

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037354**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.17

(21) Номер заявки
201891679

(22) Дата подачи заявки
2017.03.22

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/768 (2015.01)

**(54) ЛЕЧЕНИЕ РАКА ОНКОЛИТИЧЕСКИМ ВИРУСОМ В КОМБИНАЦИИ С
ИНГИБИТОРОМ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК**

(31) EP16163555.2; EP16020193.5

(32) 2016.04.01; 2016.05.27

(33) EP

(43) 2019.04.30

(86) PCT/EP2017/056886

(87) WO 2017/167626 2017.10.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ДОЙЧЕС
КРЕБСФОРШУНГСЦЕНТРУМ;
РУПРЕХТ-КАРЛС-УНИВЕРСИТЕТ
ГЕЙДЕЛЬБЕРГ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Лойхс Барбара, Марчини Антонио,
Роммелере Жан, Ангелова Ассия, Егер
Дирк, Вик Вольфганг, Дам Михаэль
(DE)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2016009017

KARISHMA RAJANI ET AL.: "Combination Therapy With Reovirus and Anti-PD-1 Blockade Controls Tumor Growth Through Innate and Adaptive Immune Responses", MOLECULAR THERAPY, vol. 24, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 166-174, XP055375845, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2015.156, abstract, page 167, column 1, paragraph 2, page 170, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1, page 172, column 2, paragraph 4 - page 173, column 2, paragraph 1; figure 1

WO-A1-2010139401

NORMAN WOLLER ET AL.: "Oncolytic Viruses As Anticancer Vaccines", FRONTIERS IN ONCOLOGY, vol. 4, 21 July 2014 (2014-07-21), page 188, XP055282709, abstract, page 8, column 2, paragraph 3 - page 9, column 2, paragraph 1; figure 1

J.C. PAGLINO ET AL.: "LuIII Parvovirus Selectively and Efficiently Targets, Replicates in, and Kills Human Glioma Cells", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 86, no. 13, 1 July 2012 (2012-07-01), pages 7280-7291, XP055206096, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00227-12, abstract, page 7288, column 2, paragraph 2 - page 7289, column 1, paragraph 1

WO-A1-2015010782

WO-A1-2009083232

SUZANNE L. TOPALIAN ET AL.: "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer", The New England journal of medicine, 28 June 2012 (2012-06-28), pages 2443-2454, XP055098235, United States, DOI: 10.1056/NEJMoa1200690, Retrieved from the Internet: URL: <http://search.proquest.com/docview/1022620071>, abstract; tables 1-2

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, в которой ингибитор контрольных точек комбинируют с онколитическим вирусом, и применению указанной комбинации для лечения рака.

B1**037354****037354****B1**

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, в которой ингибитор контрольных точек комбинируют с онколитическим вирусом, и применению указанной комбинации для лечения рака.

Рак является второй по распространенности причиной смерти во всем мире. По оценкам, у половины мужчин и одной трети женщин за время их жизни будет диагностирована какая-либо форма рака. Более того, поскольку рак является преимущественно болезнью старения, число смертей от рака во всем мире, по прогнозам, увеличится примерно на 45% с 2007 по 2030 год (с 7,9 до 11,5 млн смертей) из-за увеличения доли пожилых людей (оценки ВОЗ, 2008 год)). Рак также является самым дорогостоящим заболеванием. Последние оценки Национального института онкологии США показали, что общий экономический ущерб от рака в США в 2007 году составил 226,8 млрд. долл. США, и, если не будут разработаны более успешные меры профилактики, раннего выявления и более эффективные методы лечения, ожидается, что это и без того огромное экономическое бремя будет и дальше расти в течение следующих двух десятилетий. Несмотря на значительный прогресс в профилактике, выявлении, диагностике и лечении многих форм рака, о чем свидетельствует увеличение процента 5-летнего выживания онкологических пациентов в США и Европе за последние 30 лет, некоторые типы опухолей, такие как рак поджелудочной железы, печени, легких, мозга, остаются практически без эффективных методов лечения, требуя разработки новых терапевтических вариантов. Быстро развивающимся перспективным инструментом для борьбы с раком являются онколитические вирусы, которые используют специфические для рака уязвимости для уничтожения раковых клеток, при этом щадя нормальные клетки (Breitbach et al., 2011; Russell et al., 2012). В настоящее время не менее 12 различных онколитических вирусов проходят клинические испытания I-III фазы для лечения различных злокачественных новообразований (Russell et al., 2012) как в качестве монотерапии, так и в комбинации с другими противораковыми агентами. Среди них онколитический крысиный парвовирус H-1 PV в настоящее время оценивается на предмет безопасности и первых признаков эффективности в клинических испытаниях фазы I-IIa у пациентов с рецидивирующей мультиформной глиобластомой (МФГ) (Geietnekv et al., 2012).

H-1 PV представляет собой небольшую (~25 нм в диаметре) безоболочечную частицу икосаэдрической формы, содержащую геном одноцепочечной ДНК длиной 5,1 т.п.н. (Cotmore & Tattersall, 2007). Геномная организация H-1 PV содержит две транскрипционные единицы, управляемые двумя промоторами, ранним промотором P4 и поздним промотором P38. P4 регулирует экспрессию гена, кодирующего неструктурные (NS) белки (NS1 и NS2), а P38 регулирует экспрессию гена, кодирующего белки капсида (VP) (VP1, VP2, VPS) (Cotmore & Tattersall, 2007). Этот вирус размножается преимущественно в быстрорастущих раковых клетках. Его онкоселективность базируется не на лучшем поглощении вируса раковыми клетками, а скорее связана с тем, что раковые клетки сверхэкспрессируют такие факторы, как циклин А, E2F или CREB/ATF, необходимые для репликации вирусной ДНК. Кроме того, раковые клетки часто являются дефектными в своей способности развивать эффективный противовирусный иммунный ответ, что способствует размножению вирусов (Nuesch et al., 2012). Известно, что вирус активирует множественные пути гибели клеток. В зависимости от типа клетки и условий выращивания H-1 PV может индуцировать апоптоз (Hristov et al., 2010; Ohshima et al., 1998; Ravet et al., 1998; Ueno et al., 2001), некроз (Ran et al., 1999) или катепсин В-зависимую гибель клетки (Di Piazza et al., 2007). Вирус оказался способен индуцировать онколиз даже в раковых клетках, устойчивых к TRAIL (родственный фактору некроза опухоли лиганд, индуцирующий апоптоз), цисплатину и при сверхэкспрессии Bcl-2 (di Piazza et al., 2007). Последний результат показывает, что Bcl-2 не является отрицательным модулятором парвовирусной цитотоксичности. Недавно была описана терапия рака с применением парвовируса и его комбинации с химиотерапией или ингибитором HDAC (WO 2009/083232 A1; WO 2011/113600 A1).

Основной неструктурный белок NS1 является главным регулятором репликации вирусной ДНК, экспрессии вирусного гена и цитотоксичности. Одной только экспрессии NS1, аналогично всему вирусу, уже достаточно для индукции остановки клеточного цикла, апоптоза и клеточного лизиса в результате накопления активных форм кислорода и повреждения ДНК (Hristov et al., 2010). Показано, что в результате своей онколитической активности этот вирус обладает онкопрессорными свойствами, продемонстрированными на ряде животных моделей, которые лежат в основе запуска клинического испытания для лечения МФГ (Geletneky et al., 2012).

В течение нескольких последних лет, помимо концепций терапии, основанных на онколитических вирусах, ценным подходом в борьбе с раком стало поле иммуноонкологии. Одним из самых последних перспективных подходов к активизации терапевтического противоопухолевого иммунитета является блокада иммунных контрольных точек. Понятие иммунных контрольных точек предназначено для обозначения множества ингибиторных путей, "вшитых" в иммунной системе, которые имеют решающее значение для поддержания аутоотолерантности и модулирования продолжительности и амплитуды физиологических иммунных ответов в периферических тканях для минимизации побочных повреждений тканей. Сейчас ясно, что опухоли кооптируют определенные пути иммунных контрольных точек в качестве основного механизма иммунорезистентности, особенно против Т-клеток, специфичных к опухолевым антигенам. Поскольку многие иммунные контрольные точки инициируются взаимодействием лиганд-рецептор, их можно легко блокировать антителами или модулировать рекомбинантными формами

лигандов или рецепторов.

Огромное количество генетических и эпигенетических изменений, присущих большинству раковых клеток, порождают множество ассоциированных с опухолью антигенов, которые способна распознать иммунная система хозяина, тем самым заставляя опухоль развивать специфические механизмы иммуно-резистентности. Важным механизмом иммунорезистентности являются иммуноингибирующие пути, называемые иммунными контрольными точками, которые обычно опосредуют иммунную толерантность и уменьшают побочные повреждения тканей. Особенно важным рецептором контрольных точек иммунного ответа является цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4), который уменьшает амплитуду активации Т-клеток. При нормальной физиологии Т-клетки активируются двумя сигналами: связывание Т-клеточного рецептора с комплексом антиген-МНС и связывание Т-клеточного рецептора CD28 с CD80 и CD86 на поверхности презентующих антиген клеток. CTLA-4 связывается с CD80 или CD86, что предотвращает связывание CD28 с этими поверхностными белками и, следовательно, отрицательно регулирует активацию Т-клеток. Активные цитотоксические Т-клетки необходимы иммунной системе для борьбы с раковыми клетками, тогда как регуляторные Т-клетки ингибируют другие Т-клетки, которые могут благоприятствовать опухоли. Блокада CTLA-4 антителами при раке индуцировала противоопухолевый иммунитет по причине изменения соотношения регуляторных Т-клеток к цитотоксическим Т-клеткам. Таким образом, увеличение количества цитотоксических Т-клеток и уменьшение количества регуляторных Т-клеток усиливает противоопухолевый ответ. Клинические исследования с применением антагонистических CTLA-4-антител продемонстрировали активность при меланоме. Несмотря на высокую частоту иммунологической токсичности, эта терапия улучшала выживаемость в двух рандомизированных исследованиях III фазы. Препарат анти-CTLA-4 антител был первым агентом, который продемонстрировал улучшение выживаемости у пациентов с распространенной меланомой и был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) в 2010 году (Pardoll, D., *Nature Reviews Cancer*, Vol. 12, p. 252-264, (2012)). Это одобренное антитело к CTLA-4 известно под названием "ипилимумаб" и продается под фирменным названием "Ервой®" компании Bristol Myers Squibb (BMS).

Некоторые рецепторы иммунных контрольных точек, такие как белок запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1), ограничивают эффекторные функции Т-клеток в тканях. Активируя лиганды для PD-1, опухолевые клетки блокируют противоопухолевые иммунные ответы в микроокружении опухоли. Клинические данные, полученные для блокаторов других белков иммунных контрольных точек, таких как белок запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1), указывают на широкие и разнообразные возможности для усиления противоопухолевого иммунитета с потенциальной возможностью получения долговременных клинических ответов. Клинические исследования показывают, что блокада пути PD-1 индуцирует устойчивую регрессию опухоли при различных типах опухолей. Ответы на блокаду PD-1 могут коррелировать с экспрессией PD-1-лигандов опухолевыми клетками.

4 сентября 2015 г. FDA одобрило гуманизированное моноклональное антитело под названием пембролизумаб (также известный как препарат МК-3575 или Китруда®, выведенный на рынок компанией Merck Sharp Dohme, MSD), направленное против целевого PD-1, в рамках Программы ускоренного рассмотрения заявки на регистрацию FDA. Пембролизумаб одобрен для применения после терапии ипилимумабом (который направлен против CTLA-4) или после терапии ипилимумабом и ингибитором BRAF у пациентов с распространенной меланомой, несущих мутацию BRAF.

30 сентября 2015 г. FDA предоставило ускоренную регистрацию другому анти-PD-1-антителу (ниволумаб, инъекционный препарат Опдиво®, выведенный на рынок компанией Bristol Myers Squibb; BMS) в комбинации с анти-CTLA-4-антителом ипилимумабом для лечения пациентов с диким типом BRAF V 600, неоперабельной или метастатической меланомой.

