(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293270 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.26

(22) Дата подачи заявки
2021.05.12

(51) Int. Cl. ***A61K 38/08*** (2019.01)
A61P 29/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

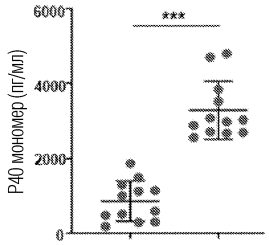
(31) **62/704,475**
(32) **2020.05.12**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/031917**
(87) **WO 2021/231528 2021.11.18**

(71) Заявитель:
РАШ ЮНИВЕРСИТИ МЕДИКАЛ СЕНТР (US)

(72) Изобретатель:
Пейхен Калипада (US)

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

(57) В изобретении описаны способы лечения тройного негативного рака молочной железы (TNBC) с использованием антител против мономеров p40. В некоторых аспектах способы лечения TNBC включают введение антител против мономеров p40 или введение антител против мономеров p40 в комбинации со связывающими пептидами, такими как пептид взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM) или пептид связывающего NEMO домена (NBD). В данном документе описаны способы лечения других видов рака с использованием антител против мономеров p40 в комбинации со связывающими пептидами, такими как пептид TIDM или пептид NBD.



202293270 A1

202293270 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 576578EA/042

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/704475, поданной 12 мая 2020 года, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

[0002] В настоящей заявке содержится Перечень последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в данный документ посредством ссылки. Копия ASCII, созданная 11 мая 2021 года, называется 42960-338899_Sequence_listing_ST25.txt и имеет размер 7 килобайт.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

1. Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0003] Данное раскрытие в целом относится к способам лечения рака. В одном аспекте представлен способ лечения тройного негативного рака молочной железы, включающий введение нуждающемуся в таком лечении субъекту антител против мономеров p40. В другом аспекте представлены композиции и способы лечения рака, включающие введение нуждающемуся в таком лечении субъекту антител против мономеров p40 и пептидов связывающего домена.

2. Описание Предшествующего уровня техники настоящего изобретения

[0004] Хотя для других видов рака молочной железы доступны некоторые виды лечения, имеется очень немного возможностей для тройного негативного рака молочной железы (TNBC), агрессивной формы рака молочной железы, которая является отрицательной для рецептора эстрогена, рецептора прогестерона и HER2. виды лечения, используемые для других видов рака молочной железы, оказались не эффективны для TNBC. Приблизительно у 30%-40% пациентов с TNBC будет рецидив заболевания в течение 3-10 лет после лечения при неоадъювантной терапии и хирургическом вмешательстве. Большинство пациентов с рецидивирующим заболеванием TNBC умирают рака молочной железы. Вследствие этого, решающее значение имеет выявление терапевтических достижений, специфичных для TNBC.

Сущность настоящего изобретения

[0005] В данном документе описаны способы лечения тройного негативного рака молочной железы (TNBC) с использованием антител против мономеров p40. В некоторых аспектах способы лечения TNBC включают введение антител против мономеров p40 или введение антител против мономеров p40 в комбинации со связывающими пептидами, такими как пептид взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM) или пептид связывающего NEMO домена (NBD). В данном документе описаны способы лечения других видов рака с использованием антител против мономеров p40 в комбинации со связывающими пептидами, такими как пептид TIDM или пептид NBD.

[0006] Другие преимущества и признаки будут понятны из следующего подробного описания при чтении в сочетании с приложенными чертежами.

Краткое описание чертежей

[0007] Фиг. 1A-1D. Уровни цитокинов из семейства IL-12 в сыворотке пациентов с раком молочной железы. Сыворотку не получавших лекарственного средства пациентов с раком молочной железы (n=12) и здоровых людей того же возраста (n=12), полученную от Discovery Life Sciences (Los Osos, CA), анализировали на p40 (1A), $p40_2$ (1B), IL-12 (1C) и IL-23 (1D) с помощью сэндвич-ELISA. *p<0,05; ***p<0,001.

[0008] Фиг. 2A-2F. Опосредованная моноклональными антителами нейтрализация p40 индуцирует гибель различных клеток TNBC человека. Уровни p40 и $p40_2$ измеряли в супернатантах клеток TNBC человека (2A, BT-549; 2B, HCC70) с помощью ELISA. Результаты представлены как среднее значение ± SD трех разных экспериментов. *p<0,05; **p<0,01. Клетки BT-549 (2C & 2E) и HCC70 (2D & 2F) обрабатывали p40 mAb в течение 24 часов в бессывороточных условиях с последующим мониторингом метаболизма MTT (2C-2D) и высвобождения LDH (2E-2F). Результаты представлены как среднее значение ± SD трех отдельных экспериментов. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

[0009] Фиг. 3A-3D. Регрессия опухоли TNBC in vivo у мышей с полученным у пациента ксенотрансплантатом (PDX) с помощью p40 mAb. 3A) Самкам гамма-мышей NOD scid (NSG) в возрасте 6-8 недель прививали в бок фрагменты опухоли TNBC при пассаже P1-P9 (инвазивная протоковая карцинома; TNBC ER-/-/PR-/-/HER2-/-). Через 6 недель после прививки уровни p40 и $p40_2$ измеряли в сыворотке с помощью сэндвич-ELISA. Результаты представлены как среднее значение+SEM четырех мышей (n=4) в группе. **p<0,01. 3B) Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX (n=5 в группе) имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb (правая панель) и IgG хомяка (среднняя панель) в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 2 недели опухоли метили красителем 2DG, конъюгированным с Alexa800, посредством инъекции в хвостовую вену, а затем визуализировали в системе формирования изображений в инфракрасных лучах Licor Odyssey. Результаты сравнивали с контрольной группой (левая панель). 3C) Опухоли вырезали из бока мышей во всех группах. В каждую группу входило пять мышей (n=5). 3D) Размер опухоли отслеживали через день. Результаты представлены как среднее значение ± SEM пяти разных мышей.

[0010] Фиг. 4A-4H. Стимуляция смертельной реакции в опухоли TNBC мышей PDX с помощью p40 mAb. Самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель прививали в бок опухоль TNBC. Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX (n=5 в группе) имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 2 недели после лечения проводили окрашивание H&E (4A) опухолевых срезов. Опухоль ткани анализировали на экспрессию различных связанных с гибелью генов с помощью специально созданной панели мРНК (4B), затем строили график с помощью программного обеспечения для исследования тепловых карт. 4C) анализы мРНК в реальном времени 11 различных связанных с гибелью

генов. Результаты представлены как среднее значение ± SEM пяти мышей. ***p<0,001. Срезы опухолевой ткани дважды метили на актин и методом TUNEL (4D) с последующим подсчетом TUNEL-положительных клеток в двух срезах каждой из пяти мышей в группе (4E). Суспензии отдельных клеток, выделенных из тканей опухоли, исследовали с помощью двойной FACS на йодид пропидия (PI) и аннексин V (4F) в анализаторе LSRFortessa (BD Biosciences) с последующим анализом с использованием программного обеспечения FlowJo (v10). Количественное определение апоптозных (PI-аннексин V+ ранние апоптозные+PI+аннексин V+ поздние апоптозные; 4G) и некротических (аннексин V-PI+; 4H) клеток. Результаты представлены как среднее значение+SEM трех мышей PDX в группе. **p<0,01; ***p<0,001.

[0011] Фиг. 5A-5H. Стимуляция адаптивного иммунного ответа в селезенке мышей PDX с помощью лечения p40 mAb. Самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель прививали в бок опухоль TNBC. Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 2 недели после лечения брали селезенки, и отслеживали уровни Т-клеток CD4+CD8+ (5A), CD4+IFNγ+ (5B) и CD8+IFNγ+ (5C) в спленоцитах с помощью FACS с использованием анализатора клеток BD LSRFortessa™. Подсчитывали процентное содержание Т-клеток CD4+CD8+ (5D), CD4+IFNγ+ (5E) и CD8+IFNγ+ (5F). Результаты представлены как среднее значение+SEM пяти мышей (n=5) в группе (один анализ на мышь). Измеряли уровни IFNγ (5G) и IL-10 (5H) в сыворотке всех групп (n=5) мышей с помощью сэндвич-ELISA. *p<0,05; ***p<0,001.

[0012] Фиг. 6A-6H. Нейтрализация p40 с помощью p40 mAb стимулирует адаптивный иммунный ответ в опухоли TNBC мышей PDX. Самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель прививали в бок опухоль TNBC. Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 2 недели после лечения брали ткани опухоли, и отслеживали уровни Т-клеток CD4+CD8+ (6A), CD4+IFNγ+ (6B) и CD8+IFNγ+ (6C) в суспензиях отдельных клеток с помощью FACS с использованием анализатора клеток BD LSRFortessa™. Подсчитывали процентное содержание Т-клеток CD4+CD8+ (6D), CD4+IFNγ+ (6E) и CD8+IFNγ+ (6F). Результаты представлены как среднее значение+SEM пяти мышей (n=5) в группе (один анализ на мышь). Измеряли уровни IFNγ (6G) и IL-10 (6H) в гомогенатах TNBC всех групп (n=5) мышей с помощью сэндвич-ELISA. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

[0013] Фиг. 7A-7C. Нейтрализация p40 с помощью p40 mAb индуцирует инфильтрацию CD8+IFNγ+ Т-клеток в опухоль TNBC мышей PDX. Самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель прививали в бок опухоль TNBC. Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 2 недели после лечения опухолевые срезы дважды метили на CD8 и IFNγ (7A) с последующим подсчетом клеток CD8+ (7B) и IFNγ+ (7C) в двух срезах каждой из пяти мышей в группе. ***p<0,001.

[0014] Фиг. 8A-8B. Нейтрализация p40 с помощью p40 mAb снижает количество ассоциированных с опухолью M2 (TAM2) макрофагов, в то же время повышая количество макрофагов TAM1 в опухоли TNBC мышей PDX. Самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель прививали в бок опухоль TNBC. Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 2 недели после лечения поперечные срезы опухоли дважды иммунометили либо на Iba1 & iNOS, либо на Iba1 & Arg1. Для окрашивания ядер использовали DAPI. Клетки, положительные на Iba1 & iNOS (A) и Iba1 & Arg1 (B), подсчитывали в одном срезе (2-3 изображения на срез) каждой из пяти разных мышей в группе. ***$p<0,001$.

[0015] Фиг. 9A-9B. Нейтрализация p40 с помощью p40 mAb подавляет передачу сигналов PD-1/PD-L1 в опухоли TNBC мышей PDX. Самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель прививали в бок опухоль TNBC. Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 2 недели после лечения поперечные срезы опухоли иммуноокрашивали либо на PD-1, либо на PD-L1. Для окрашивания ядер использовали DAPI. Клетки, положительные на PD-1 (A) и PD-L1 (B), подсчитывали в одном срезе (2-3 изображения на срез) каждой из пяти разных мышей в группе. ***$p<0,001$.

[0016] Фиг. 10A-10B. Нейтрализация p40 с помощью p40 mAb является нетоксичной для мышей PDX. Самкам мышей NSG в возрасте 6-8 недель прививали в бок опухоль TNBC. Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 2 недели после лечения уровень LDH (10A) и ALT (10B) анализировали в сыворотке с использованием наборов для анализа (Sigma). Результаты представлены как среднее значение+SEM пяти мышей в группе. ***$p<0,001$.

[0017] Фиг. 11. уровень мономера p40 выше гомодимера p40 в клетках тройного негативного рака молочной железы (TNBC) человека. Клетки TNBC человека (BT549 и HCC-70) приобретали у ATCC, а уровни мономера и гомодимера p40 измеряли в супернатантах с помощью сэндвич-ELISA. Результаты представлены как среднее значение+S.D. трех отдельных экспериментов.

[0018] Фиг. 12A-12B. Лечение p40 mAb не изменяет иммунный ответ Т-хелпера 17 (Th17) в мышиной модели TNBC. 12A) мышей с TNBC (модель PDX ID# TM00096) получали в Jackson Lab. Через 5 недель после прививки опухоли, когда опухоли имели размер примерно 0,5 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Через 3 недели после лечения брали селезенки, и уровни Th17 или CD4+IL-17+ Т-клеток (12A) отслеживали в спленоцитах с помощью FACS с использованием анализатора клеток BD LSRFortessa™. 12B) Подсчитывали процентное содержание CD4+IL-17+ Т-клеток. Результаты представлены как среднее значение+SEM трех мышей (n=3) в группе (один анализ на мышь). NS, незначимый.

[0019] Фиг. 13A-13C. Нейтрализация мономера p40 с помощью mAb a3-7g индуцирует гибель различных раковых клеток человека. Клетки LnCAP (13A), Hep3B (13B) и HCC70 (13C) при слиянии 70-80% обрабатывали нейтрализующими mAb a3-7g против p40 в течение 48 часов в бессывороточных условиях с последующим мониторингом жизнеспособности клеток с помощью анализа MTT. Результаты представлены как среднее значение+S.D. трех отдельных экспериментов. **p<0,01 & ***p<0,001 по сравнению с контролем.

[0020] Фиг. 14. Пептид связывающего NEMO домена (NBD), селективный ингибитор классической активации NF-kB. (SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9)

[0021] Фиг. 15A-15C. пептид NBD дикого типа (wtNBD), но не мутантного NBD (mNBD), усиливает эффективность mAb a3-3a при уничтожении различных раковых клеток. Клетки MCF-7 (15A), Hep3B (15B) и BT-549 (15C), высеваемые при слиянии 70-80%, обрабатывали нейтрализующими mAb a3-3a против p40 в присутствии или в отсутствие пептида wtNBD и mNBD в течение 48 часов в бессывороточных условиях с последующим мониторингом жизнеспособности клеток с помощью MTT. Результаты представлены как среднее значение+S.D. трех отдельных экспериментов. *p<0,05, **p<0,01 & ***p<0,001 по сравнению с контролем.

[0022] Фиг. 16A-16B. Внутриносовое введение пептида домена (NBD) дикого типа, связывающего существенный модификатор NF-κB (NEMO), приводит к большей регрессии опухоли у получавших p40 mAb мышей с TNBC. Мышей с TNBC (модель PDX ID# TM00096) получали в Jackson Lab. В этой модели самкам гамма-мышей NOD Scid (NSG) прививали в бок опухоль TNBC (инвазивная протоковая карцинома). Через 5 недель, когда опухоли имели размер примерно 0,5 $см^2$, мышей лечили p40 mAb (a3-3a) в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю в присутствии или в отсутствие ежедневного внутриносового лечения пептидами wtNBD и mNBD (0,1 мг/кг массы тела/д). 16A) Через 3 недели опухоли метили красителем 2DG, конъюгированным с Alexa800, посредством инъекции в хвостовую вену, а затем визуализировали в системе формирования изображений в инфракрасных лучах Licor Odyssey. 16B) Размер опухоли отслеживали через три недели. Результаты представлены как среднее значение+SD пяти разных мышей в группе.

[0023] Фиг. 17. Пептид взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM), селективный ингибитор индуцированной активации TLR2

[0024] Фиг. 18A-18C. пептид TIDM дикого типа (wtTIDM), но не мутантного TIDM (mTIDM), усиливает эффективность mAb a3-3a при уничтожении различных раковых клеток. клетки MCF-7 (18A), Hep3B (18B) и BT-549 (18C), высеваемые при слиянии 70-80% обрабатывали нейтрализующими mAb a3-3a против p40 в присутствии или в отсутствие пептида wtTIDM и mTIDM в течение 48 часов в бессывороточных условиях с последующим мониторингом жизнеспособности клеток с помощью MTT. Результаты представлены как среднее значение+S.D. трех отдельных экспериментов. *p<0,05, **p<0,01 & ***p<0,001 по сравнению с контролем.

[0025] Фиг. 19A-19B. Внутриносовое введение пептида взаимодействующего с TLR2 домена дикого типа MyD88 (wtTIDM) приводит к большей регрессии опухоли у получавших p40 mAb мышей с TNBC. Мышей с TNBC (модель PDX ID# TM00096) получали в Jackson Lab. В этой модели самкам гамма-мышей NOD Scid (NSG) прививали в бок опухоль TNBC (инвазивная протоковая карцинома). Через 5 недель, когда опухоли имели размер примерно 0,5 $см^2$, мышей лечили p40 mAb (a3-3a) в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю в присутствии или в отсутствие ежедневного внутриносового лечения пептидами wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг массы тела/д). 19A) Через 3 недели опухоли метили красителем 2DG, конъюгированным с Alexa800, посредством инъекции в хвостовую вену, а затем визуализировали в системе формирования изображений в инфракрасных лучах Licor Odyssey. 19B) Размер опухоли отслеживали через три недели. Результаты представлены как среднее значение+SD пяти разных мышей в группе.

[0026] Фиг. 20A-20B. Селективное ингибирование TLR2 пептидом wtTIDM (взаимодействующего с TLR2 домена MyD88) и селективное ингибирование активации NF-kB пептидом wtNBD (связывающего NEMO домена) дополнительно стимулируют T-цитотоксичный 1 (Tc1) иммунный ответ у получавших p40 mAb мышей с TNBC. A) мышей с TNBC (модель PDX ID# TM00096) получали в Jackson Lab. Через 5 недель после прививки опухоли, когда опухоли имели размер примерно 0,5 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. В отдельных группах мыши, получавшие p40 mAb, также интраназально получали пептиды wtTIDM () и wtNBD (). Через 3 недели после лечения брали селезенки, и отслеживали уровни T-клеток Tc1 или CD8+IFNγ+ (20A) в спленоцитах с помощью FACS с использованием анализатора клеток BD LSRFortessa™. 20B) Подсчитывали процентное содержание CD8+IFNγ+ T-клеток. Результаты представлены как среднее значение+SEM трех мышей (n=3) в группе (один анализ на мышь). $**p < 0,01$ vs p40 mAb.

[0027] Фиг. 21. Интраназальный пептид wtTIDM стимулирует опосредованную p40 mAb регрессию опухоли TNBC in vivo у мышей с полученным у пациента ксенотрансплантатом (PDX). Самкам гамма-мышей NOD scid (NSG) в возрасте 6-8 недель прививали в бок фрагменты опухоли TNBC при пассаже P1-P9 (инвазивная протоковая карцинома; TNBC ER-/-/PR-/-/HER2-/-). Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Мыши также ежедневно получали интраназальным путем пептид взаимодействующего с TLR2 домена дикого типа (wt) и мутантного (m) MyD88 (TIDM) в дозе 0,1 мг/кг массы тела. Через 2 недели опухоли метили красителем 2DG, конъюгированным с Alexa800, посредством инъекции в хвостовую вену, а затем визуализировали в системе формирования изображений в инфракрасных лучах Licor Odyssey.

[0028] Фиг. 22. Интраназальный пептид wtTIDM стимулирует опосредованную p40 mAb регрессию опухоли TNBC in vivo у мышей с полученным у пациента ксенотрансплантатом (PDX). Самкам гамма-мышей NOD scid (NSG) в возрасте 6-8 недель

прививали в бок фрагменты опухоли TNBC при пассаже P1-P9 (инвазивная протоковая карцинома; TNBC ER-/-/PR-/-/HER2-/-). Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Мыши также ежедневно получали интраназальным путем пептид взаимодействующего с TLR2 домена дикого типа (wt) и мутантного (m) MyD88 (TIDM) в дозе 0,1 мг/кг массы тела. Через 2 недели после лечения проводили окрашивание H&E опухолевых срезов. Результаты представляют анализ пяти разных мышей в группе.

[0029] Фиг. 23A-23B. Интраназальный пептид wtTIDM стимулирует опосредованную p40 mAb индукцию IFNγ при одновременном снижении уровня IL-10 в тканях опухоли TNBC мышей с ксенотрансплантатом (PDX), полученным от пациентов. Самкам гамма-мышей NOD scid (NSG) в возрасте 6-8 недель прививали в бок фрагменты опухоли TNBC при пассаже P1-P9 (инвазивная протоковая карцинома; TNBC ER-/-/PR-/-/HER2-/-). Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Мыши также ежедневно получали интраназальным путем пептид взаимодействующего с TLR2 домена дикого типа (wt) и мутантного (m) MyD88 (TIDM) в дозе 0,1 мг/кг массы тела. Через 2 недели после лечения измеряли уровни IFNγ человека (23A) и IL-10 человека (23B) в экстрактах ткани опухоли с помощью сэндвич-ELISA (Thermofisher). Результаты представлены как среднее значение+SEM 6-7 мышей в группе. ***$p< 0,001$.

[0030] Фиг. 24A-24B. Интраназальный пептид wtTIDM стимулирует опосредованную p40 mAb индукцию IFNγ при одновременном снижении уровня IL-10 в сыворотке в модели мышей с TNBC с ксенотрансплантатом (PDX), полученным от пациентов. Самкам гамма-мышей NOD scid (NSG) в возрасте 6-8 недель прививали в бок фрагменты опухоли TNBC при пассаже P1-P9 (инвазивная протоковая карцинома; TNBC ER-/-/PR-/-/HER2-/-). Примерно через 4 недели после прививки, когда опухоли мышей PDX имели размер 0,6-0,8 $см^2$, мышей лечили p40 mAb и IgG хомяка в дозе 2 мг/кг массы тела один раз в неделю. Мыши также ежедневно получали интраназальным путем пептид взаимодействующего с TLR2 домена дикого типа (wt) и мутантного (m) MyD88 (TIDM) в дозе 0,1 мг/кг массы тела. Через 2 недели после лечения измеряли уровни IFNγ человека (24A) и IL-10 человека (24B) в сыворотке с помощью сэндвич-ELISA (Thermofisher). Результаты представлены как среднее значение+SEM 6-7 мышей в группе. ***$p< 0,001$.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0031] семейство цитокинов IL-12 имеет четыре различных члена, включая мономер p40 (p40), гомодимер p40 ($p40_2$), IL-12 (p40:p35) и IL-23 (p40:p19) [4-9]. Недавно авторы установили, что p40 отличается от других членов семейство IL-12 избирательным ингибированием интернализации IL-12Rβ1 и подавлением аутоиммунной демиелинизации [5]. авторы также видели, что некоторые раковые клетки предотвращают свою гибель с помощью p40 и что селективное истощение p40 функциональными блокирующими mAb

приводит к регрессии опухоли предстательной железы у мышей [4]. В данном случае авторы продемонстрировали, что уровень p40 был значительно выше в сыворотке пациентов с раком молочной железы чем у здоровых людей того же возраста. Соответственно, клетки TNBC человека также продуцировали более высокие уровни p40, чем $p40_2$, а нейтрализация p40 с помощью p40 mAb индуцировала гибель клеток TNBC. Наконец, авторы установили, что лечение p40 mAb активировало цитотоксичные Т-клетки, стимулировало макрофаги M1 и подавляло ось PD-1/PD-L1, что приводило к подавлению роста опухоли TNBC в модели мышей PDX. Эти исследования выявили свойство p40 mAb против TNBC, которые могут быть полезными для пациентов с TNBC.

[0032] В данном документе описаны способы лечения тройного негативного рака молочной железы (TNBC) с использованием антител против мономеров p40. В некоторых вариантах осуществления используют антитела a3-3a и a3-7g против мономера p40. В некоторых аспектах способы лечения TNBC включают введение антител против мономеров p40 или введение антител против мономеров p40 в комбинации со связывающими пептидами, такими как пептид взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM) или пептид связывающего NEMO домена (NBD). В данном документе описаны способы лечения других видов рака (например, рака предстательной железы, рака молочной железы не типов TNBC, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника и других видов рака, которые сверхэкспрессируют мономер p40) с использованием антител против мономеров p40 в комбинации со связывающими пептидами, такими как пептид TIDM или пептид NBD.

[0033] В рамках настоящего изобретения термин «количество» относится к «эффективному количеству» или «терапевтически эффективному количеству» композиции, например, антител или пептидов, для достижения полезного или нужного профилактического или терапевтического результата, включая клинические результаты. «Терапевтически эффективное количество» композиции может различаться в зависимости от таких факторов как состояние заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, и способность антител или пептидов вызывать у индивидуума нужный ответ. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором терапевтически полезные эффекты перевешивают любые токсичные или вредные эффекты вируса или трансдуцированных терапевтических клеток. Термин «терапевтически эффективное количество» включает количество, эффективное для «лечения» субъекта (например, пациента). Когда указано терапевтическое количество, точное количество вводимых композиций согласно настоящему раскрытию может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, размере опухоли, распространенности инфекции или метастазов и состояния пациента (субъекта).

[0034] «Антитело» относится к связывающему средству, которое представляет собой полипептид, содержащий вариабельную область легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, который специфически распознает и связывает эпитоп антигена-мишени, такой как пептид, липид, полисахарид или нуклеиновая кислота, содержащая

антигенную детерминанту, такау как те, которые распознаются иммунной клеткой. Термин «антитело» включает его антигенсвязывающие фрагменты. Термин также включает генетически модифицированные формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышиные антитела), гетероконъюгированные антитела (такие как биспецифические антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты. См. также Каталог и справочник Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997. Антитело или его иммунологически активный фрагмент может быть моноклональным антителом или иммунологически активным фрагментом моноклонального антитела. В других вариантах осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент представляет собой поликлональное, моноклональное, человеческое, гуманизированное и химерное антитело; одноцепочечное антитело или эпитоп-связывающий фрагмент такого антитела. В другом варианте осуществления антитело или его иммунологически активный фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его иммунологически активный фрагмент.

[0035] Вариабельные области легкой и тяжелой цепи содержат «каркасную» область, прерванную тремя гипервариабельными областями, также называемыми «определяющими комплементарность областями» или «CDR». CDR могут быть определены или идентифицированы обычными способами, такими как последовательность по Kabat et al. (Wu, TT and Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (см., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, включенные в данный документ посредством ссылки), или с помощью структуры по Chothia et al. (Choithia, C. and Lesk, AM., J Mal. Biol., 196(4): 901-917 (1987), Choithia, C. et al, Nature, 342: 877-883 (1989)).

