

# E1B 缺失腺病毒瘤内注射治疗恶性肿瘤的安全性研究

袁中玉, 张 力, 李 苏, 钱晓洲, 管忠震

## Safety of an E1B Deleted Adenovirus Administered Intratumorally to Patients with Cancer

Yuan Zhong-Yu, Zhang Li, Li Su, Qian Xiao-Zhou, Guan Zhong-Zhen

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & OBJECTIVE: In recent years, great development has been made in cancer therapeutics with replication-competent viruses (oncolytic viruses). Genetically modified adenovirus is one of promising viruses. The current study was designed to evaluate the safety of intratumoral H101, an E1B deleted adenovirus. METHODS: A total of 15 patients with malignant tumors were treated with H101 in a dose-escalation manner (from  $5 \times 10^7$  VP to  $1.5 \times 10^{12}$  VP per day for 5 consecutive days). Systemic examination was performed prior to injection. Physical signs (including weight, temperature, respiration, pulse, and blood pressure) and toxicity were observed and recorded carefully during treatment. Adenoviral DNA in plasma, urine, and swabs of oropharynx, swabs of the injection site from different time-point were determined by PCR. RESULTS: Evaluation of toxicity in all 15 cases was available. All patients tolerated well following intratumoral injection of H101. Dose limited toxicity (DLT) and serious adverse event (SAE) were not found in the course of treatment. Main side effects were injection site pain (60.0%) and fever (33.3%). Adenoviral DNA was undetectable in plasma, urine, and swabs of oropharynx, swabs of the injection site. CONCLUSION: This study showed that the toxicities of intratumoral injection of E1B deleted adenovirus (H101) were lower and tolerable. There is no evidence indicating the invasion. These results suggested that intratumorally injected H101 is safe.

**KEYWORDS:** Genetically modified adenovirus/Therapeutic use; Malignant tumors; Biotherapy; Safety

**【摘 要】** 背景及目的:具有复制能力的病毒(或称溶瘤病毒)用于治疗恶性肿瘤的研究近年来发展相当迅速,E1B 缺失腺病毒是目前研究最多、进展最快的溶瘤病毒之一。本研究目的是观察瘤内注射 E1B 缺失腺病毒注射液(H101)治疗恶性肿瘤的安全性。方法:按入选标准筛选肿瘤患者 15 例,给予 H101 瘤内注射,注射剂量在每人每天  $5 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^{12}$  颗粒数,采用 5 个剂量级进行爬升,连续 5 天为一疗程。治疗前对患者进行全面体检,治疗期间密切观察患者的生命体征和不良反应,治疗后不同时间采集患者的血、尿、咽拭子及注射部位拭子进行腺病毒 DNA 测定(PCR 法)。结果:15 例患者均可进行毒性评价。所有患者对 H101 瘤内注射耐受性良好,在整个治疗过程中,没有观察到剂量限制性毒性(DLT),也未见严重不良事件,主要不良反应为注射局部疼痛(60.0%)和发热(33.3%)。血、尿、咽拭子及注射部位拭子中均未检测到腺病毒 DNA。结论:E1B 缺失腺病毒注射液(H101)瘤内注射毒副作用较低,患者耐受性良好,也未发现 H101 向体外播散的证据。因此,H101 瘤内注射具有良好的安全性。

**关键词:** E1B 缺失腺病毒/治疗应用;恶性肿瘤/生物疗法;安全性

中图分类号:R730.53;R73 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2003)03-0310-04

中山大学肿瘤防治中心内科,  
广东 广州 510060

Cancer Center, Sun Yat-sen  
University, Guangzhou,  
Guangdong, 510060,  
P. R. China