Еще несколько рецепторов и лигандов иммунных контрольных точек, некоторые из которых избирательно активированы в различных типах опухолевых клеток, являются первоочередными мишенями для блокады, особенно в сочетании с подходами, которые усиливают активацию противоопухолевых иммунных реакций, такими как вакцины.

Анти-PD-L1-антитела и способы их получения известны в данной области техники. Такие антитела к PD-L1 могут быть поликлональными или моноклональными и/или рекомбинантными и/или гуманизированными. Примеры антител к PD-L1 описаны в патенте США № 8217149, заявках на патент США № 13/511538, 13/478511.

Типичные агенты, нацеленные на пути иммунных контрольных точек, показаны в табл. 1 (с изменениями из работы Pardoll, D., *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, p. 252-264, (2012)).

Таблица 1

Мишень	Биологическая функция	Антитело или гибридный белок Ig
Поверхностный белок CTLA4	Ингибирующий рецептор	Ипилимумаб (фирменное название: Ервой (Yervoy)®, продаваемый BMS) Тремелиумаб (также известный как тицилимумаб или CP-675206)
Рецептор запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1)	Ингибирующий рецептор	MDX-1106 (также известный как BMS-936558 или ниволумаб, фирменное название: Опдиво (Opdivo)®, продаваемый BMS) МК 3475 (также известный как пембролизумаб или ламбролизумаб, фирменное название: Китруда (Keytruda)®, продаваемый MSD) CT-011 AMP-224
PDL1	Лиганд для PD1	MDX-1105
LAG3	Ингибирующий рецептор	IMP321
B7-H3	Ингибирующий лиганд	MGA271

Хотя для некоторых типов опухолей (например, меланомы, рака легких) лечение ингибиторами контрольных точек показывает многообещающие результаты, было признано, что пациенты с некоторыми другими опухолями (например, рак толстой кишки, поджелудочной железы) не получают пользы от такого лечения.

Поэтому целью настоящего изобретения является предоставление средств для улучшенной терапии рака и расширение диапазона опухолей, восприимчивых к лечению ингибиторами контрольных точек.

Согласно настоящему изобретению это достигается предметами изобретения, определенными в его формуле.

В исследовании, приведшем к настоящему изобретению, был поставлен вопрос, действует ли ингибитор контрольных точек, например анти-PD-1-антитело, такое как пембролизумаб, синергически с онколитическим вирусом, например парвовирусом, таким как H-1 PV или родственным парвовирусом грызунов, при уничтожении раковых клеток. Было показано, что у нескольких пациентов введение пембролизума потенцирует онколитическую активность данного вируса синергическим образом.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей (а) онколитический вирус в комбинации с (b) ингибитором контрольных точек. Настоящее изобретение также относится к применению указанной фармацевтической комбинации для лечения рака.

Предпочтительно в указанной фармацевтической композиции онколитический вирус и ингибитор контрольных точек присутствуют в эффективной дозе и объединены с фармацевтически приемлемым носителем.

Используемый в настоящем изобретении термин "агент" подразумевает вещество, которое дает желаемый эффект в ткани, системе, животном, млекопитающем, человеке или другом субъекте.

Соответственно, под термином "противоопухолевый агент" понимают вещество, производящее противоопухолевый эффект в ткани, системе, животном, млекопитающем, человеке или другом субъекте. Следует также понимать, что "агент" может представлять собой одно соединение или комбинацию или композицию из двух или более соединений.

Под термином "лечение" и его производными, используемыми в настоящем изобретении, понимают терапевтическую терапию. В отношении конкретного патологического состояния лечение подразумевает (1) облегчение патологического состояния или одного или нескольких биологических проявлений таких состояний; (2) вмешательство в (а) одну или несколько точек в биологическом каскаде, ведущем к данному патологическому состоянию или вызывающем его или (b) одно или несколько биологических проявлений такого состояния; (3) облегчение одного или нескольких симптомов, эффектов или побочных эффектов, ассоциированных с таким состоянием; или (4) замедление прогрессирования состояния или одного или нескольких биологических проявлений такого состояния.

Под используемым в настоящем изобретении термином "предупреждение" понимают профилактическое введение лекарственного средства для существенного уменьшения вероятности или тяжести состояния или его биологического проявления или для замедления возникновения такого состояния или его биологического проявления. Специалисту в данной области техники будет понятно, что "предупреждение" не является абсолютным термином. Профилактическая терапия целесообразна, например, когда

субъект сочтен подверженным высокому риску развития рака, например, когда у субъекта имеется явная семейная история рака или когда субъект подвергся воздействию канцерогена.

Используемый в настоящем изобретении термин "эффективное количество" означает количество лекарственного средства или фармацевтического агента, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ ткани, системы, животного или человека, которого стремится достичь, например, исследователь или клиницист. Кроме того, термин "терапевтически эффективное количество" означает любое количество, которое по сравнению с соответствующим субъектом, не получившим такого количества, приводит к улучшению лечения, заживлению, профилактике или облегчению заболевания, расстройства или побочного эффекта. Этот термин также включает количество, эффективное для улучшения нормальной физиологической функции. "Эффективная доза", подходящая для лечения и/или предупреждения этих заболеваний или расстройств, может быть определена с использованием способов, известных специалисту в данной области техники.

Введение терапевтически эффективного количества комбинаций согласно изобретению имеет преимущество по сравнению с отдельными соединениями-компонентами в том смысле, что комбинации обеспечивают одно или несколько из следующих улучшенных свойств по сравнению с индивидуальным введением терапевтически эффективного количества соединения-компонента: i) больший противоопухолевый эффект по сравнению с самым активным единственным агентом, ii) синергическая или высокосинергическая противоопухолевая активность, iii) протокол дозирования, который обеспечивает усиленную противоопухолевую активность с пониженным профилем побочных эффектов, iv) снижение профиля токсических эффектов, v) увеличение терапевтического окна или vi) увеличение биодоступности одного или обоих компонентов.

Термин "фармацевтически приемлемый" может охватывать любой носитель, который не влияет на эффективность биологической активности активных ингредиентов и не токсичен для пациента при введении. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как водомасляные эмульсии, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Такие носители могут быть приготовлены обычными способами и могут вводиться субъекту в эффективной дозе. Дополнительные фармацевтически совместимые носители могут включать гели, биоадсорбируемые матричные материалы, имплантационные элементы, содержащие терапевтический агент, или любой подходящий носитель, средство или материал(ы) доставки или дозирования.

Используемый в настоящем изобретении термин "рак" относится к аномальному росту клеток или тканей и понимается как включающий злокачественный неопластический рост. Термин "неопластический" означает новообразование или связан с ним. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, т.е. рак мозга (в частности, глиомы: эпендимомы, астроцитомы (например, мультиформная глиобластома), олигодендроглиомы, глиомы ствола головного мозга, олигоастроцитомы); колоректальный рак (в частности, не-MSI KPP), рак мочевого пузыря, рак печени, рак молочной железы (в частности, дважды или трижды отрицательный рак молочной железы), рак почки, плоскоклеточный рак головы/шеи, рак легкого (в частности, плоскоклеточная карцинома легкого, мелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мелкоклеточный рак легкого (МРЛ)), злокачественную меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечноклеточный рак или рак желудка. Термин "рак" также включает метастазы указанных опухолей в различных органах. В предпочтительном варианте осуществления эти опухоли устойчивы к токсичности парвовируса. В другом предпочтительном варианте осуществления эти опухоли, подлежащие лечению, представляют собой рецидивирующие опухоли. Особым преимуществом фармацевтической композиции по настоящему изобретению является то, что могут быть успешно вылечены даже иницирующие рак стволовые клетки. Это оказывает положительный эффект с точки зрения предотвращения рецидива опухолей и образования метастазов.

В других вариантах осуществления рак представляет собой злокачественную опухоль гема, т.е. острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), EBV-положительную ДВККЛ, первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, Т-клеточную (гистиоцитарную) В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина (HL), лимфому мантийных клеток (MCL), множественную миелому (ММ), белок клеток миелоидной лейкемии- (Mcl-1), синдром миелодисплазии (MDS), неходжкинскую лимфому (НХЛ) или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL).

Термин "ингибитор контрольных точек" обозначает любой агент, который вызывает блокаду ингибирующих контрольных точек иммунной системы. Блокада ингибирующих иммунных контрольных точек активирует функцию иммунной системы. Подходящие мишени и агенты приведены в табл. 1, на которую сделана ссылка. В предпочтительном варианте осуществления взаимодействие лиганд-рецептор в качестве мишени для лечения рака представляет собой взаимодействие между трансмембранным белком запрограммированной клеточной смерти 1 (PDCD1, PD-1, также известным как CD279) и его лигандом, PD-1-лигандом (PD-L1, CD274). В нормальной физиологии PD-L1 на клеточной поверхности связывается с PD-1 на поверхности иммунной клетки, что ингибирует активность иммунных клеток.

Повышающая регуляция PD-L1 на поверхности раковых клеток может позволить им уклоняться от иммунной системы пациента, ингибируя Т-клетки, которые могли бы в противном случае атаковать эту опухолевую клетку. Антитела, которые связываются с PD-1 или PD-L1 и, тем самым, блокируют это взаимодействие, позволяют Т-клеткам атаковать опухоль. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления в качестве ингибитора контрольных точек используют антагонисты PD-1.

"Антагонист PD-1" означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая блокирует связывание PD-L1, экспрессируемого на раковой клетке, с PD-1, экспрессируемым на иммунной клетке (Т-клетке, В-клетке или НКТ-клетке), и предпочтительно также блокирует связывание PD-L2, экспрессируемого на раковой клетке, с экспрессируемым на иммунной клетке PD-1. Альтернативные названия или синонимы для PD-1 и его лигандов включают PDCD1, PD-1, CD279 и SLEB2 для PD-1; PDCD1 L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 и B7-H для PD-L1 и PDCD1 L2, PDL2, B7-DC, Btdc и CD273 для PD-L2. При любом способе лечения, лекарственных средствах и применениях настоящего изобретения, включающих лечение человека, антагонист PD-1 блокирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека и предпочтительно блокирует связывание PD-L1 человека и PD-L2 человека с PD-1 человека. Аминокислотные последовательности PD-1 человека приведены в базе NCBI Locus № NP 054862 и NP 079515 соответственно.

Антагонисты PD-1, используемые в любом способе лечения, лекарственных средствах и применениях по настоящему изобретению, включают моноклональное антитело (mAb) или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с PD-1 или PD-L1 и предпочтительно специфически связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека. Это mAb может быть человеческим антителом, гуманизированным антителом или химерным антителом и может включать константную область человека. В некоторых вариантах осуществления константная область человека выбирают из группы, состоящей из константных областей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а в предпочтительных вариантах осуществления константная область человека представляет собой константную область IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из Fab, Fab*-SH, F(ab')₂, scFv и Fv-фрагментов.

Примеры mAb, которые связываются с PD-1 человека и используемые в способе лечения, лекарственных средствах и применениях настоящего изобретения, описаны в патентах США US 7521051, US 8008449 и US 8354509. Специфические античеловеческие mAb к PD-1, используемые в качестве антагониста PD-1 в способе лечения, лекарственных средствах и применениях по настоящему изобретению, включают МК-3475 (пембролизумаб), гуманизированное mAb IgG4 со структурой, описанной в Лекарственном вестнике ВОЗ, т. 27, № 2, с. 161-162 (2013); ниволумаб (BMS-936558), человеческое mAb IgG4 со структурой, описанной в Лекарственном вестнике ВОЗ, т. 27, № 1, с. 68-69 (2013); гуманизированные антитела h409A11, h409A16 и h409A17, которые описаны в WO 2008/156712 A1.

Специалисты в данной области техники поймут, что любой тип вируса, который является потенциально цитотоксичным для опухолевых клеток, может быть использован в комбинации по настоящему изобретению. Репликационно-компетентные токсичные вирусы, используемые в изобретении, могут влиять на опухоль, убивая ее путем лизиса, т.е. быть онколитическим, или могут убивать опухолевые клетки с помощью другого механизма. Конкретные примеры вирусов для применения при реализации данного изобретения включают аденовирус, ретровирус, вирус везикулярного стоматита, вирус болезни Ньюкасла, вирус полиомы, вирус коревой оспы, вирус простого герпеса и парвовирус. Предпочтительным онколитическим вирусом является парвовирус, более предпочтительно парвовирус Н-1 или родственный ему парвовирус грызунов, выбранный из LuIII, мышинового вируса (MMV), парвовируса мыши (MPV), мелкого вируса крысы (RMV), парвовируса крысы (RPV) или вируса крысы (RV).