[0036] Последовательности каркасных областей различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны в пределах вида, такого как человек. Каркасная область антитела, то есть комбинированные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, служит для позиционирования и выравнивания CDR в трехмерном пространстве. CDR в первую очередь ответственны за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно обозначаются как CDR1, CDR2 и CDR3, нумеруются последовательно, начиная с N-конца, и также обычно идентифицируются по цепи, в которой находится конкретная CDR. Таким образом, CDR, расположенные в вариабельном домене тяжелой цепи антитела, обозначаются как CDRH1, CDRH2 и CDRH3, тогда как CDR, расположенные в вариабельном домене легкой цепи антитела, обозначаются как CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Антитела с различной специфичностью (то есть с разными связывающими центрами для разных антигенов) имеют разные CDR. Хотя именно CDR различаются от антитела к антителу, только ограниченное число положений аминокислот в CDR непосредственно участвует в связывании антигена. Эти положения внутри CDR называются остатками, определяющими специфичность (SDR).

[0037] Ссылки на «VH» или «VH» относятся к вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая вариабельную область антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела, раскрытого в настоящем документе. Ссылки на «VL» или «VL» относятся к вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина, включая вариабельную область антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела, раскрытого в настоящем документе.

[0038] «Моноклональное антитело» представляет собой антитело, продуцируемое одним клоном В-лимфоцитов или клеткой, в которую были трансфицированы гены легкой и тяжелой цепей одного антитела. Моноклональные антитела получают способами, известными специалистам в данной области, например, путем получения гибридных антителообразующих клеток из слияния клеток миеломы с иммунными клетками селезенки. Моноклональные антитела включают гуманизированные моноклональные антитела.

[0039] «Химерное антитело» имеет каркасные остатки одного вида, такого как человек, и CDR (которые обычно обеспечивают связывание с антигеном) другого вида, такого как мышь. В некоторых вариантах осуществления CAR, рассматриваемый в настоящем документе, содержит антигенспецифический связывающий домен, который представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0040] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело (такое как гуманизированное моноклональное антитело), которое специфически связывается с поверхностным белком на опухолевой клетке. «Гуманизированное» антитело представляет собой иммуноглобулин, содержащий каркасную область человека и одну или несколько CDR нечеловеческого (например, мышиного, крысиного или синтетического) иммуноглобулина. Гуманизированные антитела могут быть сконструированы с помощью генной инженерии (см., например, патент США № 5585089).

[0041] В рамках настоящего изобретения «верблюжий lg» или «верблюжий VHH» относится к наименьшей известной антигенсвязывающей единице тяжелой цепи антитела (Koch-Nolte, et al., FASEB J, 21: 3490-3498 (2007)). Термин «антитело с тяжелой цепью» или «верблюжье антитело» относится к антителу, которое содержит два домена VH и не содержит легких цепей (Riechmann L. et al., J Immunol. Methods 231:25-38 (1999); WO 94/04678; WO 94/25591; патент США № 6005079).

[0042] «IgNAR» в «иммуноглобулиновом рецепторе нового антигена» относится к классу антител из иммунного спектра акул, которые состоят из гомодимеров одного вариабельного домена рецептора нового антигена (VNAR) и пяти доменов константного рецептора нового антигена (CNAR).

[0043] Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых Fab-фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный Fc-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент содержит вариабельные домены

тяжелой и легкой цепи, а также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбокси-конце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой обозначение в данном документе для Fab', в котором цистеиновый остаток (остатки) константных доменов несет свободную тиольную группу. Фрагменты антитела F(ab')2 первоначально были получены в виде пар фрагментов Fab', между которыми имеются шарнирные цистеины. Также известны другие химические соединения фрагментов антител.

[0044] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенсвязывающий сайт. В одноцепочечных видах Fv (scFv) один вариабельный домен тяжелой цепи и один вариабельный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером, так что легкая и тяжелая цепи могут связываться в «димерную» структуру, аналогичную структуре в двухцепочечных видах Fv.

[0045] Термин «диатела» относится к фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL). При использовании линкера, слишком короткого, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами в одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Диатела более полно описаны, например, в EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); and Hollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003).

[0046] «Однодоменное антитело» или «sdAb», или «наноантитело» относится к фрагменту антитела, состоящему из вариабельной области тяжелой цепи антитела (домен VH) или вариабельной области легкой цепи антитела (домен VL) (Holt, L., et al., Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490).

[0047] «Одноцепочечные Fv» или «scFv» фрагменты антител содержат домены VH и VL антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать нужную структуру для связывания антигена. Обзор scFv см., например, в Pluckthin, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[0048] В рамках настоящего изобретения термин «лечение» включает любое благоприятное или желательное влияние на симптомы или патологию заболевания или патологического состояния и может включать даже минимальное снижение одного или нескольких измеримых маркеров заболевания или состояния, подвергаемого лечению,

например рака. Лечение может необязательно включать либо уменьшение или ослабление симптомов заболевания или состояния, либо замедление прогрессирования заболевания или состояния. «Лечение» не обязательно означает полную ликвидацию или излечение заболевания или состояния или связанных с ним симптомов.

[0049] Готовые формы терапевтических средств можно приготовить путем смешивания с физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными средствами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов, лосьонов или суспензий (см., например, Hardman et al., (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.).

[0050] Выбор схемы введения терапевтического средства зависит от нескольких факторов, включая скорость обмена веществ в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность вещества и доступность клеток-мишеней в биологической матрице. В некоторых вариантах осуществления схема введения максимизирует количество терапевтического средства, доставляемого пациенту, в соответствии с приемлемым уровнем побочных эффектов. Соответственно, количество доставляемого биологического препарата частично зависит от конкретного вещества и тяжести состояния, подлежащего лечению. Имеются рекомендации по выбору соответствующих доз антител, цитокинов и малых молекул (см., например, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert et al, (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom et al, (1999) New Engl. J. Med. 341 : 1966-1973; Slamon et al, (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz et al, (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh et al, (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky et al, (2000) New Engl. J. Med. 343: 1594-1602).

[0051] Подходящую дозу определяет клиницист, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области, влияющих на лечение или предположительно влияющих на лечение. Как правило, доза начинается с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и затем ее увеличивают небольшими приращениями до тех пор, пока не будет достигнут нужный или оптимальный эффект по сравнению с любыми негативными побочными эффектами. Важные диагностические меры включают симптомы, например, воспаление или уровень продуцируемых воспалительных цитокинов.

[0052] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических

композициях, используемых в настоящем документе, можно варьировать для получения количества активного ингредиента, эффективного для достижения нужного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для больного. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций или их сложного эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующая история болезни пациента, проходящего лечение, и аналогичные факторы, известные в медицинской области. Композиции, содержащие связывающие средства, такие как антитела или их фрагменты, можно вводить путем непрерывного вливания или в виде доз с интервалами, например, один день, одна неделя или 1-7 раз в неделю. Дозы можно вводить внутривенно, подкожно, местно, перорально, назально, ректально, внутримышечно, в мозг или путем ингаляции. Конкретный протокол дозирования включает в себя максимальную дозу или частоту приема, которые позволяют избежать значительных нежелательных побочных эффектов. Общая недельная доза может составлять по меньшей мере 0,05 мкг/кг массы тела, по меньшей мере 0,2 мкг/кг, по меньшей мере 0,5 мкг/кг, по меньшей мере 1 мкг/кг, по меньшей мере 10 мкг/кг, по меньшей мере 100 мкг/кг, по меньшей мере 0,2 мг/кг, по меньшей мере 1,0 мг/кг, по меньшей мере 2,0 мг/кг, по меньшей мере 10 мг/кг, по меньшей мере 25 мг/кг, по меньшей мере 30 мг/кг, по меньшей мере 40 мг/кг или по меньшей мере по меньшей мере 50 мг/кг (см., например, Yang et al, (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold et al, (2002) New Engl. J. Med. 346: 1692-1698; Liu et al. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 133-144). Нужная доза антител или их фрагментов примерно такая же, как для антитела или полипептида, в расчете на моль/кг массы тела. Нужная концентрация антител или их фрагментов в плазме примерно такая же в расчете на моль/кг массы тела. Доза может составлять по меньшей мере 15 мкг, по меньшей мере 20 мкг, по меньшей мере 25 мкг, по меньшей мере 30 мкг, по меньшей мере 35 мкг, по меньшей мере 40 мкг, по меньшей мере 45 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 55 мкг, по меньшей мере 60 мкг, по меньшей мере 65 мкг, по меньшей мере 70 мкг, по меньшей мере 75 мкг, по меньшей мере 80 мкг, по меньшей мере 85 мкг, по меньшей мере 90 мкг, по меньшей мере 95 мкг или по меньшей мере 100 мкг. Дозы, вводимые субъекту, могут составлять по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 или более. В рамках настоящего изобретения для антител или их фрагментов доза, вводимая пациенту, может составлять от 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента. Дозировка может быть между 0,0001 мг/кг и 20 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 10 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 5 мг/кг, 0,0001 и 2 мг/кг, 0,0001 и 1 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,75 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,5 мг/кг, 0,0001 мг/кг до 0,25 мг/кг, 0,0001 до 0,15 мг/кг, 0,0001 до 0,10 мг/кг, 0,001 до 0,5 мг/кг, от 0,01 до 0,25 мг/кг или от 0,01 до 0,10 мг/кг массы тела больного.

[0053] В рамках настоящего изобретения дозировка антител или их фрагментов может быть рассчитана с использованием веса пациента в килограммах (кг), умноженного на вводимую дозу в мг/кг. Дозировка антител или их фрагментов согласно изобретению может составлять 150 мкг/кг или менее, 125 мкг/кг или менее, 100 мкг/кг или менее, 95 мкг/кг или менее, 90 мкг/кг или менее, 85 мкг /кг или менее, 80 мкг/кг или менее, 75 мкг/кг или менее, 70 мкг/кг или менее, 65 мкг/кг или менее, 60 мкг/кг или менее, 55 мкг/кг или менее, 50 мкг/кг или менее, 45 мкг/кг или менее, 40 мкг/кг или менее, 35 мкг/кг или менее, 30 мкг/кг или менее, 25 мкг/кг или менее, 20 мкг/кг или менее, 15 мкг/кг или менее, 10 мкг/кг или менее, 5 мкг/кг или менее, 2,5 мкг/кг или менее, 2 мкг/кг или менее, 1,5 мкг/кг или менее, 1 мкг/кг или менее, 0,5 мкг/кг или менее или 0,5 мкг/кг или менее массы тела пациента.

[0054] В рамках настоящего изобретения стандартная доза антител или их фрагментов может составлять от 0,1 мг до 20 мг, от 0,1 мг до 15 мг, от 0,1 мг до 12 мг, от 0,1 мг до 10 мг, от 0,1 мг до 8 мг, от 0,1 мг до 7 мг, от 0,1 мг до 5 мг, от 0,1 мг до 2,5 мг, от 0,25 мг до 60 мг, от 0,25 мг до 40 мг, от 0,25 мг до 20 мг, от 0,25 мг до 15 мг, от 0,25 мг до 12 мг, от 0,25 мг до 10 мг, от 0,25 мг до 8 мг, от 0,25 мг до 7 мг, от 0,25 мг до 5 мг, от 0,5 мг до 2,5 мг, от 1 мг до 20 мг, от 1 мг до 15 мг, от 1 мг до 12 мг, от 1 мг до 10 мг, от 1 мг до 8 мг, от 1 мг до 7 мг, от 1 мг до 5 мг или от 1 мг до 2,5 мг.

[0055] В рамках настоящего изобретения доза антител или их фрагментов может достигать титра в сыворотке по меньшей мере 0,1 мкг/мл, по меньшей мере 0,5 мкг/мл, по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 2 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 6 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 25 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 125 мкг/мл, по меньшей мере 150 мкг/мл, по меньшей мере 175 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 225 мкг/мл, по меньшей мере 250 мкг/мл, по меньшей мере 275 мкг /мл, по меньшей мере 300 мкг/мл, по меньшей мере 325 мкг/мл, по меньшей мере 350 мкг/мл, по меньшей мере 375 мкг/мл или по меньшей мере 400 мкг/мл у субъекта. В рамках настоящего изобретения доза антител или их фрагментов может достигать у субъекта титра в сыворотке по меньшей мере 0,1 мкг/мл, по меньшей мере 0,5 мкг/мл, по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере, 2 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 6 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 25 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 125 мкг/мл, по меньшей мере 150 мкг/мл, по меньшей мере 175 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 225 мкг/мл, по меньшей мере 250 мкг/мл, по меньшей мере 275 мкг /мл, по меньшей мере 300 мкг/мл, по меньшей мере 325 мкг/мл, по меньшей мере 350 мкг/мл, по меньшей мере 375 мкг/мл или по меньшей мере 400 мкг/мл.

[0056] В рамках настоящего изобретения дозы антител или их фрагментов можно повторять, и введения могут быть разделены по меньшей мере 1 днем, 2 днями, 3 днями, 5 днями, 7 днями, 10 днями, 15 днями, 30 днями, 45 днями, 2 месяцами, 75 днями, 3

месяцами или по меньшей мере 6 месяцами.

[0057] Эффективное количество для конкретного пациента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, которое лечат, общее состояние здоровья пациента, способ введения и доза, а также тяжесть побочных эффектов (см., например, Maynard et al., (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch PubL, London, UK).

[0058] Путь введения может быть, например, местным или кожным, инъекцией или вливанием внутривенно, внутрибрюшинно, внутримозгово, внутримышечно, внутриглазно, внутриартериально, внутримозгово-спинномозгово, внутрь очага поражения или с помощью систем с замедленным высвобождением или имплантата (см., например, Sidman et al. al., (1983) Biopolymers 22:547-556, Langer et al., (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277, Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105, Epstein et al., (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688-3692, Hwang et al., (1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030-4034, патент США № 6350466 и 6316024). При необходимости композиция может также содержать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Кроме того, также можно использовать легочное введение, например, с помощью ингалятора или распылителя, а также препаративную форму с аэрозольным средством. См., например, патенты США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации PCT № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0059] Композицию мономерного антитела против p40 или его иммунологически активного фрагмента, описанную в настоящем документе, также можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области. Как будет понятно специалистам в данной области, путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от нужных результатов. Выбранные способы введения антител или их фрагментов согласно изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Парентеральное введение может представлять собой способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию. Альтернативно, композицию согласно изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. В одном

варианте осуществления антитела или их фрагменты согласно изобретению вводят путем инфузии. В другом варианте осуществления мультиспецифический связывающий эпитоп белок согласно изобретению вводят подкожно. Если антитела или их фрагменты согласно изобретению вводят в системе с контролируемым или замедленным высвобождением, можно использовать насос для достижения контролируемого или замедленного высвобождения (см. Langer, выше; Sefton, (1987) CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., (1980), Surgery 88:507; Saudek et al., (1989) N.Engl. J.Med.321:574). Полимерные материалы можно использовать для достижения контролируемого или замедленного высвобождения лекарственных средств согласно изобретению (см., например, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, FL (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984), Ranger and Peppas, (1983) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; см. также Levy et al., (1985) Science 228: 190; During et al, (1989) Ann. Neurol. 25:351; Howard et al, (1989) J. Neurosurg. 7 1:105); патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; публикация PCT № WO 99/15154; and публикация PCT № WO 99/20253. Примеры полимеров, используемых в составах с замедленным высвобождением, включают без ограничения поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), поли(этилен-со-винилацетат), поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, полиэтиленгликоль, полилактиды (PLA), поли(лактид-со-гликолиды) (PLGA) и полиортоэфиры. В одном варианте осуществления полимер, используемый в препаративной форме с замедленным высвобождением, является инертным, не содержит вымываемых примесей, является стабильным при хранении, стерильным и биоразлагаемым. Система с контролируемым или замедленным высвобождением может быть размещена вблизи профилактической или терапевтической мишени, что требует лишь части системной дозы (см., например, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

[0060] Системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (1990), Science 249: 1527-1533). Любая методика, известная специалисту в данной области, может быть использована для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одно или несколько антител или их фрагментов согласно изобретению. См., например, патент США № 4526938, публикацию PCT WO 91/05548, публикацию PCT WO 96/20698, Ning et al, (1996), Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, Song et al, (1995) PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., (1997) Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, and Lam et al, (1997) Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0061] Если антитела или их фрагменты вводят местно, они могут быть приготовлены в форме мази, крема, чрескожного пластыря, лосьона, геля, шампуня, спрея,

аэрозоля, раствора, эмульсии или в другой форме, хорошо известной специалисту в данной области. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Для нераспыляемых лекарственных форм для местного применения обычно используют вязкие или полутвердые или твердые формы, содержащие носитель или одно или несколько вспомогательных средств, совместимых с местным применением и имеющих в некоторых случаях динамическую вязкость выше, чем у воды. Подходящие составы включают без ограничения растворы, суспензии, эмульсии, кремы, мази, порошки, растирания, бальзамы и тому подобное, которые при необходимости стерилизуют или смешивают со вспомогательными средствами (например, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, буферами или солями) для воздействия на различные свойства, такие как, например, осмотическое давление. Другие подходящие лекарственные формы для местного применения включают распыляемые аэрозольные препараты, в которых активный ингредиент в некоторых случаях в сочетании с твердым или жидким инертным носителем упаковывают в смесм с летучим веществом под давлением (например, с газообразным пропеллентом, таким как фреон) или в сжимаемой бутылке. При необходимости к фармацевтическим композициям и лекарственным формам также можно добавлять увлажняющие средства или смачивающие средства. Примеры таких дополнительных ингредиентов хорошо известны в данной области.

[0062] Если композиции, содержащие антитела или их фрагменты, вводят интраназально, они могут быть приготовлены в форме аэрозоля, спрея, тумана или в форме капель. В частности, профилактические или терапевтические средства для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть удобно доставлены в форме аэрозольного спрея из упаковок под давлением или распылителя с использованием подходящего пропеллента (например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа). В случае аэрозоля под давлением единица дозировки может быть определена путем обеспечения клапана для подачи отмеренного количества. Капсулы и картриджи (состоящие, например, из желатина) для использования в ингаляторе или инсуффляторе могут быть приготовлены с использованием порошковой смеси соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

[0063] В данной области известны способы совместного введения или лечения вторым терапевтическим средством, например, цитокином, стероидом, химиотерапевтическим средством, антибиотиком или облучением (см., например, Hardman et al., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, lO.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Эффективное количество терапевтического средства может уменьшить симптомы по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%;

по меньшей мере примерно на 30% и более; по меньшей мере 40% и более или по меньшей мере 50%.

[0064] В некоторых аспектах второе терапевтическое средство может представлять собой связывающий пептид, содержащий пептид взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM) или пептид связывающего NEMO домена (NBD).

[0065] Дополнительные терапевтические препараты (например профилактические или терапевтические средства), которые можно вводить в комбинации с антителом против мономера p40 или его иммунологически активным фрагментом, можно вводить с интервалом менее 5 минут, с интервалом менее 30 минут, с интервалом 1 час, примерно 1 час, примерно 1-2 часа, примерно 2-3 часа, примерно 3-4 часа, примерно 4-5 часов, примерно 5-6 часов с интервалом от примерно 6 до примерно 7 часов, с интервалом от примерно 7 до примерно 8 часов, с интервалом от примерно 8 до примерно 9 часов, с интервалом от примерно 9 до примерно 10 часов, с интервалом от примерно 10 до примерно 11 часов, с интервалом от 11 до 12 часов, с интервалом от 12 до 18 часов, с интервалом от 18 до 24 часов, с интервалом от 24 до 36 часов, с интервалом от 36 до 48 часов, с интервалом от 48 до 52 часов, с интервалом от 52 до 60 часов, с интервалом от 60 до 72 часов, с интервалом от 72 до 84 часов, с интервалом от 84 до 96 часов или с интервалом от 96 часов до 120 часов от антител или их фрагментов согласно изобретению. Два или более видов терапии могут быть назначены в течение одного посещения пациента.

[0066] Антитело против мономера p40 или его иммунологически активный фрагмент и другие виды терапии можно вводить циклически. Циклическая терапия включает применение первой терапии (например первого профилактического или терапевтического средства) в течение определенного периода времени с последующим применением второй терапии (например второго профилактического или терапевтического средства) в течение определенного периода времени, необязательно с последующим применением третьей терапии (например профилактического или терапевтического средства) в течение определенного периода времени и так далее и повторением этого последовательного введения, то есть цикла, для уменьшения развития резистентности к одному из терапевтических средств, чтобы избежать или уменьшить побочные эффекты одного из методов лечения и/или повысить эффективность методов лечения.

[0067] В некоторых вариантах осуществления антитело против мономера p40 или его иммунологически активный фрагмент и/или связывающий пептид могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить надлежащее распределение in vivo. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Чтобы гарантировать, что терапевтические соединения согласно изобретению пересекают BBB (при необходимости), их можно приготовить, например, в липосомах. О способах производства липосом см., например, патент США № 4522811; 5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или более фрагментов, которые избирательно

транспортируются в определенные клетки или органы, таким образом улучшая адресную доставку лекарственного средства (см., например, Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Примеры групп направленного действия включают фолиевую кислоту или биотин (см., например, патент США № 5416016, выданный Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); антитела (Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); рецептор сурфактантного белка A (Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); стр. 120 (Schreier et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); см. также K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

[0068] Представлены неограничивающие примеры протоколов введения фармацевтической композиции, содержащей антитело против мономера p40 или его иммунологически активный фрагмент, отдельно или в комбинации с другими видами терапии нуждающемуся в этом субъекту. Терапевтические препараты (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированной терапии можно вводить субъекту одновременно или последовательно. Терапевтический препарат (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированной терапии согласно настоящему изобретению также можно применять циклически. Циклическая терапия включает применение первой терапии (например первого профилактического или терапевтического средства) в течение определенного периода времени, за которой следует применение второй терапии (например второго профилактического или терапевтического средства) в течение определенного периода времени и повторение этого последовательного введения, то есть цикл, для уменьшения развития резистентности к одному из терапевтических препаратов (например средств), чтобы избежать или уменьшить побочные эффекты одного из терапевтических препаратов (например средств) и/или для улучшения эффективность терапии.

[0069] Терапевтические препараты (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированной терапии можно вводить субъекту одновременно. Термин «одновременно» не ограничен введением терапевтических препаратов (например профилактических или терапевтических средств) в одно и то же время, а скорее означает, что фармацевтическую композицию, содержащую антитела или их фрагменты согласно изобретению, вводят субъекту в такой последовательности и в пределах временного интервала, чтобы антитела согласно изобретению могли действовать вместе с другим терапевтическим препаратом (препаратами) для обеспечения большей пользы, чем если бы они вводились иначе. Например, каждый терапевтический препарат можно вводить субъекту одновременно или последовательно в любом порядке в разные моменты времени; однако, если их не вводить одновременно, их следует вводить достаточно близко по времени, чтобы обеспечить нужный терапевтический или профилактический эффект. Каждый терапевтический препарат можно вводить субъекту отдельно, в любой подходящей форме и любым подходящим путем. В различных вариантах осуществления терапевтические препараты (например профилактические или

терапевтические средства) вводят субъекту с интервалом менее 15 минут, менее 30 минут, с интервалом менее 1 часа, с интервалом примерно 1 час, с интервалом примерно от 1 часа до примерно 2 часов, с интервалом от примерно 2 до примерно 3 часов, с интервалом от примерно 3 до примерно 4 часов, с интервалом от примерно 4 до примерно 5 часов, с интервалом от примерно 5 до примерно 6 часов, с интервалом от примерно 6 до примерно 7 часов, с интервалом от примерно 7 до примерно 8 часов, с интервалом от примерно 8 до примерно 9 часов, с интервалом от примерно 9 до примерно 10 часов, с интервалом от примерно 10 до примерно 11 часов, с интервалом от примерно 11 до примерно 12 часов, с интервалом 24 часа, с интервалом 48 часов, с интервалом 72 часа или с интервалом 1 неделя. В других вариантах осуществления два или более терапевтических препаратов (например, профилактических или терапевтических средств) вводят за одно и то же посещение пациента.

[0070] Профилактические или терапевтические средства комбинированной терапии можно вводить субъекту в одной и той же фармацевтической композиции. Альтернативно, профилактические или терапевтические средства комбинированной терапии можно вводить одновременно субъекту в виде отдельных фармацевтических композиций. Профилактические или терапевтические средства можно вводить субъекту одним и тем же или разными путями введения.

[0071] Если специально не указано иное, в практике настоящего изобретения будут использоваться традиционные методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, методов рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области, многие из которых описаны ниже с целью иллюстрации. Такие методы полностью описаны в литературе. См., например, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-е издание, 2001 г.); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2-е издание, 1989 г.); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, обновлено в июле 2008 г.); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); Ежегодный обзор иммунологии ; а также монографии в таких журналах, как Advances in Immunology.

[0072] Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0073] Средства связывания мономера p40

[0074] В некоторых вариантах осуществления средство, используемое в способах

лечения, описанных в настоящем документе, для связывания с мономером p40, представляет собой антитело, и в данном контексте включает моноклональное антитело или производное антитела. Производные антител для лечения, в частности для лечения человека, включают гуманизированные рекомбинантные антитела, химерные рекомбинантные антитела, фрагменты антител Fab, Fab', F(ab')2 и F(v) и мономеры или димеры тяжелых или легких цепей антител или их смеси. В рамках настоящего изобретения связывающее средство против мономера p40 не распознает часть p40 IL-12 или IL-23. В некоторых вариантах осуществления средство связывания мономера p40 получено из моноклонального антитела a3-7g или a3-3a. В некоторых вариантах осуществления средство связывания мономера p40 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VH-цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 VL-цепи моноклональных антител a3-7g или a3-3a.

