i> , 2013

Вимагаються більш масштабні дослідження сарком м'яких тканин в обох видів для визначення того, чи є ці представлені драйверні мутації показниками важливих, консервативних онкогенних шляхів. Незалежно від цього генетичні ландшафти пухлин собак аналогічні їм у людей з погляду кількості генетичних змін і спектра мутацій. Зокрема, вони виключають

можливість того, що пухлини собак мають дуже велику кількість мутацій, які могли би змусити їх з більшою імовірністю викликати імунну відповідь, ніж аналогічні типи пухлин у людини.

Приклад 6

Внутрішньопухлинне (ІТ) введення *C. novyi* NT - Дослідження 1. Методи

5 Для дослідження безпеки й ефективності способу за даним винаходом проводили порівняльне дослідження на 16 собаках з солідними пухлинами, які спонтанно виникли (таблиця 6).

Таблиця 6

Характеристика хворих

ID випадку	Стать ^a	Порода	Вік (роки)	маса тіла (кг)	Тип пухлини ^b	стадія ^c	Локалізація	Найдовший діаметр ^d (мм)	Попереднє лікування	# ІТ лікування <i>C. novyi</i> NT
01-R02	FN	Бордерколі	14,3	21,7	STS-PNST	II	Лівий бік	43	Не було	4
04-R01	MN	Золотистий ретривер	7,9	34,0	STS-PNST	II	Права верхня щелепа	15	операція	4
04-R02	MI	Золотистий ретривер	12,0	38,8	STS-PNST	I	Правий бічний зап'ясток	46	операція	4
04-R03	MN	Боксер	9,6	29,4	STS	I	Ліве медіальне передпліччя	56	Не було	3 ^{tr}
04-R04	FN	Сенбернар	11,7	31,0	OSA _c	III	Права проксимальна плечова кістка	Не визн.	операція	1 ^{ae}
04-R05	MN	шелті	14,0	13,4	STS	III	Праве передпліччя, краніально	45	операція і спори <i>C. novyi</i> -NT в./в.	4
04-R06	FN	Лабрадор-ретривер	11,6	24,3	MCT	I	III палець правої задньої кінцівки	23	Не було	4
04-R08	FN	Вівчарка	7,2	28,9	STS-PNST	III	Середина лапи правої задньої кінцівки	65	операція	3 ^{pd}
10-R01	MN	Золотистий ретривер	13,7	33,6	OMM	III	Ліва нижня щелепа	27	операція	2 ^{ae}
10-R02	MN	Пітбультер'єр	10,0	43,6	STS	I	Правий бік	53	операція	4
11-R01	MN	мальтійська болонка	11,1	8,1	STS-PNST	II	Ліва вушна раковина	28	операція	1 ^{tr}
11-R02	FN	Лабрадор-ретривер	12,2	30,3	STS-PNST	II	Лівий колінний суглоб задньої кінцівки	43	Не було	3 ^{iv}

11-R04	MN	хаскі	10,3	44,3	STS	I	Лапа правої передньої кінцівки	29	Не було	4
16-R02	MN	Лабрадор-ретривер	9,8	36,8	STS	I	Ліва латеральна стегнова кістка	91	операція	4
16-R03	FN	Вівчарка	10,8	20,8	STS	I	Лапа лівої передньої кінцівки	53	операція	4
26-R01	MN	Лабрадор-ретривер	7,9	30,8	STS	II	Лапа правої передньої кінцівки	24	Не було	4

^aFN – стерилізована сука; MN – стерилізований пес; MI – інтактний пес. ^bSTS – PNST – пухлина оболонки периферичних нервів; OSA_c - хондробластна остеосаркома; MCT – пухлини тучних клітин; OMM – пероральна злоякісна меланома. ^cВизначення стадій, основане на опублікованих критеріях (Dennis et Al., 2011, Patnaik et al., 1984, Smedley et al., 2011, Sabattini et al., 2014): I – низький ступінь дедиференціювання; II – проміжний ступінь дедиференціювання; III – високий ступінь дедиференціювання; NA – не визначено.

^dНайбільший діаметр під час першого введення C. povui-NT (день 0). ND – не піддається вимірюванню через локалізацію. ^e04-R05 – попереднє лікування C. povui-NT шляхом однократної в./в. ін'єкції 1×10⁷ спор/м² за 437 днів до першого ІТ введення спор C. povui-NT.

^fПричина зниження циклів лікування нижче 4-х, дана в нарядковому індексі: TR – відповідь пухлини; AE – несприятлива подія; PD – прогресія захворювання; в./в. – 4-а доза внутрішньовенно.

Собак включали в дослідження в багатьох організаціях, які беруть участь у мережі онкологічних клінічних досліджень на тваринах (ACI, Washington, DC), і письмова інформована згода була отримана від власника(ів) до включення. Лікування, зміст і оцінки результатів дослідження контролювалися як задовольняючі вимогам ветеринарних лікарів-онкологів із професійною сертифікацією. Включення пропонувалося собакам, які належали клієнтам-власникам, зі спонтанними солідними пухлинами з перевагою саркоми м'яких тканин, у яких стандартна терапія не діяла або власник(и) яких відхилили таку терапію. Участь була обмежена собаками-пухлиноносіями з вузлом-мішенню, що має найбільший діаметр від 1 до 7 сантиметрів. Собак з пухлинами, розташованими в зонах, у яких розвиток абсцесу буде мати катастрофічні наслідки (наприклад, назальні пухлини, що поширюються в мозок, або запущене метастатичне легеневе захворювання), виключали з дослідження.

Собаки з ознаками активної бактеріальної інфекції, що вимагає системної терапії антибіотиками протягом семи днів або терапії раку (хіміотерапії, променевої терапії, імунотерапії) протягом 21 дня, не мали права на лікування спорами C. povui-NT. Собаки повинні були мати оцінку активності 0 або 1 (таблиця 7) і бути доступними для реєстрації протягом усього періоду дослідження. Спільне використання протиракових агентів і участь в інших клінічних випробуваннях заборонялася. Собак, які були вагітні або можуть завагітніти, не включали в дослідження. Крім того, не включали в дослідження собак, які можуть бути недоступні протягом усієї тривалості дослідження, і собак, які розглядалися як непридатні для включення в дослідження дослідником або головлікарем.

Таблиця 7

Оцінка рівня активності

Бал	Опис
0	Нормальна активність
1	Обмежена активність: активність, знижена відносно активності захворювання
2	Порушена: тільки в амбулаторних умовах, здатні до послідовної дефекації і сечовипускання в допустимих місцях
3	Інвалідизована: необхідність насильного годування і/або нездатність обмежувати сечовипускання і дефекацію допустимими місцями
4	Смерть

Під час скринінгового візиту кожній собаці присвоювали унікальний ідентифікаційний дослідний номер, що складається з 5-значного цифрового коду (який може не збігатися з послідовним порядковим номером скринінгу собак). Перші 2 цифри вказували на місце дослідження (від 01 до 99), середня цифра вказувала дослідження «R», і останні 2 цифри описували дослідний номер собаки в місці дослідження (від 01 до 99). Наприклад, 11-й собаці, включений в дослідження в місці 9, присвоювали дослідний номер собаки 09-R11. Дослідні номери присвоювали собакам у хронологічному порядку, у якому собак включали в дане місце дослідження. Собака розглядалася як включений в дослідження, коли він задовольняв критеріям включення і виключення.

Дослідження макроскопічної патології і гістології були виконані відповідно до керівництва CVM для галузі 185 Управління з контролю за продуктами і ліками. При розтині наступні тканини (таблиця 8) оцінювали на макроскопічну патологію і гістопатологію й описували в повідомленні про розтин. Для мікробіології збирали зразки мозку, серця, легень, печінки, селезінки, нирок, м'язів, кісток, тонкої кишки, товстої кишки і будь-якої тканини з великою аномалією.

Таблиця 8

Перелік тканин, отриманих для перевірки макроскопічної патології і гістопатології

Гіпофіз	Мозок	Кістка і кістковий мозок
Щитовидна залоза	Спинний мозок	Мозок спинного мозку
Паращитовидна залоза	Очі	Селезінка
Надниркова залоза	Легеня	Шлунок
Підшлункова залоза	м'яз	Дванадцятипала кишка
Яєчники	Молочна залоза	Порожня кишка
Матка	Печінка	Клубова кишка
Сім'яники	Жовчний міхур	Товста кишка
Простата	Нирки	Сліпа кишка
ЕПІДИДИМИС	Сечовий міхур	Тимус
Серце	Лімфатичні вузли	Місце введення
шлуночки	шкіра	будь-які аномальні тканини

Усі собаки госпіталізувалися з 0 (D0) до 4 дня (D4), а потім необов'язково (на розгляд дослідника) протягом від 24 до 48 годин після кожного наступного циклу лікування для клінічного спостереження. Рідини вводили всім собакам, включеним у дослідження, під час госпіталізації після лікування C. повуї NT. У дні дозування всім собакам вводили внутрішньовенно (в.в.) кристалоїди 4 мл/кг/година протягом 2 годин. За собаками уважно стежили протягом шести годин після кожної IT ін'єкції спор C. повуї-NT. При наступному візиті (через 4 дні) усім собакам вводили підшкірно кристалоїди (SQ) 20 мл/кг. Якщо собака був госпіталізований і одержував в.в. кристалоїди в той день, коли повинні були бути введені кристалоїди SQ, зникала необхідність давати дозу SQ.

Дослідні візити і події наведені в таблиці 9, як приклад дана схема лікування 4 дозами. Інтервал дозування, як передбачалося, був щотижневим інтервалом, якщо собака не розглядалася як такий, що піддається лікуванню повторюваними дозами. Відстрочка лікування при повторному дозуванні виникала в ході дослідження через несприятливі події або рішення дослідника.

Таблиця 9

Короткий виклад оцінок дослідження

	Скринінг перед лікування	0 день ^b	4 день	7 день ^b	11 день	14 день ^b	18 день	21 день ^b	25 день	60 день	90 день
Інформована згода	x										
Історія хвороби & персональні дані	x										
Фізичний огляд	x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Маса & показники життєдіяльності	x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Оцінка активності	x										
Критерії включення & виключення	x										
Лабораторні показники ^c	x	X	X	X	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Візуалізація ^d	x	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Біопсія	x										
Дослідження	x										
Дослідження крові											
Вимірювання & фотографії пухлини	x	X		X		X		X		X	X
Номер, присвоєний собаці в дослідженні	x										
Включення	x										
ITC. novyi-NT		X		X		X		X		X	
Терапія в.в. рідиною ^e		X		X		X		X		X	
Терапія рідиною SQ ^f			X		X		X		X		
Закінчення дослідження ^g											X

^aОцінки при скринінгу проводили за 1-14 днів до початку дослідження. ^bЗа пацієнтом слідували протягом 6 годин після лікування. Оцінку здійснювали кожні 15 хвилин протягом 1-ї години після лікування, кожні 30 хвилин протягом 2-ї години після лікування і через кожні 60 хвилин протягом 3-6 годин після лікування. ^cЛабораторні показники включають: загальний аналіз крові, біохімічну панель сироватки, протромбіновий час, тромбопластиновий час і аналіз сечі. (X) - на розгляд дослідника. ^dДіагностична візуалізація, яка включає: рентгенограми, ультразвукове дослідження або комп'ютерну томографію. ^eКристалоїд в дозі 4 мл/кг/час протягом двох годин. ^fКристалоїд в дозі 20 мл/кг. ^gПісля завершення дослідження і якщо були потрібні системні антибіотики для лікування несприятливих подій, рекомендувалося вводити собакам доксициклін 5-10 мг/кг перорально два рази в день (PO BID) протягом 3 місяців.

Шістнадцять собак, 9 стерилізованих псів, 1 здоровий (інтактний) пес і 6 стерилізованих сук були включені в дослідження. (Таблиця 6). Їхні персональні характеристики і характеристики пухлини наведені в таблиці 6. Включені в дослідження особи являли собою особи різних порід, маси і віку. В особин були раніше діагностовані типи раку, які спонтанно виникли, різного гістологічного походження: у 13 собак був діагноз саркоми м'яких тканин (81 %), у 1-єї - остеосаркома (6,3 %), у 1-єї - меланома (6,3 %) і в 1-єї - пухлина тучних клітин (6,3 %). З 13 сарком м'яких тканин гістологічний підтип був доступний у 11-ти і включав: 4 гемангіоперицитоми (30,8 %), 3 пухлини оболонки периферичних нервів (23,1 %), 1 саркому

синовіальних клітин (7,7 %), 1 мікросаркому (7,7 %), 1 рабдосаркому (7,7 %) і 1 фібросаркому (7,7 %). Середня маса собак, включених у дослідження, складала 29,4 кг (діапазон - 8,1-44,3 кг) і їхній середній вік складав 10,9 років (діапазон: 7,2-14,3 роки). Тринадцять собак мали діагноз саркоми м'яких тканин і по одній мали діагноз остеосаркоми, злоякісної меланоми і пухлини тучних клітин. З 13 сарком м'яких тканин шість були доступні для імуногістохімії (IHC). Усі шість були позитивними відносно S100 і негативними відносно актину гладких м'язів, припускаючи діагноз саркоми підтипу, що називається пухлиною оболонки периферичних нервів. Сім пухлин характеризувалися стадією I, п'ять - стадією II, і чотири - стадією III. У восьми собак раніше проводилося хірургічне лікування раку.

Одержання спор *C. novyi*-NT і IT введення у спонтанні пухлини собак

Спори *C. novyi*-NT для використання в порівняльному дослідженні собак одержували, як описано раніше (Dang et al., 2001, Bettegowda et al., 2006). Коротко, бактерії культивували в середовищі для споруляції щонайменше протягом двох тижнів для забезпечення максимального виходу зрілих спор. Зрілі спори очищували за допомогою двох послідовних безперервних градієнтів і ресуспендування в PBS. Тестування стерильності кінцевого продукту здійснювалося за допомогою культивування продукту в соєво-казеїновому середовищі і тигриколятному середовищі відповідно до керівництва FDA 21CFR610.12 (Nelson Laboratories, Salt Lake City, UT). Аналізи ефективності проростання проводили в анаеробних умовах на агарі для культивування бруцел із 5 % кров'ю коня для забезпечення впевненості в тому, що спори відповідають заданим критеріям життєздатності. Спори упаковували в стерильні 1,8 мл кріопробірки з герметичними гвинтовими ковпачками з ущільнювальним кільцем (Simport, Beloeil, Canada) в об'ємі 1000 мкл і концентрації 1×10^9 спор/мл. Кріопробірки з *C. novyi*-NT зберігали при температурі 2-8°C. Для дозування аліквоту 0,4 мл маточного розчину спор упаковували в 0,5 мл кріопробірки. Після введення дози кріопробірки і невикористані спори *C. novyi*-NT утилізували відповідно до діючих правил утилізації для рівня 2 біобезпеки матеріалу. Перед IT введенням спори ресуспендували за допомогою вортекса, змішуючи при максимальній швидкості протягом 10 секунд у цілому три рази, перед відсмоктуванням у 1 мл шприц. Місце ін'єкції готували в асептичних умовах. Якщо було можливо, для ідентифікації некротичної зони пухлини використовували ультразвукове дослідження або комп'ютерну томографію (КТ). Якщо некротичні зони не виявлялися, ін'єкція була спрямована до центра пухлини. Голку вставляли один раз у заздалегідь визначене місце, і 100 мкл суспензії спор (1×10^8 спор *C. novyi*-NT) дозували з рівномірним тиском. Ін'єкційну голку видаляли повільно, і місце ін'єкції стерилізували. Усі собаки одержали щонайменше 1 цикл IT дози 1×10^8 спор в 100 мкл фізіологічного розчину (для біохірургії): 3 собаки одержали один цикл лікування, 13 собак одержували більше 1 циклу, до 4 циклів лікування. Собаки могли одержувати до 4 циклів біохірургії з інтервалом в один тиждень між циклами. Після лікування за собаками спостерігали протягом щонайменше 90 днів після першої IT ін'єкції. Більш тривале спостереження за прогресією захворювання і виживаністю було виправданим у випадку доступності. Дострокове виключення з дослідження було можливим через токсичність або прогресію захворювання.

Оцінка дослідження проводилася, як описано в таблиці 9. Оцінки при попередньому спостереженні здійснювалися з 1 по 14 день перед першим циклом біохірургії. Собак у ході дослідження періодично обстежували як на основі стаціонару, так і на амбулаторній основі. Лабораторні зразки брали, як представлено в таблиці 9, і включалося дослідження повного аналізу крові, біохімії сироватки, протромбінового часу, часткового тромбопластинового часу й аналіз сечі. Візуалізацію проводили при скринінгу, і вона включала місцеву КТ, рентген грудної клітки й ультразвукове дослідження черевної порожнини. Додаткова візуалізація могла бути проведена в ході дослідження на розгляд дослідника.

Несприятливі події оцінювали, коли це можливо, з використанням загальних термінологічних критеріїв для несприятливих подій ветеринарної кооперативної групи онкологів (VCOG-CTCAE) v1,0 (Veterinary Co-operative Oncology Group, 2004) з термінологією з ветеринарного словника для інформації про питання, пов'язані з ліками (VeDDRA) Rev.4 (European Medicines Agency, 2012). Термінологія для несприятливих подій, пов'язаних із проростанням *C. novyi*-NT (реакції цільового вузла), визначена в таблиці 10. Клінічні спостереження без належного VeDDRA або термінології реакції цільового вузла класифікувалися окремо як незакодовані ознаки (таблиця 11). Відношення до лікування *C. novyi*-NT визначалося дослідником, що звітує.

Таблиця 10

Кодовані терміни для опису пухлинних несприятливих подій, пов'язаних з активністю C. novyi-NT

Термін по Класифікації ураження органів і систем органів (SOC)	Груповий термін високого рівня (HLT)	Переважаючий термін (PT)	Груповий термін низького рівня (LLT)
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Абсцес пухлини	Абсцес пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Абсцес пухлини	Закрита рана пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Абсцес пухлини	Пухлинний неприємний запах
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Абсцес пухлини	Некроз пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Абсцес пухлини	Відкрита рана пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Абсцес пухлини	Втрата пухлинної тканини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Абсцес пухлини	тканина пухлини, що відторглася
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Абсцес пухлини	вкривання пухлини виразками
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Зміна консистенції пухлини	Зміна консистенції пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Зміна консистенції пухлини	Щільність пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Зміна консистенції пухлини	М'якість пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Виділення із пухлини	Пухлинна кровотеча
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Виділення із пухлини	Кров'яне виділення із пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Виділення із пухлини	Виділення із пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Виділення із пухлини	Гнійне виділення із пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Виділення із пухлини	Серозне виділення із пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Запалення пухлини	Підвищена температура пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Запалення пухлини	Підвищена температура пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Запалення пухлини	Набряк пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Запалення пухлини	Запалення пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Запалення пухлини	Запальна реакція пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Запалення пухлини	Свербіж пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Запалення пухлини	Набухання пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Пухлинний біль	Біль у пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Шкірне пухлинне порушення	Гематома пухлини

Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Шкірне пухлинне порушення	Зміна кольору пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Шкірне пухлинне порушення	Еритема пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Шкірне пухлинне порушення	Точковий крововилив у пухлини
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Інше пухлинне порушення	Інше пухлинне порушення
Реакція цільового пухлинного вузла	Запалення пухлини	Пухлинний біль	Дискомфорт пухлини

Таблиця 11

Ознаки, які не стосуються VeDDRA, що лежать в основі нозологічної форми або реакції цільового пухлинного вузла, пов'язаних з *C. novyi*-NT

Несприятлива подія (переважний термін)	G-I	G-II	G-III	G-IV	# собак (з настанням щонайменше одного АЕ)	Сумарно
Незакодована ознака	15	2		1 ^a	5	18

^aСтадія IV, зниження в крові еозинофілів, що повідомляється дослідником.

Вимірювання найдовшого діаметра пухлини цільового пухлинного вузла (призначеного для введення) робили на 0 день, 7 день, 14 день, 21 день, 60 день і 90 день після лікування (таблиця 9). Нецільові і нові вузли фіксували, але не вимірювали. Найкращу сумарну відповідь мішені оцінювали на 21 день або після 21-го дня дослідного візиту: повна відповідь (CR) визначалася як повне зникнення цільового вузла; часткова відповідь (PR) визначалася як щонайменше 30 % зменшення найбільшого діаметра цільового вузла; і прогресія цільового захворювання (PD) визначалася як щонайменше 20 % збільшення в найбільшому діаметрі цільового вузла або поява нових нецільових вузлів. Стабільне захворювання (SD) визначалося як недостатнє зниження або збільшення найбільшого діаметра цільового вузла для класифікації його як CR, PR або PD. У випадку абсцесів, пов'язаних *C. novyi*-NT, медична або хірургічна обробка некротичних тканин надавалася на розгляд дослідника.

