

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393211** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.05

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.24

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЛЕГКОГО

(31) **63/192,217**

(32) **2021.05.24**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2022/064061**

(87) **WO 2022/248478 2022.12.01**

(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

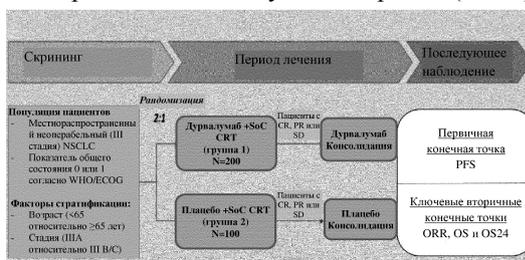
(72) Изобретатель:

**Ярковский Третий Энтони, Деннис
Филлип, Трани Лео, Ньютон Майкл,
Шайр Нора (US)**

(74) Представитель:

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Раскрыты способы лечения местнораспространенного (III стадии) неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) с помощью антитела, которое ингибирует активность PD-1/PD-L1, одновременно со средством химиолучевой терапии (сCRT).



202393211

A1

A1

202393211

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЛЕГКОГО ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] На протяжении нескольких десятилетий рак легкого являлся наиболее распространенным видом рака в мире, и к 2012 году число новых случаев заболевания оценивалось в 1,8 миллиона, что составляло 12,9% от всех новых случаев рака. Он также был самой распространенной причиной смерти от рака с 1,59 миллиона смертей (19,4% от общего числа). На долю немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) приходится от примерно 80 до 85% всех случаев рака легкого, и 30% пациентов характеризуются III стадией заболевания. Стандартным лечением пациентов с хорошим общим состоянием (PS) и неоперабельной III стадией NSCLC была двухкомпонентная химиотерапия на основе платины и лучевая терапия, проводимые одновременно с целью излечения (сCRT). Метаанализ одновременной и последовательной CRT продемонстрировал лучшие результаты при одновременной терапии, но даже при применении сCRT 5-летняя общая выживаемость (OS) варьирует в пределах от 15% до 32%. Таким образом, остается значительная неудовлетворенная потребность в новых терапевтических подходах для увеличения выживаемости пациентов после прохождения сCRT.

[0002] Лиганд 1 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L1) на опухолевых и миелоидных клетках в микроокружении опухоли связывается с белком PD-1, являющимся контрольной точкой иммунного ответа, на активированных Т-клетках, ингибируя их активность. Дурвалумаб представляет собой избирательное высокоаффинное моноклональное антитело IgG1 человека, которое блокирует связывание PD-L1 с PD-1 и CD80, позволяя Т-клеткам распознавать и уничтожать опухолевые клетки. Дурвалумаб продемонстрировал обнадеживающую противоопухолевую активность в клиническом исследовании ранней фазы в отношении нескольких различных запущенных солидных опухолей и был одобрен для лечения местнораспространенной или метастатической уротелиальной карциномы после терапии с использованием платины.

[0003] Для удовлетворения потребности в усовершенствованных способах клинического контроля местнораспространенного рака в данном документе представлены способы, которые включают введение дурвалумаба одновременно с химиолучевой терапией (сCRT) пациентам с поздней стадией местнораспространенного неоперабельного NSCLC.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В целом изобретение относится к способам лечения местнораспространенного (III стадия) неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) с помощью

антитела, ингибирующего активность PD-1/PD-L1, одновременно со средством химиолучевой терапии (сCRT).

[0005] В данном документе представлен способ повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), при этом способ включает одновременное лечение пациента с помощью антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии.

[0006] Также в данном документе представлен способ увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным NSCLC, включающий одновременное лечение пациента с помощью антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии. Также в данном документе представлена комбинация, включающая антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в способе повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

[0007] Также в данном документе представлена комбинация, включающая антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в способе увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

[0008] Также в данном документе представлена комбинация, включающая антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в лечении неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) III стадии.

[0009] Также представлено применение комбинации, включающей антитело к PD-L1 человека и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для изготовления лекарственного препарата для применения в способе повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

[0010] Также представлено применение комбинации, включающей антитело к PD-L1 человека и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для изготовления лекарственного препарата для применения в способе увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

[0011] Также представлено применение комбинации, включающей антитело к PD-L1 человека и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, в изготовлении лекарственного препарата для применения в лечении неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) III стадии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0012] На фигуре 1 показан общий план исследования для раскрытых в данном документе способов.

[0013] На фигуре 2А представлена схема, иллюстрирующая схему лечения и определенные конечные точки. Каждая группа включала 6 мышей. Радиотерапию (RT) проводили, когда опухоли достигали размера примерно 100-200 мм³, и временные точки для анализа соответствовали указанным. На фигуре 2В представлена пузырьковая диаграмма продольного анализа путей (из таблицы 4). На оси Y перечислены пути, и на оси X - временные точки. Размер пузырька показывает абсолютные значения кратности изменения экспрессии каждого пути. На фигуре 2С показаны объемы опухолей на момент иссечения. Данные выражены как среднее значение ± SEM. Каждая группа включала 6 мышей. * P<0,05, критерий Манна-Уитни.

[0014] На фигурах 3А-3С представлены сетевые карты, показывающие дифференцированно регулируемые гены и вышерасположенные регуляторы у опухолей NT и RT в каждой временной точке. Гены и вышерасположенные регуляторы разделены по их клеточным компартментам в день 1 (фигура 3А), день 3 (фигура 3В) и день 7 (фигура 3С) после воздействия RT. На фигуре 3D представлена пузырьковая диаграмма продольного анализа путей (по данным таблицы 3). На оси Y перечислены пути, и на оси X - временные точки. Цвет пузырька указывает на направление регуляции гена. Размер пузырька показывает абсолютные значения кратности изменения экспрессии данного пути. Сокращения, относящиеся к путям: перекрестное взаимодействие между дендритными клетками (DC) и естественными клетками-киллерами (NK); распознавание бактерий и вирусов - роль рецепторов распознавания паттернов в распознавании бактерий и вирусов; врожденная и адаптивная иммунная система - связь между клетками врожденного и адаптивного иммунитета.

[0015] На фигурах 4А-4F показано, что RT приводит к изменениям в популяциях инфильтрирующих опухоль миелоидных клеток. Клетки выделяли из необработанных (NT) (черные столбики) или обработанных RT (7 Гр) (серые столбики) опухолей через 1, 3 или 7 дней после RT (или сопоставимых по времени NT-контролей). На фигуре 4А показаны образцы опухолей, проанализированные с помощью проточной цитометрии в отношении наличия F4/80⁺ клеток. На фигурах 4В и 4С показана экспрессия (MFI) CD86 и CD206 на F4/80⁺ клетках. Над соответствующими гистограммами с изотипическим контролем (черная линия), NT (закрашено черным) и RT (серая линия) показаны репрезентативные гистограммы. На фигуре 4D показаны процентные доли CD86⁺ и CD206⁺ клеток, которые являлись F4/80⁺, и на диаграммах типа "ящик с усами" показано

соотношение CD86⁺/CD206⁺ для опухолей NT (черный) или обработанных RT (серый). На фигурах 4E и 4F показаны значения частоты встречаемости CD11b⁺Gr1^{lo} и CD11b⁺Gr1^{hi} клеток в опухолевой ткани. На графике приведены средние значения \pm SEM. Каждая группа включала 6 мышей. * $P < 0,05$ и ** $P < 0,01$ при сравнении групп NT с облученными группами.

[0016] На фигурах 5A-5F показано, что RT влияла на частоту и фенотип лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. Клетки выделяли из необработанных (NT) (черные столбики) или обработанных RT (7 Гр) (серые столбики) опухолей через 1, 3 или 7 дней после RT (или сопоставимых по времени NT-контролей). На фигурах 5A и 5B показана частота CD4⁺ и CD8⁺ инфильтрирующих опухоль Т-клеток. На фигурах 5C и 5D показана экспрессия CD69 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. На фигуре 5E показаны инфильтрирующие опухоль CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (T_{reg}) клетки, выраженные в виде процентной доли от популяции CD4⁺. На фигуре 5F показано соотношение CD8⁺ и T_{reg} клеток. На графике приведены средние значения \pm SEM. Каждая группа включала 6 мышей. * $P < 0,05$ и ** $P < 0,01$ при сравнении групп NT с облученными группами.

[0017] На фигурах 6A-6G показано, что RT приводила к повышенной экспрессии как PD-1, так и PD-L1 в опухоли, что снижало эффективность обработки. Клетки выделяли из необработанных (NT) (черные столбики) или обработанных RT (7 Гр) (серые столбики) опухолей через 1, 3 или 7 дней после RT (или сопоставимых по времени NT-контролей). На фигурах 6A и 6B показана экспрессия PD-1 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. На фигурах 6C и 6D показана экспрессия PD-L1 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. На фигуре 6E показана экспрессия PD-L1 на опухолевых CD45⁺ клетках. На графике приведены средние значения \pm SEM. * $P < 0,05$ и ** $P < 0,01$ при сравнении групп NT с облученными группами. На фигурах 6F и 6G представлены кривые роста опухоли и кривая Каплана-Мейера мышей, несущих развившуюся опухоль, после обработки 7 Гр RT отдельно или в комбинации с mAb к α PD-L1 в дозе 10 мг/кг 3qw в течение 1 недели. Экспериментальные группы включали по меньшей мере 6 мышей и иллюстрируют 2 независимых исследования. ++ $P < 0,01$ относительно 7 Гр RT отдельно. ** $P < 0,01$ и *** $P < 0,001$ относительно NT-контроля.

[0018] На фигурах 7A-7B показаны тепловые карты, отражающие значения кратности изменения маркеров линии (фигура 7A) и фенотипа (фигура 7B) в ткани облученных опухолей, удаленных в день 1, 3 и 7 после RT 7 Гр, в виде процентной доли от сопоставимых по времени необработанных контрольных опухолей. Жирным шрифтом выделены значения, которые были статистически значимы по сравнению с образцами, не

подвергавшимся обработке и сопоставимыми по времени. Каждая группа включала 6 мышей. (U Манна-Уитни, $P < 0,05$).

[0019] На фигурах 8A-8D показаны стратегии гейтирования, применяемые для анализа популяций опухолевых клеток. На фигуре 8A показано гейтирование на живых лейкоцитах, выделенных из селезенки, используемых для получения гейта лейкоцитов. На фигуре 8B показаны $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ клетки в опухолевой ткани. На фигуре 8C показаны популяции $CD11b^+ Gr1^{lo}$ и hi в селезенке и опухолевой ткани. На фигуре 8D показаны опухолевые $CD45^-$ клетки.

[0020] На фигуре 9 показана процентная доля $CD45^+$ клеток в опухолевой ткани, выделенной через 1, 3 или 7 дней после NT (черный) или RT 7 Гр (серый). $P < 0,01$, U Манна-Уитни. Каждая группа включала 6 мышей. ** $P < 0,01$, критерий Манна-Уитни.

[0021] На фигурах 10A-10B показаны репрезентативные гистограммы экспрессии CD69 (фигура 10A) и PD-1 (фигура 10B) в $CD4^+$ и $CD8^+$ клетках из опухолевой ткани NT и обработанной RT. На фигуре 10A показаны незаполненные гистограммы, которые представляют собой изотипические контроли. На фигуре 10B показана структурированная гистограмма изотипического контроля, черная линия представляет собой NT, серая линия представляет собой RT 7 Гр.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0022] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно понятное специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Следующие литературные источники предоставляют специалисту в данной области общие определения многих терминов, используемых в настоящем изобретении: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); и Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Используемые в данном документе следующие термины имеют значения, приписываемые им ниже, если не указано иначе.

[0023] В настоящем изобретении термины "содержит", "содержащий", "состоящий" и "имеющий" и т. п. могут иметь значение, приписываемое им в патентном законодательстве США, и могут означать "включает", "включающий" и т. п.; аналогичным образом, термин "состоящий фактически из" или "состоит фактически" имеет значение, приписываемое ему в патентном законодательстве США, при этом данный термин является открытым, допускающим наличие не только того, что упоминается, при условии, что основные или новые характеристики того, что упоминается, не изменяются благодаря

наличию не только того, что упоминается, но исключает аспекты из предшествующего уровня техники.

[0024] Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, термин "или", используемый в данном документе, следует понимать как включающий. Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, форму единственного числа и множественного числа, используемую в данном документе, следует понимать как единственное или множественное число.

[0025] Если специально не оговаривается или не очевидно из контекста, используемый в данном документе термин "приблизительно" понимают как нахождение в диапазоне допустимой погрешности в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. "Приблизительно" можно понимать как нахождение в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от указанного значения. Если иное не очевидно из контекста, все числовые значения, представленные в данном документе, модифицированы с помощью термина "приблизительно".

[0026] Любые композиции или способы, предусмотренные в данном документе, можно использовать в комбинации с одной или несколькими из любых других композиций и способов, предусмотренных в данном документе.

[0027] Диапазоны, представленные в данном документе, понимают как сокращенную запись всех значений в пределах данного диапазона. Например, понимают, что диапазон от 1 до 50 включает любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50.

[0028] Термин "антитело к PD-L1", используемый в данном документе, относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые избирательно связывают полипептид PD-L1. Иллюстративные антитела к PD-L1 описаны, например, в патентах США №№ 8779108 и 9493565, которые включены в данный документ посредством ссылки.

[0029] Термин "дурвалумаб", используемый в данном документе, относится к антителу, которое избирательно связывает PD-L1 и блокирует связывание PD-L1 с рецепторами PD-1 и CD80, как описано в патенте США № 9493565 (в котором дурвалумаб упоминается как "2.14H9OPT"), который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Домен дурвалумаба, представляющий собой кристаллизующийся фрагмент (Fc), содержит тройную мутацию в константном домене тяжелой цепи IgG1, которая уменьшает степень связывания с компонентом C1q системы комплемента и Fcγ-

рецепторами, отвечающими за опосредование антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности ("ADCC"). Дурвалумаб может ослаблять PD-L1-опосредованное подавление активации Т-клеток человека *in vitro* и ингибировать рост опухоли в ксенотрансплантатной модели посредством Т-клеточнозависимого механизма.

[0030] "Полный ответ" (CR) относится к исчезновению всех очагов, независимо от того, поддаются ли они измерению, и отсутствию новых очагов. Подтверждение можно получить с помощью повторной последующей оценки не ранее чем через четыре недели после даты первого документального подтверждения. Новые не поддающиеся измерению очаги исключают CR.

[0031] "Частичный ответ" (PR) относится к уменьшению опухолевой нагрузки на $\geq 50\%$ по сравнению с исходным уровнем. Подтверждение можно получить с помощью последующей повторной оценки через по меньшей мере четыре недели после даты первого документального подтверждения.

[0032] "Прогрессирование заболевания" (PD) относится к увеличению опухолевой массы на $\geq 25\%$ по сравнению с минимальной зарегистрированной (наиболее низким уровнем). Подтверждение можно получить с помощью последующей повторной оценки через по меньшей мере четыре недели после даты первого документального подтверждения. Новые не поддающиеся измерению очаги не определяют PD.

[0033] "Стабилизация заболевания" (SD) относится к случаю несоответствия критериям CR, PR или PD. SD указывает на то, что не может быть установлено уменьшение опухолевой нагрузки на 50% по сравнению с исходным уровнем и не может быть установлено увеличение на 25% по сравнению с наиболее низким уровнем.

[0034] Под немелкоклеточным раком легкого (NSCLC) можно понимать любой из трех основных подтипов NSCLC: плоскоклеточную карциному, аденокарциному и крупноклеточную (недифференцированную) карциному. Другие подтипы включают в себя железисто-плоскоклеточную карциному и саркоматоидную карциному.

[0035] При использовании в данном документе термин "PD-L1" может относиться к полипептидным или полинуклеотидным последовательностям или их фрагментам, характеризующимся по меньшей мере приблизительно 85%, 95% или 100% идентичностью последовательности с последовательностями PD-L1. PD-L1 также упоминается в уровне техники как B7-H1. В некоторых вариантах осуществления полипептид PD-L1 или его фрагмент характеризуются по меньшей мере приблизительно 85%, 95% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью под № доступа в NCBI NP_001254635 и обладают активностью связывания с PD-1 и CD80.

Последовательность полипептида PD-L1

№ доступа в NCBI NP_001254635

1 mrifavfifm tywhllnapy nkinqrliv dpvtsehelt cqaegyphae viwtssdhqv

61 lsgktttns kreeklfnvt stlrntttt eifctfrl dpeenhtael vipelplahp

121 pnerthlvil gailclgva ltfifrlrkg rmmdivkkgi qdtnskkqsd thleet

[0036] В некоторых вариантах осуществления "молекула нуклеиновой кислоты PD-L1" содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид PD-L1. Иллюстративная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты PD-L1 представлена под № доступа в NCBI NM_001267706.

