



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109069585 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780019808.6

(22)申请日 2017.02.02

(30)优先权数据

62/291,190 2016.02.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2017/050129 2017.02.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/134668 EN 2017.08.10

(71)申请人 免疫系统密钥有限公司

地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 Y·德瓦雷 U·桑德勒

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

C12Q 1/6886(2018.01)

A61K 45/06(2006.01)

权利要求书4页 说明书40页

序列表2页 附图13页

(54)发明名称

在癌症疗法作为预测工具的内质网应激和用于癌症治疗的联合疗法

(57)摘要

本发明提供了用于评估治疗对癌症患者的影响的方法、药剂和试剂盒。另外,本发明涉及用于在被治疗的癌症患者中降低抗癌剂的施用标准护理剂量的联合治疗。

1. 一种预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药理学上可接受的盐的治疗的反应的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 测定所述患者的至少一个生物样品中至少一种内质网 (ER) 应激标志物的表达水平,以获得表达值,其中在所述治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个;

(b) 确定步骤 (a) 中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值比所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值更高还是更低;

其中在 (a) 中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值高于预定标准中所述至少一种ER应激标志物的表达值表明所述患者是所述治疗的反应者。

2. 权利要求1的方法,其中所述至少一个生物样品中的所述至少一种ER应激标志物的表达值高于所述预定标准中所述至少一种ER应激标志物的表达值表明应该继续所述治疗。

3. 权利要求1或2的方法,其中所述至少一种ER应激标志物是结合免疫球蛋白 (BiP)、真核起始因子2的磷酸化 α 亚基 (p-eIF2 α)、磷酸化肌醇需要1 (p-IRE)、磷酸化的PKR样ER激酶 (p-PERK) 或C/EBP同源蛋白 (CHOP) 或其任意组合。

4. 权利要求1至3中任一项的方法,其中所述ER应激标志物是结合免疫球蛋白 (BiP)。

5. 权利要求1至4中任一项的方法,其中在所述患者的至少两个在时间上分开的生物样品中测定步骤 (a) 中的所述至少一种ER应激标志物的表达水平。

6. 权利要求5的方法,其中在所述治疗开始之前获得所述至少两个生物样品中的一个。

7. 权利要求5或权利要求6的方法,其中所述至少两个在时间上分开的生物样品间隔一周、两周、三周或四周、间隔一个月、两个月、三个月或四个月。

8. 权利要求1至7中任一项的方法,其中所述方法还包括向所述患者施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的所述分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药理学上可接受的盐。

9. 权利要求8的方法,其中以约5mg/m²至约100mg/m²的剂量施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的所述分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐。

10. 权利要求8或9的方法,其中以每周一次、两次或三次的频率施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的所述分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐。

11. 权利要求1至10中任一项的方法,其中所述治疗是利用由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的分离的肽或利用所述分离的肽的药理学上可接受的盐。

12. 权利要求1-11中任一项的方法,其中所述癌症选自胰腺癌、卵巢癌、神经来源的梭形细胞肿瘤、梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、结直肠癌、结肠腺癌、直肠癌、直肠腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、脊髓肿瘤、乳腺癌、皮肤癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈癌、胃肠癌、胃癌、小肠癌、肝癌、肝脏癌症和女性生殖道的恶性肿瘤。

13. 权利要求1-11中任一项的方法,其中所述癌症选自神经来源的梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、肺癌、直肠癌、胰腺癌和脊髓肿瘤。

14. 权利要求1-13中任一项的方法,其中所述患者中的癌细胞是ST2阳性细胞。

15. 权利要求1-13中任一项的方法,其中所述方法包括使对所述至少一种ER应激标志物特异的至少一种检测剂与所述至少一个生物样品或从其获得的任何核酸或蛋白质产物

接触。

16. 权利要求15所述的方法,其中对所述至少一种ER应激标志物特异的所述至少一种检测剂是抗体或与可检测部分缀合的抗体,其中所述抗体特异性识别并结合所述ER应激标志物。

17. 一种对ER应激标志物特异的检测剂用于预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药理学上可接受的盐的治疗的反应的方法中,所述方法包括以下步骤:

(a) 利用所述检测剂在所述患者的至少一个生物样品中测定所述ER应激标志物的表达水平,以获得表达值,其中在治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个;

(b) 确定步骤(a)中获得的所述ER应激标志物的表达值比所述ER应激标志物的预定标准表达值高还是低;

其中在(a)中获得的所述ER应激标志物的表达值高于预定标准中所述ER应激标志物的表达值表明所述患者是所述治疗的反应者。

18. 权利要求17所述使用的检测剂,其中所述至少一个生物样品中所述ER应激标志物的表达值高于所述预定标准中所述ER应激标志物的表达值表明应该继续进行所述治疗。

19. 权利要求17或权利要求18所述使用的检测剂,其中所述ER应激标志物是结合免疫球蛋白(BiP)、真核起始因子2的磷酸化 α 亚基(p-eIF2 α)、磷酸化肌醇需要1(p-IRE)、磷酸化的PKR样ER激酶(p-PERK)或C/EBP同源蛋白(CHOP)或其任意组合。

20. 权利要求17-19中任一项所述使用的检测剂,其中所述ER应激标志物是结合免疫球蛋白(BiP)。

21. 权利要求17-20中任一项所述使用的检测剂,其中在所述患者的至少两个时间上分开的生物样品中测定步骤(a)中所述ER应激标志物的表达水平。

22. 权利要求17-21中任一项所述使用的检测剂,其中在所述治疗开始之前获得所述至少两个生物样品中的一个。

23. 权利要求17-22中任一项所述使用的检测剂,其中所述至少两个在时间上分开的生物样品间隔一周、两周、三周或四周、间隔一个月、两个月、三个月或四个月。

24. 权利要求17-23中任一项所述使用的检测剂,其中所述治疗是利用由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的分离的肽或利用其药理学上可接受的盐。

25. 权利要求17-24中任一项所述使用的检测剂,其中所述癌症选自胰腺癌、卵巢癌、神经来源的梭形细胞肿瘤、梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、结直肠癌、结肠腺癌、直肠癌、直肠腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、脊髓肿瘤、乳腺癌、皮肤癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈癌、胃肠癌、胃癌、小肠癌、肝癌、肝脏癌症和女性生殖道的恶性肿瘤。

26. 权利要求17-25中任一项所述使用的检测剂,其中所述癌症选自神经来源的梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、肺癌、直肠癌、胰腺癌和脊髓肿瘤。

27. 权利要求17-26中任一项所述使用的检测剂,其中所述患者中的所述癌细胞是ST2阳性细胞。

28. 权利要求17至27中任一项所述使用的检测剂,其中对ER应激标志物特异的所述检测剂是抗体或与可检测部分缀合的抗体,其中所述抗体特异性识别并结合所述ER应激标志

物。

29. 一种试剂盒,其包括:

(a) 至少一种检测剂,其特异性地用于测定生物样品中至少一种ER应激标志物的表达值;以及任选地以下的至少一种:

(b) 在治疗开始前和施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其任何功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐时,针对癌症患者所测定的所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值;

(c) 至少一个对照样品。

30. 权利要求29的试剂盒,其还包含用于测定生物样品中至少一种ER应激标志物的表达水平的至少一种试剂。

31. 权利要求29或30的试剂盒,其中所述试剂盒还包括:

(d) 包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐。

32. 权利要求29至31的试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用说明书。

33. 权利要求29至32中任一项的试剂盒,其中所述至少一种ER应激标志物是BiP。

34. 权利要求29至33中任一项的试剂盒,其用于预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐的治疗的反应。

35. 一种用于治疗癌症的方法中的联合治疗,其包含抗癌剂和含有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐,其中以低于所述抗癌剂的标准护理剂量的剂量施用所述抗癌剂。

36. 权利要求38所述使用的联合治疗,其中所述抗癌剂的施用剂量比所述抗癌剂的标准护理剂量低至少约1%-50%,约5%-45%,约10%-40%,约15%-35%或约20%-30%。

37. 权利要求38或39所述使用的联合治疗,其中所述抗癌剂是化学治疗剂、酪氨酸激酶抑制剂、免疫治疗剂、激素剂、生物制剂、分化因子、抗血管生成因子、抗自噬剂或免疫刺激剂。

38. 权利要求38-40中任一项所述使用的联合治疗,其中所述抗癌剂是紫杉醇。

39. 权利要求38至41中任一项所述使用的联合治疗,其中同时或相继地施用所述分离的肽和所述抗癌剂。

40. 权利要求38-42中任一项所述使用的联合治疗,其中所述癌症是胰腺癌、卵巢癌、神经来源的梭形细胞肿瘤、梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、结直肠癌、结肠腺癌、直肠癌、直肠腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、脊髓肿瘤、乳腺癌、皮肤癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈癌、胃肠癌、胃癌、小肠癌、肝癌、肝脏癌症或女性生殖道的恶性肿瘤。

41. 权利要求38-42中任一项所述使用的联合治疗,其中所述癌症是卵巢癌或胰腺癌。

42. 权利要求38-42中任一项所述使用的联合治疗,其中所述癌症包含ST2阳性癌细胞。

43. 权利要求38-45中任一项所述使用的联合治疗,其中所述分离的肽由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成或其药学上可接受的盐组成。

44. 权利要求38-46中任一项所述使用的联合治疗,其中以约5mg/m²至约100mg/m²的剂

量施用所述分离的肽或其药学上可接受的盐。

45. 权利要求38至47中任一项所述使用的联合治疗,其中以每周一次、两次或三次的频率施用所述分离的肽或其药学上可接受的盐。

46. 一种试剂盒,其包括:

(a) 抗癌剂;和

(b) 包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐。

47. 权利要求46的治疗试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用说明书。

48. 权利要求46或47的治疗试剂盒,其用于治疗癌症的方法中,其中以低于所述抗癌剂的标准护理剂量的剂量施用所述抗癌剂。

49. 一种治疗有此需要的患者的癌症的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐与抗癌剂的组合,其中所述分离的肽降低了所述抗癌剂的标准护理施用剂量。

在癌症疗法作为预测工具的内质网应激和用于癌症治疗的联合疗法

技术领域

[0001] 本公开涉及个性化医疗。更具体地,本公开提供了用于预测癌症疗法的效果的方法、试剂盒和组合物。另外,本公开涉及用于降低被治疗的癌症患者中抗癌剂的标准护理剂量的联合治疗。

背景技术

[0002] 被认为作为背景与当前公开的主题相关的参考文献如下:

[0003] [1]Mehta,S.et al.,2010,Therapeutic Advances in Medical Oncology 2(2): 125-148.

[0004] [2]Lee,A.S.2007,Cancer Research 67(8):3496-3499.

[0005] [3]Zheng,Y.Z.et al.,2014,Breast Cancer Research and Treatment 145: 349-358.

[0006] [4]Sato,M.et al.,2010,Advances in Genetics 69:97-114.

[0007] [5]Han,K.S.et al.,2015,Oncotarget 6:34818-30.

[0008] [6]WO 2008/042508.

[0009] [7]US 2009/0181472.

[0010] [8]WO 02/082076.

[0011] [9]WO 02/077176.

[0012] [10]WO 2006/046239.

[0013] [11]WO 2007/122622

[0014] [12]WO 2007/091240.

[0015] [13]WO 2008/075349.

[0016] [14]Sandler,U.et al.,2010,Recent advances in clinical medicine,ISSN: 1790-5125.

[0017] [15]Sandler,U.et al.,2010,J Experimental Therapeutics and Oncology 8: 327-339.

[0018] [16]WO 2015/083167.

[0019] [17]Eisenhauer,E.A.et al.,2009,European Journal of Cancer 45:228-247.

[0020] 本文对上述参考文献的确认不应被推断为意味着这些参考文献与目前公开的主题的专利性有任何关联。

[0021] 背景

[0022] 技术进步极大地增进了对肿瘤进展的分子基础的理解,并且迄今已鉴定出许多肿瘤和治疗反应生物标志物(1)。

[0023] 这些标志物通常可分为两种类型,即旨在客观地评估患者的总体结果(诸如标准治疗后癌症复发的概率)的预后标志物和旨在评估受益于特定临床干预的可能性的预测标

志物(1)。

[0024] 涉及癌症发展和预后的细胞标志物中有葡萄糖调节蛋白GRP78,也称为BiP(结合免疫球蛋白蛋白),其主要存在于内质网(ER)中。GRP78属于HSP70蛋白家族,其有助于正确的蛋白质折叠,防止中间体聚集,并靶向错误折叠的蛋白质以进行蛋白酶体降解。另外,GRP78还可作为ER应激信号传导调节剂。GRP78促进肿瘤增殖、存活、转移和对多种疗法的抗性,因此GRP78表达可用作肿瘤行为和治疗反应的生物标志物(2)。

[0025] 与上述相一致,癌细胞通过诱导GRP78(2)的表达来适应肿瘤环境中的慢性应激,其中GRP78(2)作为强效的抗凋亡因子起作用并赋予药物抗性(3)。实际上,已经表明,癌症患者血清中GRP78自身抗体的存在通常与预后不良相关(4)。多项研究已证实抗血管生成疗法后GRP78/BiP上调。例如,Han等(5),显示舒尼替尼治疗诱导Caki-1异种移植物中的缺氧,随后治疗组中GRP78/BiP表达与对照组相比升高。

[0026] 因此,GRP78被提议作为各种病症的标志物,除了其它以外,用于确定患有癌症的受试者是否具有对激素疗法产生抗性的风险(6),作为评估头颈癌病例中肿瘤分级的预后标志物(7)或作为各种癌症的肿瘤标志物(8,9)。然而,GRP78在癌症进展或癌症治疗期间起作用的机制仍不清楚。

[0027] 先前鉴定了由人胸腺特有的cDNA编码的称为“T101”的肽。该肽及其衍生物,除其它以外,已被应用于通过T101作为免疫系统刺激剂的作用来治疗癌症(WO 2006/046239,10)。WO 2006/046239证明了T101能够刺激免疫系统并减小肿瘤大小,表明该肽影响癌细胞的增殖。WO 2006/046239还提出了T101在例如标准化疗过程中保护患者方面的基于免疫的作用。

[0028] 在WO 2007/122622(11)中还提出了使用T101进行的癌症治疗,其除其它以外,证明了T101对各种类型肿瘤发展的影响。肽T101也描述于WO 2007/091240(12)(涉及免疫疾病的治疗)和WO 2008/075349(13)中以及Sandler等的出版物(14和15)(涉及治疗或预防牵涉具有T1/ST2受体的细胞的疾病)中。

[0029] 另外,据报道,称为“Nerofe”的T101肽衍生物可使癌细胞减少已知与癌症转移相关的蛋白质的分泌,并在体外直接抑制癌细胞的迁移。另外,经显示该肽影响癌症患者的血管内皮生长因子(VEGF)的血清水平(WO 2015/083167,16),并且被建议用于预防或治疗癌症转移的方法。

[0030] 概述

[0031] 通过其一个方面,本发明提供了预测癌症患者对利用分离的肽(其包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列)或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐治疗的反应的方法,所述方法包括以下步骤:

[0032] (a)测定所述患者的至少一个生物样品中至少一种内质网(ER)应激标志物的表达水平,以获得表达值,其中在所述治疗开始后获得至少一个所述生物样品;

[0033] (b)确定步骤(a)中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值比所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值高还是低;

[0034] 其中在(a)中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值高于预定标准中所述至少一种ER应激标志物的表达值,表明所述患者是所述治疗的反应者。