Используемый в настоящем изобретении термин "онколитический вирус" и, в частности, "парвовирус" или "парвовирус Н-1", включает его репликационно-компетентные производные дикого типа или модифицированные, а также родственные вирусы или векторы на основе таких вирусов или производных. Подходящие онколитические вирусы, производные и т.д., а также клетки, которые могут быть использованы для активного производства указанных вирусов и которые являются подходящими для лечения, легко определяются специалистом в данной области техники на основании настоящего раскрытия без лишних эмпирических усилий.

Введение данных соединений может быть осуществлено различными способами, например внутривенным, внутривнутрибрюшинным, подкожным, внутримышечным, местным, внутриопухолевым или внутрикожным введением. Путь введения, разумеется, зависит от вида терапии и вида соединений, содержащихся в фармацевтической композиции. Схема дозирования вируса и ингибитора контрольных точек легко определяется специалистом в данной области техники, лечащим врачом, исходя из данных пациента, наблюдении и других клинических факторов пациента, включая, например, вес пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретный вирус, конкретный предназначенный для введения ингибитор и т. д., время и путь введения, тип и характеристики опухоли, общее состояние здоровья пациента и другие лекарственные препараты, которые получает пациент. Что касается ингибиторов контрольных точек, см. инструкцию по применению препарата и информационный листок пациента, которые включены в настоящее описание путем ссылки. Выбор схемы дозирования (также называемой в настоящем опи-

сании схемой введения) для комбинированной терапии согласно изобретению зависит от нескольких факторов, включая скорость выведения из сыворотки или ткани субъекта, уровень симптомов, иммунгенность субъекта и доступность клеток-мишеней, ткани или органа-мишени у человека, которого лечат. Предпочтительно схема дозирования максимизирует количество каждого терапевтического агента, доставляемого пациенту, в сочетании с приемлемым уровнем побочных эффектов. Соответственно, величина дозы и частота дозирования каждого терапевтического агента в комбинации частично зависят от конкретного терапевтического агента, тяжести рака пациента и характеристик пациента. Доступны рекомендации по выбору подходящих доз антител, цитокинов и малых молекул. См., например, работы Wawrzynczak (1996), *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd. Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Beart et al. (2003), *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999), *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001), *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000), *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003), *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000), *New Engl. J. Med.* 343: 1594-1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57-е изд.); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57-е изд. (ноябрь 2002 г.). Определение соответствующей схемы дозирования может быть выполнено клиницистом, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области техники, влияющих на лечение или согласно прогнозам влияющих на лечение, и будет зависеть, например, от истории болезни пациента (например, предшествующей терапии), типа и стадии рака, подлежащего лечению, и биомаркеров ответа на один или более терапевтических агентов в комбинированной терапии.

Так как вирус в комбинации с ингибитором контрольных точек в соответствии с настоящим изобретением содержит инфекционные вирусные частицы, способные проникать через систему крови, лечение может быть выполнено или, по крайней мере, начато внутривенной инъекцией вируса. Однако предпочтительным способом введения является внутриопухолевое введение.

Поскольку долгосрочное внутривенное лечение подвержено потере эффективности в результате образования нейтрализующих антител к вирусу, после первоначальной схемы внутривенного введения вируса могут быть выбраны другие способы введения либо такие другие способы введения, например внутриопухолевое введение вируса, можно применять альтернативно на протяжении всего курса вирусной терапии.

В качестве другого специфического способа введения вирус (вирус, вектор и/или клеточный агент) можно вводить пациенту из источника, имплантированного пациенту. Например, катетер, в том числе из силикона или другого биосовместимого материала, можно подключить к небольшому подкожному резервуару (резервуар Рикхэма), установленному у пациента во время удаления опухоли или при отдельной процедуре, чтобы сделать возможными инъекции композиции парвовируса локально в разное время без дальнейшего хирургического вмешательства. Вирус или производные векторы также могут быть введены в опухоль с помощью стереотаксических хирургических методов или методов навигационного нацеливания на мишени.

Введение вируса также может быть осуществлено путем непрерывной инфузии вирусных частиц или жидкостей, содержащих вирусные частицы, через имплантированные катетеры при низких скоростях потока с использованием подходящих насосных систем, например перистальтических инфузионных насосов или насосов с конвекционной доставкой (CED).

Еще один способ введения вирусной части комбинации - введение из имплантированного устройства, сконструированного и приспособленного для подачи парвовируса к соответствующей раковой ткани. Например, могут применяться пластины-имплантаты, пропитанные вирусом, в частности парвовирусом H-1, причем такую пластину прикрепляют к краям полости резекции по завершении хирургического удаления опухоли. В таком терапевтическом вмешательстве можно использовать несколько пластин. Также в опухоль или в опухолевую полость после удаления опухоли могут быть введены клетки, которые активно продуцируют вирус или вирусные векторы.

Согласно изобретению также допустимо клиническое применение вируса и/или ингибитора контрольных точек при более низких терапевтических дозах, сохраняя или даже усиливая противоопухолевую эффективность, одновременно повышая безопасность и уменьшая и/или устраняя побочные эффекты. Ввиду сильного синергетического эффекта между вирусом и ингибитором контрольных точек можно предвидеть снижение терапевтических доз, например, половина или треть ранее использованных однокомпонентных доз будут сохранять желаемый терапевтический эффект. Ввиду сниженных доз (тяжелые) побочные эффекты можно уменьшить или даже избежать их.

В случае парвовируса эффекты инфицирования убивают опухолевые клетки, но не вредят нормальным клеткам, и такое инфицирование можно, например, реализовать при помощи внутриопухолевого применения подходящего парвовируса, например парвовируса H-1, или родственного ему вируса или векторов на основе таких вирусов, для осуществления опухолеспецифической терапии без неблагоприятных неврологических или других побочных эффектов.

Комбинированную терапию согласно изобретению можно использовать до или после операции для

удаления опухоли, а также до, во время или после лучевой терапии.

Комбинированную терапию согласно изобретению обычно используют для лечения опухоли, которая достаточно велика для обнаружения пальпацией или методами визуализации, хорошо известными в данной области техники, такими как МРТ, УЗИ или компьютерная аксиальная томография. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления комбинированную терапию согласно изобретению используют для лечения опухоли продвинутой стадии, имеющей размеры по меньшей мере примерно 200, 300, 400, 500, 750 или до 1000 мм³.

Фармацевтическая комбинация может также содержать один или более дополнительных терапевтических агентов. Таким дополнительным терапевтическим агентом может быть, например, химиотерапевтический агент, биотерапевтический агент (включая, помимо прочего, антитела к VEGF, EGFR, Her2/neu, рецепторам VEGF, другим рецепторам фактора роста, CD20, CD40, CD40L, CTLA-4, OX-40 4-1 BB и ICOS), иммуногенный агент (например, ослабленные раковые клетки, опухолевые антигены, антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, активированные опухолевым антигеном или нуклеиновыми кислотами, иммуностимулирующие цитокины (например, IL-2, IFN α 2, ГМ-КСФ) и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (такими как, помимо прочего, ГМ-КСФ).

Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как циклофосфамид, бусульфид, один из камптотецинов, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин, антибиотики, блеомицины, камминомицин, дактиномицин, даунорубин, идарубин, 5-фторурацил (5-ФУ), метотрексат, цитарабин, аналог платины, такой как цисплатин и карбоплатин; винбластин, платина; этопозид (VP-16); ифосфамид, митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин, кселода; ибандронат; ингибиторы топоизомеразы; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, тамоксифен, ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен или ингибиторы ароматазы.

Настоящее изобретение также относится к применению (a) парвовируса H-1 и (b) ингибитора контрольных точек для получения фармацевтической композиции (композиций) или комбинации для лечения рака.

Способ введения компонентов (a) и (b) может быть реализован одновременно или последовательно, причем предпочтительно (a) и (b) вводят последовательно (или по отдельности). Это означает, что (a) и (b) могут быть предоставлены в единичной дозированной форме для применения совместно или в виде отдельных единиц (например, в отдельных контейнерах), которые должны вводиться одновременно или с определенной разницей во времени. Эта разница во времени может составлять от 1 ч до 1 недели, предпочтительно от 12 ч до 3 дней. Кроме того, вирус можно вводить с помощью другого способа введения, нежели способ введения ингибитора контрольных точек. В этом отношении может быть выгодным вводить вирус или ингибитор контрольных точек внутриопухолевым путем, а другой препарат соответственно - системно или перорально. В конкретном предпочтительном варианте осуществления вирус вводят внутриопухолевым путем, а ингибитор контрольных точек - внутривенно. Предпочтительно вирус и ингибитор контрольных точек вводят в виде отдельных соединений. Возможна также сопутствующая терапия этими двумя агентами.

Каждый терапевтический агент в составе комбинированной терапии согласно изобретению может вводиться либо отдельно, либо в лекарственном средстве (также называемом в настоящей заявке фармацевтической композицией), содержащем этот терапевтический агент и один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ и разбавителей в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Каждый терапевтический агент в составе комбинированной терапии согласно изобретению может вводиться одновременно (т.е. в одном и том же лекарственном средстве), параллельно (т.е. в отдельных лекарственных средствах, вводимых одно за другим в любом порядке) или последовательно в любом порядке. Последовательное введение является особенно подходящим, когда терапевтические агенты в составе комбинированной терапии находятся в разных лекарственных формах (один агент представляет собой таблетку или капсулу, а другой агент представляет собой стерильную жидкость) и/или вводятся по разным схемам дозирования, например химиотерапевтический препарат, который вводят по меньшей мере ежедневно, и биотерапевтический препарат, который вводят реже, например один раз в неделю, раз в две недели или раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из терапевтических агентов в составе комбинированной терапии вводят с использованием той же схемы дозирования (доза, частота и продолжительность лечения), которая обычно применяется, когда агент используют в качестве монотерапии для лечения того же вида рака: в других вариантах осуществления пациент получает меньшее общее количество по меньшей мере одного из терапевтических агентов в составе комбинированной терапии, чем когда этот агент используется в качестве монотерапии, например, меньшие дозы, менее частые дозы и/или более короткая продолжительность лечения. Ингибитор контрольных точек и онколитический вирус, описанные в настоящей заявке, могут быть предоставлены в виде набора, который содержит первый контейнер и второй контейнер и инструкцию по применению препарата. Первый контейнер содержит по меньшей мере одну дозу лекарственного средства, содержащего ингибитор контрольных точек, предпочти-

тельно антагонист PD-1, второй контейнер содержит по меньшей мере одну дозу лекарственного средства, содержащего онколитический вирус, и инструкцию по применению препарата или этикетку, содержащую инструкции по лечению пациента от рака с применением этих лекарственных средств. Первый и второй контейнеры могут быть одинаковой или различной формы (например, флаконы, шприцы и бутылки) и/или состоять из одинакового или различного материала (например, пластика или стекла). Набор может дополнительно содержать другие материалы, которые могут являться подходящими при введении лекарственных средств, например разбавители, фильтры, пакеты и системы для внутривенного вливания, иглы и шприцы. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления набора антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1, и в инструкциях указано, что эти лекарственные средства предназначены для применения при лечении пациента, страдающего от рака, с положительным результатом теста на экспрессию PD-L1 посредством анализа ИГХ.

В настоящем изобретении впервые было показано, что комбинированное применение онколитического вируса, в частности парвовируса H-1 PV и ингибитора контрольных точек, в частности пембролизумаба, может быть эффективным подходом при лечении рака, в частности опухоли головного мозга, карциномы толстой кишки и карцином поджелудочной железы. Как описано более подробно в примерах, неожиданно оказалось возможным уменьшить размер метастазов при типе опухоли (колоректальный рак), который обычно не реагирует на лечение ингибиторами контрольных точек. Еще более удивительно, что было получено значительное уменьшение размера опухоли при неоперабельной первичной мультиформной глиобластоме.