Последовательность нуклеиновой кислоты PD-L1

№ доступа в NCBI NM_001267706, мРНК

```

1  ggcgсаасgc  tgagсаgctg  gcgcgtcccc  cgcggccccа  gttctgcgca  gcttccccgag
61  gctccgcacc  agccgcgctt  ctgtccgcct  gcagggcatt  ccagaaagat  gaggatattt
121  gctgtcttta  tattcatgac  ctactggcat  ttgctgaacg  ccccatacaa  caaaatcaac
181  caaagaatth  tggttgtgga  tccagtcacc  tctgaacatg  aactgacatg  tcaggctgag
241  ggctaccccc  aggccgaagt  catctggaca  agcagtgacc  atcaagtcct  gagtggtaaг
301  accaccacca  ccaattccaa  gagagaggag  aagcttttca  atgtgaccag  cacactgaga
361  atcaacacaa  caactaatga  gattttctac  tgcactttta  ggagattaga  tcctgaggaa
421  aaccatacag  ctgaattggt  catcccagaa  ctacctctgg  cacatcctcc  aaatgaaagg
481  actcacttgg  taattctggg  agccatctta  ttatgccttg  gtgtagcact  gacattcatc
541  ttccgtttta  gaaaaggгag  aatgatggat  gtgaaaaaat  gtggcatcca  agatacaaac
601  tcaaagaagc  aaagtгatac  acatttgгag  gagacгtaat  ccagcattgg  aacttctgat
661  cttcaagcag  ggattctcaa  cctgtgгttt  agggгttcat  cggggctgag  cgtgacaaga
721  ggaaggaatg  ggcccgtggg  atgcaggcaa  tgtgggactt  aaaaggcccc  agcactgaaa
781  atggaacctg  gcgaaagcag  aggaggagaa  tgaagaaaga  tggagtcaaa  caggгagcct
841  ggaggгagac  cttgatactt  tcaaatgcct  gagggгctca  tcgacгcctg  tgacaggгag
901  aaaggatact  tctgaacaag  gagcctccaa  gcaaatcatc  cattgctcat  cctagгaaga
961  cggгttgaga  atccctaatt  tgaggгtcag  ttccctgcaga  agtgcccttt  gcctccactc
1021  aatgcctcaa  tttgttttct  gcatgactga  gagtctcagt  gttgгаacгg  gacagtattt
1081  atgtatgagt  ttttctatt  tattttgagt  ctgtgaggtc  ttcttgтca  gtgagtgtgg
1141  ttgtgaatga  tttcttttga  agatatattg  tagtagatgt  tacaattttg  tcgccaaact
1201  aaacttgctg  cttaatgatt  tgctcacatc  tagtaaaaca  tggagtattt  gtaaggтgct
1261  tggтctcctc  tataactaca  agtatacatt  ggaagcataa  agatcaaac  gttgгttgca
1321  taggatgtca  cttttattta  accattaat  actctgгttg  acctaatctt  attctcagac
1381  ctcaagtgtc  tgtgcagtat  ctgttccatt  taaatatcag  ctttacaatt  atgtgгtagc
1441  ctacacacat  aatctcattt  catcгctgta  accaccctgt  tgtgataacc  actattattt
1501  taccatcгt  acagctgagg  aagcaaacag  attaagtaac  ttgccccaac  cagtaaatag
1561  cagacctcag  actgcccacc  actgтccttt  tataatacaa  tttacagcta  tattttactt
1621  taagcaattc  ttttattcaa  aaaccattta  ttaagtгccc  ttgcaatatc  aatcгctgtg
1681  ccaggcattg  aatctacaga  tgtgagcaag  acaagтacc  tgtcctcaag  gagctcatag
1741  tataatgagg  agattaacaa  gaaaatgtat  tattacaatt  tagtccagтg  tcatagcata

```

1801 aggatgatgc gaggggaaaa cccgagcagt gttgccaaga ggaggaaata ggccaatgtg
 1861 gtctgggacg gttggatata cttaaacatc ttaataatca gagtaatttt catttaca
 1921 gagaggctcg tactttaa
 1981 tattttattcc tgatttgctt ttgccaatata atcta
 2041 ttgtttaaca gttctgtctt ttctatttaa atgccactaa
 2101 catgattcaa aattcaaaag atcccatggg agatggttg
 2161 caagccattc aagtttcctt tccagaagca actgctactg
 2221 ctaaagatag tctacatttg gaaatgtatg ttaaaagcac
 2281 ctaa
 2341 ttcttatata gcagatggaa tgaat
 2401 tgtttctaag ttatctttcc catagctttt cattatcttt
 2461 aaatatgtcc tacatataca tttagacaac caccattt
 2521 gagtttgat ttgtttatgt ttgctcaaaa ggagacccat
 2581 agtcaatcta gtccataaaa gcaatcttat tattaactct
 2641 gaacttttgt tttctgcttt ctgtcaagta taaacttcac
 2701 atcacatttt ctttctggaa attccggcag tgtaccttga
 2761 gaaaagcctc attcgttgtg cttgaaccct tgaatgccac
 2821 ccctcctaag aggcttctg gaggtttcga gattcagatg
 2881 tcctttccct cttggccata ttctggtgtc aatgacaagg
 2941 tgtcaaggct gaagaaacag tgtctccaac agagctcctt
 3001 tgcatttgta cagtaattgg tgtgacagtg ttctttgtgt
 3061 ggctgagcaa ggcacatagt ctactcagtc tattcctaag
 3121 gttggatttg taaggcactt tatccctttt gtctcatggt
 3181 agagatgata cctaattctg catttgattg tcaacttttg
 3241 aatattctta tttattttgt tacttggtac accagcatgt
 3301 tgtttaataa aatgttcagt ttaacatccc agtggagaaa

[0037] Белок-1 запрограммированной гибели клетки ("PD-1") представляет собой мембранный белок I типа размером примерно 31 кДа, являющийся представителем обширного семейства CD28/CTLA4 регуляторов Т-клеток (см. Ishida *et al.*, "Induced Expression of PD-1, A Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11: 3887-95 (1992)).

[0038] PD-1 экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и моноцитах (Agata *et al.*, "Expression of the PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes," *Int. Immunol.* 8(5): 765-72 (1996); Yamazaki *et al.*, "Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC," *J. Immunol.* 169: 5538-45 (2002)) и при низких уровнях в естественных Т-клетках-киллерах (NK) (Nishimura *et al.*, "Facilitation of Beta Selection and Modification of Positive Selection in the Thymus of PD-1-Deficient Mice," *J. Exp. Med.* 191: 891-98 (2000); Martin-Orozco *et al.*, "Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4): 288-98 (2007)). PD-1 представляет собой рецептор,

отвечающий за подавление иммунной системы после активации за счет связывания PDL-1 или PDL-2 (Martin-Orozco *et al.* (2007)), и функционирует в качестве индуктора гибели клетки (Ishida *et al.* (1992); Subudhi *et al.*, "The Balance of Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition", *J. Molec. Med.* 83: 193-202 (2005); Lazar-Molnar *et al.*, "Crystal Structure of the Complex Between Programmed Death-1 (PD-1) and Its Ligand PD-L2," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(30): 10483-88 (2008)). Этот процесс используется во многих опухолях посредством сверхэкспрессии PD-L1, что приводит к подавлению иммунного ответа.

[0039] PD-1 является хорошо валидированной мишенью для иммуноопосредованной терапии в онкологии с положительными результатами клинических испытаний при лечении, среди прочего, меланомы и форм немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). Антагонистическое ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 усиливает активацию Т-клеток, повышая степень распознавания и элиминации опухолевых клеток иммунной системой хозяина. Было предложено применение антител к PD-1 для лечения инфекций и опухолей и положительного модулирования адаптивного иммунного ответа.

[0040] Термин "антитело", используемый в данном документе, относится к иммуноглобулину или его фрагменту или производному и охватывает любой полипептид, содержащий антигенсвязывающий участок, независимо от того, получен ли он *in vitro* или *in vivo*. Данный термин включает без ограничения поликлональные, моноклональные, моноспецифические, полиспецифические, неспецифические, гуманизированные, человеческие одноцепочечные, химерные, синтетические, рекомбинантные, гибридные, мутантные и привитые антитела. Для целей настоящего изобретения термин "антитело", если он в других случаях не модифицирован термином "интактное", как в случае "интактных антител", также включает фрагменты антител, такие как Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb и другие фрагменты антител, которые сохраняют антигенсвязывающую функцию, т. е. способность специфично связывать PD-L1. Как правило, такие фрагменты будут содержать антигенсвязывающий домен.

[0041] Термин "антитело человека" при использовании в данном документе включает антитела, содержащие переменные и константные области, по сути соответствующие последовательностям иммуноглобулина зародышевого типа человека.

[0042] Термины "антигенсвязывающий домен", "антигенсвязывающий фрагмент" и "связывающий фрагмент" при использовании в данном документе относятся к части молекулы антитела, которая содержит аминокислоты, отвечающие за специфичное связывание между антителом и антигеном. В некоторых случаях, когда антиген является крупным, антигенсвязывающий домен может связываться только с частью антигена. Часть молекулы антигена, которая отвечает за специфичные взаимодействия с

антигенсвязывающим доменом, называется "эпитопом" или "антигенной детерминантой". Антигенсвязывающий домен обычно содержит вариабельную область легкой цепи антитела (V_L) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (V_H); однако он не обязательно должен содержать их обе. Например, так называемый Fd-фрагмент антитела состоит только из V_H -домена, однако по-прежнему сохраняет некоторую антигенсвязывающую функцию интактного антитела.

[0043] Связывающие фрагменты антитела получают с помощью методик рекомбинантной ДНК или с помощью ферментативного или химического расщепления интактных антител. Связывающие фрагменты включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и одноцепочечные антитела. Понятно, что под антителом, отличным от "биспецифического" или "бифункционального" антитела, понимают антитело, в котором все из его связывающих участков являются идентичными. Расщепление антител ферментом папаином приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, известных также как "Fab"-фрагменты, и "Fc"-фрагмента, не обладающего антигенсвязывающей активностью, но обладающего способностью к кристаллизации. Расщепление антител ферментом пепсином приводит к образованию F(ab')₂-фрагмента, в котором два плеча молекулы антитела остаются соединенными и содержат два антигенсвязывающих участка. F(ab')₂-фрагмент обладает способностью к перекрестному связыванию антигена. При использовании в данном документе термин "Fv" относится к минимальному фрагменту антитела, в котором сохраняются как антигенраспознающий, так и антигенсвязывающий участки. При использовании в данном документе термин "Fab" относится к фрагменту антитела, который содержит константный домен легкой цепи и СН1-домен тяжелой цепи.

[0044] Термин "mAb" при использовании в данном документе относится к моноклональному антителу. Антитела по настоящему изобретению включают в себя без ограничения полные нативные антитела, биспецифические антитела; химерные антитела; Fab, Fab', одноцепочечные фрагменты на основе V-областей (scFv), слитые полипептиды и нестандартные антитела.

[0045] Термины "выделенный", "очищенный" или "биологически чистый" при использовании в данном документе относятся к материалу, который в различной степени не содержит компоненты, обычно сопутствующие ему, как обнаруживается в его нативном состоянии. "Выделение" означает степень отделения от источника происхождения или окружения. "Очистка" означает степень отделения, более высокую, чем при выделении. "Очищенный" или "биологически чистый" белок в достаточной мере

не содержит другие материалы, так что какие-либо примеси существенно не влияют на биологические свойства белка и не вызывают другие неблагоприятные последствия.

[0046] Под термином "специфично связывает" при использовании в данном документе подразумевается соединение (например, антитело), которое распознает молекулу (например, полипептид) и связывается с ней, но которое по сути не распознает другие молекулы и не связывается с ними в образце, например, в биологическом образце. Например, две молекулы, которые специфично связываются, образуют комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфичное связывание характеризуется высокой аффинностью и емкостью от низкой до умеренной в отличие от неспецифичного связывания, которое обычно характеризуется низкой аффинностью и емкостью от умеренной до высокой. Как правило, связывание считается специфичным, если константа аффинности K_A превышает 10^6 M^{-1} или, более предпочтительно, превышает 10^8 M^{-1} . При необходимости неспецифичное связывание можно уменьшить без существенного влияния на специфичное связывание путем изменения условий связывания. Соответствующие условия связывания, такие как концентрация антител, ионная сила раствора, температура, допустимое время связывания, концентрация блокирующего средства (например, сывороточного альбумина, казеина молока), могут быть оптимизированы специалистом в данной области с применением обычных методик.

[0047] Обычно используемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения", "лечение" и т. п. относятся к снижению, уменьшению интенсивности или замедлению прогрессирования нарушения или заболевания и/или симптомов, ассоциированных с нарушением или заболеванием. Будет понятно, что при осуществлении лечения нарушения, заболевания или состояния не требуется, чтобы такое нарушение, заболевание или состояние или ассоциированные с ними симптомы полностью устранялись, хотя это и не исключается. В конкретных вариантах осуществления, относящихся к NSCLC, "лечить", "проводить лечение", "лечение" может относиться к достижению любой из первичных или вторичных конечных точек клинического исследования или их комбинации.

[0048] В данном документе представлен способ повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), при этом способ включает одновременное лечение пациента с помощью человеческого антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии.

[0049] Также в данном документе представлен способ увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным NSCLC, включающий одновременное лечение пациента с помощью человеческого антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии.

[0050] Также в данном документе представлен способ лечения пациента с неоперабельным NSCLC III стадии, включающий одновременное лечение пациента с помощью человеческого антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии.

[0051] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб или сугемалимаб. В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб, авелумаб или атезолизумаб. В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб.

[0052] Дурвалумаб и его антигенсвязывающие фрагменты для применения в способах, предусмотренных в данном документе, содержат тяжелую цепь и легкую цепь или переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи.

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи дурвалумаба представлена под SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи дурвалумаба представлена под SEQ ID NO: 2. Аминокислотные последовательности определяющие комплементарность областей (CDR) переменной области тяжелой цепи дурвалумаба представлены под SEQ ID NO: 3 (CDR1), SEQ ID NO: 4 (CDR2) и SEQ ID NO: 5 (CDR3), и аминокислотные последовательности CDR переменной области легкой цепи дурвалумаба представлены под SEQ ID NO: 6 (CDR1), SEQ ID NO: 7 (CDR2) и SEQ ID NO: 8 (CDR3).

[0053] В некоторых вариантах осуществления дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, предусмотренных в данном документе, содержат переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, предусмотренных в данном документе, содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит определенные по Kabat последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO: 3-5, и где переменная область легкой цепи содержит определенные по Kabat последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO: 6-8. Средние специалисты в данной области легко смогут идентифицировать CDR, определенные по Chothia, определенные по Abm или определенные согласно другим системам, известным

средним специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, предусмотренных в данном документе, содержат последовательности CDR вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела 2.14H9OPT, раскрытого в патентах США №№ 8779108 и 9493565, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0054] Дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить один раз в четыре недели, обеспечивая при этом благоприятный эффект для пациента. В дополнительных вариантах осуществления пациенту вводят дополнительные последующие дозы. Последующие дозы можно вводить с различными интервалами времени в зависимости от возраста, массы тела пациента, клинической оценки, опухолевой нагрузки и/или других факторов, в том числе по усмотрению лечащего врача.

[0055] В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят несколько доз дурвалумаба или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления пациенту можно вводить по меньшей мере три дозы, по меньшей мере четыре дозы, по меньшей мере пять доз, по меньшей мере шесть доз, по меньшей мере семь доз, по меньшей мере восемь доз, по меньшей мере девять доз, по меньшей мере десять доз, по меньшей мере пятнадцать доз, по меньшей мере двадцать шесть доз или более чем по меньшей мере двадцать доз. В некоторых вариантах осуществления дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент вводят один раз в две недели, в течение двухнедельного периода, в течение четырехнедельного периода лечения, в течение шестинедельного периода лечения, в течение восьминедельного периода лечения, в течение двенадцатинедельного периода лечения, в течение двадцатичетырехнедельного периода лечения, в течение годовичного периода лечения или в течение периода лечения, большего, чем годовичный.

[0056] В некоторых вариантах осуществления интервал между дозами может составлять три недели. В некоторых вариантах осуществления интервал между дозами может составлять четыре недели (Q4W). В некоторых вариантах осуществления интервалы между дозами могут составлять два месяца (например, в ходе поддерживающей фазы).

[0057] В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят одну или несколько доз антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента, где доза представляет собой фиксированную дозу 1500 мг. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят 1500 мг человеческого антитела к PD-L1 каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят одну или несколько доз антитела к PD-L1, где доза

составляет приблизительно 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят 1500 мг человеческого антитела к PD-L1 внутривенно каждые четыре недели (Q4W).

[0058] В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят одну или несколько доз дурвалумаба или его антигенсвязывающего фрагмента, где доза представляет собой фиксированную дозу 1500 мг. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят 1500 мг дурвалумаба каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят одну или несколько доз дурвалумаба, где доза составляет приблизительно 20 мг/кг.

[0059] Количество дурвалумаба или его антигенсвязывающего фрагмента, подлежащих введению пациенту, может корректироваться и может зависеть от различных параметров, таких как возраст, масса тела пациента, клиническая оценка, опухолевая нагрузка и/или другие факторы, в том числе мнение лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления доза представляет собой фиксированную дозу.

[0060] В некоторых вариантах осуществления введение дурвалумаба или его антигенсвязывающего фрагмента согласно способам, предусмотренным в данном документе, осуществляют посредством парентерального введения. Например, дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить путем внутривенной инфузии или путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством внутривенной инфузии.