[0035] 在一些实施方案中,所述至少一个生物样品中所述至少一种ER应激标志物的表达

值高于所述预定标准中所述至少一种ER应激标志物的表达值,表明应继续进行所述治疗。

[0036] 在其他实施方案中,所述至少一种ER应激标志物是结合免疫球蛋白蛋白(BiP)、真核起始因子2的磷酸化 α 亚基(p-eIF2 α)、磷酸化肌醇需要1(p-IRE)、磷酸化PKR样ER激酶(p-PERK)或C/EBP同源蛋白(CHOP)或其任何组合。本公开的各种实施方案涉及结合免疫球蛋白(BiP)的ER应激标志物。

[0037] 在一些实施方案中,在所述患者的至少两个时间上分开的生物样品中测定步骤(a)中所述至少一种ER应激标志物的表达水平。在其他具体实施方案中,在开始所述治疗之前获得所述至少两个生物样品中的一个。在另外的实施方案中,所述至少两个在时间上分开的生物样品间隔一周、两周、三周、或四周、一个月、两个月、三个月或四个月。

[0038] 在各种实施方案中,如本文所定义的方法还包括向所述患者施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐。在一些实施方案中,以约5mg/m²至约100mg/m²的剂量施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐。在其他实施方案中,以每周一次、两次或三次的频率施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐。

[0039] 在另外的实施方案中,如本文所定义的治疗是利用由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序组成的分离的肽,或利用所述分离的肽的药学上可接受的盐。

[0040] 在本公开的各种实施方案中,癌症选自胰腺癌、卵巢癌、神经来源的梭形细胞肿瘤、梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、结直肠癌、结肠腺癌、直肠癌、直肠腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、脊髓肿瘤、乳腺癌、皮肤癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈癌、胃肠癌、胃癌、小肠癌、肝癌(hepatic carcinoma)、肝脏癌症(liver cancer)和女性生殖道的恶性肿瘤。在其他具体实施方案中,癌症选自神经来源的梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、肺癌、直肠癌、胰腺癌和脊髓肿瘤。在其它实施方案中,患者中的癌细胞是ST2阳性细胞。

[0041] 在一些实施方案中,根据本发明的方法包括使对所述至少一种ER应激标志物特异的至少一种检测剂与所述至少一个生物样品或从其获得的任何核酸或蛋白质产物接触。在各种实施方案中,对所述至少一种ER应激标志物特异的所述至少一种检测剂是抗体或与可检测部分缀合的抗体,其中所述抗体特异性识别并结合所述ER应激标志物。

[0042] 本公开还提供了对ER应激标志物特异的检测剂,其用于预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐治疗的反应的方法中,所述方法包括以下步骤:

[0043] (a) 利用所述检测剂在所述患者的至少一个生物样品中测定所述ER应激标志物的表达水平,以获得表达值,其中在治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个;

[0044] (b) 确定步骤(a)中获得的所述ER应激标志物的表达值比所述ER应激标志物的预定标准表达值高还是低;

[0045] 其中在(a)中获得的所述ER应激标志物的表达值高于预定标准中所述ER应激标志物的表达值,表明所述患者是所述治疗的反应者。

[0046] 本发明还提供了试剂盒,其包括:

[0047] (a) 至少一种检测剂,其特异性地用于测定生物样品中至少一种ER应激标志物的

表达值;以及任选地以下的至少一种:

[0048] (b) 在治疗开始前和施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其任何功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐时,针对癌症患者所测定的所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值;

[0049] (c) 至少一个对照样品。

[0050] 在一些实施方案中,用于确定至少一种ER应激标志物的表达值的试剂盒还包含用于测定生物样品中至少一种ER应激标志物的表达水平的至少一种试剂。

[0051] 在其他实施方案中,用于测定至少一种ER应激标志物的表达值的试剂盒还包括:

[0052] (d) 包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物,或所述分离的肽的药理学上可接受的盐。

[0053] 在另外的实施方案中,用于测定至少一种ER应激标志物的表达值的试剂盒还包括使用说明书。

[0054] 在各种实施方案中,如本文所定义的试剂盒用于预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药理学上可接受的盐治疗的反应。

[0055] 本公开还提供了包含抗癌剂和包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药理学上可接受的盐的联合治疗用于治疗癌症的方法中,其中以低于所述抗癌剂的标准护理剂量的剂量施用所述抗癌剂。

[0056] 在一些实施方案中,使用的联合治疗是其中所述抗癌剂的施用剂量低于所述抗癌剂的标准护理剂量至少约1%-50%,约5%-45%,约10%-40%,约15%-35%或约20%-30%。

[0057] 在其他实施方案中,使用的联合治疗是其中所述抗癌剂是化学治疗剂、酪氨酸激酶抑制剂、免疫治疗剂、激素剂、生物剂、分化因子、抗血管生成因子、抗-自噬剂或免疫刺激剂。在另外的实施方案中,使用的联合治疗是其中所述抗癌剂是紫杉醇。

[0058] 在另外的实施方案中,使用的联合治疗是其中同时或相继地施用所述分离的肽和所述抗癌剂。

[0059] 在用于癌症的联合治疗方面的各种实施方案中,癌症是胰腺癌、卵巢癌、神经来源的梭形细胞肿瘤、梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、结直肠癌、结肠腺癌、直肠癌、直肠腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、脊髓肿瘤、乳腺癌、皮肤癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈癌、胃肠癌、胃癌、小肠癌、肝癌、肝脏癌症或女性生殖道的恶性肿瘤。在使用联合治疗的方面的具体实施方案中,癌症是卵巢癌或胰腺癌。在使用联合治疗的另外的实施方案中,癌症包括ST2阳性癌细胞。

[0060] 在使用联合治疗的方面的一些实施方案中,所述分离的肽由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成或由其药理学上可接受的盐组成。

[0061] 在使用联合治疗的方面的其他实施方案中,以约5mg/m²至约100mg/m²的剂量施用所述分离的肽或其药理学上可接受的盐。在使用联合治疗的方面的其他实施方案中,以每周一次、两次或三次的频率施用所述分离的肽或其药理学上可接受的盐。

[0062] 在其另一方面,本公开提供了治疗试剂盒,其包括:

[0063] (a) 抗癌剂;和

[0064] (b) 包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐。

[0065] 在一些实施方案中,治疗试剂盒是其中所述试剂盒还包含使用说明书。

[0066] 在其他实施方案中,治疗试剂盒用于治疗癌症的方法中,其中以低于所述抗癌剂的标准护理剂量的剂量施用所述抗癌剂。

[0067] 在又一方面,本公开提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐与抗癌剂的组合,其中所述分离的肽降低了所述抗癌剂的标准护理施用剂量。

[0068] 附图概述

[0069] 为了更好地理解本文公开的主题并举例说明如何在实践中进行实施,现在将参考附图以及通过非限制性实例描述实施方案,其中:

[0070] 图1是患者随机化和分配的概述,显示患者数量和至特定群组的分配以及研究中使用的剂量。

[0071] 图2A-图2B是取自患有脊髓肿瘤的命名为002-006的患者的活检样品的显微照片。图2A描述了在接受dTCaP之前从患者获得的活检样品的结合免疫球蛋白 (BiP) 染色,图2B描述了用dTCaP治疗11个月后获得的活检样品的BiP染色。用于染色的抗体是抗-BiP抗体 (Abcam)。

[0072] 图3是显示ER应激标志物BiP的血清水平变化与dTCaP的剂量之间的相关性的图。

[0073] 图4是显示ER应激标志物BiP的血清水平变化与肿瘤大小变化之间的相关性的图。

[0074] 图5是显示患者参与临床试验的天数根据患者的T1/ST2表达的图。

[0075] 图6是显示ER应激标志物BiP的血清水平变化与ST2阴性和ST2阳性群体的肿瘤大小变化之间的相关性的图。

[0076] 图7是显示按剂量组的dTCaP随时间的血清浓度的图。误差棒表示SD。

[0077] 图8是显示肿瘤大小的变化与dTCaP的施用剂量之间的相关性的图。

[0078] 图9A-图9D是使用针对 β -cop的抗体对对照OV90细胞 (图9A)、用指示的dTCaP肽处理的OV90细胞 (图9B)、对照OV90ST2敲除 (KO) 细胞 (图9C) 和用所示dTCaPs肽处理的OV90ST2敲除 (KO) 细胞 (图9D) 的免疫细胞化学图像。

[0079] 图10A-图10D是使用针对GRP78BiP的抗体对对照OV90细胞 (图10A)、用所示的dTCaP肽处理的OV90细胞 (图10B)、对照OV90ST2敲除 (KO) 细胞 (图10C) 和用所示的dTCaP肽处理的OV90ST2敲除 (KO) 细胞 (图10D) 的免疫细胞化学图像。

[0080] 图11A-图11B是显示在治疗结束时dTCaP治疗的患者中的血清CRT水平 (图11A) 和dTCaP治疗的患者中的CRT水平的变化 (图11B) 的柱状图。

[0081] 图12是显示在dTCaP存在的情况下天然杀伤细胞 (NK细胞) 的活化的图。

[0082] 图13A-图13B是显示在紫杉醇 (2nM或4nM)、dTCaP (25 μ g/ml) 或其组合 (25 μ g/ml的dTCaP和2或4nM的紫杉醇) 存在的情况下人卵巢癌细胞 (图13A) 和人胰腺癌细胞 (图13B) 中BrdU掺入水平的柱状图。

[0083] 实施方案详述

[0084] 本公开基于以下令人惊讶的发现,即用本文称为dTCaP (或Nerofe) 的肽 (其具有

Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys的全D氨基酸序列(由SEQ ID NO:1表示))的治疗在多种癌症中增加内质网(ER)应激,如从ER应激标记结合免疫球蛋白(BiP)表达水平的升高所证实的。值得注意的是,发现ER应激标志物BiP的观察到的增加与dTCaP治疗的患者中肿瘤生长的抑制相关,如通过治疗期结束时肿瘤大小的减小所证明的。

[0085] 因此,除其它以外,本公开显示ER应激标志物,例如BiP,可用作用生物标志物于评估在癌症患者中利用肽dTCaP的治疗效果。

[0086] 因此,在其一个方面,本公开提供了用于预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐治疗的反应的方法,所述方法包括以下步骤:

[0087] (a) 测定所述患者的至少一个生物样品中至少一种内质网(ER)应激标志物的表达水平,以获得表达值,其中在所述治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个;

[0088] (b) 确定步骤(a)中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值比所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值高还是低;

[0089] 其中在(a)中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值高于预定标准中所述至少一种ER应激标志物的表达值,表明所述患者是所述治疗的反应者。

[0090] 换句话说,本公开提供了用于在早期阶段(例如,在下面例举的治疗开始后约一个月之后或在其他时间点)确定癌症患者是否响应治疗(即,治疗是否适合)并基于这些结论确定进一步的治疗选择(例如是否建议继续进行这种类型的疗法)的方法。

[0091] 考虑到大量治疗方案通常与不希望的副作用相关联而且可能是不成功的事实,调整合适的治疗方案是非常有价值的并且是临床上所需的。因此,在治疗开始后的早期阶段和/或治疗期间或治疗期之后优化治疗方案可避免不充分的治疗,减少不必要的副作用和药物负担并提高成功的机会。

[0092] 本文针对癌症患者对治疗的反应使用的术语“预测(prediction)”或“预测(predicting)”是指确定或评估患者将有利地(即,将具有有益的反应)或不利地(即,将不会经历有益的反应)对本文中定义的治疗作出反应的可能性。对本文定义的治疗具有总体有益的反应的患者被称为“反应者”,而不利地对治疗作出反应的患者被称为“非反应者”。

[0093] 在本公开的上下文中,术语“反应”是指因治疗而引起的患者的总体结果,其可以使用本发明领域的技术人员已知的任何临床参数来评估。因此,本文定义的治疗背景中的术语“反应者”是指与被诊断患有相同病况(例如,本文定义的癌症疾病的相同类型、分期、程度和/或分类)的未治疗的受试者相比,或与治疗开始前(或在其第一天,在第一次施用前)相同受试者的临床参数相比,或与未实现至少一个临床参数改善的患者群体(如本文中定义为“无反应者”)的临床参数相比较,经历至少一个临床参数的总体改善的患者。

[0094] 针对治疗的术语“无反应者”是指未经历至少一个临床参数的改善并且被诊断为具有相同病况(例如,病理的相同类型、分期、程度和/或分类),或经历同一受试者在本文定义的治疗之前的临床参数的患者。

[0095] 癌症背景中的“临床参数的改善”的含义在本领域中是公知的,包括但不限于肿瘤大小的减小;肿瘤生长的至少部分抑制;肿瘤数量的减少;可接受的疾病标志物(即用于诊断或监测疾病的本领域已知的任何标志物)的减少;肿瘤细胞转移的抑制(至少部分);抗肿

瘤免疫反应的增强;与肿瘤相关的一种或多种症状的至少部分缓解;治疗后存活期长度的增加;治疗后给定时间点的死亡率降低等。因此,在一些实施方案中,有益反应是肿瘤负荷的降低,其可以根据RECIST指南(17)来评估。

[0096] 如上所述,本公开提供了通过首先测定所述患者的至少一个生物样品中至少一种内质网(ER)应激标志物的表达水平以获得表达值来预测癌症患者对如本文所定义的治疗的反应的方法,其中在治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个。然后在步骤(b)中,确定步骤(a)中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值比所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值高还是低。根据本发明的方法,当在(a)中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值高于在预定标准中所述至少一种ER应激标志物的表达值时,所述患者被诊断为治疗的“反应者”。

[0097] 必须理解的是,与对照样品的相应预定标准表达值(或截止值)相比更高或更低的如下定义的表达值预测了患者是“反应者”还是“非反应者”。

[0098] 因此,该方法包括检查任何一个测试的ER应激标志物的表达值在标准群体的表达值或该群体的截止值的范围内还是高于标准群体的表达值或此类群体的截止值。表达值被称为“高于”相应的预定标准表达值,其中在特定治疗时间点针对某个ER应激标志物获得的表达值等于或高于针对标准群体在相应的治疗时间点获得的表达值(即预定的标准表达值)的约1%至99.9%,具体地,约1%至约5%、约5%至10%、约10%至15%、约15%至20%、约20%至25%、约25%至30%、约30%至35%、约35%至40%、约40%至45%、约45%至50%、约50%至55%、约55%至60%、约60%至65%、约65%至70%、约75%至80%、约80%至85%、约85%至90%、约90%至95%、约95%至99%或约99%至99.9%或更高的任何一个。

[0099] 因此,术语“较低”是指低于预定标准表达值例如约1%至99.9%,具体地,约1%至约5%、约5%至10%、约10%至15%、约15%至20%、约20%至25%、约25%至30%、约30%至35%、约35%至40%、约40%至45%、约45%至50%、约50%至55%、约55%至60%、约60%至65%、约65%至70%、约75%至80%、约80%至85%、约85%至90%、约90%至95%、约95%至99%或约99%至99.9%的任何表达值。

[0100] 换句话说,将测试样品的特定表达值与预定的截止值或标准值进行比较。如本文中所用,术语“比较”表示对根据本发明测试的样品获得的表达水平和/或表达值的任何检查(以发现至少两种不同样品之间的相似性或差异)。应当注意,根据本发明的比较包括使用基于计算机的方法的可能性。

[0101] 如本文中定义的术语“预定标准表达值(predetermined standard expression value)”或“多个预定标准表达值(predetermined standard expression values)”是指优选在对应于获得根据本发明的方法的表达值的时间点的时间点,针对本文定义的治疗的反应者群体中ER应激标志物的表达水平(任选地经标准化以获得如下定义的表达值)。例如但不限于对于参与下文所述的临床试验的患者所获得的表达水平。这些患者用作示例性的预定标准反应者群体或在治疗前获得的样品和在治疗的第29天获得的样品中ER应激标志物BiP的预定标准表达值。