Без привязки к конкретной теории, поскольку ранее упомянутые опухоли укрываются от атак иммунной системы, используя пути иммунных контрольных точек, например посредством связывания PD-L1 на стороне опухоли с PD-1-рецептором на стороне Т-клеток. Это приводит к иммунной толерантности организма в отношении опухоли. Ингибиторы иммунных контрольных точек представляют собой антитела, которые блокируют пути иммунных контрольных точек (например, антитела к PD-L1 или к PD-1). В результате иммунная толерантность нарушается, и иммунные клетки могут распознавать опухоль и атаковать ее. Однако это не работает для всех типов опухолей, поскольку опухоли часто имеют микроокружение, которое делает невозможным вторжение активированных иммунных клеток в опухоль. Теперь это вторжение в опухоль становится возможным благодаря применению онколитического вируса, в частности парвовируса, в частности парвовируса H-1, который атакует опухоль и изменяет ее микроокружение. Другими словами, онколитический вирус способен сделать опухоль "обнаженной" посредством онколиза, а иммунные клетки, которые были "вооружены" с помощью ингибитора контрольных точек, могут начать вторжение в опухоль. Онколитический вирус можно рассматривать как "отмычку" для успешного иммунного ответа. С этой концепцией может оказаться возможным лечение любых типов опухолей, в том числе также таких, лечение которых ингибитором контрольных точек в прошлом не удавалось, поскольку лечение онколитическим вирусом трансформирует неиммуногенную опухоль в иммуногенную. Вследствие общего принципа это работает с любым онколитическим вирусом, если он изменяет микроокружение опухоли и с любым ингибитором контрольных точек. Это может вести к долгосрочным последствиям для профилактики рецидивов заболеваний, потенциально развивая успех первоначального онколиза. Эта комбинация эффектов делает опухоль более уязвимой перед иммунной системой, в частности, после предыдущей терапии вирусом. Примеры пациентов показывают, что эта комбинированная терапия приводит либо к ремиссии, либо к стабилизации болезни.

При исследовании прогрессирования рака обнаружилось, что определенную роль в нем играет развивающееся взаимовлияние между различными клетками, включая особенно раковые клетки и иммунные клетки. Раковые клетки способны изменять иммунное микроокружение и функцию иммунных клеток, что приводит к иммуносупрессии и уклонению от распознавания иммунной системой (Fridman et al., 2012; Gabrilovich et al., 2012; Halama et al., 2011 (a), 2011 (b)). Например, в случае метастазов в печени, вызванных колоректальным раком (КРР), было показано, что инвазивный край метастазов в печени от колоректального рака является иммунологическим микроокружением со своей собственной активностью. Это окружение индуцирует миграцию Т-лимфоцитов в инвазивный край из-за отчетливого градиента хемокинов. Инфильтрирующие Т-лимфоциты оказывают стимулирующее опухоль воздействие посредством своей собственной выработки CCL5. Это микроокружение в метастазах в печени, вызванных колоректальным раком, не показывает наличия Th1, Th2 или Th7, но зато оптимизировано для стимулирующего опухоль воспаления с участием хемокинов и факторов роста, таких как VEGF, HGF и MTF. (Halama et al., 2016). В этой статье были наглядно продемонстрированы: а) иммуносупрессивный ландшафт, б) потенциальный защитный для опухоли механизм, используемый метастазами колоректального рака, и с) стимулирующие опухоль свойства специфических субпопуляций иммунных клеток в опухолях и метастазах. В этой публикации также показано, что опухолевые клетки на инвазивном крае являются PD-L1 отрицательными. Это может быть объяснением того, почему лечение ингибиторами контрольных точек пока не было столь успешным при нескольких видах опухолей. Как уже упоминалось ранее, необходимо изменить микроокружение онколитическим вирусом, прежде чем иммунные клетки смогут успешно попасть в опухоль и атаковать ее. В этой связи см. пример 2 и фиг. 1-9, показывающие, что после лечения парвовирусом H-1 и PD-1-антителом наблюдалось значительное увеличение плотности

Т-клеток в опухоли и что большинство Т-клеток являются PD-1-положительными.

Далее изобретение будет описано только в качестве иллюстрации со ссылкой на следующие неограничивающие примеры, методы и фигуры.

Фигуры

Фиг. 1: Иммунофлуоресценция материала биопсии 1 метастазов печени (CD3) показывает наиболее важные области опухоли, прозрачный инфильтрат CD3-положительных клеток. Инфильтраты являются гетерогенными.

Фиг. 2: Иммунофлуоресценция материала биопсии 1 метастазов печени (CD8) показывает прозрачный инфильтрат эффекторных Т-клеток, как и в предыдущем примере, гетерогенный. Интересно, что наблюдается близость CD8+ Т-клеток к опухолевому эпителию, что встречается редко.

Фиг. 3: Иммунофлуоресценция материала биопсии 1 метастазов печени (PD-1) показывает, что преимущественно стромальный компартмент богат Т-клетками. Большинство из них являются PD-1 положительными.

Фиг. 4: Иммунофлуоресценция материала биопсии 2 метастазов печени (CD3) показывает, что после первой инфузии Н-1 PV + PD-1-антитела наблюдалось значительное увеличение плотности Т-клеток (около + 30-50%). Как и в предыдущем случае, гетерогенная картина.

Фиг. 5: Иммунофлуоресценция материала биопсии 2 метастазов печени (CD8) показывает значительное увеличение плотности CD8+ Т-клеток. Высокогетерогенная картина. Тесный контакт CD8+ Т-клеток с опухолевыми клетками.

Фиг. 6: Иммунофлуоресценция материала биопсии 2 метастазов печени (PD-1) показывает, что большинство Т-клеток являются PD-1-положительными.

Фиг. 7: Иммунофлуоресценция материала биопсии 3 метастазов печени (CD3) показывает, что после второй инфузии Н-1 PV + PD-1-антитела опять наблюдается увеличение плотности Т-клеток. Как и в предыдущем случае, высокогетерогенная картина.

Фиг. 8: Иммунофлуоресценция материала биопсии 3 метастазов печени (CD8) показывает плотные инфильтраты Т-клеток, похожие на материал биопсии 2.

Фиг. 9: Иммунофлуоресценция материала биопсии 3 метастазов печени (PD-1) показывает, что большинство Т-клеток все еще являются PD-1-положительными.

Фиг. 10-15: Профили цитокинов.

Данные количественного определения содержания цитокинов путём мультиплексного анализа

Эталонные данные для количественного определения белка.

Равные количества белка для каждой биопсии.

Показаны относительные величины (изображенные точками столбцы содержат слишком низкие количества белков, чтобы считаться робастными).

Фиг. 10: Повышенные/активированные белки: STACK-CCL27, IL-16, SDF-12, IP-10, MIP-1b.

Фиг. 11: Пониженные/подавляемые белки: G-CSF, IL-5, IL-7, IL-13, IL-12p40, FGF стандартный, MIF, SCGF-β, IL-1α.

Фиг. 16: МРТ прогрессирующей рецидивирующей мультиформной глиобластомы перед лечением и во время лечения (55 и 101 день после введения комбинации Н-1 PV + пембролизумаб).

Верхний ряд: до лечения комбинацией Н-1 PV + пембролизумаб.

Средний ряд: 55 дней после введения комбинации Н-1 PV + пембролизумаб.

Нижний ряд: 101 день после введения комбинации Н-1 PV + пембролизумаб.

Примеры

Пример 1. Общие методики.

(а) Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).

Количественный анализ FISH.

Процедуру методики выполняли в основном так, как описано в работах Silaharoglu et al. (Molecular and Cellular Probes. 2003; 17:165-169) и Nehme et al. (J. Neurosci. Methods. 2011; 196:281-288). Анализ FISH был впервые принят в качестве стандартного в клетках NBK человека, культивированных in vitro, и распространен на залитую парафином опухолевую ткань, полученную из ксенотрансплантатов глиомы человека у крыс с иммунодефицитом. Затем протокол этого анализа был применен для обнаружения ДНК- и РНК-последовательностей Н-1 PV в залитом парафином или криоконсервированном опухолевом материале, полученном от пациента.

Положительный и отрицательный контроль.

В каждом анализе FISH в качестве положительного или отрицательного контроля использовали залитую парафином опухолевую ткань, полученную из подвергнутых воздействию Н-1 PV или имитатора ксенотрансплантатов человеческой глиомы у крыс соответственно. Также были включены контрольные образцы без зонда (отрицательный контроль с заменой реагента, мишень-специфический гибридизационный зонд не использован) и контрольные образцы с несовпадением (мишень-специфический гибридизационный зонд с заменой 3-5 нуклеотидов).

Гибридизационные зонды.

Мишень-специфические гибридизационные зонды были специально разработаны компанией Exiqon

(Ведбек, Дания) для распознавания кодирующих последовательностей неструктурных (NS) и структурных (VP) белков H-1 PV и представляли собой олигонуклеотиды с запертой нуклеиновой кислотой (LNA) с увеличенной мишень-специфичностью и связыванием с высокой эффективностью (см. www.exiqon.com). Зонды синтезировали путем обратной комплементации либо отрицательной (смысловой), либо положительной (антисмысловой) цепи ДНК H-1 PV, и добавляли в качестве двойной метки дигоксин (DIGN) на их 3'- и 5'-концах. NS- и VP-специфичные зонды применяли в виде смеси равных количеств, чтобы увеличить сигнал гибридизации.

NS1-антисмысловая последовательность:

5DIGN/TCAGCACACAACAGATGGCAT/3DIGN

VP-антисмысловая последовательность:

5DIGN/TACTATCCAGAGCAACCATCAT/3DIGN

NS1-смысловая последовательность:

5DIGN/AATTCGCTAGGTTCAATGCGCT/3DIGN

VP-смысловая последовательность:

5DIGN/TGACCTACCAACATCAGATACA/3DIGN

Визуализация сигналов.

Визуализацию сигналов получали путем последовательной инкубации с антителом к DIGN, конъюгированным с пероксидазой хрена (Roche, Sigma-Aldrich, Мюнхен, Германия), и реагентом тирамидного усиления сигнала (TSA)/цианина (Cy) 3 (Perkin Elmer, Германия). Изображения получали с использованием микроскопа Zeiss Cell Observer и программного обеспечения ZEN.

Количественное определение сигналов.

Для количественного анализа положительных сигналов использовали программное обеспечение Fiji ImageJ, а также был проведен автоматизированный анализ с использованием специально разработанных пользовательских макросов (Д-р D. Krunic, Германский онкологический научный центр, Гейдельберг, Германия) и настроек постоянной обработки. Результаты представляли в виде средней интенсивности положительных сигналов на поле зрения микроскопа (dFOV = 1000 мкм) и/или в виде средней интенсивности положительных сигналов на одну меченую клетку. Значение фоновой флуоресценции (ложноположительные сигналы, генерируемые зондом с несовпадением) определяло границу отсеки между положительным и отрицательным сигналами. Интенсивность сигнала выражали в произвольных единицах (а.е.).

(b) Клеточные культуры и анализы пролиферации.

Т-клетки отбирали у здоровых доноров и после короткого периода выдержки стимулировали в 96-луночных планшетах с покрытием CD3/CD28 (анти-CD3 от производителя BioLegend, США, анти-CD8 от производителя BD, Германия) в течение ночи. Культуральные среды для Т-клеток содержали раствор RPMI1640 (РАА, США), 10% сыворотку человека (инактивированную нагреванием в течение 30 мин при 56°C), 1% глутамин (РАА, США), 1% пенициллина/стрептомицина (РАА, США), 1% незаменимых аминокислот (РАА, США) и 1% HEPES (РАА, США). Коммерческие линии опухолевых клеток культивировали в соответствии с инструкциями поставщиков. Количественную оценку клеток проводили в трех повторностях с двойными измерениями при помощи автоматического счетчика клеток TC10 (BioRad, Германия), в частности непосредственно после посева (т.е. $0,5 \times 10^5$ клеток/мл для анализов пролиферации, клетки, равномерно высеянные в планшетах) и после инкубации/обработки препаратом. Первичные клеточные линии аутентифицировали с использованием системы мультиплексной аутентификации клеток Multiplexion (Гейдельберг, Германия), описанной в недавней статье (Castro et al., 2013). Профили SNP, сопоставленные известным профилям, были уникальными, соответствуя линии клеток эпителиальных опухолей человека. Все клеточные линии были протестированы на заражение микоплазмой с помощью ПЦР.