[0075] Связывающие пептиды

[0076] В некоторых вариантах осуществления средство связывания мономера p40 вводят в комбинации со связывающим пептидом. В некоторых вариантах осуществления средство связывания мономера p40 вводят в комбинации с пептидом взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM) или пептидом связывающего NEMO домена (NBD). В одном варианте осуществления пептид TIDM содержит последовательность PGAHQK (SEQ ID NO: 1). В другом варианте осуществления пептид TIDM содержит от 6 до 10 аминокислот, включая последовательность PGAHQK (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления пептид TIDM содержит менее 12, 13, 14 или 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид TIDM состоит из SEQ ID NO: 1. В еще одном варианте осуществления пептид дополнительно содержит гомеодомен Antennapedia, связанный с пептидом, содержащим пептид TIDM с SEQ ID NO 1. В некоторых вариантах осуществления использован пептид гомеодомена Antennapedia из drqikiwfqnrrmkwkk (SEQ ID NO: 2). Пептид гомеодомена Antennapedia может быть связан с амино- или карбо-концом пептида TIDM. В другом варианте осуществления последовательность связывающего пептида представляет собой drqikiwfqnrrmkwkkPGAHQK (SEQ ID NO: 3). В качестве контроля можно использовать пептид мутантного TIDM. Например, пептид мутантного TIDM представляет собой PGWHGD (SEQ ID NO: 4), и пептид мутантного TIDM может быть связан с гомеодоменом Antennapedia SEQ ID NO: 2. Мутантный (m) TIDM; drqikiwfqnrmikwkkPGWHGD (SEQ ID NO: 5)

[0077] В других вариантах осуществления средство связывания мономера p40 можно вводить в комбинации с пептидом NBD. В одном варианте осуществления пептид NBD содержит последовательность LDWSWL (SEQ ID NO: 6). В другом варианте осуществления пептид NBD содержит от 6 до 10 аминокислот, включая последовательность LDWSWL (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления пептид NBD содержит менее 12, 13, 14 или 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид NBD состоит из SEQ ID NO: 6. В еще одном варианте осуществления пептид дополнительно содержит гомеодомен Antennapedia, связанный с пептидом, содержащим пептид NBD с последовательностью SEQ ID NO 6. В некоторых

вариантах осуществления использован пептид гомеодомена Antennapedia drqikiwfqnrrmkwkk (SEQ ID NO: 2). Пептид гомеодомена Antennapedia может быть связан с амино- или карбо-концом пептида NBD. В другом варианте осуществления последовательность связывающего пептида представляет собой drqikiwfqnrrmkwkkLDWSWL (SEQ ID NO: 7). В качестве контроля можно использовать пептид мутантного NBD. Например, пептид мутантного NBD представляет собой LDASAL (SEQ ID NO: 8), и пептид мутантного NBD может быть связан с гомеодоменом Antennapedia SEQ ID NO: 2. Мутантный (m) NBD; drqikiwfqnrrmkwkkLDASAL: (SEQ ID NO: 9).

[0078] Примеры

[0079] Уровни IL-12, IL-23, $p40_2$ и p40 в сыворотке больных раком молочной железы. Недавно авторы увидели, что уровень p40 намного выше в сыворотке больных раком предстательной железы по сравнению со здоровым контролем [4]. Чтобы понять, является ли это наблюдение специфичным для рака предстательной железы или нет, авторы также измерили уровни IL-12, IL-23, $p40_2$ и p40 в сыворотке больных раком молочной железы (n=12) и контрольной группе того же возраста (n=12). Поскольку терапия, модифицирующая заболевание, может изменить уровни этих цитокинов, авторы использовали сыворотку только предварительно пролеченных пациентов с раком молочной железы. Подобно тому, что наблюдается у пациентов с раком предстательной железы, уровень p40 был значительно выше в сыворотке пациентов с раком молочной железы по сравнению со здоровым контролем (фиг. 1A). Напротив, уровни $p40_2$ (фиг. 1B), IL-12 (фиг. 1C) и IL-23 (фиг. 1D) были значительно ниже в случаях рака молочной железы по сравнению со здоровым контролем, что указывает на специфичность результатов.

[0080] Иммунотерапия моноклональными антителами против мономера p40 IL-12 (p40 mAb) стимулирует гибель клеток TNBC человека. Поскольку было трудно получить образцы сыворотки случаев TNBC в достаточном количестве, авторы отслеживали уровни p40 и $p40_2$ в клеточных линиях TNBC человека. Клетки TNBC человека (BT-549 и HCC70) культивировали в бессывороточных условиях в течение 48 часов с последующим измерением уровней p40 и $p40_2$ в супернатантах с помощью сэндвич-ELISA. Как и в сыворотке больных раком молочной железы, уровень p40 был значительно выше, чем $p40_2$, в супернатантах как клеток BT-549 (фиг. 2A), так и клеток HCC70 (фиг. 2B). Поэтому авторы исследовали роль p40 в выживании клеток TNBC человека с использованием p40 mAb a3-3a. Ранее авторы показали, что p40 mAb a3-3a нейтрализует выработку оксида азота и фактора некроза опухоли α (TNFα) в перитонеальных макрофагах, индуцированную только p40, но не $p40_2$, IL-12 и IL-23 [10]. Недавно авторы также увидели, что однократное введение p40 mAb a3-3a, но не контрольного IgG, стимулирует клинические симптомы экспериментального аллергического энцефаломиелита (EAE), животной модели рассеянного склероза (MS) [5]. Это резко контрастирует с функциями mAb против $p40_2$, IL-12 и IL-23 при EAE [11, 18, 19], что означает, что функция p40 отличается от других членов семейства IL-12 ($p40_2$, IL-12 и IL-

23). В данном случае авторы заметили, что p40 mAb a3-3a снижает MTT (фиг. 2C-D) и увеличивает высвобождение LDH (фиг. 2E-F) как в клетках BT-549 (фиг. 2C и E), так и в клетках HCC70 (фиг. 2D и F), что указывает на индукцию гибели клеток TNBC за счет нейтрализации p40. Этот результат был специфичным, поскольку контрольный IgG хомяка не влиял ни на LDH, ни на MTT в клетках TNBC человека.

[0081] Иммунотерапия p40 mAb индуцирует регрессию опухоли в мышиной модели TNBC с ксенотрансплантатом, полученным у пациента (PDX): в отсутствие какой-либо эффективной генетически сконструированной мышиной модели TNBC модели PDX широко используются для проведения доклинической оценки любых новых терапевтических подходов. Для этого исследования авторы использовали модель PDX (ID# TM00096; Jackson Lab). В этой модели опухоль TNBC (инвазивная протоковая карцинома) была привита в бок самкам гамма-мышей NOD scid (NSG). Сначала авторы измерили уровень p40 в сыворотке мышей PDX и обнаружили более высокий уровень p40, чем $p40_2$, в сыворотке примерно через 4 недели после приживления опухоли TNBC (фиг. 3A). Поэтому, чтобы изучить роль p40 в прогрессировании опухоли TNBC, авторы исследовали влияние p40 mAb на размер опухоли и гибель опухолевой ткани у мышей PDX. Когда площадь опухоли достигала 0,6-0,8 $см^2$, мышам вводили p40 mAb a3-3a в дозе 2 мг/кг тела/неделю внутрибрюшинно (i.p.) в течение 2 недель. Размер опухоли регистрировали через день. Через 2 недели лечения опухоли метили IR красителем 800, конъюгированным с 2-дезокси-d-глюкозой, путем инъекции в хвостовую вену, а затем визуализировали с помощью инфракрасного сканера LI-COR Odyssey. Интересно, что авторы наблюдали, что введение p40 mAb значительно уменьшало размер опухолей, как видно из ИК-изображений всего животного (фиг. 3B) и изображений иссеченных опухолей (фиг. 3C). Из кривой регрессии опухоли было ясно, что размер опухолей в группе, получавшей p40 mAb, был намного меньше, чем в контрольной группе (фиг. 3D). Напротив, контрольный IgG хомяка не оказывал такого эффекта (фиг. 3B-D).

[0082] Иммунотерапия p40 mAb стимулирует реакцию гибели в опухолевых тканях мышиной модели PDX с TNBC: Уклонение от апоптоза, естественного клеточного механизма запрограммированной гибели клеток, является одним из отличительных признаков раковых клеток. Поэтому далее авторы наблюдали за апоптозом или реакцией гибели в этих опухолевых тканях. Хотя авторы не наблюдали полной регрессии опухолей TNBC с помощью p40 mAb, окрашивание H&E показало почти пустое ядро, поскольку авторы не обнаружили присутствия каких-либо живых клеток в ядре опухоли мышей PDX, получавших p40 mAb, по сравнению с любой контрольной группой без лечения или получавших IgG мышей PDX (фиг. 4A). Чтобы понять процесс гибели клеток, авторы проверили экспрессию мРНК различных генов, связанных с гибелью и выживанием клеток, в опухолевых тканях с лечением или без лечения с использованием специально созданного массива генов. Массив генов (фиг. 4B) с последующим ПЦР-анализом отдельных генов в реальном времени (фиг. 4C) ясно показал, что лечение p40 mAb заметно увеличивает экспрессию связанных с апоптозом генов, таких как цитохром C,

каспаза 3, каспаза 8, каспаза 9, p53, BAD, BID, BAX и BAK в опухолевых тканях мышей PDX. С другой стороны, авторы наблюдали уменьшение экспрессии генов, связанных с выживанием, таких как Bcl 2 и Bcl-XL, в опухолевых тканях мышей PDX, получавших p40 mAb (фиг. 4B-C). Результаты TUNEL авторов также ясно показали, что популяция TUNEL-позитивных клеток в опухолях с лечением p40 mAb, была выше, чем в контрольных опухолях или в опухолях с лечением IgG (фиг. 4D-E). Чтобы дополнительно подтвердить это наблюдение, авторы провели двойной анализ FACS с йодидом пропидия и аннексином V (фиг. 4F) и обнаружили, что лечение p40 mAb заметно увеличивает уровень как апоптотических (фиг. 4G), так и некротических (фиг. 4H) клеток в опухолевых клетках. тканей мышей PDX. В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что нейтрализация p40 с помощью p40 mAb способна вызывать гибель клеток в опухолях TNBC.

[0083] Активация Т-хелпера 1 (Th1) и Т-цитотоксического 1 (Tc1) иммунные ответы in vivo в селезенке мышей PDX после лечения p40 mAb: раковые клетки не умирают обычно, как другие клетки в организме человека, поскольку известно, что раковые клетки избегают гибели из-за изменения иммунного надзора. К счастью, имеются Т-цитотоксические 1 (Tc1) и Т-хелперные 1 (Th1) клетки, чтобы справиться с такой ситуацией. В то время как взаимодействие между клетками Tc1 и Th1 необходимо для уничтожения опухолевых клеток [20-22], в нескольких исследованиях сообщалось, что иммунные ответы как Th1, так и Tc1 подавляются у больных раком во время прогрессирования заболевания [23]. Хотя авторы использовали модель PDX у мышей NSG, ряд исследований продемонстрировал развитие функциональных Т-клеток в гуманизированных моделях мышей [24, 25]. CD3+и CD8+ Т-клетки легко идентифицируются в крови, селезенке и костном мозге PDX-модели TNBC у мышей NSG [26]. Согласно Najima et al. [27], человеческие CD8+ Т-клетки у мышей NSG также распознают ассоциированный с опухолью антиген, опухоль Вильмса 1 (WT1), что позволяет предположить, что зрелые Т-клетки человека, распознающие специфические антигены, могут быть получены в модели гуманизированных мышей. Таким образом, авторы отслеживали влияние лечения p40 mAb на ответы Th1 и Tc1 у получавших и не получавших лечения мышей PDX. В то время как клетки Th1 характеризуются CD4 и IFNγ, клетки Tc1 в основном представляют собой CD8+ IFNγ+. Интересно, что авторы обнаружили, что лечение p40 mAb заметно усиливало общий адаптивный иммунный ответ, о чем свидетельствует увеличение количества CD4+, CD8+, а также CD4+ CD8+ Т-клеток в спленоцитах мышей PDX, получавших p40 mAb, по сравнению с не получавшими лечения или контрольными мышами PDX, получавшими IgG (фиг. 5A и D). Кроме того, двойное мечение спленоцитов на CD4 и IFNγ выявило усиление Th1-ответа у мышей PDX при лечении p40 mAb (фиг. 5B и E). Этот результат был специфичным, поскольку авторы не наблюдали какого-либо увеличения числа клеток CD4+ IFNγ+ Th1 при лечении контрольным IgG (фиг. 5B и E). Точно так же, когда авторы метили спленоциты на CD8 и IFNγ, авторы обнаружили заметное увеличение количества клеток

CD8+ IFNγ+ Tc1 у мышей с TNBC при лечении p40 mAb, но не IgG (фиг. 5C и F). Результаты ELISA в сыворотке мышей PDX также демонстрируют заметное увеличение IFNγ, цитокина Th1 и Tc1, в сыворотке мышей PDX после лечения p40 mAb, но не контрольным IgG (фиг. 5G). Напротив, авторы обнаружили значительное снижение уровня IL-10, цитокина Th2, в сыворотке мышей PDX, получавших p40 mAb (фиг. 5H), что подчеркивает специфичность вывода авторов о том, что нейтрализация p40 mAb у мышей PDX избирательно активирует ответы Th1 и Tc1.

[0084] Иммунотерапия p40 mAb увеличивает иммунные ответы Th1 и Tc1 в опухолевых тканях в модели TNBC мышей PDX: поскольку p40 mAb повышали иммунные ответы Th1 и Tc1 в селезенке мышей PDX, авторы затем исследовали, способно ли лечение p40 mAb усиливать ответы Th1/Tc1 in vivo в опухолевых тканях. Аналогично тому, что наблюдается в селезенке, лечение p40 mAb также усиливало управляемые Th1 и Tc1 адаптивные иммунные ответы в опухоли TNBC, о чем свидетельствует увеличение количества Т-клеток CD4+ CD8+ (фиг. 6A и D), клеток CD4+ IFNγ+ Th1 (фиг. 6B и E) и клеток CD8+ IFNγ+ Tc1 (фиг. 6C и F) в опухолевых тканях мышей PDX. Поскольку инфильтрация клеток Tc1 в опухоль является ключом к регрессии опухоли, то авторы наблюдали за инфильтрацией клеток Tc1 в опухоль TNBC в разных группах мышей PDX. Проводили двойное мечение поперечных срезов опухоли антителами против CD8 и IFNγ (фиг. 7A) с последующим подсчетом CD8+ (фиг. 7B) и IFNγ+ (фиг. 7C). Т-клетки ясно показывают выраженную инфильтрацию CD8+ клеток, способных высвобождать IFNγ в опухоль мышей PDX после лечения p40 mAb, но не контрольным IgG.

[0085] Лечение p40 mAb активирует макрофаги M1, подавляя макрофаги M2 в опухолевых тканях мышиной модели PDX с TNBC: Опухолеассоциированные макрофаги (TAM) играют критическую роль в патогенезе различных видов рака, включая TNBC [28]. TAM обычно разделяются либо в M1, проявляющие противоопухолевую активность, либо в M2, обладающие функциями, способствующими развитию опухоли. В то время как TAM1 экспрессируют большое количество индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), TAM2 характеризуются аргиназой 1 (ARG1) [29]. Поэтому авторы исследовали состояние TAM1/TAM2 в опухоли TNBC после лечения p40 mAb. Как видно из фиг. 8A, количество iNOS+Iba1+ TAM1, которое было низким в контрольной опухоли TNBC, резко увеличилось после лечения p40 mAb, но не контрольным IgG. Напротив, Arg1+Iba1+ TAM2 были подавлены в опухоли TNBC после лечения p40 mAb, но не контрольным IgG (фиг. 8B), что свидетельствует о том, что иммунотерапия p40 mAb способна переключать TAM2 на TAM1 в опухоли TNBC.

[0086] Иммунотерапия p40 mAb подавляет ось белок 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1)/лиганд 1 запрограммированной гибели клеток (PD-L1) в опухолевых тканях Модели PDX мышей с TNBC: было показано, что передача сигналов PD-1/PD-L1 играет важную роль в ускользании рака от иммунитета [29, 30]. В результате подавление оси PD-1/PD-L1 связано со значительным клиническим ответом у широкого круга онкологических больных. Поэтому в данном документе авторы исследовали влияние

иммунотерапии p40 mAb на статус PD-1 и PD-L1. Как и ожидалось, ткани опухоли TNBC легко экспрессировали как PD-1, так и PD-L1. Однако лечение p40 mAb заметно ингибировало уровень как PD-1 (фиг. 9A), так и PD-L1 (фиг. 9B), указывая на то, что иммунотерапия p40 mAb блокирует путь ускользания от иммунного ответа в опухоли TNBC.

[0087] Иммунотерапия p40 mAb не токсична для модели мышей PDX с TNBC: Аланинаминотрансфераза (ALT), вероятно, является наиболее широко используемым клиническим биомаркером состояния печени. Точно так же более высокий уровень LDH в сыворотке, чем нормальный уровень, обычно указывает на повреждение тканей. Поэтому, чтобы понять, вызывает ли p40 mAb какие-либо токсические эффекты, авторы измеряли LDH и ALT в сыворотке всех групп мышей. В то время как лечение p40 mAb увеличивало уровень LDH в сыворотке у мышей PDX (фиг. 10A) из-за гибели опухоли TNBC, уровень ALT в сыворотке был заметно ингибирован у мышей PDX, получавших p40 mAb (фиг. 10B), что указывает на то, что иммунотерапия p40 mAb не токсична для мышей с TNBC, и лечение p40 mAb снижает токсичность для печени у мышей с TNBC. Эти результаты были специфическими, поскольку контрольный IgG не изменял уровень ни LDH, ни ALT в сыворотке мышей PDX.

[0088] В клетках TNBC человека уровень p40 выше, чем гомодимера p40 ($p40_2$). Во-первых, авторы отслеживали уровни p40 и гомодимера p40 ($p40_2$) в различных клеточных линиях TNBC человека. Клетки BT-549 и HCC-70 (ATCC) культивировали в бессывороточных условиях в течение 48 часов с последующим измерением уровней p40 и $p40_2$ с помощью сэндвич-ELISA. Уровень p40 был выше, чем $p40_2$ как в клетках BT-549, так и в клетках HCC-70 (фиг. 11).

[0089] Нейтрализация мономера p40 с помощью p40 mAb a3-3a не регулировала ответ Т-хелперов 17 (Th17) у мышей с TNBC: хотя клетки Th17 (CD4+ IL-17+) участвуют в патогенезе аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз и ревматоидный артрит, эти клетки играют противоречивую роль в развитии рака. В то время как некоторые исследования подтверждают способность клеток Th17 уничтожать рак, другие исследования показали участие клеток Th17 в росте рака. Поэтому авторы также отслеживали влияние лечения p40 mAb на ответ Th17 у мышей с TNBC путем двойной маркировки спленоцитов на CD4 и IL-17. Было интересно увидеть, что, несмотря на активацию ответов Th1 и Tc1, p40 mAb не оказывало какого-либо значительного действия на клетки Th17 (фиг. 12A-B). Лечение контрольным IgG также оставалось неспособным модулировать ответ Th17 у мышей с TNBC (фиг. 12A-B).

[0090] Влияние других нейтрализующих моноклональных антител против мономера p40 (p40 mAb a3-7g) на выживаемость клеток TNBC человека: в то время как p40 mAb a3-3a относится к типу IgG2a, p40 mAb a3-7g относится к типу IgG2b (Pahan lab, 2008, Hybridoma, 27: 141-151). Чтобы понять, было ли тумороцидное действие специфичным для mAb a3-3a или mAb a3-7g также способны индуцировать гибель раковых клеток, авторы проанализировали влияние mAb a3-7g на выживаемость

различных раковых клеток. LnCAP (клетки рака предстательной железы человека), Hep3B (клетки рака печени человека) и HCC-70 (клетки TNBC человека) обрабатывали различными концентрациями mAb a3-7g в течение 48 ч в бессывороточных условиях с последующим мониторингом выживаемости клеток с помощью анализа MTT. Как видно из фиг. 13, обработка a3-7g значительно индуцировала гибель клеток LnCAP (фиг. 13A), Hep3B (фиг. 13B) и HCC-70 (фиг. 13C). Эти результаты были специфическими, поскольку контрольный IgG оставался неспособным вызывать гибель этих раковых клеток человека. Кроме того, эти результаты позволяют предположить, что подобно mAb a3-3a, mAb a3-7g также способны убивать различные раковые клетки.

[0091] Затем авторы искали способы дальнейшего усиления уничтожающего рак эффекта p40 mAb.

[0092] Пептид связывающего NEMO домена (NBD) повышает эффективность mAb a3-3a в уничтожении различных раковых клеток: слабовыраженное воспаление играет благоприятную роль для роста рака. Поэтому, поскольку активация NF-kB имеет решающее значение для воспаления, авторы исследовали, может ли эффективность p40 mAb a3-3a быть увеличена с помощью специфического ингибитора NF-kB. Другие исследователи (May et al., 2000, Science, 289: 1550-1554) и авторы (Pahan lab, 2007, PNAS, 104: 18754-18759) видели, что пептид домена связывания существенного модификатора NF-kB (NEMO) (NBD) является специфическим ингибитором активации NF-kB (фиг. 14). Интересно, что авторы обнаружили, что p40 mAb a3-3a индуцирует большую гибель клеток MCF-7 (фиг. 15A), Hep3B (фиг. 15B) и BT-549 (фиг. 15C) в присутствии пептида NBD дикого типа (wtNBD), чем при его отсутствии. Этого не наблюдалось в присутствии пептида мутантного NBD (фиг. 15), что указывает на специфичность эффекта.

[0093] Интраназальное введение пептида wtNBD приводило к большей регрессии опухоли у мышей с TNBC, получавших p40 mAb: поскольку пептид wtNBD вызывал большую гибель в различных раковых клетках человека, то авторы исследовали влияние пептида wtNBD и p40 mAb a3-3a на регрессию опухоли TNBC у мышей. В то время как мышам TNBC вводили p40 mAb a3-3a (2 мг/кг массы тела) один раз в неделю посредством внутрибрюшинной инъекции, те же самые мыши получали пептид wtNBD или mNBD (0,1 мг/кг массы тела) ежедневно интраназальным путем. Как видно из фиг. 16, интраназальное введение пептида wtNBD приводило к большему уменьшению размера опухоли TNBC у мышей с TNBC, получавших mAb a3-3a. Этот результат был специфичным, поскольку пептид mNBD не проявлял такого эффекта (фиг. 16).

[0094] Пептид взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM) усиливает эффективность mAb a3-3a в уничтожении различных раковых клеток: поскольку гиалуронан играет важную роль на разных стадиях рака, и этот гиалуронан взаимодействует с несколькими рецепторами клеточной поверхности, включая TLR2, способствуя выживанию и пролиферации раковых клеток, авторы решили нацелить TLR2 на различные опухолевые клетки. Недавно авторы продемонстрировали селективный нокдаун TLR2 (компонента врожденного иммунитета) с помощью пептида

взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM) (Pahan lab, 2018, J. Clin. Invest., 128: 4297) (фиг. 17). Поэтому различные опухолевые клетки (MCF-7, Hep3B и BT-549) обрабатывали mAb a3-3a в присутствии или в отсутствие пептида wtTIDM и mTIDM в течение 48 ч в бессывороточных условиях. Как видно из MTT, комбинация mAb a3-3a и пептида wtTIDM заметно индуцировала гибель клеток MCF-7 (фиг. 18A), Hep3B (фиг. 18B) и BT-549 (фиг. 18C).

[0095] Интраназальное введение пептида wtTIDM приводило к большей регрессии опухоли у мышей с TNBC, получавших p40 mAb: поскольку пептид wtTIDM индуцировал превосходную гибель различных раковых клеток человека, то авторы исследовали, вызывал ли пептид wtTIDM большую регрессию опухоли у мышей с TNBC в присутствии p40 mAb a3-3a. В этом случае мышей с TNBC также лечили p40 mAb a3-3a (2 мг/кг массы тела) один раз в неделю путем внутрибрюшинной инъекции пептида wtNBD/mNBD (0,1 мг/кг массы тела) ежедневно интраназальным путем. После трех недель лечения опухоли были помечены красителем Alexa800, конъюгированным с 2DG, путем инъекции в хвостовую вену с последующей инфракрасной визуализацией в Licor Odyssey. Подобно пептиду wtNBD, интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM, также вызывало большее уменьшение опухоли у мышей с TNBC, получавших mAb a3-3a (фиг. 19A-B). Эти результаты свидетельствуют о том, что комбинация mAb a3-3a и интраназального пептида wtTIDM может быть эффективной стратегией борьбы с TNBC.

[0096] Интраназальное введение либо пептида wtNBD, либо пептида wtTIDM стимулировало разрушающий рак ответ Tc1 у мышей с TNBC, получавших p40 mAb: поскольку интраназальное введение пептида wtNBD и wtTIDM приводило к лучшей регрессии опухоли у мышей с TNBC, получавших mAb a3-3a, то авторы исследовали основной механизм. Управление ответом Tc1 всегда полезно для рака. Поэтому авторы исследовали, способен ли пептид wtTIDM или wtNBD вызывать ответ Tc1 у мышей с TNBC, получавших α3-3a. Интересно, что авторы обнаружили, что интраназальное введение низких доз пептида wtTIDM или пептида wtNBD заметно стимулировало ответ Tc1 у мышей с TNBC, получавших p40 mAb (фиг. 20), что свидетельствует о том, что пептид wtTIDM или wtNBD вызывал большее сморщивание опухоли у мышей, получавших p40 mAb, вероятно, за счет увеличения ответа Tc1.