[0102] 应当注意,预定的标准表达值在本文中有时简称为“截止值”,是满足高诊断灵敏度(真阳性率)和高诊断特异度(真阴性率)的要求的值。应注意,术语“灵敏度”和“特异度”在本文中被用于一种或多种ER应激标志物正确地将样品分类为属于与对本文定义的治疗

的反应性相关的预先建立的群体的能力方面。

[0103] 在某些替代实施方案中,可以使用对照样品(或对照生物样品)(代替预定的标准表达值,或者除了预定的标准表达值以外还使用)。因此,将ER应激标志物的表达值与对照样品中的表达值进行比较。对照样品可以从健康受试者、患有相同病理性病症并且未被本文定义的分离的肽治疗的受试者、治疗前的被治疗的患者、对治疗有反应的受试者和非反应者受试者中的至少一种受试者获得。

[0104] 如上所述,本公开基于以下令人惊讶的发现:利用肽dTCApF(由SEQ ID NO:1表示)的治疗使从各种癌症患者获得的肿瘤中的内质网(ER)中的应激(与对治疗的阳性患者反应相关)增加。ER在新合成的蛋白质的折叠和成熟中具有重要作用。如本领域已知的,ER应激是指ER稳态的破坏,其通过ER中错误折叠和解折叠蛋白的积累表现出来。ER应激激活复杂的信号传导网络,例如被称为解折叠蛋白反应(UPR)的网络,其起到减少ER应激并恢复体内平衡的作用。

[0105] 解折叠蛋白反应(UPR)由以下三种ER跨膜蛋白启动:肌醇需要1(IRE1)、PKR样ER激酶(PERK)和激活转录因子6(ATF6)。在未应激条件下,ER伴侣,即免疫球蛋白结合蛋白(BiP)与这些主调节剂的腔结构域结合,使它们保持无活性。在ER应激时,BiP与这些传感器解离,从而导致它们的激活。

[0106] 激活的UPR通过以下三个不同的功能调节下游效应子:适应性响应、反馈控制和细胞命运调节。UPR适应性响应除其它以外,包括分子伴侣和蛋白质加工酶的上调以增加折叠。当重新建立ER稳态时,反馈控制涉及UPR激活的负调节。UPR对细胞命运的调节在ER应激相关病症的发病机制中起重要作用。如本领域已知的,当细胞遇到UPR可以减轻的ER应激时,细胞将存活。然而,在无法解决的ER应激条件下,UPR不能减少ER应激并恢复体内平衡,从而促进细胞死亡。

[0107] 与ER应激相关的其他途径是内质网相关蛋白降解(ERAD),这是一种细胞途径,其靶向内质网的错误折叠蛋白质以进行遍在蛋白化和随后被蛋白质降解复合物(即蛋白酶体)降解以及进行ER应激介导的细胞凋亡。

[0108] 因此,术语“内质网应激标志物”或“ER应激标志物”是指与内质网应激反应相关的任何分子,例如但不限于与被称为解折叠蛋白反应(UPR)的信号传导网络(其起到减少ER应激并恢复体内平衡的作用)相关的任何分子,与内质网相关蛋白降解(ERAD)相关的任何分子或与ER应激介导的细胞凋亡相关的任何分子。

[0109] 在一些实施方案中,如本文所定义的ER应激标志物是葡萄糖调节蛋白(GRP-78)(也称为结合免疫球蛋白(BiP))、肌醇需要1(IRE1)、PKR样ER激酶(PERK)、真核起始因子2(eIF2 α)的 α 亚基、I I型ER跨膜转录因子(ATF6)或C/EBP同源蛋白(CHOP)。

[0110] 如上所述,在被施予肽dTCApF的患者中检测到结合免疫球蛋白(BiP)ER标志物的表达水平的升高,这与这些患者中肿瘤生长的抑制相关。

[0111] 因此,在各种实施方案中,根据本公开的方法、对所使用的ER应激标志物特异的检测和试剂盒是其中所述ER应激标志物是结合免疫球蛋白(BiP)。术语结合免疫球蛋白(BiP)和葡萄糖调节蛋白GRP78可互换使用,并且是指相同的ER应激标志物。

[0112] 术语“结合免疫球蛋白”(BiP),也称为78kDa葡萄糖调节蛋白(GRP-78)或热休克70kDa蛋白5(HSPA5),是指在人中由HSPA5基因编码并且作为位于内质网(ER)内腔的分子伴

侣的蛋白质。当BiP被转运至ER中时,BiP结合新合成的蛋白质,并使它们保持在能够随后折叠和寡聚化的状态。BiP也是转位机器的主要组成部分,并且在注定被蛋白酶体降解的异常蛋白质的跨ER膜转运中起作用。BiP在所有生长条件下都是丰富的蛋白质,但其合成在导致ER中解折叠多肽积累的条件下被显著诱导。在本公开的具体实施方案中,BiP是人BiP,具有UniProtKB登录号P11021。

[0113] 具体地,在其另一方面,本公开提供了用于预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐治疗的反应的方法,所述方法包括以下步骤:

[0114] (a) 测定所述患者的至少一个生物样品中BiP的表达水平以获得表达值,其中在所述治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个;

[0115] (b) 确定步骤(a)中获得的BiP的表达值比BiP的预定标准表达值高还是低;

[0116] 其中,(a)中获得的BiP的表达值高于预定标准中BiP的表达值表明所述患者是所述治疗的反应者。

[0117] 在其他具体实施方案中,根据本公开的ER应激标志物是肌醇需要1(IRE1)。IRE1(一种I型ER跨膜激酶)通过其N末端腔结构域感知ER应激。在检测到解折叠或错误折叠的蛋白质存在时,IRE1二聚化并自磷酸化以变得具有活性。

[0118] 在其他具体实施方案中,根据本公开的ER应激标志物是PKR样ER激酶(PERK)。PERK也是I型ER跨膜激酶,当被ER应激激活时,其寡聚化,自磷酸化,然后直接磷酸化真核起始因子2的 α 亚基(eIF2 α)上的Ser51。

[0119] 因此,在另外的具体实施方案中,根据本公开的ER应激标志物是真核起始因子2的 α 亚基(eIF2 α)。

[0120] 在另外的具体实施方案中,根据本公开的ER应激标志物是I I型ER跨膜转录因子(ATF6)。ATF6具有两种同种型ATF6 α 和ATF6 β 。

[0121] 在其他具体实施方案中,根据本公开的ER应激标志物是ER应激介导的细胞凋亡诸如C/EBP同源蛋白(CHOP)。

[0122] 在另外的具体实施方案中,如本文所定义的ER应激标志物是磷酸化蛋白质,例如p-eIF2 α 、p-IRE1或p-PERK。

[0123] 因此,在上述和其他实施方案中,根据本公开的ER应激标志物是结合免疫球蛋白(BiP)、真核起始因子2的磷酸化 α 亚基(p-eIF2 α)、磷酸化肌醇需要1(p-IRE)、磷酸化PKR样ER激酶(p-PERK)或C/EBP同源蛋白(CHOP)或其任意组合。

[0124] 在一些实施方案中,根据本公开的方法、对所使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒表明应当继续进行所述治疗。换句话说,在根据本公开的方法、对所使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒的一些实施方案中,所述至少一个生物样品中所述至少一种ER应激标志物的表达值高于所述预定标准中所述至少一种ER应激标志物的表达值表明应继续进行所述治疗。

[0125] 在一些实施方案中,当患者经历癌症消退、无进展存活、无疾病存活、完全反应或部分反应中的至少一种时,患者是根据本公开的治疗的反应者。

[0126] 或者,如果患者的所述至少一种生物样品中所述至少一种ER应激标志物的表达值低于预定标准中相同ER应激标志物的表达值,则应当停止治疗。

[0127] 如上所述,本公开的方法基于测定生物样品中至少一种ER应激标志物的表达水平。术语“表达的水平”或“表达水平”可互换使用,通常是指编码生物样品中的氨基酸产物或蛋白质的多肽(蛋白质)或多核苷酸的量(量)的数值表示。“表达”通常是指籍以将基因编码信息转化为细胞中存在和操作的结构的结构的过程,可以通过测量多肽(蛋白质)或编码其的多核苷酸的量来评估。

[0128] 至少一种ER应激标志物的表达水平的测定还可基于多肽(蛋白质)的片段或其编码多核苷酸的表达水平,或基于任何翻译后修饰的蛋白质(例如磷酸化蛋白质)或其片段的表达水平。

[0129] 测定内质网应激标志物(例如BiP)或其任何多肽片段或衍生物或其任何编码核酸的表达水平可以通过本领域已知的任何方法,使用对被检查的内质网应激标志物特异的检测剂来进行。例如,可以使用ELISA、免疫测定、免疫荧光、免疫组织化学、免疫沉淀、northern印迹、western印迹、PCR、免疫-PCR或表面等离子体共振来测定ER应激标志物的表达水平。

[0130] 特别地,测定ER应激标志物BiP的表达水平可如下所述,使用基于ELISA的方法或使用标记的抗体(例如针对BiP的标记的抗体)来进行。测定ER应激标志物(例如BiP)的表达水平也可以基于测定编码BiP蛋白的核酸(例如mRNA)的表达水平或通过测定生物样品中BiP的任何多肽片段或衍生物的表达水平来测定。

[0131] 在某些和具体的实施方案中,通过本发明的方法测定表达水平以获得表达值的步骤还包括另外和任选的标准化步骤。根据该实施方案,除了测定如本文定义的所述至少一种ER应激标志物的表达水平以外,还将测定同一样品中至少一种合适的对照参考基因(例如,管家基因)的表达水平。根据这样的实施方案,根据所述测试样品中在另外的任选步骤中获得的所述至少一种参考对照基因的表达水平,标准化步骤(a)中获得的本发明的所述至少一种应激标志物的表达水平,从而获得标准化的表达值。任选地,当适用时(即,如本文所定义的预定标准),也在至少一个对照样品或代表性的标准中进行类似的标准化。

[0132] 因此,术语“表达值”是指将通过实验获得的“表达的水平”或“表达水平”用作输入并通过如本文所述的至少一个标准化步骤标准化所述“表达的水平”或“表达水平”的计算的结果,获得本文中称为“表达值”的计算值。

[0133] 更具体地,如本文中所用,“标准化的值”或“表达值”是ER应激标志物的原始表达值除以来自同一样品的对照参考基因(诸如稳定表达的管家对照基因)的表达值的商。将ER应激标志物的原始表达水平除以对照参考基因原始表达水平产生了商或测量,所述商或测量基本上没有任何技术失败或不准确性,并且构成了所述标志基因的标准化表达值。然后可将该标准化的表达值与标准化的截止值(即从标准化的表达值计算的截止值)进行比较。在某些实施方案中,对照参考基因可以是在微阵列分析中分析的所有样品中保持稳定的基因。

[0134] 在具体的实施方案中,本文定义的方法和试剂盒包括使对所述至少一种ER应激标志物特异的至少一种检测剂与所述至少一种生物样品或从其获得的任何核酸或蛋白质产物接触。

[0135] 如下所示,ER应激标志物BiP的测定基于针对BiP的抗体的使用。因此,在根据本发明的方法、对所使用的ER应激标志物特异的检测剂和试剂盒的一些实施方案中,对所述(至

少一种) ER应激标志物特异的检测剂是抗体或与可检测部分缀合的抗体,其中所述抗体特异性识别并结合所述ER应激标志物。

[0136] 本文定义的术语“对ER应激标志物特异的检测剂”是指可用于定量样品中相关ER应激标志物表达的水平的对ER应激标志物特异的任何试剂(例如但不限于特异性地用于检测编码相关ER应激标志物的mRNA的核酸试剂或结合并识别相关ER应激标志物或其片段的特异性抗体)。

[0137] 此外,必须理解的是,对ER应激标志物特异的任何检测剂或由试剂盒使用的以及本发明方法的任何步骤中使用的试剂是非天然存在的产物或化合物,因此,本发明的检测分子均不针对天然存在的化合物或产物。

[0138] 在一些实施方案中,ER应激标志物是BiP,术语“对BiP特异的检测剂”是指可用于定量样品中BiP表达水平的对BiP特异的任何试剂(例如,特异性地用于检测编码BiP的mRNA的核酸试剂或结合并识别BiP或其片段的特异性抗体)。

[0139] 术语“抗体”在本文中以其最广泛的含义使用,并且包括但不限于单链抗体、单克隆抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、合成抗体、多克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体或其活性片段或同源物。在上述和其他实施方案中,如本文定义的抗体是非天然存在的抗体。与可检测部分缀合的抗体是指与可检测部分缀合的任何抗体,以便具有可通过荧光、化学发光等检测的标签(在本文中也称为“标记的抗体”)。

[0140] 术语“接触”是指合在一起、放在一起、一起孵育或混合在一起。这样,当两个物品被合在一起或放在一起(例如,通过将它们彼此接触或组合它们)时,第一物品与第二物品接触。在本发明的说明书中,术语“接触”包括允许ER应激标志物(和任选地一种合适的对照参考基因)的至少一种检测分子与所测试样品的核酸或氨基酸分子之间相互作用的所有测量或步骤。

[0141] 因此,在其另一方面,本公开提供了对ER应激标志物特异的检测剂,所述ER应激标志物用于预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐治疗的反应的方法中(体外进行的),所述方法包括以下步骤:

[0142] (a) 用所述检测剂测定所述患者的至少一个生物样品中所述ER应激标志物的表达水平,以获得表达值,其中在治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个;

[0143] (b) 确定步骤(a)中获得的所述ER应激标志物的表达值比所述ER应激标志物的预定标准表达值高还是低;

[0144] 其中在(a)中获得的所述ER应激标志物的表达值高于预定标准中所述ER应激标志物的表达值,表明所述患者是所述治疗的反应者。

[0145] 本发明的方法还涉及在治疗期间的各个时间点(即在患者的“在时间上分开的”生物样品中)重复测定患者对如本文所定义的治疗的反应,从而监测患者的持续反应。当在如本文定义的方法的步骤(a)中针对每一个时间上分开的生物样品获得的至少一种ER应激标志物的表达值高于在治疗的相应时间点对相应群体(反应者)获得的预定标准中的所述相同的至少一种ER应激标志物的表达值时,可继续治疗。

[0146] 例如,可通过比较从同一患者获得的两个生物样品之间的ER应激标志物的表达水平来计算ER应激标志物水平(例如,BiP水平)的差异。第一生物样品是在治疗之前或在治疗

的第一天(在第一次施用之前)从患者获得的对照生物样品,或者第一生物样品是在治疗前从具有相同病况和临床状态的患者获得的相关ER应激标志物的预定标准表达水平。第二生物样品是在治疗开始后获得的所述患者的生物样品。可以重复上述过程。

[0147] 例如并且如下面所例示的,可在治疗开始后约四周(例如在第29天)获得第二生物样品,并且在治疗之前或在所述治疗的第一天于第一施用之前获得第一生物样品(对照生物样品)。具体地,当ER应激标志物为BiP时,如下测量BiP表达水平的差异: $[(\text{第29天的BiP水平}) - (\text{第1天的BiP水平})] * 100 / (\text{第1天的BiP水平})$

[0148] 因此,在具体的实施方案中,在所述治疗开始后约四周获得如本文所定义的方法的步骤(a)中的所述至少一个生物样品。

[0149] 在各种实施方案中,根据本公开的方法、对使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒是其中在所述患者的至少两个时间上分开的生物样品中测定步骤(a)中的所述至少一种ER应激标志物的表达水平。