Приготовление образцов асцитической жидкости (от пациентов с колоректальным раком) и экстракцию макрофагов и лимфоцитов проводили следующим образом. Подготовленную согласно предыдущим работам асцитическую жидкость собирали в стерильные полиэтиленовые пакеты. Выходной патрубком каждого мешка дезинфицировали 70%-ным спиртом и первую фракцию асцитической жидкости отбрасывали, а оставшуюся асцитическую жидкость разливали в 50 мл пробирки Falcon. Центрифугирование проводили со скоростью 1500 об/мин в течение 10 мин. Супернатанты смешивали со средой RPMI (1:2) и использовали в качестве кондиционированной среды (СМ). Для получения популяций макрофагов (а) гранулы затем ресуспендировали в среде RPMI и пропускали через градиент фиколла (30 мин при 2000 об/мин при комнатной температуре). Затем интерфазу собирали в RPMI, промывали и центрифугировали (1800 об/мин в течение 10 мин) и полученные гранулы затем высевали в клеточные колбы с RPMI. Для получения популяций макрофагов супернатанты затем собирали после стадии адгезии продолжительностью 1,5 ч (37°C), оставшиеся адгезивные клетки промывали PBS (три раза), а затем добавляли к ним СМ. Для получения лимфоцитов (b) гранулы затем ресуспендировали в среде RPMI, снова центрифугировали, а гранулы затем высевали в клеточные колбы с RPMI. После стадии адгезии супернатант использовали для извлечения лимфоцитов. После экспериментов с макрофагами или лимфоцитами супернатант измеряли на наличие цитокинов и клетки собирали и анализировали окрашиванием (двой-

ное окрашивание CD163 и CD68 для определения макрофагов, СЕА для определения опухолевых клеток и CDS для определения лимфоцитов) и выполняли контроль на чистоту клеточного содержимого (>95%). Экстракцию опухолевых клеток проводили после диссоциации опухолевой ткани и стадий адгезии.

(с) Количественное определение цитокинов и хемокинов.

Устройство считывания с матрицей из двух лазеров позволяет количественно оценить одновременно все рассматриваемые цитокины и хемокины. Стандартные кривые и концентрации рассчитывали с помощью программного обеспечения Bio-Plex Manager 4.1.1 на основе формулы 5-параметрической кривой логистической регрессии. В кратком изложении, мелкие кусочки расщепленной замороженной ткани переносили в 150 мкл холодного лизисного буфера, перемешивали на вортексе, замораживали при -80°C (10 мин) и оттаивали на льду. После инкубации в холодной ультразвуковой ванне (10 мин) образцы снова замораживали при -80°C , оттаивали на льду и центрифугировали (13000 об/мин, 20 мин, 4°C). Определяли концентрацию белка в супернатанте и доводили концентрацию лизатов до 1000 пг/мл (300 пг/мл для биоптатов) с помощью разбавителя - человеческой сыворотки (BioRad), а затем количественно определяли концентрации цитокинов/хемокинов в тканевых лизатах с помощью мультиплексных белковых матриц, в соответствии с инструкциями производителя (BioRad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США). Чувствительность обнаружения аналитов составляла от 1 пг/мл до 100 нг/мл. Значения, которые были определены платформой как находящиеся "вне диапазона", экстраполировали на основе простых стандартных кривых, которые были построены для каждого аналита. Поскольку стандартные кривые показали минимальные стандартные отклонения, для экстраполяции использовали концентрацию наиболее концентрированных стандартов. Для формирования классов цитокинов (в порядке убывания, например Th1, Th2, Th17 и т.д.) использовали базу данных AMIGO (<http://amigo.geneontology.org/>) при оценке конкретных терминов (например, GO: 0043030: регуляция активации макрофагов, GO: 0042104: положительная регуляция активированной пролиферации Т-клеток или GO: 0006935: хемотаксис) или поиск по литературе. Для анализа использовали положительные контрольные образцы из образцов с преобладанием цитокинов Th1, Th2 или Th17.

Общая воспроизводимость (точность) подхода мультиплексного количественного определения белков на последовательных срезах показала отличную воспроизводимость (ранговая корреляция Спирмена с $r=0,975$ и $p=0,0001$, медиана погрешности 70 пг/мл). Достоверность анализа оценивали с помощью измерений растворов с известными концентрациями цитокинов, например, CCL5 при концентрации 25000 пг/мл, которое показало стандартное отклонение 628,92 пг/мл, что соответствует 2,5% от ожидаемого значения, и CCL5 при концентрации 100 пг/мл, которое показало стандартное отклонение 2,7 пг/мл, что соответствует 2,7% от ожидаемого значения. Калибровку исследуемых аналитов выполняли в соответствии с рекомендациями производителя (BioRad, Германия), а дополнительный справочный материал о точности и достоверности приведен на сайте производителя (http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5803A.pdf).

Сравнение различных результатов количественного определения белков в серийных срезах инвазивного края также показало отличную воспроизводимость (ранговая корреляция Спирмена $\rho=0,922$, $p=0,0001$). Наконец, сравнение результатов количественного определения для микродиссектированного (с использованием лазера) материала с макродиссектированным материалом показало, что инвазивный край действительно является отделяемой с высокой точностью областью с воспроизводимыми и индивидуальными профилями цитокинов. Кроме того, отличия от соседних тканей печени или метастазов печени настолько выражены, что картина для макродиссектированного образца полностью совпадает с наблюдаемой в микродиссектированном образце.

Получение данных по цитокинам и хемокинам из биопсийного материала выполняли, как описано выше. Из-за ограничений в количестве доступного материала концентрации белка, используемые для анализа, устанавливали на 300 нг. С гистологической точки зрения соседняя ткань печени пациентов оставалась неизменной при лечении по сравнению с картиной до лечения, в отношении морфологии и наличия иммунных клеток. Поэтому в качестве контроля точности измерения цитокинов (и для оценки эффектов разведения и т.д.) использовали уровни цитокинов соседней ткани печени до и после лечения, которые показали отличную согласованность (ранговая корреляция Спирмена $\rho=0,991$ и $p=0,0001$, медиана погрешности 5 мкг/мл). Благодаря этому эффект заживления раны (который больше не должен присутствовать после 8-го дня после биопсии) вряд ли будет влиять на эффекты ингибирования CCR5. Процент апоптотических опухолевых клеток определяли путем подсчета апоптотических ядер (на основании ядерной морфологии) и интактных опухолевых клеток в срезах, окрашенных гемалауном и/или гематоксилином-эозином, как описано ранее (Duan et al., 2003).

(d) Иммуногистохимия и иммунофлуоресценция.

Зафиксированные формалином и залитые парафином (FFPE) ткани депарафинизировали и регидратировали (депарафинизирующий раствор BOND Dewax Solution, Leica, Германия). После высокотемпературной демаскировки эпитопа антигена (HIER) при 100°C (раствор BOND Epitope Retrieval Solution 1 или 2, Leica, Германия) эндогенную активность пероксидазы блокировали путем инкубации с 3%-ным пероксидным блокатором в течение 20 мин (Система обнаружения на основе полимеров BOND Polymer

Refine Detection System, Leica, Германия). Срезы блокировали 10% нормальной сывороткой коз (Vector, США). Список использованных антител и разведений приведен ниже. Их применяли в качестве первичных антител при комнатной температуре в течение 30 мин. Срезы инкубировали со вторичным антителом (кроличий антимышинный IgG, Bond Polymer Refine System, Leica, Германия) в течение 8 мин при комнатной температуре. Дальнейшее усиление сигнала выполняли путем инкубации с третьим антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена и связанных с молекулами декстрана в большом количестве, в течение 8 мин при комнатной температуре (Poly-HRP-мышинный-антикроличий IgG, детектирование связывания полимерных связей Система, Лейка, Германия). Обнаружение антигена осуществляли с помощью цветной реакции с 3,3-диаминобензидином (DAВ-хромоген, Bond Polymer Refine System, Leica, Германия). Затем срезы контрастно окрашивали гематоксилином (Bond Polymer Refine System, Leica, Германия) и монтировали с помощью Акватекса (Merck, Германия). Соответствующие контрольные изотипы использовали в качестве отрицательного контроля, а соседнюю нормальную ткань или известные положительные клетки использовали в качестве положительного контроля.

Иммунофлуоресцентное двойное окрашивание проводили на криосрезам с применением окрашенного красным флуоресцентным красителем Alexa Fluor 594 ослиного антимышинного IgG (Life Technologies, Германия) и окрашенного зеленым флуоресцентным красителем Alexa 488 козьего антикроличьего IgG (Life Technologies, Германия) последовательно с целью двойного окрашивания хемокинов (либо, в случае окрашенного зеленым флуоресцентным красителем Alexa 488 козьего антимышинного IgG, второе первичное антитело было исключено для контроля). Для анализа CD68, PD-L1, CD4, CD8 и CCL5 одновременно применяли окрашенный красным флуоресцентным красителем Alexa Fluor 594 ослиный антикроличий IgG (Invitrogen, Германия) и окрашенный зеленым флуоресцентным красителем Alexa 488 козий антимышинный IgG (Life Technologies, Германия). Для анализа CDS и CCL5 применяли окрашенные Alexa Fluor 555 козы антимышинные IgG (H+L) молекулярные зонды A21422 и окрашенный Alexa Fluor 488 козий антикроличий IgG. Криосрезы были зафиксированы либо 4% ПФА, либо 33% ацетоном в метаноле перед окрашиванием в соответствии с рекомендациями производителя антитела. После инкубации первого первичного антитела в течение ночи при 4°C применяли Alexa Fluor 594 (разведение 1:100) в течение 1 ч. Затем применяли второе первичное антитело в течение 3 ч при комнатной температуре и детектировали с помощью Alexa Fluor 488 (разведение 1:100) в течение 1 ч во время последовательного двойного окрашивания. Для одновременного окрашивания оба первичных антитела инкубировали в течение ночи после применения обоих Alexa Fluor (разведение 1:100 каждый) в течение 1 ч. Срезы монтировали с помощью среды Vectashield с DAPI (Вектор, США) для контрастирования. Конфокальные изображения получали на конфокальном микроскопе Nikon C2 Plus.

Моноклональные мышинные антитела, распознающие

человеческий CD3-эпсилон (разведение 1:100 и HIER1 для FFPE, фиксация 4% ПФА и HIER2 для криосрезам, клон PS1, Novocastra, Великобритания, и кролик моноклональный анти-CD3, клон Sp7 производства Abcam),

CD8 (разведение 1:50 и HIER2 для FFPE, разведение 1:100 и фиксация 4% ПФА и для криосрезам, клон 4B11, Novocastra, Великобритания),

CCR5 (разведение 1:50 и HIER1 для FFPE, разведение 1:100, фиксация 4% ПФА и HIER1 для криосрезам, клон MM0065-6H20, Abcam, Великобритания),

CCL5 (разведение 1:50 и фиксация 4% ПФА для криосрезам, клон VL1, BioLegend, США),

PD-1 (разведение 1:50 и HIER1 для FFPE, фиксация 33% ацетоном в метаноле для криосрезам, клон NAT, Abcam, Великобритания),

CD68 (разведение 1:200 и HIER1 для FFPE, разведение 1:700 и фиксация 33% ацетоном в метаноле для криосрезам, клон KP1, Abcam, Великобритания),

D163 (разведение 1:500 и HIER2 для FFPE, фиксация 33% ацетоном в метаноле для криосрезам, клон EDHu-1, AbD Serotec, Великобритания),

CD44 (разведение 1:9000 и HIER1 для FFPE, 1:5000, фиксация 4% ПФА и HIER2 для криосрезам, клон 156-3C1, Abcam, Великобритания),

D74 (разведение 1:50 и HIER 1 для FFPE, разведение 1:75, фиксация 4% ПФА и HIER2 для криосрезам, клон LN2, Abcam, Великобритания),

Ki67 (разведение 1:200, фиксация ПФА, клон MIB-1, DAKO, США),

CCR1 (разведение 1:50 и HIER1 для FFPE, фиксация 4% ПФА и HIER1 для криосрезам, клон MM0061-7B17, Abcam, США),

CXCL9 (разведение 1:100 и фиксация 33% ацетоном в метаноле для криосрезам, клон M 0220-7F11, Abcam, Великобритания),

CD11b (разведение 1:50 и фиксация 33% ацетоном в метаноле для криосрезам, клон 2Q902, Abcam, Великобритания) и

CXCL10 (разведение 1:50 и фиксация 33% ацетоном в метаноле для крио разделы, клон 6D4, Abcam, Великобритания), интерферон-альфа2 (разведение 1:50, клон EBI-1, eBioscience) и интерферон-гамма (разведение 1:00, клон B27, BioLegend).