[0097] Ежедневное интраназальное введение пептида взаимодействующего с TLR2 домена дикого типа MyD88 (wtTIDM) значительно стимулировало опосредованное p40 mAb a3-3a уменьшение опухоли TNBC в модели ксенотрансплантата, полученного у пациента (PDX), у мышей (фиг. 21). Этот результат был специфичным, поскольку (m) пептид мутантного TIDM оставался неспособным стимулировать опосредованное p40-mAb уменьшение опухоли TNBC (фиг. 21).

[0098] Как видно из фиг. 22, интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM, стимулировало гибель опухоли TNBC в модели полученного у пациента ксенотрансплантата (PDX) с лечением p40 mAb a3-3a у мышей. Очень мало живых клеток было обнаружено в сердцевине опухоли TNBC у мышей PDX, которых лечили

комбинацией пептида wtTIDM и p40 mAb a3-3a (фиг. 22).

[0099] Интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM, стимулировало опосредованную p40 mAb a3-3a индукцию IFNγ в опухолевых тканях (фиг. 23A) и сыворотке (фиг. 24A) модели PDX мышей с TNBC.

[00100] Интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM, усиливало опосредованное p40 mAb a3-3a снижение IL-10 в опухолевых тканях (фиг. 23B) и сыворотке (фиг. 24B) Модели PDX мышей с TNBC.

[00101] Подводя итог, авторы продемонстрировали следующее:

[00102] A. Клетки TNBC человека продуцируют больше p40, чем $p40_2$.

[00103] B. Нейтрализующие моноклональные антитела против p40 (a3-3a) вызывали гибель клеток тройного негативного рака молочной железы человека (BT-549 и HCC70).

[00104] C. Нейтрализующие моноклональные антитела против p40 (a3-7g) вызывали гибель клеток рака предстательной железы человека (LnCAP), печени (Hep3B) и тройного негативного рака молочной железы (HCC70).

[00105] D. Еженедельное введение p40 mAb a3-3a приводило к регрессии опухоли в модели TNBC у мышей PDX.

[00106] E. Лечение p40 mAb A3-3A усиливало уничтожающие рак иммунные ответы Th1 и Tc1 у мышей с TNBC.

[00107] F. В присутствии пептида wtNBD p40 mAb a3-3a вызывало значительную регрессию опухоли в модели TNBC у мышей PDX.

[00108] G. Комбинация пептида wtNBD и p40 mAb a3-3a приводила к значительному уменьшению опухоли в модели TNBC у мышей PDX.

[00109] H. Интраназальное введение либо пептида wtTIDM, либо пептида wtNBD приводило к большему ответу Tc1 у мышей с TNBC, получавших p40 mAb.

[00110] Обсуждение

[00111] TNBC представляет собой агрессивный тип рака молочной железы, связанный с ограниченными возможностями лечения, и в результате на TNBC ежегодно приходится 5% всех смертей, связанных с раком. При современных методах лечения медиана общей выживаемости при TNBC составляет 10,2 месяца с 5-летней выживаемостью около 65% для местных опухолей и 11% для опухолей с распространением на отдаленные органы. Поскольку TNBC чувствителен к химиотерапии, химиотерапия является стандартом лечения, особенно в тех случаях, когда хирургическое вмешательство невозможно. В последнее время на TNBC также тестировали ряд иммунотерапевтических средств в сочетании с различными исследуемыми препаратами [31, 32]. IL-12 является важным цитокином для индукции клеточно-опосредованного иммунного ответа [6]. Антигенпрезентирующие клетки при активации через Toll-подобные рецепторы и/или при взаимодействия с CD4+ T-клетками продуцируют этот гетеродимерный (p35:p40) цитокин [6, 33]. Хотя мономер p40 IL-12 (p40) был известен как биологически неактивный, недавно авторы наблюдали более

высокие уровни p40 в сыворотке больных раком предстательной железы по сравнению со здоровым контролем и регрессию опухоли предстательной железы у мышей после нейтрализации p40 специфическими mAb. [4]. Интересно, что авторы наблюдали противоположные результаты в сыворотке пациентов с рассеянным склерозом (MS), у которых уровень p40 в сыворотке был ниже по сравнению со здоровым контролем, а добавление p40 ингибировало аутоиммунную демиелинизацию у мышей [5]. В данном документе авторы демонстрируем, что уровень p40 значительно выше в сыворотке больных раком молочной железы по сравнению со здоровыми контролями того же возраста, и что клетки TNBC человека, а также модель PDX мышей с TNBC также продуцируют избыток p40. Соответственно, опосредованная mAb нейтрализация p40 вызывает гибель клеток TNBC человека и подавляет рост опухоли в модели PDX мышей с TNBC. Эти результаты указывают на возможную иммунотерапевтическую перспективу p40 mAb при TNBC.

[00112] Для достижения регрессии опухоли почти обязательно индуцировать апоптоз и/или некроз в опухолевых тканях. С нескольких точек зрения авторы продемонстрировали большую реакцию гибели в опухоли TNBC после лечения p40 mAb. Вывод авторов основан на следующих наблюдениях: во-первых, окрашивание H&E показало пустое или мертвое ядро опухоли у мышей PDX, получавших p40 mAb. С другой стороны, авторы не заметили такого полого ядра в опухолях ни необработанных, ни контрольных мышей PDX, получавших IgG. Во-вторых, как и ожидалось, авторы обнаружили заметную активацию генов, связанных с апоптозом, таких как цитохром C, каспаза 3, каспаза 8, каспаза 9, p53, BAD, BID, BAX и BAK, в опухолевых тканях мышей PDX, получавших p40 mAb, по сравнению с не получавшими лечения или контрольными мышами PDX, получавшими IgG. В-третьих, количество TUNEL-позитивных клеток было намного выше в опухолях мышей PDX, получавших p40 mAb, чем у не получавших лечения или контрольных мышей PDX, получавших IgG. В-четвертых, двойное окрашивание FACS с PI и аннексином V выявило увеличение количества ранних апоптотических (PI-отрицательных и аннексин-V-положительных), поздних апоптотических (PI-положительных и аннексин-V-положительных), а также некротических (PI-положительных и аннексин-V-отрицательных) клеток в опухолях мышей PDX, получавших p40 mAb, по сравнению с не получавшими лечения или контрольными мышами PDX, получавшими IgG. Таким образом, p40 mAb можно рассматривать для индукции реакции гибели клеток в опухолях TNBC.

[00113] Активация адаптивного иммунного ответа, опосредованного CD8+ цитотоксическими-1 T (Tc1)-лимфоцитами, является одним из важных механизмов индукции реакции гибели при различных видах рака, включая TNBC. Соответственно, клетки Tc1, способные продуцировать IFNγ, являются основной популяцией иммунологических эффекторных клеток, опосредующих устойчивость к раку [34, 35]. Клетки Tc1 также могут уничтожать рост и метастазирование злокачественных опухолевых клеток [35]. Однако в клинических испытаниях только ограниченное число

пациентов отвечает на терапию клетками Tc1 [36]. Хотя основные механизмы неизвестны, это, вероятно, связано с отсутствием вспомогательной группы Т-клеток [21, 22]. Подобно клеткам Tc1, клетки CD4+ Т-хелперы 1 (Th1), которые необходимы для создания клеточного иммунитета, не убивают непосредственно опухолевые клетки. Однако клетки Th1 играют важную роль в примировании опосредованных Tc1 противоопухолевых ответов [21]. Возможно, клетки Th1 обеспечивают IL-2, необходимые для индукции Tc1-опосредованного противоопухолевого иммунитета [20]. Также сообщалось, что клетки Th1 играют важную роль в индукции клеточных ответов Tc1 посредством активации DC через лигирование CD40 [37]. Более того, клетки Th1 необходимы для определения величины и устойчивости ответов Tc1 и для инфильтрации Tc1 в опухоли [38, 39]. Таким образом, одновременное усиление ответов Tc1 и Th1 важно для успешной иммунотерапии рака. Приятно видеть, что лечение p40 mAb заметно активирует ответы Th1 и Tc1 в селезенке и опухолях TNBC мышей PDX.

[00114] Известно, что моноциты крови проникают в опухоли, чтобы в конечном итоге дифференцироваться в макрофаги, известные как опухолеассоциированные макрофаги (TAM) [40, 41]. TAM можно разделить на конкретные подмножества на основе маркера, функции и фенотипа. Например, широко признано, что экспрессирующие аргиназу 1 и продуцирующие полиамины опухолеассоциированные макрофаги M2 (TAM2) поддерживают проонкогенные функции и являются патогенными при раке [41, 42]. С другой стороны, известно, что опухолеассоциированные макрофаги M1 (TAM1), характеризующиеся экспрессией индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и фактора некроза опухоли α (TNFα), проявляют противораковую активность посредством провоспалительных иммунных ответов [42]. Следовательно, известно, что перепрограммирование иммуносупрессивного TAM2 в сторону провоспалительного состояния TAM1 ограничивает рост опухоли [43]. Соответственно, авторы видели очень мало TAM1 и много TAM2 в опухолях TNBC у не получавших лечения мышей PDX. Однако иммунотерапия p40 mAb заметно усиливала TAM1 и подавляла TAM2 в опухолях TNBC у мышей PDX. Также известно, что TAM модулируют передачу сигналов PD-1/PD-L1, при этом секретируемые TAM цитокины индуцируют экспрессию PD-1 и PD-L1 [44, 45]. Многочисленные исследования подчеркивают важную роль PD-1/PD-L1 в опухолевой прогрессии посредством ингибирования иммунных ответов, стимуляции апоптоза антиген-специфических Т-клеток и подавления апоптоза регуляторных Т-клеток [46-48]. По данным Sun et al [49] инфильтрация иммунными клетками PD-1(+) обратно пропорциональна выживаемости операбельных больных раком молочной железы. Согласно Zhu et al. [50], хотя блокада CSF1/CSF1R перепрограммирует инфильтрирующие опухоль макрофаги и улучшает ответ на иммунотерапию Т-клеточными контрольными точками в моделях рака поджелудочной железы, регрессия опухоли ограничивается одновременной активацией PD-L1. Вместе, чтобы иммунотерапия была успешной в лечении рака, важно преодолеть сопротивление от передачи сигналов PD-1/PD-L1. Приятно видеть, что в соответствии со стимулированием TAM1 и подавлением TAM2

лечение p40 mAb заметно подавляло ось PD-1/PD-L1 в опухолях TNBC. Следовательно, иммунотерапия p40 mAb способна подавлять различные сигнальные пути в опухолях TNBC, уклонения от гибели.

[00115] Вывод

[00116] Таким образом, в данном документе авторы описывают активацию p40 у пациентов с раком молочной железы, клетках TNBC человека и в модели PDX мышей с TNBC, а также то, что удаление p40 с помощью p40 mAb обогащает антионкогенные клетки Tc1 и Th1, смягчает проонкогенные клетки Th2, активирует макрофаги M1, подавляет передачу сигналов PD-1/PD-L1 и индуцирует апоптоз и/или некроз, что приводит к регрессии опухоли в модели TNBC у мышей PDX. Хотя разнообразный процесс заболевания TNBC у человека не совсем такой же, как в модели PDX мышей с TNBC, результаты авторов показывают, что p40 mAb может обеспечить новый иммунотерапевтический путь против TNBC.

[00117] Методы

[00118] Реагенты: линии клеток TNBC человека (BT-549 и HCC70) были приобретены в ATCC. Материалы для культивирования клеток (RPMI 1640, DMEM, L-глутамин, антибиотик/антимикотик) были приобретены у Life Technologies. Hamster IgG (номер по каталогу IR-HT-GF) был получен от Innovative Research. Набор для анализа MTT (номер по каталогу CGD1) и набор для анализа LDH (номер по каталогу TOX7) были приобретены у Sigma. Набор для анализа TUNEL (номер по каталогу QIA39) был приобретен у Calbiochem, а набор для анализа аннексина V (номер по каталогу K101-25) был приобретен у Biovision. Наборы ELISA для человеческого IFN-γ, IL-12, IL-23 и IL-10 были приобретены у ThermoFisher. Антитела против индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) были приобретены у BD Bioscience. Антитела против адапторной молекулы 1 (Iba1), связывающей ионизированный кальций, PD-1 и PD-L1 были приобретены у Abcam. Антитела против аргиназы 1 были приобретены у Thermo Fisher.

[00119] Образцы сыворотки пациентов с раком молочной железы: Образцы сыворотки ранее получавших лечение пациентов с раком молочной железы и здоровых контролей того же возраста были получены от Discovery Life Sciences, Los Osos, CA.

[00120] Животные: Содержание животных и эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Национального института здравоохранения и были одобрены комитетом по институциональному уходу за животными и их использованию Медицинского центра Университета Rush, Chicago, IL. Модель ксенотрансплантата пациента (PDX) (ID# TM00096) была приобретена в лаборатории Jackson, Bar Harbor, ME, USA. В этой модели фрагменты опухоли TNBC при пассаже P1-P9 (инвазивная протоковая карцинома; TNBC ER-PR-HER2-) прививали в бок самкам гамма-мышей NOD scid (NSG) в возрасте 6-8 недель. Мышей получали из лаборатории Jackson в течение ~ 2 недель после приживления опухоли. Мышей PDX содержали в виварии для животных с регулируемой температурой и достаточным количеством пищи и воды.

[00121] Измерение опухоли: Рост опухоли измеряли штангенциркулем и площадь

поперечного сечения опухоли определяли по формуле ($мм^2$=самый длинный диаметр x самый короткий диаметр). Лечение p40 mAb начинали, когда размеры опухоли достигали 0,6-0,8 $см^2$ по площади. p40 mAb a3-3a инъецировали один раз в неделю внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл стерильного PBS-1% нормальной мышиной сыворотки. Затем опухоли измеряли для определения прогрессирования или регрессии. Инфракрасный краситель (краситель 2DG, конъюгированный с Alexa 800; Licor) вводили через хвостовую вену за день до анализа изображений. Мышей умерщвляли в конце исследования, и брали ткани опухоли для различных биохимических анализов.

[00122] Сэндвич-ELISA: Сэндвич-ELISA использовали для количественного определения $p40_2$ и p40, как описано авторами [10, 11]. Вкратце, для $p40_2$ mAb a3-1d (1,3 мг/мл) разбавляли 1:3000 и добавляли в каждую лунку (100 мкл/лунка) 96-луночного планшета ELISA для покрытия. Биотинилированное $p40_2$ mAb d7-12c (2 мг/мл) разбавляли 1:3000 и использовали в качестве детектирующего антитела. Аналогично для p40, mAb a3-3a (1,3 мг/мл) и биотинилированное p40 mAb a3-7g (2 мг/мл) также разбавляли 1:3000 и использовали в качестве покрывающих и обнаруживающих антител, соответственно [10]. Концентрации IFN-γ, IL-12, IL-23 и IL-10 измеряли в гомогенатах сыворотки или ткани с помощью ELISA (eBioscience/ThermoFisher) в соответствии с инструкциями производителя, как описано ранее [5].

[00123] Выделение спленоцитов: Селезенки, выделенные у получавших лечение или не получавших лечения мышей PDX, помещали в сито для клеток и измельчали поршнем шприца. Полученные суспензии одиночных клеток обрабатывали буфером для лизиса RBC (Sigma-Aldrich), промывали и культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, 50 мкМ 2-ME, 2 мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг /мл стрептомицина.

[00124] Проточная цитометрия: Суспензии одиночных клеток, выделенные из селезенки или опухоли мыши, окрашивали с помощью набора Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (Biolegend) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки промывали буфером FACS (ThermoFisher) и окрашивали FITC-антителами против CD4 человека и антителами APC/Cy7 против CD8 человека (Biolegend) для внеклеточного окрашивания. Для окрашивания IFNγ клетки окрашивали PE-антителами против IFNγ человека (Biolegend) и выявляли с помощью анализа проточной цитометрии. В качестве контроля служили только обработанные PE и неокрашенные клетки. Анализы проточной цитометрии выполняли с использованием анализатора LSRFortessa (BD Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (v10), как описано [4, 5].

[00125] Подготовка ткани и иммуногистохимия: готовили срезы ткани, залитые парафином, и вырезали срезы ткани размером 5 микрон, как описано [11, 12]. Для устранения активности эндогенной пероксидазы срезы тканей депарафинизировали, регидратировали и инкубировали с 3% H_2O_2 в метаноле в течение 15 мин при комнатной температуре. Извлечение антигена проводили при 95°C в течение 20 мин, помещая

предметные стекла в 0,01 М цитратно-натриевый буфер (pH 6,0). После блокировки предметные стекла инкубировали с первичными антителами против CD8 и IFNγ в течение 2 ч при комнатной температуре с последующей промывкой и инкубацией со вторичными антителами Cy2 или Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) при комнатной температуре в течение 1 ч [13].

[00126] Измерения жизнеспособности клеток:

[00127] MTT анализ: Митохондриальную активность измеряли с помощью анализа 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (MTT) (Sigma), как описано ранее [14, 15]. Клетки выращивали на 24-луночных культуральных планшетах с 500 мкл среды и обрабатывали различными реагентами согласно дизайну эксперимента. По окончании периода обработки из каждой лунки удаляли по 300 мкл питательной среды, добавляли по 20 мкл раствора MTT (5 мг/мл) и инкубировали в течение 1 ч.

[00128] Анализ LDH. Активность лактатдегидрогеназы (LDH) измеряли с помощью прямого спектрофотометрического анализа с использованием набора для анализа от Sigma, как описано ранее [14, 15].

[00129] Анализ токсичности для печени. Активность ланинаминотрансферазы (ALT) или сывороточной глутамин-пировиноградной трансаминазы (SGPT) регулировали в сыворотке с использованием набора для анализа от Sigma в соответствии с протоколом производителя.

[00130] Двойное мечение TUNEL и актином: после обработки p40 mAb выполняли анализы TUNEL, как описано ранее [16, 17]. Вкратце, срезы опухолевой ткани блокировали блокирующим буфером с последующей обработкой 20 мкг/мл протеиназы К при комнатной температуре и одной промывкой PBS. Затем образцы инкубировали в течение 90 минут в уравновешивающем буфере терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT), содержащем антитело против актина. После трех промывок в PBST срезы инкубировали в реакционной смеси флуоресцеин-fragEL TdT, содержащей фермент TdT и вторичные антитела, в течение 60 мин при 37°C. Перед монтированием образцы дважды промывали в PBS. Наконец, образцы монтировали с использованием монтирующей среды, содержащей 4,6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI), что позволяет визуализировать общую клеточную популяцию и наблюдать за фрагментами ДНК, меченными флуоресцеином.

[00131] ПЦР в реальном времени: Общую РНК выделяли из опухолевых тканей с использованием реагента Ultraspec II RNA (Biotecx Laboratories Inc.) в соответствии с протоколом производителя. Чтобы удалить любую загрязняющую геномную ДНК, общую РНК расщепляли ДНКазой. Затем расщепленную ДНКазой РНК анализировали с помощью ПЦР в реальном времени в системе обнаружения последовательностей ABI-Prism7700 (Applied Biosystems), как описано ранее [4, 5].

[00132] Статистический анализ. Для регрессии опухоли количественные данные были представлены как среднее значение ± SEM. Статистическая значимость была получена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом

Стьюдента-Ньюмана-Кеулса. Другие данные были выражены как среднее ± SD трех независимых экспериментов. Статистические различия между средними рассчитывали с помощью критерия Стьюдента. Значение p менее 0,05 ($p<0,05$) считалось статистически значимым.

[00133] Таблица 1: Список праймеров, использованных в этом исследовании

Ген	Направления	Последовательность (5'…3')	SEQ ID NO:
GAPDH	Смысловая	GCATCTTCTTGTGCAGTGCC	10
	Антисмысловая	TACGGCCAAATCCGTTCACA	11
Cytochrome C	Смысловая	CCCCCAGCCTCCCTTATCTT	12
	Антисмысловая	GGTCTGCCCTTTCTCCCTTC	13
Caspase 3	Смысловая	GAGCTTGGAACGGTACGCTA	14
	Антисмысловая	CCGTACCAGAGCGAGATGAC	15
Caspase 8	Смысловая	AACATTCGGAGGCATTTCTGT	16
	Антисмысловая	AGAAGAGCTGTAACCTGTGGC	17
Caspase 9	Смысловая	CTCTGAAGACCTGCAGTCCC	18
	Антисмысловая	CTGCTCCACATTGCCCTACA	19
P53	Смысловая	ACCAGGGCAACTATGGCTTC	20
	Антисмысловая	AGTGGATCCTGGGGATTGTG	21
BAD	Смысловая	CAGCGTACGCACACCTATCC	22
	Антисмысловая	CGGGATCGGACTTCCTCAAG	23
BID	Смысловая	TCTGAGGTCAGCAACGGTTC	24
	Антисмысловая	TTTGTCTTCCTCCGACAGGC	25
BAX	Смысловая	CTGGATCCAAGACCAGGGTG	26
	Антисмысловая	CCTTTCCCCTTCCCCCATTC	27
BCL2	Смысловая	AGCATGCGACCTCTGTTTGA	28
	Антисмысловая	GCCACACGTTTCTTGGCAAT	29
BCL-XL	Смысловая	TTGTACCTGCTTGCTGGTCG	30
	Антисмысловая	CCCGGTTGCTCTGAGACATT	31
BAK	Смысловая	CCTGGGCCAACACGC	32
	Антисмысловая	CTGTGGGCTGAAGCTGTTCTA	33

[00134] Хотя были изложены только некоторые варианты осуществления, альтернативы и модификации будут очевидны из приведенного выше описания для специалистов в данной области техники. Эти и другие альтернативы считаются эквивалентными и находятся в пределах сущности и объема настоящего раскрытия и прилагаемой формулы изобретения.

[00135] Ссылки

[00136] 1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin 2017, 67(1):7-30.

2. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L: Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. Nat Rev Clin Oncol 2016, 13(11):674-690.

3. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L: Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? Nat Rev Clin Oncol 2010, 7(12):683-692.

4. Kundu M, Roy A, Pahan K: Selective neutralization of IL-12 p40 monomer induces death in prostate cancer cells via IL-12-IFN-gamma. Proc Natl Acad Sci U S A 2017, 114(43):11482-11487.

5. Mondal S, Kundu M, Jana M, Roy A, Rangasamy SB, Modi KK, Wallace J, Albalawi YA, Balabanov R, Pahan K: IL-12 p40 monomer is different from other IL-12 family members to selectively inhibit IL-12Rbeta1 internalization and suppress EAE. Proc Natl Acad Sci U S A 2020, 117(35):21557-21567.

6. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH: The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. Annu Rev Immunol 1998, 16:495-521.

7. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T et al: Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature 2003, 421(6924):744-748.

8. Brahmachari S, Pahan K: Role of cytokine p40 family in multiple sclerosis. Minerva Med 2008, 99(2):105-118.

9. Jana M, Dasgupta S, Pal U, Pahan K: IL-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, induces nitric oxide synthase in microglia via IL-12R beta 1. Glia 2009, 57(14):1553-1565.

10. Dasgupta S, Bandopadhyay M, Pahan K: Generation of functional blocking monoclonal antibodies against mouse interleukin-12 p40 homodimer and monomer. Hybridoma (Larchmt) 2008, 27(3):141-151.

11. Mondal S, Roy A, Pahan K: Functional blocking monoclonal antibodies against IL-12p40 homodimer inhibit adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol 2009, 182(8):5013-5023.

12. Mondal S, Pahan K: Cinnamon ameliorates experimental allergic encephalomyelitis in mice via regulatory T cells: implications for multiple sclerosis therapy. PLoS One 2015, 10(1):e0116566.

13. Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K: Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104(47):18754-18759.

14. Corbett GT, Roy A, Pahan K: Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, upregulates IL-1 receptor antagonist in mouse cortical neurons: implications for neuronal self-defense. J Immunol

2012, 189(2):1002-1013.

15. Jana A, Pahan K: Fibrillar amyloid-beta-activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. J Neurosci 2010, 30(38):12676-12689.

16. Modi KK, Roy A, Brahmachari S, Rangasamy SB, Pahan K: Cinnamon and Its Metabolite Sodium Benzoate Attenuate the Activation of p21rac and Protect Memory and Learning in an Animal Model of Alzheimer's Disease. PLoS One 2015, 10(6):e0130398.

17. Rangasamy SB, Jana M, Roy A, Corbett GT, Kundu M, Chandra S, Mondal S, Dasarathi S, Mufson EJ, Mishra RK et al: Selective disruption of TLR2-MyD88 interaction inhibits inflammation and attenuates Alzheimer's pathology. J Clin Invest 2018, 128(10):4297-4312.

18. Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ: Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. J Exp Med 1995, 181(1):381-386.

19. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L et al: Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest 2006, 116(5):1317-1326.

20. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P: Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. Cell 1990, 60(3):397-403.

21. Goedegebuure PS, Eberlein TJ: The role of CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. Immunol Res 1995, 14(2):119-131.

22. Pockaj BA, Sherry RM, Wei JP, Yannelli JR, Carter CS, Leitman SF, Carasquillo JA, Steinberg SM, Rosenberg SA, Yang JC: Localization of 111indium-labeled tumor infiltrating lymphocytes to tumor in patients receiving adoptive immunotherapy. Augmentation with cyclophosphamide and correlation with response. Cancer 1994, 73(6):1731-1737.

23. Li J, Jie HB, Lei Y, Gildener-Leapman N, Trivedi S, Green T, Kane LP, Ferris RL: PD-1/SHP-2 inhibits Tc1/Th1 phenotypic responses and the activation of T cells in the tumor microenvironment. Cancer Res 2015, 75(3):508-518.