[0150] 在本文定义的生物样品的上下文中,术语“在时间上分开的”是指在不同时间点(例如但不限于治疗前和治疗的第29天)获得的生物样品。

[0151] 在其他实施方案中,根据本公开的方法、对使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒是其中在开始所述治疗之前获得所述至少两个生物样品中的一个,其中“开始治疗”或“治疗开始”应当理解为第一剂本文定义的分离的肽的施用。术语“在开始所述治疗之前”是指在第一次施用所述分离的肽之前。在一些实施方案中,术语“在开始所述治疗之前”是指在治疗的第一天在进行第一次施用之前。

[0152] 在其他具体实施方案中,根据本公开的方法、对使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒是其中所述至少两个在时间上分开的生物样品间隔一周、两周、三周或四周、一个月、两个月、三个月或四个月。在另外的实施方案中,根据本公开的方法、对使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒是其中所述至少两个在时间上分开的生物样品间隔超过四个月。

[0153] 术语“生物样品”在本文中以其最广泛的含义使用,是指从哺乳动物受试者获得的样品。生物样品可以从哺乳动物(包括人)获得并包括流体、固体和组织。在一些实施方案中,生物样品是血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、组织样品、活检样品或细胞裂解物。

[0154] 如上所述,在开始如本文定义的治疗后,或在所述治疗开始之前(先于所述治疗开始)获得生物样品。生物样品可由本领域技术人员通过已知的任何方法获得。

[0155] 如下文实施例中所述,还检查了dTCaP对天然杀伤(NK)细胞的作用。如图12中所示,dTCaP诱导受体CD335和CD337表达的增加。天然杀伤细胞提供了对病毒感染细胞的快速反应并对肿瘤形成起反应。不希望受理论束缚,dTCaP对受体CD335和CD337的激活与这些细胞中增加的ER应激相关。因此,在一些实施方案中,可在患者的细胞例如NK细胞中进行ER应激的测量。

[0156] 此外,关于生物样品的术语“至少一个”是指一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或更多个生物样品。经必要的变通,在ER应激标志物的背景下,术语“至少一种”是指一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或更多种ER应激标志物。

[0157] 根据以下实施例1中显示的结果,与在11个月的治疗后(图2B)从脊髓肿瘤患者获得的活检样品中观察到的BiP水平相比,在从开始治疗之前(图2A)的同一患者获得的活检

样品中观察到BiP水平的明显差异。上述结果表明dTCaP肽增加了从脊髓肿瘤癌症患者获得的肿瘤中的ER应激。

[0158] 另外,以下实施例2中显示的结果表明,BiP水平的升高与在本文指定条件下利用肽dTCaP治疗的具有不同癌症类型的患者中肿瘤生长的完全抑制相关。

[0159] 如本文中用于描述本公开的,“癌症”或“肿瘤”等地涉及组织或器官的增生。如果组织是淋巴或免疫系统的一部分,则恶性细胞可包括循环细胞的非实体瘤。其他组织或器官的恶性肿瘤可能产生实体瘤。通常,本公开的方法和组合物可用于治疗非实体瘤和实体瘤。

[0160] 在一些实施方案中,癌症选自胰腺癌、卵巢癌、神经来源的梭形细胞肿瘤、梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、结直肠癌、结肠腺癌、直肠癌、直肠腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、脊髓肿瘤、乳腺癌、皮肤癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈癌、胃肠癌、胃癌、小肠癌、肝癌、肝脏癌症和女性生殖道的恶性肿瘤。

[0161] 在本公开的其他实施方案中,癌症选自神经来源的梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、肺癌、直肠癌、胰腺癌和脊髓肿瘤。

[0162] 在下面描述的临床研究中,发现dTCaP的抗肿瘤活性与患者肿瘤细胞中T1/ST2表达状态之间存在相关性。发现T1/ST2阳性、肿瘤大小变化与ER应激诱导之间存在直接相关性。这些发现与下文实施例4中描述的临床前研究一致,表明用dTCaP孵育ST2基因敲除OV-90细胞不会导致ER应激。不希望受理论束缚,这些观察表明T1/ST2受体可能是用于选择更可能对dTCaP产生积极反应的T1/ST2阳性患者的生物标志物。

[0163] 因此,在更进一步的实施方案中,本公开的方法还包括测定从处于dTCaP治疗下的患者获得的生物样品中的细胞的ST2受体状态。如下所述,在从接受dTCaP治疗的患者获得的治疗前和/或治疗中的肿瘤组织样品中也监测到了可溶性T1/ST2受体和外周血单核细胞(PBMC) T1/ST2受体表达水平相对于基线的变化。

[0164] 不希望受理论束缚,癌细胞上ST2受体的表达促进dTCaP进入细胞。因此,在如本文定义的方法、对使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒的一些实施方案中,患者中的癌细胞是ST2阳性细胞。

[0165] 如本文中所定义的,术语“ST2受体”或T1/ST2受体(也称为“T1/ST2”和“ST2/T1”)是指IL-1R超家族的成员,其具有三个细胞外免疫球蛋白结构域和一个细胞内TIR结构域。已经表明T1/ST2涉及心血管疾病。本文定义的术语“ST2阳性细胞”是指通过本领域已知的任何方法(例如但不限于下述方法)鉴定细胞上存在ST2受体的细胞。

[0166] 在另外的实施方案中,根据本公开的方法或对使用的ER应激标志物特异的检测剂是其中所述方法还包括向患者施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐。

[0167] 因此,在另一方面,本公开提供了用于预测癌症患者对用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐的治疗的反应的方法,所述方法包括以下步骤:

[0168] (a) 向患者施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的所述分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐;

[0169] (b) 测定所述患者的至少一个生物样品中至少一种内质网(ER) 应激标志物的表达

水平,以获得表达值,其中在所述治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个;

[0170] (c) 确定步骤(b)中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值比所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值高还是低;

[0171] 其中在(a)中获得的所述至少一种ER应激标志物的表达值高于预定标准中所述至少一种ER应激标志物的表达值表明所述患者是所述治疗的反应者。

[0172] 包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐可通过本领域技术人员已知的任何施用途径(例如静脉内(iv))施用。

[0173] 可以以使得达到所需治疗效果所必需的“有效量”施用本文定义的分离的肽。“有效量”由疾病的严重度结合治疗目标、施用途径和患者的一般状况(年龄、性别、体重和主治医师已知的其他考虑因素)来确定。

[0174] 如下所述,本发明人进行一项进行中的临床试验,据此确定癌症类型,剂量、施用频率、治疗长度、施用和其他参数。如下所述,给药方案为6、12、24、48或96mg/m²(例如,如图1所示)。

[0175] 在各种实施方案中,以约5mg/m²至约100mg/m²、90mg/m²、80mg/m²、70mg/m²、60mg/m²或约10mg/m²至约50mg/m²的剂量施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐。

[0176] 在具体实施方案中,如本文定义的方法或对使用的ER应激标志物特异的检测剂是其中以约5mg/m²至约100mg/m²的剂量施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的所述分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的所述药学上可接受的盐。

[0177] 在另外的具体实施方案中,以约6、12、24、48或96mg/m²dTCaP的剂量施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐。

[0178] 在另外的具体实施方案中,本文定义的方法、对使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒是其中以每周一次、两次或三次的频率施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的所述分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐。

[0179] 在另外的具体实施方案中,以每周3次的频率施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐。

[0180] 如下所列举的,在局部晚期或转移性实体瘤中用dTCaP(6、12、24、48和96mg/m²,3次/周,以连续28天的周期)治疗是安全的且耐受良好的,具有剂量依赖性的线性PK。dTCaP抑制了抗原因子,诱导抗癌细胞因子产生和ER应激,这很可能导致在一些患者中观察到的临床结果。阳性T1/ST2染色可用作对dTCaP的反应的预测标志物。

[0181] 因此,本发明还提供了治疗有此需要的患者的癌症的方法,包括向所述患者施用治疗有效量的包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、其功能性衍生物或所述分离肽的药学上可接受的盐。在一些实施方案中,分离的肽的治疗有效量为约6、12、24、48或96mg/m²。在另外的实施方案中,每周施用三次所述分离的肽,持续至少约四周的时间。在另外的具体实施方案中,所述分离的肽是本文中称为dTCaP的肽,其由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成。

[0182] 在其他具体实施方案中,所述分离的肽的治疗有效量为约24、48或96mg/m²或更

高。在另外的具体实施方案中,治疗有效量为约24mg/m²(或更高),持续至少约四周的时间,并且以约48、96mg/m²或更高的较高治疗有效量向患者进一步施用所述分离的肽。

[0183] 如本文中所用,术语“治疗”、“医治”、“医疗”是指改善、减轻或消除癌症患者的疾病活动的一种或多种临床参数、症状或指征。与本领域已知和如上详述的癌症相关的临床参数是例如肿瘤大小、肿瘤生长、肿瘤数量、疾病标志物、肿瘤细胞转移等。“患者”是指对于期望向其施用本文定义的分离的肽或本发明的任何药物组合物的任何哺乳动物,即患有本文定义的癌症的患者,特别是人患者。

[0184] 监测本文定义的治疗可以例如根据RECIST指南(17),通过本领域已知的用于监测癌症患者对治疗的反应的任何方法进行。

[0185] 如下文中详述的,本公开除其它以外,涉及与使用肽dTCApF进行的正在进行的临床试验相关的结果,所述肽dTCApF具有Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys的全D氨基酸序列(如由SEQ ID NO:1所示的)。

[0186] 本文定义的术语“分离的肽”包括包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列(即全部D构象的氨基酸序列Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys)的分离的肽(本文称为“dTCApF”或“Nerofe”)和由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐。

[0187] 本公开涵盖本文定义的分离的肽的任何药学上可接受的盐,特别是肽的乙酸盐。

[0188] 在一些实施方案中,分离的肽由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成,其具有Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys的全D氨基酸序列。在具体的实施方案中,根据本公开的分离的肽是SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的药学上可接受的盐,例如其乙酸盐。

[0189] 换句话说,在各种实施方案中,根据本发明的方法、对使用的ER应激标志物特异的检测剂或试剂盒是其中所述治疗是利用由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的分离的肽,或利用所述分离的肽的药学上可接受的盐。

[0190] 在其他具体实施方案中,本公开提供了预测癌症患者对利用由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的分离的肽或利用所述分离的肽的药学上可接受的盐的反应的方法,所述方法包括以下步骤:

[0191] (a) 测定所述患者的至少一个生物样品中BiP的表达水平以获得表达值,其中在所述治疗开始后获得所述生物样品中的至少一个;

[0192] (b) 确定步骤(a)中获得的BiP的表达值比BiP的预定标准表达值高还是低;

[0193] 其中,(a)中获得的BiP的表达值高于预定标准中BiP的表达值表明所述患者是所述治疗的反应者。

[0194] 换句话说,本公开提供了方法、对使用的ER应激标志物特异的检测剂、组合物和试剂盒,所述方法、检测剂、组合物和试剂盒用于预测癌症患者对利用由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的分离的肽或利用所述分离的肽的药学上可接受的盐的治疗的反应。

[0195] 本文定义的术语“肽”是指氨基酸残基的分子链,如果需要,可以在其每个氨基酸残基处进行修饰,例如通过甘露糖基化、糖基化、酰胺化(例如C-末端酰胺)、羧化或磷酸化。肽可以通过合成,通过基因工程方法,在宿主细胞中表达,或通过任何其他合适的方法获得。用于产生肽的方法是本领域熟知的。

[0196] 术语“分离的”是指从其天然环境中取出、分离或分开的分子,诸如氨基酸序列或肽。

[0197] 如本文中所用,术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸残基,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。

[0198] 术语氨基酸包括L-氨基酸和D-氨基酸,后者是L-氨基酸的镜像,其中碳 α 处的手性已被反转。D-氨基酸对蛋白酶介导的降解具有高度抗性并且具有低免疫原性反应。

[0199] 术语“氨基酸序列”或“肽序列”还涉及通过肽键连接的氨基酸残基位于肽和蛋白质的链中的顺序。通常从含有游离氨基的N-末端至含有游离羧基的C-末端报告序列。

[0200] 术语“包含”是指根据本公开的分离的肽包括SEQ ID NO:1所示的肽,但也可在所述肽的N-末端或C-末端处或两个末端处包含额外的氨基酸残基。

[0201] 如上所述,本公开还包括分离的肽,其包含具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的肽的衍生物。

[0202] 术语“衍生物”意指包括肽,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,但在其整个序列中相异于一个或多个氨基酸,即其在SEQ ID NO:1的整个序列内具有缺失、取代(例如用另一个氨基酸对至少一个氨基酸的替代)、倒转或添加。该术语还包括整个序列中的至少一个氨基酸残基被其相应的L-氨基酸残基替代。

[0203] 在具体实施方案中,本公开涉及SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的功能性衍生物,其中所述功能性衍生物与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、更优选95%,特别地99%的同一性。

[0204] 氨基酸“取代”是用具有相似结构和/或化学性质的另一种氨基酸替代一个氨基酸的结果,即保守氨基酸替代。氨基酸取代可基于所涉及的残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性来进行。例如,以下八组中的每一组包含彼此互为保守取代的氨基酸:

[0205] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0206] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0207] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0208] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0209] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0210] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0211] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和

[0212] 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。

[0213] 应理解,这些肽衍生物不得改变原始肽的生物活性。术语“功能性”意在表示经修饰的肽(即衍生物)保留了与未修饰的肽的生物活性定性地相似的生物学活性。可如本文所述测定衍生物的生物活性,即通过监测所述衍生物在向动物模型施用后的效果,如本领域已知的。

[0214] 在一些实施方案中,本文所定义的分离的肽或其药学上可接受的盐包含在药物组合合物中。

[0215] 本文定义的术语“药物组合物”是指包含由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐和任选地至少一种本领域已知的药理学上可接受的赋形剂或载体。如本文中所示，“药理学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂等。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或药剂与活性成分不相容，否则考虑将其应用于治疗性组合物。

[0216] 根据本公开的用于治疗有此需要的受试者的药物组合物任选地还包含缓冲剂、调节其摩尔渗透压浓度的试剂，和任选地本领域已知的一种或多种药理学上可接受的添加剂。

[0217] 根据本发明的用于治疗有此需要的受试者的药物组合物可以方便地以单位剂型提供，其可以根据制药工业中熟知的常规技术（例如如下文实施例中详述的）来制备。

[0218] 应当理解，除了本文特别提及的成分以外，根据本公开的组合物还可根据所述制剂的类型而包含本领域中常规的其他试剂。

[0219] 更进一步地，本公开提供了试剂盒，其包括：

[0220] (a) 至少一种检测剂，其特异性地用于测定生物样品中至少一种ER应激标志物的表达值；以及任选地以下的至少一种：

[0221] (b) 在治疗开始前和施用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其任何功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐时，针对癌症患者所测定的所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值；

[0222] (c) 至少一个对照样品。

[0223] 术语至少一种ER应激标志物的“特异性地用于测定表达值的检测剂”是指对本文定义的ER应激标志物特异的任何检测剂和任选地特异性地用于测定至少一种合适的对照参考基因的表达水平的另外的检测剂，如上所定义的。

[0224] 对照样品可包含生物样品或从其衍生的任何多肽/核酸。

[0225] 在具体实施方案中，根据本公开的试剂盒还包含用于测定生物样品中至少一种ER应激标志物的表达水平的至少一种试剂。包括了本领域已知用于此目的的任何试剂，例如但不限于二抗染料和荧光剂。

[0226] 在另外的实施方案中，根据本发明的试剂盒还包括：

[0227] (d) 包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物，或所述分离的肽的药理学上可接受的盐。

[0228] 在其他实施方案中，根据本公开的试剂盒还包含使用说明书。此类说明书可包括以下中的至少一种：用于进行生物样品中至少一种ER应激标志物的表达值的测定的说明书；和用于将生物样品中至少一种ER应激标志物的表达值与所述至少一种ER应激标志物的预定标准表达值进行比较的说明书。