[0061] В некоторых вариантах осуществления дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент вводят одновременно со средством химиолучевой терапии. Термин "одновременно" при использовании в данном документе означает введение дурвалумаба или его антигенсвязывающего фрагмента и введение средства химиолучевой терапии в пределах приблизительно трех дней относительно друг друга. В некоторых вариантах осуществления дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в пределах приблизительно двух дней относительно средства химиолучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в пределах приблизительно одного дня относительно средства химиолучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в день 1 цикла 1 химиолучевой терапии.

[0062] В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 вводят в первый день химиолучевой терапии.

[0063] В некоторых вариантах осуществления средство химиолучевой терапии предусматривает терапевтическое средство на основе платины.

[0064] В некоторых вариантах осуществления одновременно вводимое средство химиолучевой терапии предусматривает любые принятые стандартные средства лечения первой линии для пациентов с распространенным NSCLC. В некоторых вариантах осуществления стандартные средства лечения первой линии могут включать химиотерапию, лучевую терапию или и то и другое (химиолучевая терапия). В некоторых вариантах осуществления средство терапии может предусматривать одно или несколько химиотерапевтических средств на основе платины. В некоторых вариантах осуществления средство химиолучевой терапии основано на платине. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько химиотерапевтических средств на основе платины могут быть выбраны из карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина или их комбинаций. Как описано в данном документе, средство терапии на основе платины может предусматривать однокомпонентные или двухкомпонентные схемы, такие как, например, введение цисплатина или карбоплатина вместе с другим противораковым средством, таким как паклитаксел, доцетаксел, этопозид, гемцитабин, винорелбин и т. п.

[0065] Настоящее изобретение относится к способам лечения пациентов, у которых имеется неоперабельный местнораспространенный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), включающим одновременное введение пациенту человеческого антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии. Раскрытые способы лечения могут обеспечивать существенное улучшение в отношении выживаемости без прогрессирования (PFS), общей частоты ответа (ORR), общей выживаемости (OS) пациентов и доли пациентов, выживших через 24 месяца после рандомизации (OS24).

[0066] В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает увеличение PFS по сравнению с плацебо. В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает увеличение ORR по сравнению с плацебо. В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает увеличение OS по сравнению с плацебо.

[0067] В некоторых вариантах осуществления представлена комбинация, включающая человеческое антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в способе повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления представлена комбинация, включающая человеческое антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в способе увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления представлена комбинация, включающая человеческое антитело к PD-L1 и

одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в лечении неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) III стадии.

[0068] В некоторых вариантах осуществления представлено применение комбинации, включающей человеческое антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, в изготовлении лекарственного препарата для применения в способе повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления представлено применение комбинации, включающей человеческое антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, в изготовлении лекарственного препарата для применения в способе увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления представлено применение комбинации, включающей человеческое антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, в изготовлении лекарственного препарата для применения в лечении неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) III стадии.

[0069] Общая выживаемость (OS) относится к периоду времени от даты начала лечения до наступления смерти по любой причине. OS может относиться к общей выживаемости в течение такого периода времени, как, например, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца и т. п. Такие периоды времени можно обозначить, например, как "OS24", что относится к количеству (%) пациентов, которые остаются в живых через 24 месяца после начала лечения согласно оценке общей выживаемости по методу Каплана-Мейера через 24 месяца.

[0070] Выживаемость без прогрессирования (PFS) относится к периоду времени от даты начала лечения до даты объективного прогрессирования заболевания (согласно RECIST 1.1) или смерти (по любой причине при отсутствии прогрессирования). В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают увеличение PFS. В некоторых вариантах осуществления данные способы обеспечивают PFS, составляющую от по меньшей мере 9 месяцев до по меньшей мере приблизительно 24 месяцев (например, по меньшей мере 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более 24 месяцев и до приблизительно 5 лет).

[0071] Частота объективного ответа (ORR) относится к количеству (%) пациентов, у которых по меньшей мере один ответ при визите представлял собой полный ответ (CR) или частичный ответ (PR) согласно RECIST 1.1.

[0072] Как описано в данном документе и проиллюстрировано примерами, данные способы обеспечивают лечение местнораспространенного неоперабельного NSCLC. В

некоторых вариантах осуществления "неоперабельный" рак включает рак, который нельзя полностью устранить хирургическим путем вследствие по меньшей мере одной из нескольких медицинских причин. Причины, по которым рак может быть неоперабельным, включают, например, размер опухоли (например, если она является слишком большой для безопасного удаления, и/или если может потребоваться обширное удаление части важного органа), местоположение опухоли (например, если опухоль физически переплетена с жизненно важными структурами, такими как кровеносные сосуды или нервы), метастазирование опухоли, при котором удаление опухоли не будет эффективным для контроля рака в целом, или другие медицинские состояния, при которых риск хирургического вмешательства повышается до неприемлемого уровня (например, заболевания сердца, заболевания легкого, сахарный диабет). Кроме того, неоперабельный NSCLC может не быть необратимо неоперабельным после агрессивного лечения, которое может быть эффективным для уменьшения размера опухоли до степени, при которой допускается возможное хирургическое удаление. Кроме того, неоперабельный NSCLC может также относиться к NSCLC (или отдаленным метастазам), которые не могут быть полностью удалены хирургическим путем, но могут быть частично удалены с помощью одной или нескольких хирургических процедур. Примеры включают циторедуктивную хирургическую операцию и хирургическую операцию по удалению частей ракового образования легкого, а также частей метастатических очагов.

[0073] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, можно применять при "операбельных" формах рака.

[0074] Как описано и проиллюстрировано в данном документе, способы настоящего изобретения можно применять для лечения пациентов с местнораспространенным неоперабельным NSCLC на поздней стадии (например, III стадии). Определение стадии рака можно осуществлять с использованием любых общеизвестных и принятых в данной области техники тестов. В некоторых вариантах осуществления определение стадии рака может включать применение системы классификации TNM Американского объединенного комитета по изучению рака (AJCC). Обычно в системе классификации TNM представлены результаты различных тестов и сканирований для определения размера и местоположения первичной опухоли (опухоль, T); того, распространился ли рак на лимфатические узлы, и, если это произошло, местоположения и количества пораженных лимфатических узлов (узел, N); а также того, распространился ли рак на другие части тела, и, если это произошло, степени выраженности и местоположения отдаленного ракового образования (метастаз, M). Хотя у каждого типа рака может быть

своя собственная система классификации, в системе определения стадии рака TNM обычно используется балльная шкала для каждой буквы.

[0075] В некоторых вариантах осуществления неоперабельный NSCLC характеризуется III стадией. В некоторых вариантах осуществления неоперабельный NSCLC является местнораспространенным. В некоторых вариантах осуществления неоперабельный NSCLC характеризуется III стадией и является местнораспространенным.

[0076] Для опухоли "T" указывается вместе с числом (например, от 0 до 4) для описания общего размера опухоли, ее местоположения и того, проникает ли она в близлежащие ткани. Более крупным или более инвазивным опухолям присваивается большее число, и, в зависимости от рака, может быть добавлена строчная буква, такая как "a", "b" или "m" (для множественных опухолей), для предоставления более подробной информации.

[0077] Аналогичным образом, для узла "N" указывается вместе с числом (например, от 0 до 3) для описания того, было ли обнаружено раковое образование в лимфатических узлах, и также может указывать на количество лимфатических узлов, содержащих раковое образование. Чем больше лимфатических узлов поражено раком, тем большее число назначается.

[0078] Для метастаза "M" указывает на то, распространился ли рак на другие части тела или нет, и обозначается M0 в случае, если он не распространился, или M1, если он распространился.

[0079] Результаты T, N и M объединяются для определения стадии рака, как правило, одной из четырех стадий: от I (первой) стадии до IV (четвертой) стадии. У некоторых форм рака также имеется стадия 0 (нулевая). Стадия 0 описывает рак *in situ*, который остается местным по отношению к исходной ткани без какого-либо распространения на близлежащие ткани. Эта стадия рака часто характеризуется высокой излечимостью, обычно посредством хирургического удаления всей опухоли. Стадия I или рак на ранней стадии обычно используется для описания небольшого ракового образования или опухоли, которые не проросли глубоко в близлежащие ткани и не распространились на лимфатические узлы или другие части тела. Стадии II и III описывают более крупные раковые образования или опухоли, которые более глубоко проросли в близлежащую ткань и которые также могли распространиться на лимфатические узлы, но не метастазировали в другие ткани. Стадия IV описывает раковое образование, которое распространилось на другие органы или части тела и часто идентифицируется как запущенный или метастатический рак.

[0080] Определение стадии может включать необязательный анализ прогностических факторов для определения шансов на выздоровление и рекомендованной терапии. Анализ прогностических факторов может включать определение стадии рака на основании появления раковых клеток; анализ экспрессии опухолевых маркеров и анализ генетических особенностей опухолей.

[0081] Стадия рака может быть определена повторно с использованием той же исходной системы, чтобы определить эффективность лечения или получить больше информации о рецидивирующем раке.

[0082] Определение стадии NSCLC: NSCLC имеет 5 стадий: 0 (нулевая) стадия и с I по IV (с 1 по 4) стадии. NSCLC на 0 стадии указывает на то, что раковое образование не проросло в близлежащие ткани и не распространилось за пределы легкого.

[0083] NSCLC на I стадии указывает на то, что рак представляет собой небольшую опухоль, которая не распространилась на какие-либо лимфатические узлы. I стадия подразделяется на 2 подстадии в зависимости от размера опухоли. Опухоли на IA стадии имеют ширину менее 3 сантиметров (см), а опухоли на стадии IB имеют ширину более 3 см, но менее 5 см. При NSCLC на I стадии может допускаться полное хирургическое удаление ракового образования.

[0084] II стадия подразделяется на 2 подстадии (IIA и IIB). IIA стадия может быть представлена либо опухолью шириной более 5 см, но менее 7 см, которая не распространилась на близлежащие лимфатические узлы, либо небольшой опухолью шириной менее 5 см, которая распространилась на близлежащие лимфатические узлы. IIB стадия может описывать либо опухоль шириной более 5 см, но менее 7 см, которая распространилась на лимфатические узлы, либо опухоль шириной более 7 см, которая могла прорасти или не прорасти в близлежащие структуры в легком, но не распространилась на лимфатические узлы. Хотя при NSCLC на II стадии может допускаться хирургическое лечение, для лечения этой стадии NSCLC обычно требуются другие виды терапии.

[0085] III стадия включает подстадии IIIA или IIIB. Хирургическая операция затруднена или невозможна при многих формах рака на стадии IIIA и практически при всех формах рака на стадии IIIB вследствие распространения ракового образования на лимфатические узлы или вследствие его прорастания в близлежащие структуры в легком. В любой ситуации при хирургической операции обычно требуется частичное удаление ракового образования.

[0086] NSCLC на IV стадии ассоциирован с его распространением на более чем одну область другого легкого, жидкость, окружающую легкое или сердце, или отдаленные

метастазы в организме. NSCLC с большей долей вероятности распространяется на головной мозг, кости, печень и надпочечники. NSCLC на IV стадии включает подстадии IVA (распространение в пределах грудной клетки) и IVB (распространение за пределами грудной клетки). В большинстве случаев NSCLC на III или IV стадии хирургическая операция редко является успешной, и его может быть невозможно устранить, если он распространился на лимфатические узлы выше ключицы или на жизненно важные структуры в пределах грудной клетки (например, сердце, крупные кровеносные сосуды или основные легочные структуры). В некоторых вариантах осуществления пациент, описанный в данном документе, является пациентом с NSCLC на IV стадии.

[0087] Рецидивирующий NSCLC выявляется после прохождения курса лечения.

[0088] При практическом осуществлении способов, раскрытых в данном документе, используют, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии (в том числе рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые полностью находятся в пределах компетенции специалиста в данной области. Такие методики в полном объеме поясняются в литературе, такой как "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", второе издание (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology", "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); и "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991).

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Эффективность дурвалумаба в комбинации со средством химиолучевой терапии на основе платины у пациентов с местнораспространенным неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (III стадии)

[0089] Это рандомизированное двойное слепое плацебоконтролируемое многоцентровое международное исследование фазы III, в котором оценивается эффективность и безопасность дурвалумаба, применяемого одновременно со средством химиолучевой терапии на основе платины (CRT) (дурвалумаб + стандартное средство терапии [SoC] CRT) у пациентов с местнораспространенным неоперабельным NSCLC (III стадии).

[0090] Будут набирать примерно 390 пациентов с местнораспространенным неоперабельным NSCLC (III стадии) и 300 пациентов будут рандомизировать при соотношении 2:1 для дурвалумаб + SoC CRT или плацебо + SoC CRT. Пациентов будут

стратифицировать по возрасту (< 65 лет относительно ≥ 65 лет) и стадии (ША относительно ПВ/С).

[0091] Субъекты в данном исследовании включают взрослых субъектов в возрасте ≥ 18 лет с гистологически или цитологически подтвержденным NSCLC, у кого представлено местнораспространенное неоперабельное заболевание (III стадия). Все субъекты должны были характеризоваться удовлетворительной функцией органов и костного мозга.

[0092] Субъекты исключались из участия в исследовании в случае предыдущего или настоящего введения средства лечения NSCLC, в том числе без ограничения средства лучевой терапии, исследовательских лекарственных средств, химиотерапии и mAb.

[0093] Все пациенты будут получать один из следующих вариантов химиотерапии SoC на основе платины в дополнение к лучевой терапии: цисплатин/этопозид, арбоплатин/паклитаксел, пеметрексед/цисплатин или пеметрексед/карбоплатин. Схемы химиотерапевтического лечения приведены в таблице 1.

Таблица 1. Исследуемые средства лечения

| | Дурвалумаб | Плацебо | Стандартное средство лечения ^a | | | | |
|--|---|---|--|--|---|--|---|
| Название исследовательского средства лечения: | Дурвалумаб (MED14736) | Солевой раствор | Цисплатин/этопозид | Карбоплатин/ паклитаксел | Пеметрексед/цисплатин ^b | Пеметрексед/карбоплатин ^b | Облучение |
| Состав для дозирования^c | Раствор во флаконе 500 мг для инфузии после разбавления, 50 мг/мл | Стерильный раствор 0,9% (вес/об.) хлорида натрия для инъекций | Обеспечивается из местных источников | Обеспечивается из местных источников | Обеспечивается из местных источников | Обеспечивается из местных источников | Обеспечивается из местных источников |
| Путь введения | IV | IV | IV | IV | IV | IV | Дистанционная лучевая терапия |
| Инструкции по введению:^d | 1500 мг IV q4w ^e | Объем солевого раствора, соответствующий объему дурвалумаба | Цисплатин 50 мг/м ² в дни 1 и 8 Этопозид 50 мг/м ² в дни 1-5 q28 дней × 2 цикла +1 необязательный индукционный цикл Одновременная торакальная лучевая терапия | Карбоплатин AUC 2 и паклитаксел 40-50 мг/м ² в день 1 еженедельно в течение 6 недель - Одновременная торакальная лучевая терапия Необязательно: паклитаксел 175-200 мг/м ² и карбоплатин AUC 5-6 q 21 день, который дают в виде 1 индукционного цикла до начала лучевой терапии ИЛИ в виде 1-2 консолидирующих циклов после завершения лучевой терапии | Пеметрексед 500 мг/м ² и цисплатин 75 мг/м ² в день 1 каждого 21-дневного цикла в течение 3 циклов +1 необязательный дополнительный индукционный цикл | Пеметрексед 500 мг/м ² и карбоплатин AUC 5 в день 1 каждого 21-дневного цикла в течение 4 циклов | 5 фракций/неделя в течение ~6 недель (±3 дня) (Всего 60 Гр) |
| Упаковка и маркировка | Предоставлено во флаконах 500 мг, маркированных в соответствии с Приложением 13 GMP и согласно регуляторным требованиям страны ^f | Обеспечивается на месте учреждением | Обеспечивается на месте учреждением | Обеспечивается на месте учреждением | Обеспечивается на месте учреждением | Обеспечивается на месте учреждением | Обеспечивается на месте учреждением |

| | Дурвалумаб | Плацебо | Стандартное средство лечения [§] | | | | |
|------------------|-------------|--|--|--|--|--|--|
| Поставщик | AstraZeneca | Обеспечивается на месте учреждением [§] |

[0094] Также пациенты будут получать дурвалумаб 1500 мг или плацебо каждые четыре недели посредством внутривенной инфузии одновременно с SoC CRT (т. е. начиная с дня 1 [± 3 дня] цикла 1). Пациенты с полным ответом (CR), частичным ответом (PR) или стабильным заболеванием (SD) при оценке опухоли через 16 недель после завершения SoC CRT продолжат получать дурвалумаб/плацебо в качестве консолидирующего лечения (1500 мг q4w IV). Пациенты с радиологическим прогрессированием заболевания, определенным согласно RECIST 1.1, при оценке опухоли через 16 недель после завершения SoC CRT будут продолжать наблюдение. Исходя из средней массы тела 75 кг, фиксированная доза дурвалумаба 1500 мг q4w является эквивалентной 20 мг/кг q4w.