Оцінку хірургічних зразків і розтини проводили за допомогою департаменту сертифікованих ветеринарних патологів. Зразки тканини фіксували в 10 % нейтральному забуференому формаліні й укладали в парафін. Одержували зрізи, забарвлені H&E і/або забарвлені по Граму, для оцінки відповідно до принципів стандартних керівництв. Для імуногістохімії (IHC) одержували зрізи 5 мкм фіксованої у формаліні, вміщеної в парафін пухлинної тканини, депарафінізували в ксилолі і регідратували проведенням через батарею спиртів. Демаскування антигену здійснювали з використанням демаскуючого розчину (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Первинні антитіла до S100 (DAKO, Carpinteria, CA) і антитіла проти актину гладких м'язів (DAKO, Carpinteria, CA) використовували в розбавленні 1:100. Вторинні антитіла (Vector Laboratories, Burlingame, CA), мічені DAB, використовували в розбавленні 1:500. Зрізи інкубували з реагентом ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) і підзабарвлювали гематоксиліном. Ступінь злоскісності пухлини оцінювали для кожної пухлини на основі опублікованих критеріїв (Dennis, et al., 2011, Patnaik, et al., 1984, Smedley, et al., 2011, Sabattini, et al., 2014).

Приклад 7

Внутрішньопухлинне (IT) введення *C. novyi*-NT - Дослідження 1. Результати

Усі собаки одержували щонайменше один цикл біохірургії, з 53 циклами, отриманими максимально з 64 запланованих. Більшість собак, 10 з 16, одержали призначені чотири цикли. Цикли біохірургії складали окремо один тиждень. Не використовували ніякого контролю плацебо або маскуючого контролю.

У собак, що демонструють ранні відповіді пухлини, токсичність або прогресію захворювання після першого циклу, наступні цикли припинялися. Найбільш загальні несприятливі події вказували на місцеву інфекцію в місці ін'єкції спор *C. novyi*-NT, включаючи: лихоманку (17 випадків), запалення пухлини (12 випадків), абсцес пухлини (10 випадків), анорексію (дев'ять інцидентів) і в'ялість (шість випадків) (таблиця 12). Клінічні ознаки запальної реакції в місці введення в цільовий пухлинний вузол спостерігалися в 14 собак з 16 (87,5 %), включаючи:

запалення пухлини (12/14), абсцес пухлини (7/14), болі в пухлині (5/14) і виділення з пухлини (4/14) (таблиця 13).

Таблиця 12

Короткий виклад несприятливих подій, які спостерігаються під час дослідження

Несприятлива подія (переважний термін)	G-I	G-II	G-III	G-IV	# собак (з настанням щонайменше одного АЕ)	Сумарно
Гіпертермія	14	3			10	17
Запалення пухлини	7	4	1		12	12
Абсцес пухлини	6	3	1		8	10
Анорексія	7	2			8	9
В'ялість	3	2	1		6	6
Кульгавість	5		1		6	6
Набряк	5	1			5	6
Гіпертензія	6				4	6
Нейтрофілія	6				6	6
Виділення із пухлини	6				4	6
Анемія	4		1		5	5
Діарея		3	1		2	4
Біль у пухлині	3	1			4	4
Лейкоцитоз	4				3	4
Лімфаденіт	4				4	4
Зміна консистенції пухлини	3				3	3
Лейкопенія		1		1	1	2
Тромбоцитопенія	1			1	2	2
Локалізований біль		1	1		2	2
Лімфопенія	1		1		2	2
Зміна білків крові	1	1			2	2
Блювання	1	1			2	2
Рідина в черевній порожнині	1	1			1	2
Генералізований біль	1	1			2	2
Порушення електролітного балансу	2				2	2
Порушена свідомість	2				2	2
Порушення шкіри пухлини	2				2	2
Нейтропенія				1	1	1
Неспокій			1		1	1
М'язова слабкість			1		1	1
Лежачий стан			1		1	1
Панікуліт			1		1	1
Геморагія травного тракту		1			1	1
Інфекція шкіри і тканин		1			1	1
Аритмія	1				1	1
Порушення кісток і суглобів	1				1	1
Гіпертрофія серця	1				1	1
Порушення травного тракту	1				1	1
Еозинофілія	1				1	1
Еритема	1				1	1
Гепатомегалія	1				1	1

Гепатопатія	1				1	1
Свербіж у місці введення	1				1	1
Лімфоцитоз	1				1	1
Шум	1				1	1
Нудота	1				1	1
Пальпована маса	1				1	1
Легеневе порушення	1				1	1
Геморагія шкіри	1				1	1
Аномалії сечі	1				1	1
Сумарно						153

Таблиця 13

Короткий виклад клінічного доказу проростання і відповіді на терапію C. novyi-NT

ID випадку	Клінічний доказ проростання ^a	Клінічна відповідь ^b
01-R02	Запалення пухлини, шкірне порушення і виділення	PD
04-R01	Запалення пухлини і біль	CR
04-R02	Запалення пухлини і абсцес	PR
04-R03	Запалення пухлини, зміна консистенції, виділення і біль в пухлині	CR
04-R04	Запалення пухлини і біль	NE
04-R05	Запалення пухлини, зміна консистенції, порушення шкіри і біль	PR
04-R06	Запалення пухлини, абсцес і виділення	CR
04-R08	Абсцес пухлини і виділення	NE
10-R01	-	PD
10-R02	Запалення пухлини, абсцес і біль	SD
11-R01	Запалення пухлини і абсцес	PR
11-R02	Запалення пухлини	SD
11-R04	Абсцес пухлини і зміна консистенції	SD
16-R02	Запалення пухлини	PD
16-R03	Запалення пухлини і абсцес	SD
26-R01		SD

^aКлінічне свідчення проростання C. novyi-NT на 0 день або після 0 дня дослідження, і воно включає реакції цільового пухлинного вузла (фігура 5).

^bКраща відповідь цільового пухлинного вузла, як це визначено протоколом дослідження, після 21 дня дослідження: CR – повна відповідь; PR – часткова відповідь; SD – стабільне захворювання; PD – прогресуюче захворювання; NE – що не піддається аналізу на відповідь на 21 день або після 21 дня дослідження.

Несприятливі події з раннім настанням

- 5 Несприятливі події з раннім настанням стосуються подій, які відбуваються протягом перших 7 днів після першого циклу лікування (13 собак) або єдиного циклу лікування (3 собаки). Різноманітні дані про несприятливі (AE) події відзначалися в багатьох випадках. Несприятливі події з раннім настанням, що відбулися протягом 7 днів або після першого циклу лікування (13 собак, що одержували кілька циклів), або після єдиного циклу лікування (3 собаки, що одержували тільки один цикл), наведені в таблиці 14.

10

Таблиця 14

Короткий виклад несприятливих подій з раннім настанням^a
будь-якого ступеня протягом першого циклу лікування

Несприятлива подія	Тип	Кількість собак ^b (N=16)	Захворюваність (%)
Запалення пухлини	Реакція цільового пухлинного вузла	9	56,3 %
Анорексія	Загальні ознаки або симптоми	4	25,0 %
Набряк	Загальні ознаки або симптоми	4	25,0 %
Лихоманка	Загальні ознаки або симптоми	4	25,0 %
Підвищені лейкоцити	Кров і лімфатична система	2	12,5 %
Гіпертензія	Циркуляторні порушення	2	12,5 %
В'ялість	Загальні ознаки або симптоми	2	12,5 %
Біль	Загальні ознаки або симптоми	2	12,5 %
Абсцес пухлини	Реакція цільового пухлинного вузла	2	12,5 %
Знижений Hb	Кров і лімфатична система	1	6,3 %
Знижений MCV	Кров і лімфатична система	1	6,3 %
Підвищені нейтрофіли	Кров і лімфатична система	1	6,3 %
Знижені еритроцити	Кров і лімфатична система	1	6,3 %
Знижені лейкоцити	Кров і лімфатична система	1	6,3 %
Кров у калі	Порушення травного тракту	1	6,3 %
Діарея	Порушення травного тракту	1	6,3 %
Нудота	Порушення травного тракту	1	6,3 %
Зригування	Порушення травного тракту	1	6,3 %
Блювання	Порушення травного тракту	1	6,3 %
Свербіж у місці введення	Реакції в місці введення	1	6,3 %
Пухлинна кровотеча	Реакція цільового пухлинного вузла	1	6,3 %
Пухлинна еритема	Реакція цільового пухлинного вузла	1	6,3 %

^a До 7 днів і менше, ніж через 7 днів після першого циклу лікування.

^b Кількість собак щонайменше з однією несприятливою подією будь-якого ступеня

Загальні дані про несприятливі події з раннім настанням включали: реакції цільового пухлинного вузла, зміни загальних ознак і симптомів і аномалії показників крові і лімфатичної системи. Більшість несприятливих подій з раннім настанням було від легких до помірних (ступінь I-II), причому запалення пухлини, анорексія, набряк пухлини і лихоманки були подіями, що найбільш часто спостерігаються. Абсцес пухлини III ступеня і запалення пухлини III ступеня відзначалися в двох випадках (10-R02 і R03-16). Дані про несприятливі події з раннім настанням представляються відповідними очікуваним запальним реакціям пухлини, що відбуваються в результаті механізму дії терапевтичних C. novyi-NT.

Несприятливі події з пізнім настанням

Підгрупа з 3 собак одержувала тільки один цикл лікування (за станом на 2 грудня 2012 р.). Несприятливі події з пізнім настанням стосуються подій, що відбуваються після 7 днів, що слідує за єдиним циклом лікування, і вони підсумовані в таблиці 15 для 3 собак (04-R04, 10-R02 і 11-R01). Більшість несприятливих подій з пізнім настанням були від легких до помірних (ступінь I-II), і 11 з 12 даних про несприятливі події з пізнім настанням були відзначені в єдиного індивідуума 04-R04. У цього собаки була представлена хондробластна остеосаркома правої передньої лапи з вихідним виміром LD 94,5 мм (вимірювання за допомогою КТ було не доступно). Ампутація розглядалася через 20 днів після введення спор C. novyi-NT через прогресію хвороби. Два інші індивідууми добре переносили єдиний цикл лікування. Їх АЕ з пізнім настанням обмежувалася винятково легкою лихоманкою (ступінь I).

Таблиця 15

Короткий виклад несприятливих подій з пізнім настанням^a
будь-якого ступеня після першого циклу лікування

Несприятлива подія	Тип	Кількість собак ^b (N=3)	Захворюваність (%)	Дні до дослідження ^c
Лихоманка	Загальні ознаки або симптоми	1	33,3 %	9
Біль	Загальні ознаки або симптоми	1	33,3 %	20
Порушення в місці хірургії	Системні порушення NOS	1	33,3 %	24
Підвищені нейтрофіли	Кров і лімфатична система	1	33,3 %	34
Знижені еритроцити	Кров і лімфатична система	1	33,3 %	34
Підвищені еозинофіли	Кров і лімфатична система	1	33,3 %	61
Підвищені лейкоцити	Кров і лімфатична система	1	33,3 %	61
Нова маса пухлини	Неоплазія	1	33,3 %	82
Лімфоаденопатія	Порушення лімфатичних вузлів	1	33,3 %	82
Знижені тромбоцити	Кров і лімфатична система	1	33,3 %	93

^aПісля 7 днів, які слідує за першим циклом лікування.

^bКількість собак щонайменше з однією несприятливою подією будь-якого ступеня.

^cЗ дня першого лікування.

Таким чином, профіль безпеки, що спостерігається після одного циклу лікування ІТ введенням 1×10^8 спор C. puvu-NT, припускав придатну переносимість. Несприятливі події з раннім настанням і пізнім настанням відповідали очікуванім пухлинним запальним реакціям, що відбуваються в результаті механізму дії C. puvu-NT. Несприятливі події відслідковувалися й ефективно контролювалися, як описано в даному документі.

Несприятливі події, відмічувані в собак при одержанні множинних циклів лікування ІТ введенням C. puvu-NT, наведені в таблиці 9 для несприятливих подій (AEs) будь-якого ступеня й у таблиці 10 для AEs ступеня III і вище.

Різноманіття і кількість даних про несприятливі події після множинних циклів лікування були дуже подібні зі тими, що спостерігаються після одного циклу лікування. Крім того, настання подій, як виявилось, у значній мірі узгоджується з тим, що спостерігається після однократного циклу лікування: з 169 даних для усіх випадків, тільки в 30 вона відзначалася більш ніж через сім днів після попередньої дози. Аналогічно, запалення пухлини, анорексія і лихоманка були подіями, що найбільш часто спостерігаються. Несприятливі події, що відбулися більш ніж в одному випадку, включали: реакції цільового пухлинного вузла, зміни загальних ознак і симптомів, аномалії крові і лімфатичної системи, кульгавість, гіпертензію, лімфаденопатію, діарею і нові маси. Більшість (приблизно 95 %) даних свідчило про інтенсивність від легкої до помірної (ступеня від I до II).

Важкі несприятливі події

Важкі несприятливі події (ступеня III і більше) були відзначені у 5 випадках (таблиця 16). Індивідуум 04-R05 мав збільшення нейтрофілів III ступеня. Індивідуум 10-R01 мав анемію, в'ялість, м'язову слабкість, міозит, біль III ступеня і знаходився в лежачому положенні. Велике метастатичне захворювання при відсутності його виявлення у вихідний момент було діагностоване після розтину індивідуума 10-R01 на 60 день; прогресія захворювання могла мати вплив на дані про несприятливі події в цьому випадку. Індивідуум 10-R02 мав абсцес пухлини III ступеня. Індивідуум 11-R01 мав зниження кількості тромбоцитів IV ступеня через 93 дні після першого циклу лікування, що вирішилося спонтанно. Симптоми зникли через 21 день після візиту на 93 день без якого-небудь медичного лікування. Примітно, що цей індивідуум характеризувався також симптомами тромбоцитопенії I ступеня і II ступеня при скринінгу і

початково, відповідно. Індивідуум 16-R03 мав діарею III ступеня, кульгавість і запалення пухлини, що зникали протягом одного тижня.

Таблиця 16

Короткий виклад несприятливих подій, більш сильних або таких, що дорівнюють III ступеню, для всіх циклів лікування

Несприятлива подія	Тип	Кількість собак ^a (N=16)	Захворюваність (%)
Кульгавість	Порушення опорно-рухового апарату	3	18,8 %
Біль	Загальні ознаки або симптоми	2	12,5 %
Анемія	Кров і лімфатична система	1	6,3 %
Знижені нейтрофіли	Кров і лімфатична система	1	6,3 %
Знижені тромбоцити	Кров і лімфатична система	1	6,3 %
Діарея	Порушення травного тракту	1	6,3 %
В'ялість	Загальні ознаки або симптоми	1	6,3 %
Панікуліт	Загальні ознаки або симптоми	1	6,3 %
Міозит	Порушення опорно-рухового апарату	1	6,3 %
Абсцес пухлини	Реакція цільового пухлинного вузла	1	6,3 %
Запалення пухлини	Реакція цільового пухлинного вузла	1	6,3 %

^aКількість собак щонайменше з однією несприятливою подією будь-якого ступеня.

5 У двох собак були задокументовані нові маси в ході дослідження. Ректальна маса виявлена в індивідуума 04-R04 на 82 день і літичне ураження хребта стадії T1 в індивідуума 10-R01 на 9 день. Ці дані можуть відображати наявність метастазу або другої окремої патології. В обох випадках, зв'язок з терапією C. povuyi-NT був незрозумілим.

Відповідь на лікування C. povuyi-NT

10 Таким чином, лікування C. povuyi-NT собак-компаньйонів у дозі 1×10^8 спор на цикл терапії протягом до 4 циклів добре переноситься. Більшість несприятливих подій, можливо або ймовірно пов'язаних з ліками, що характеризувалися більш ніж III ступенем, дозволялися протягом одного тижня. Очікувані несприятливі події багато в чому були пов'язані з місцевими запальними змінами після внутрішньопухлинної терапії і звичайно дозволялися протягом одного тижня. Несприятливі події і важкі несприятливі події відслідковувалися й ефективно керувалися, як описано в даному документі.

15 З огляду на, що введення C. povuyi-NT супроводжувалося широким доказом біологічної активності, проведена попередня оцінка відповіді первинної пухлини з використанням RECIST 1.1, і вона узагальнена в таблиці 17 нижче.

20

Таблиця 17

Короткий виклад клінічних ознак проростання C. povuyi-NT і відповіді на терапію C. povuyi-NT

ID випадку	Клінічна ознака проростання ^a	Клінічна відповідь ^b
01-R02	Запалення пухлини, порушення шкіри і порушення	PD
04-R01	Запалення пухлини і біль	CR
04-R02	Запалення пухлини і абсцес	PR
04-R03	Запалення пухлини, зміна консистенції, виділення і біль в пухлині	CR
04-R04	Запалення пухлини і біль	NE
04-R05	Запалення пухлини, зміна консистенції, порушення шкіри і біль	PR
04-R06	Запалення пухлини, абсцес і виділення	CR

04-R08	Абсцес пухлини і виділення	NE
10-R01	-	PD
10-R02	Запалення пухлини, абсцес і біль	SD
11-R01	Запалення пухлини і абсцес	PR
11-R02	Запалення пухлини	SD
11-R04	Абсцес пухлини і зміна консистенції	SD
16-R02	Запалення пухлини	PD
16-R03	Запалення пухлини і абсцес	SD
26-R01	-	SD

Проводили оцінку на кращу відповідь собак на 21 день або після 21 дня дослідження. У трьох спостерігалася повна відповідь (CR) на терапію, у трьох спостерігалися часткові відповіді (PR), у п'яти спостерігалася стабільне захворювання (SD), у трьох спостерігалася прогресуюче захворювання (PD), і в двох собак (04-R04 і 04-R08) відповідь не оцінювалася через те, що пухлину, у яку здійснювалося введення, видалили хірургічним шляхом до 21 дня. Ступінь об'єктивної відповіді на біохірургію складав 37,5 % (6 з 16 собак, 95-процентний довірчий інтервал: 15,2–64,6 %). Пухлинні абсцеси і відповіді наставали після від одного до чотирьох циклів біохірургії. Собака 11-R01 мав PR після єдиного циклу, 04-R03 характеризувався CR після трьох циклів, собаки 04-R02 і 04-R05 характеризувалися PRs після чотирьох циклів, у той час як 04-R01 і 04-R06 характеризувалися CRs після чотирьох циклів. На фігурах 7A-F і фігурах 8A-F представлені репрезентативні зміни в собак із частковою (11-R01) і повною (04-R03) відповідями, відповідно. Результат абсцесів відбувався із санацією, і загоєння ран завершувалося через від 2 до 4 тижнів. Проте, явне формування абсцесу перед об'єктивною відповіддю спостерігалася не завжди. Собаки 04-R01 і 04-R06 одержували 4 цикли біохірургії із запаленням пухлини, але без утворення абсцесу при спостереженні до 21 дня дослідного візиту. Проте, повні відповіді в цих двох собак відзначалися на 42 день (незапланованого візиту) і на 60 день дослідних візитів, відповідно.

Більш докладні дані про індивідуальних собак обговорюються нижче:

Енді (11-R01, фігури 7A-F), 10-річний стерилізований пес, мальтійська болонка, мав саркому м'яких тканин II ступеня злоякісності на лівій вухній раковині. Його історія хвороби включала операцію до включення. Він одержував єдину дозу спор C. novyi-NT 18 червня 2012 р. Енді мав набрякання пухлини I ступеня на 1 день (19 червня 2012 р.). Формування абсцесу привело до виразки пухлини і виділення гнійного, некротичного матеріалу. У результаті рана загоїлася без ускладнення. Під час розширеного періоду спостереження спостерігалася тромбоцитопенія IV ступеня на 93 день (19 вересня 2012 р.), що вирішилася до звичайного наступного візиту кілька тижнів після. Стовщена зона шкіри приблизно в 8 мм залишалася після загоєння рани (дивися фігуру 9, що демонструє часову залежність вимірів пухлини протягом циклу дослідження). Це, можливо, являло собою рубцеву тканину або залишкову пухлину.