通讯作者:袁中玉

Correspondence to: Yuan Zhong-Yu

Tel 86-20-87343356

收稿日期:2002-08-06

修回日期:2002-10-09

恶性肿瘤是导致人类死亡的主要疾病,主要治疗方法有手术、放疗和化疗。生物治疗是近年发展起来的、被称为治疗恶性肿瘤的第4种方法,它包括了肿瘤疫苗疗法、肿瘤非特异性免疫疗法、单抗免疫导向疗法、细胞因子疗法、过继细胞免疫疗法、肿瘤基因疗法等。病毒治癌也属于生物治疗范畴,近二十年来发展相当迅速,尤以基因工程改造的病毒为突出,E1B缺失腺病毒即是其中之一。它利用肿瘤细胞和正常细胞内p53基因状态的不同,通过基因工程方法改造腺病毒,使改造后的病毒能特异地在p53基因突变的肿瘤细胞中生长,进而杀死肿瘤细胞<sup>[1]</sup>。Nemunaitis等<sup>[2,3]</sup>用E1B缺失腺病毒(国外称ONYX-015)治疗难治性头颈癌取得较好疗效,目前ONYX-015经美国FDA批准正在进行III期临床研究。

H101是由上海三维生物技术有限公司开发的一种E1B缺失腺病毒注射液,经中国药监局批准,在中山大学肿瘤医院内科进行临床试验,现将H101瘤内注射治疗恶性肿瘤患者的安全性报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 入选标准

患者年龄大于18岁,且有明确的病理学诊断。经常规治疗失败或复发,或患者同意接受H101治疗;能通过简单、安全的方法进行瘤内H101注射;肿瘤的大小易通过临床或影像学方法测量;距上一次化疗、放疗、生物治疗或接受其他研究药品治疗后至少4周;体力状况:0~2级;预计生存时间大于3个月;能合作观察不良反应和疗效;患者或其法定代理人签署知情同意书。

### 1.2 患者的一般资料

在2000年9月至2001年3月按入选标准筛选出15例患者进入本研究。在15例患者中,头颈部肿瘤5例、恶性黑色素瘤3例、乳腺癌2例、卵巢癌1例、阴茎癌1例、软组织肉瘤2例、神经母细胞瘤1例。受试者中男性7例,女性8例,年龄28~72岁,中位年龄54岁。受试前未接受治疗1例(6.7%)经外科治疗11例(73.3%),化疗7例(46.7%),放射治疗4例(26.7%),其中接受2种或2种以上治疗的6例。肿瘤面积2.5~78 cm<sup>2</sup>,中位面积12.7 cm<sup>2</sup>。

### 1.3 治疗方法

1.3.1 H101制剂 H101制剂由上海三维生物技术有限公司提供,为乳白色混悬液,每支0.5 ml,装在2 ml西林瓶中,含 $5.0 \times 10^{11}$ 病毒颗粒,比活性

大于1:60 TCID<sub>50</sub>,保存在-20℃以下。使用时按规定的方法进行配制。

1.3.2 临床试验起始剂量、终止剂量以及爬升方法的确定 起始剂量的设定参考临床前的主要药效学和毒理研究结果,及国外同类药物(ONYX-015)的I期临床试验<sup>[4]</sup>的起始剂量,采用首例患者单次注射 $5.0 \times 10^7$ 颗粒数,剂量爬升以一个自然对数级的方式递增。根据我国新药(西药)临床试验技术要求,并参考ONYX-015的I期临床研究报道,将H101的临床试验终止剂量规定为每人每天 $1.5 \times 10^{12}$ 颗粒数。为此,本试验剂量范围每人每天为 $5.0 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^{12}$ 颗粒数,分为5个剂量级爬升。

1.3.3 给药计划 本研究分为两个阶段:特殊临床试验阶段和普通临床试验阶段。特殊临床试验阶段3例,第1例起始剂量 $5.0 \times 10^7$ 颗粒,注射1次,第2~3例用药剂量为每次 $5.0 \times 10^7$ 颗粒数,每天注射1次,连续5天。普通临床试验阶段12例,每组3例,每人每天给药1次,连续5天。起始剂量组患者给药为每次 $5.0 \times 10^9$ 颗粒数,每天1次,共5天。其后的各剂量组患者给药剂量依次为每次 $5.0 \times 10^{10}$ 、 $5.0 \times 10^{11}$ 、 $1.5 \times 10^{12}$ 颗粒数,每天1次,共5天。