[0095] Основной целью исследования является оценка эффективности дурвалумаба + SoC CRT по сравнению с плацебо + SoC CRT в отношении выживаемости без прогрессирования согласно критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей версии 1.1 (RECIST 1.1), как оценено с помощью независимой централизованной оценки в слепом режиме (BICR). Ключевыми вторичными конечными точками (т. е. включенными в процедуру множественного тестирования) являются частота объективного ответа по RECIST 1.1, оцененная с помощью BICR, общая выживаемость и доля пациентов, выживших через 24 месяца после рандомизации (OS24).

Пример 2. Экспрессия генов в сингенной мышинной модели опухоли, демонстрирующая иммунологические последствия радиотерапии

[0096] *Материалы и способы.*

[0097] *Мышиные модели опухоли.* Мышей содержали в специальных условиях без патогенов в клетках Tecniplast 1284 IVC, рассчитанных максимум на 6 животных, с подстилкой из Aspenchips-2, гнездовым материалом Sizzlenest и картонным туннелем. Мышей содержали в условиях цикла света/тьмы 12/12, поили фильтрованной водой и кормили *ad libitum* экструдированным рационом для грызунов Teklad Global с 19% белка.

[0098] Клеточную линию аденокарциномы толстой кишки CT26 (приобретена в 2011 году в ATCC) культивировали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко, дополненной 10% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки и 1% (об./об.) L-глутамина (Invivogen). Клетки не пассировали более 3 месяцев и регулярно проводили скрининг для подтверждения отсутствия инфекции *Mycoplasma* (PlasmoTest, Source BioScience LifeSciences, Великобритания). 1×10^5 клеток CT26 вводили подкожно (s.c.) в области спины мышей Balb/c (Harlan Laboratories, Великобритания) на расстоянии 1 см от основания хвоста. Объем опухоли измеряли в мм³ как *длина x ширина x толщина* с применением штангенциркуля и контролировали вес ежедневно.

[0099] *Опухолевая терапия.* Локальное облучение проводили, когда опухоли достигали объема 100-200 мм³. Мышей фиксировали в свинцовом щите, оставляя незащищенной только опухоль, чтобы обеспечить локальное воздействие ИК-лучами в однократной дозе 7 Гр с применением рентгеновского излучения 250 кВ (рентгеновская трубка MXR-320/36, Comet AG, Швейцария) при силе тока 12 мА и мощности дозы 2 Гр/мин. Мышей умерщвляли через 1, 3 и 7 дней после облучения наряду с сопоставимыми по времени контрольными группами, не подвергавшимися обработке. Опухоли собирали и использовали свежесобранными для анализа с помощью проточной цитометрии, а для анализа генов с помощью микрочипов по меньшей мере 20 мг ткани из каждой опухоли мгновенно замораживали. Для исследований комбинации мыши получали RT с последующим введением 10 мг/кг моноклонального антитела к α PD-L1 (mAb) (клон 10F.9G2, Biolegend, Великобритания) в дозе 3qw в течение 1 недели и начиная с дня 1 RT. Мышей умерщвляли, когда опухоли достигали объема 1000 мм³, или, в случае мышей с продолжительным периодом выживаемости (LTS), через 100 дней после терапии. Исследования фенотипирования с помощью проточной цитометрии и исследования комбинации являются репрезентативными для двух независимых экспериментов.

[0100] *Анализ экзонов с использованием микрочипов.* Для оценки с помощью микрочипов было проведено одно исследование с отбором образцов 5 различных опухолей из каждой группы обработки в каждой временной точке. Выделение свежзамороженной РНК проводили с применением RNASat 60 (Amsbio, Великобритания) и тестирование с контролем качества общей РНК осуществляли с применением биоанализатора 2100 (Agilent, Великобритания). Амплификацию образцов проводили с применением Ovation Pico WTA System v2 (NuGEN Technologies, Нидерланды). После тестирования QC кДНК фрагментировали и вносили метку с применением модуля Encore Biotin (NuGEN Technologies, Нидерланды), которые затем гибридизовали с чипами экзонов мыши в соответствии с рекомендациями NuGEN для чипов Affymetrix GeneChip®. Анализ с применением микрочипов проводили с применением чипа Mouse Exon 1.0 ST (Affymetrix, Великобритания). Все данные микрочипов были депонированы в GEO (номер доступа GSE74875).

[0101] *Анализ данных.* Необработанные данные микрочипов предварительно подвергались обработке/нормализации с помощью Robust Multichip Algorithm (RMA) по основным транскрипционным зондам (Bolstad *et al.*, *Bioinformatics* 19(2): 185-93 (2003)). Затем проводили контроль качества, исключая три выброса после оценки целостности данных (по одному из каждой группы обработки в день 1 и один из группы, подвергнутой

облучению, в день 3). Контрольные транскрипты Affy AFFX были удалены вместе с неинформативными транскриптами (пороговое значение экспрессии $\log_2 < 3,6473$ и пороговое значение дисперсии $< 0,0088$). Для анализа оставляли 8500 точно детектированных Id транскриптов (Id кластера транскриптов Affymetrix).

[0102] Сравнение проводили для групп обработки (не подвергнутая обработке относительно облученной) в каждой временной точке и определяли Id дифференцированно экспрессируемых транскриптов (повышающе или понижающе регулируемых) с применением отсекающего р-значения, составляющего 0,05 (ANOVA). Для групп опухолей, не подвергавшихся обработке, рассчитывали медианное значение \log_2 интенсивности для каждого Id транскрипта в каждой временной точке и затем вычитали из обработанных образцов в их эквивалентной временной точке, получая нормализованные относительно контроля значения интенсивности экспрессии транскриптов в каждой временной точке. Иерархический кластерный анализ (HCA); ненормализованный, связь = метод Уорда и расстояние = нецентрированная корреляция (Omicsoft ArrayStudio) проводили для кластеризации контрольных нормализованных данных экспрессии транскриптов по образцам и Id транскриптов. Данные по совокупности дифференцированно регулируемых генов, категоризированных относительно пути, были нанесены на график в зависимости от временной точки в виде пузырьковых диаграмм (MatLab), при этом цвет пузырька указывал на направление регуляции гена. Размер пузырька указывает абсолютные значения кратности изменения экспрессии каждого пути. Примечания для мышинных генов присваивались Id транскриптов с применением BioMart (гены Mus Musculus GRCm38.p2) и IDconverter (Alibes *et al.*, *BMC Bioinformatics* 8:9. doi: 10.1186/1471-2105-8-9 (2007)). Функциональное обогащение и сетевые анализы проводили с применением Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity® Systems). Транскрипты, которые были повышающе или понижающе регулируемы в по меньшей мере 1,5 раза, картировали относительно путей и вышерасположенных регуляторов. Анализ обогащения генных онтологий проводили с помощью функции g:GOSt в g:Profiler (Reimand *et al.*, (обновление 2011), *Nucleic Acids Res.* 39(издание на веб-сервере):W307-15. doi: 10.1093/nar/gkr378 (2011)).

[0103] *Проточная цитометрия.* Опухоли разрезали на кусочки размером 1 мм³ и инкубировали при 37°C в течение 40 минут в 2 ЕД/мл ДНКзы (Sigma, Великобритания), 300 CDU/мл коллагеназы I (Life Technologies, Великобритания) и 0,9 мг/мл диспазы II (Sigma, Великобритания) в PBS и пропускали через 100 мкм клеточное сито с буфером FACS (PBS с 10% FCS). Экспрессию CD4, CD8 (BD Biosciences, Великобритания), CD11b, CD11c, CD45, CD69, CD86, CD206 (Biolegend, Великобритания), МНС-II, F4/80, Gr1,

НКр46, B220, PD-1 и CTLA-4 (все от eBiosciences, Великобритания, если не указано иное) анализировали с помощью проточной цитометрии после инкубации с блокирующими антителами на основе Fc к CD16/CD32 (Life Technologies, Великобритания). Для исключения мертвых клеток включали окрашивание в отношении жизнеспособности (Life Technologies, Великобритания). Регуляторные Т-клетки анализировали с применением набора № 3 для окрашивания мышинных регуляторных Т-клеток (eBioscience, Великобритания).

[0104] *Статистический анализ.* Для сравнения данных проточной цитометрии и объема опухоли между двумя группами применяли U критерии Манна-Уитни. Данные в отношении получения профиля экспрессии генов оценивали, как описано выше. Для данных по выживаемости применяли логарифмические ранговые критерии Мантеля-Кокса. Данные считались статистически отличающимися, если $P < 0,05$.

[0105] **RT приводит к активации врожденного и адаптивного иммунитета.** Иммунокомпетентные мыши Balb/c, несущие развившиеся опухоли СТ26, получали однократную дозу RT 7 Гр, и опухоли иссекали через 1, 3 и 7 дней после обработки (фигуры 2А и 2С) для анализа экзонов с помощью микрочипов с целью выявления ранних транскрипционных изменений. Транскриптомы облученных опухолей сравнивали с таковыми не подвергнутых обработке (NT) контролей, сопоставимых по времени, в результате чего идентифицировали 757 генов ($\pm 1,5$ кратное изменение и $p \leq 0,05$), которые характеризовались значительной дифференцированной экспрессией (повышающе или понижающе регулируемой) в по меньшей мере одной из временных точек (таблица 2). Кроме ожидаемой активации пути p53 (зависимое от облучения повреждение ДНК и клеточная гибель), анализ функционального обогащения данных IPA выявил сильное смещение в сторону функций врожденного и адаптивного иммунитета. К ним относятся презентация антигена, активация и цитотоксичность Т-клеток и продуцирование хемокинов (фигуры 2В и 3 и таблицы 3 и 4). Было примечательно, что количество дифференцированно регулируемых генов явно увеличивалось с дня 1 до дня 7 (таблица 2).

[0106] Таблица 2. Количество повышающе или понижающе регулируемых генов, соответствующих порогу отсечения ($\geq \pm 1,5$ -кратное изменение и $p \leq 0,05$, ANOVA) в разных временных точках.

| | День 1 | День 3 | День 7 |
|--|--------|--------|--------|
| $\geq 1,5$-кратное изменение | 205 | 275 | 503 |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| ≤ -1,5-кратное изменение | 185 | 242 | 205 |
| Общее количество дифференцированно регулируемых генов в день | 390 | 517 | 708 |

[0107] Таблица 3. Основные преобладающие иммунологические пути (анализированные с помощью программного обеспечения IPA), ассоциированные с дифференцированно экспрессируемыми генами (кратность изменения = +/- 1,5 и $p \leq 0,05$) в трех временных точках (день 1, 3 и 7) в опухолях СТ26 после IR 7 Гр. * пути, задействованные в нескольких временных точках. Выделены иммунные пути, не связанные с заболеваниями, присутствующие в первой 10 с наиболее значимыми значениями p.

| | Путь | Гены мышцы | -log(p- значение) |
|-------------------|--|---|----------------------|
| День 1 | Путь презентации антигена | Psmb9, Ifng, H2-Q4, H2-Aa, Psmb8, Cd74, Tap1, H2-DMa, H2-DMb1, H2-DMb2, Tapbp, H2-Eb1 | 18,6 |
| | Коммуникация между клетками врожденного и адаптивного иммунитета * | Ifng, Cd40lg, H2-Q4, Il15, Cd8a, Cd8b1, Cxcl10, Ccl4, Ccl3, Il1b, Tnf, H2-Eb1 | 14,4 |
| | Созревание дендритных клеток * | Cd40lg, H2-Q4, Il15, H2-Aa, H2-Ab1, H2-DMa, H2-DMb1, H2-DMb2, Il1b, Stat2, Stat1, Tnf, H2-Eb1, Fcgr4 | 9,36 |
| | Дифференцировка Т-хелперных клеток | Ifng, Cd40lg, H2-DMa, H2-DMb1, H2-DMb2, H2-Aa, H2-Ab1, Stat1, Tnf, H2-Eb1 | 9,11 |
| День 3 | Адгезия и диапедез гранулоцитов * | Il1a, VCAM1, Cxcl11, Ppbp, Il1rl1, Cxcl12, Ccl17, Mmp13, Ccl5, Cldn6, Cxcl10, Cxcl16, Cxcl3, Ccl4, Il1rn, Ccl3, Ccl2, Cxcl14, Cxcl1, Ccl7 | 11,9 |
| | Адгезия и диапедез агранулоцитов * | Il1a, Vcam1, Cxcl11, Ppbp, Cxcl12, Ccl17, Mmp13, Ccl5, Cldn6, Cxcl10, Cxcl16, Cxcl3, Ccl4, Il1rn, Ccl3, Ccl2, Cxcl14, Cxcl1, Ccl7 | 10,5 |
| | Коммуникация между клетками врожденного и адаптивного иммунитета * | Cxcl10, Il1a, Ccl4, Cd80, Il1rn, Ccl3, Il15, Ccl5, Tlr3, H2-Eb1 | 8,5 |
| | Созревание дендритных клеток * | Il1a, Il15, H2-Aa, Col10a1, H2-Ab1, Cd80, H2-DMa, Il1rn, Pik3cg, H2-DMb1, H2-DMb2, Stat2, Tlr3, Stat1, H2-Eb1, Col3a1 | 7,63 |
| День 7 | Адгезия и диапедез гранулоцитов * | Sell, Sele, Cxcl11, Cxcl12, Thy1, Mmp2, Ccl5, Ccl11, Cldn6, Itgal, Ccl9, Selplg, | 11,9 |

| | | | |
|--|---|--|------|
| | | Il1r2, Cxcl10, Ccl4, Selp, Il1rn, Ccl3, Ccl2, Tnf, Ccl6, Ccl7, Mmp19, Itga4 | |
| | Коммуникация между клетками врожденного и адаптивного иммунитета * | Ifng, Il15, Ccl5, Cd8a, Tlr9, Cd8b1, Ccl9, Cxcl10, Cd28, Ccl4, Il1rn, Ccl3, Tlr3, Tnf | 8,98 |
| | Адгезия и диапедез агранулоцитов * | Sell, Sele, Cxcl11, Cxcl12, Mmp2, Ccl5, Ccl11, Cldn6, Ccl9, Selp, Cxcl10, Ccl4, Selp, Il1rn, Ccl3, Ccl2, Tnf, Ccl6, Ccl7, Mmp19, Itga4 | 8,92 |
| | Передача сигнала Т-клеточных рецепторов | Camk4, Prkcq, Cd3e, Cd8a, Cd8b1, Cd3d, Ctla4, Ptpre, Cd28, Cd3g, Lck, Txk, Card11, Grap2, Lat, Itk | 8,54 |
| | Роль рецепторов распознавания паттерна в распознавании бактерий и вирусов | Ifng, Oas1a, Oas1g, Prkcq, C3, Oas2, Ccl5, Oas3, Tlr9, Ifih1, Irf7, Ddx58, Casp1, Prkch, Eif2ak2, Tlr3, Tnf | 7,24 |
| | Перекрестное взаимодействие между дендритными клетками и естественными клетками-киллерами | Ifng, Cd28, Prf1, Klrd1, Il15, Cd226, Ltb, Tnfsf10, Tlr3, Tlr9, Tnf, Itgal | 6,68 |
| | Передача сигнала интерферона | Ifit3, Ifng, Oas1a, Oas1g, Ifi35, Stat2, Irf9, Psmb8, Stat1 | 6,33 |

[0108] Таблица 4. Классификация ключевых генов в каждом кластере (А-Е) из тепловой карты (фигура 2) с получением функциональных наборов с иммунными или радиомодулирующими ассоциациями. Показана кратность изменения экспрессии генов в каждой временной точке (подвергнутая облучению относительно необработанной опухоли), звездочками отмечены значимые р-значения ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,005$ ***). Функциональные классификации проводили, руководствуясь панелью иммунного профилирования Nanostring nCounter Mouse PanCancer и знаниями авторов.