[0229] 在另外的实施方案中，根据本公开的试剂盒是其中所述至少一种ER应激标志物是BiP。

[0230] 在其他实施方案中，根据本公开的试剂盒用于预测癌症患者对利用包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐的治疗的反应。

[0231] 如下所列举的，细胞上ST2受体的更高丰度促进dTCaP肽进入细胞。不希望受理论

束缚,这可以使得被治疗的患者的癌细胞中的ER应激增加,并且可使得能够降低所施用的分离的肽或与其一起施用的任何其他药剂的剂量。

[0232] 大多数抗癌药剂都是强效药物,出于安全性和有效性的原因,它们的剂量范围相当窄。服用过少的药剂将不能很好地治疗癌症,服用过量可能会导致危及生命的副作用。已知化学疗法的与其相关的副作用。常见的副作用包括疲劳、疼痛、口腔和咽喉溃疡、腹泻、恶心和呕吐等。因此,需要限制或减少施用的化学治疗剂的剂量的方法。

[0233] 如下所示,dTCApF肽对癌细胞的有益治疗效果及对其与ER应激的独特关联的理解作为本发明的另一方面的基础,根据该基础,将dTCApF与另一种抗癌治疗剂组合。不希望受理论束缚,由于dTCApF对ER应激的影响,dTCApF可以允许另外的抗癌剂的施用量显著减少,从而间接地减少其相关副作用,同时保持药物的抗肿瘤效果。

[0234] 其中将dTCApF与另外的抗癌治疗剂例如紫杉醇组合施用的研究描述如下。令人惊讶的是,尽管每种药剂,即dTCApF和紫杉醇对细胞活力仅具有边际效应,但将dTCApF与紫杉醇组合产生了协同效应并显著降低细胞活力。因此,dTCApF与抗癌剂的组合允许在癌症治疗期间降低抗癌剂的标准护理施用剂量。

[0235] 因此,在其另一个方面,本发明提供了联合治疗,其包含抗癌剂和用于治疗癌症的方法中的包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药理学上可接受的盐,其中以低于所述抗癌剂的标准护理剂量的剂量施用所述抗癌剂。

[0236] 如本文中所用,术语“联合治疗”是指伴随(同时)或相继施用两种或更多种药剂,即包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物和抗癌剂。例如,同时施用可以指含有两种或更多种药剂的一种剂型或者两种或更多种药剂的混合物的施用,而相继施用是指在不同时间点,甚至可以通过不同的施用途向患者施用的分开的剂型。

[0237] 因此,在本公开的一些实施方案中,同时或相继地施用本发明的分离的肽和所述抗癌剂。

[0238] 因此,如本文中所用,术语“所述抗癌剂的标准护理剂量”是指由熟练的医师基于以下考虑推荐用于治疗癌症患者的某种类型的癌症的剂量:诸如待施用的抗癌剂、患者的年龄、性别、体重和与疾病相关的相关临床参数以及患者的一般健康状况。虽然根据患者的体重(以千克计)来确定一些抗癌剂,但对于一些抗癌剂,剂量是基于身体表面积(BSA)确定的,其中医生使用身高和体重来计算所述身体表面积。BSA以平方米(m^2)表示。即使在考虑BSA后,儿童和成人的剂量也不同。

[0239] 如下所示,将肽dTCApF与紫杉醇组合产生协同效应并显著降低细胞活力。因此,dTCApF肽与抗癌剂的联合治疗可以允许在癌症治疗期间降低抗癌剂的标准护理施用剂量。

[0240] 在本公开的一些实施方案中,根据本公开使用的联合治疗是其中所述抗癌剂的施用剂量低于所述抗癌剂的标准护理剂量至少约1%-50%、约5%-45%、约10%-40%、约15%-35%或约20%-30%。

[0241] 术语“抗癌剂”也称为“抗癌药物”或“抗肿瘤药物”,以其广义使用,包括有效治疗恶性或癌性疾病的任何药物或药剂。存在几类抗癌药物,例如,烷化剂(例如环磷酰胺)、抗代谢物(例如5FU)、天然产物、免疫治疗剂、激素和抑制剂等。

[0242] 在一些实施方案中,根据本公开的抗癌剂是化学治疗剂、酪氨酸激酶抑制剂、免疫

治疗剂(例如下调抑制性免疫受体的抗体、抗体片段或单克隆抗体)、激素剂、生物制剂、分化因子、抗血管生成因子、抗自噬剂或免疫刺激剂。

[0243] 本领域已知的“化学治疗剂”是在形成新细胞的过程的不同阶段靶向细胞的药物。化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂、抗代谢物(例如5-FU)、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂(例如紫杉醇或泰素)或皮质类固醇等等。

[0244] 本领域已知的术语“酪氨酸激酶抑制剂”是指抑制酪氨酸激酶的药物。酪氨酸激酶是负责通过信号转导级联激活许多蛋白质的酶。这些蛋白质是通过向蛋白质中添加磷酸基团(磷酸化)来激活的,这是酪氨酸激酶抑制剂所抑制的步骤。

[0245] 在本公开的上下文中,术语“免疫治疗剂”或“免疫刺激剂”是指癌症免疫疗法,其试图刺激免疫系统以破坏肿瘤。

[0246] 本领域已知的癌症治疗背景中的术语“生物制剂”(有时称为“免疫疗法”)涉及使用活生物体、源自活生物体的物质或此类物质的实验室产生的形式来治疗疾病。癌症的一些生物疗法使用疫苗或细菌来刺激身体的免疫系统以对抗癌细胞。干扰参与肿瘤生长和进展的特定分子的生物疗法也称为靶向疗法。

[0247] 本领域已知的术语“抗血管生成因子”是指干扰血管生成(即新血管的产生过程)的药剂。抗血管生成剂是各种靶向疗法,其使用药物或其他物质阻止肿瘤制造它们保持生长所需要的新血管。

[0248] 本领域已知的术语“抗自噬剂”是指干扰自噬过程(即分解不需要的或功能失调的组分的细胞的受调控的破坏性机制)的药物(例如博来霉素、多柔比星)。

[0249] 在另外的实施方案中,根据本公开的抗癌剂是化学治疗剂、酪氨酸激酶抑制剂、免疫治疗剂、激素剂、生物制剂、分化因子、抗血管生成因子、抗自噬剂或免疫刺激剂。

[0250] 在具体的实施方案中,抗癌剂是紫杉醇。

[0251] 在一些实施方案中,本公开提供了联合治疗,其包含抗癌剂和用于治疗癌症的方法的由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的分离的肽或所述分离的肽的药学上可接受的盐,其中以低于所述抗癌剂的标准护理剂量的剂量施用所述抗癌剂。

[0252] 在另外的具体实施方案中,本公开提供了联合治疗,其包含紫杉醇和用于治疗癌症的方法中的由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的分离的肽或所述分离的肽的药学上可接受的盐,其中以低于所述抗癌剂的标准护理剂量的剂量施用紫杉醇。

[0253] 在一些实施方案中,以约5mg/m²至约100mg/m²的剂量施用所述分离的肽或其药学上可接受的盐。

[0254] 在另外的实施方案中,以每周一次、两次或三次的频率施用所述分离的肽或其药学上可接受的盐。在具体的实施方案中,以每周三次的频率施用所述分离的肽或其药学上可接受的盐。

[0255] 在另外的实施方案中,将所述分离的肽、抗癌剂或其任何药学上可接受的盐一起或分开地包含在药物组合物中。

[0256] 在一些实施方案中,根据本公开使用的联合治疗是其中所述癌症为胰腺癌、卵巢癌、神经来源的梭形细胞肿瘤、梭形细胞肿瘤、转移性结直肠癌、结肠癌、结直肠癌、结肠腺癌、直肠癌、直肠腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、脊髓肿瘤、乳腺癌、皮肤癌、肾癌、多发性骨髓瘤、甲状腺癌、前列腺癌、腺癌、头颈癌、胃肠癌、胃癌、小肠癌、肝癌、肝脏癌症和女性生殖道

的恶性肿瘤。

[0257] 在其他实施方案中,根据本公开使用的联合治疗是其中所述癌症为卵巢癌或胰腺癌。在另外的实施方案中,根据本公开使用的联合治疗是其中所述癌症是乳腺癌,优选地其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌(TNBC)。

[0258] 在另外的实施方案中,根据本公开使用的联合治疗是其中所述癌症包含ST2阳性癌细胞。

[0259] 在另外的实施方案中,根据本公开使用的联合治疗是其中所述分离的肽由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其药学上可接受的盐组成。

[0260] 在另外的实施方案中,根据本公开使用的联合治疗是其中以约5mg/m²至约100mg/m²的剂量施用所述分离的肽或其药学上可接受的盐。

[0261] 在另外的实施方案中,根据本公开使用的联合治疗是其中以每周一次、两次或三次的频率施用所述分离的肽或其药学上可接受的盐。

[0262] 本公开还提供治疗试剂盒,其包括:

[0263] (a) 抗癌剂;和

[0264] (b) 包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、或其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐。

[0265] 在一些实施方案中,本文定义的治疗试剂盒还包含使用说明书。

[0266] 在一些实施方案中,本文公开的治疗试剂盒用于治疗癌症的方法中,其中以低于所述抗癌剂的标准护理剂量的剂量施用所述抗癌剂。

[0267] 本公开还提供了治疗有此需要的患者的癌症的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的分离的肽、其功能性衍生物或所述分离的肽的药学上可接受的盐与抗癌剂的组合,其中所述分离的肽降低了所述抗癌剂的标准护理施用剂量。

[0268] 如本文中所用,术语“约”表示可以偏离(高于或低于)所参考的值高达1%,更具体地5%,更具体地10%,更具体地15%,在一些情况下高达20%的值,偏差范围包括整数值,并且如果适用,也包括非整数值,构成连续范围。

[0269] 如所公开和描述的,应理解,本发明不限于本文公开的具体实施例、方法步骤和组合物,因为此类方法步骤和组合物可以有所不同。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不是限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求及其等同物的限制。

[0270] 术语“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(includes)”、“包括(includes)”,“具有(having)”及它们的连接形式(conjugates)表示“包括但不限于”。该术语包括术语“由.....组成”和“基本上由.....组成”。短语“基本上由.....组成”是指组合物或方法可包括另外的成分和/或步骤,但仅在所述另外的成分和/或步骤不实质上改变所述组合物或方法的基本和新颖特征的情况下才包括。在整个说明书和随后的实施例和权利要求中,除非上下文另有要求,否则词语“包含”和变型诸如“含有(comprises)”和“包含(comprising)”将被理解为暗示包括所述整数或步骤或者整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤或者整数或步骤的组。

[0271] 如本文中所用,术语“方法”是指用于完成给定任务的方式、手段、技术和程序,包

括但不限于已知由化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业者已知的或易于从已知的方式、手段、技术和程序开发的那些方式、手段、技术和方法。

[0272] 必须注意的是,如在本说明书和所附权利要求中所使用的,除非另有明确说明,否则单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该(the)”包括复数指示物。

[0273] 在整个本说明书和随后的实施例和权利要求中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”和变型诸如“含有(comprises)”和“包含(comprising)”将被理解为暗示包括所述整数或步骤或者整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤或者整数或步骤的组。

[0274] 以下实施例代表本发明人在实施本发明的方面时所采用的技术。应当理解,虽然这些技术是用于实施本发明的优选实施方案的示例,但本领域技术人员根据本公开将认识到,在不脱离本发明的精神和预期范围的情况下,可以进行多种修改。

实施例

[0275] 无需进一步详细说明,据信本领域技术人员可以使用先前的描述最大限度地利用本发明。因此,以下优选的具体实施方案仅被解释为说明性的,并且不以任何方式限制要求保护的本发明。

[0276] 本领域已知的并且未在本文中具体描述的标准分子生物学方案通常如Sambrook& Russell,2001中所述。

[0277] 实验步骤

[0278] 活检样品

[0279] 由熟练的医生通过本领域熟知的程序从患者获得活检样品。

[0280] 通过活组织检查获得的组织的BiP染色

[0281] 解决方案和试剂

[0282] -二甲苯(Sigma#534056);

[0283] -乙醇,无水变性的,组织学等级(100%Solulfix#E003和95%Sigma#32294);

[0284] -去离子水(dH₂O);

[0285] -苏木精Gill12(Sigma#GHS216);

[0286] -洗涤缓冲液:1X TBS/0.1%吐温-20(1X TBST):为了制备1L,将50ml 20X TBS(Amresco#J640)加入到950ml dH₂O中,添加1ml Tween-20(Amresco#J640),并混合缓冲液;

[0287] -抗体稀释剂:**SignalStain®**抗体稀释液#8112;

[0288] -抗原暴露:

[0289] o柠檬酸盐:10mM柠檬酸钠缓冲液:为了制备1L,将2.94g二水合柠檬酸三钠钠盐(C₆H₅Na₃O₇·2H₂O)加入到1L dH₂O中。将pH调节至6.0。

[0290] oTE:10mM Tris/1mM EDTA,pH9.0:为制备1L,将1.21g**Trizma®**碱(C₄H₁₁N₃)和0.372g EDTA加入1L dH₂O中。

[0291] -3%过氧化氢:为了制备100mL溶液,将10ml 30%的H₂O₂(Sigma#216763)加入到90ml dH₂O中;

[0292] -封闭溶液:Background Buster(Innovex#NB306);

[0293] -一抗:用于免疫组织化学的抗BiP抗体(抗-BIP ab21685,abcam);

[0294] -生物素化的二抗: **SignalStain®**Boost免疫组织化学 (IHC) 检测试剂 (HRP, 兔) #8114;

[0295] DAB试剂 (Sigma#D6190);

[0296] EukittMounting介质 (Sigma#03989);

[0297] 脱蜡/再水化

[0298] 在此过程中,任何时候都不能使载玻片干燥。如本领域已知的那样制备活检组织的切片,并如下脱石蜡/水化:将切片在三次二甲苯洗涤中孵育,每次5分钟,进一步在两次100%乙醇洗涤中孵育,每次10分钟,然后在两次95%乙醇洗涤中孵育,每次10分钟,最后将切片在dH₂O中洗涤两次,每次5分钟。

[0299] 抗原暴露 (Antigen Unmasking)

[0300] 对于柠檬酸盐,将载玻片在pH 6.0的10mM柠檬酸钠缓冲液中煮沸,然后在亚沸温度下保持10分钟。将载玻片在工作台上冷却30分钟。对于Tris EDTA (TE),将载玻片在10mM TE/1mM EDTA (pH 9.0) 中煮沸,然后在亚沸温度下保持18分钟。将载玻片在工作台上冷却30分钟。

[0301] 染色

[0302] 将切片在dH₂O中洗涤三次,每次5分钟,在3%过氧化氢中孵育10分钟,在dH₂O中洗涤两次,每次5分钟,并在洗涤缓冲液中洗涤5分钟。然后,在室温下用100-400μl封闭溶液封闭每个切片30分钟。除去封闭溶液,并将在抗体稀释剂中以1:500稀释的100-400μl一抗(即抗-BipP)加入到每个切片中。将处理过的切片在4℃下孵育过夜。随后,除去抗体溶液,将切片在洗涤缓冲液中洗涤三次,每次5分钟。将生物素化的二抗(100-400μl)加入到每个切片中,并将处理过的切片在室温下于二抗存在的情况下孵育30分钟。然后,除去二抗溶液,用洗涤缓冲液洗涤切片3次,每次5分钟。随后,将试剂3,3'-二氨基联苯胺 (DAB, 100-400μl) 加入到每个切片中,并密切监测染色。一旦切片显色,将载玻片浸入dH₂O中。任选地按照制造商的说明将切片在苏木精中复染,然后在dH₂O中洗涤两次,每次5分钟。