1.3.4 操作方法 按稀释规程用生理盐水将试验药品稀释至所需剂量,根据病灶部位,取适当体位卧于操作床上,常规消毒,局部麻醉;注射针在预定区域内进针,达一定深度回抽无血后给药。肿瘤面积<3 cm<sup>2</sup>者单点注射;肿瘤面积3~5 cm<sup>2</sup>者,将瘤体平分为两部分,每部分注药1/2总量;肿瘤面积>5 cm<sup>2</sup>者,将瘤体平分为4个象限,每个象限注药1/4总量。允许进针后在皮下调整进针方向进行多方向注药。给药后以棉球压迫穿刺点10 min止血,并以创可贴贴敷。回病房后密切观察。

### 1.4 观察指标

治疗前及治疗后的第1、2、3周分别对患者进行全面体检、血液常规检查(包括血红蛋白、红细胞、白细胞等)、血生化检查(包括胆红素、谷丙转氨酶、血浆蛋白、肌酐、尿素氮等)、尿常规、胸片、心电图、肝脏B超等。治疗期间密切观察患者的生命体征,包括心率、血压、呼吸、体温,并注意观察有无不良反应发生。治疗后第1、6、12、19及26天采取患者的血浆、咽拭子、注射部位拭子及尿等标本,用PCR方法对H101的复制情况进行测定。

### 1.5 PCR检测

H101的特异性引物由上海基康生物工程公司合

成,上游引物:5'-CTGGCCGAGAAGTATTCCAT-3',下游引物 5'-GTCACATCCAGCATCACAGG-3'。PCR 反应条件:预变性 94℃ 10 min,然后进入扩增循环,即变性 94℃ 60 s,退火 55℃ 45 s,延伸 72℃ 90 s,35 个循环,最后延伸 72℃ 10 min。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.6 疗效和不良反应评价

疗效判断采用 WHO 的抗肿瘤药物疗效标准,分为 CR、PR、MR、SD、PD [CR:可见的病变完全消失,超过 1 个月;PR:肿瘤面积(肿块两最大垂径的乘积)缩小 50% 以上;MR:肿块缩小不及 50%;SD:肿块增大未超过 25%;PD:肿块病变增大 25% 以上或出现新病变]。不良反应评价采用 NCI 的不良反应分级标准分为 I~IV 级。

## 2 结果

### 2.1 疗效

对 15 例受试者进行初步的疗效评价。15 例患者中,注射病灶 PR 1 例,MR 2 例,SD 8 例,PD 4 例,未发现 CR 病例。有效病例在注射结束后 4 周予证实。1 例 PR 患者为鼻咽癌放疗后右颈淋巴结转移,该例患者属每次  $5.0 \times 10^{11}$  颗粒数注射剂量组;2 例 MR 患者均为软组织肉瘤,分别属每次  $5.0 \times 10^{10}$  颗粒数及  $5.0 \times 10^{11}$  颗粒数注射剂量组。可见,在上述剂量范围内可取得一定的临床疗效,获得疗效的患者都是较高剂量组。

### 2.2 不良反应

15 例受试者中,接受 1 疗程给药的 14 例,接受 2 个疗程给药 1 例,所有受试者都可进行不良反应评价。15 例患者显示出对 H101 很好的耐受性,在整个试验过程中,没有观察到剂量限制毒性(DLT),最多见的不良反应为发热和注射局部疼痛(见表 1)。在  $5.0 \times 10^9$  颗粒剂量组,有 2 例患者注射不同时期出现了转氨酶增高,其中 1 例患者有多年的乙型肝炎病史,注射 H101 后转氨酶达到 5001 mmol/s

(300 U/L),给予降酶治疗后降至正常;另 1 例患者转氨酶轻度增高,未作处理自行下降。

### 2.3 环境安全性

在本临床试验过程中,不同时间(d1、3、6、12、19、26)对受试者的血液进行了 PCR 检测,结果均为阴性,提示瘤内注射 H101 后,在血液中无复制。所有受试者及所有检测时间的咽拭子、注射部位拭子、尿 PCR 检测也均为阴性,表明注射到患者体内的 H101 无明显向外界播散的现象。

## 3 讨论

本研究的主要目的是评价 H101 瘤内注射的安全性。结果显示:H101 瘤内注射后的主要不良反应是注射局部反应和轻微的流感样症状。在  $5.0 \times 10^9$  颗粒剂量组,有 2 例患者注射不同时期出现了转氨酶增高,这一不良反应似与 H101 无明显因果关系,因为:①此不良反应与 H101 并未呈现出量效关系,只出现了 2 例;②一例患者既往有肝病。此外,根据 ONYX-015 肝动脉给药治疗胃肠肿瘤肝转移的 I 期临床结果,直接经肝动脉注射给药并未引起肝功能损害<sup>[5]</sup>,因此,认为本试验中的 2 例转氨酶增高可能与 H101 无关,但在未来的临床试验中应密切注意肝功能的改变。