| | Название гена | Кластер | День 1 (кратность изменения) | День 3 (кратность изменения) | День 7 (кратность изменения) |
|-------------------------------|-------------------|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Т-клетки и цитотоксичность | Cd3d | A | 1,84 | -2,47** | 3,97*** |
| | Cd3g | A | 1,37 | -1,94 | 3,35*** |
| | Cd3e | A | 1,46 | -1,72 | 3,09*** |
| | Cd8a | A | 2,16* | -1,69 | 3,38*** |
| | Cd28 | A | -1,05 | -1,24 | 3,39*** |
| | Pdcd1 (Pd1) | A | -1,05 | -1,25 | 1,95*** |
| | Ctla4 | A | 1,07 | -1,09 | 2,54*** |
| | Icos | A | 1,03 | -1,17 | 1,78*** |
| | Lag3 | A | 1,01 | 1,04 | 2,24*** |
| | Entpd1 (Cd39) | A | 1,38 | -1,09 | 1,63*** |
| | Havcr2 (Tim3) | A | -1,05 | 1,04 | 2,54*** |
| | Ifng | A | 1,67** | 1,24 | 1,99*** |
| | Il15 | B | 1,61*** | 2,65*** | 2,14*** |
| | Tnfsf9 (Cd137) | B | 1,15 | 1,5* | 1,12 |
| | Cd274 (Pd- 11) | C | 2,41 | 2,29*** | 2,11*** |
| | Tnf | C | 1,53* | 1,1 | 1,71** |
| | Sell (Cd62l) | C | 1,48 | 1,39 | -1,6** |
| | Cd40lg | C | 1,7** | -1,17 | -1,47 |
| | Gzmb | C | 2,58* | 3,75*** | 4,04*** |
| Врожденный иммунный ответ | Tlr9 | A | 1,24 | 1,16 | 1,68*** |
| | C2 | A | 1,32 | 1,1 | 1,84*** |
| | Stat4 | A | 1,05 | -1,36 | 2,25*** |
| | Tlr3 | B | 1,21 | 2,21*** | 2,24*** |

| | | | | | |
|---|--------------------|---|---------|----------|----------|
| | Nos2 | B | 1,46 | 1,82*** | 1,79*** |
| | Cfb | B | 1,35 | 1,44 | 2,66*** |
| | Irf7 | B | 1,27 | 2,77*** | 4,39*** |
| | Irf9 | B | 1,22 | 1,39 | 1,71*** |
| | Mx1 | B | 1,53 | 3,68*** | 5,41*** |
| | Oas1a/Oas1g | B | 1,42 | 1,92*** | 2,82*** |
| | Oas2 | B | 1,27 | 2,15** | 2,54*** |
| | Irf1 | C | 2,14*** | 1,41 | 1,49 |
| | Stat1 | C | 2,08*** | 1,61* | 1,85*** |
| | Stat2 | C | 1,64* | 2,05*** | 2,38*** |
| | C3 | C | 1,98*** | 1,42 | 2,24*** |
| | C1ra | C | 1,37 | 1,48 | 1,87*** |
| | C1rb | C | 1,37 | 1,48 | 1,87*** |
| | Cd74 | P | 2,21** | -2,02** | -1,19 |
| | Retnla | P | -1,55 | -6,93*** | 2,54 |
| | Mrc1 | E | -1,34 | -1,89*** | -1,41 |
| | Cd163 | E | -1,58** | -1,96*** | 1,09 |
| Восстановление зависимого от облучения повреждения ДНК и гибель клеток | Tnfsf10 (Trail) | A | 1,22 | 1,62* | 1,63*** |
| | Casp4 | B | 1,54*** | 2,09*** | 1,85*** |
| | Parp11 | B | 1,24 | 1,79*** | 2,01*** |
| | Cdkn1a | C | 1,46 | 1,7*** | 1,24 |
| | Fas | C | 1,8*** | 1,52* | 1,31 |
| | Parp14 | C | 1,53 | 1,8* | 2,51*** |
| | Parp12 | C | 1,32 | 1,76** | 2,06*** |
| | Parp9 | C | 1,44 | 1,72*** | 1,97*** |
| | Brcal | E | -1,07 | -1,2 | -1,59*** |
| | Brcal2 | E | -1,04 | -1,18 | -1,59*** |
| | Ercc1 | E | -1,02 | -1,13 | -1,77*** |
| | Lig4 | E | -1,83* | -1,59 | -1,33 |

| | | | | | |
|---|----------|---|----------|----------|----------|
| | Pola1 | E | -1,09 | -1,32 | -1,56*** |
| | Gadd45a | E | -2,13*** | -1,53* | -1,2 |
| | Parpbp | E | 1,33 | -1,11 | -1,56* |
| | Hist1h4h | E | -1,87*** | -1,81*** | -1,35 |
| | Hist2h4 | E | -1,72* | -1,83** | -1,06 |
| Презентация антигенов и В- клетки | Cd80 | B | 1,26 | 1,87*** | 1,37 |
| | Psmb8 | C | 1,84*** | 1,4 | 1,52* |
| | Psmb9 | C | 2,03*** | 1,43 | 1,4 |
| | Psmb10 | C | 1,59* | 1,55* | 1,51* |
| | Tap1 | C | 1,85*** | 1,37 | 1,48 |
| | Tapbp | C | 1,51** | 1,6*** | 1,6*** |
| | H2-DMa | P | 1,6** | -1,54** | -1,05 |
| | H2-DMb1 | P | 1,61* | -1,9*** | -1,24 |
| | H2-DMb2 | P | 1,61* | -1,9*** | -1,24 |
| | H2-Aa | P | 1,95* | -2,28*** | 1,02 |
| | H2-Ab1 | P | 1,66* | -1,72* | 1,01 |
| | H2-Eb1 | P | 2,08* | -2,43*** | -1,02 |
| | Prkcb | P | -1,26 | -2,48*** | 1,32 |
| | Cd24a | P | 1,02 | -2,32* | 1,31 |
| | Cd93 | P | -1,03 | -1,73*** | -1,13 |
| | Cd38 | P | 1,59** | -1,09 | 1,26 |
| | Cd209d | P | -1,18 | -2,02*** | 1,12 |
| | Cd209c | P | -1,08 | -1,96*** | -1,04 |
| Хемокины | Cxcl10 | B | 2,12* | 3,04*** | 2,58*** |
| | Ccl2 | B | 1,38 | 1,9*** | 1,51** |
| | Ccl5 | B | 1,44 | 1,75* | 4,17*** |
| | Ccl6 | B | 1,08 | 1,33 | 1,51* |
| | Ccl7 | B | 1,25 | 1,63** | 1,97*** |
| | Cxcl1 | C | 2,58*** | 2,41*** | 1,26 |
| | Cxcl2 | C | 1,59 | 3,63*** | 1,15 |

| | | | | | |
|--|--------|---|---------|----------|---------|
| | Cxcl11 | C | 2,7** | 3,1*** | 2,72*** |
| | Ccl3 | C | 2,4** | 2,28** | 2,63*** |
| | Ccl4 | C | 2,37*** | 2,48*** | 3,45*** |
| | Ccl11 | P | 1,04 | -1,29 | 3,24*** |
| | Ccr2 | P | 1,22 | -1,56* | 1,3 |
| | Cxcl9 | P | 4,25*** | -1,02 | 1 |
| | Cxcl12 | P | 1,38 | -1,64* | 1,77* |
| | Cxcl14 | P | -1,07 | -2,26*** | 1,38 |
| | Cxcl16 | P | 1,37 | -1,57*** | -1,11 |
| | Ccl17 | E | -1,21 | -1,56** | -1,18 |

[0109] Характер ответа также наблюдается в сетевых картах, построенных на основе данных о наиболее значимых вышерасположенных регуляторах, связанных с иммунитетом, которые в значительной степени дифференцированно регулируются в каждой временной точке (фигура 3). Кроме того, посредством анализа путей отмечено, что 30,8% повышающе и понижающе регулируемых генов связаны с процессами в иммунной системе (GO:0002376), что обеспечивает наиболее значимое *p*-значение обогащения $4,35E-72$, наблюдаемое для данного набора генов, подчеркивая преобладание иммунных процессов в течение 7 дней после облучения. Однако чуть более 5% генов продемонстрировали сходное поведение во всех 3 временных точках (38 повышающе/3 понижающе регулируемых), таким образом отмечая различные фазы ответа на облучение в 3 оцениваемых временных точках.

[0110] Подробный иерархический кластерный анализ (НСА) дифференцированно экспрессируемых генов обеспечил идентификацию 5 кластеров, каждый из которых содержал гены, регулируемые совместно в разных временных точках (фигура 2B). Гены в кластере А характеризовались значительной повышающей регуляцией в день 7 по сравнению с экспрессией в контрольных опухолях. Анализ путей продемонстрировал, что подавляющее большинство этих генов связано с клеточными ответами адаптивного иммунитета, включая передачу сигнала Т-клеточных рецепторов и передачу сигнала CD28. Иллюстрацией этого факта является повышение экспрессии *Cd3d/e/g*, *Cd8a* и *Cd28*, что свидетельствует об увеличении инфильтрации или размножении CD3⁺/CD8⁺ Т-клеток. Предполагали также, что признаками активного противоопухолевого иммунного ответа является повышение регуляции *Ifny*. Другим представляющим интерес повышающе регулируемым геном является *Tnfsf10*, который кодирует рецептор клеточной смерти

TRAIL. Известно, что облучение индуцирует экспрессию на поверхности опухолевых клеток рецепторов клеточной смерти и их лигандов и повышающая регуляция TRAIL на Т-клетках может способствовать направленному уничтожению опухолевых клеток посредством активации рецептора TRAIL. Интересно, что наблюдаемая одновременная экспрессия ингибиторных иммунных контрольных точек, таких как *Pd-1*, *Lag3* и *Ctla4*, позволяла предположить, что этот адаптивный иммунный ответ может быть временным. Развитие такого иммуносупрессивного микроокружения опухоли также усиливается посредством повышающей регуляции *Cd39/Entpd1*, которая в сочетании с ферментативной активностью *Cd73*, как известно, способствует аденозинзависимой супрессии иммунных клеток.

[0111] Второй кластер (В) был обогащен не только генами, связанными с врожденным иммунитетом, но и генами, кодирующими белки, участвующие в коммуникации между врожденной и адаптивной частями иммунной системы. Эти гены непрерывно подвергались повышающей регуляции в ходе эксперимента. Некоторые гены были в значительной степени повышающе регулируемы в день 1, но экспрессия большинства генов была в значительной степени повышающе регулируемой, начиная с дня 3. Данный характер экспрессии позволяет предположить, что врожденный иммунный ответ инициируется рано и остается относительно постоянным в течение первой недели после однократной дозы RT. Релевантные гены в этом кластере включали *Cd80*, который представляет собой костимуляторный рецептор, экспрессируемый на APC, и *IL15*, цитокин, экспрессируемый моноцитами и дендритными клетками, который действует как эффективный индуктор/активатор естественных клеток-киллеров и Т-клеток. Кроме того, кластер В содержал *Nos2* (фермент, индуцируемый *IFN γ* на активированных макрофагах), *Cfb* (фактор В системы комплемента, каталитическая субъединица которого Bb может активировать C3-конвертазу для последующей активации В-клеток) и toll-подобный рецептор 3 (*Tlr3*). Дополнительно этот кластер были обогащен регулируемыми интерфероном I и II типов гены, включая *Irf7*, *Irf9*, *Mx1*, *Oas1a/g* и *Oas2*, и генами хемокинов *Cxcl10*, *Ccl2/5/6* и 7.

[0112] Профиль кластера С является более однородным по временным точкам и может рассматриваться как "первый генный кластер" с точки зрения хронологического ответа. Он состоял из большого набора генов, подвергнутых значительной повышающей регуляции в ранние временные точки (день 1 и 3), и меньшего поднабора генов, подвергнутых повышающей регуляции позднее (с дня 3 до дня 7). В этом кластере врожденный иммунный ответ, восстановление зависимого от облучения повреждения ДНК и клеточная гибель и хемокины обеспечивали преобладающие функциональные

обогащения, но также присутствовало несколько генов, связанных с Т-клетками и цитотоксичностью и презентацией антигена и В-клетками. Гены, связанные с врожденным иммунитетом, включали таковые, кодирующие компоненты комплемента, такие как *C3*, *Clra* и *Clrb*, и гены, регулируемые интерфероном, включая *Stat1*. Интересно, что в анализах функционального обогащения IPA во всех трех временных точках *Stat1* был отмечен как вышерасположенный регулятор (фигура 3 и таблица 4). Хемокины, такие как *Ccl4* (хемокин, связанный с рекрутированием макрофагов и НК-клеток), также подвергались сильной повышающей регуляции в день 1, как и гены, связанные с процессингом антигена (*Psm8/9/10*, *Tap1* и *Tapbp*). Восстановление зависимого от облучения повреждения ДНК и клеточная гибель и Т-клетка и цитотоксичность представляли собой преобладающие функциональные обогащения в этом кластере. Примечательной и подтверждающей набор данных является экспрессия генов, связанных с передачей сигнала p53, что связано с прямыми эффектами IR. Клеточный стресс, такой как повреждение ДНК, вызванное IR, активирует p53, подавляет клеточную пролиферацию и направляет опухолевые клетки к апоптозу. Например, активация p53 индуцирует экспрессию ингибитора гена прогрессирования клеточного цикла *Cdkn1a* (повышающе регулируемого в 1,7 раза в день 3, $p < 0,01$). Аналогично рецептор смерти *Fas* (повышающе регулируемый в 1,8 раза в день 1, $p < 0,01$), как известно, индуцируется с помощью активированного p53 и делает клетки чувствительными к экспрессирующим лиганд FAS иммунным эффекторным клеткам. Релевантные повышающе регулируемые гены, связанные с адаптивным иммунитетом, включали *Cd40lg* (обычно экспрессируемый на активированных CD4⁺ Т-клетках), белок иммунных контрольных точек *Pd-1* (*Cd274*), который подвергается значительной повышающей регуляции с дня 3, и *Gzmb* (гранзим В), который, помимо своей функции уничтожения целевых клеток, участвует в ремоделировании базальной мембраны и трансмиграции лимфоцитов и подвергался значительной повышающей регуляции с дня 1 и далее.

[0113] Гены в кластере D временно подвергались повышающей регуляции в день 1 перед тем, как быть значительно понижающе регулируемыми в день 3. Анализ путей продемонстрировал обогащение генов, связанных с презентацией антигена (гены *H2*, *Cd74*, *Cd209d* и *Cd209c*) и активацией В-клеток (*Cd24a*), наряду с экспрессией хемокинов (*Cxcl9* и *Cxcl12*). Ни один из генов, связанных с презентацией антигена и В-клетками, не подвергался значительной дифференцированной регуляции к дню 7, что свидетельствует о том, что каскад эффектов продвинулся далее по иммунным функциональным путям.

[0114] Последний идентифицированный кластер (кластер E) представлял собой самый крупный кластер, содержащий 180 генов. Восстановление зависимого от облучения

повреждения ДНК является ключевым функциональным обогащением с показателями значительной понижающей регуляции уже в день 1 (в день 1 *Lig4*; в день 1 и 3 *Gadd45a* или в день 7 *Brcal*, *Brc2*, *Ercc1*, *Polal* и *Parbp*). Эти данные подтверждают результаты предшествующих исследований, в которых раскрыто быстрое восстановление ДНК в пределах 24 часов после облучения. Наконец, определили тесную связь между понижением регуляции биосинтеза холестерина и облучением.

[0115] В целом транскриптомный анализ подтверждает, что однократная доза облучения опухолей СТ26 вызывает p53-зависимую клеточную гибель. Запуск клеточной гибели, вероятно, является лимитирующей скоростью стадией для запуска как врожденного, так и адаптивного иммунного ответов в облученных опухолях. Действительно, профиль экспрессии генов позволяет предположить, что RT-индуцируемая гибель опухолевых клеток приводит к рекрутированию и активации врожденного иммунитета (экспрессия $IFN\alpha$, процессинг/презентация антигена, рекрутирование макрофагов и созревание дендритных клеток) с последующей активацией адаптивного иммунного ответа (передача сигнала $IFN\gamma$, Т-клеточная цитотоксичность, передача сигнала Т-клеточных рецепторов и активация В-клеток). Однако, как и для любой физиологической системы, ожидается, что этот биологический иммунный ответ будет временным, как продемонстрировано повышенной экспрессией нескольких иммуносупрессивных молекул.

[0116] Для подтверждения данных анализа генов с помощью микрочипов и дальнейшего изучения фенотипических изменений иммунных компонентов после IR в отношении уровня белков те же ткани параллельно анализировали с помощью проточной цитометрии. На фигуре 7 обобщена тепловая карта, демонстрирующая кратные изменения маркеров линий и фенотипов в сопоставимой опухолевой ткани.

[0117] RT обеспечивает модификацию фенотипа популяций инфильтрирующих опухоль миелоидных клеток. Макрофаги демонстрируют высокую степень пластичности линии, однако при ряде видов рака ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM) имеют склонность к фенотипу M2. Клетки M2 экспрессируют CD206 (также известный как рецептор маннозы или MRC1), являются плохими APC и могут способствовать ускользанию от иммунного ответа и прогрессированию заболевания за счет высвобождения проангиогенных и иммуносупрессивных факторов. Напротив, M1-дифференцированные макрофаги совместно экспрессируют костимулирующие молекулы, такие как CD86, что обеспечивает эффективную активацию лимфоцитов. Анализировали как частоту, так и состояние дифференцировки TAM в подвергнутых обработке RT и сопоставимых по времени контрольных NT опухолях. В то время как общее количество $F4/80^+$ TAM после RT существенно не изменилось (фигура 4A), экспрессия CD86 и CD206

была модулирована. Через семь дней после RT экспрессия CD86 в F4/80⁺ клетках была снижена по сравнению с NT-контролями, сопоставимыми по времени (MFI 695,0±46,6 NT относительно 494,7±13,9 в облученных, $P<0,05$; фигура 4B). Кроме того, экспрессия CD206 была значительно снижена на инфильтрирующих опухоль F4/80⁺ клетках через 3 дня после RT (MFI 263,7±23,8 в NT относительно 99,5±8,1 в облученных опухолях. $P<0,001$; фигура 4C). Такое снижение экспрессии также наблюдалось в день 7 после RT. Аналогичный характер ответа также наблюдали в транскриптомном анализе (таблица 4). Соотношение CD86⁺ и CD206⁺ положительных F4/80⁺ клеток увеличивалось в день 3 по сравнению с сопоставимыми по времени контролями NT (1,8±0,05 NT относительно 2,7±0,12 в облученных, $P<0,01$) (фигура 4D). Помимо изменений в экспрессии CD86 и CD206, о сдвиге фенотипа макрофагов свидетельствует также повышение экспрессии *Nos2* и *Stat1*, наблюдаемое в данных определения профиля экспрессии генов после облучения (фигура 3 и таблица 4). Дополнительно также через 3 дня после RT выявили снижение экспрессии генов резистинподобного альфа (*Retnla*) и *Cd163* (в 6,9 и 2 раза соответственно), которые связаны с M2-подобным фенотипом (фигура 3 и таблица 4). Принимая во внимание, что изменения общего количества TAM не было обнаружено, эти данные позволяют предположить, что RT приводит к временной поляризации макрофагов в направлении фенотипа M1.