Моллі (11-R02), 12-річна стерилізована сука, лабрадор-ретривер, мала саркому м'яких тканин II ступеня злоякісності на лівому задньому колінному суглобі. Вона не мала ніякої історії хвороби до включення. Вона одержала 3 ІТ цикли спор C. novyi-NT з наступною 1 в.в. дозою 1×10^8 спор C. novyi-NT через 7 днів після 3-ї ІТ дози. Вона одержувала 1-у, 2-у і 3-ю ІТ дози 11 липня 2012 р., 18 липня 2012 р. і 25 липня 2012 р., відповідно. Разову в.в. дозу спор C. novyi-NT давали 1 серпня 2012 р. через відсутність виявлення біологічної активності попередніх ІТ доз. Єдина відзначена несприятлива подія являла собою гіпертензію I ступеня після 3-ї ІТ дози. Гіпертензія була тимчасовою і самообмеженою, що дозволяється протягом 1 години. Пухлина Моллі була видалена хірургічним шляхом на 30 день (10 серпня 2012 р.) для гістологічного аналізу. Пухлинне утворення підтверджене як саркома м'яких тканин з ділянками некрозу і запалення. Бактерії не були присутні при забарвленні по Граму, підтверджуючи відсутність біологічної активності в цьому випадку.

Рікі (10-R01), 13-річний стерилізований пес, золотистий ретривер, мав пероральну меланому. Його історія хвороби включала операцію до включення. Він одержував 2 ІТ курси спор C. novyi-NT. ІТ введення C. novyi-NT проводили при лікуванні 2 серпня 2012 р. і 9 серпня 2012 р. На 9 день (11 серпня 2012 р.) у Рікі раптово через 2 дні після 2-го циклу лікування почав розвиватися біль у шийному відділі і неврологічний дефіцит задньої ноги. Відзначалася також анемія III ступеня. Була виконана MPT і вона виявила ймовірний панікуліт шийного відділу і компресію шийного відділу спинного мозку. Вводилися кортикостероїди й агенти, що захищають шлунково-кишковий тракт, і Рікі відновився через 3 дні. Не відзначалося ніяких змін у пероральній меланомі, і ніякого додаткового лікування C. novyi-NT не здійснювали. На 21 день (23 серпня 2012 р.), була виконана MPT, і вона показала поліпшення описаного раніше

панікуліту; однак, при КТ грудної клітки виявлялися метастатичні легеневі вузли. Проводили оперативне видалення пероральної меланоми. Лікування тирозиназною вакциною проти меланоми людини було почате 30 серпня 2012 р. На 42 день (13 вересня 2012 р.) у Рікі почався рецидивний біль шийного відділу і біль у передніх кінцівках (через 2 тижні після припинення введення кортикостероїдів) і через 2 тижні після одержання вакцини проти меланоми. Медичне втручання зі знеболювальним не привело до поліпшення через 4 дні, тому введення кортикостероїдів було відновлене. На 46 день відзначалися анемія III ступеня і підвищення АМК. Передбачувану шлунково-кишкову кровотечу лікували агентами, що захищають шлунково-кишковий тракт. На 60 день у Рікі розвинувся колапс і криваве блювання. Була проведена гуманна евтаназія. Розтин показав дисеміновану метастатичну меланому, включаючи підщелепний лімфатичний вузол, лімфатичний вузол середостіння, брижовий лімфатичний вузол, нирку і периспінальну жирову тканину в зоні шийного відділу хребта. Ніяких доказів наявності виразки шлунка або кишечника не було знайдено. Передбачуваною причиною двох епізодів болю в хребті є метастатична меланома. Відношення до C. povui-NT залишилося невизначеним.

Фінеган (04-R02), 11-річний інтактний пес, золотистий ретривер, мав саркому м'яких тканин (гемангіоперіцитому) на правому бічному п'ястку. Його історія хвороби включала операцію до включення. Він одержав 4 ІТ цикли спор C. povui-NT. Несприятливі події були помірними і добре переносилися. Повне знищення пухлини наступило після 4 циклів лікування із залишенням країв нормальної тканини по окружності місця пухлини. Фінеган одержав 1-й, 2-й, 3-й і 4-й цикли лікування 3 серпня 2012 р., 10 серпня 2012 р., 17 серпня 2012 р. і 24 серпня 2012 р., відповідно. Введення C. povui-NT було пов'язане з несприятливими подіями тільки I ступеня після 1-го, 2-го і 3-го циклів. Несприятливі події I і II ступеня відзначалися через 48 годин після 4-ої дози. Інфікування пухлини відзначалося і складалося з лихоманки, лейкоцитозу, нейтрофілії і пов'язаного з пухлиною болю і утворенням абсцесу. Інфікування прогресувало до формування абсцесу і знищення всієї пухлини з мінімальною санацією рани, що відбуваються через 96 годин після 4-ої дози. Виміри пухлини при цьому візиті записували вранці перед повним видаленням усієї пухлинної маси в той же день пізніше. Ампутацію кінцівки проводили замість лікування відкритої рани на 25 день (28 серпня 2012 р.) і давали антибіотики. Фінеган відновився від операції без побічних ефектів і залишався вільним від пухлинної маси 94 дні (05 листопада 2012 р.) після першого циклу його лікування.

Дрейк (04-R01, фігура 10A), 7-річний стерилізований пес, золотистий ретривер, мав саркому м'яких тканин (фібросаркому) в зоні середини верхньої щелепи справа. Він не мав ніякої історії хвороби до включення. Він одержав 4 ІТ цикли спор C. povui-NT. Несприятливі події були помірними і добре переносилися. Повне знищення пухлини відбулося після 4 циклів із залишенням країв нормальної тканини навколо місця пухлини. Дрейк одержував 1-й, 2-й, 3-й і 4-й цикл лікування 13 серпня 2012 р., 20 серпня 2012 р., 27 серпня 2012 р. і 4 вересня 2012 р., відповідно. Інтервали між 1-ою, 2-ою і 3-ю дозами складали 7 днів; у той час як інтервал між 3-ю і 4-ою дозами складав 8 днів для дотримання національного свята. Введення C. povui-NT було пов'язане з помірними несприятливими подіями, включаючи в'ялість і відсутність апетиту I ступеня, і блювання і кров'янисте випорожнення II ступеня, відзначені через 24-48 годин після 1-го циклу. Ці АЕс успішно виліковувалися за допомогою протиблювотного засобу й антибіотика. АЕс відзначалися протягом 24 годин після 4-ї дози, включаючи біль у пухлині і набрякання I ступеня. Не спостерігалось додаткового доказу інфікування пухлини і формування абсцесу. Знищення маси пухлини було очевидне на 60 день (12 жовтня 2012 р.), і пухлина не піддавалася вимірюванню (дивися фігуру 10B, що представляє виміри пухлини залежно від часу протягом дослідження). Зона була щільною і залишалася злегка набряклою, і виконували КТ. Дрейк залишався вільним від пухлини на 86 день (7 листопада 2012 р.) після 1-ої дози.

Бакстер (04-R03, фігура 8A-F), 9-річний стерилізований пес, боксер, мав саркому м'яких тканин II ступеня злоякісності на лівому медіальному передпліччі. Він не мав ніякої історії хвороби до включення. Він одержав три ІТ цикли спор C. povui-NT. Несприятливі події були помірними і добре переносилися. Повне знищення пухлини відбулося після трьох ін'єкцій із залишенням країв нормальної тканини навколо місця пухлини. Бакстер одержав свої 1-у, 2-у і 3-ю дози спор C. povui-NT 17 серпня 2012 р., 24 серпня 2012 р. і 31 серпня 2012 р., відповідно. Введення C. povui-NT добре переносилося, причому не повідомлялося про токсичність, пов'язану з дією досліджуваного агента, після 1-ої або 2-ої дози. Пов'язані з дослідженням несприятливі події відзначалися через 24 години після 3-ї дози. Ці несприятливі події були пов'язані з інфікуванням пухлини і склалися з лихоманки, анорексії, в'ялості і пов'язаного з пухлиною болю, набряку і кровотечі. Несприятливі події були помірними (II ступеня або нижче) і їх лікували за допомогою підтримувальної терапії й анальгетиків. Пухлинна інфекція, пов'язана

з C. povui-NT, прогресувала із залученням усієї пухлини і формуванням абсцесу. Хірургічна санація пухлини 2 вересня 2012 р. привела до швидкого результату AEs. Загоєння рані пройшло без ускладнень і завершилося до 16 жовтня 2012 р. Бакстер залишається вільним від пухлинної маси на 94 день (19 листопада 2012 р.) після його першого циклу лікування (дивися фігуру 11, що представляє виміри пухлини залежно від часу протягом дослідження).

Харлі (26-R01), 7-річний стерилізований пес, лабрадор-ретривер, мав саркому м'яких тканин (гемангіоперицитому) II ступеня злоякісності на правій лапі. Він не мав ніякої історії хвороби до включення. Він одержав 4 ІТ цикли спор C. povui-NT. 1-у, 2-у, 3-ю і 4-у дози вводили 20 серпня 2012 р., 27 серпня 2012 р., 4 вересня 2012 р. і 10 вересня 2012 р. Інтервал між дозами складав 6-8 днів. Підвищення температури відносно базальної відзначалося під час 1-ої і 2-ої доз. ІТ лікування спорами C. povui-NT добре переносилося без повідомлень про які-небудь несприятливі події. Відповіді на лікування не спостерігалося.

Урсула (04-R-04), 11-річна стерилізована сука, метис сенбернара, мала хондробластну остеосаркому правої передньої кінцівки. Її історія хвороби включала операцію до включення. Вона одержала одну ІТ дозу спор C. povui-NT. Ніякого метастатичного захворювання не спостерігалося на момент включення. Після першого циклу лікування 31 серпня 2012 р. спостерігалося формування абсцесу пухлини і запалення навколо пухлини протягом перших 24 годин і це лікували терапевтично за допомогою знеболювального, теплих компресів і внутрішньовенних кристалізмів. Після відсутності поліпшення пухлину/абсцес розтинали на 2 день (2 вересня 2012 р.). Помірно була присутня серозно-геморагічна рідина. В анаеробній культурі виділені C. povui. Антибіотики вводили, починаючи з 4 дня (4 вересня 2012 р.). Місце вирізання лікували як відкриту рану до 20 дня (20 вересня 2012 р.), на який виконали ампутацію через прогресію захворювання. Гістопатологія показала важкий некроз і крововилив разом із хондробластною остеосаркомою, що зберігається. Після ампутації відзначалася інфекція в місці вирізання. Культивування не виявило C. povui. Ніякої ад'ювантної терапії не проводили після ампутації. На 81 день (21 листопада 2012 р.) в Урсулі був присутній ректальний пролапс і було встановлено, що в неї є ректальні поліпи. Рентгенівські знімки грудної клітки, виконані під час цієї оцінки, показали наявність легеневих метастазів.

Габріель (16-R02), 9-річний стерилізований пес, лабрадор-ретривер, мав саркому м'яких тканин I ступеня злоякісності на лівій бічній стороні стегна. Його історія хвороби включала операцію до включення. Він одержав 4 ІТ цикли спор C. povui-NT. ІТ введення спор C. povui-NT у цілому добре переносилося із затримкою в 1 тиждень між 1-ою і 2-ою дозою в зв'язку з діареєю II ступеня, що була відповіддю на медичне втручання. Габріель одержав 1-у, 2-у, 3-ю і 4-у дози 12 вересня 2012 р., 26 вересня 2012 р., 3 жовтня 2012 р. і 10 жовтня 2012 р., відповідно. Токсичність була помірною і складалася в основному з діареї і конституціональних симптомів. Діарея II ступеня відзначалася після кожної дози і добре реагувала на медичне втручання. Після 1-ої дози здійснювалася затримка введення дози на 1 тиждень, приводячи в результаті до 14-денного інтервалу між 1-ою і 2-ою дозою. Затримки введення дози через діарею II ступеня не здійснювалися при введенні наступних доз. Крім того, набрякання пухлини II ступеня спостерігалося на 4 день (16 вересня 2012 р.). Розмір пухлини залишався стабільним з D0 (12 вересня, 201 р.2) до D63 (14 листопада 2012 р.), дні самого останнього дослідного візиту.

Баді (04-R05), 13-річний стерилізований пес, шелті, мав саркому м'яких тканин (рабдоміосаркому) на правому передпліччі. Його історія хвороби включала хірургічне втручання, хіміотерапію, і попереднє клінічне випробування C. povui-NT перед включенням. Ніякого метастатичного захворювання не спостерігалося на момент включення в дослідження. Він одержав 4 ІТ цикли спор C. povui-NT. Клінічно значущі несприятливі події, що збігаються за часом із введенням C. povui-NT, виділялися як нейтропенія III ступеня і лихоманка після 3-го циклу терапії. Ця подія дозволялася протягом 48 годин медичного втручання за допомогою внутрішньовенних антибіотиків і інфузійної терапії. Баді одержав 1-й, 2-й, 3-й і 4-й курси лікування 20 вересня 2012 р., 27 вересня 2012 р., 5 жовтня 2012 р. і 12 жовтня 2012 р. Помірне запалення пухлини (еритема, жар, набрякання) відзначалося як пов'язане з 2 з 4 циклів. Тимчасове зменшення розміру пухлини відзначалося на 4 день (24 вересня 2012 р.). Новий нецільовий вузол відзначався поруч з первинним місцем пухлини на 21 день (12 жовтня 2012 р.). Первинна пухлина була стабільною на 61 день.

Амбра (16-R03), 10-річна стерилізована сука, вівчарка, мала саркому м'яких тканин I ступеня злоякісності на долонній і дорзальній поверхнях лівої лапи. Її історія хвороби включала операцію до включення. Вона одержала 4 ІТ цикли спор C. povui-NT. 1-у, 2-у, 3-ю і 4-у дози вводили 26 вересня 2012 р., 3 жовтня 2012 р., 15 жовтня 2012 р. і 24 жовтня 2012 р. Інтервал між дозами складав 7-12 днів. Амбра мала набряк пухлини II ступеня і біль після 1-ої і 2-ої доз. І ступінь втрати апетиту відзначався на 2-й день (28 вересня 2012р.). На 8-й день (4 жовтня 2012

р., через 1 день після 2-ої дози) відзначалася лихоманка I ступеня, жар у пухлині II ступеня і кульгавість III ступеня. Її пухлину розтинали, і їй давали анальгетики. Діарея III ступеня відзначалася на 11 День (7 жовтня 2012 р.), і її лікували за допомогою медичного втручання. Через пов'язані з пухлиною несприятливі події і діарею 3-ю дозу відклали до 19 дня (15 жовтня 2012 р.). Набрякання пухлини II ступеня знову спостерігалось на 19 день, після 3-ї дози C. povui-NT, і його лікували анальгетиками. Несприятливих подій не відзначалося після 4-ї дози.

Секст (11-R04), 9-річний стерилізований пес, хаскі, мав саркому м'яких тканин I ступеня злоякісності на правій лапі. Він не мав історії хвороби до включення. Він одержав 4 ІТ цикли спор C. povui-NT. Секст одержував 1-у, 2-у, 3-ю і 4-у дози 1 жовтня 2012 р., 8 жовтня 2012 р., 15 жовтня 2012 р. і 22 жовтня 2012 р., відповідно. Введення спор C. povui-NT добре переносилося тільки з помірними несприятливими подіями, що спостерігаються. Після 1-ої дози відзначалася гіпертензія I ступеня і лихоманка. Лихоманка і гіпертензія були самообмежуваними і дозволялися в межах 1 і 2 годин після введення дози, відповідно. На 4-й день (5 жовтня 2012 р.) пухлина була суб'єктивно м'якше, і спостерігалася невелика зона виразки (I ступеня) у місці попередньої біопсії. Виразка продовжувалася до 31 дня (1 листопада 2012 р.), самого останнього поточного дослідного візиту. Ця виразка може бути пов'язана або з досліджуванним агентом, або з ускладненням біопсії, необхідної для включення в дослідження.

Белла (04-R06), 11-річна стерилізована сука, лабрадор-ретривер, мала пухлину тучних клітин (спочатку визначену при аспіруванні як саркома м'яких тканин) на 3 пальці правої задньої ноги з метастазами в підколінному лімфатичному вузлі. Вона не мала історії хвороби до включення. Вона одержала 4 ІТ цикли спор C. povui-NT. Несприятливі події були помірними й обмежувалися лихоманкою I ступеня і запаленням пухлини I ступеня. Белла одержувала 1-й, 2-й, 3-й і 4-й цикли лікування 19 жовтня 2012 р., 26 жовтня 2012 р., 2 листопада 2012 р. і 9 листопада 2012 р. Лихоманка I ступеня збігалася за часом з лікуванням C. povui-NT і запаленням пухлини. Лихоманка і запалення спонтанно дозволялися без необхідності медичного втручання, відмінного від протоколу, що вимагає підшкірне введення рідин за схемою дослідних візитів. Виразка пухлини відзначалася на 21-й день (9 листопада 2012 р.). Фотографії пухлини, послані досліднику власником собаки, показали результат виразок і істотний регрес пухлинної маси. Незапланований візит проводився на 46 день (4 грудня 2012 р.) для того, щоб захопити й оцінити відгук пухлини. Була відзначена повна регресія пухлини.

Фріда (11-R01), 7-річна стерилізована сука, метис німецької вівчарки, мала саркому м'яких тканин (гемангіоперицитому) на правій задній лапі з можливими метастазами в лімфатичних вузлах (за даними КТ). Її історія хвороби включала операцію до включення. Її власник приїхав з нею з Мексики для участі в цьому клінічному випробуванні. Вона одержала 3 ІТ цикли спор C. povui-NT. Несприятливі події були обмежені наростанням і зменшенням лихоманки протягом 48 годин, що дозволялося за допомогою внутрішньовенних рідин і НПЗП. Фріда одержала 1-й, 2-й і 3-й цикли лікування 6 листопада 2012 р., 14 листопада 2012 р. і 21 листопада 2012 р. Єдині значущі несприятливі події включали лихоманку I ступеня, що вимагає госпіталізації і введення рідин, починаючи з 4 дня (10 листопада 2012 р.), і прогресуючу до II ступеня лихоманку на 5 день (11 листопада 2012 р.). Лихоманка дозволялася після 48 годин. Лихоманка I ступеня відзначалася також після 3-го циклу лікування на 18 день (24 листопада 2012 р.). Прогресія пухлини зробила необхідною ампутацію на 21-й день (27 листопада 2012 р.).

Мійя (01-R02), 7-річний стерилізований пес, бордер-колі, мав саркому м'яких тканин (пухлина оболонки периферичних нервів) на лівому боці грудної клітки. Він не мав історії хвороби до включення. Він одержав 3 ІТ цикли спор C. povui-NT. Несприятливі події були помірними і добре переносилися. Запалення пухлини, жар і виділення від серозно-геморагічних до слизисто-гнійних, імовірно, стосуються активності C. povui-NT. 4-й цикл спор C. povui-NT планується. Мійя одержав 1-у, 2-у і 3-ю дози 12 листопада 2012 р., 20 листопада 2012 р. і 27 листопада 2012 р., відповідно. Інтервал між 1-ою і 2-ою дозами складав 8 днів; у той час як інтервал між 2-ою і 3-ю дозами складав 7 днів. Введення C. povui-NT було пов'язано з помірною токсичністю I-II ступеня. Нудота і відрижка I ступеня були відзначені після 1-ої дози, втрата апетиту і в'ялість I ступеня відзначалися після 3-ї дози. Токсичність незабаром дозволялася за допомогою медичного втручання. Найбільша токсичність I ступеня або II ступеня важкості була локалізована у місці пухлини (жар, запалення, свербіж, виділення, від серозно-геморагічних до слизисто-гнійних, і еритема) і виникала протягом 2 днів після введення C. povui-NT. Крім того, вентральний набряк I-II ступеня спостерігався через 2 дні після 1-ої і 3-ї доз.

Танк (10-R02), 10-річний стерилізований пес, змішаної породи, мав саркому м'яких тканин (гемангіоперицитому) на правому боці. Його історія хвороби включала операцію до включення. Він одержав 1 ІТ цикл спор C. povui-NT 12 листопада 2012 р. Лихоманка I ступеня, зниження апетиту, набряк II ступеня навколо пухлини й абсцес пухлини III ступеня відзначалися на 4 день

(16 листопада 2012 р.) після лікування. Медичне втручання, що включає знеболювальні ліки, в./в. рідини й антибіотики широкого спектра дії, було використано для керування абсцесом. Запалення пухлини і навколишній набряк мали результат на 11 день (23 листопада 2012 р.). Танк одержав 2-й цикл лікування на 3 грудня 2012 р. Інтервал між циклами складав 21 день. 2-а

доза була відкладена через період вимивання антибіотиків.

Залежність вимірів пухлини у восьми собак від часу показана на фігурі 12A. На фігурі 12B показано три криві залежності від часу, що були вкорочені через ампутацію або відсутність даних.