本临床试验到达预设最高剂量时,仍未出现 DLT。根据新药(西药)临床研究的技术要求,终止剂量爬升。这一结果与 ONYX-015 的 I 期临床试验结果相似<sup>[4,6]</sup>,而在  $5.0 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^{12}$  颗粒数剂量范围内,连续 5 天进行瘤内注射,已在 3 例患者中呈现出了初步的疗效,因此,提示 H101 在该剂量范围内治疗肿瘤患者是安全、可耐受的,并可以取得一定疗效。

在注射给药 24 h 后,采用 PCR 方法检测血液中的 H101 均为阴性,这与 ONYX-015 的临床前<sup>[7,8]</sup>以及 I 期临床<sup>[2]</sup>结果相同。Heise 等<sup>[9,10]</sup>研究表明,接受过化疗、放疗、手术的复发性肿瘤组织中存在大量的纤维疤痕组织,对瘤体中的病毒颗粒扩散有阻碍作用,使得其入血的机会大大降低。此外,H101 即便少量入血,也立即被机体的非特异性免疫系统清除,如脾脏、肝脏中的巨噬细胞吞噬<sup>[7]</sup>。这些结果显示,H101 经瘤内注射后,不会大量扩散入血,血中少数病毒存在时间也极短,不会在正常组织内大量复制而引起靶组织之外的其他器官组织损害。

本研究显示,对血、尿或注射部位及口咽部拭子进行 PCR 检测,在检验方法的灵敏度范围内也没有

表 1 15 例受试者不良反应情况

Tab. 1 Toxicities Experienced during Trial

Toxicities	Grade					Total (%)
	I	II	III	IV	V	
Fever	4	1	0	0	0	5(33.3)
Injection site pain	9	1	0	0	0	9(60.0)
Nausea	3	0	0	0	0	3(20.0)
Leucopenia	1	0	0	0	0	1(6.7)
Hepatic dysfunction	1	0	1	0	0	2(13.3)
Flu-like symptom	7	1	0	0	0	8(53.3)

检测到 H101 病毒 与 ONYX-015 I 期临床<sup>[4]</sup>结果相同,提示瘤体内的 H101 没有向机体外扩散。在临床研究过程中也采取极其严密的隔离步骤,未发现在病区引起流行,经随访治疗后的患者也未在其所涉及区间内引起流行。因此,结合监测结果、流行病学观察结果及 H101 本身的生物学特点,可以认为 H101 是较为安全的一种病毒制品,目前尚无证据表明其有明显的危害。

综上所述, H101 经 5 个剂量级的剂量递增,未出现剂量限制性毒性和严重不良反应。经严格的检验,未发现 H101 有向体外播散的证据。因此, H101 应用于人体时有良好的安全性,局部注射的方法对体表肿瘤进行瘤内给药是可行的。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bischoff JR, Kim DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells[J]. *Science*, 1996, 274(5286): 373 - 376.
- [2] Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, et al. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(2): 289 - 298.
- [3] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. *Nat Med*, 2000, 6(8): 879 - 885.
- [4] Ganly I, Eckhardt SG, Rodriguez GI, et al. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(3): 798 - 806.
- [5] Habib NA, Sarraf CE, Mitry RR, et al. E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumors[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(3): 219 - 226.
- [6] Mulvihill S, Warren R, Venook A, et al. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial[J]. *Gene Ther*, 2001, 8(4): 308 - 315.
- [7] Heise C, Wukkuans AM, Xue S, et al. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 2623 - 2628.
- [8] Heise C, Ganly I, Kim YT, et al. Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomatosis is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status[J]. *Gene Ther*, 2000, 7: 1925 - 1929.
- [9] Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, et al. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents [J]. *Nat Med*, 1997, 3(6): 639 - 645.
- [10] Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K, et al. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1193 - 1196.

[编辑 张菊 校对 杨允贵]