24. Coleman CB, Lang J, Sweet LA, Smith NA, Freed BM, Pan Z, Haverkos B, Pelanda R, Rochford R: Epstein-Barr Virus Type 2 Infects T Cells and Induces B Cell Lymphomagenesis in Humanized Mice. J Virol 2018, 92(21).

25. Serr I, Furst RW, Achenbach P, Scherm MG, Gokmen F, Haupt F, Sedlmeier EM, Knopff A, Shultz L, Willis RA et al: Type 1 diabetes vaccine candidates promote human Foxp3(+)Treg induction in humanized mice. Nat Commun 2016, 7:10991.

26. Rosato RR, Davila-Gonzalez D, Choi DS, Qian W, Chen W, Kozielski AJ, Wong H, Dave B, Chang JC: Evaluation of anti-PD-1-based therapy against triple-negative breast cancer patient-derived xenograft tumors engrafted in humanized mouse models. Breast Cancer Res 2018, 20(1):108.

27. Najima Y, Tomizawa-Murasawa M, Saito Y, Watanabe T, Ono R, Ochi T, Suzuki N,

Fujiwara H, Ohara O, Shultz LD et al: Induction of WT1-specific human CD8+ T cells from human HSCs in HLA class I Tg NOD/SCID/IL2rgKO mice. Blood 2016, 127(6):722-734.

28. Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS, Xue C: High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. Onco Targets Ther 2014, 7:1475-1480.

29. Santoni M, Romagnoli E, Saladino T, Foghini L, Guarino S, Capponi M, Giannini M, Cognigni PD, Ferrara G, Battelli N: Triple negative breast cancer: Key role of Tumor-Associated Macrophages in regulating the activity of anti-PD-1/PD-L1 agents. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2018, 1869(1):78-84.

30. Han Y, Liu D, Li L: PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. Am J Cancer Res 2020, 10(3):727-742.

31. Emens LA: Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. Clin Cancer Res 2018, 24(3):511-520.

32. Marra A, Viale G, Curigliano G: Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. BMC Med 2019, 17(1):90.

33. Ngiow SF, Teng MW, Smyth MJ: A balance of interleukin-12 and -23 in cancer. Trends Immunol 2013, 34(11):548-555.

34. Mukai S, Kjaergaard J, Shu S, Plautz GE: Infiltration of tumors by systemically transferred tumor-reactive T lymphocytes is required for antitumor efficacy. Cancer Res 1999, 59(20):5245-5249.

35. Tanaka H, Yoshizawa H, Yamaguchi Y, Ito K, Kagamu H, Suzuki E, Gejyo F, Hamada H, Arakawa M: Successful adoptive immunotherapy of murine poorly immunogenic tumor with specific effector cells generated from gene-modified tumor-primed lymph node cells. J Immunol 1999, 162(6):3574-3582.

36. Chang AE, Yoshizawa H, Sakai K, Cameron MJ, Sondak VK, Shu S: Clinical observations on adoptive immunotherapy with vaccine-primed T-lymphocytes secondarily sensitized to tumor in vitro. Cancer Res 1993, 53(5):1043-1050.

37. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR: Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. Nature 1998, 393(6684):478-480.

38. Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, Scott B: Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. J Immunol 2000, 165(11):6047-6055.

39. Marzo AL, Lake RA, Robinson BW, Scott B: T-cell receptor transgenic analysis of tumor-specific CD8 and CD4 responses in the eradication of solid tumors. Cancer Res 1999, 59(5):1071-1079.

40. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guilliams M, Misharin A et al: Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity 2013, 38(1):79-91.

41. Van Overmeire E, Laoui D, Keirsse J, Bonelli S, Lahmar Q, Van Ginderachter JA: STAT of the union: dynamics of distinct tumor-associated macrophage subsets governed by

STAT1. Eur J Immunol 2014, 44(8):2238-2242.

42. Qian BZ, Pollard JW: Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell 2010, 141(1):39-51.

43. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, Olson OC, Quick ML, Huse JT, Teijeiro V et al: CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. Nat Med 2013, 19(10):1264-1272.

44. Santarpia M, Gonzalez-Cao M, Viteri S, Karachaliou N, Altavilla G, Rosell R: Programmed cell death protein-1/programmed cell death ligand-1 pathway inhibition and predictive biomarkers: understanding transforming growth factor-beta role. Transl Lung Cancer Res 2015, 4(6):728-742.

45. Zhang X, Zeng Y, Qu Q, Zhu J, Liu Z, Ning W, Zeng H, Zhang N, Du W, Chen C et al: PD-L1 induced by IFN-gamma from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer. Int J Clin Oncol 2017, 22(6):1026-1033.

46. Arlauckas SP, Garris CS, Kohler RH, Kitaoka M, Cuccarese MF, Yang KS, Miller MA, Carlson JC, Freeman GJ, Anthony RM et al: In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. Sci Transl Med 2017, 9(389).

47. Ljunggren HG, Jonsson R, Hoglund P: Seminal immunologic discoveries with direct clinical implications: The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine honours discoveries in cancer immunotherapy. Scand J Immunol 2018, 88(6):e12731.

48. Messenheimer DJ, Jensen SM, Afentoulis ME, Wegmann KW, Feng Z, Friedman DJ, Gough MJ, Urba WJ, Fox BA: Timing of PD-1 Blockade Is Critical to Effective Combination Immunotherapy with Anti-OX40. Clin Cancer Res 2017, 23(20):6165-6177.

49. Sun S, Fei X, Mao Y, Wang X, Garfield DH, Huang O, Wang J, Yuan F, Sun L, Yu Q et al: PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2014, 63(4):395-406.

50. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, Wang-Gillam A, Goedegebuure SP, Linehan DC, DeNardo DG: CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. Cancer Res 2014, 74(18):5057-5069.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения тройного негативного рака молочной железы (TNBC), причем способ включает введение нуждающемуся в таком лечении субъекту композиции, содержащие терапевтически эффективное количество антител против мономеров p40 или его иммунологически активных фрагментов.

2. Способ по п. 1, в котором антитело или его иммунологически активный фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его иммунологически активный фрагмент.

3. Способ по п. 1, в котором антитело против мономера p40 или его иммунологически активный фрагмент выбирают из группы, состоящей из поликлональных, моноклональных, человеческих, гуманизированных и химерных антител; одноцепочечных антител; и эпитопсвязывающих фрагментов антител.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором антитело или его иммунологически активный фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его иммунологически активный фрагмент.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором композиция дополнительно содержит пептид, содержащий взаимодействующий с TLR2 домен MyD88 (TIDM).

6. Способ по п. 5, в котором пептид TIDM содержит последовательность PGAHQK (SEQ ID NO: 1).

7. Способ по п. 5 или 6, в котором пептид TIDM содержит от 8 до 10 аминокислот.

8. Способ по любому из пп. 5-7, в котором пептид TIDM дополнительно содержит гомеодомен Antennapedia.

9. Способ по п. 8, в котором гомеодомен Antennapedia связывается с амино-концом или карбокси-концом пептида TIDM.

10. Способ по п. 9, в котором последовательность пептида TIDM представляет собой drqikiwfqnrrmkwkkPGAHQK (SEQ ID NO: 3).

11. Способ по любому из пп. 1-4, в котором композиция дополнительно содержит пептид, содержащий связывающий NEMO домен (NBD).

12. Способ по п. 11, в котором пептид NBD содержит последовательность LDWSWL (SEQ ID NO: 6).

13. Способ по п. 11 или 12, в котором пептид NBD содержит от 8 до 10 аминокислот.

14. Способ по любому из пп. 11-13, в котором пептид NBD дополнительно содержит гомеодомен Antennapedia.

15. Способ по п. 14, в котором гомеодомен Antennapedia связывается с амино-концом или карбокси-концом пептида NBD.

16. Способ по п. 15, в котором последовательность пептида NBD представляет собой drqikiwfqnrrmkwkkLDWSWL (SEQ ID NO: 7).

17. Способ лечения рака, причем способ включает введение нуждающемуся в таком лечении субъекту композиции, содержащие терапевтически эффективное

количество антител против мономеров p40 или его иммунологически активных фрагментов и связывающих домены пептидов.

18. Способ по п. 17, в котором пептид связывающего домена содержит пептид взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM) или пептид связывающего NEMO домена (NBD).

19. Способ по п. 18, в котором пептид TIDM содержит последовательность PGAHQK (SEQ ID NO: 1).

20. Способ по п. 18, в котором пептид NBD содержит последовательность LDWSWL (SEQ ID NO: 6).

21. Способ по любому из пп. 17-20, в котором пептид TIDM или пептид NBD содержит от 8 до 10 аминокислот.

22. Способ по любому из пп. 17-21, в котором пептид TIDM или пептид NBD дополнительно содержит гомеодомен Antennapedia.

23. Способ по п. 22, в котором гомеодомен Antennapedia связывается с амино-концом или карбокси-концом пептида TIDM или пептида NBD.

24. Способ по п. 22, в котором последовательность пептида TIDM представляет собой drqikiwfqnrrmkwkkPGAHQK (SEQ ID NO: 3).

25. Способ по п. 15, в котором последовательность пептида NBD представляет собой drqikiwfqnrrmkwkkLDWSWL (SEQ ID NO: 7).

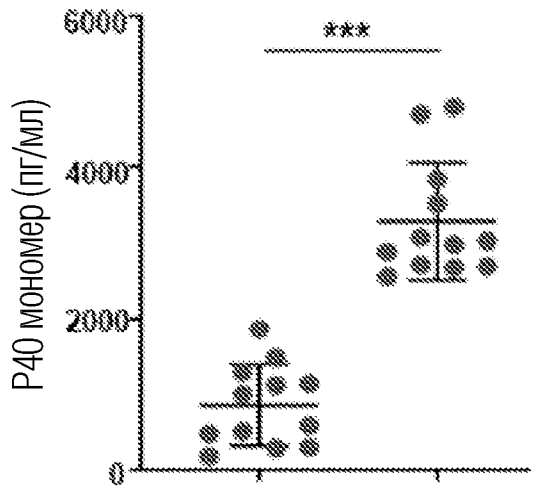
26. Способ по любому из пп. 17-25, в котором антитело или его иммунологически активный фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его иммунологически активный фрагмент.

27. Способ по любому из пп. 17-25, в котором антитело против мономера p40 или его иммунологически активный фрагмент выбирают из группы, состоящей из поликлональных, моноклональных, человеческих, гуманизированных и химерных антител; одноцепочечных антител; и эпитопсвязывающих фрагментов антител.

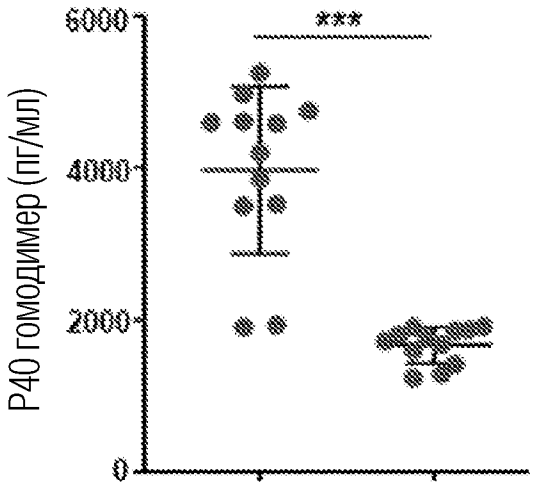
28. Способ по любому из пп. 17-27, в котором антитело или его иммунологически активный фрагмент представляет собой гуманизированное антитело или его иммунологически активный фрагмент.

29. Способ по любому из пп. 17-28, в котором рак выбирают из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака молочной железы не типов TNBC, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника и других видов рака, которые сверхэкспрессируют мономер p40.