У цілому C. povui-NT, що вводяться за допомогою ІТ ін'єкції в дозі 1×10^8 спор за цикл, до 4 циклів лікування виявляють значущу біологічну і протипухлинну активність і, як вважається, добре переносяться собаками-компаньйонами із солідними пухлинами, які спонтанно виникли. Відповіді пухлини є швидкими зі значним некрозом пухлини і з помітною регресією захворювання, що відбувається протягом декількох днів введення C. povui-NT. Більшість несприятливих подій обмежується 1 ступенем і 2 ступенем і відповідає механізму пухлинних запальних реакцій, очікуваних при лікуванні C. povui-NT. Кілька випадків у даний час знаходяться в рамках довгострокового спостереження для оцінки прогресії і виживаності.

Приклад 8

Внутрішньопухлинне (ІТ) введення C. povui-NT. - Дослідження 2 - методи

Проводили дослідження для характеристики дози й об'єму введення C. povui-NT за допомогою ІТ ін'єкції для лікування собак із солідними пухлинами (за винятком остеосаркоми або пухлини тучних клітин).

Собак із солідними пухлинами (за винятком остеосаркоми або пухлини тучних клітин) будь-якої маси, породи, статі або віку обстежували для включення. Критерії включення були подібними з представленими в прикладі 6 за винятком того, що кожен собака мав цитологічний або гістологічний діагноз будь-якого типу раку за винятком остеосаркоми або пухлини тучних клітин і того, що кожен собака мав щонайменше 1 вимірюваний пухлинний вузол із найбільшим діаметром ≥ 1 см.

У ході первісного скринінгового візиту кожному собаці присвоювався унікальний ідентифікаційний номер дослідження собаки, що складається з 5-значного цифрового коду (який може не збігатися з послідовністю номерів скринінгу собак). Перші 2 цифри вказували на місце проведення дослідження (від 01 до 99), середня цифра вказувала на дослідження "5", і останні 2 цифри описували дослідний номер собаки в місці проведення дослідження (від 01 до 99). Наприклад, 11-ому собаці, що надійшов у місце проведення дослідження 9, призначався дослідний номер собаки 09-511. Дослідні номери собак призначалися в тому хронологічному порядку, у якому собаки включалися в дане місце проведення дослідження. Собака розглядалася як включений в дослідження, коли він задовольняв критеріям включення і виключення.

Макропатологічне, гістопатологічне дослідження і розтин проводили, як описано в прикладі 6.

Спори C. povui-NT одержували, як викладено вище, перед доставкою в концентрації 1×10^8 спор/мл і суспендували в стерильному фізіологічному розчині в 2 мл кріопробірках. Кожен цикл лікування C. povui складався з до 5 ін'єкцій 1 мл суспензії спор (1×10^8 спор) для кожної ін'єкції в одне місце цільового вузла. Суспензію спор, що містить 1×10^8 спор, упаковували в окремі кріопробірки для кожної 1 мл ін'єкції, і посудину, шприц і голку утилізували після кожної ін'єкції.

Схема проведення ін'єкції показана на фігурі 13. П'ять місць для 1 мл ін'єкції (представлених квадратами) були розподілені по пухлині: центр і чотири (4) рівномірно розподілені місця ін'єкцій у межах пухлини. Місце для кожної ін'єкції в 1 мл додатково включало 5 місць перенаправлення (як представлено кружками на фігурі 13). У кожне місце перенаправлення надходило 200 мкл суспензії спор. Голку спочатку направляли в центр місця ін'єкції, а потім рівномірно перенаправляли в чотири кути місця ін'єкції без виймання голки. Після завершення першої 1 мл ін'єкції голку виймали і шприц утилізували. Глибина кожної ін'єкції повинна бути визначена належним чином так, щоб досягався найкращий розподіл. Рекомендований розмір шприца складав 1 мл для кожної ін'єкції, рекомендована голка між 22 калібром і 25 калібром. Адекватна довжина голки повинна бути вибрана, ґрунтуючись на глибині пухлинного вузла.

Усі собаки були госпіталізовані від D0 до D2, а потім на розгляд дослідника від 24 до 48 годин після кожного наступного лікування для клінічного спостереження. Рідини вводили всім собакам, включеним у дослідження, під час госпіталізації після лікування C. povui-NT. У дні одержання доз усім собакам в./в. вводили кристалоїди 4 мл/рт.ст./година протягом 2 годин після лікування C. povui-NT.

Дослідні візити і події підсумовані в таблиці 18 при схемі лікування з 8 циклів як приклад. Інтервал дозування, як передбачалося, складав один раз на тиждень, якщо метою було лікування собаки множинними циклами терапії.

Таблиця 18

Короткий виклад дослідних візитів і подій

	Спостереження	Цикл 1*	Цикл 2 - 8†	D70±7 днів	D90±7 днів
	C D-14 по D0	D0	D__		
Інформована згода	X				
Персональні дані	X				
МАСа і життєздатність	X	X	X	X	X
Фізикальне обстеження	X	X	X	X	X
Лабораторні проби	X	X	(X)	(X)	X
Дослідні проби крові	X	X	X	X	X
Дослідний зразок пухлини	X				
Діагностична візуалізація	X				X***
Показник активності	X				
ВКЛЮЧЕННЯ/виключення	X				
ВКЛЮЧЕННЯ	X				
Вимірювання пухлини	X	X	X	X	X
C. novyi-NT*		X*	X†		
Кристаліди**		X**	X**		
Завершення дослідження					X††

*Власники доставляють свою собаку в клініку з D0 по D2, і кристаліди будуть вводиться в./в. всім собакам у клініці. При наступних циклах дослідники будуть заповняти D згідно з кількістю днів у дослідженні порівняно з D0.

**Собакам будуть вводиться в./в. кристаліди.

*** Тільки рентгенографія грудної клітки.

† Собаки можуть не отримувати 8 циклів. В цьому дослідженні рішення про продовження наступного циклу дозування повинне бути прийняте на індивідуальній основі з допомогою консультації між медичним директором, дослідником і спонсором.

†† Після завершення дослідження і якщо системні антибіотики були потрібні для керування несприятливими подіями, рекомендується вводити собакам доксициклін 5-10 мг/кг після операції два рази на день протягом 3 місяців.

5

Приклад 9

Внутрішньопухлинне (ІТ) введення C. novyi-NT. - Дослідження 2 - проміжні результати

За станом на 2 грудня 2012 р. у дослідженні лікували двох собак-компаньйонів. Обидві тварин одержували рівень дози 5×10^8 спор, що вводяться в 5 унікальних місць ІТ ін'єкцією за цикл лікування.

10

Перший собака, Баді (04-503), 9-річний стерилізований пес, бельгійський малінуа, мав саркому м'яких тканин у лівому зап'ясті з початково вимірюваним LD 69 мм (4,4×3,3×0,7 см при визначенні за допомогою КТ). Його історія хвороби включала операцію до включення. Він одержав 2 ІТ цикли спор C. novyi-NT. Несприятливі події були помірними й обмежувалися лихоманкою І ступеня і запаленням пухлини І ступеня. Баді одержував 1-й і 2-й цикли лікування 21 листопада 2012 р. і 28 листопада 2012 р. Лихоманка І ступеня і почервоніння пухлини, набрякання і посилення болю відзначалися протягом 6 годин після першої ін'єкції. Лихоманка дозволялася протягом 6 годин після лікування НПЗП карпрофеном. Помірна виразка пухлини відзначалося на 2 день (23 листопада 2012 р.) після лікування. На 7 день (28 листопада 2012 р.) відзначалося незначне зменшення розмірів пухлинної маси (-12,0 %). Кожен цикл лікування добре переносився без несприятливих подій вище І ступеня.

15

20

Другий собака, Гінес (04-502), 9-річний стерилізований пес, уїтон-тер'єр, мав плоскоклітинну карциному на лівому плечі з початково вимірюваним LD 122 мм (9,1×9,3×14,5 см за даними КТ), гемангіосаркому низького ступеня злоякісності на задній нозі і доведені легеневі метастази (на основі КТ). Його історія хвороби включала операцію до включення. Захворювання, що раніше

25

існувало, мітрального клапана було доведено на основі ехокардіографії, виконаної до включення. Він одержав одну ІТ дозу спор *C. novyi*-NT на 28 листопада 2012 р. Лихоманка III ступеня відзначався протягом 6 годин після лікування, і її лікували в./в. рідинами. На 1 день (29 листопада 2012 р.) оцінювали абсцес пухлинної маси, гнійні виділення і нейтрофілію.

Продовжували вводити в./в. рідини і почали давати знеболювальні препарати (включаючи НПЗП). На 2 день (30 листопада 2012 р.) прогресуюче набрякання пухлини й ознаки сепсису (лихоманка, нейтропенія, гіпоглікемія, гіпоальбумінемія) послужили поштовхом для розтину і зрошення пухлини. Вводили антибіотики широкого спектра дії, гідроксietилкрохмаль і альбумін людини. На 3 день (1 грудня 2012 р.) відзначалося прогресуюче зниження статусу в результаті дихальної недостатності. Вводили етаназуючий розчин. Проводили розтин. Макроскопічні клінічно значущі результати включали вегетативний ендокардит, гнійні вузли в легенях і підшкірні крововиливи, і набряк усього тіла. Посмертні аеробні культури різних тканин і органів (легень, печінки, серця, нирок, селезінки, ШКТ, шлунка) виявили полімікробний ріст бактерій (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, штами *Streptococcus*); анаеробні культури всіх органів і тканин були негативними відносно росту *C. novyi*-NT за винятком пухлинної тканини і сечового міхура. Гістопатологія уражених тканин розглядається. Септичний токсемічний шок розглядається як найбільш ймовірна причина смерті, і зв'язок з лікуванням *C. novyi*-NT на даний момент не ясний.

Приклад 10

Внутрішньопухлинне (ІТ) введення *C. novyi*-NT людині – методи

Фаза I клінічного випробування ІТ введення спор *C. novyi*-NT людині

Фаза I відкритого нерандомізованого багатоцентрового дослідження безпеки однократного ІТ введення спор *C. novyi*-NT у даний час продовжується в хворих із солідними пухлинами, що не піддаються лікуванню. Протокол клінічного дослідження розглянутий і схвалений спостережною радою інституту (IRB) у випадку кожного інституту, що бере участь, і всі нормативні етапи виконувалися відповідно до вказівок Управління з контролю за продуктами і ліками (FDA) (номер NCT01924689). Від усіх хворих було потрібно підписання форми письмової інформованої згоди (ICF) перед включенням у дослідження.

Основними задачами цієї I фази дослідження було визначення профілю безпеки, що обмежує дозу токсичності (DLT), і максимальної переносимої дози (MTD), що вводяться ІТ *C. novyi*-NT. Крім того, досліджували протипухлинну активність терапевтичного агента.

Одержання і ІТ введення спор *C. novyi*-NT у I фазі випробування

Спори *C. novyi*-NT, що клінічно постачаються, упаковували в одноразові 2 мл стерильні й апірогенні флакони типу I з боросилікатного скла з гумовою пробкою й алюмінієвим покриттям з фізично захищеним ковпачком у концентрації $8,52 \times 10^8$ спор/мл, суспендованих у стерильному забуференому фосфатним буфером фізіологічному розчині (PBS) у повному об'ємі 1,0 мл. Флакони зберігали при 2-8°C з контрольованою температурою навколишнього середовища при постійному моніторингу температури. Продукт GMP одержували і складали за допомогою Omnia biologics, Inc. (Rockville, MD).

Після включення хворого у випробування один флакон доставляли до місця проведення дослідження. Подальше одержання *C. novyi*-NT було необхідним і відбувалося в той же день, що і ІТ введення. Розбавлення концентрованої суспензії спор проводили в призначеному кабінеті біологічної безпеки з використанням інфузійних мішків зі стерильним фізіологічним розчином (0,9 %), з розміром, що підходить для досягнення необхідної дози, основаної на виділеній когорті. Об'єм для ін'єкції (3 мл) потім відсмоктували з мішка з фізіологічним розчином і вводили, керуючись рентгенографією. Спори *C. novyi*-NT вводили багатозубою голкою 18 калібру Quadra-Fuse®, Rex-Medical, Conshohocken, PA.

Дизайн і проведення клінічного випробування на людині

Дослідження проводили за стандартним дизайном 3+3 ескалації дози. У хворих повинний бути поставлений діагноз наявності пізньої стадії злоякісної солідної пухлини з цільовим пухлинним вузлом, що піддається вимірюванню, пальпації або чітко ідентифікується під контролем ультразвуку або рентгенографії і піддається черезшкірній ін'єкції спор *C. novyi*-NT. Цільовий вузол повинний мати найбільший діаметр ≥ 1 см і піддаватися вимірюванню, як визначено критеріями RECIST 1.1. Основні критерії включення включали історію злоякісного новоутворення, що не піддається лікуванню; вік щонайменше 18 років; загальний стан ≤ 2 по параметрах Східної об'єднаної онкологічної групи (ECOG); здатність виносити 45 хвилин шляху руху швидкої допомоги і наявність доглядальниці протягом 28 днів після ІТ ін'єкції. Основними критеріями виключення були вагітність; первинна злоякісна пухлина мозку або метастази в мозок; клінічно значущий асцит або клінічно доведена портосистемна гіпертензія або цироз, або історія їхньої наявності; шкала ком Глазго (GCS) < 15 ; рівень креатиніну сироватки $> 1,5$ рази

вище верхньої межі нормальних значень (ULN), хронічна ниркова недостатність, що вимагає гемодіалізу або перитонеального діалізу; насичення киснем (SPCO₂) <95 % (при кімнатному повітрі); середній артеріальний тиск крові (АТ) <70 мм рт. ст.; кількість тромбоцитів $\leq 100000/\text{мм}^3$; гемоглобін <9,0 г/дл; абсолютна кількість нейтрофілів (ANC) <1000/мм³; клінічно значущий ексудативний плеврит, ексудативний перикардит, циркулярний ексудативний перикардит або будь-який випіт більше 1,0 см з будь-якою локалізацією навколо серця; необхідність проведення лікування імуносупресорним агентом; історія трансплантації солідних органів; системна або місцева інфекція.

Задовольняючих критеріям хворих допускали і включали в когорти, які одержують дози. Відповідно до протоколу, хворі залишалися госпіталізованими після введення спор і спостерігалися протягом 8 днів, і хворі поверталися в місце клінічного дослідження для запланованих за схемою повторних відвідувань протягом 12 місяців, у процесі яких проводили оцінки безпеки й ефективності залежно від часу.

Клінічну відповідь і прогресію оцінювали за допомогою RECIST версії 1.1. Об'єктивні відповіді вимірювали за допомогою серійного КТ або МРТ сканування пухлини, що піддається введенню, а також віддалених метастазів (до 5 цільових вузлів). Моніторинг безпеки відносно інфекційних ускладнень або інших пов'язаних з лікуванням несприятливих подій проводили постійно протягом 12 місяців.

Приклад 11

Внутрішньопухлинне (ІТ) введення C. novyi-NT людині - Результати

C. novyi-NT викликає швидке локальне руйнування пухлини в першій хворій людині

Багатообіцяючі результати і сприятливі профілі ризику/переваги біохірургії в порівняльному дослідженні на собаках, у сполученні з результатами, отриманими на щурах, дали основу для спроби біохірургії в людини. Відповідно, була почата I фаза дослідного випробування в хворих людей із солідними пухлинами, що були або резистентні до стандартної терапії, або не доступні для стандартної терапії (NCT01924689). Перший хворий, включений у це випробування, описаний у даному документі: 53-річна жінка з діагнозом заочеревинної лейоміосаркоми в серпні 2006 р. Хвора перенесла декілька хірургічних резекцій і одержувала множинні курси лікування за допомогою хіміотерапії і променевої терапії, включаючи праву радикальну нефректомію і променеву терапію в березні 2007 р., хіміотерапію гемцитабіном, таксоллом, адриаміцином і іфосфамідом, резекцію метастазів у печінці в листопаді 2008 р., множинні клиноподібні резекції правосторонніх легеневи метастазів у грудні 2009 р., лікування трабектедином з березня 2010 р. по квітень 2011 р., множинні клиноподібні резекції лівосторонніх легеневи метастазів у грудні 2010 р., лікування пазопанібом у квітні 2011 р., ліву нижню лобектомію в жовтні 2011 р., абраксан HAI, гемцитабін і авастин з лютого 2012 р. по січень 2013 р., еверолімус і пазопаніб з лютого 2013 р. по липень 2013 р. і помірну артеріальну печіночну емболізацію в серпні 2013 р. і вересні 2013 р. Однак у хворій спостерігалася прогресія з метастатичним захворюванням, що є присутнім у неї в печінці, легенях, очеревині і м'якій тканині правого плеча і прилеглій правій плечовій кістці.

Біохірургію проводили за допомогою запланованої початкової дози 1×10^4 спор C. novyi-NT, що вводяться в її метастатичну пухлину правого плеча багатозубою голкою 18 калібра (день 0, 19 листопада 2013 р.).

Внутрішньопухлинне введення з використанням тризубої голки під контролем КТ

У хворій викликали помірний седативний ефект під дією фентанілу, і вивчали його протягом 35 хвилин. Пристрій 18 калібра Quadra-Fuse (Rex-Medical) (фігура 16A) використовували для ін'єкції під контролем КТ, вставивши 3-зубу голку (27g) у ділянку-мішень ін'єкції (фігури 16B і 16C). Три зубці (кожний з яких мав 2 наскрізні отвори для 4 виходів рідини) (фігура 16D) були розгорнуті на 4, 3 і 2 см у кожній локалізації (фігура 16E), 1 мл аліквоту розчину спор C. novyi-NT вводили протягом поетапного процесу ретракції. Пристрій видаляли після повної ретракції розгорнутих зубців у канюлю голки, і використовували ручне стискання для досягнення гемостазу.

У 1 день хвора мала помірний біль у правому плечі, що поширюється на лопатку, що відповідав на трамадол і ацетамінофен. На 2 день її біль вимагав в.в. введення хворій контрольованого анальгетика гідроморфону, кількість її лейкоцитів збільшилося до 18300 на мкл, і в неї розвинулася лихоманка з максимальною температурою 39,2°C. На 3 день біль у правому плечі і лопатці хворой було важко контролювати. Її максимальна температура складала 37,8°C. КТ сканування правої верхньої кінцівки показало значне руйнування пухлини з газом у м'яких тканинах і з кістковим компонентом пухлини (фігура 14A). Обговорювався некроз її плечової кістки. Аспірація її пухлини під контролем КТ показала ріст C. novyi-NT в умовах анаеробного культивування. Потім хворій почали давати антибіотики, і незабаром після цього

- лихоманка знизилася. На 4 день МРТ правої верхньої кінцівки продемонструвало помітне зменшення узиштя, обмеженого пухлинною масою, порівняно з вихідним (фігура 14В і 14С). Біопсія пухлини показала множину грампозитивних бактерій і відсутність життєздатних пухлинних клітин. Під час біопсії черезшкірний дренаж поміщали в абсцес пухлини для
- 5 дренажу рідини і зруйнованих клітин. Хвора залишалася без температури, і кількість її лейкоцитів поступово нормалізувалося. Їй продовжували давати антибіотики, і вона залишалася в лікарні для в./в. введення анальгетиків до 20 дня, коли вона перейшла на пероральні анальгетики. Вона була виписана з призначенням пероральних метронідазолу і доксицикліну відповідно до протоколу. На 29-й день наступна МРТ продемонструвала продовження
- 10 зменшення пухлинного узиштя (фігура 14D). На 55 день у хворої був локалізований біль у результаті зусилля хворої, що спровокувало патологічний перелом правої проксимальної плечової кістки. Наступна часткова резекція плечової кістки, санація і внутрішня фіксація за допомогою штифта для остеосинтезу і цементної прокладки привели до значного поліпшення в плані болю і збільшенню розмаху руху. Інтраопераційні культури показали ріст *S. pneumoniae* при анаеробних умовах культивування. Гістопатологія продемонструвала інтенсивний некроз
- 15 пухлини з дрібними вогнищами залишкових пухлинних клітин (фігури 15A-D). Хвора продовжує залишатися під спостереженням і має статус активності 1 по шкалі Східної об'єднаної онкологічної групи (ECOG) без клінічних ознак інфекції.

Документи

AGRAWAL, N. et al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15172-7 (2004).

BAI, R.Y., et al. V. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-oncology* 13, 974-982 (2011).

BARRETINA, J., et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nature genetics* 42,715-721 (2010).