Кроличьи антитела, распознающие человеческий PD-L1 (разведение 1:50 и HIER2 для FFPE, разве-

дение 1:150 и фиксация 4% ПФА для криосрезов, поликлональное антитело, Abcam, Великобритания), CCR3 (разведение 1:800, HIER1 и фиксация 4% ПФА для криосрезов, клон Y31, Abcam, Великобритания), CD4 (разведение 1:150 и фиксация 4% ПФА для криосрезов, клон SP35, Zytomed Systems, Германия), CD11b (разведение 1:500 и фиксация 4% ПФА, клон EP1345Y, Abcam, Великобритания), CD8 (разведение 1:150 и фиксация 4% ПФА для криосрезов, клон SP16, Zytomed Systems, Германия) и CEACAM5 (разведение 1:100, клон 327, Sino Biological).

Классическое окрашивание гематоксилином-эозином и по методу TUNEL проводили в соответствии с описанием производителя (набор для определения гибели клеток *in situ*, Roche, Германия) и использовали серийные срезы для количественной оценки мертвых опухолевых клеток путем сравнения данных TUNEL с морфологическим анализом. Поскольку параллельное сравнение срезов ткани подтвердило отличное диагностическое значение морфологического анализа в соответствии с предыдущей публикацией (Duan et al., 2003), морфологический анализ был предпочтительным методом оценки.

(е) Количественное определение (иммунных) клеток на цельном срезе.

Количество окрашенных иммунных клеток подсчитывали с использованием компьютеризированной системы анализа изображений, состоящей из слайд-сканера NOP Nanozoomer (Hamamatsu Photonics, Япония), подключенного к персональному компьютеру. Были автоматически получены полные микроскопические изображения целых срезов ткани (виртуальная микроскопия), и среднюю плотность клеток в измеряемой области использовали для анализа. Количество клеток в данной исследуемой области (в среднем - 10 мм², до 40 мм²) получали с помощью специально разработанной программы (комплект программного обеспечения VIS, Visiopharm, Дания), как описано ранее (Halama et al., 2011b; Halama et al., 2010; Halama et al., 2009b). Все оценки визуально проверяли на согласованность.

(f) Проточная цитометрия.

Для каждого эксперимента ткань из инвазивного края метастазов колоректального рака в печени (до 10 г) диссоциировали путем разрезания и нескольких стадий промывки с помощью клеточного фильтра 40 мкм и среды RPMI. Затем выделенные клетки помещали в 24-луночный планшет со средой RPMI (с добавкой 10% эмбриональной телячьей сыворотки) на ночь и затем в некоторых случаях блокировали монензином (BD Biosciences, Германия) в течение 3 ч. Затем клетки собирали, центрифугировали и анализировали на содержание CDS, CD8, CD4 и CCL5 с использованием стандартных протоколов проточной цитометрии.

Поверхностное окрашивание выполняли следующим образом: на каждые 100 мкл FACS-буфера (для анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией) использовали 2,5 мкл CD3-V450 (560365, BD, Германия), 1,25 мкл CD4-PerCP-Cy5.5 (560650, BD, Германия) и 2,5 мкл CD8-APC-H7 (641400, BD Biosciences, Германия) с последующей 20-минутной инкубацией на льду (в защищенном от света месте) и центрифугированием. Затем выполняли внутриклеточное окрашивание путем забора клеток в 1% ПФА и инкубации в течение 15 мин с последующими тремя стадиями промывки с 0,1% сапониновым буфером (и центрифугированием). Окрашивание CCL5 выполняли следующим образом: на каждые 100 мкл 0,1% сапонинового буфера использовали 5 мкл античеловеческого RANTES (CCL5)-eFluor660 (AF647, eBioscience, Великобритания) или изотипного контрольного мышиного IgG2b-eFluor660, 1,25 мкл (AF647, eBioscience, Великобритания) с последующей 15-минутной инкубацией при комнатной температуре (в защищенном от света месте) и двумя стадиями промывки 0,1%-ным сапониновым буфером. Затем меченые клетки анализировали методом FACS с использованием цитометра BD Biosciences FACS Canto II (Институт стволовых клеток Гарварда), при гейтировании с помощью отрицательных контрольных образцов.

Чтобы получить положительный контроль перед анализом опухолевой ткани и идентифицировать популяции лимфоцитов, здоровые донорские лимфоциты обрабатывали, как описано выше.

Пример 2. Комбинированная терапия парвовирусом H-1 и ингибитором контрольных точек у пациента с метастазирующим KPP (колоректальный рак).

Пациента, страдающего колоректальным раком (слабо дифференцированная аденокарцинома поперечной ободочной кишки, статус мутации: KRAS дикого типа, NRAS дикого типа, MSS, первая операция в 2013 году) с прогрессирующими метастазами в печени (прогрессирование по размеру и количеству), лечили суммарной дозой 1,2×10⁹ БОЕ парвовируса H-1, примененной в виде трех последовательных ежедневных инфузий (4×10⁸ БОЕ, дни 1-3), с последующим лечением ингибитором иммунных контрольных точек пембролизумабом (Кейтруда®) в соответствии с рекомендованной дозировкой изготовителя (2 мг/кг веса тела, день 1). Это лечение с той же схемой дозирования повторяли через 5 недель.

Биопсии метастазов печени были выполнены до начала лечения и в различные моменты времени во время лечения со следующими неожиданными результатами: по сравнению с первой биопсией, выполненной до лечения H-1 PV + пембролизумабом, наблюдалась лимфоцитарная инфильтрация, которая увеличивалась в последующих биопсиях (вторая и третья биопсии). Кроме того, анализ визуализации (УЗИ, КТ, МРТ) выявил массовое снижение метастазов в печени.

Фиг. 1-9 показывают, что во время лечения наблюдалось значительное увеличение плотности Т-клеток с преобладающей популяцией CD8⁺ Т-клеток. Инфильтраты Т-клеток являются гетерогенными

с поразительной близостью Т-клеток к опухолевым клеткам. Большинство Т-клеток являются PD-1-положительными.

Количественное определение цитокинов и хемокинов проводили с применением способа, описанного в примере 1 выше. Полученные профили показаны на фиг. 10-15. По-видимому, преобладает увеличение IP10 и CCL5. Наблюдалось отсутствие повышения IL-2 и лишь незначительное повышение гамма-интерферона.

Анализ FISH выполняли, как описано в примере 1 (а) выше. Он показывает, что в биопсии 2 определяется активный вирус (H-1 PV). Это явное указание на то, что вирус мигрировал в опухоль/метастазы.

Пример 3. Комбинированная терапия парвовирусом H-1 и ингибитором контрольных точек у пациента с первичной неоперабельной глиобластомой (мультиформная глиобластома).

Пациента, страдающего неоперабельной мультиформной глиобластомой, лечили суммарной дозой $1,2 \times 10^9$ БОЕ парвовируса H-1, примененной в виде трех последовательных ежедневных инфузий, с последующим лечением пембролизумабом (Кейтруда®) в соответствии с рекомендованной дозировкой производителя (2 мг/кг веса тела, через 3 дня после введения H1-PV).

МРТ выполняли до начала терапии и во время лечения ингибитором контрольных точек H-1 PV + пембролизумабом. МРТ выявила уменьшение размера опухоли, превышающее 30% после 55 дней лечения, и почти полную ремиссию на 101-й день. В настоящее время пациент поправляется, и ему не требуется никаких дополнительных лекарств. Результаты МРТ показаны на фиг. 16.

Указатель ссылок на материалы:

Breitbart CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQ, Nieva J, Hwang TH, Moon A, Patt R et al (2011) Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477: 99-102

Castro, F., Dirks, W.G., Fahnrch, S., Hotz-Wagenblatt, A., Pawlita, M., and Schmitt, M. (2013). High-throughput SNP-based authentication of human cell lines. *Int J Cancer* 132, 308- 314.

Cotmore SF, Tattersall P (2007) Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res* 70: 183-232

Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero y Calle M, Weber E, Schlehofer J, Deleu L, Rommelaere J (2007) Cytosolic Activation of Cathepsins Mediates Parvovirus H-1 -Induced Killing of Cisplatin and TRAIL-Resistant Glioma Cells. *Journal of Virology* 8 : 4186-4198

Duan et al., 2003; *J. Pathol.* 199, 221-228

Geletneky K, Huesing J, Rommelaere J, Schlehofer JR, Leuchs B, Dahm M, Krebs O, von Knebel Doeberitz M, Huber B, Hajda J (2012) Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryxOI protocol. *BMC cancer* 12: 99

Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C, and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12, 298-306.

Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268.

Halama, N., Braun, M., Kahlert, C, Spille, A., Quack, C, Rahbari, N., Koch, M., Weitz, J., Kloor, M., Zoernig, I., et al. (2011 a). Natural Killer Cells are Scarce in Colorectal Carcinoma Tissue Despite High Levels of Chemokines and Cytokines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 678-689.

Halama, N., Michel, S., Kloor, M., Zoernig, I., Benner, A., Spille, A., Pommerencke, T., von Knebel.D.M., Folprecht, G., Luber, B., et al. (2011 b). Localization and Density of Immune Cells in the Invasive Margin of Human Colorectal Cancer Liver Metastases Are Prognostic for Response to Chemotherapy. *Cancer Res* 71, 5670- 5677.

Halama, N., Michel, S., Kloor, M., Zoernig, I., Pommerencke, T., von Knebel Doeberitz, M., Schirmacher, P., Weitz, J., Grabe, N., and Jager, D. (2009a). The localization and density of immune cells in primary tumors of human metastatic colorectal cancer shows an association with response to chemotherapy. *Cancer immunity* 9, 1.

Halama, N., Spille, A., Lerch, T., Brand, K., Herpel, E., Welte, S., Keim, S., Lahrmann, B., Klupp, F., Kahlert, C, et al. (2013). Hepatic metastases of colorectal cancer are rather homogeneous but differ from primary lesions in terms of immune cell infiltration. *Oncoimmunology* 2, e24116.

Halama, N., Zoernig, I., Spille, A., Michel, S., Kloor, M., Grauling-Halama, S., Westphal, K., Schirmacher, P., Jaeger, D., and Grabe, N. (2010). Quantification of prognostic immune cell

markers in colorectal cancer using whole slide imaging tumor maps. *Anal Quant Cytol Histol* 32, 333-340.

Halama, N., Zoernig, I., Spille, A., Westphal, K., Schirmacher, P., Jaeger, D., and Grabe, N. (2009b). Estimation of Immune Cell Densities in Immune Cell Conglomerates: An Approach for High-Throughput Quantification. *PLoS One* 4, e7847.