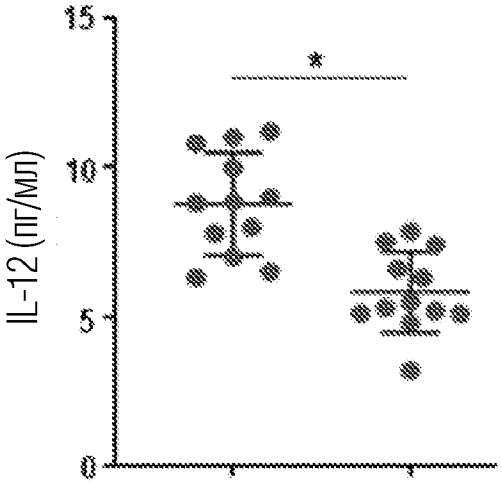
ФИГ. 1A



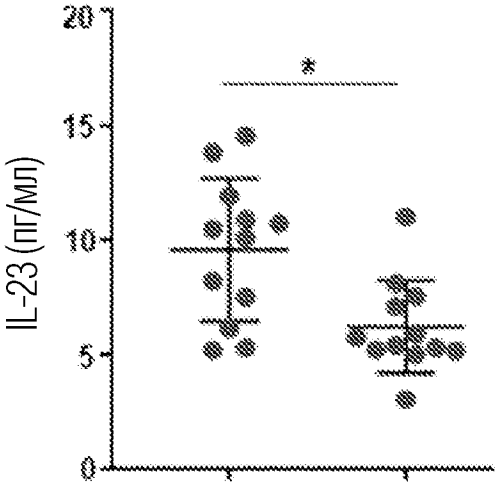
ФИГ. 1B



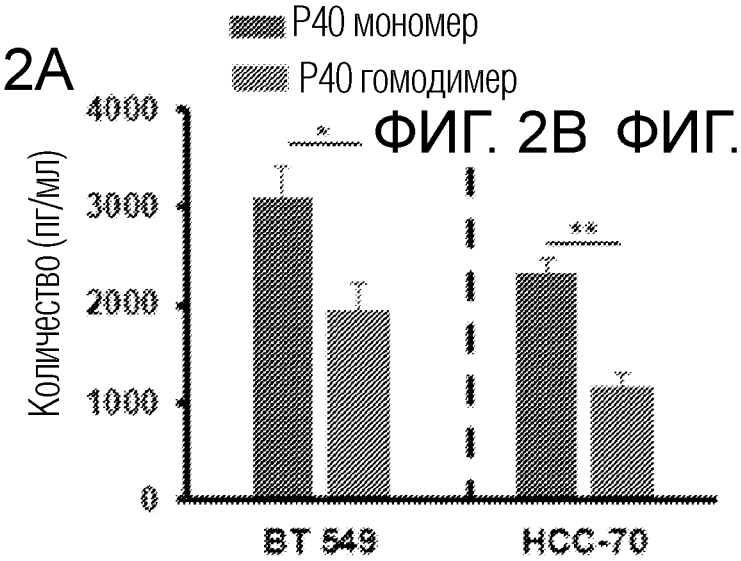
ФИГ. 1C



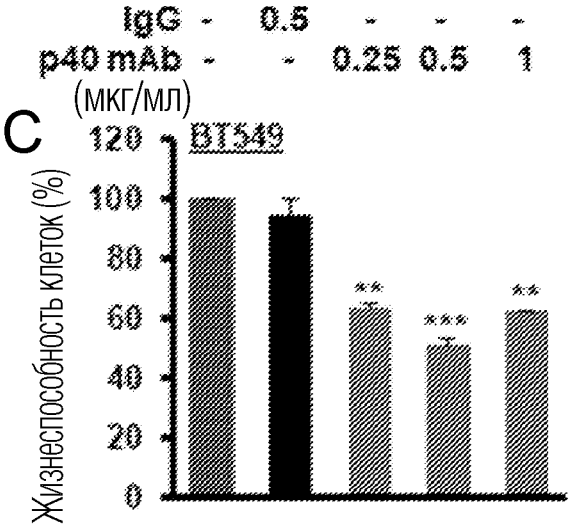
ФИГ. 1D



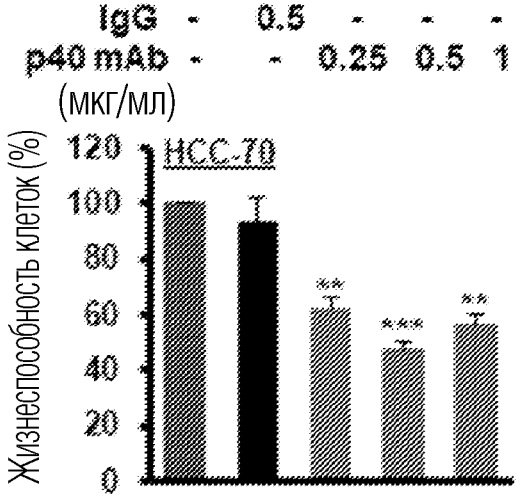
ФИГ. 2A



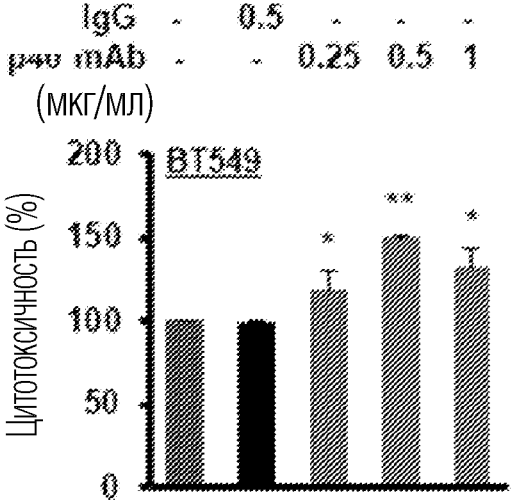
ФИГ. 2B ФИГ. 2C



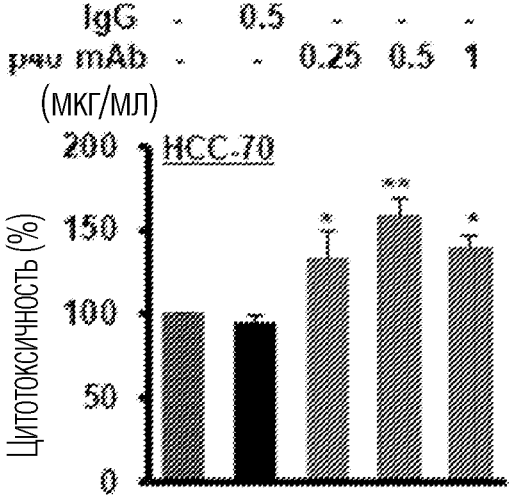
ФИГ. 2D



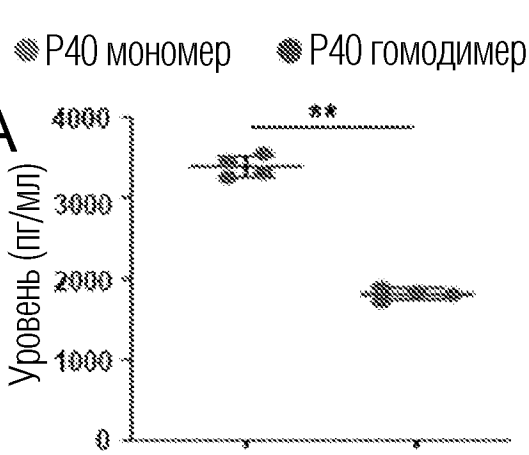
ФИГ. 2E



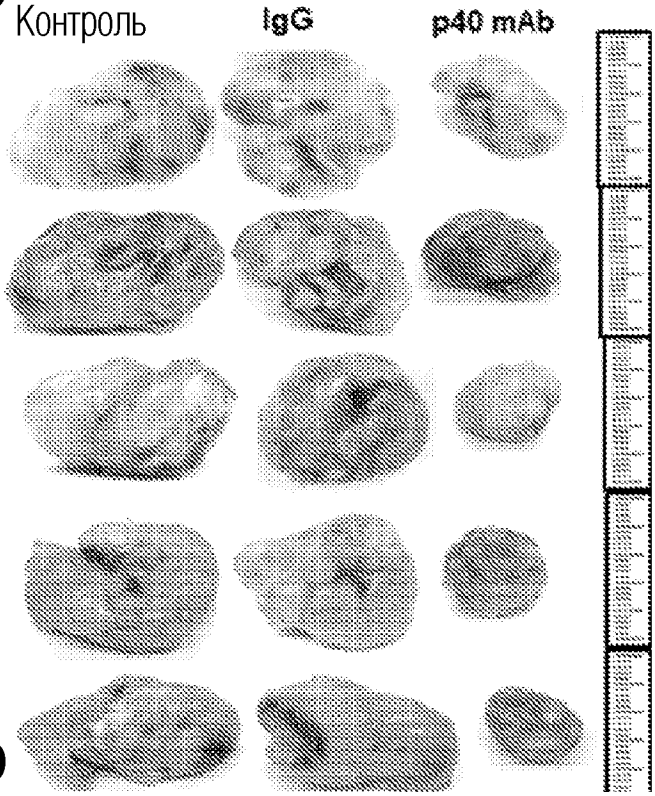
ФИГ. 2F



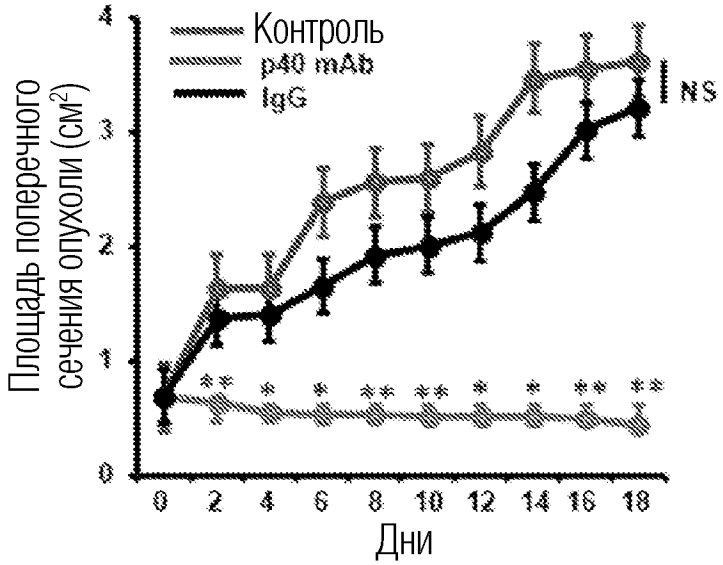
ФИГ. 3A



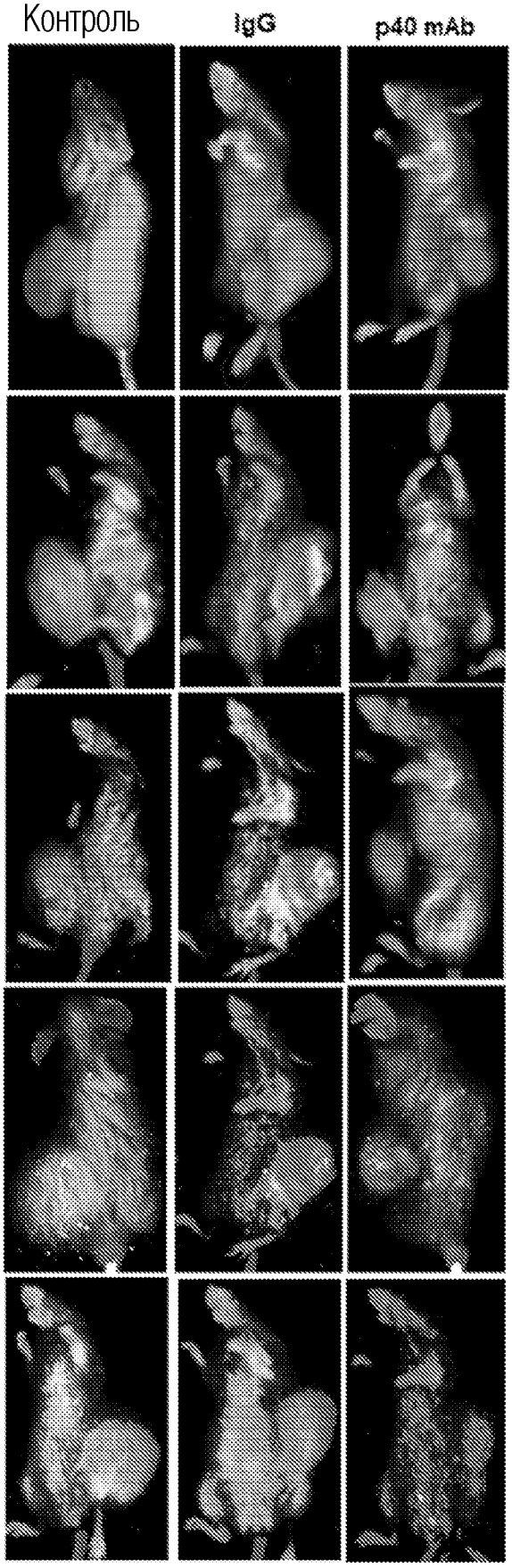
ФИГ. 3C



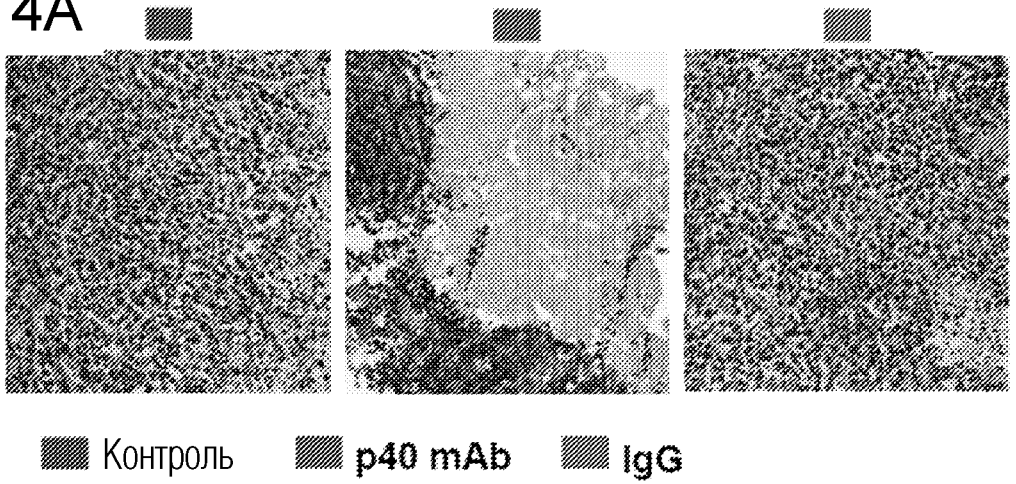
ФИГ. 3D



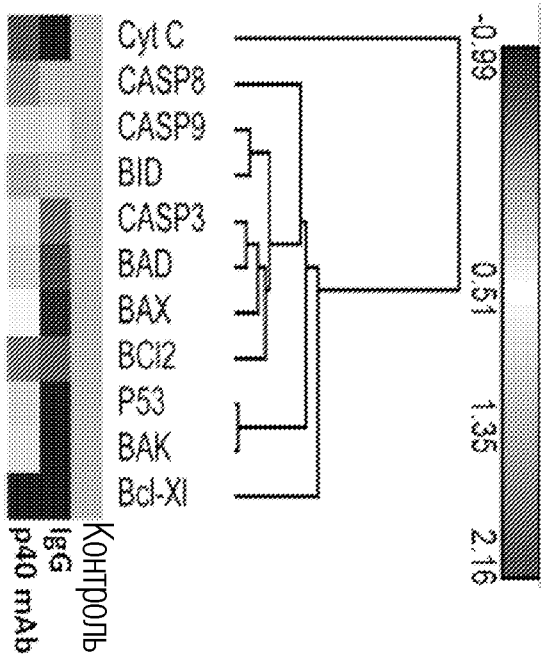
ФИГ. 3В



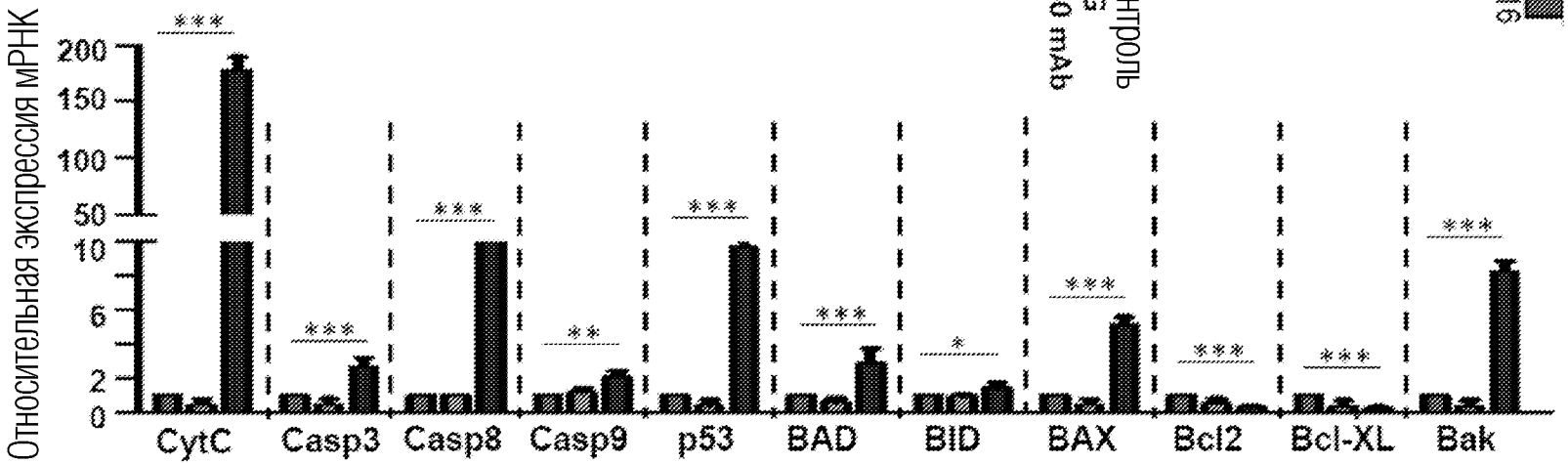
ФИГ. 4А



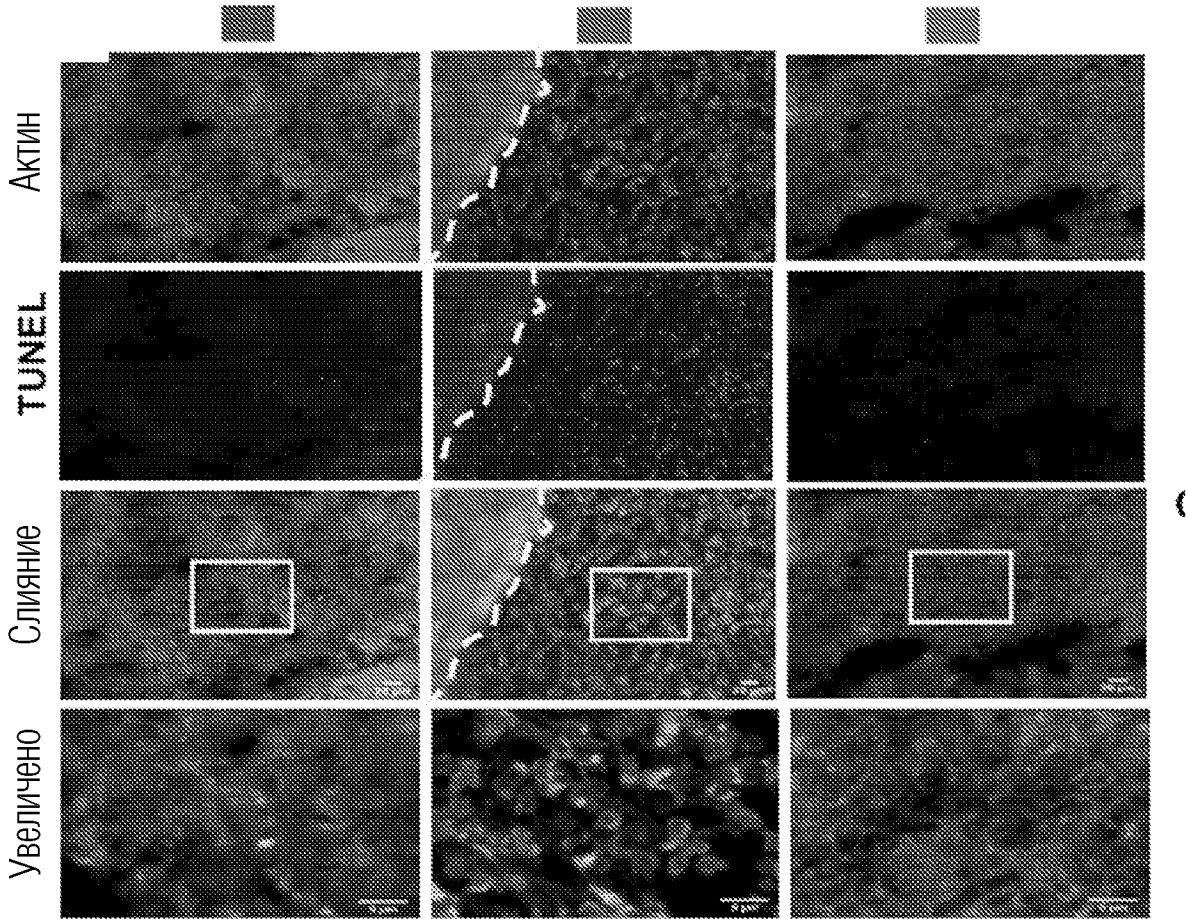
ФИГ. 4В



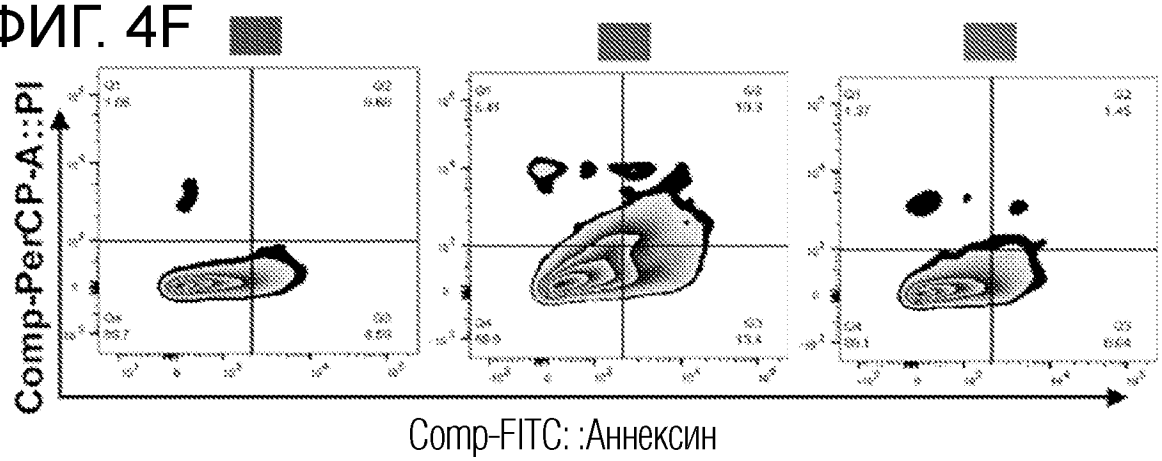
ФИГ. 4С



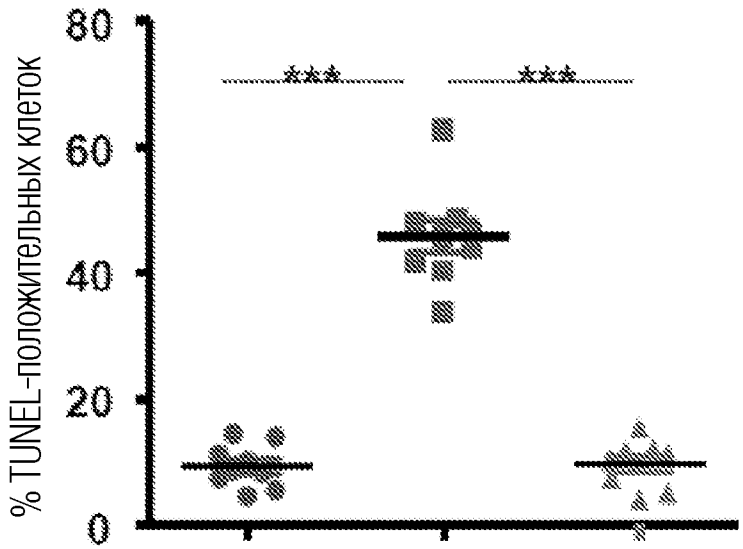
ФИГ. 4D


Актин
TUNEL
Слияние
Увеличено

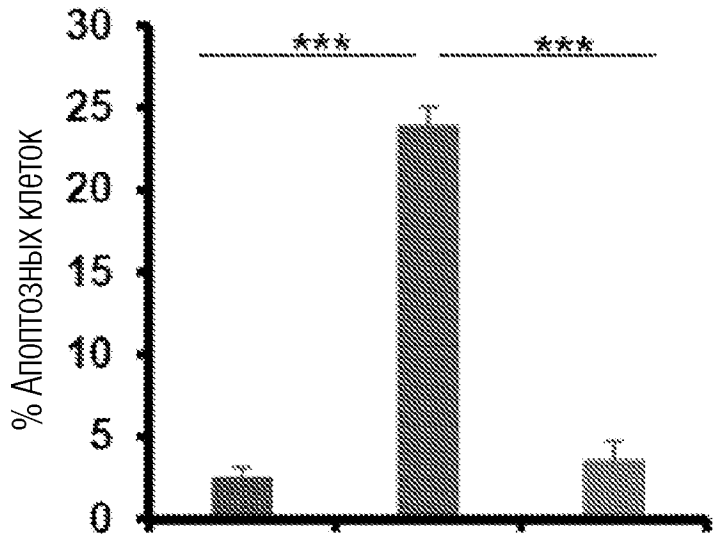
ФИГ. 4F


Comp-PerCP-A::PI
Comp-FITC: :Аннексин

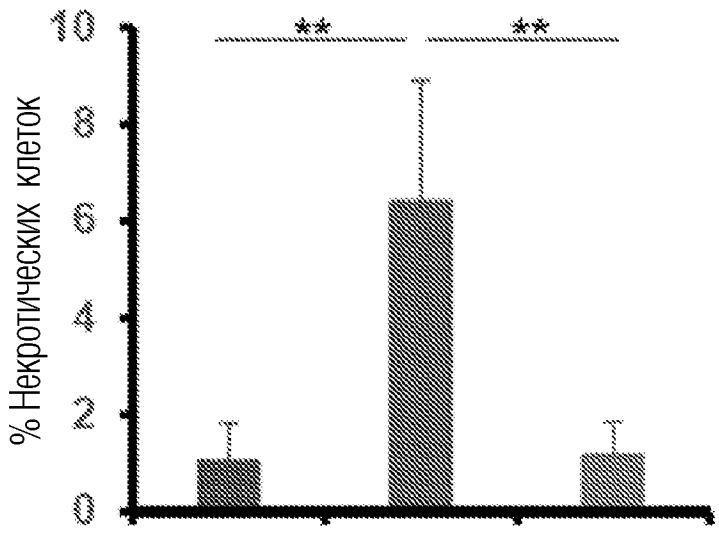
ФИГ. 4E



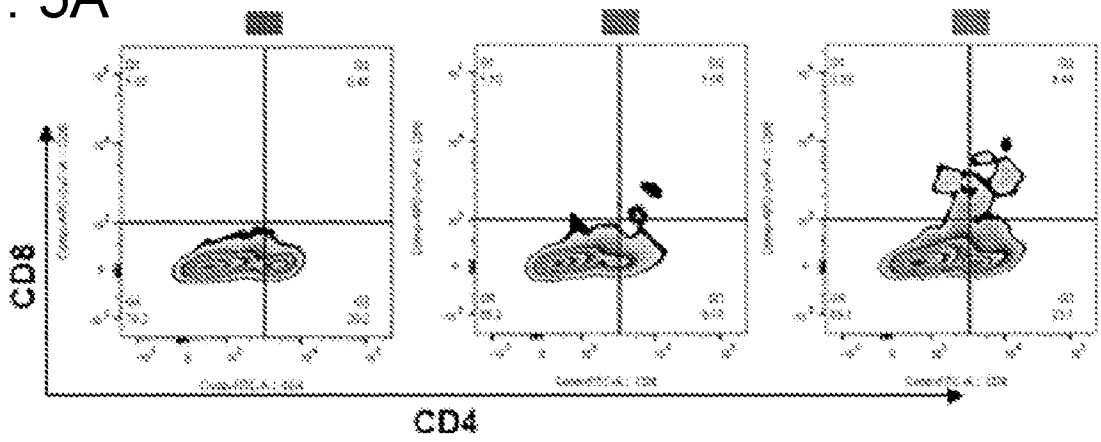
ФИГ. 4G



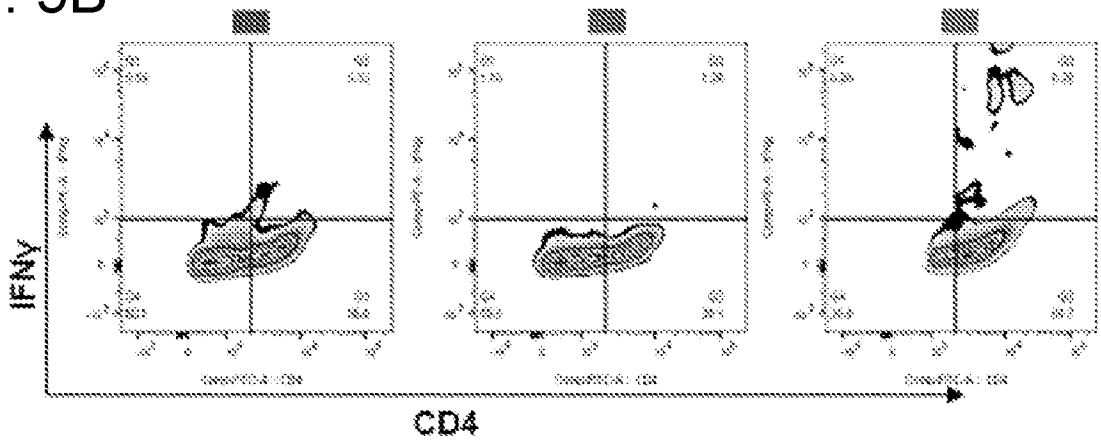
ФИГ. 4H



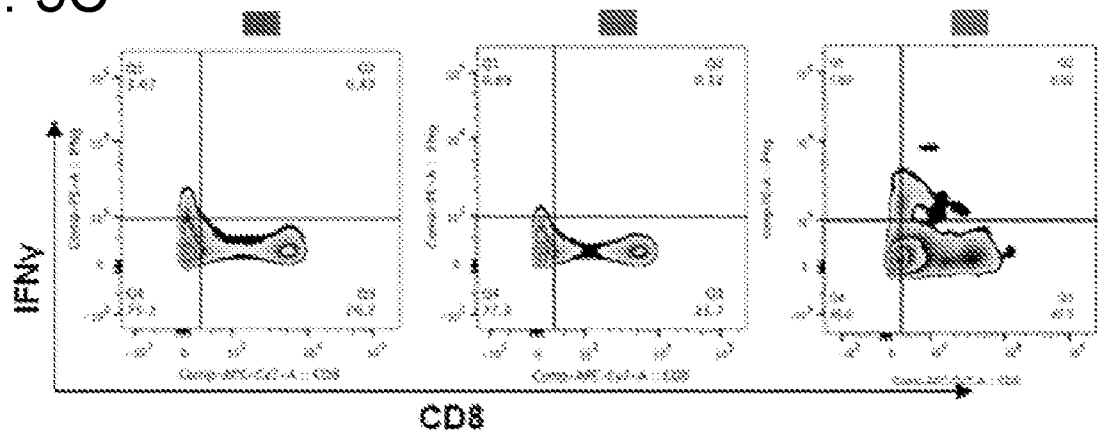
ФИГ. 5A



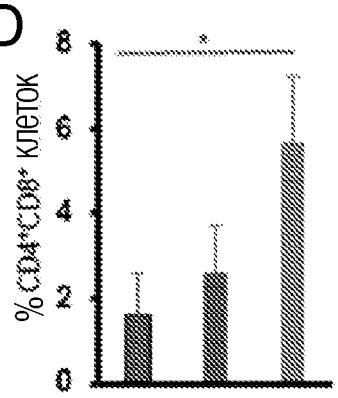
ФИГ. 5B



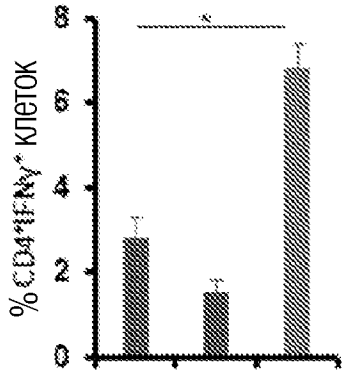
ФИГ. 5C



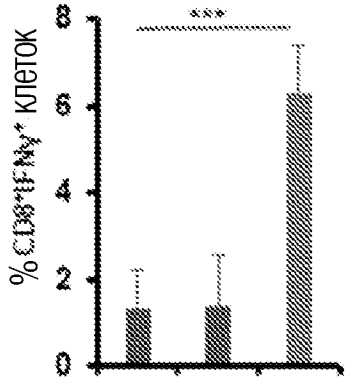
ФИГ. 5D



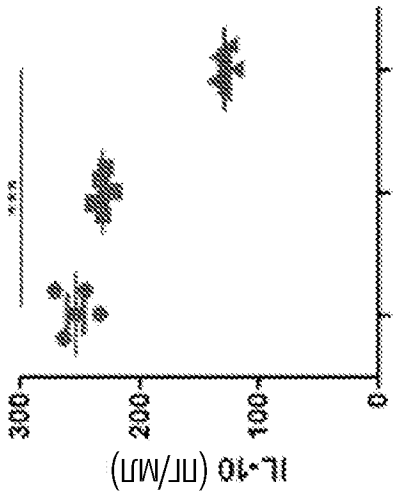
ФИГ. 5E



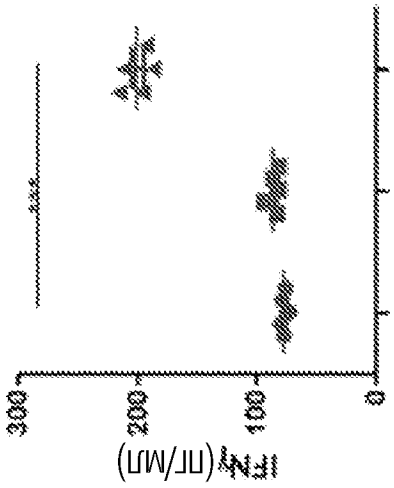
ФИГ. 5F



ФИГ. 5H



ФИГ. 5G

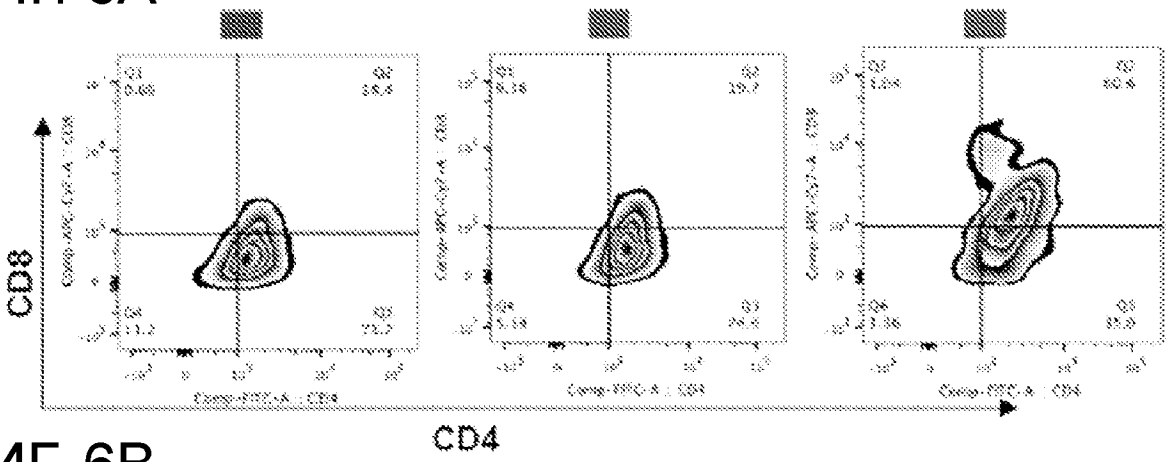


Контроль

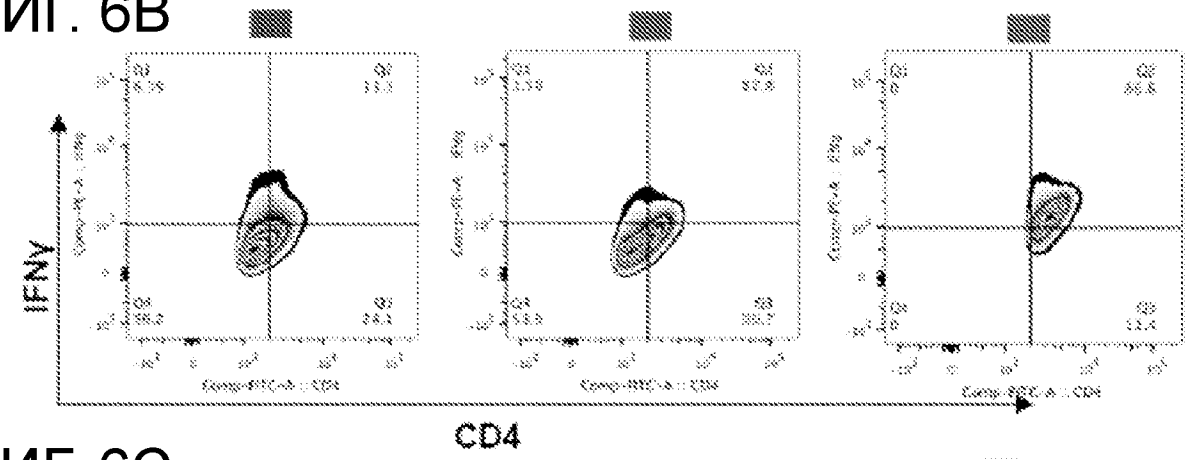
IgG

p40 mAb

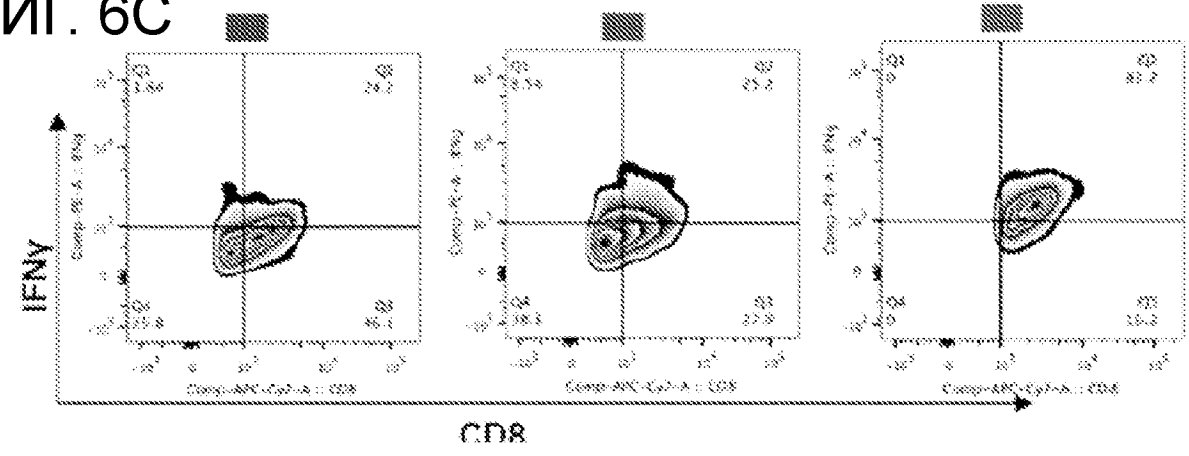
ФИГ. 6A



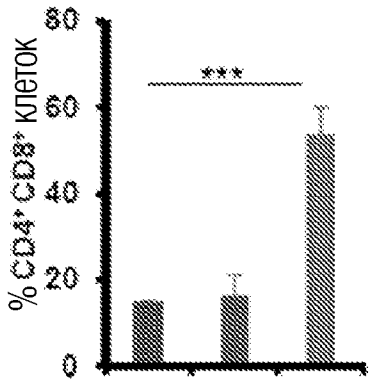
ФИГ. 6B