BETTEGOWDA, C., et al. The genome and transcriptomes of the anti-tumor agent *Clostridium novyi*-NT. *Nature biotechnology* 24, 1573-1580 (2006).

BREED, R.S., et al. The Number of Colonies Allowable on Satisfactory Agar Plates. *Journal of Bacteriology* 1 (3): 321-331 (1916).

CAREY, R.W., et al. Clostridial oncolysis in man. *Eur. J. Cancer* 3, 37-46 (1967).

CHMIELECKI, J., et al. Whole-exome sequencing identifies a recurrent NAB2-STAT6 fusion in solitary fibrous tumors. *Nature genetics* 45, 131-132 (2013).

DANG, L.H. et al. Targeting Vascular and Avascular Compartments of Tumors with *C. novyi*-NT and Anti-Microtubule Agents. *Cancer Biol Ther* 3, 326-37 (2004).

DANG, L.H., et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *PNAS*. Vol. 98, pages 15155-15160 (2001).

DANG, L.H., et al. U.S. Patent No. 7,344,710.

DENNIS, M.M., et al. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. *Veterinary pathology* 48, 73-84 (2011).

DIAZ, L.A., Jr. et al. Pharmacologic and toxicologic evaluation of *C. novyi*-NT spores. *Toxicol Sci* 88, 562-75 (2005).

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Combined VeDDRA list of clinical terms for reporting suspected adverse reactions in animals and humans to veterinary medicinal products (2012).

GAVHANE, Y.N. et al. Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. *International J. of Pharma Science and Research*, Vol. 2, pages 1-12 (2011).

JAIN, R.K., et al. Can engineered bacteria help control cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14748-50 (2001).

JONES, S., et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 330, 228-231 (2010).

JOSEPH, C., et al. Exomic Analysis of myxoid liposarcomas, synovial sarcomas and osteosarcomas. Submitted, (2013).

LEE, R.S., et al. A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers. *The Journal of clinical investigation* 122, 2983-2988 (2012).

MOSE, J.R. Clostridium Strain M55 and its effect on Malignant Tumors. in *Bactéries anaérobies* 1st edn (ed. Fredette, V.) 229-247 (Montreal: Institut de Microbiologie et l'Hygiène de Université de Montréal, 1967).

MOSE, J.R. Onkolyse durch Clostridien. in *3rd International Congress of Chemotherapy* (ed. Thieme, G.) 1972 (Stuttgart, Germany, 1963).

PAOLONI, M., et al. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer* 8, 147-156 (2008).

PARKER, R.C., et al. Effect of histolytic infection and toxin on transplantable mouse tumors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 66, 461 (1947).

PATNAIK, A.K., et al. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary pathology* 21, 469-474 (1984).

SABATTINI, S., et al. Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3? *Veterinary pathology*, published online February 10, 2014.

SMEDLEY, R.C., et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Veterinary pathology* 48, 54-72 (2011).

VAIL, D.M., et al. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation* 18, 781-792 (2000).

VETERINARY CO-OPERATIVE ONCOLOGY GROUP. Veterinary Co-operative Oncology Group - Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Veterinary and comparative oncology* 2, 195-213 (2004).

VOGELSTEIN, B., et al. Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546-1558 (2013).

Усі документи, процитовані в даній заявці, включені в даний документ як посилання, як якщо вони викладалися в даному документі в повному об'ємі.

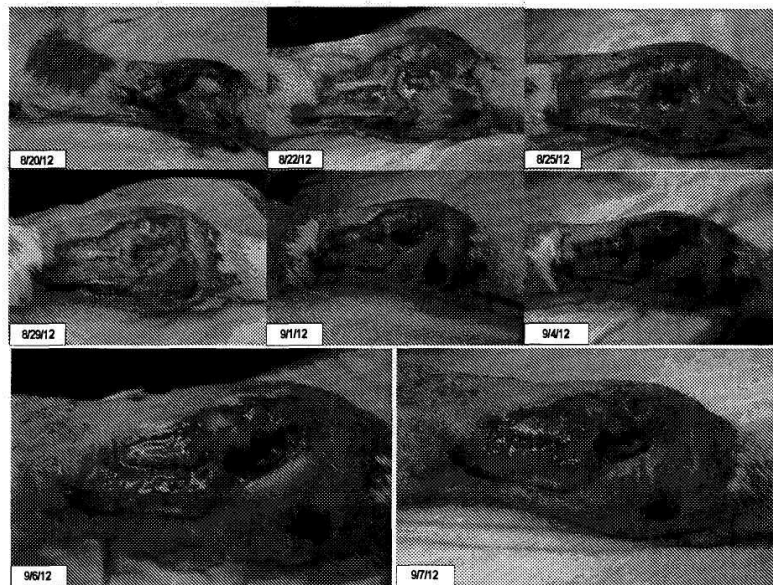
Хоча в даному документі описані ілюстративні варіанти здійснення даного винаходу, варто розуміти, що винахід не обмежується тим, що описано, і що різні інші зміни або модифікації можуть бути зроблені фахівцем у даній галузі техніки без відходу від об'єму або суті винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

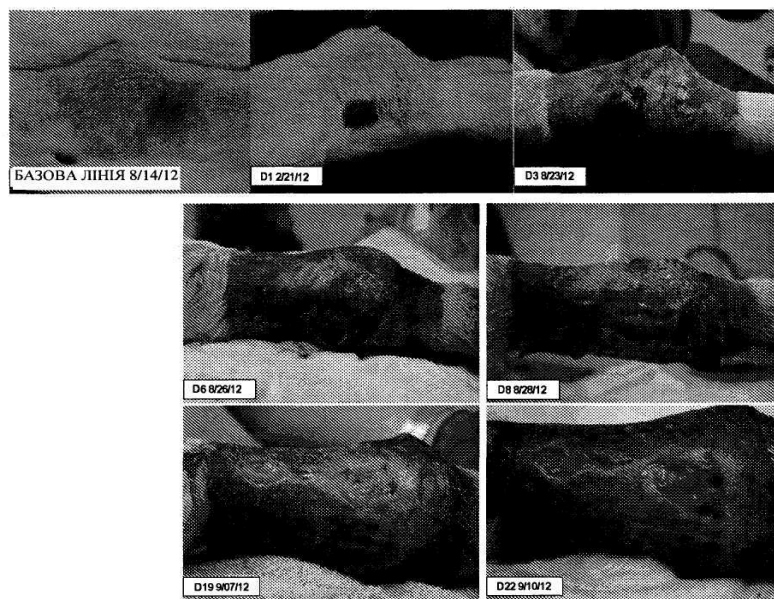
- 10 1. Спосіб лікування або полегшення впливу солідної пухлини, що присутня у людини, який включає введення людині в пухлину одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) С. Novyi-NT, що містить 1×10^3 - 1×10^6 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
- 15 2. Спосіб за п. 1, де солідна пухлина, вибрана з групи, що складається із саркоми м'яких тканин, гепатоцелюлярної карциноми, раку молочної залози, раку підшлункової залози і меланому.
3. Спосіб за п. 1, де солідна пухлина являє собою лейоміосаркому.
4. Спосіб за п. 3, де солідна пухлина являє собою заочеревинну лейоміосаркому.
5. Спосіб за п. 1, де одиниця дози включає 1×10^5 - 1×10^6 КУО С. Novyi-NT.
6. Спосіб за п. 1, де одиниця дози включає 1×10^4 КУО С. Novyi-NT.
- 20 7. Спосіб за п. 1, де КУО С. Novyi-NT вибрані з групи, що складається з вегетативної форми і форми спор.

8. Спосіб за п. 1, де одиниця дози включає 1×10^4 - 1×10^6 спор С. Novyi-NT.
9. Спосіб за п. 8, де одиниця дози включає 1×10^5 - 1×10^6 спор С. Novyi-NT.
10. Спосіб за п. 1, де стадія введення включає ін'єкцію одиниці дози в одне місце локалізації в пухлині.
- 5 11. Спосіб за п. 1, де стадія введення включає ін'єкцію одиниці дози в множинні унікальні місця локалізації в пухлині.
12. Спосіб за п. 1, де стадія введення включає ін'єкцію одиниці дози в 1-5 унікальних місць локалізації в пухлині.
13. Спосіб за п. 1, де стадія введення включає ін'єкцію одиниці дози в 5 або більше унікальних місць локалізації в пухлині.
- 10 14. Спосіб за п. 1, який додатково включає введення при множинних циклах лікування людини, причому кожен цикл лікування включає ін'єкцію однієї одиниці дози КУО С. Novyi-NT у солідну пухлину.
15. Спосіб за п. 14, де здійснюється 1-10 циклів введення.
- 15 16. Спосіб за п. 14, де здійснюється 2-4 цикли введення.
17. Спосіб за п. 14, у якому інтервал між кожним циклом лікування складає 5-100 днів.
18. Спосіб за п. 14, у якому інтервал між кожним циклом лікування складає 7 днів.
19. Спосіб за п. 1, який додатково включає в/в введення рідин людині до, під час і/або після кожного введення спор С. Novyi-NT.
- 20 20. Спосіб за п. 1, який додатково включає забезпечення людини першим курсом антибіотиків протягом періоду часу й у дозуванні, що є ефективним для лікування або полегшення несприятливого побічного ефекту, викликаного С. Novyi-NT.
21. Спосіб за п. 20, де антибіотики вводять протягом двох тижнів після введення С. Novyi-NT.
22. Спосіб за п. 20, де антибіотики вибрані з групи, що складається з амоксициліну, клавуланату, метронідазолу і їхніх сполучень.
- 25 23. Спосіб за п. 20, який додатково включає забезпечення людини другим курсом антибіотиків протягом періоду часу й у дозуванні, що є ефективним для лікування або полегшення несприятливого побічного ефекту, викликаного С. Novyi-NT.
24. Спосіб за п. 23, де другий курс антибіотиків починається після завершення першого курсу антибіотиків і проводиться протягом 1-6 місяців.
- 30 25. Спосіб за п. 23, де другий курс антибіотиків починається після завершення першого курсу антибіотиків і проводиться протягом 3 місяців.
26. Спосіб за п. 23, де антибіотик, використовуваний у другому курсі, являє собою доксициклін.
27. Спосіб за п. 1, який додатково включає одержання людиною терапії, вибраної з групи, що складається з хіміотерапії, променевої терапії, імунотерапії і їхніх сполучень.
- 35 28. Спосіб за п. 27, де імунотерапія включає введення людині інгібітора імунних контрольних точок.
29. Спосіб за п. 1, де солідна пухлина стійка до терапії, вибраної з групи, що складається з хіміотерапії, променевої терапії, імунотерапії і їхніх сполучень.
- 40 30. Спосіб за п. 27, де хіміотерапія включає введення агенту, вибраного з групи, що складається з антиметаболіту, інгібітора мікротрубочок, агента, що ушкоджує ДНК, антибіотика, агента проти ангіогенезу, молекулярно спрямованого агента і їхніх сполучень.
31. Спосіб за п. 27, де хіміотерапія включає введення людині агента, вибраного з групи, що складається з гемцитабіну, таксолу, адриаміцину, іфосфаміду, трабектедину, пазопанібу, абраксану, авастину, еверолімусу і їхніх сполучень.
- 45 32. Спосіб за п. 1, де солідна пухлина не піддається стандартній терапії або солідна пухлина не доступна для стандартної терапії.
33. Спосіб за п. 1, де індукується потужна місцева запальна відповідь і адаптивна імунна відповідь у людини.
- 50 34. Спосіб мікроскопічно точного знищення пухлинних клітин у людини, який включає введення людині усередину пухлини одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) С. Novyi-NT, що включає 1×10^3 - 1×10^6 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
35. Спосіб лікування або ослаблення впливу солідної пухлини, що метастазувала в одне або більше місць у людини, що включає введення людині усередину пухлини одиниці дози колонієутворювальних одиниць (КУО) С. Novyi-NT, що включає щонайменше 1×10^3 - 1×10^6 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
- 55 36. Спосіб за п. 35, де щонайменше одне місце знаходиться дистальніше вихідної солідної пухлини.

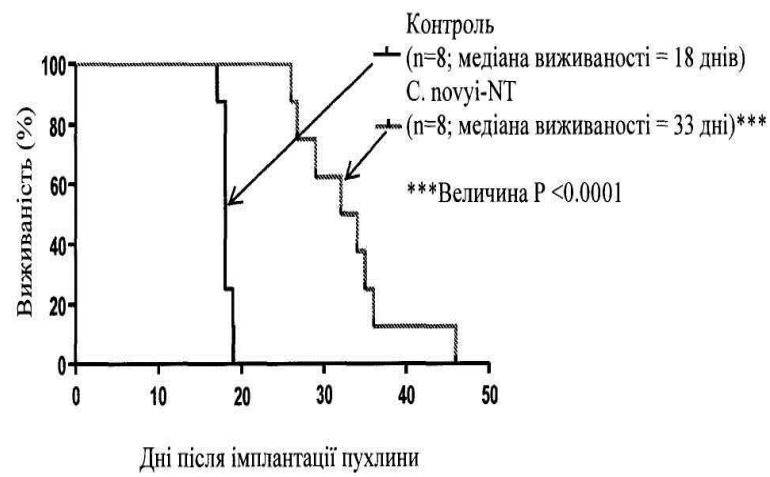
37. Спосіб циторедукції солідної пухлини, що присутня у людини, який включає введення людині в пухлину одиниці дози КУО С. Novyi-NT, що включає 1×10^3 - 1×10^6 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
- 5 38. Спосіб за п. 37, де солідна пухлина вибрана з групи, що складається із саркоми м'яких тканин, гепатоцелюлярної карциноми, раку молочної залози, раку підшлункової залози і меланоми.
39. Спосіб циторедукції солідної пухлини, що присутня у людини, який включає введення людині в пухлину від одного до трьох циклів одиниць дози спор С. Novyi-NT, що включає 1×10^4 спор на цикл, причому кожна одиниця дози С. Novyi-NT суспендована у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
- 10 40. Спосіб лікування або ослаблення ефекту солідної пухлини, що присутня у людини, який включає введення людині в пухлину від одного до чотирьох циклів одиниць дози спор С. Novyi-NT, що включає 1×10^4 спор на цикл, причому кожна одиниця дози спор С. Novyi-NT суспендована у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
- 15 41. Спосіб знищення солідної пухлини, що присутня у людини, який включає введення людині в пухлину одиниці дози КУО С. Novyi-NT, що включає 1×10^3 - 1×10^6 КУО, суспендованих у фармацевтично прийнятному носії або розчині, де пухлину знищують, залишаючи край нормальної тканини.
42. Спосіб за п. 41, де пухлина являє собою саркому.
- 20 43. Одиниця дози КУО С. Novyi-NT, що включає 1×10^3 - 1×10^6 КУО у фармацевтично прийнятному носії або розчині, що є ефективною для лікування або ослаблення впливу солідної пухлини, що присутня у людини.
44. Одиниця дози за п. 43, де КУО С. Novyi-NT вибрані з групи, що складається з вегетативної форми і форми спор.
- 25 45. Одиниця дози за п. 43, де одиниця дози включає 1×10^4 - 1×10^6 спор С. Novyi-NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
46. Одиниця дози за п. 43, де одиниця дози включає 1×10^6 - 1×10^6 спор С. Novyi-NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
47. Одиниця дози за п. 43, де одиниця дози включає 1×10^4 спор С. Novyi-NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
- 30 48. Набір для лікування або ослаблення впливу солідної пухлини, що присутня у людини, який включає одиницю дози КУО С. Novyi-NT, що включає 1×10^3 - 1×10^6 КУО у фармацевтично прийнятному носії або розчині, і інструкції із застосування набору.
49. Набір за п. 48, який додатково включає один або більше антибіотиків, що ефективні для лікування або полегшення несприятливого побічного ефекту, викликаного КУО С. Novyi-NT.
- 35 50. Набір за п. 48, де КУО С. Novyi-NT вибрані з групи, що складається з вегетативної форми і форми спор.
51. Набір за п. 48, де одиниця дози включає 1×10^4 - 1×10^6 спор С. Novyi-NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
- 40 52. Набір за п. 48, де одиниця дози включає 1×10^5 - 1×10^6 спор С. Novyi-NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
53. Одиниця дози за п. 48, де одиниця дози включає 1×10^4 спор С. Novyi-NT у фармацевтично прийнятному носії або розчині.
54. Набір за п. 48, який додатково включає 1-4 одиниці дози С. Novyi-NT для проведення 1-4 циклів лікування.
- 45 55. Набір за п. 51, який додатково включає 1-4 одиниці дози спор С. Novyi-NT для проведення 1-4 циклів лікування.