[0303] 切片的脱水

[0304] 将切片在95%乙醇中孵育两次,每次10秒,在100%乙醇中重复孵育,孵育切片两次,每次10秒。然后在二甲苯中重复孵育,孵育切片两次,每次10秒,然后封固盖玻片以用于分析。

[0305] dTCaP肽以及包含其的组合物的制备

[0306] 肽dTCaP或NEROFE(这两个术语在本文中可互换使用并且指与上述相同的肽)是14个氨基酸残基长的肽,其中所有氨基酸残基处于其D构型,具有Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys(或以单字母代码表示的WWTFFLPSTLWERK,如由SEQ ID NO:1所示的)的氨基酸序列。

[0307] 如下合成肽。dTCaP醋酸盐(用于临床研究的最终药物产品)由Nextar Ltd., Israel以良好生产规范(GMP)制造、包装、测试、标记和发布。

[0308] 用于注射用溶液的dTCaP粉末以含有15mg(浓度为7.5mg/mL)的冻干5mL小瓶或含有80mg(浓度为40mg/mL)活性物质和4.8%甘露醇的10mL小瓶的形式提供,每瓶用注射用水(WFI)重建至终体积2mL。

[0309] 然后必须将用于注射用溶液的重建的2mL小瓶的dTCaP粉末在5%葡萄糖水溶液

中稀释至100或250mL的终体积以用于输注。dTCaP_F由Nextar Ltd提供,用于指定的临床部位(以用于第一期的临床研究)。

[0310] 药品是白色无菌、无热原的冻干饼,用于在注射用水中单次重建。重建后,其具有清澈无色溶液的外观。小瓶是5mL或10mL的I型透明注射玻璃小瓶,用20mm冻干型橡胶塞塞住,带有20mm铝制翻盖。将每十个小瓶二次包装在白色的带标记外盒中。小瓶和二次包装盒临床研究GCP标准标记由Nextar Ltd.在受控条件下进行。

[0311] 正在进行的临床试验概括

[0312] 患者

[0313] 本研究包括患有病理上证实的局部晚期和/或转移性实体恶性肿瘤的成人患者(≥ 18 岁),这些患者未能或不能耐受先前的标准疗法。主要入选标准包括可评估/可测量的疾病和东部肿瘤学协作组(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG)表现状态(PS) ≤ 1 。如果肝功能符合某一标准,则肝癌/肝转移患者符合条件,如果放射疗法在招募前 ≥ 4 周已完成并且患者接受 $\leq 4\text{mg/日}$ 的地塞米松,则脑转移患者符合条件。主要排除标准包括在开始研究药物前14天接受抗癌治疗和预期寿命 < 16 周。患者特征概述于下表1中。

[0314] 表1. 患者人口统计数据和基线特征

[0315]

	dTCaP _F 剂量				
	6 mg/m ²	12 mg/m ²	24 mg/m ²	48 mg/m ²	96 mg/m ²
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3
年龄, 岁数					
中位数 (范围)	63	61	65	72	64
平均值 (SE)	(62-77)	(58-62)	(57-67)	(51-94)	(55-77)
	68 (5)	67 (4)	67 (2)	72 (8)	64 (9)
性别, 男性/女性, <i>n/n</i>	3/0	2/1	1/2	2/1	3/2
肿瘤, 类型, <i>n</i>					
结直肠	3	2	0	2	1
胰腺	0	0	1	0	4
其它 ^a	0	1	2	1	0
先前疗法, <i>n</i>					
化学疗法	3	4	4	1	3
放射疗法	1	2	1	1	0
手术	2	2	1	1	2
利用生物药剂的治疗	0	0	1	0	0
利用小分子 (诸如酪氨酸激酶抑制剂) 的治疗	0	0	0	1	0

[0316] ^a包括小肠、肺、肝和脊髓中的肿瘤。

[0317] 研究设计

[0318] 本临床研究是正式的标签公开的I期剂量递增研究。主要目的是确定dTCaP_F的最大耐受剂量 (MTD) 和安全性。评估包括药物接触、不良事件 (AE; 根据不良事件的常用术语标准 (CTCAE) 进行分级) 以及剂量限制性毒性 (DLT) 的表征。其他目的包括评估dTCaP_F施用后血管生成因子的血清水平、药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 分析以及受体染色和肿瘤反应的评估。

[0319] 剂量递增研究遵循常规“3+3”方案, 并且包括6、12、24、48和96mg/m²静脉内 (i.v.) dTCaP_F的剂量, 3次/周, 连续28天的周期。患者的分配如图1所示。在所有3-患者群组中, 第一与第二患者的第一剂量间隔2-4周, 并且与第三患者的间隔≥1周。在以先前水平对3名患者进行≥28天的随访后开始新的剂量水平。MTD被定义为3名受试者中有≥1名在他们的第一治疗周期期间经历DLT的最高剂量水平。由于与AE无关的原因而未完成第一治疗周期的

患者被替换。另外,测定PK参数,包括曲线下面积(AUC)、最大血浆浓度(C_{max})和血浆半衰期(t_{1/2})。使用非区室模型估计PK参数。

[0320] 换句话说,以6mg/m²向患者静脉内施用dTCApF,每周3次,只要他们的疾病没有进展。如果证明12mg/m²的剂量是安全的并且疾病正在进展,则以12mg/m²向患者施用。例如,向图1中的患者编号1施用两个治疗周期(以6和12mg/m² dTCApF)。图1中的患者编号4接受三个治疗周期(12、24和48mg/m² dTCApF)。

[0321] 使用RECIST v1.1,通过体检、计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)技术(仅针对可评价的疾病)每8周评估dTCApF的临床活性;在适当的情况下,每个周期都有信息性肿瘤标志物。该研究得到了Rabin Medical Center, and the Ministry of Health, Israel的机构审查委员会的批准,并根据赫尔辛基宣言在Davidoff Center, Rabin Medical Center进行。所有患者在招募前签署了知情同意书。该研究在ClinicalTrials.gov (NCT01690741)注册。

[0322] 施用

[0323] 将用于注射用溶液的dTCApF粉末作为冻干的含有15mg (7.5mg/mL)的5mL小瓶或含有80mg (40mg/mL)活性物质和4.8%甘露醇的10mL小瓶提供,以如上所述,每小瓶用注射用水重建成2mL的终体积。然后,必须将用于注射用溶液的重建的2mL小瓶的dTCApF粉末在5%葡萄糖水溶液中稀释至终体积100mL以用于输注,剂量水平高达48mg/m²并且包括48mg/m²。对于高于48mg/m²的剂量水平,最终稀释体积为250mL。在60分钟内静脉内(iv)施用注射用dTCApF。

[0324] 药代动力学分析

[0325] 使用非区室模型估计PK参数,包括AUC (0-24)、C_{max}、C_{min}、T_{max}和t_{1/2}。进行跨剂量水平的比较以评估比例性。下表2中提供了PK参数的概述。

[0326]

表 2. 第 1 和第 2 周期(每个周期为 28 天)的第一天的 dTCApF 的药代动力学

	周期 1, 第 1 天					周期 2, 第 1 天				
	6 mg/m ² <i>n</i> = 3	12 mg/m ² <i>n</i> = 4	24 mg/m ² <i>n</i> = 4	48 mg/m ² <i>n</i> = 4	96 mg/m ² <i>n</i> = 3	6 mg/m ² <i>n</i> = 3	12 mg/m ² <i>n</i> = 4	24 mg/m ² <i>n</i> = 4	48 mg/m ² <i>n</i> = 4	96 mg/m ² <i>n</i> = 3
dTCApF 剂量										
AUC _{0-∞} , ng h/mL	3813 1209	12,905 6048	49,630 14,609	79,935 18,267	206,742 32,964	9719 1536	11,452 6048	57,069 14,609	100,093 22,113	294,682 32,016
C _{max} , ng/mL	2.3	2.1	3.2	4.9	6.0	2.8	2.0	3.7	4.6	8.5
T _{1/2} , h										

[0327] 药效学分析

[0328] 提供循环细胞因子和可溶性T1/ST2受体以及外周血单核细胞 (PBMC) T1/ST2受体

表达水平相对于基线的变化用于解释,并且与PK和抗肿瘤活性分析相关联。如果获得治疗前和/或治疗中的肿瘤组织样品,则提供T1/ST2受体测定的结果以用于临床解释。

[0329] 生物标志物分析

[0330] 如下所述定期从患者采集血液样品并置于冰上10分钟。通过在4℃下以3000rpm离心10分钟采集血清,将其在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下保持在单独的小瓶中,并在 -20°C 下运送至Immune System Key Ltd,在那里将它们解冻,等分,并于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 且储存。避免重复的冻融循环。

[0331] 使用全长抗-ST2抗体 (GenMed, Plymouth, MN) 对T1/ST2受体进行免疫组织化学(IHC)染色。用酶联免疫吸附测定(ELISA)测量各种因子的血清水平。被测量的其他因子包括:血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子D(VEGF-D)、表皮生长因子(EGF)、血管生成素-1、成纤维细胞生长因子1(FGF-1)、成纤维细胞生长因子2(FGF-2)、血小板衍生生长因子AA(PDGF-AA)、血小板衍生生长因子BB(PDGF-BB)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (均使用R&D systems, Abingdon, UK的ELISA试剂盒);粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素12p70(IL-12p70)、白细胞介素21(IL-21)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) (Millipore, Billerica, MA);和葡萄糖调节蛋白78(GRP78)/BiP (Enzo, New York, NY)。在进行利用肽的治疗的患者中测量的各种血管生成因子和细胞因子的血清水平的概述示于下表3中。

[0332] 表3. 施用dTCaP的血管生成因子和细胞因子的血清水平的平均变化

[0333]

dTCaP F 剂量	6 mg/m ²	12 Mg/m ²	24 Mg/m ²	48 Mg/m ²	96 Mg/m ²
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 5
利用 dTCaP F 治疗前或治疗后的血清水平的变化, %					
血管生成因子					
血管生成素-1	+960	-80	-77	-50	+70
FGF-1	+120	-62	-20	-27	+457
FGF-2	+199	-74	-34	-13	+44
PDGF-AA	+1379	-92	-79	-73	+57
PDGF-BB	+2271	-95	-82	-78	+185
VEGF-A	+265	-47	-62	-72	-2
TGF-β 1	+18	-80	-59	-20	无数据
VEGF-D	+117	-40	-54	-63	+3
细胞因子					
GM-CSF	+2173	-97	+11	+5613	+974
IL12-p70	+469	-76	+83	+477	+332
I1-2	无数据	-100	无数据	+242	+577
I1-21	+100	-61	+84	+1326	+29
TNF-α	+4	-5	+31	+74	+97

[0334] FGF, 成纤维细胞生长因子; GM-CSF, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; IL, 白细胞介素, PDGF, 血小板衍生生长因子; TGF, 转化生长因子; VEGF, 血管内皮生长因子; TNF, 肿瘤坏死因子。

[0335] 免疫原性

[0336] 循环抗-dTCaP F 抗体水平的相对于基线的变化被用于解释。

[0337] 抗肿瘤活性分析

[0338] 根据每2个周期的实体瘤 (RECIST) 1.1版中的响应评估标准评估具有可评价或可测量的疾病的受试者, 其中周期被定义为4周的治疗, 每周三次施用。根据循环和剂量群组概述肿瘤病变测量值和相对于基线的变化。在下表4中提供了dTCaP F 剂量组的不良事件的概述。

[0339] 表4. dTCaP F 剂量组的不良事件概述

[0340]

dTCApF 剂量					
	6 mg/m ²	12 mg/m ²	24 mg/m ²	48 mg/m ²	96 mg/m ²
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 5
1 级					
<u>血液病症</u>					
贫血	3	0	0	0	0
升高的 INR	0	0	0	1	0
<u>GI 病症</u>					
腹痛	0	1	2	0	0
肠梗阻	1	0	0	0	0
腹泻	0	2	0	0	2
胃肠道出血	1	0	0	0	0
呕吐	2	0	0	0	1
<u>一般病症</u>					
脱水	0	0	0	0	1
疲劳	0	1	0	1	0
高血压	3	1	1	0	1
<u>神经系统病症</u>					
神经病	0	1	1	0	0
2 级					
<u>疼痛</u>					
<u>疼痛, 腿</u>	0	2	0	0	0
<u>疼痛, 上背部</u>	0	0	0	0	1
<u>呼吸系统病症</u>					
<u>咳嗽</u>	0	1	0	0	0
<u>皮肤病症</u>					
<u>瘙痒症</u>	0	0	0	0	1

[0341]

<u>荨麻疹</u>	0	0	0	0	1
<u>肝脏和泌尿系统病症</u>					
<u>ALT 升高</u>	0	0	0	0	1
<u>AST 升高</u>	0	0	0	0	1
<u>胆红素升高</u>	0	0	0	1	1
<u>肝功能不全</u>	0	0	0	0	1
<u>尿路感染</u>	0	1	0	0	0
3 级					
<u>血液病症</u>					
<u>升高的 INR</u>	0	0	0	1	0
<u>一般病症</u>					
<u>高血压</u>	2	1	1	0	2
<u>肝脏和泌尿系统病症</u>					
<u>胆红素升高</u>	0	0	0	1	1
<u>胃肠道病症</u>					
<u>肠梗阻</u>	1	0	0	0	0
<u>腹泻</u>	0	1	0	0	1
<u>胃肠道出血</u>	1	0	0	0	0
4 级					
<u>胃肠道病症</u>					
<u>呕吐</u>	0	0	0	0	1

[0342] ALT, 丙氨酸转氨酶; AST, 天冬氨酸氨基转移酶; GI, 胃肠道; INR, 国际标准化比率。

[0343] 提出了客观肿瘤反应率 (完全反应和部分反应)、客观肿瘤反应持续时间、至客观肿瘤反应的时间和无进展存活期。使用卡普兰-迈耶尔方法和Cox模型, 利用计算的原始危害比和计算的调整后的危害比 (针对混杂因子变量进行调整的) 生成时间-对-事件 (Time-to-event) 估计和存活曲线。具有信息性肿瘤标志物评估 (例如, CA125或PSA) 的受试者在每个周期进行适当的评估。按循环和剂量群组概述肿瘤标志物参数 (当可评估时)。对PK、PD与dTCaP的临床效果之间的关系进行了探索性评估。参加该研究的患者的无进展存活期 (PFS) 的概述示于下表5中。

[0344] 表5. 关于参加研究之前的最后方案和关于dTCaP的PFS。灰色行表示经历关于

dTCApF的PFS的患者,所述PFS与他们参加前的最后方案的PFS相当或超过其。

[0345]

患者编号	关于招募前最后方案的 PFS, 天数	关于 dTCApF 的 PFS, 天 数
1	480	53
2	134	25
3	110	170
4	0	330
5	52	51
6	384	110
7	54	90
8	80	52
9	375	60
10	1800	14
11	41	52
12	42	50
13	96	42
14	365	40
15	1	80
16	105	45
17	564	41

[0346] PFS,无进展存活期

[0347] 统计分析

[0348] 描述性统计用于所有分析,并使用**SAS®**9.1版(SAS Institute Inc.,Cary,NC)进行。回归分析用于研究每月肿瘤变化、dTCApF的施用剂量与ER应激生物标志物(BiP)水平之间的双向相关性(2-way correlation)。使用F统计验证了相关性的统计显著性。