[0118] Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) обладают способностью супрессировать противоопухолевые иммунные ответы и поэтому могут влиять на иммуногенность RT. В то время как ни в одной из временных точек после RT не наблюдали изменений в частоте инфильтрирующих опухоль CD11b⁺Gr1^{lo} клеток (фигура 4E и стратегия гейтирования, фигура 8), в день 3 в опухолях, подвергнутых обработке RT, наблюдали увеличение в 2,7 раза количества CD11b⁺Gr1^{hi} клеток (фенотипически определяемых как MDSC) (фигура 4F). Это увеличение оказалось временным, поскольку к дню 7 не наблюдали существенной разницы в частоте встречаемости CD11b⁺Gr1^{hi} клеток между группами NT и подвергнутой обработке RT.

[0119] RT приводит к активации Т-клеток и изменяет соотношение CD8:Treg в опухолях. Хотя RT приводила к общему повышению доли CD45⁺ клеток, инфильтрирующих опухоль (фигура 9), обнаружено, что количества CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток были снижены на 52% и 63% соответственно через 3 дня после RT по сравнению с сопоставимыми по времени контролями (фигуры 5A и 5B). В то время как через 7 дней после обработки количества CD4⁺ Т-клеток оставались сниженными, количества CD8⁺ Т-клеток восстановилось, и в опухолях, подвергнутых обработке RT, наблюдалась тенденция к размножению (от 15,9±3,0% до 25,9±3,8%). $P=0,06$). Интересно, что на

оставшихся инфильтрирующих опухоль CD4⁺ (в день 3 и 7 после RT) и CD8⁺ (в день 1 и 3 после RT) Т-клетках наблюдали повышенную экспрессию раннего маркера активации CD69 относительно сопоставимых по времени контролей (фигуры 5C и 5D и фигура 10A), что дает основание предполагать, что RT индуцировала активацию Т-клеток.

[0120] Даже в опухолях NT доля CD4⁺ клеток с фенотипом Treg увеличивалась в 3,3 раза с дня 1 до дня 7 (фигура 5E), демонстрируя, как меняется микроокружение опухоли с течением времени. Однако сравнение сопоставимых по времени опухолей раскрыло, что RT далее увеличивало частоту встречаемости Treg на дополнительные 32% при оценке через 7 дней после обработки. Несмотря на это, соотношение клеток CD8:Treg, как часто сообщают, ассоциировано с лучшим прогнозом при раке, было в 2,5 раза выше в опухолях, подвергнутых обработке RT, по сравнению с контролями NT в день 7 (фигура 5F).

[0121] RT приводит к экспрессии PD-1 и PD-L1 в микроокружении опухоли, что ограничивает противоопухолевую эффективность. Данные определения профиля экспрессии генов раскрыли, что RT приводила к повышенной экспрессии в опухоли нескольких коингибиторных иммунных контрольных точек. Принимая во внимание последовательную повышающую регуляцию *Pd-11*, наблюдаемую после RT на уровне мРНК, и экспрессию *Pdcd1* (PD-1) в день 7 (фигура 3 и таблица 4), первоначальные исследования были направлены на путь PD-1/PD-L1. Проточная цитометрия позволила провести дальнейшую контекстуализацию данных по мРНК и открыла повышенную экспрессию как PD-1, так и PD-L1 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках через 7 дней после RT (фигуры 6A-6D и фигура 10B). Более того, RT также приводила к повышению экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках во всех исследуемых временных точках (фигура 6E). Эти данные тесно соответствовали характеристикам экспрессии, наблюдаемым на уровне мРНК (фигура 3 и таблица 4).

[0122] Проводили терапевтические исследования с целью определения того, повлияет ли блокирование оси PD-1/PD-L1 на противоопухолевую эффективность RT. Мыши получали RT (7 Гр в виде однократной дозы) отдельно или в комбинации с mAb к αPD-L1. Медианная выживаемость в когорте NT составляла 15,5 дня, которая существенно не улучшалась с помощью mAb к αPD-L1, доставленного 3qw, в качестве монотерапии (медианная выживаемость = 18 дней; фигуры 6F и 6G). Однако RT при доставке в комбинации с mAb к αPD-L1 привела к значительному улучшению выживаемости по сравнению с любой монотерапией отдельно, причем у >70 % мышей был получен полный терапевтический ответ.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSE
KYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 3 - CDR1 VH

GFTFSRYWMS

SEQ ID NO: 4 – CDR2 VH

NIKQDGSEKYYVDSVKG

SEQ ID NO: 5 – CDR3 VH

EGGWFGELAFDY

SEQ ID NO: 6 – CDR1 VL

RASQRVSSSYLA

SEQ ID NO: 7 – CDR2 VL

DASSRAT

SEQ ID NO: 8 – CDR3 VL

QQYGSLPWT

Формула изобретения

1. Способ повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), при этом способ включает одновременное лечение пациента с помощью антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии.
2. Способ по п. 1, где антитело к PD-L1 является человеческим.
3. Способ по п. 1 или п. 2, где средство химиолучевой терапии основано на платине.
4. Способ по п. 2 или п. 3, где человеческое антитело к PD-L1 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.
5. Способ по п. 2 или п. 3, где человеческое антитело к PD-L1 содержит:
CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и
CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и
CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и
CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.
6. Способ по п. 2 или п. 3, где человеческое антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб или сугемалимаб.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где лечение с помощью антитела к PD-L1 включает введение 1500 мг антитела к PD-L1 пациенту внутривенно каждые четыре недели (Q4W).
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где неоперабельный NSCLC характеризуется III стадией.
9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где неоперабельный NSCLC является местнораспространенным.
10. Способ по любому из предыдущих пунктов, где антитело к PD-L1 вводят в первый день химиолучевой терапии.
11. Способ увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), при этом способ включает одновременное лечение пациента с помощью антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии.
12. Способ по п. 11, где антитело к PD-L1 является человеческим.

13. Способ по п. 11 или п. 12, где средство химиолучевой терапии основано на платине.

14. Способ по п. 12 или п. 13, где человеческое антитело к PD-L1 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

15. Способ по п. 12 или п. 13, где человеческое антитело к PD-L1 содержит:

CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и

CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и

CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и

CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и

CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и

CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

16. Способ по п. 12 или п. 13, где человеческое антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб или сугемалимаб.

17. Способ по любому из пп. 11-16, где лечение с помощью антитела к PD-L1 включает введение 1500 мг антитела к PD-L1 пациенту внутривенно каждые четыре недели (Q4W).

18. Способ по любому из пп. 11-17, где неоперабельный NSCLC характеризуется III стадией.

19. Способ по любому из пп. 11-18, где неоперабельный NSCLC является местнораспространенным.

20. Способ по любому из пп. 11-19, где антитело к PD-L1 вводят в первый день химиолучевой терапии.

21. Способ лечения пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC) III стадии, при этом способ включает одновременное лечение пациента с помощью антитела к PD-L1 и средства химиолучевой терапии.

22. Способ по п. 21, где антитело к PD-L1 является человеческим.

23. Способ по п. 21 или п. 22, где средство химиолучевой терапии основано на платине.

24. Способ по п. 22 или п. 23, где человеческое антитело к PD-L1 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

25. Способ по п. 22 или п. 23, где человеческое антитело к PD-L1 содержит:

CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и
CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и
CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и
CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и
CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и
CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

26. Способ по п. 22 или п. 23, где антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб или сугемалимаб.

27. Способ по любому из пп. 21-26, где лечение с помощью антитела к PD-L1 включает введение 1500 мг антитела к PD-L1 пациенту внутривенно каждые четыре недели (Q4W).

28. Способ по любому из пп. 21-27, где антитело к PD-L1 вводят в первый день химиолучевой терапии.

29. Комбинация, включающая антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в способе повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

30. Комбинация, включающая антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в способе увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

31. Комбинация, включающая антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, для применения в лечении неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) III стадии.

32. Комбинация для применения по любому из пп. 29-31, где антитело к PD-L1 является человеческим.

33. Комбинация для применения по любому из пп. 29-32, где средство химиолучевой терапии основано на платине.

34. Комбинация для применения по п. 32 или п. 33, где человеческое антитело к PD-L1 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

35. Комбинация для применения по п. 32 или п. 33, где человеческое антитело к PD-L1 содержит:

CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3; и
CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; и

CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; и CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7; и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8.

36. Комбинация для применения по любому из пп. 32-35, где человеческое антитело к PD-L1 представляет собой дурвалумаб, авелумаб, атезолизумаб или сугемалимаб.

37. Комбинация для применения по любому из пп. 31-36, где лечение с помощью человеческого антитела к PD-L1 включает введение 1500 мг антитела к PD-L1 пациенту внутривенно каждые четыре недели (Q4W).

38. Комбинация для применения по любому из пп. 31-37, где неоперабельный NSCLC характеризуется III стадией.

39. Комбинация для применения по любому из пп. 31-38, где неоперабельный NSCLC является местнораспространенным.

40. Комбинация для применения по любому из пп. 31-39, где антитело к PD-L1 вводится в первый день химиолучевой терапии.

41. Применение комбинации, включающей антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, в изготовлении лекарственного препарата для применения в способе повышения выживаемости без прогрессирования (PFS) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

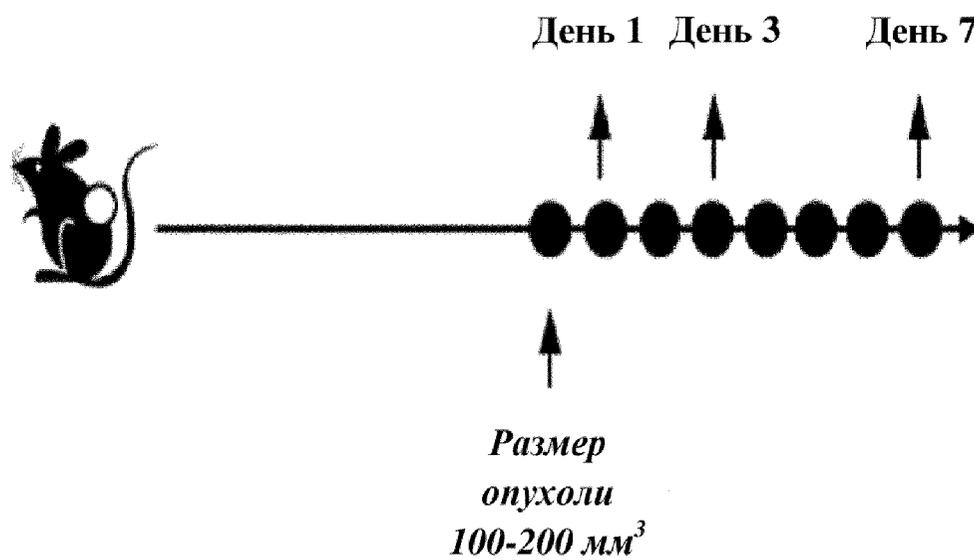
42. Применение комбинации, включающей антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, в изготовлении лекарственного препарата для применения в способе увеличения общей частоты ответа (ORR) у пациента с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого (NSCLC).

43. Применение комбинации, включающей антитело к PD-L1 и одновременно вводимое средство химиолучевой терапии, в изготовлении лекарственного препарата для применения в лечении неоперабельного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) III стадии.



ФИГУРА 1

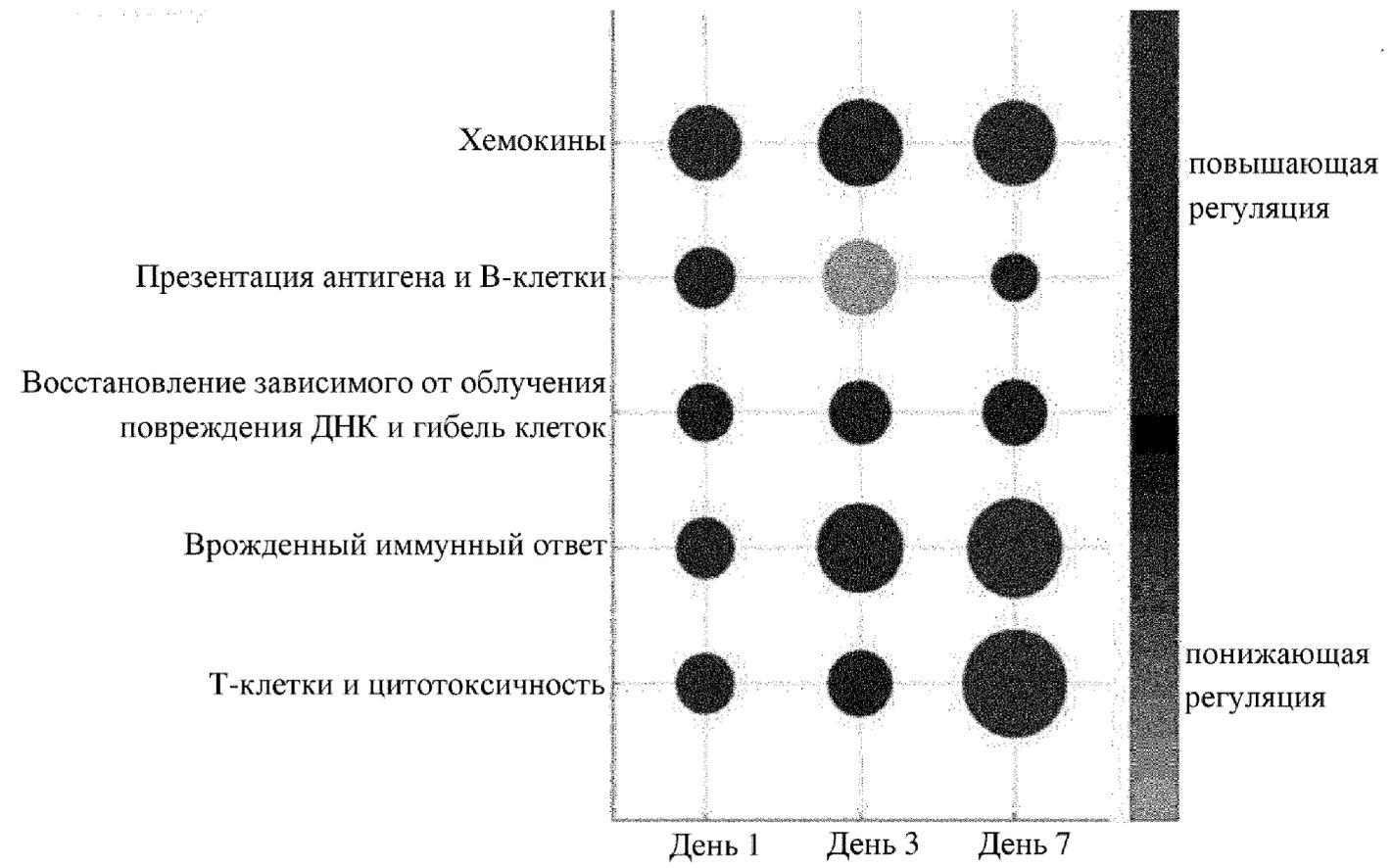
**S.C. имплантация
СТ26**



ФИГУРА 2
А

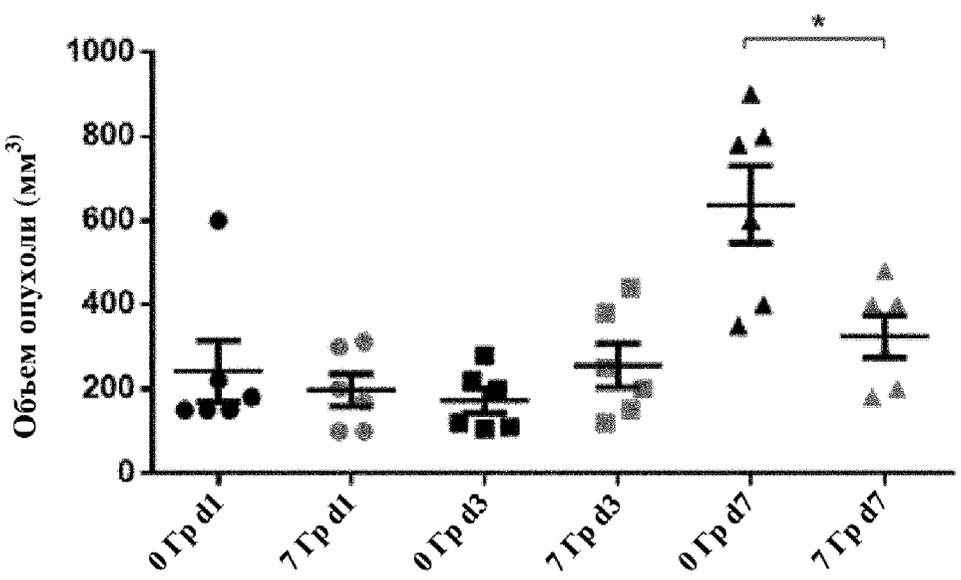
ФИГУРА 2 (продолжение)