Halama et al. (2016), "Tumoral immune cell exploitation in colorectal cancer liver metastases can be targeted effectively by anti-CCR5 therapy in cancer patients"; *Cancer Cell*, in press

Hristov G, Kramer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeflter L, Zentgraf H, Rommelaere J, Marchini A (2010) Through Its Nonstructural Protein NS1, Parvovirus H-1 Induces Apoptosis via Accumulation of Reactive Oxygen Species. *J Virol* 84: 5909-5922

Nuesch JP, Lacroix J, Marchini A, Rommelaere J (2012) Molecular pathways: rodent parvoviruses-mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. *Clin Cancer Res* 18: 3516-3523

Ohshima T, Iwama M, Ueno Y, Sugiyama F, Nakajima T, Fukamizu A, Yagami K (1998) Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. *The Journal of general virology* 79 (Pt 12): 3067-3071

Ran Z, Rayet B, Rommelaere J, Faisst S (1999) Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* 65: 161-174

Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J, Dinsart C (1998) Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol* 72: 8893-8903

Russell SJ, Peng KW, Bell JC (2012) Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30: 658-670

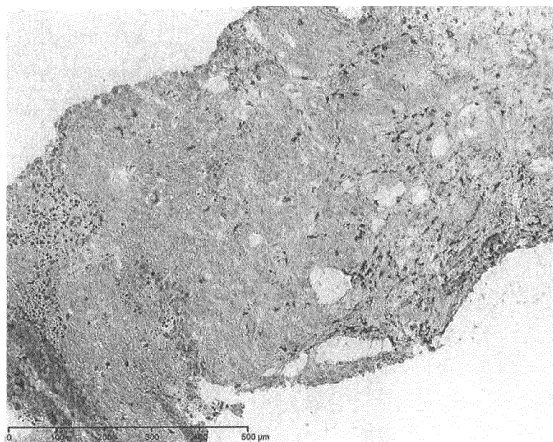
Ueno Y, Harada T, Iseki H, Ohshima T, Sugiyama F, Yagami K (2001) Propagation of rat parvovirus in thymic lymphoma cell line C58(NT)d and subsequent appearance of a resistant cell clone after lytic infection. *J Virol* 75: 3965-3970

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая комбинация для лечения рака, содержащая (а) парвовирус Н-1 и (b) анти-PD-1-антитело или анти-PD-L1-антитело.
2. Фармацевтическая комбинация по п.1, отличающаяся тем, что анти-PD-1-антитело представляет собой пембролизумаб или ниволумаб.
3. Фармацевтическая комбинация по любому из пп.1, 2, дополнительно содержащая один или более подходящих дополнительных терапевтических агентов, выбранных из химиотерапевтических агентов, биотерапевтических агентов, иммуногенных агентов, иммуностимулирующих цитокинов и клеток, трансфицированных генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины.
4. Применение фармацевтической комбинации по любому из пп.1-3 в способе лечения рака.
5. Применение по п.4, отличающееся тем, что указанное применение предназначено для лечения солидных опухолей, гематологического рака и/или иницирующих рак стволовых клеток.
6. Применение по любому из пп.4, 5, отличающееся тем, что рак представляет собой рак головного мозга, рак толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак печени, рак молочной железы, рак почки, плоскоклеточный рак органов головы и шеи, рак легких, злокачественную меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечноклеточный рак или рак желудка.
7. Применение по п.6, отличающееся тем, что рак головного мозга представляет собой мультиформную глиобластому.
8. Способ лечения рака, включающий применение фармацевтической комбинации по любому из пп.1-3, где (а) парвовирус Н-1 и (b) анти-PD-1-антитело или анти-PD-L1-антитело вводят последовательно.
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что (а) парвовирус Н-1 и/или (b) анти-PD-1-антитело или анти-PD-L1-антитело вводят внутриопухолевым или внутривенным путем.
10. Набор для лечения рака, который содержит первый контейнер, второй контейнер и листок-вкладыш, причем первый контейнер содержит по меньшей мере одну дозу фармацевтической композиции, содержащей парвовирус Н-1, второй контейнер содержит по меньшей мере одну дозу фармацевтической композиции, содержащей анти-PD-1-антитело или анти-PD-L1-антитело, и листок-вкладыш содержит инструкцию по применению для лечения субъекта, страдающего от рака, с применением указанной фармацевтической композиции (композиций).
11. Набор по п.10, отличающийся тем, что рак представляет собой рак головного мозга, рак толстой кишки, рак мочевого пузыря, рак печени, рак молочной железы, рак почки, плоскоклеточный рак органов

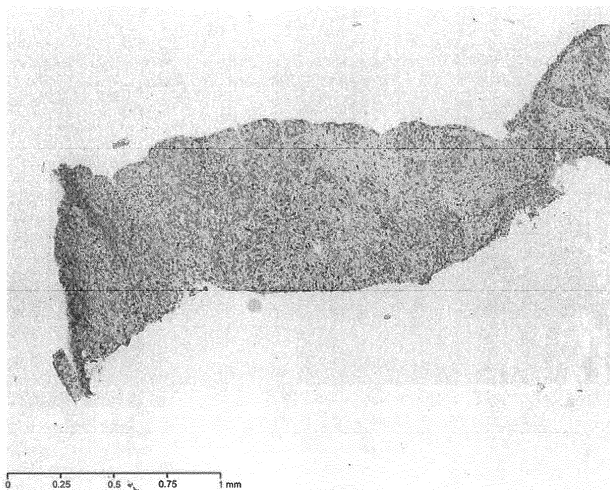
головы и шеи, рак легких, злокачественную меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечноклеточный рак или рак желудка.

12. Набор по п.11, отличающийся тем, что рак головного мозга представляет собой мультиформную глиобластому.



Биопсия 1 (CD3)

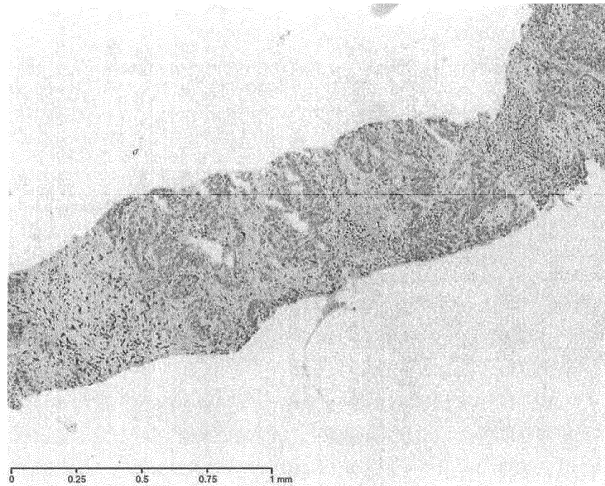
Фиг. 1



Биопсия 1 (CD8)

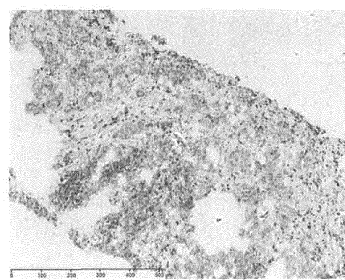
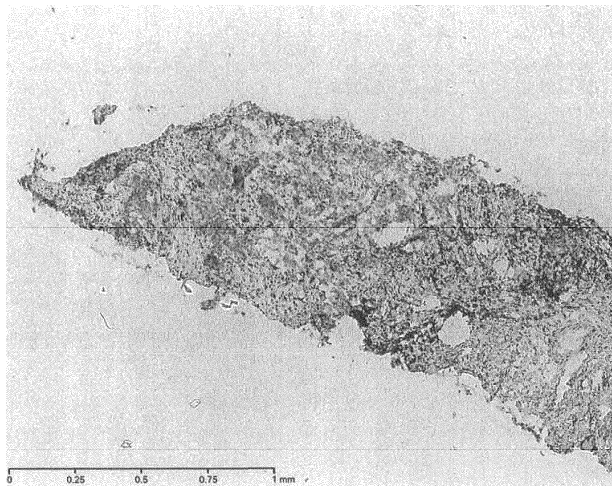
Фиг. 2

037354



Биопсия 1 (PD-1)

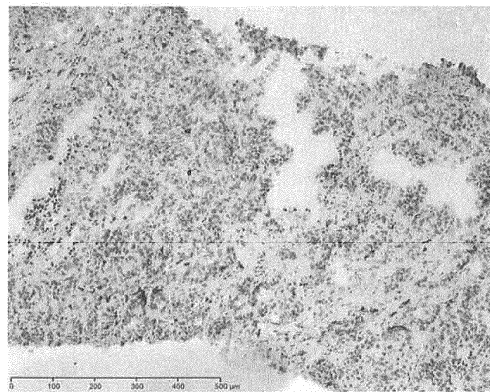
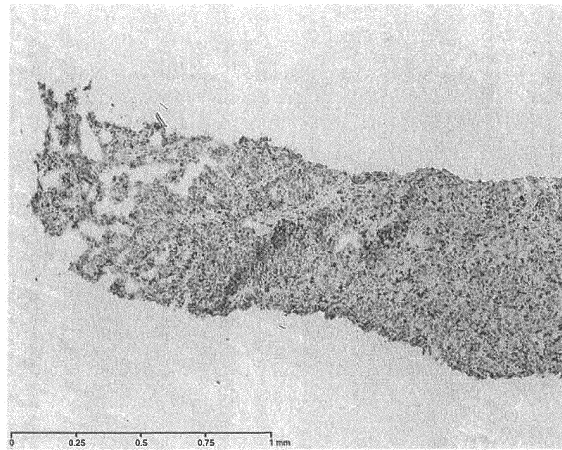
Фиг. 3



Биопсия 2 (CD3)

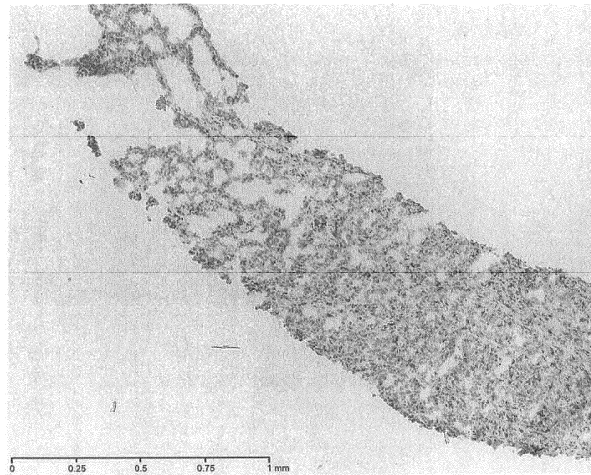
Фиг. 4

037354



Биопсия 2 (CD8)

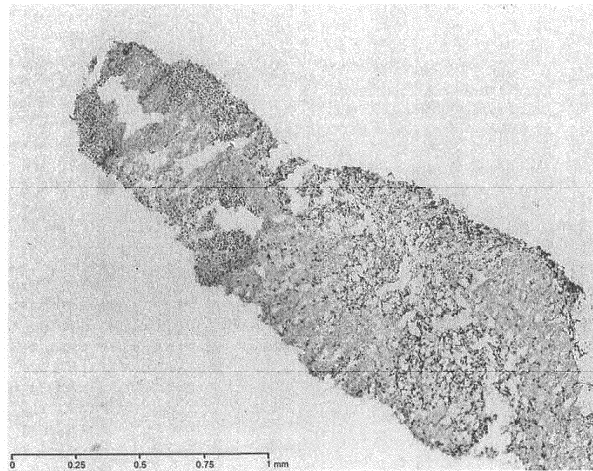
Фиг. 5



Биопсия 2 (PD-1)