[0349] 通过ELISA测定GRP78/Bip标志物的血液水平

[0350] 如下测定进行dTCApF肽治疗的患者的血浆BiP水平。

[0351] 样品采集

[0352] 将来自用dTCApF治疗的患者的血液采集到淡紫色盖真空采血管中,然后置于冰上10分钟。然后将真空采血管在4℃下以3000rpm离心10分钟。将血浆级分收集在分开的小瓶中并保持在≤-20℃,直至在-20℃下通过World Courier运送到研发部门。当收到时,将血清样品解冻,在0.5ml小瓶中制备56μl的等分试样并在≤-20℃下储存。避免了重复的冻融

循环。在第一周期的第1天、第15天和第29天以及随后周期的第29天采集血液。

[0353] GRP78/BIP的血液水平的测定

[0354] 使用试剂盒GRP/BIP ELISA试剂盒 (cat#ADI-900-214Enzo) 测定GRP78/BIP的血液水平。将血浆样品的等分试样在4℃解冻并在4℃下以10,000G离心6分钟。然后将样品用含有BSA和去垢剂(试剂盒测定)缓冲液的Tris缓冲盐水按1:5稀释,然后将样品一式两份加载到提供的96孔板上,该板预涂有驴抗-绵羊IgG。也将校准样品和空白对照样品加载到平板上,然后将针对BiP的抗体(黄色)添加到除空白对照孔外的所有孔中。将ELISA板密封并在室温(RT)下以750转/分钟(RPM)振荡培养1小时。

[0355] 在上述孵育期后,不洗涤平板,并向除空白对照孔外的所有孔中加入BiP缀合物(蓝色)。将板再振荡孵育1小时(RT)。

[0356] 在额外的孵育期后,吸出孔内容物,并通过向每个孔中加入300μl含去垢剂的Tris缓冲盐水(试剂盒的洗涤缓冲液),使用自动洗涤器(Bio-plex pro II洗涤台)洗涤孔。再重复洗涤程序三次,总共洗涤四次。在最后一次洗涤后,吸出孔并将板紧紧地倒扣在无绒纸巾上轻拍以除去任何残留的洗涤缓冲液。

[0357] 将3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液加入各孔中,将板密封并在室温下于黑暗中振荡孵育19分钟。然后向每个孔中加入终止溶液,在450nm/570nm处读取ΔOD。从所有结果中减去空白对照孔值。生成校准曲线并相应地计算BiP ng/ml值并将其乘以稀释倍数(x5)。

[0358] 计算血浆BiP表达水平的差异

[0359] 通过计算在治疗的第29天用dTCaP治疗的患者的血浆中测量的BiP表达水平与在治疗的第1天(在第一次施用dTCaP肽之前)用dTCaP治疗的患者的血浆中测量的BiP表达水平之间的差异并将结果除以在治疗的第1天测量的上述BiP表达水平(标准化),来测定BiP的血浆表达水平的差异,即如下: $[(\text{第29天的BiP水平}) - (\text{第1天的BiP水平})] * 100 / (\text{第1天的BiP水平})$ 。

[0360] 钙网蛋白(CRT)血液浓度的测定

[0361] 使用试剂盒Elisa CRT试剂盒(人)(OKEH01054,Aviva system Biology)测定血清CRT水平。将第1周期的第1天与第15天或第29天(C1D1、C1D15和C1D29)的患者样品解冻,并以10,000G离心10分钟,并按照制造商的方案将其加载到平板上。

[0362] 肿瘤大小的测定

[0363] 根据实体瘤反应评估标准(RECIST)指南(例如通过进行计算机断层扫描(CT))在医学现场评估肿瘤大小。将试验最后一天(即最后一次施用肽后)的肿瘤大小与试验第一天(第一次施用肽之前)的肿瘤大小进行比较,以百分比表示。

[0364] 癌细胞中的ST2状态的评价

[0365] 使用特异性抗人st2受体抗体,通过免疫组织化学评价从患者获得的活检样品的癌细胞中的ST2状态。染色步骤后,由病理学家评价活检样品。

[0366] 用dTCaP处理的OV90细胞的免疫细胞化学(ICC)

[0367] 用于细胞培养生长和处理的材料

[0368] 生长培养基:

[0369] -DMEM高葡萄糖,L-谷氨酰胺(Gibco 41965-039);

- [0370] -丙酮酸钠11.0mg/ml (100mM) (Biological industries目录号03-042-1B) ;
- [0371] -50ml FBS (Biological industries目录号04-121-1A) ;
- [0372] -0.5ml两性霉素B 2500μg/ml (Biological industries目录号03-029-1) ;
- [0373] -5ml硫酸庆大霉素50mg/ml (Biological industries目录号03-035-1) ;
- [0374] 处理培养基:
- [0375] 处理培养基基于补充有5%甘露醇 (Sigma目录号M4125-500G) 的生长培养基。加入甘露醇后,在0.2μm过滤器中过滤培养基。
- [0376] 其他材料:
- [0377] -胰蛋白酶EDTA (Biological industries目录号03-052-1B) ;
- [0378] -75cm²培养瓶 (Nunc目录号178905) ;
- [0379] -25cm²培养瓶 (Nunc目录号136196) ;
- [0380] -甘露醇中的20mg/ml dTCaP (使用等分试样,避免反复冻融循环) ;
- [0381] -使用人卵巢癌细胞系OV90:常规OV90 (美国典型培养物保藏中心,ATCC) 和T1/ST2 KO OV90 (由本发明人制造) ;
- [0382] 用于ICC的材料:
- [0383] -载玻片:Nunc Lab-Tek II Chamber载玻片系统 (154534Nunc) ;
- [0384] -洗涤缓冲液:PBS (02-023-5A Biological Industries) ;
- [0385] -固定溶液:PBS中的3%甲醛 (252549Sigma) ;
- [0386] -透化溶液:PBS中的0.25%Triton X-100 (0694Amresco) ;
- [0387] -封闭缓冲液:含0.1%Tween-20 (0777Amresco) 的PBS中的1%BSA (A7906Sigma) 、22.52mg/mL甘氨酸 (G8898-500G Sigma) ;
- [0388] -抗体缓冲液:含0.1%Tween-20 (0777Amresco) 的PBS中的1%BSA (A7906Sigma) ;
- [0389] -一抗:以1:500稀释的抗-58k高尔基体标志物 (ab27043) ,以1:250稀释的抗-β-COP (ab6323) ,以1:1,000稀释的抗-GRP78BiP (ab21685) (抗体购自Abcam) ;
- [0390] -二抗:对于58k高尔基体标志物和β-COP:ZytoChem Plus (HRP) 聚合物抗-兔 (ZUC032-006) 。对于BIP:ZytoChem Plus (HRP) 聚合物抗-小鼠 (ZUC050-006) ;
- [0391] -DAB (3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐,D3939Sigma) ;
- [0392] -水性封固剂 (ab128982Abcam) 。
- [0393] 细胞培养物生长
- [0394] 将OV90和OV90ST2K0细胞在37℃、5%CO₂和100%湿度下的培养箱中于烧瓶中生长,直至达到高达70-80%的密度。使用移液管从烧瓶中清空培养基。然后,向每个烧瓶中加入4ml胰蛋白酶EDTA,将烧瓶置于培养箱中数分钟,直至大部分细胞从烧瓶中脱落。避免敲击烧瓶以增加细胞的脱落。然后将培养基 (10ml) 加入烧瓶中,将培养基中的培养物和胰蛋白酶分入2个烧瓶,每个烧瓶加入15ml新鲜培养基。将细胞孵育2-3天以进行生长,直至达到70-80%,并根据需要重复传代过程。
- [0395] 细胞处理
- [0396] 将如上详述的在培养基和胰蛋白酶中生长的细胞培养物转移到50ml锥形管中,并将管在4℃下以300g离心10分钟。然后弃去上清液,向细胞沉淀中加入15ml新鲜培养基,以使沉淀物流化。计数细胞并将其在腔室玻片上以10,000个细胞/孔接种在1ml生长培养基

中。将腔室玻片放置在通风橱中静置1小时,然后转移到培养箱中过夜。第二天制备包含50 μ g/ml dTCApF的细胞处理培养基。通过从腔室玻片中吸出并弃去培养基以及通过向每个孔中加入0.5ml含有dTCApF(或对照)的细胞处理培养基来处理细胞,然后在培养箱中孵育48小时。在该时期后,将另外剂量的包含dTCApF的处理培养基加入到处理过的细胞孔中,并在进一步孵育24小时后收集细胞。

[0397] 免疫细胞化学

[0398] 将如上详述处理的细胞经受以下ICC方案。在完成孵育期后,吸出培养基并通过用洗涤缓冲液填充每个孔来洗涤细胞。然后,弃去缓冲液并向每个孔中加入300 μ l固定溶液。将细胞在室温下孵育15分钟。然后弃去固定溶液并将孔短暂漂洗两次。然后,向每个孔中加入300 μ l透化溶液,并将细胞在室温下孵育10分钟。弃去透化溶液,洗涤孔3次,每次洗涤5分钟。向每个孔中加入封闭缓冲液(1ml),并将细胞在室温下孵育1小时。在孵育时间结束之前,将上文详述的一抗在抗体稀释缓冲液中稀释。然后,从孔中弃去封闭缓冲液,并向每个孔中加入120 μ l一抗。然后用石蜡膜(或胶带)覆盖细胞并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0399] 第二天,弃去一抗,用洗涤缓冲液洗涤孔3次,每次洗涤5分钟。然后将第二抗体加入每个孔(1-2滴)中,并将细胞孔在室温下孵育30分钟。然后用洗涤缓冲液洗涤孔3次,每次洗涤5分钟。将DAB底物(新鲜制备并在0.2 μ m过滤器中过滤的)加入每个孔(1-2滴)中,将细胞孔孵育5-15分钟,同时检查显色。用PBS洗涤细胞孔5分钟。然后将孔从载玻片上取下,并将载玻片风干。添加封固剂并将载玻片置于盖玻片上。使用光学显微镜进行可视化。

[0400] 在紫杉醇或dTCApF存在的情况下的BrdU掺入测定

[0401] 如下所详述的,在BrdU存在的情况下,用dTCApF或紫杉醇处理人胰腺癌细胞(BxPC3)和人卵巢癌细胞(OV90)24小时。

[0402] 在37 $^{\circ}$ C下在具有5%CO₂的培养箱中将细胞以2,000个细胞/孔置于具有100 μ l DMEM(life science 41965-039)和10%胎牛血清(FBS,Biological industries 14-127-1A)的96孔板的中间,进行24小时。然后将培养基更换为200 μ l DMEM,所述DMEM含有2.5%FBS和紫杉醇(sigma T7402)(在DMSO中,终浓度为2nM或4nM)或dTCApF(nextar ISK353-01批次351-01/1.68)(在DMSO中,终浓度为25 μ g/ml)。如上所述,将对照细胞中的培养基替换为DMEM和FBS。细胞孔中DMSO的最大浓度低于0.5%。每种浓度使用四个孔。

[0403] 如下将经紫杉醇和dTCApF处理的细胞以及对照细胞在BrdU存在的情况下进一步孵育24小时:将20 μ l BrdU试剂(在补充有2.5%FBS的DMEM中以1:100稀释)加入细胞中,并将板在37 $^{\circ}$ C下于具有5%CO₂的培养箱中孵育24小时。根据试剂盒方案(Millipore#2752)进行BrdU ELISA。

[0404] 在紫杉醇和dTCApF存在的情况下的BrdU掺入测定

[0405] 如下所详述的,在BrdU存在的情况下,用dTCApF和紫杉醇处理人胰腺癌细胞(BxPC3)和人卵巢癌细胞(OV90)24小时。

[0406] 在37 $^{\circ}$ C下在具有5%CO₂的培养箱中将细胞以2000个细胞/孔置于具有100 μ l DMEM和10%FBS的96孔板的中间,进行24小时。然后将培养基更换为200 μ l DMEM,所述DMEM含有2.5%FBS和dTCApF(nextar ISK353-01批次351-01/1.68)(在DMSO中,终浓度为25 μ g/ml)。细胞孔中DMSO的最大浓度低于0.5%。每种浓度使用四个孔。然后将终浓度为2nM或4nM的紫杉醇(在5 μ l补充有2.5%FBS的DMEM中)加入到含有dTCApF的细胞中,并如下将处理过的细

胞在BrdU存在的情况下进一步孵育24小时：在实验结束前24小时，将20 μ l在补充有2.5% FBS的DMEM中以1:100稀释的BrdU试剂加入细胞中。最后，按照试剂盒方案(Millipore# 2752)进行BrdU ELISA。

[0407] 实施例1

[0408] 肽dTCApF增强癌细胞中的内质网(ER)应激

[0409] 如上所述，鉴定了由人胸腺特有的cDNA编码的称为“T101”的肽，并且所述肽经报道减小癌症肿瘤大小。另外，据报道，T101的肽衍生物，在本文中称为dTCApF(或“Nerofe”)，可使癌细胞减少已知与癌转移相关的蛋白质的分泌，并在体外直接抑制癌细胞的迁移(16)。

[0410] 如上所述，目前利用肽dTCApF进行正在进行的临床试验。该肽具有Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys的全D氨基酸序列(如SEQ ID NO:1所示)，并如上所述制备其。

[0411] 按指定的给药方案(静脉内(iv)，每周3次)向如上所述的癌症患者施用肽dTCApF。

[0412] 为了研究dTCApF肽对癌细胞的作用，从在上述方案下用dTCApF治疗11个月的脊髓肿瘤患者获取活检样品。在治疗前和治疗11个月从患者获得组织活检样品，并用抗-BiP抗体染色以检测BiP(一种内质网(ER)应激的标志物)水平。

[0413] 如上所述，结合免疫球蛋白(BiP)，也称为GRP78，在ER中充当分子伴侣，并且在导致ER中解折叠多肽积累的条件下其合成被显著诱导。

[0414] 如图2所示，在开始治疗之前(图2A)和在治疗11个月(图2B)从患者获得的活检样品中观察到BiP水平的明显差异，证明了dTCApF肽增强从脊髓肿瘤患者获得的肿瘤中的ER应激。

[0415] 实施例2

[0416] ER标志物BiP水平的升高与肿瘤大小的减小相关

[0417] 如上文实施例1中所述，基于观察到的BiP水平的升高，显示了dTCApF增强从接受该肽治疗的患者获得的肿瘤细胞中的ER应激。令人惊讶的是，发现ER应激标志物BiP的增加与被治疗的患者中肿瘤生长的抑制高度相关，如下所述的。

[0418] 测定参与使用dTCApF肽(如上针对第1天(在第一次施用dTCApF之前)和利用dTCApF治疗的第29天所述的那样进行)的临床研究的癌症患者的血浆中的BiP水平。然后从在第29天从癌症患者获得的BiP的血浆水平中减去在第1天针对同一癌症患者获得的BiP的血浆水平(“基线”水平)。

[0419] 并行地，如上所述，在第1天(或刚治疗开始前)和治疗的最后一天，使用计算机断层扫描(CT)评估参与的癌症患者的肿瘤大小。然后如上所述计算肿瘤大小的差异(在本文中也称为“肿瘤变化”)。简言之，“肿瘤变化”是在治疗的第一天(第1天)至治疗的最后一天之间(基于诸如上述的标准确定治疗的持续时间)通过dTCApF治疗获得的肿瘤大小差异的量度。

[0420] 总体而言，筛选了39名患者，其中17名患者参加并完成了该研究。大多数患者(64%)为男性，中位数(范围)年龄为65(51-94)岁。几乎一半的患者(47%)患有结直肠癌(CRC)，约四分之一(29%)患有胰腺癌。除一名患者外，所有患者在加入前均接受过数线的抗癌疗法(例如化学疗法、放射疗法、生物疗法)(表1)。患者接受1-3个周期的递升的dTCApF