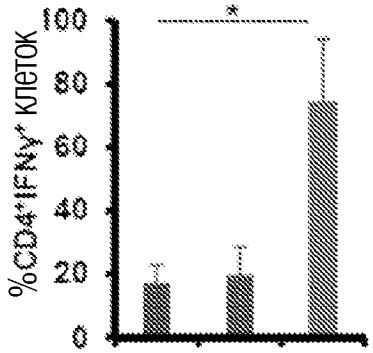
ФИГ. 6C



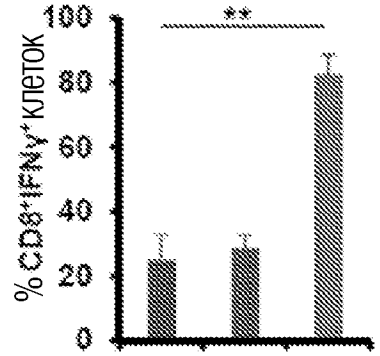
ФИГ. 6D

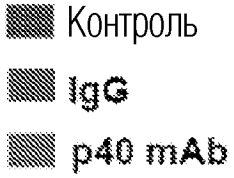


ФИГ. 6E

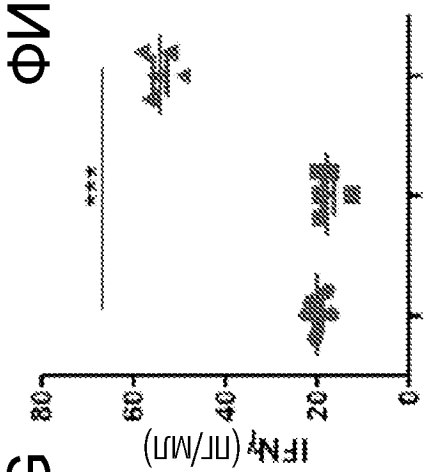


ФИГ. 6F

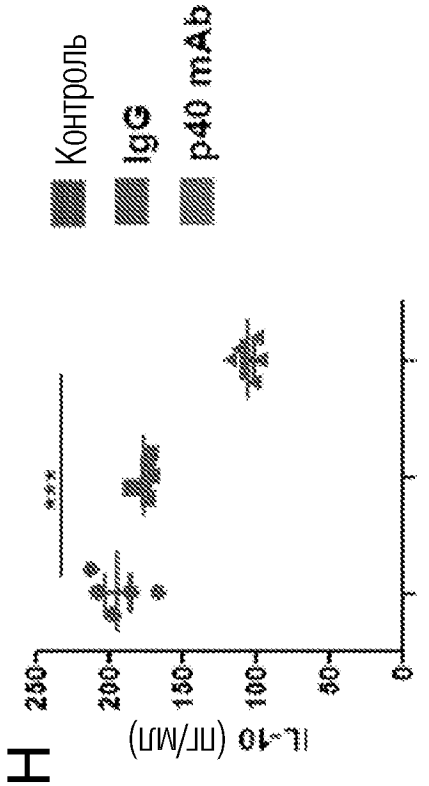




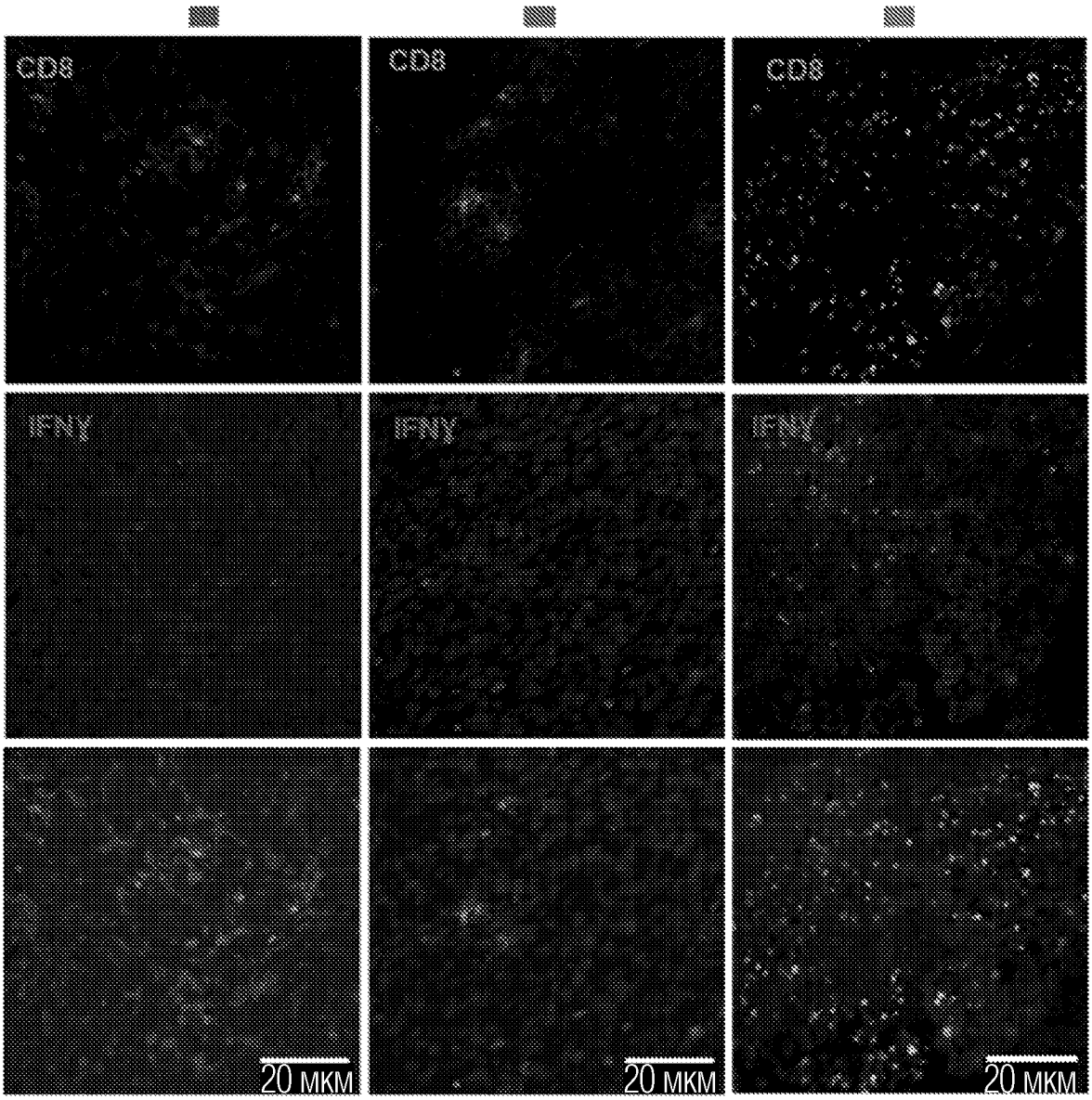
ФИГ. 6G



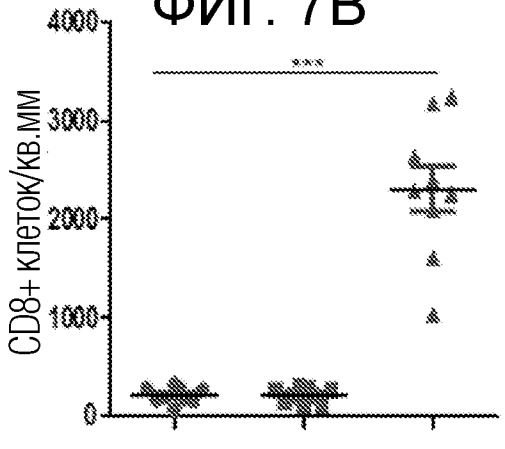
ФИГ. 6H



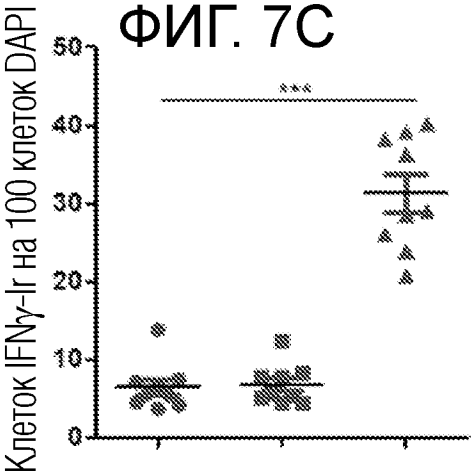
ФИГ. 7A

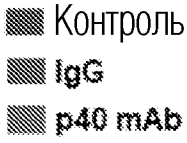


ФИГ. 7B

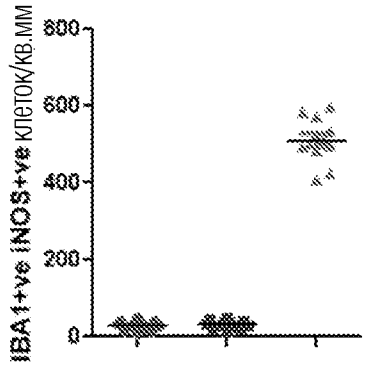


ФИГ. 7C

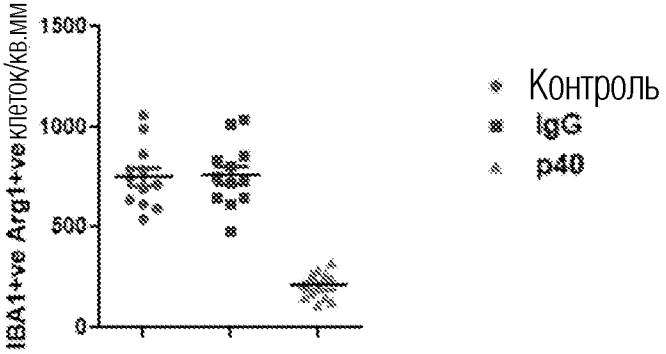




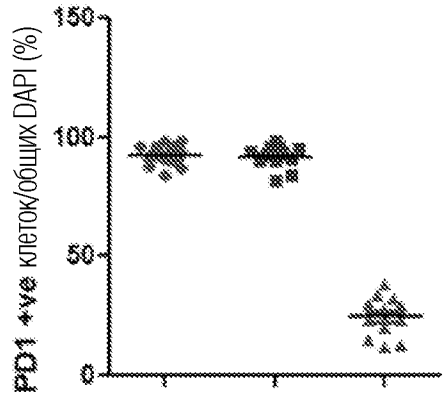
ФИГ. 8А



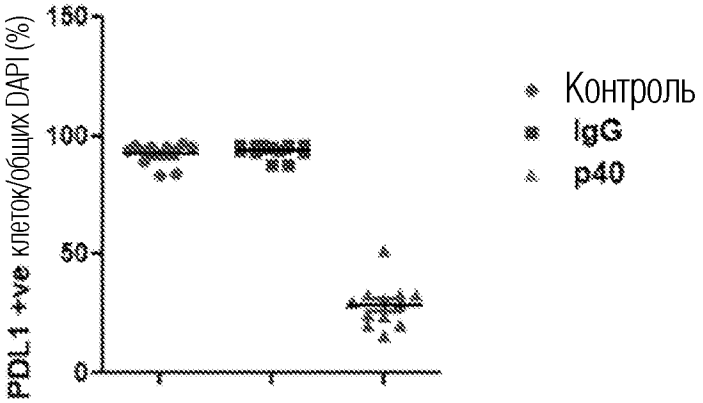
ФИГ. 8В



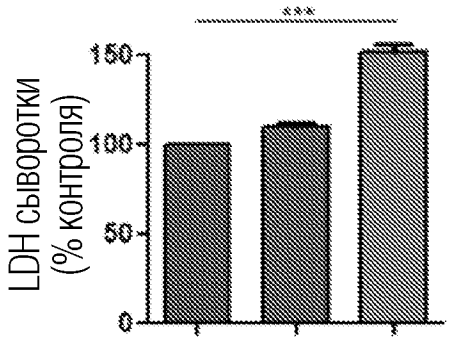
ФИГ. 9А



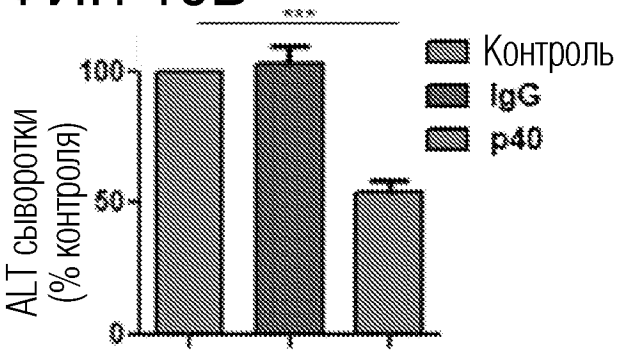
ФИГ. 9В



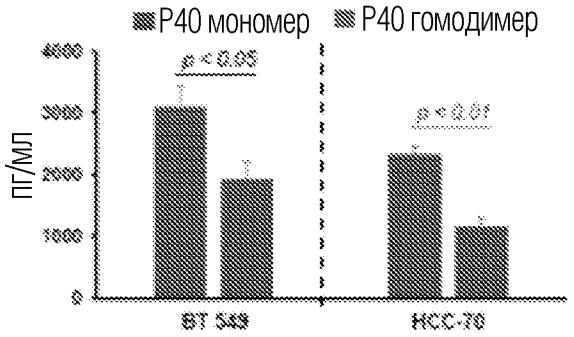
ФИГ. 10А



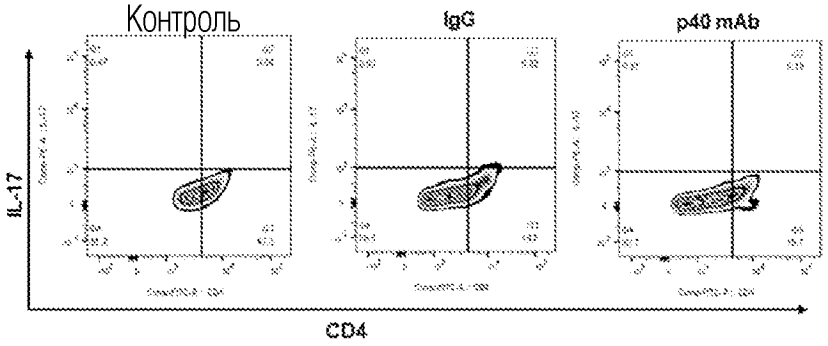
ФИГ. 10В



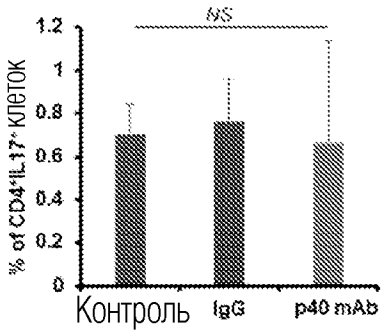
ФИГ. 11



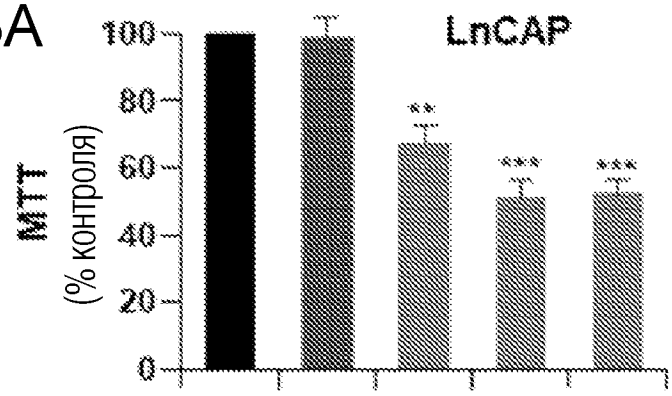
ФИГ. 12А



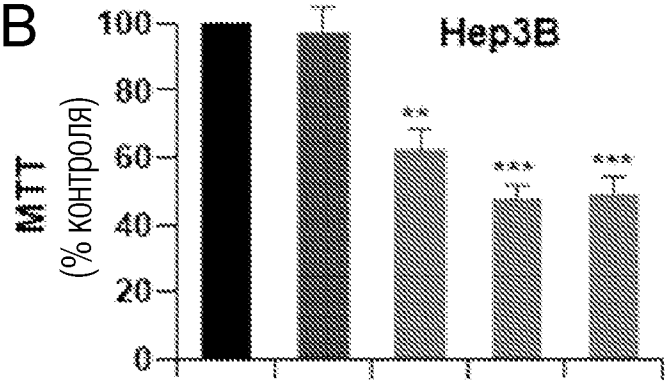
ФИГ. 12В



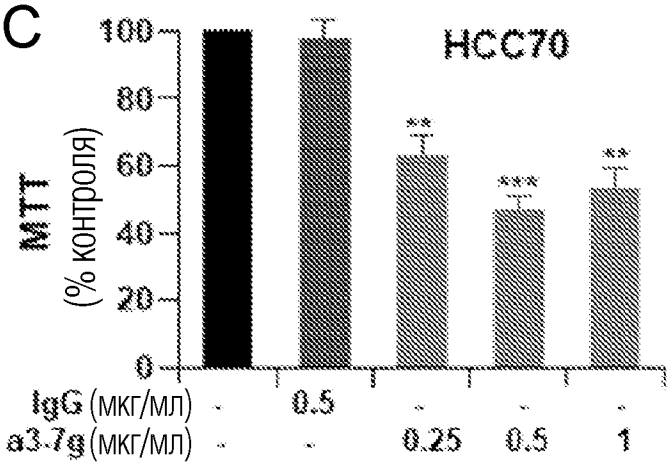
ФИГ. 13A



ФИГ. 13B



ФИГ. 13C

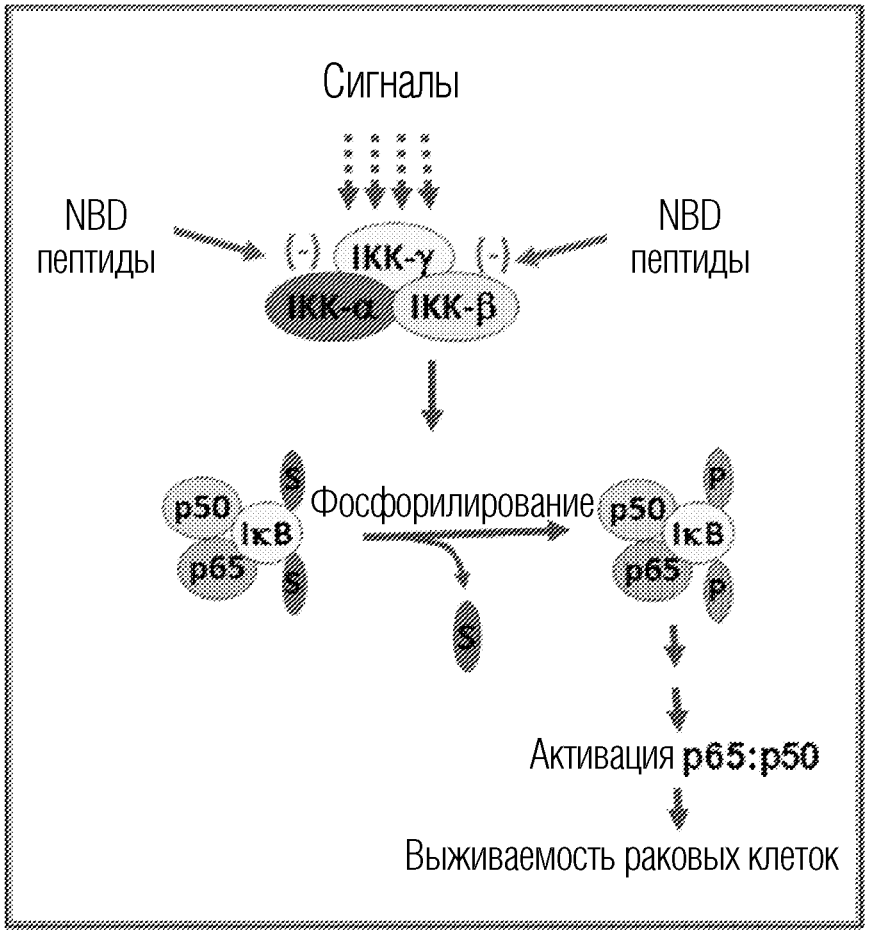


- IKKγ является регуляторной субъединицей (NF-κB существенный модификатор (NEMO)
- NEMO играет важную роль в провоспалительной активации комплекса IKK
- Короткий проникающий в клетки пептид, включающий в себя IKKβ и IKKα, нарушает связь NEMO с IKKβ и IKKα

Дикий тип: drqikiwfqnrrmkwkk LDWSWL
Мутант: drqikiwfqnrrmkwkk LDASAL

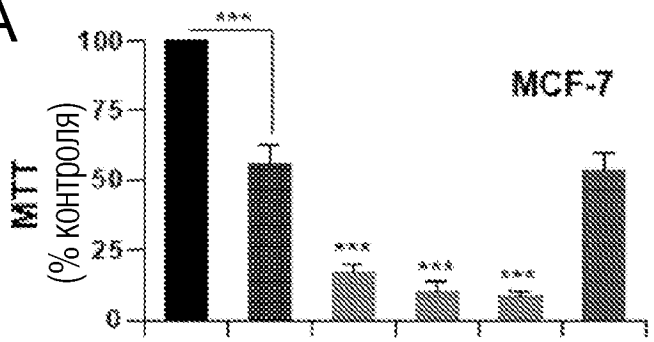
Antennapedia
гомеодомен

NBD пептид
(Pahan lab, 2007, PNAS, 104: 18754-18759)

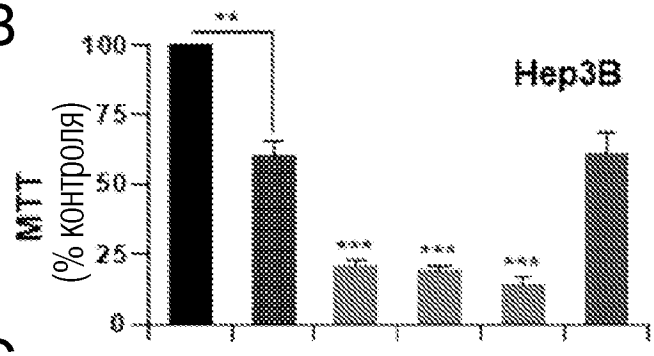


ФИГ. 14 Пептид связывающего NEMO домена (NBD), селективный ингибитор классической активации NF-kB