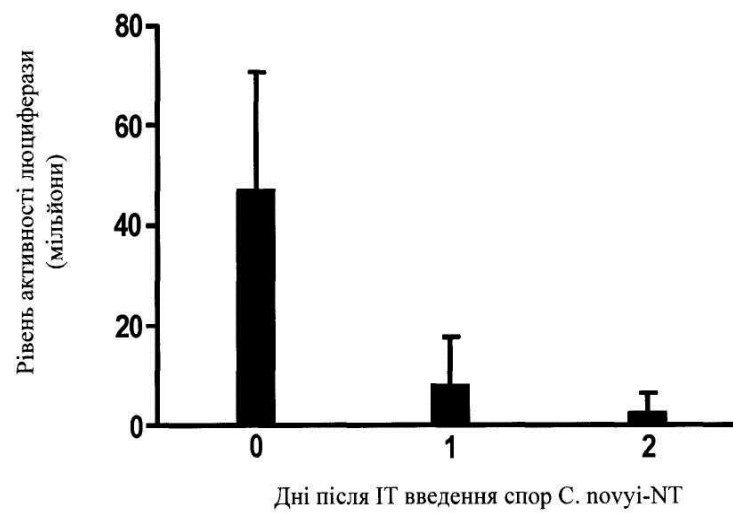
Фіг. 1А



Фіг. 1В



Фіг. 2А



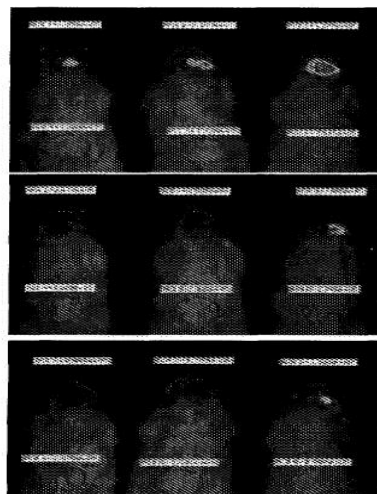
Фіг. 2С

Дні після ІТ введення
спор *C. novyi*-NT

0

1

2



Кольорова смуга
Мін = 3×10^5
Макс = 3×10^6

Fig. 2B

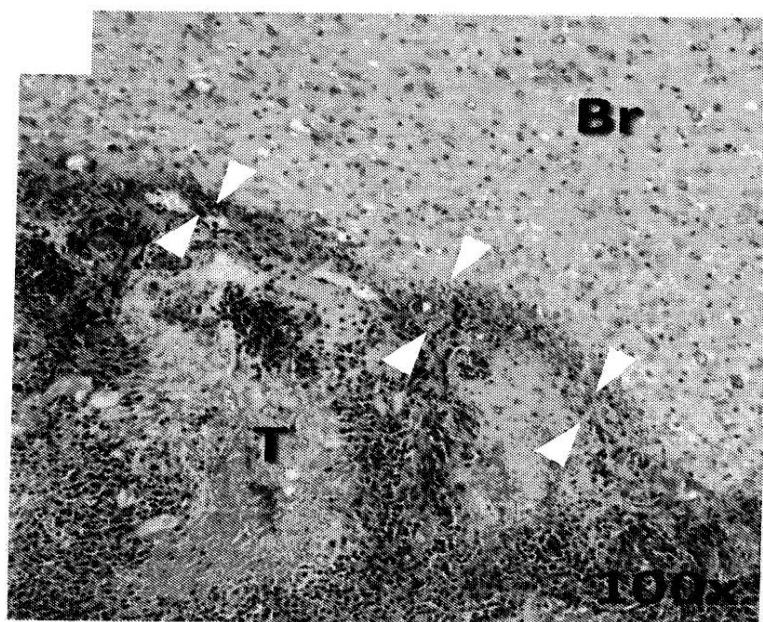


Fig. 3A

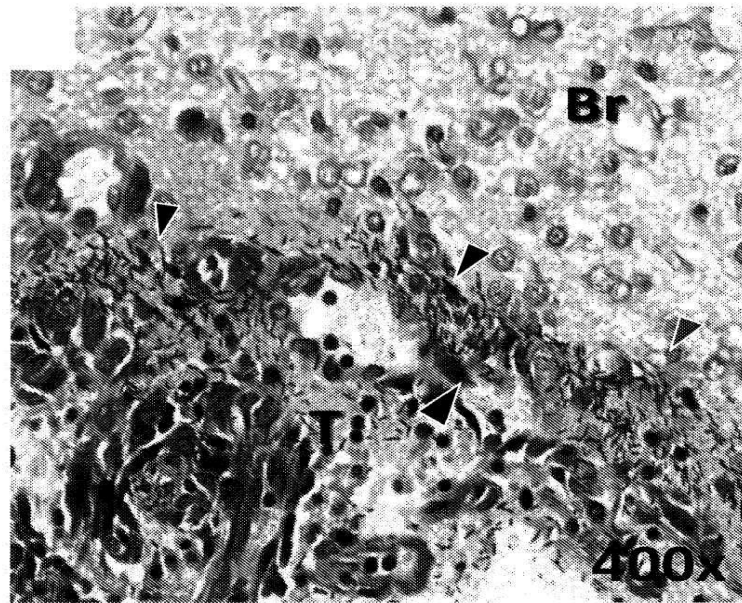


Fig. 3B

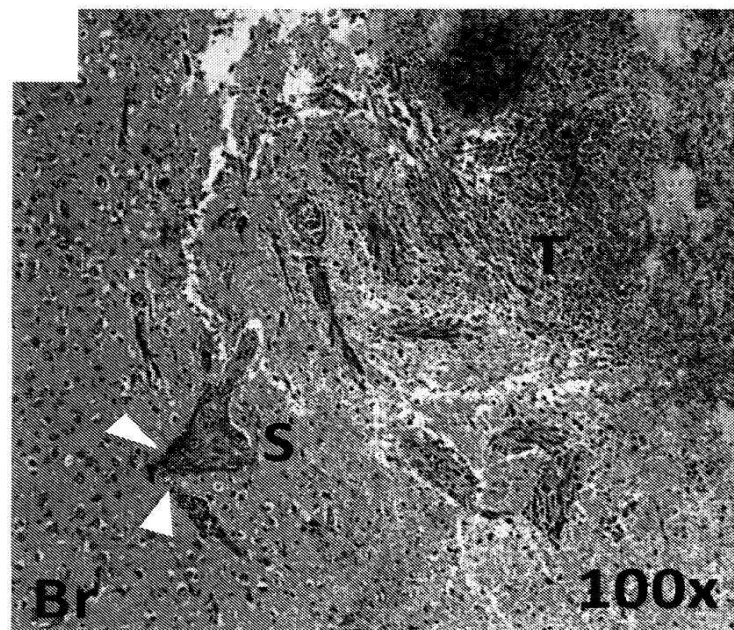
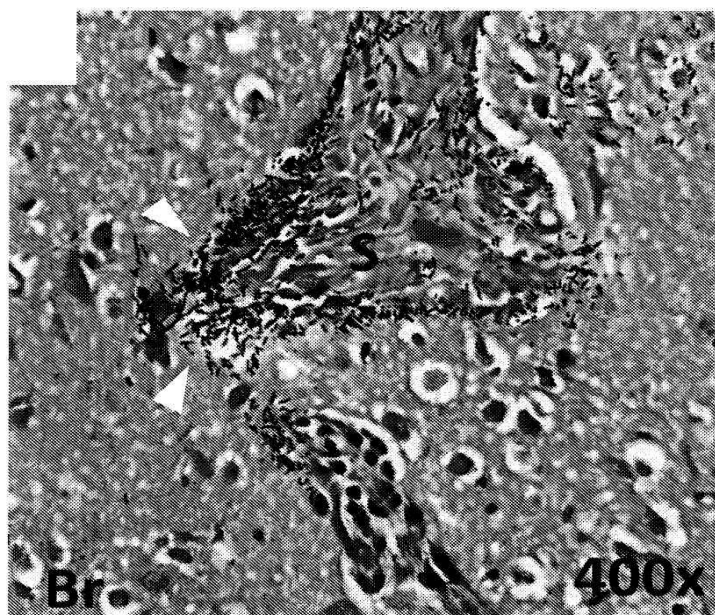


Fig. 4A



Фіг. 4В

С. NOVYI ДЛІА ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

10-1/44					
04-R03		16-R03	16-R02	11-R04	11-R02
Характеристика зразка					
Тип пухлини	STS	STS	STS	STS	STS-PNST
Локалізація пухлини	Ліве передпліччя	Ліва передня лапа	Ліва гомілка	Права передня лапа	Лівий колінний суглоб задньої
Тип зразка	FFPE	FFPE	FFPE	FFPE	FFPE
Надходження зразка	Перед початком дослідження	Перед початком дослідження	Після початку дослідження	Перед початком дослідження	Перед початком дослідження
Патологічна чистота пухлини	90%	70%	70%	70%	80%
Мутація на основі чистоти пухлини	71%	37%	41%	51%	45%
Джерело нормальної ДНК	Кров	Кров	Кров	Кров	Кров
Характеристика аналізів					
Тип аналізу	Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління
Підхід до збагачення	Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині
Аналізовані області геному	30194	30194 кодованих	30194 кодованих	30194 кодованих	30194 кодованих генів
Секвеновані основи	32893252 основи	32893252 основи	32893252 основи	32893252 основи	32893252 основи
Довжина зчитуваної	100 п.о.	100 п.о.	100 п.о.	100 п.о.	100 п.о.
Соматичні (специфічні для пухлини) зміни					
Число ідентифікованих змін	8	2	4	3	14
Число ідентифікованих змін	2	0	0	0	17

Фіг. 5

С. NOVYI ДЛІА ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

10-2/44

Загальна статистика (пухлина)						
	Секвеновані основи, картовані в геномі	14429862200	21425345200	12124067000	19196019800	15780857800
	Секвеновані основи, картовані в областях-мішенях	6089590437	9789715947	4858071422	11459270433	10233153813
	Фракція секвенованих основ, картованих в областях-мішенях	42%	46%	40%	60%	65%
	Основи в областях-мішенях щонайменше з 10 зчитуваннями	36637164	37343313	36043139	50430237	48966409
	Фракції основ в областях-мішенях щонайменше з 10 зчитуваннями	92%	94%	91%	94%	91%
Загальна статистика (норма)						
	Секвеновані основи, картовані в геномі	19693458500	14561175800	17329903700	15677511300	14950239100
	Секвеновані основи, картовані в областях-мішенях	7318085121	5586179511	6882015752	8201336539	7394567092
	Фракція секвенованих основ, картованих в областях-мішенях	37%	38%	40%	52%	49%
	Основи в областях-мішенях щонайменше з 10 зчитуваннями	37102993	36602585	38229451	50263991	50057763
	Фракції основ в областях-мішенях щонайменше з 10 зчитуваннями	93%	92%	96%	93%	93%
Зчитувана послідовність у кожній основі (пухлина)						
	Середня кількість сумарних послідовностей високої якості у кожній основі	138	227	110	190	172

Фіг. 5 (продовження)

С. NOVYI ДЛІА ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

10-3/44

	Середня кількість індивідуальних послідовностей високої якості у кожній основі	114	202	99	160	127
Зчитувана послідовність у кожній основі (норма)						
	Середня кількість сумарних послідовностей високої якості у кожній основі	178	137	168	145	130
	Середня кількість індивідуальних послідовностей високої якості у кожній основі	149	121	152	127	112
Відповідність пухлина/норма						
	SNP, що присутні в зародковій лінії	8204	13896	15138	16454	12407
	Процент відповідності T/N	100%	100%	100%	100%	100%
Висновкові дані						
	Мутації/Мб	0.24	0.06	0.12	0.09	0.43
	CNA/Мб	0.06	0.00	0.00	0.00	0.52

STS-саркома м'яких тканин; STS-PNST -саркома м'яких тканин, пухлина оболонки периферичних нервів; Т-пухлина; N- норма; Мб - мегабаза; CNA- зміни кількості копій; SNP - поліморфізми одиничних нуклеотидів; FFPE – фіксований в формаліні, вміщений в парафін; NA-

Фіг. 5 (продовження)

С. NOVYI ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

11-1/44

11-R01	04-R08	04-R02	04-R01	01-R02	04-R04	Мін.Макс.Середнє		
STS-PNST Ліва вушна раковина	STS-PNST Права задня лапа	STS-PNST Праве зап'ястя	STS-PNST Зона середини верхньої щелепи справа	STS-PNST Лівий бік грудини	OSA, Права плечова кістка	NA	NA	NA
FFPE	FFPE	FFPE	FFPE	FFPE	FFPE	NA	NA	NA
Після початку дослідження	Після початку дослідження	Перед початком дослідження	Перед початком дослідження	Перед початком дослідження	Перед початком дослідження	NA	NA	NA
90%	90%	90%	80%	80%	90%	70%	90%	81%
54%	67%	69%	NA	29%	65%	29%	71%	52%
Кров	Кров	Кров	Кров	Кров	Кров	NA	NA	NA
Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління	Секвенування нового покоління	NA	NA	NA
Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині	Захоплення ДНК в розчині	NA	NA	NA
30194 кодованих генів	30194 кодованих генів	30194 кодованих генів	30194 кодованих генів	30194 кодованих генів	30194 кодованих генів	NA	NA	NA

Тільки
STS
Тільки
STS

Фіг. 5 (продовження)

С. NOVYI ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

11-2/44

32893252 основи	32893252 основи	32893252 основи	32893252 основи	32893252 основи	32893252 основи	NA	NA	NA
100 п.о.	100 п.о.	100 п.о.	100 п.о.	100 п.о.	100 п.о.	NA	NA	NA
4	95	6	0	20	14	0	95	16
0	0	0	0	9	4	0	17	3
19163476700	8055248900	19418702600	23322445500	9336883200	10439082100	8055248900	23322445500	15699271909
8571289371	3317956697	8491584341	9068570137	3967568909	4609388923	3317956697	11459270433	7314196403
45%	41%	44%	39%	42%	44%	38.9%	64.8%	46.2%
37167238	35180875	37503866	36941231"	36056022	36426112	35180875	50430237	38972328
94%	89%	94%	93%	91%	92%	88.5%	94.4%	92.1%
16042683700	16831763000	15728989700	16160073600	15151630300	18183947700	14561175800	19696458500	16391943309
6245786511	6370965466	6167005020	6222258939	5777414557	6883542265	5586179511	8201336539	6640832434
39%	38%	39%	39%	38%	38%	37.2%	52.3%	40.7%
37018789	37230015	37216686	37236461	37246921	37128881	36602585	50263991	39575867
93%	94%	94%	94%	94%	93%	92.1%	96.2%	93.6%
195	73	190	201	84	104	73	227	153
174	67	159	170	59	79	59	202	128
154	152	150	152	140	166	130	178	152

Тільки
Тільки
STS

Фіг. 5 (продовження)

С. NOVYI ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

11-3/44

125	130	127	133	120	143	112	152	131
14801	12953	14163	14502	9828	11861	8204	16454	13110
100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
0.12	2.89	0.18	0.00	0.61	0.43	0.00	2.89	0.47
0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.12	0.00	0.52	0.09

Тільки STS

Тільки STS

Фіг. 5 (продовження)

С. NOVYI ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

12-1/44

ID	Тип	Символ гена	Опис гена	Обліковий номер гена	Положення	Ступінь	Тип мутації
04-R03	STS	<i>AIG1</i>	Індукований андрогенами 1	ENSCAFG00000000303	chr1:37686977-37687647	3.2	Ампліфікація
		<i>NKAIN1</i>	Взмодіючий 1 з АТФазою, що транспортує N+/K+	ENSCAFG000000011175	chr2:72699008-72705959	3.1	Ампліфікація
11-R02	STS-PNST	<i>PIK3C2B</i>	Каталітична субодиниця типу 2 бета фосфатидилінозитол-4-фосфат-3-кінази	ENSCAFG000000009661	chr38:4011051-4013432	10.2	Ампліфікація
		<i>MDM4</i>	Гомолог Mdm4 білка, що зв'язує p53	ENSCAFG000000009669	chr38:4055972-4103319	12.3	Ампліфікація
		<i>LRRN2</i>	Нейрональний лейцинобагачений повтор 2	ENSCAFG000000009675	chr38:4164479-4166666	4.1	Ампліфікація
		<i>NFASC</i>	Нейрофасцин	ENSCAFG000000009901	chr38:4474563-4542491	3.2	Ампліфікація
		<i>CNTN2</i>	Контактин 2 (аксональний)	ENSCAFG000000024609	chr38:4576761-4596329	7.3	Ампліфікація
		<i>TMEM81</i>	Трансмембранний білок 81	ENSCAFG000000009956	chr38:4604335-4605118	10.0	Ампліфікація
		<i>RBBP5</i>	Ретинобластомний зв'язувальний білок 5	ENSCAFG000000009970	chr38:4608590-4634589	11.4	Ампліфікація
		<i>DUSTY_CANFA</i>	Подвійна серин/треонін і тирозин-протеїнкіназа	ENSCAFG000000009999	chr38:4669577-4715897	11.3	Ампліфікація
		<i>TMCC2</i>	Трансмембранний і суперспіральний домен сімейства 2	ENSCAFG000000010030	chr38:4734043-4773669	5.8	Ампліфікація
		<i>NUAK2</i>	Сімейство NUAK, SNF-1-подібна кіназа 2	ENSCAFG000000010038	chr38:4798849-4816487	7.6	Ампліфікація
		<i>KLHC8A</i>	Що містить домен kelch 8A	ENSCAFG000000010046	chr38:4833445-4838972	6.7	Ампліфікація

Фіг. 6

С. NOVYI ДЛІА ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

12-2/44

04-R04	OSA _c	<i>LEMD1</i>	Що містить домен LEM1	ENSCAFG00000025208	chr38:4872059-4896801	10.4	Ампліфікація
		<i>CDK18</i>	Циклізалежна кінза 18	ENSCAFG00000010082	chr38:4393764-5001820	7.7	Ампліфікація
		<i>Новий ген</i>	Неохарактеризований білок	ENSCAFGG00000010109	chr38:5028755-5029725	6.2	Ампліфікація
		<i>MFSD4</i>	Домен 4, що містить головний організатор надсімейства	ENSCAFG00000010137	chr38:5037069-5063455	7.6	Ампліфікація
		<i>ELK4</i>	ELK4, білок EST-домену (SRF допоміжний білок 1)	ENSCAFG00000010144	chr38:5077862-5083778	11.7	Ампліфікація
		<i>SLC45A3</i>	Член 3 сімейства 45 транспортерів розчинних речовин	ENSCAF G00000010148	chr38:5111404-5116718	5.8	Ампліфікація
		<i>PG8D5</i>	Що походить від PiggyBac мобільного генетичного елемента 5	ENSCAFG00000012098	chr4:11989074-12023545	6.3	Ампліфікація
		<i>DLG5</i>	Диск, великий гомолог 5 (дрозофіла)	ENSCAFG00000015499	chr4:30898333-31016619	5.4	Ампліфікація
		<i>MAT1A</i>	Метіонінаденозилтрансфераза I, альфа	ENSCAFG00000015807	chr4:32G62979-32676594	5.3	Ампліфікація
		<i>Новий ген</i>	Неохарактеризований білок	ENSCAFG00000015098	chr20:47978916-47984829	5.3	Ампліфікація
		<i>AIG1</i>	Індукований андрогенами 1	ENSCAFG00000000303	chr1:37686977-37687647	5.7	Ампліфікація
		<i>XM_844172.1</i>	Неохарактеризований білок	ENSCAFG00000023337	chr2:7738782-7751246	5.9	Ампліфікація
		<i>Новий ген</i>	Неохарактеризований білок	ENSCAFG00000024028	chr3:40494283-40494577	6.4	Ампліфікація
		<i>SIX3</i>	SIX гомеобокс 3	ENSCAFG0000002547	chr10:50465860-50469140	5.3	Ампліфікація

Фіг. 6 (продовження)

С. NOVYI ДЛІА ЛІКУВАННЯ СОЛІДНИХ
ПУХЛИН ЛЮДИНИ

12-3/44

01-R02	STS-PNST	<i>LST2</i>	Специфічний для лейкоцитів транскрипт 1	ENSCAFG00000023691	chr12:4088376-4089275	6.7	Ампліфікація
		<i>FAM84A</i>	Член А сімейства з гомологією послідовностей 84	ENSCAFG00000003647	chr17:13630517-13631423	5.0	Ампліфікація
		<i>TLX2</i>	Гомеобокс 2 Т-клітинної лейкоїї	ENSCAFG00000008445	chr17:51694813-51696234	5.1	Ампліфікація
		<i>SOX3</i>	Бокс 3 SRY (що визначає пів області Y)	ENSCAFG00000019026	chrX: 113431902-113433234	5.6	Ампліфікація
		<i>Новий ген</i>	Неохарактеризований білок	ENSCAFG00000019588	chrX: 125230197-125231662	5.3	Ампліфікація

STS-саркома м'яких тканин; STS-PNST - саркома м'яких тканин, пухлина оболонки периферичних нервів; OSA_c -хондробластна остеосаркома

Фіг. 6 (продовження)