В

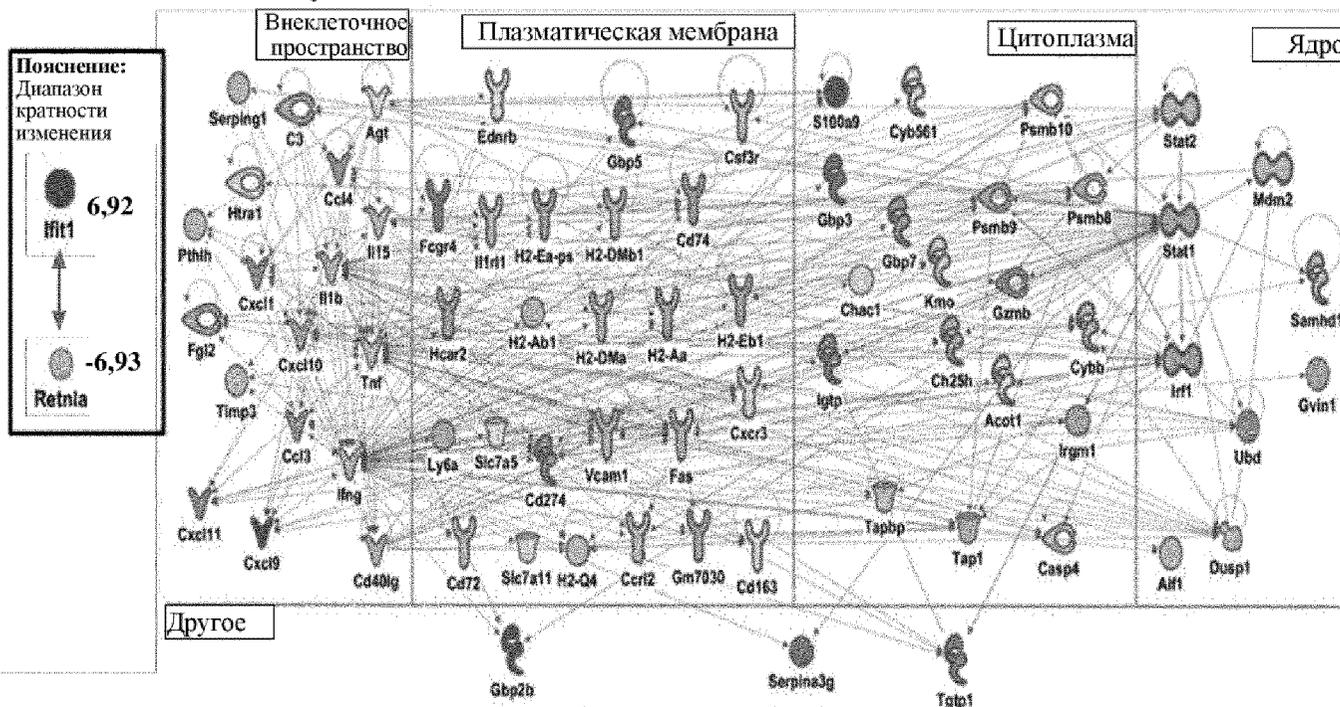


ФИГУРА 2 (продолжение)

С

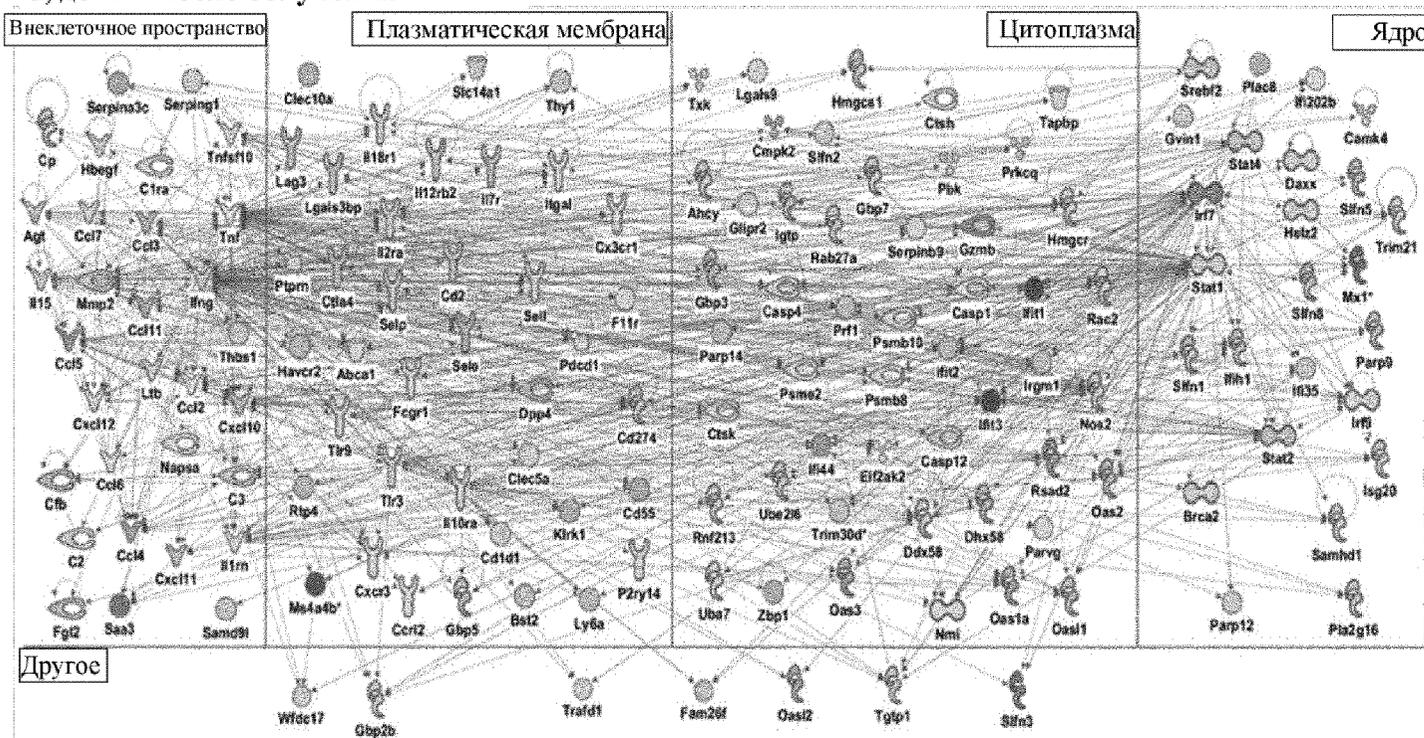


2А. день 1 после облучения



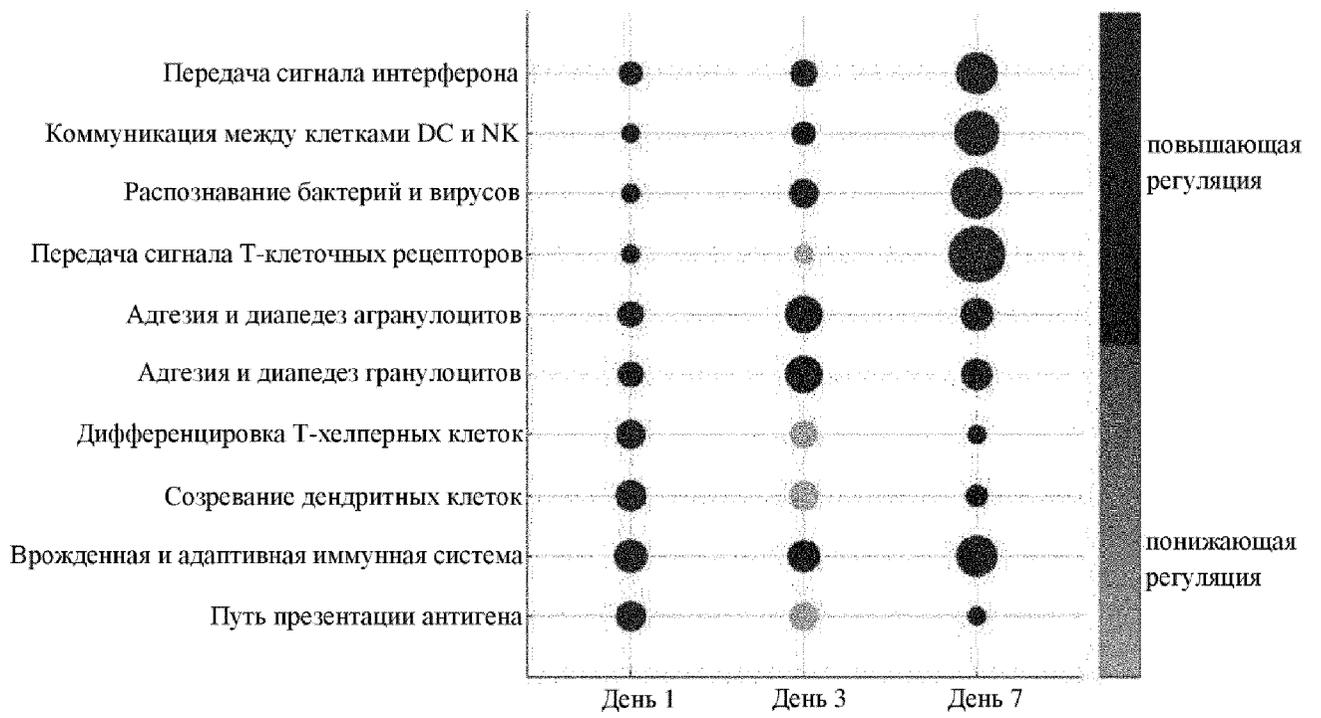
С

С, день 7 после облучения

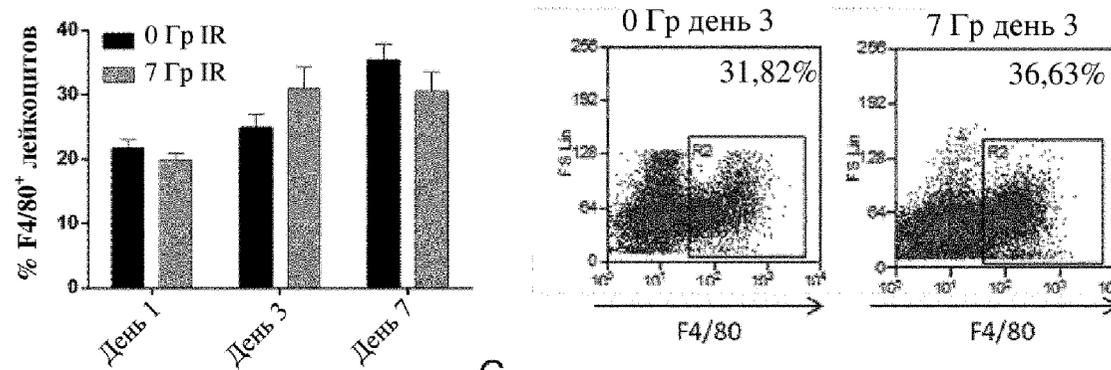


ФИГУРА 3 (продолжение)

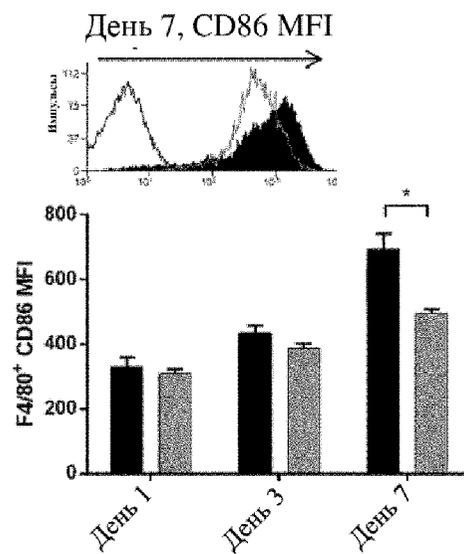
D



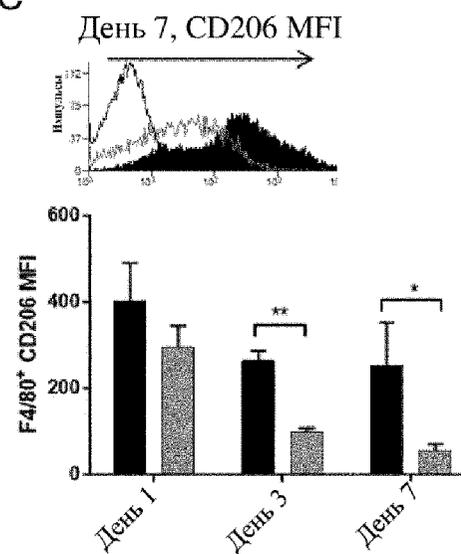
A



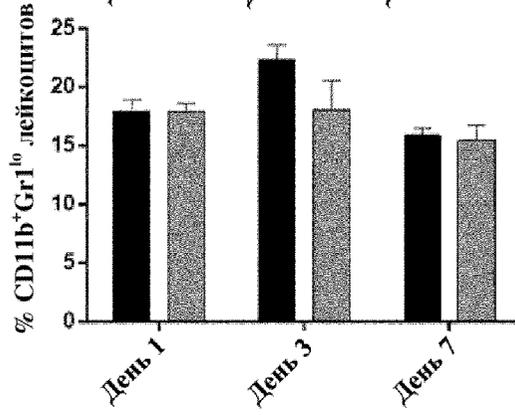
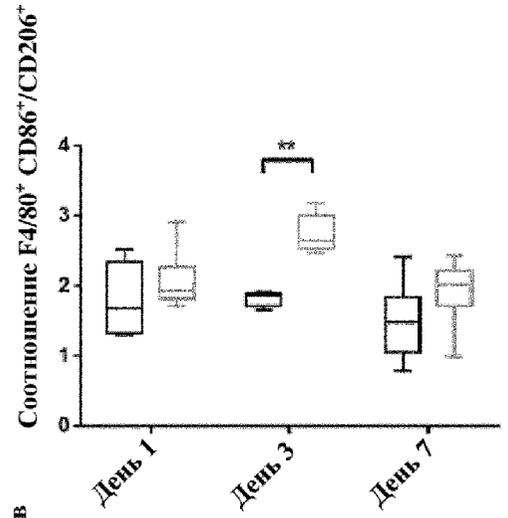
B