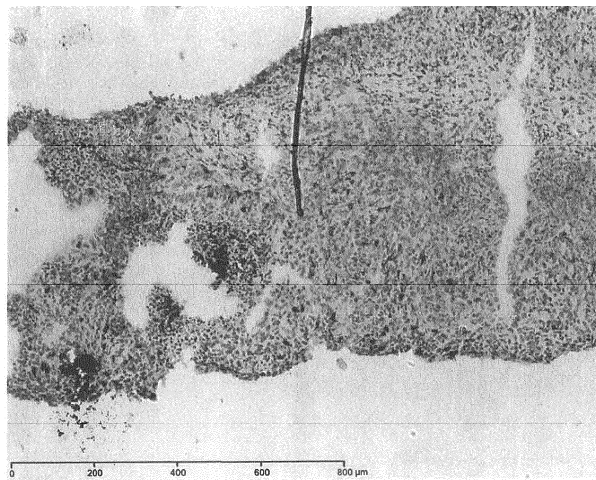
Фиг. 6

037354



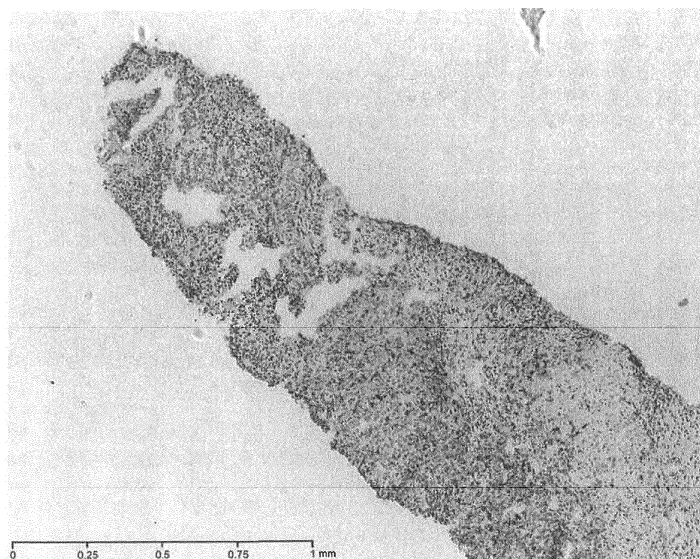
Биопсия 3 (CD3)

Фиг. 7



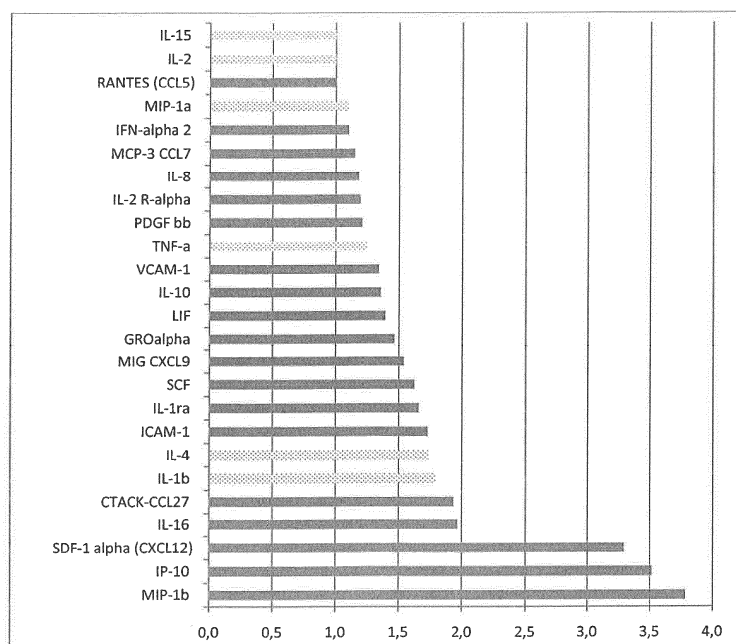
Биопсия 3 (CD8)

Фиг. 8



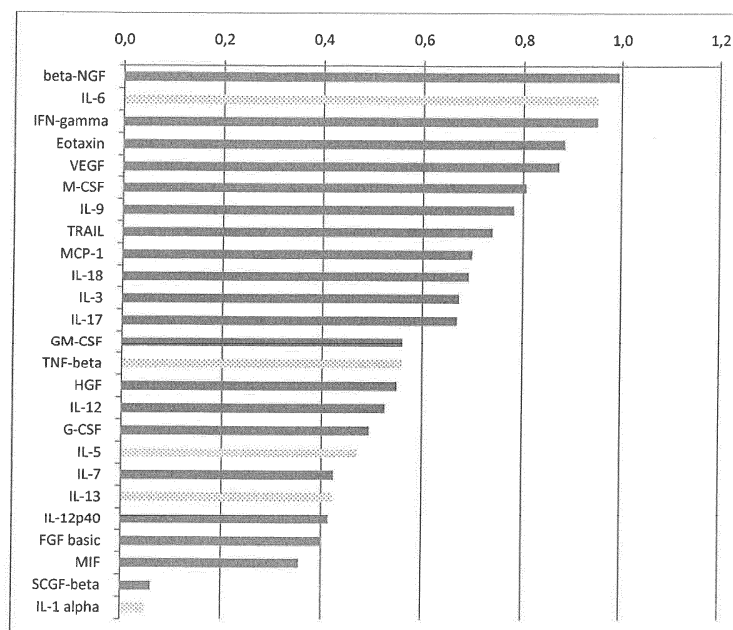
Биопсия 3 (PD-1)

Фиг. 9



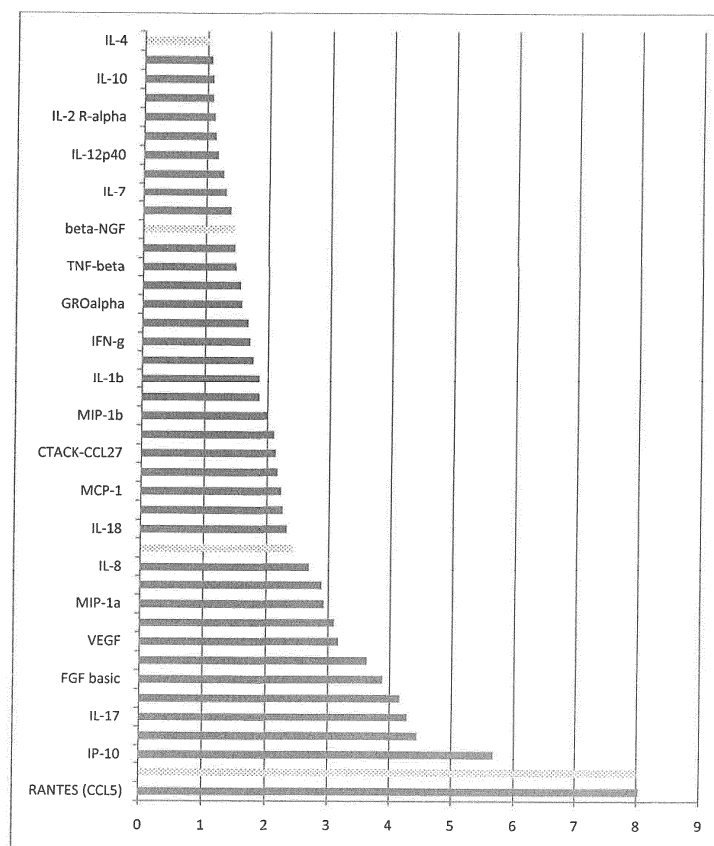
Соотношение (1-я биопсия / исходный уровень)

Фиг. 10



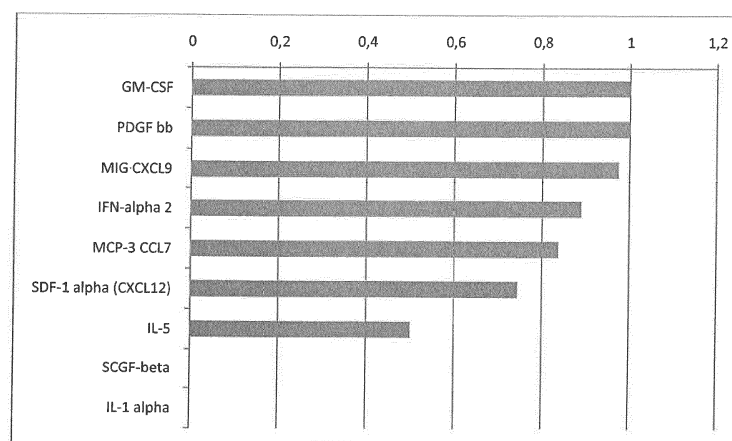
Соотношение (1-я биопсия / исходный уровень)

Фиг. 11



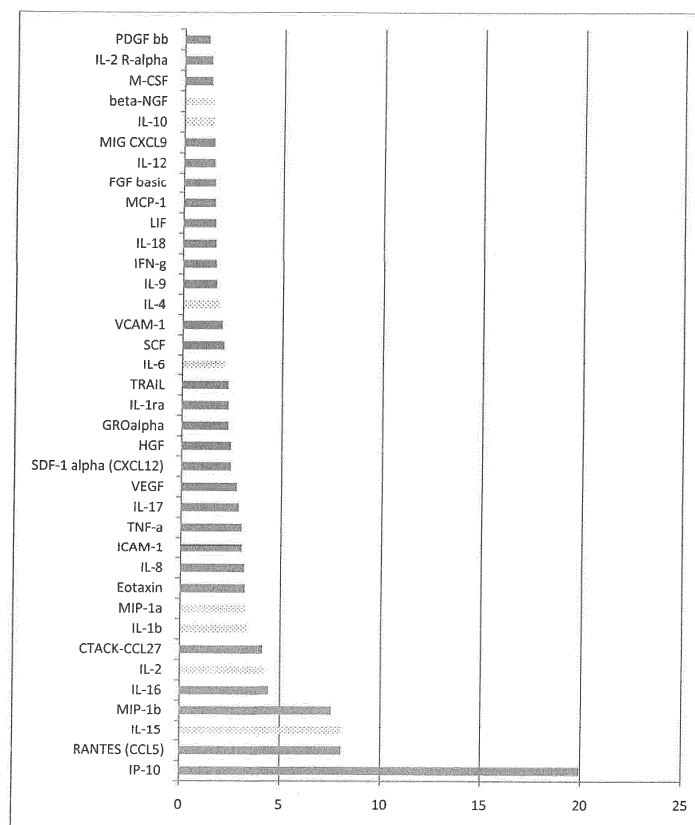
1-я биопсия по сравнению со 2-й биопсией

Фиг. 12



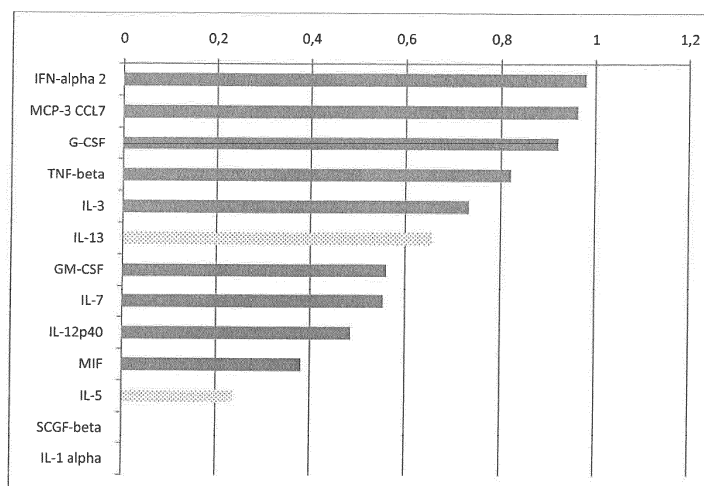
1-я биопсия по сравнению со 2-й биопсией

Фиг. 13



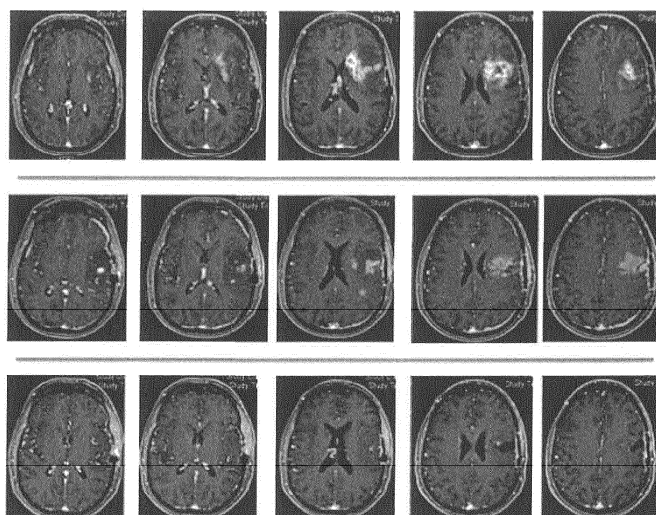
Исходный уровень по сравнению со 2-й биопсией

Фиг. 14



Исходный уровень по сравнению со 2-й биопсией

Фиг. 15



МРТ прогрессирующей рецидивирующей МФГ левой височно-теменной области

Фиг. 16