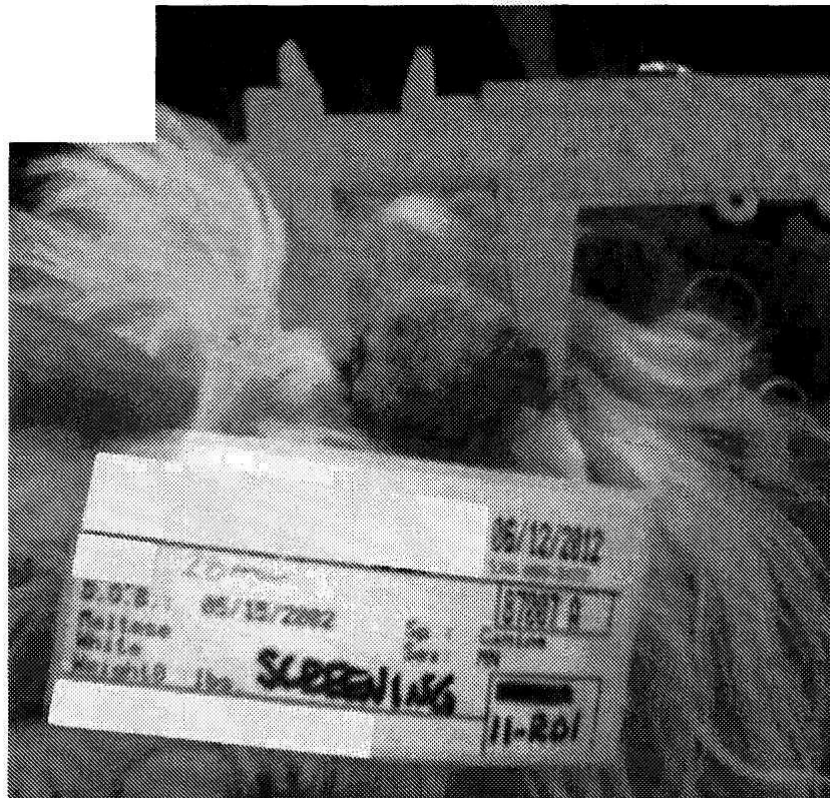


Fig. 7A

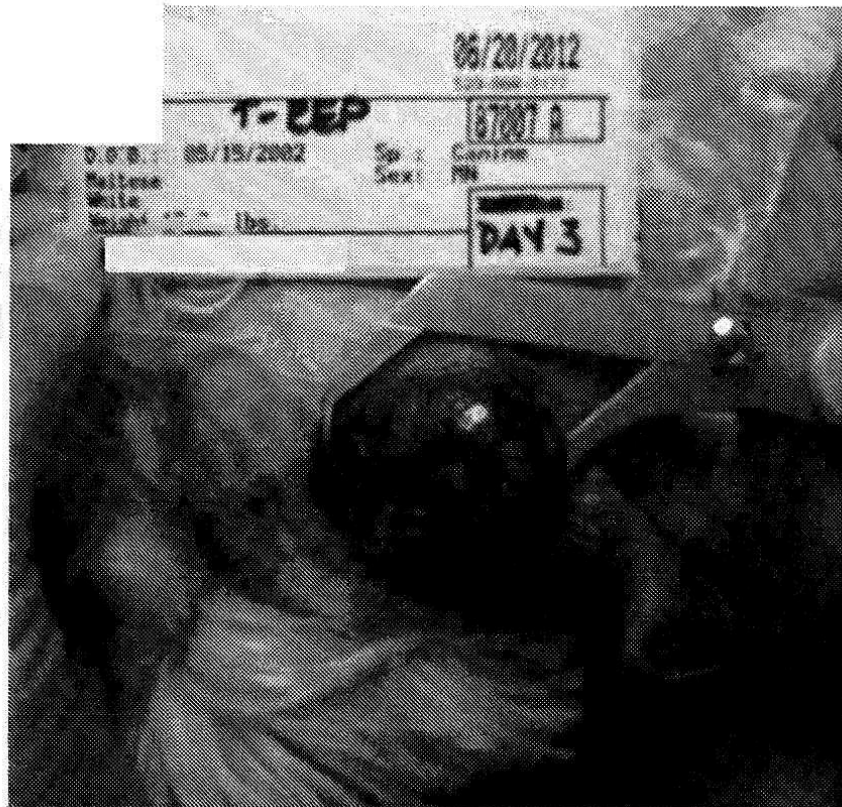


Fig. 7B



Fig. 7C



Fig. 7D

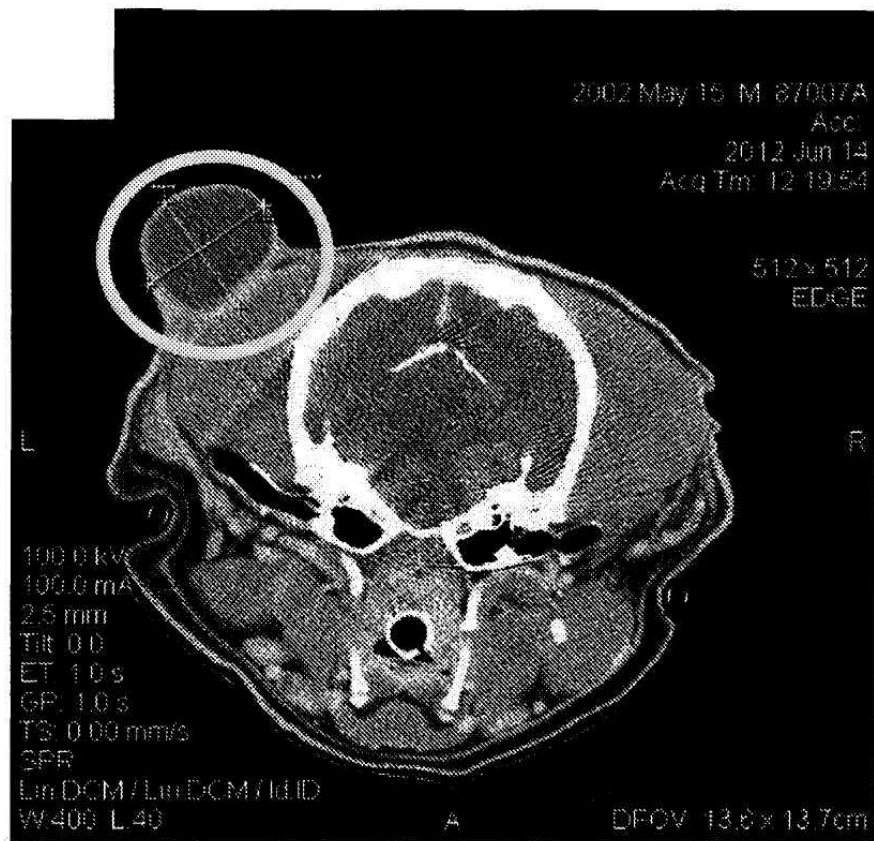


Fig. 7E



Fig. 7F

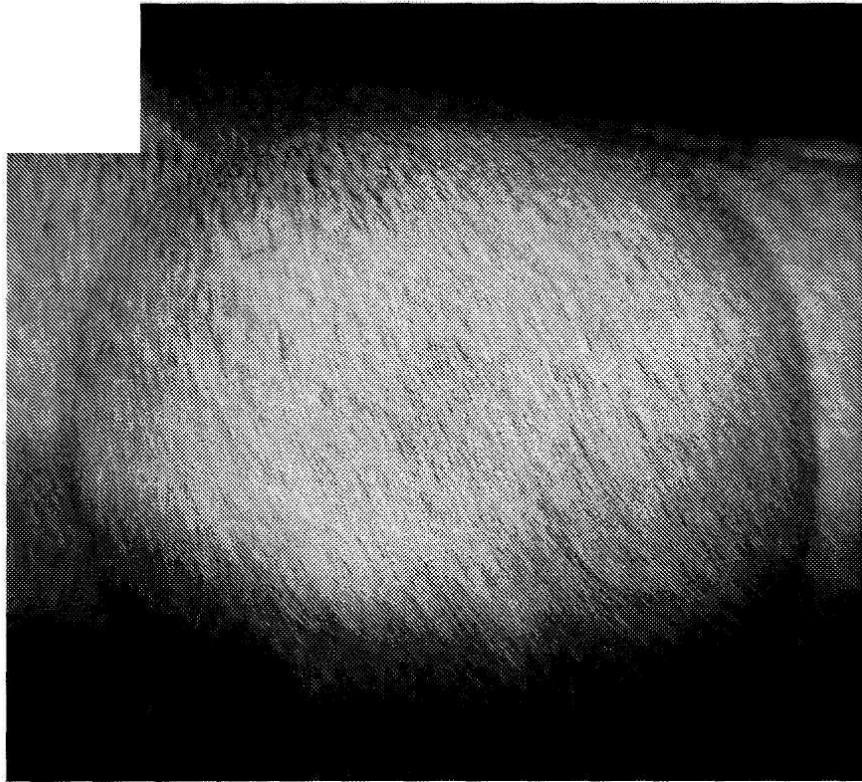


Fig. 8A

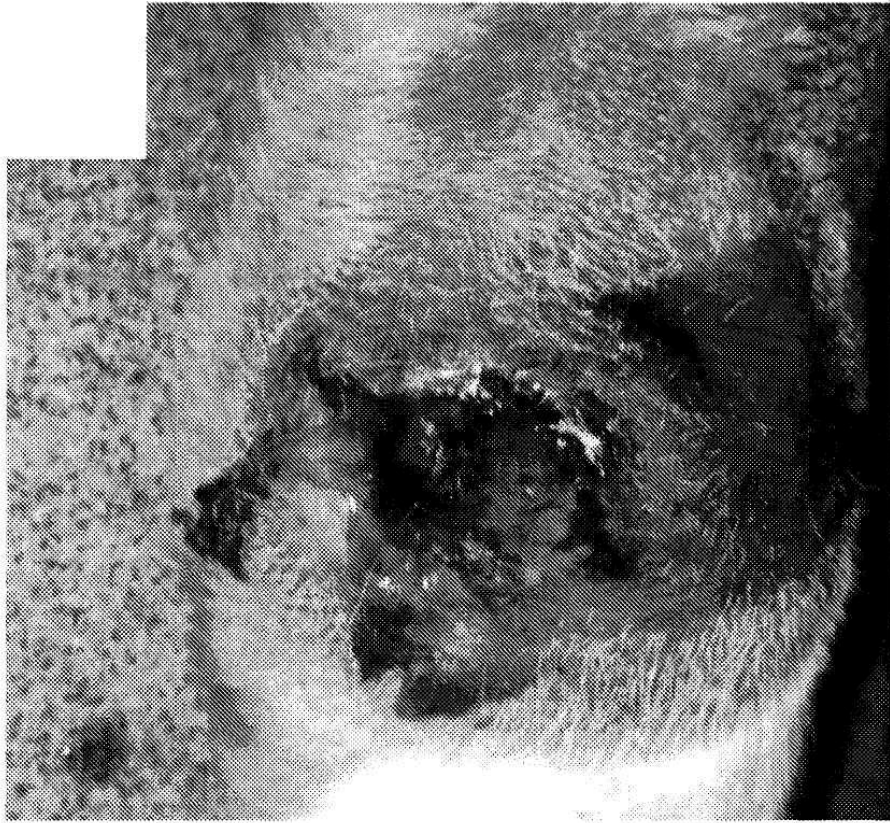


Fig. 8B



Fig. 8C



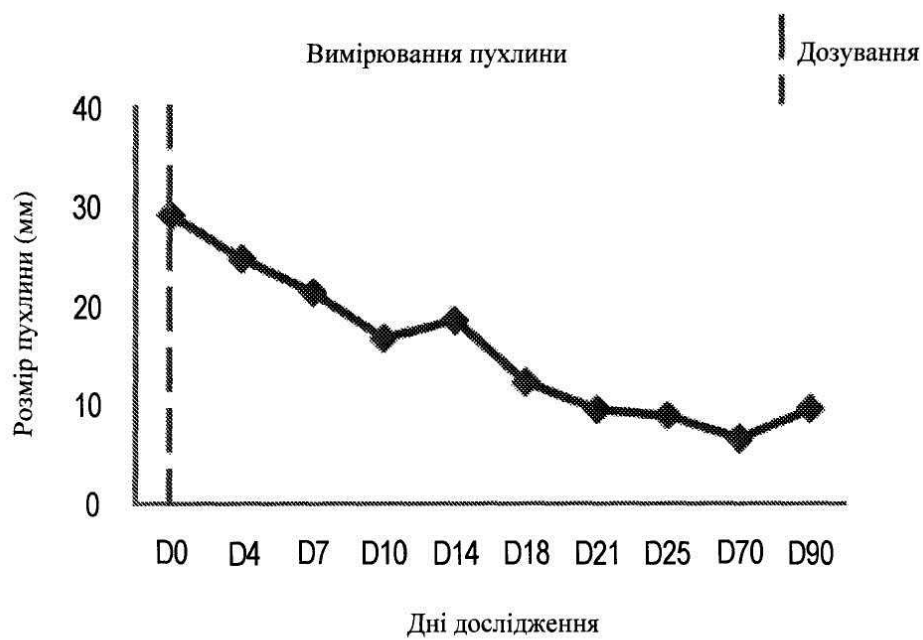
Fig. 8D



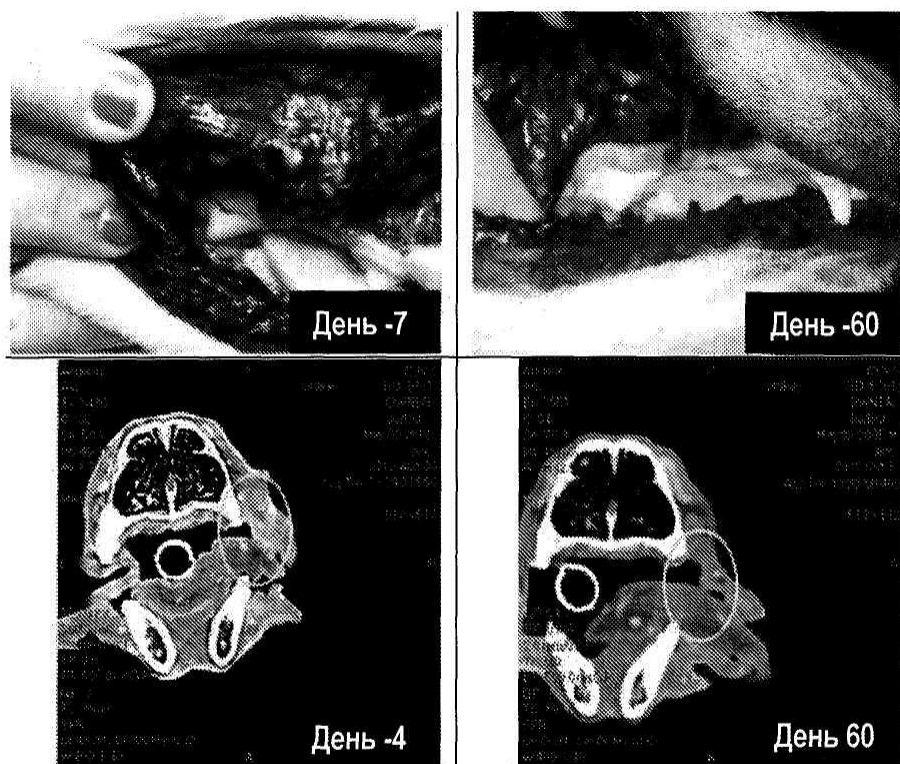
Fig. 8E



Fig. 8F

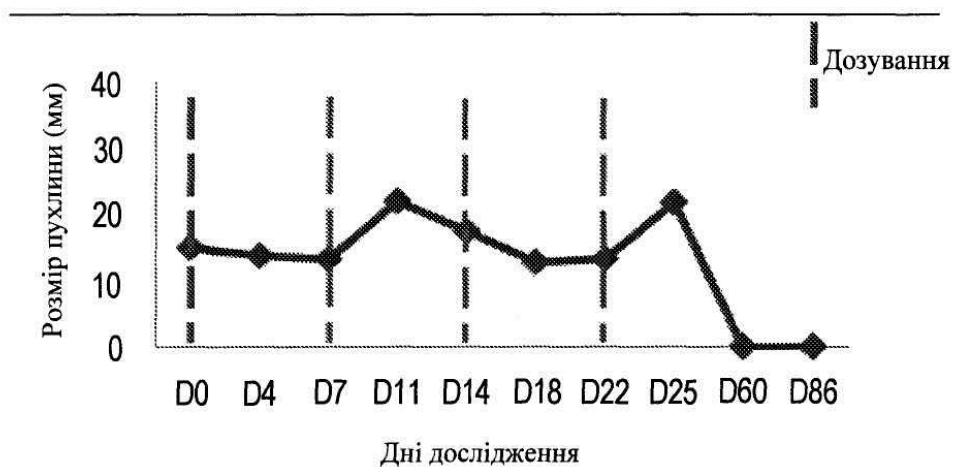


Фіг. 9



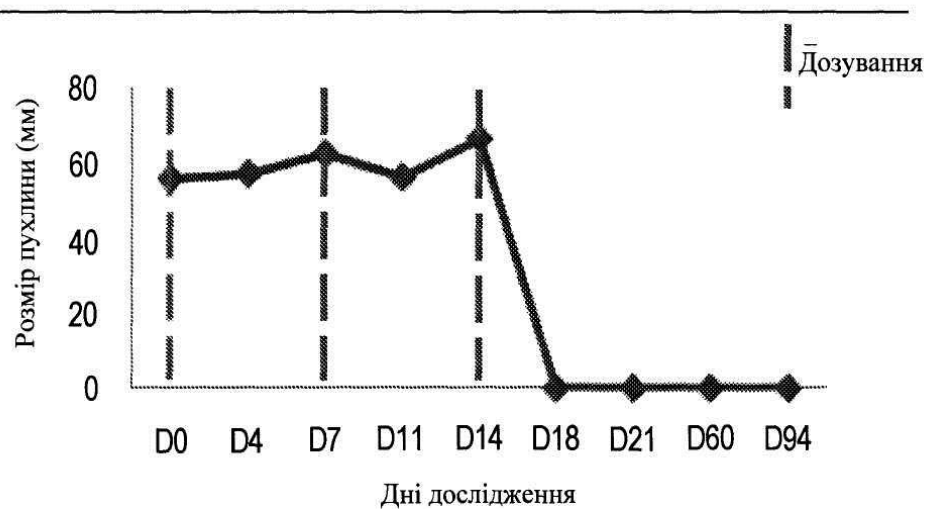
Фіг. 10А

Вимірювання пухлини



Фіг. 10В

Вимірювання пухлини



Фіг. 11

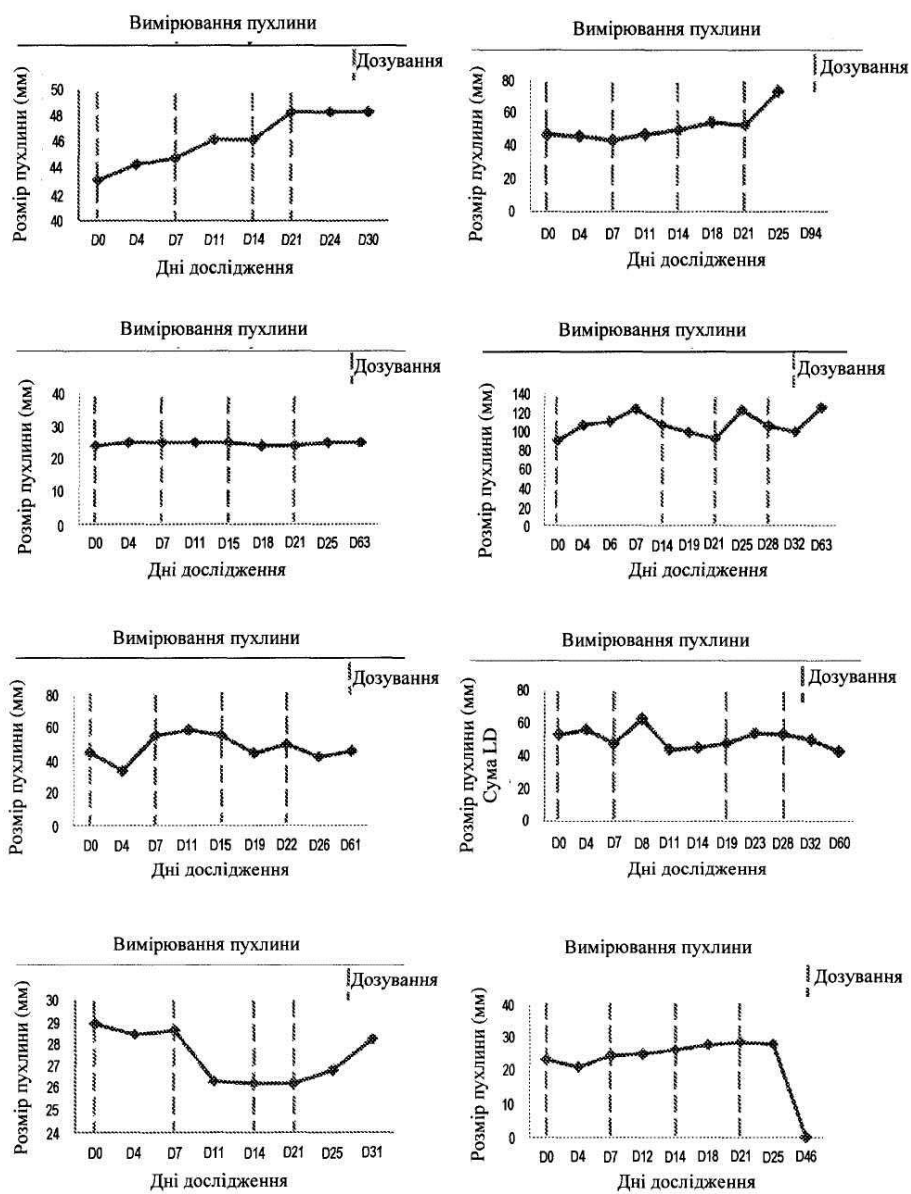
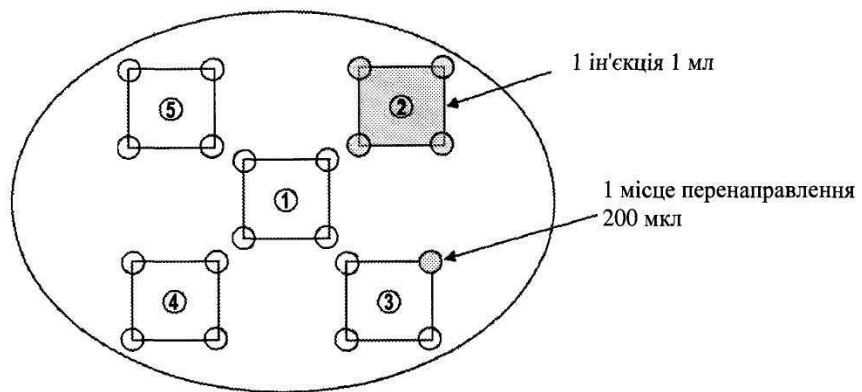