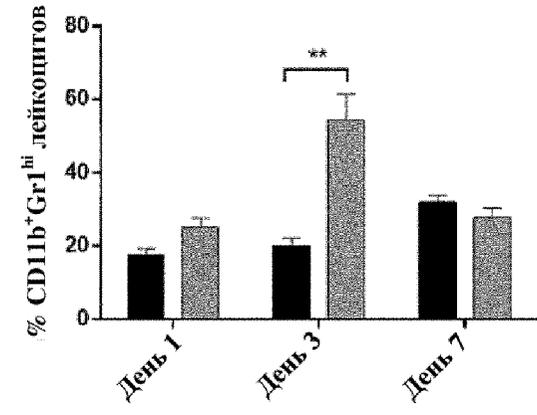
C



D

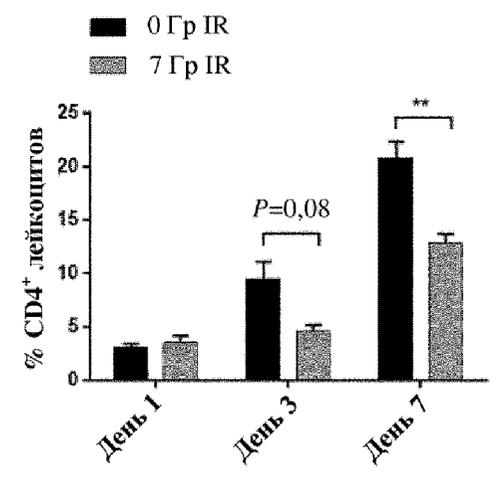


E

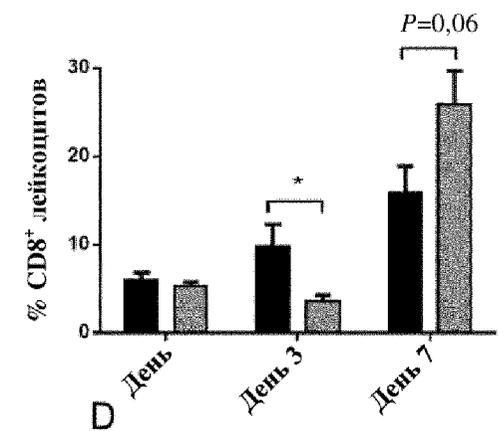


F

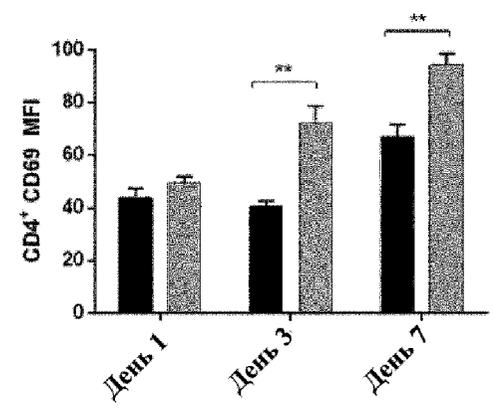
A



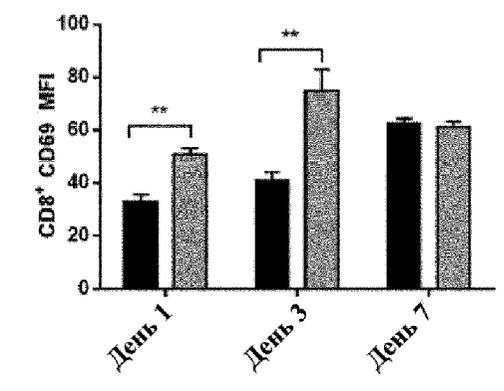
B

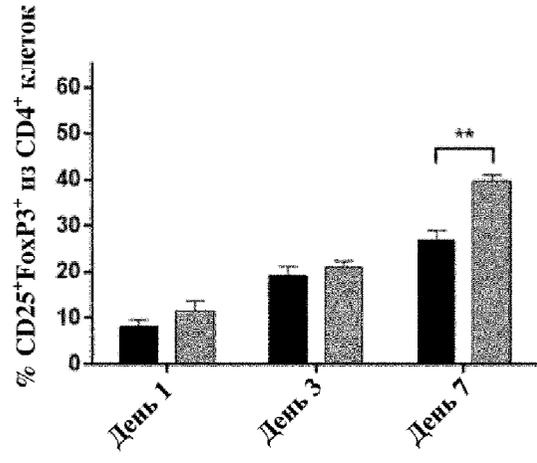


C

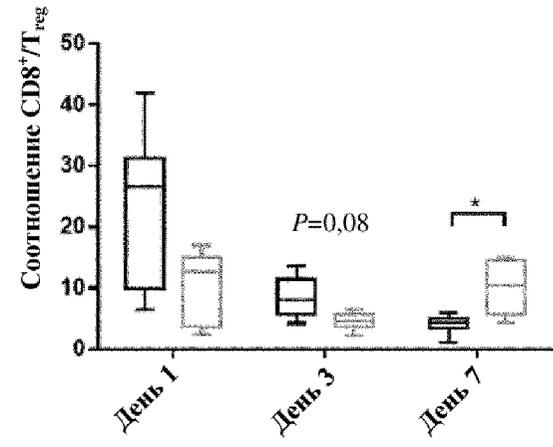


D





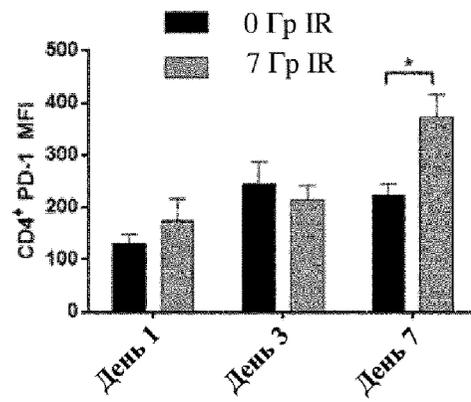
Е



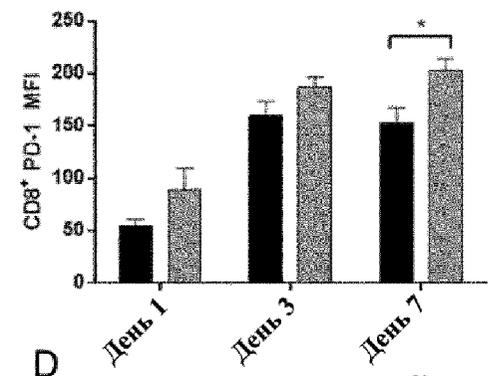
Ф

ФИГУРА 5 (продолжение)

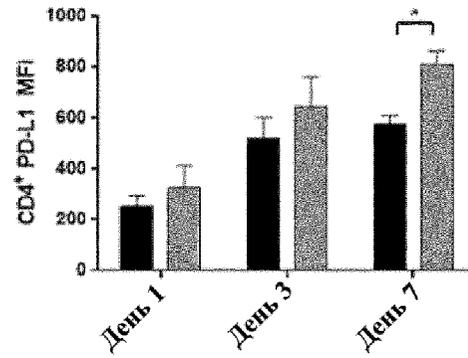
A



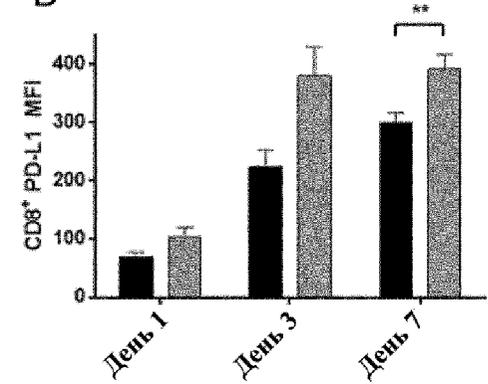
B

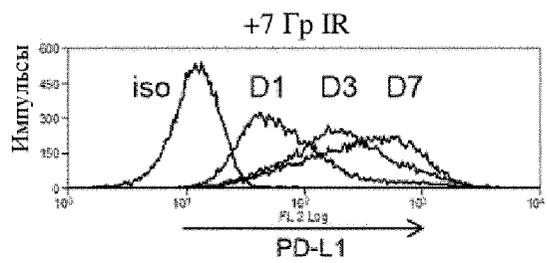
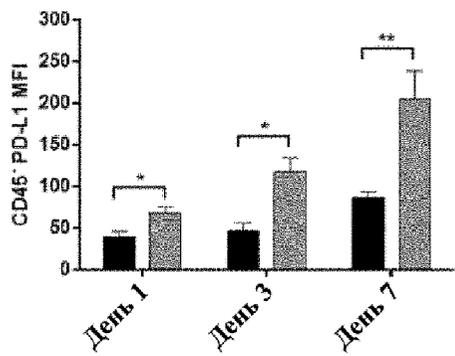


C



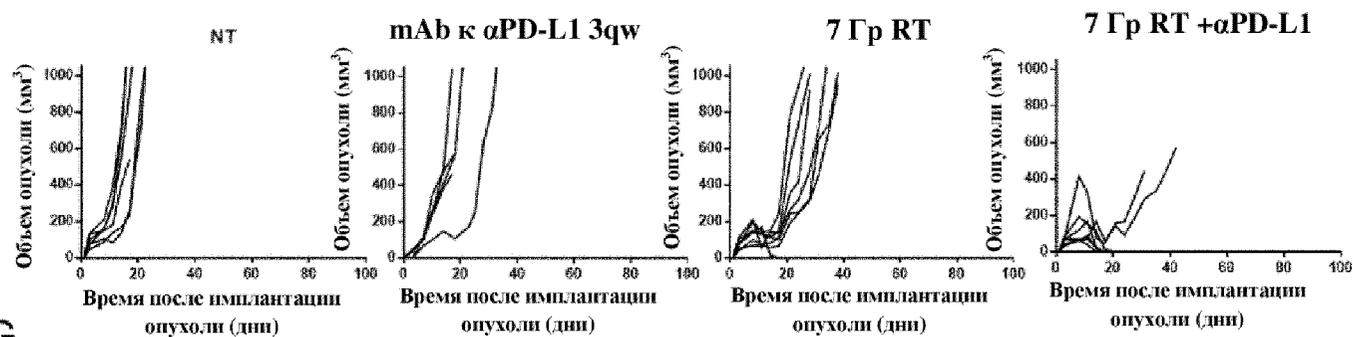
D



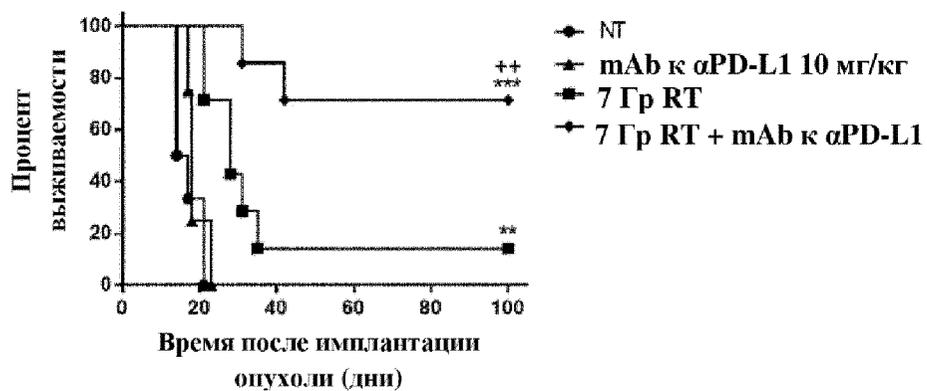


Г

Е



Г



| | День 1 | День 3 | День 7 |
|---|-----------|-----------|-----------|
| CD45 ⁺ (%) | 108,47 | 136,95 | 166,23 |
| CD4 ⁺ (%) | 112,37 | 47,94 | 61,63 |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (%) | 154,50 | 80,20 | 190,81 |
| CD8 ⁺ (%) | 86,67 | 37,23 | 308,21 |
| B220 ⁺ (%) | 72,44 | 92,90 | 141,28 |
| NKp46 ⁺ (%) | 142,00 | 107,94 | 112,48 |
| F 4/80 ⁺ (%) | 91,46 | 124,14 | 86,11 |
| CD11c ⁺ (%) | 91,59 | 107,32 | 94,46 |
| CD11c ⁺ MHC II ⁺ (%) | 114,72 | 93,93 | 145,23 |
| CD11b ⁺ Gr1 ⁺ (%) | 142,01 | 270,25 | 86,92 |

≤50% ≥200%

A

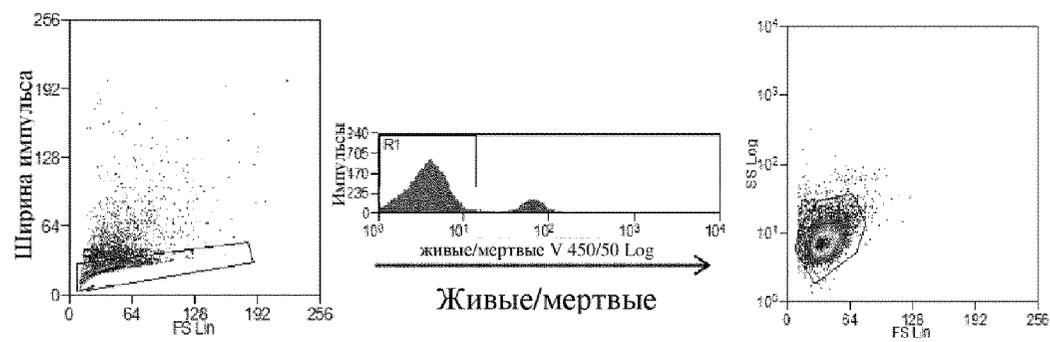
| | День 1 | День 3 | День 7 |
|---------------------|---------|---------|---------|
| CD4* CD69 (MFI) | 113,67 | 177,76 | 140,38 |
| CD8* CD69 (MFI) | 153,67 | 174,37 | 97,86 |
| F4/80* CD86 (MFI) | 93,71 | 89,08 | 71,18 |
| CD86 (% F4/80+) | 105,448 | 104,199 | 106,726 |
| F4/80* MHC II (MFI) | 103,67 | 61,58 | 75,47 |
| CD206 (% F4/80+) | 90,60 | 69,29 | 79,91 |
| F4/80* CD206 (MFI) | 73,62 | 37,74 | 22,05 |
| CD11c* MHC II (MFI) | 107,24 | 62,45 | 87,72 |
| CD45* CTLA4 (MFI) | 133,53 | 90,14 | 116,11 |
| CD4* CTLA4 (MFI) | 101,87 | 93,31 | 112,90 |
| CD8* CTLA (MFI) | 131,40 | 97,61 | 127,91 |
| CD45* PD-L1 (MFI) | 149,58 | 138,25 | 132,54 |
| CD4* PD-L1 (MFI) | 122,64 | 123,96 | 140,26 |
| CD8* PD-L1 (MFI) | 150,78 | 169,12 | 130,72 |
| CD45* PD-1 (MFI) | 140,20 | 96,34 | 151,68 |
| CD4* PD-1 (MFI) | 133,67 | 77,87 | 168,31 |
| CD8 PD-1 (MFI) | 160,46 | 116,83 | 132,66 |

≤50% ≥200%

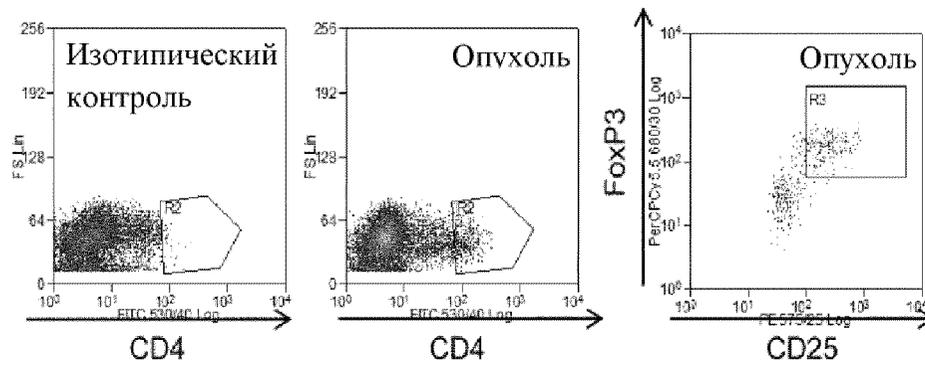
B

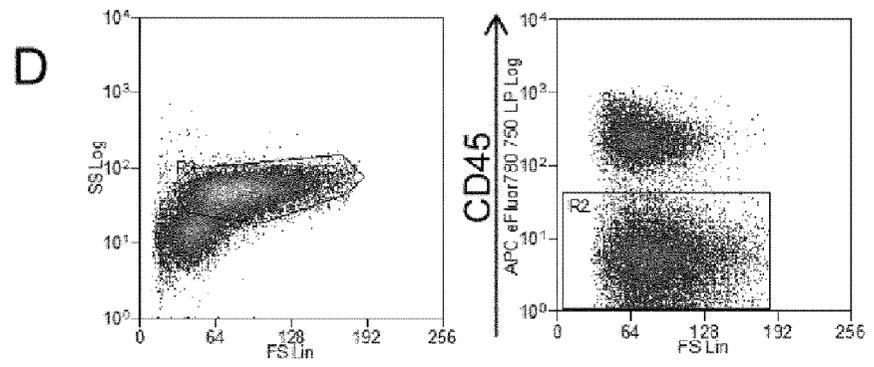
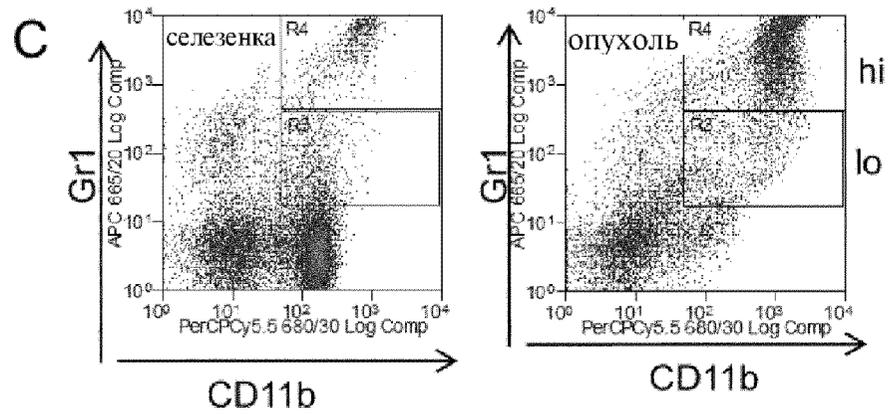
ФИГУРА 7

A

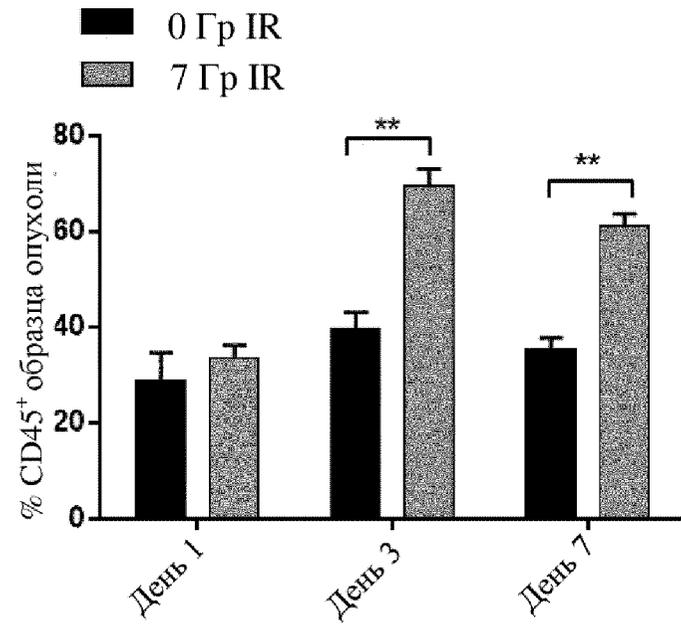


B





ФИГУРА 8 (продолжение)



ФИГУРА 9

ФИГУРА 10