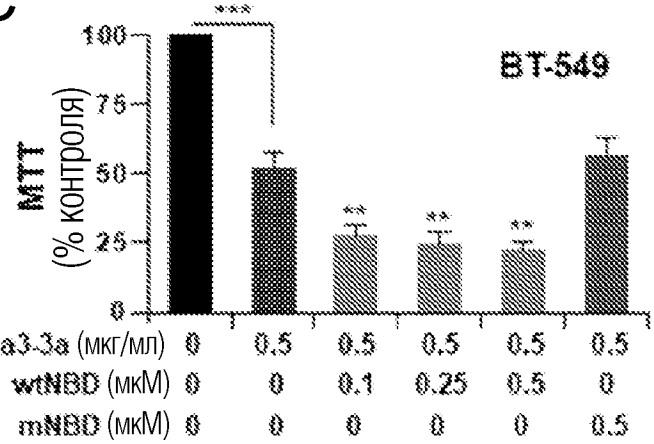
ФИГ. 15A



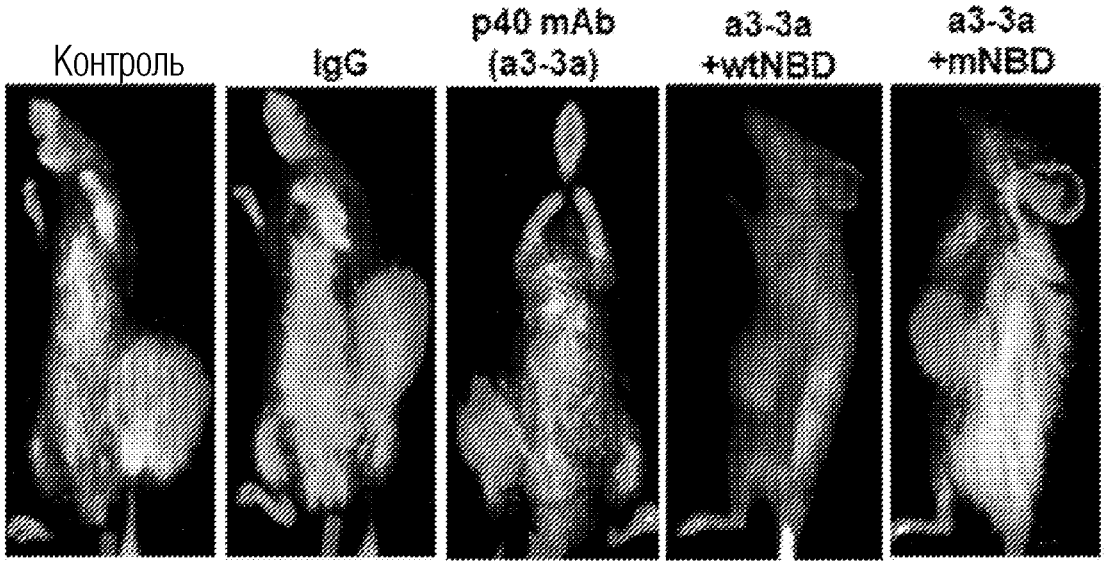
ФИГ. 15B



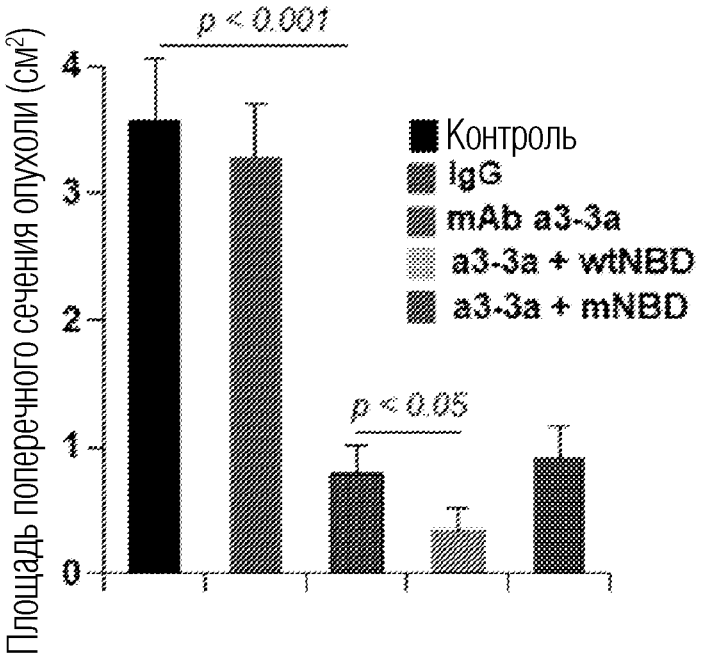
ФИГ. 15C



ФИГ. 16A

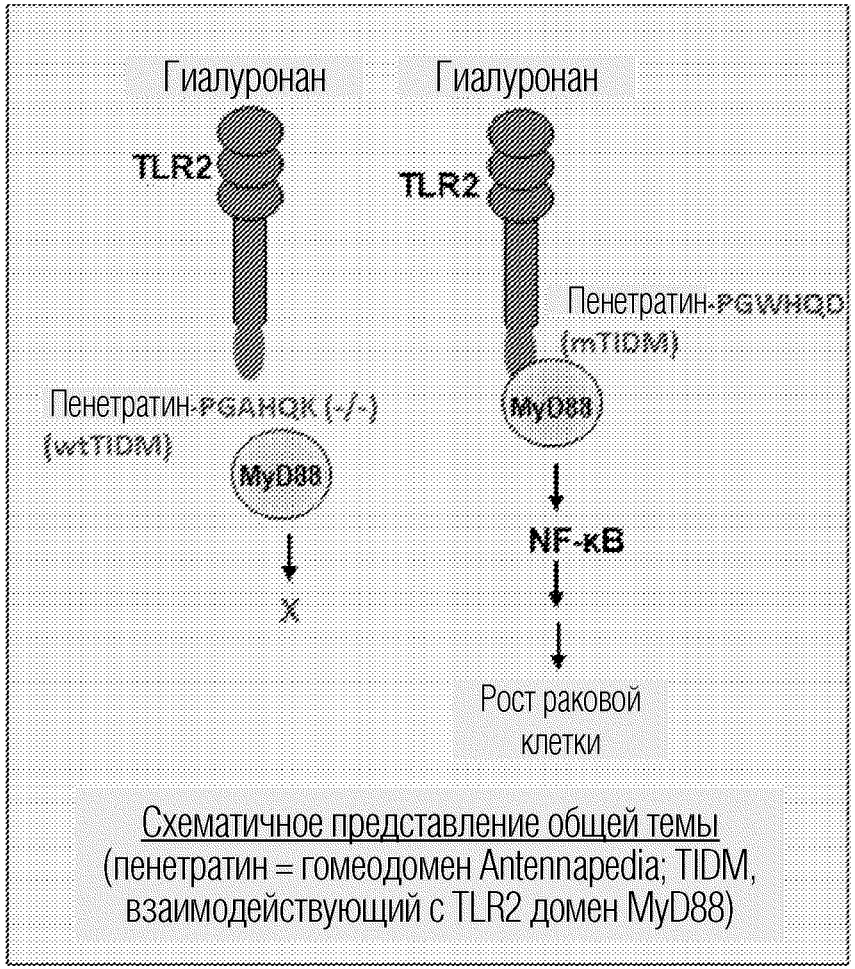


ФИГ. 16B



Гиалуронан играет важную роль на всех стадиях рака. Гиалуронан взаимодействует с множеством рецепторов клеточной поверхности, включая TLR2, что способствует жизнеспособности и пролиферации раковых клеток

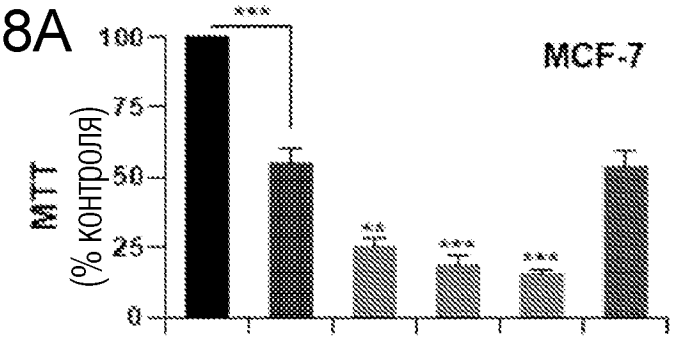
TIDM пептид
(Pahan lab, 2018, J. Clin. Invest., 128: 4297-4312)



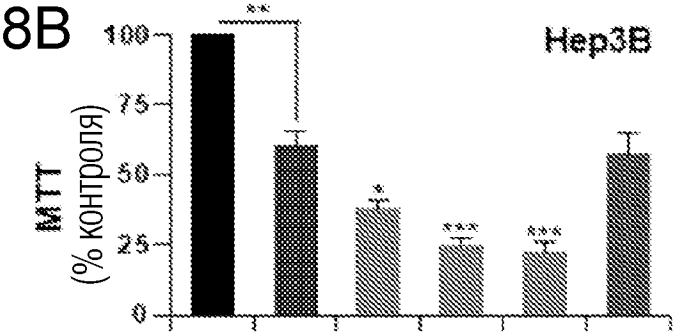
Схематичное представление общей темы
(пенетратин = гомеодомен Antennapedia; TIDM, взаимодействующий с TLR2 домен MyD88)

ФИГ. 17 Пептид взаимодействующего с TLR2 домена MyD88 (TIDM), селективный ингибитор индуцированной активации TLR2

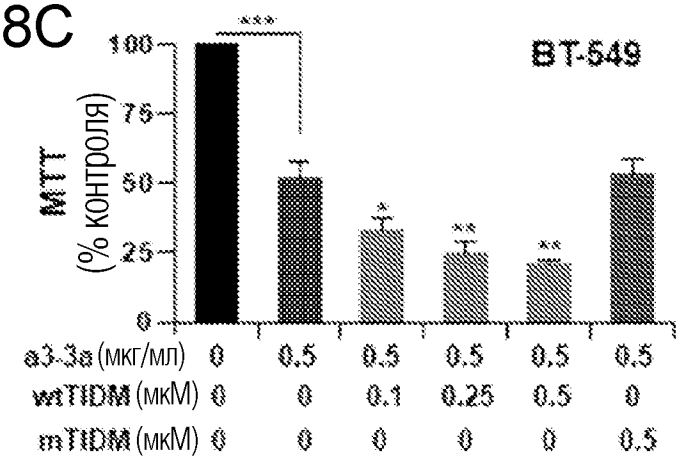
ФИГ. 18A



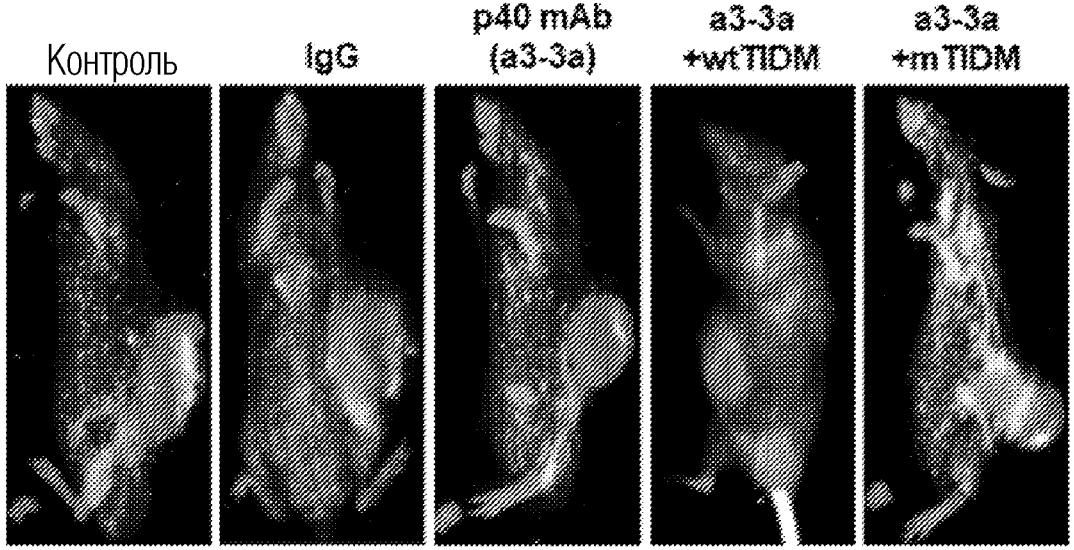
ФИГ. 18B



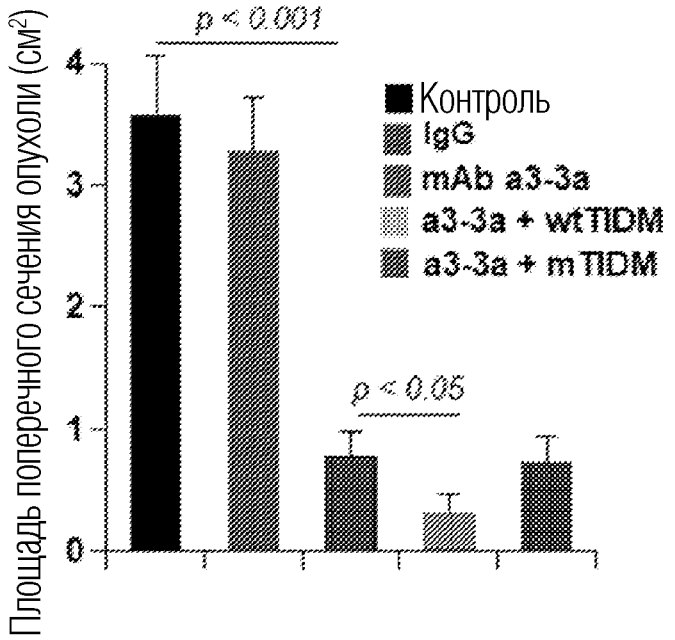
ФИГ. 18C



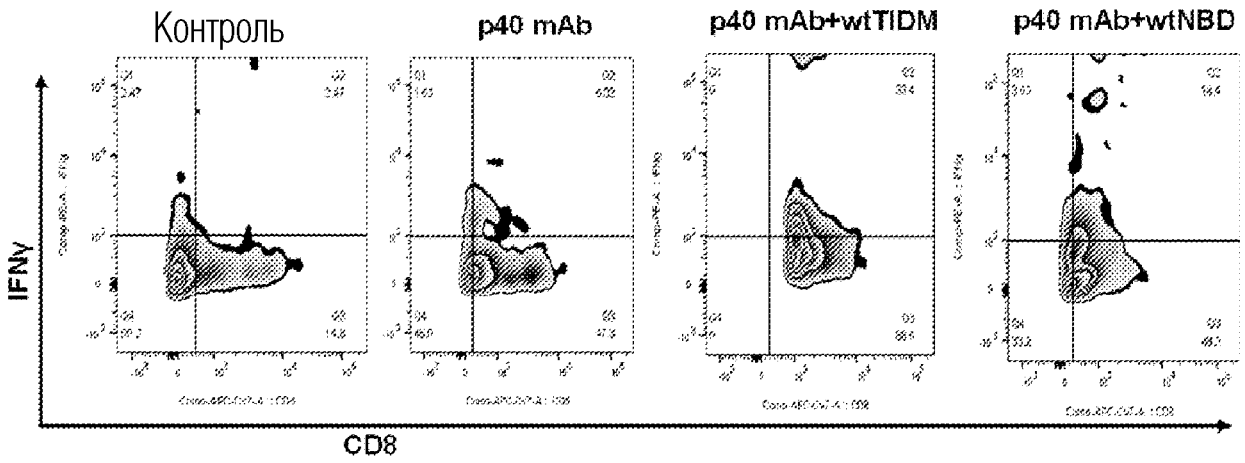
ФИГ. 19A



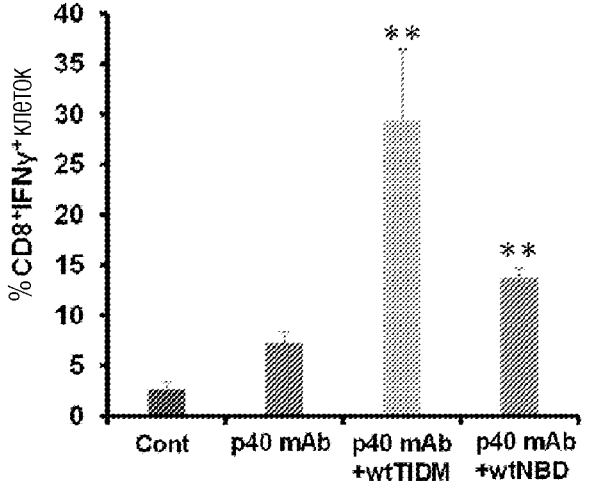
ФИГ. 19B

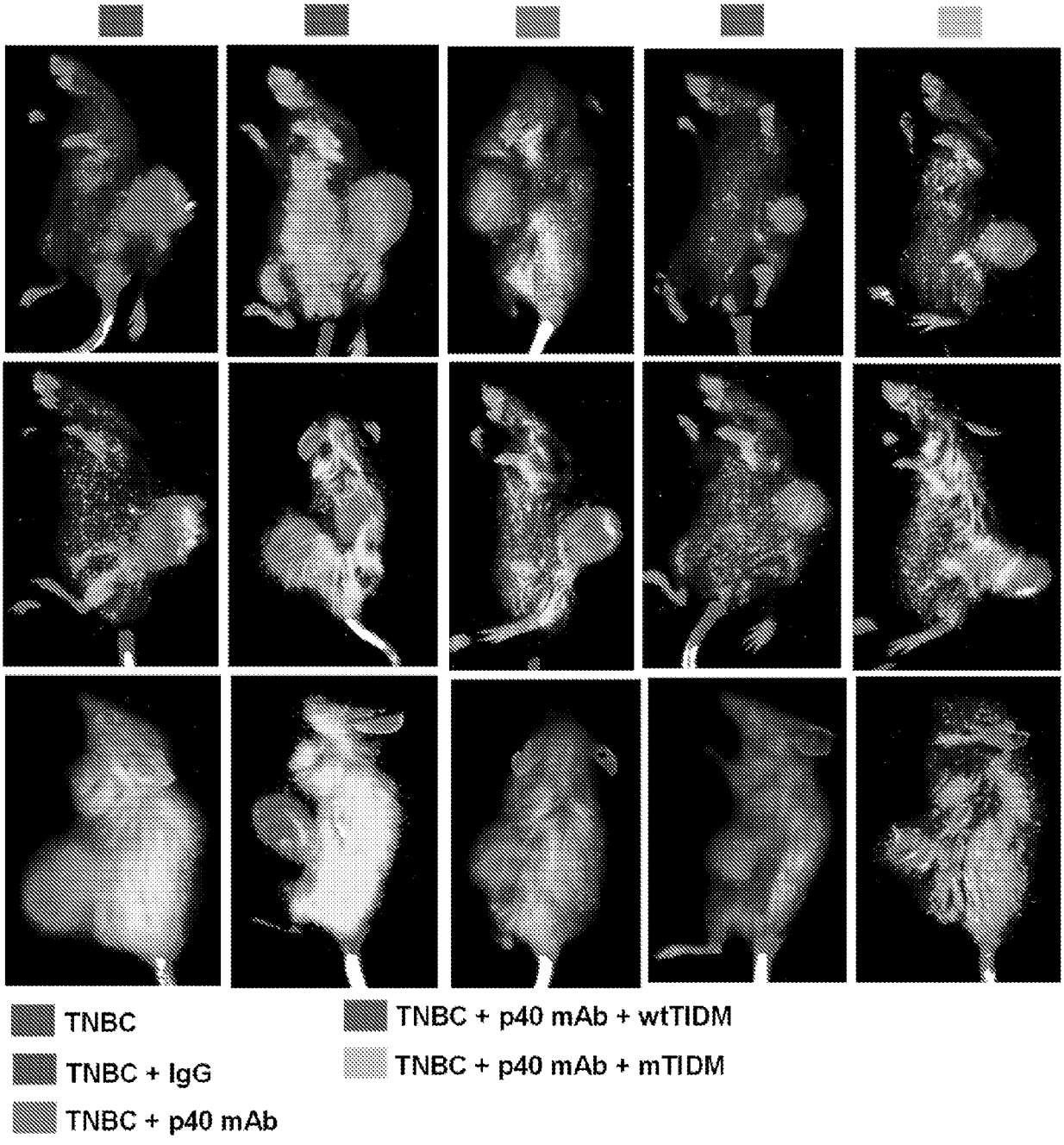


ФИГ. 20A



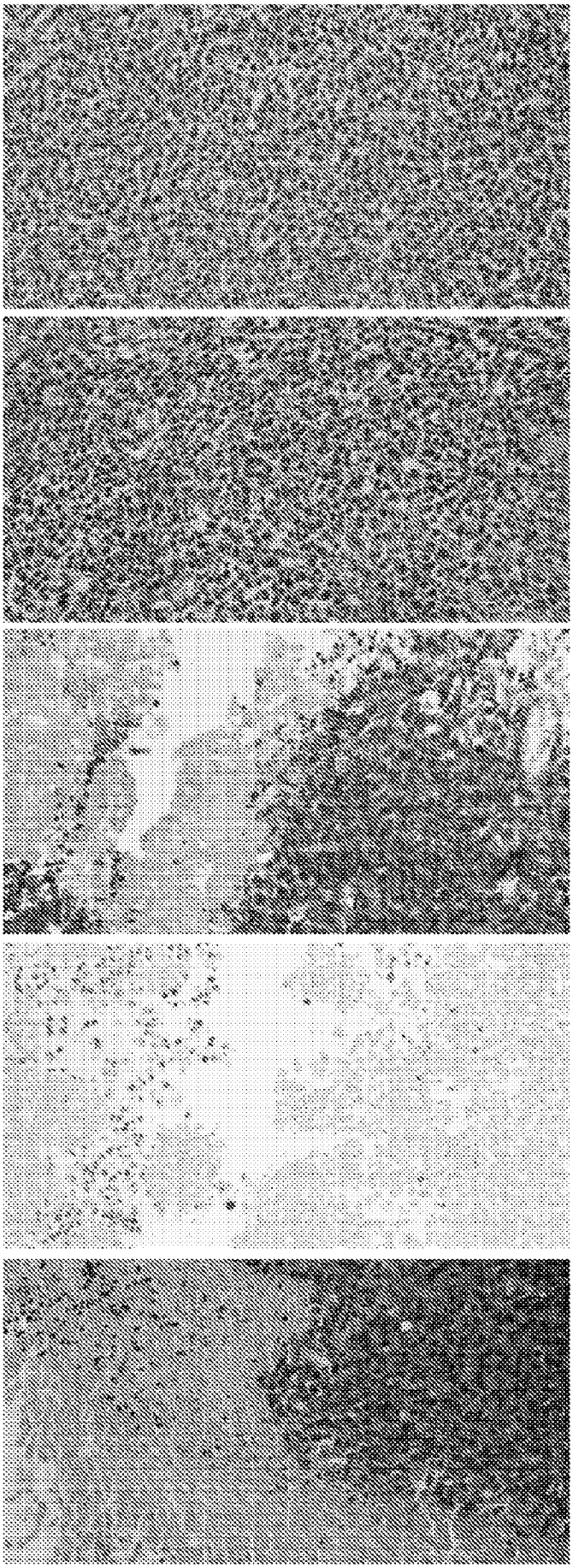
ФИГ. 20B




TNBC
TNBC + IgG
TNBC + p40 mAb
TNBC + p40 mAb + wtTIDM
TNBC + p40 mAb + mTIDM

ФИГ. 21

ФИГ. 22



TNBC

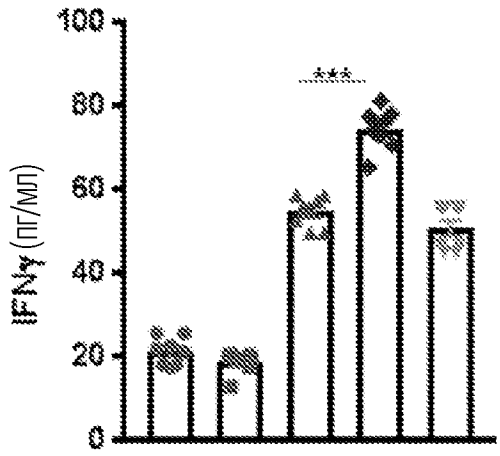
TNBC + IgG

TNBC + p40 mAb

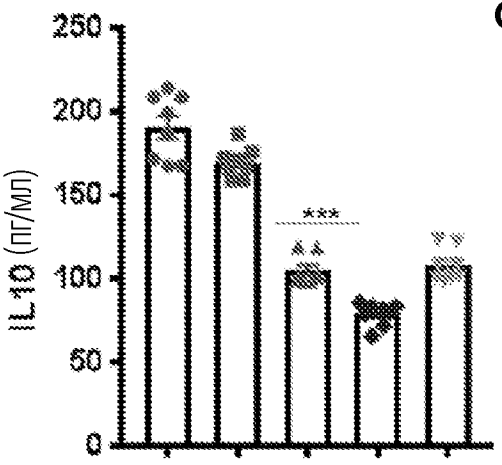
TNBC + p40 mAb + wtTIDM

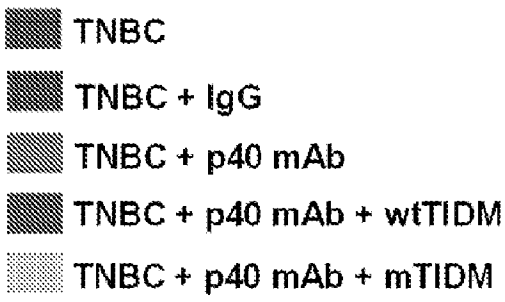
TNBC + p40 mAb + mTIDM

ФИГ. 23A

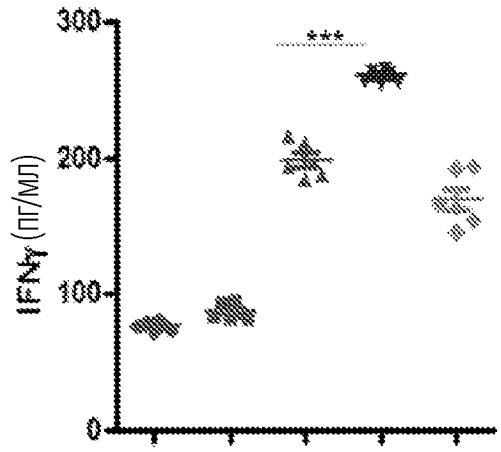
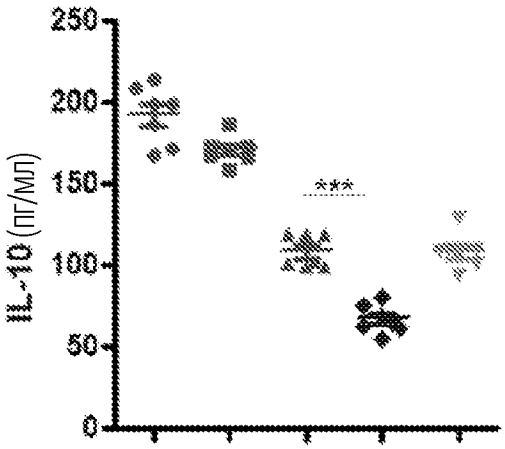
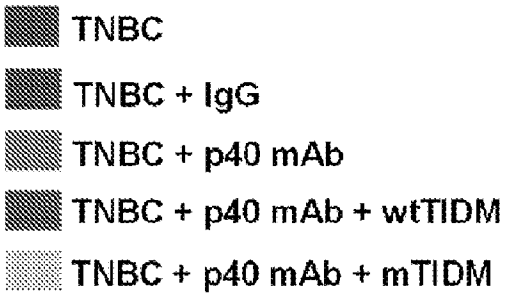


ФИГ. 23B





ФИГ. 24A



ФИГ. 24B