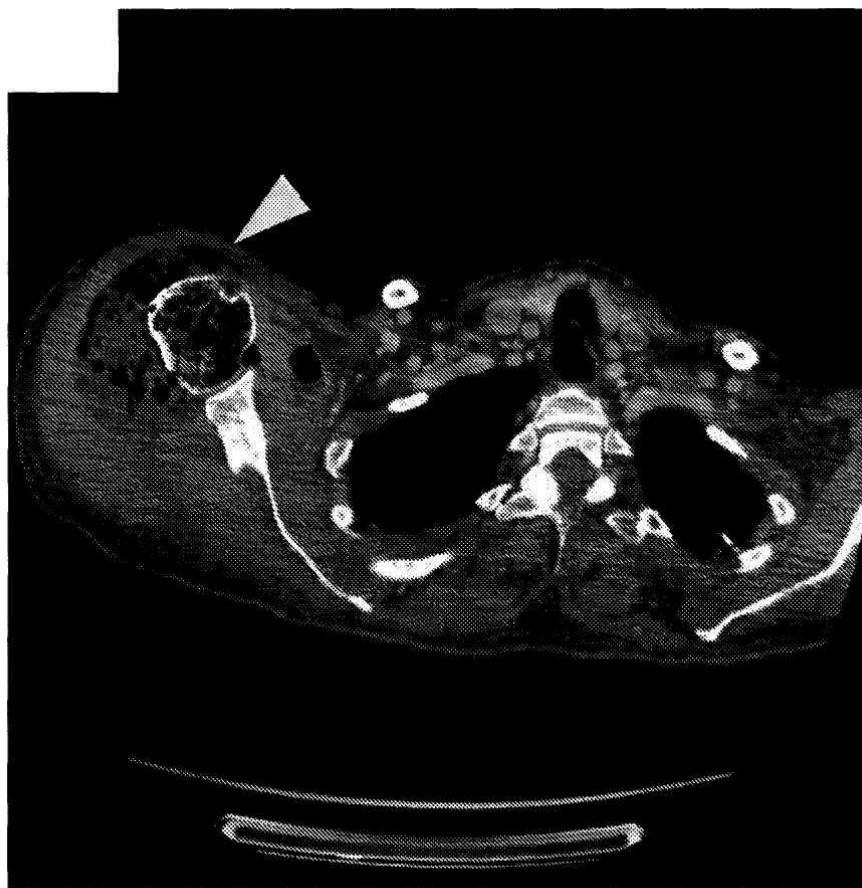
Fig. 12A



Фіг. 12В



Фіг. 13



Фіг. 14А



Fig. 14B

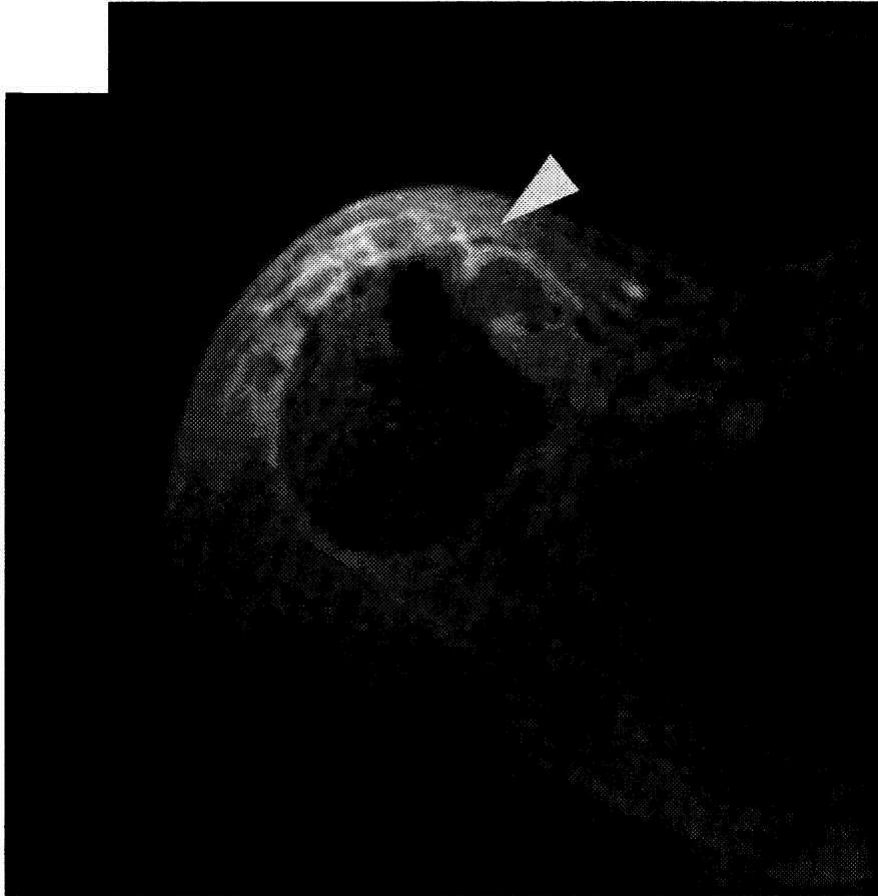


Fig. 14C



Fig. 14D

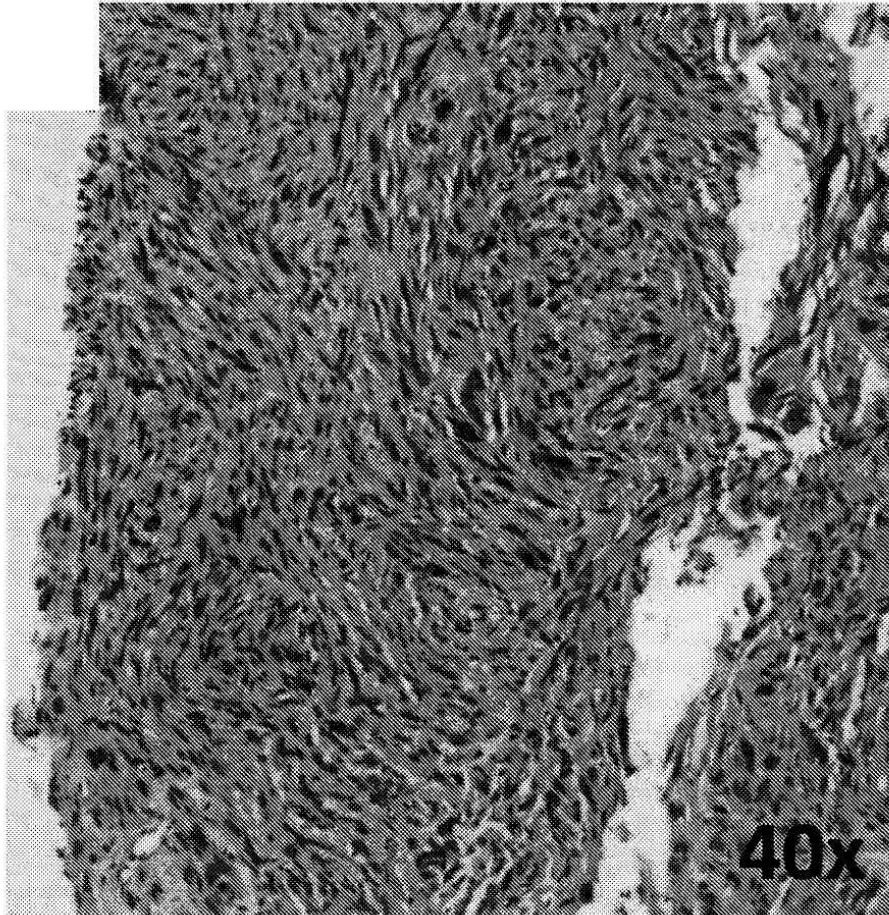


Fig. 15A

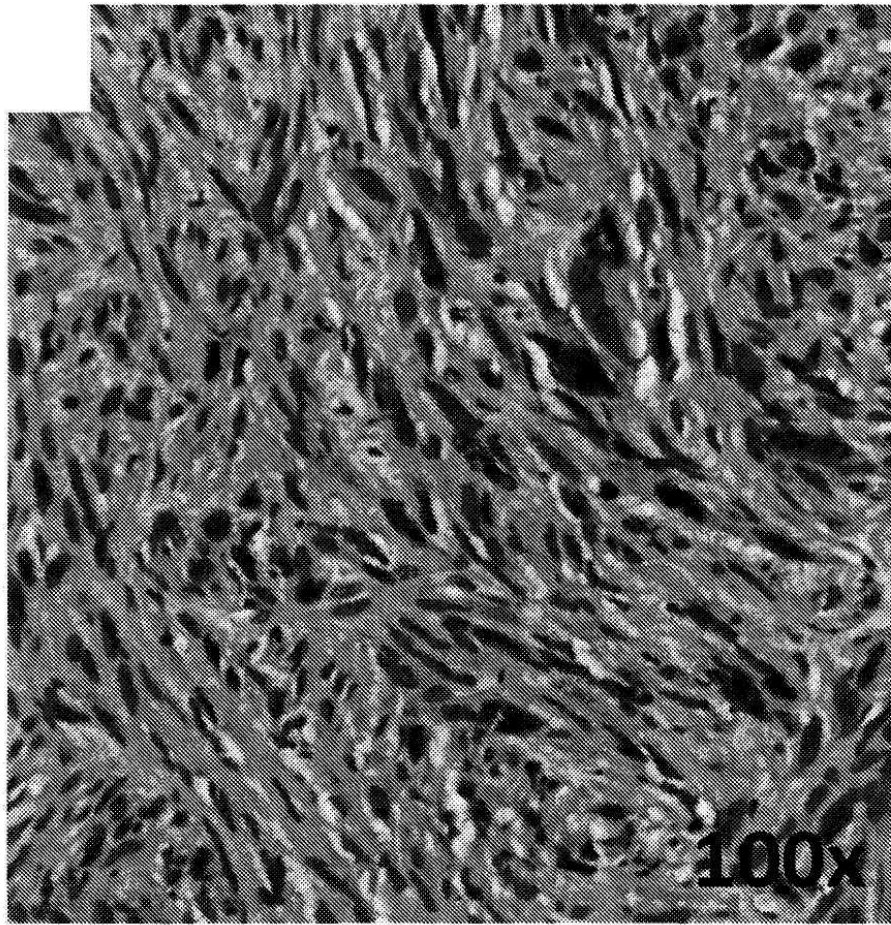


Fig. 15B

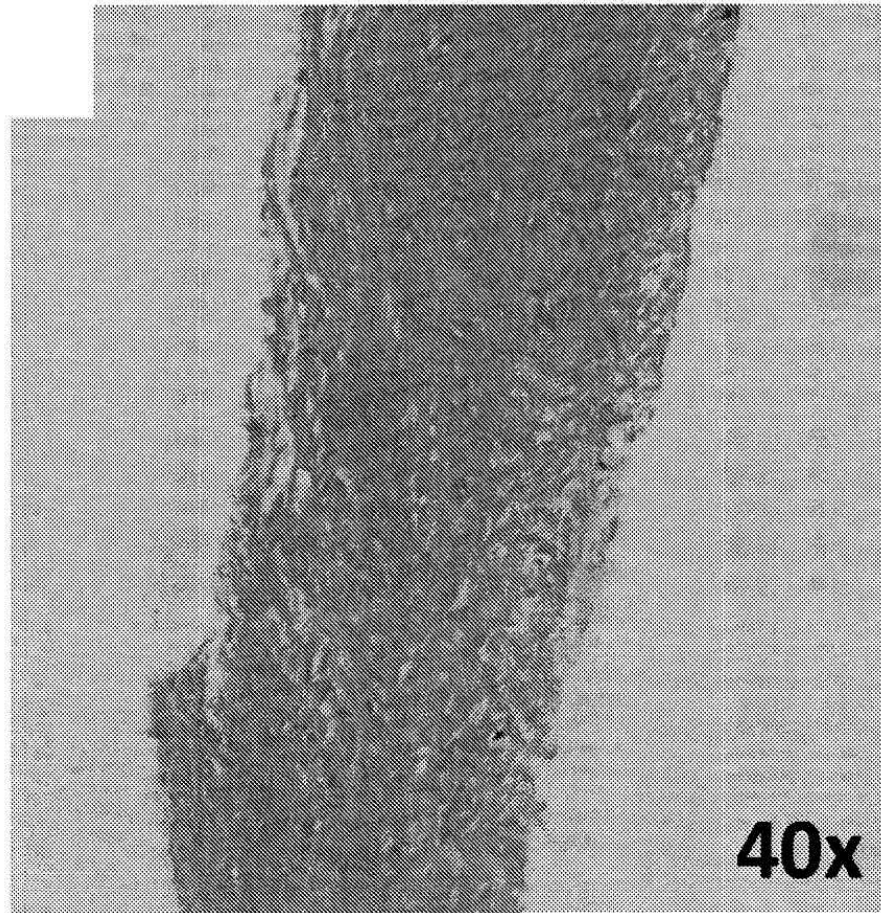


Fig. 15C

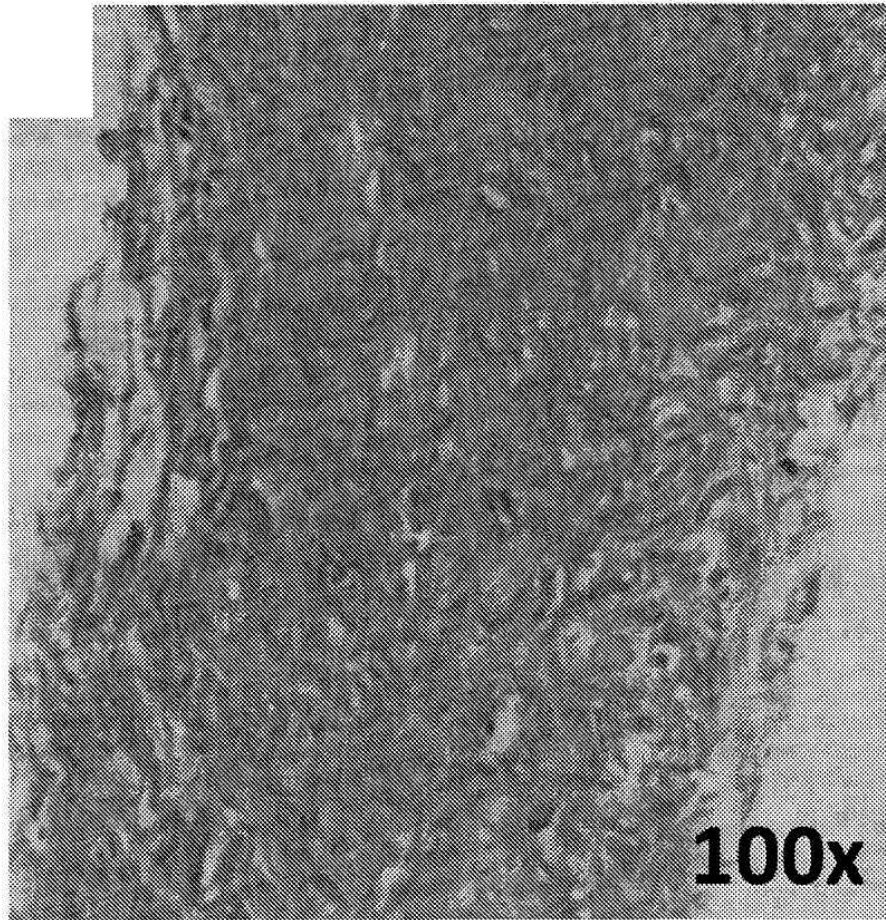


Fig. 15D

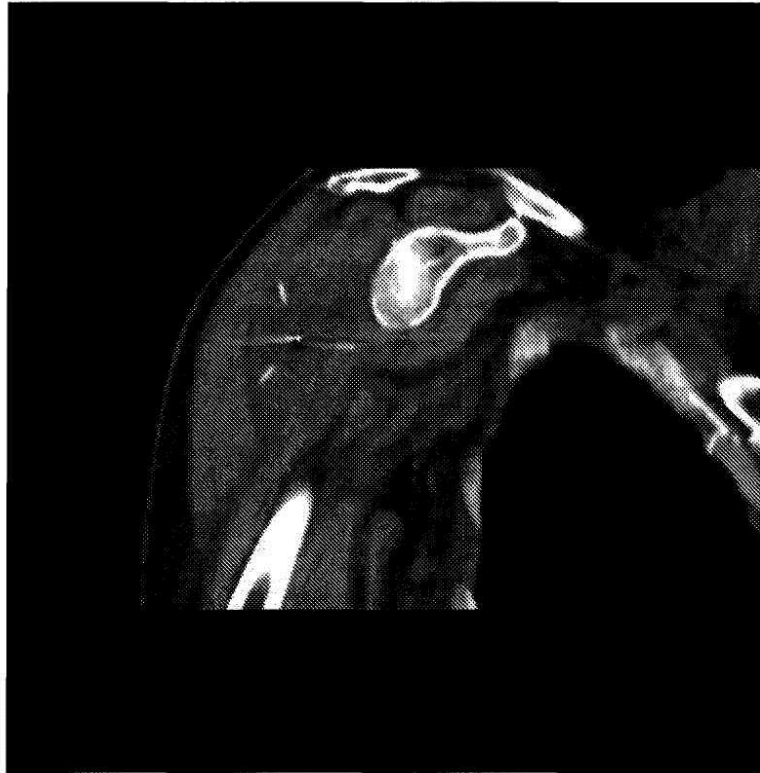


Fig. 16B

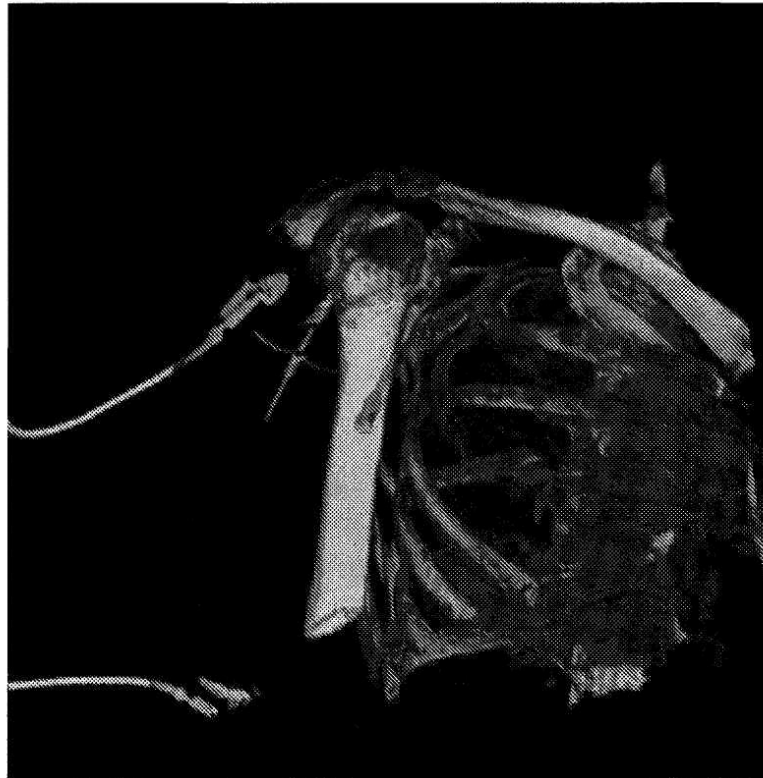
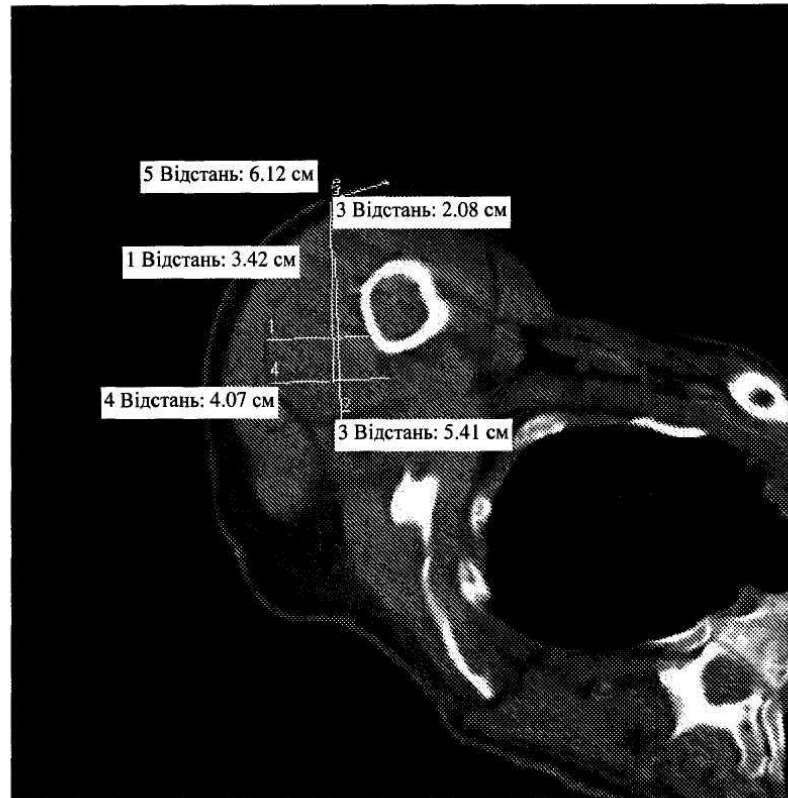


Fig. 16C



Fig. 16D



Фіг. 16Е

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601