剂量 (6mg/m²、12mg/m²、24mg/m²、48mg/m²和96mg/m²) ,如图1中详述的。

[0421] 如上所述,在开始dTCApF治疗之前和治疗29天之后测量GRP78/BiP蛋白(作为ER应激生物标志物)的血清水平。如图3所示,施用的dTCApF剂量与血清GRP78/BiP水平的变化之间 ($P \leq 0.05$) 以及肿瘤大小的变化和GRP78/BiP血清水平的变化之间 ($P \leq 0.002$) 存在统计学显著的相关性(图4),表明dTCApF诱导了ER应激。

[0422] 如图4所示,BiP水平的变化与肿瘤大小的变化之间存在(负)线性相关性,即BiP水平的升高与肿瘤生长的完全抑制相关。这些结果表明,除其它以外,dTCApF通过增强癌细胞中的ER应激以及(不希望受理论束缚)通过破坏高尔基复合体起作用,从而导致癌细胞死亡。

[0423] 如上所述在治疗的第1天和第29天测定的参与临床试验的患者的血清BiP水平示于下表6中。

[0424] 表6. 参与临床试验的患者的血清BiP水平

[0425]

患者	群组	周期	日期	ng/ml BiP	stDev (log)
002	1	1	1	21.30	0.06
002	1	1	29	26.94	2.74
006	2	1	1	9.85	6.75
006	2	1	29	38.91	3.00
007	2	1	1	51.03	2.77
007	2	1	29	38.68	0.64
011	2	1	1	45.78	1.01
011	2	1	29	23.89	0.44
012	3	1	1	13.81	0.55
012	3	1	29	21.17	0.23
013	3	1	1	48.33	0.31
013	3	1	29	26.94	3.55
015	3	1	1	56.53	2.25

[0426]

015	3	1	29	46.62	1.16
017	4	1	1	86.18	0.24
017	4	1	29	27.94	0.15
022	5	1	1	22.90	0.15
022	5	1	29	48.62	1.25
023	5	1	1	20.67	0.65
023	5	1	29	39.86	0.11
035	5	1	1	38.44	0.46
035	5	1	29	169.21	0.47

[0427] 有趣的是,如上表3所示,用6mg/m²剂量的dTCaP治疗导致血管生成素-1、FGF-1、FGF-2、PDGF-AA、PDGF-BB、VEGF-D、TGF- β 和VEGF的血清水平升高。然而,在12-48mg/m²的剂量下,观察到这些因子的血清水平降低,并且在96mg/m²时,注意到除VEGF-D之外的所有因子的增加。此外,所有抗癌细胞因子诸如GM-CSF、IL2、IL-12p70、IL-21和TNF- α 的血清水平在所有剂量水平上随着dTCaP施用而升高。

[0428] 为了探究dTCaP的活性模式(MOA),通过其T1/ST2状态检查患者。发现其肿瘤为T1/ST2阳性(如通过IHC测定的)的患者在试验中比其肿瘤为T1/ST2阴性的患者存在时间长,如图5所示的,并且在dTCaP治疗期间经历稳定的疾病(SD)。

[0429] T1/ST2受体(在本文中也称为“ST2”和“ST2/T1”)是白细胞介素1受体(IL-1R)超家族的成员。如本领域已知的,白细胞介素-1受体(IL-1R)超家族的成员的特征在于细胞外免疫球蛋白样结构域和细胞内Toll/白细胞介素-1R(TIR)结构域。该家族的成员在宿主防御、伤害和应激方面发挥着重要作用。先前已经报道了肽dTCaP所源自的胸腺肽T101可作为T1/ST2受体的配体(13-15)。

[0430] 因此,对于每个群体(T1/ST2阴性患者和T1/ST2阳性患者),重新分析BiP水平(即肿瘤大小的变化对比施用的dTCaP剂量)。结果图示于图6中。

[0431] 如图6所示,其中将ST2阳性和ST2阴性癌症分离,使BiP标志物水平与为ST2阳性的癌细胞中的肿瘤变化相关联导致为-0.98的R值,以及使BiP标志物水平与为ST2阴性的癌细胞中的肿瘤变化相关联导致为-0.83的R值。由于数据集较小,因此ST2阳性图的p值不是最佳的。

[0432] 不希望受理论束缚,该差异表明ST2阳性细胞上ST2受体的较高丰度促进dTCaP肽进入这些细胞,因此推测需要较低剂量的肽。

[0433] 值得注意的是,即使在定义为“ST2阴性”的细胞中,也存在充足的ST2受体用于将dTCaP肽掺入细胞中,尽管其丰度低于ST2阳性细胞的情况。

[0434] 上述结果表明,ER应激标志物BiP可用作dTCaP肽在用该肽治疗的癌症患者中抑制肿瘤生长的效率的标志物。由于在治疗的第一个月已经可以看到效果,因此在治疗的早期阶段测定BiP水平可以作为评估治疗功效的评估测试或工具,并有助于确定这些患者的

进一步治疗步骤(例如在确定是否应继续使用dTCApF治疗中)。

[0435] 实施例3

[0436] 肽dTCApF的安全性和耐受性

[0437] 如下所述,分析参与上述实施例2中提及的临床试验的患者的各种参数,包括安全性、PK和功效。

[0438] 安全性和耐受性

[0439] 每位患者的平均治疗周期数为 3.2 ± 1.4 。在直至群组5的任何患者中均未观察到剂量限制性毒性(DLT)。不良事件(AE)概述于上表4中。没有一个与研究药物相关。高血压、贫血、呕吐、腹泻和腹痛是报告最多的2级AE,高血压是报告最多的3级AE。呕吐是唯一的4级AE,报告于1例患者中。大多数AE都是自我缓解的。总体而言,利用dTCApF的治疗被良好地耐受,没有累积毒性。未达到MTD。

[0440] 药代动力学

[0441] 第1周期和第2周期第一天的PK结果概述于表2中; $t_{1/2}$ 、 C_{max} 和AUC0与剂量线性相关。观察到dTCApF的剂量依赖性血浆浓度(图7)。

[0442] 功效

[0443] 在整个治疗期间,治疗 ≥ 3 个月(12、24和48mg/m²)的17名患者中有5名经历了稳定的疾病(SD)。值得注意的是,一名患者患有腰痛和虚弱(显然归因于脊髓瘤形成压迫脊髓),接受各种止痛药物(例如,曲马多、羟考酮/纳洛酮、吗啡和普瑞巴林)并使用助行器。在6个月的治疗(12、24和48mg/m²)后,患者在无需要任何止痛药的情况下改善了行走。

[0444] 无进展存活期(PFS)分析显示,与先前的治疗方案相比,6名患者对于dTCApF经历更长的PFS,而且一名患者的PFS与针对他先前的治疗方案的PFS相当(这些PFS值在上表5中以粗体字母标示)。另外,一名未接受过先前治疗的患者能够持续在研究药物上330天(染色阳性)(表5)。回归分析显示肿瘤大小的变化与施用的dTCApF剂量之间的统计学显著相关性(图8)。

[0445] 实施例4

[0446] dTCApF肽对ST2敲除细胞的影响

[0447] 如上所述,ST2阳性细胞上ST2受体的较高丰度可能促进dTCApF肽进入这些细胞。为了进一步检查ST2受体在癌细胞上的存在对dTCApF进入细胞的影响,制备了ST2敲除(KO)细胞,并如下所述检测了这些细胞中响应于dTCApF施用的各种蛋白质的水平。

[0448] 用于敲除ST2受体的细胞是哺乳动物卵巢细胞OV90(腺癌)。如上所述,给OV90细胞和KO OV90细胞施用dTCApF,然后将所述细胞经历免疫细胞化学测定。

[0449] 通过比较图9A(未施用dTCApF的对照OV90细胞)与图9B(施用dTCApF的OV90细胞)显而易见的是,dTCApF诱导高尔基体完全破坏,导致ER应激。图9B显示高尔基体消失,并且破坏累积在ER上的蛋白质,这继而导致ER应激。这些结果是基于对 β -cop蛋白的分析,所述 β -cop蛋白是高尔基体蛋白之一。

[0450] 与上述结果相反,如在OV90ST2KO细胞中的图9C(对照OV90ST2KO,未处理的)和图9D(施用了肽的OV90ST2KO细胞)中所示,未观察到dTCApF对高尔基体的影响(箭头指向完整的高尔基体)。

[0451] 图10显示作为dTCApF施用的结果的OV90和OV90ST2KO细胞中BiP表达的评估。虽然

在OV90细胞中,由于dTCApF处理,观察到BiP染色的明显增强(如通过图10A(无dTCApF)与图10B(在dTCApF存在的情况下)的比较所示的),但在OV90ST2K0细胞中,作为dTCApF处理的结果,在BiP的染色方面没有差异,如通过比较图10C与图10D推断的。这意味着OV90ST2K0细胞对dTCApF不起反应,因此没有诱导ER应激。

[0452] 不希望受理论束缚,上述结果证明了ST2受体如何与患者中的ER应激相关。ST2阳性细胞对dTCApF的敏感性增加以及继而上述结果也解释了在图6中证实的在ST2阳性细胞中观察到的BiP表达水平的较高差异。

[0453] 实施例5

[0454] dTCApF肽对正常细胞的影响

[0455] 将肽dTCApF应用于健康的人外周免疫细胞,仅发生轻微的细胞死亡,因为与正常健康细胞相反,明显地癌细胞对ER应激非常敏感(数据未显示)。因此,不希望受理论束缚,dTCApF似乎选择性地影响癌细胞。

[0456] 实施例6

[0457] ER标志物CRT的水平与dTCApF肽的施用剂量无关

[0458] 钙网蛋白(CRT)是在正常条件下在细胞的ER中表达的分子伴侣,并且有助于新合成的蛋白质折叠。除了显示作为dTCApF处理的结果BiP ER应激标志物增加的上述结果以外,还检测了用dTCApF处理的人患者中CRT血清水平的变化。向患者施用不同剂量的dTCApF($6\text{mg}/\text{mm}^2$ – $96\text{mg}/\text{mm}^2$)可诱导CRT血清水平的变化,然而,与显示与dTCApF施用和肿瘤大小线性相关的BiP水平相反,其与其中施用dTCApF的剂量无任何相关性,如上所述的。

[0459] 在图11A中显示了柱状图,该柱状图显示参与上述临床研究的癌症患者中dTCApF治疗结束时的CRT血清水平,在图11B中显示了柱状图,该柱状图显示接受dTCApF治疗的患者的血清CRT水平变化。

[0460] 总之,在dTCApF剂量与血清CRT水平之间未观察到相关性。在小鼠中进行的体外实验显示,与BiP(其水平因dTCApF处理而升高(数据未显示))相反,细胞中的CRT水平不受dTCApF处理影响。

[0461] CRT是伴侣蛋白,当用dTCApF处理时其在细胞中的水平没有升高,而在用dTCApF处理后,BiP的水平在体外和体内确实增加。虽然两者都是ER应激修复机制的一部分,但dTCApF选择性地体外和体内增加BiP,并且对CRT水平没有影响。CRT水平没有发生变化的观察结果与BiP的血清水平的变化和CRT的“无变化”相关。这意味着患者中BiP水平的变化与dTCApF的体外/体内活性完美相关。

[0462] 实施例7

[0463] 肽dTCApF活化NK细胞

[0464] 天然杀伤细胞或“NK细胞”是一种对先天性免疫系统至关重要的细胞毒性淋巴细胞。NK细胞的作用类似于适应性免疫反应中细胞毒性T细胞的作用。在其他功能中,NK细胞对病毒感染的细胞提供快速反应并对肿瘤形成起反应。

[0465] 还检查了dTCApF对人NK细胞(CD56+CD16+,购自Lonza(2W-501))的作用。将NK细胞接种在LGM-3培养基(补充有IL-2和IL-15)上。用dTCApF处理细胞24小时并进一步处理72小时,然后进行FACS分析,该分析集中于CD335和CD337抗原(分别是天然细胞毒性触发受体1和天然细胞毒性触发受体3)。如图12所示,dTCApF诱导两种受体表达的增加。

[0466] CD335和CD337受体对NK细胞对抗癌细胞和病毒感染细胞的活性很重要。在上述针对患者006(具有脊髓肿瘤)所述的临床试验期间也观察到NK细胞活性的诱导。在临床试验期间,在患者进入临床试验之前和施用治疗之后用特异性抗人NK细胞抗体对患者的活检样品进行染色。在施用dTCApF后在患者的活检样品中观察到NK细胞的强染色(数据未显示)。

[0467] 实施例8

[0468] 将dTCApF与紫杉醇组合产生协同效应

[0469] dTCApF肽对癌细胞的有益治疗效果促进了进一步的研究,其中在上述条件下将dTCApF与另外的抗癌治疗剂即泰素组合施用于癌细胞。

[0470] 泰素,也称为紫杉醇,是一种抗癌(“抗肿瘤”或“细胞毒性”)化学治疗药物。紫杉醇被分类为“植物生物碱”、“紫杉烷”和“抗微管剂”,用于治疗乳腺癌、卵巢癌、肺癌、膀胱癌、前列腺癌、黑色素瘤、食道癌以及其他类型的实体瘤癌症。

[0471] 通过溴脱氧尿苷(BrdU)掺入测定监测施用的药剂的作用,用于检测活性DNA合成,从而检测细胞增殖和活力。

[0472] 两种类型的癌细胞(人卵巢癌细胞(OV90,图13A)和人胰腺癌细胞(BxPC3,图13B))用于评估dTCApF肽和泰素的组合效应。

[0473] 当将泰素单独施用于人卵巢癌细胞(图13A)或人胰腺癌细胞(图13B)时,与对照未处理细胞相比,基于所进行的BrdU掺入测定的结果,未观察到对细胞活力的影响。

[0474] 另外,如图13A所示,当将dTCApF肽(25 μ g/ml)单独施用于人卵巢癌细胞时,与对照未处理细胞相比,未观察到对细胞活力的影响。

[0475] 然而,当将dTCApF肽(25 μ g/ml)与紫杉醇(2nM)组合施用于人卵巢癌细胞时,观察到BrdU掺入减少约50%(图13A)。对于dTCApF(25 μ g/ml)与浓度为4nM的泰素的组合,该效应得到增强,未观察到BrdU掺入。

[0476] 此外,如图13B所示,当将dTCApF肽(25 μ g/ml)单独施用于人胰腺癌细胞时,与对照未处理细胞相比,仅观察到对细胞活力的轻微影响。然而,当将dTCApF(25 μ g/ml)与泰素(2nM)组合施用于人卵巢癌细胞时,观察到BrdU掺入减少约20%(图13B)。当使用浓度为25 μ g/ml的dTCApF与浓度为4nM的泰素组合时,该效应更明显,BrdU掺入减少超过40%。

[0477] 这些结果表明dTCApF肽对泰素活性的协同作用,泰素本身对增殖没有任何影响,从而允许减少用于化学疗法的泰素的剂量。不希望受理论束缚,这种协同效应可以通过如上所述的dTCApF诱导ER应激来解释,所述ER应激的诱导有助于促进细胞死亡。

序列表

<110> Immune System Key Ltd.
<120> 在癌症疗法作为预测工具的内质网应激
和用于癌症治疗的联合疗法
<130> 2450285
<150> US 62/291,190
<151> 2016-02-04
<160> 1
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 被称为“dTCaPs”的合成肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> x 等于D-Trp
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> x 等于D-Trp
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> x 等于D-Thr
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> x 等于D-Phe
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> x 等于D-Phe
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)

<223> x 等于D-Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> x 等于D-Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> x 等于D-Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9) .. (9)

<223> x 等于D-Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> x 等于D-Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11) .. (11)

<223> x 等于D-Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12) .. (12)

<223> x 等于D-Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13) .. (13)

<223> x 等于D-Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14) .. (14)

<223> x 等于D-Lys

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

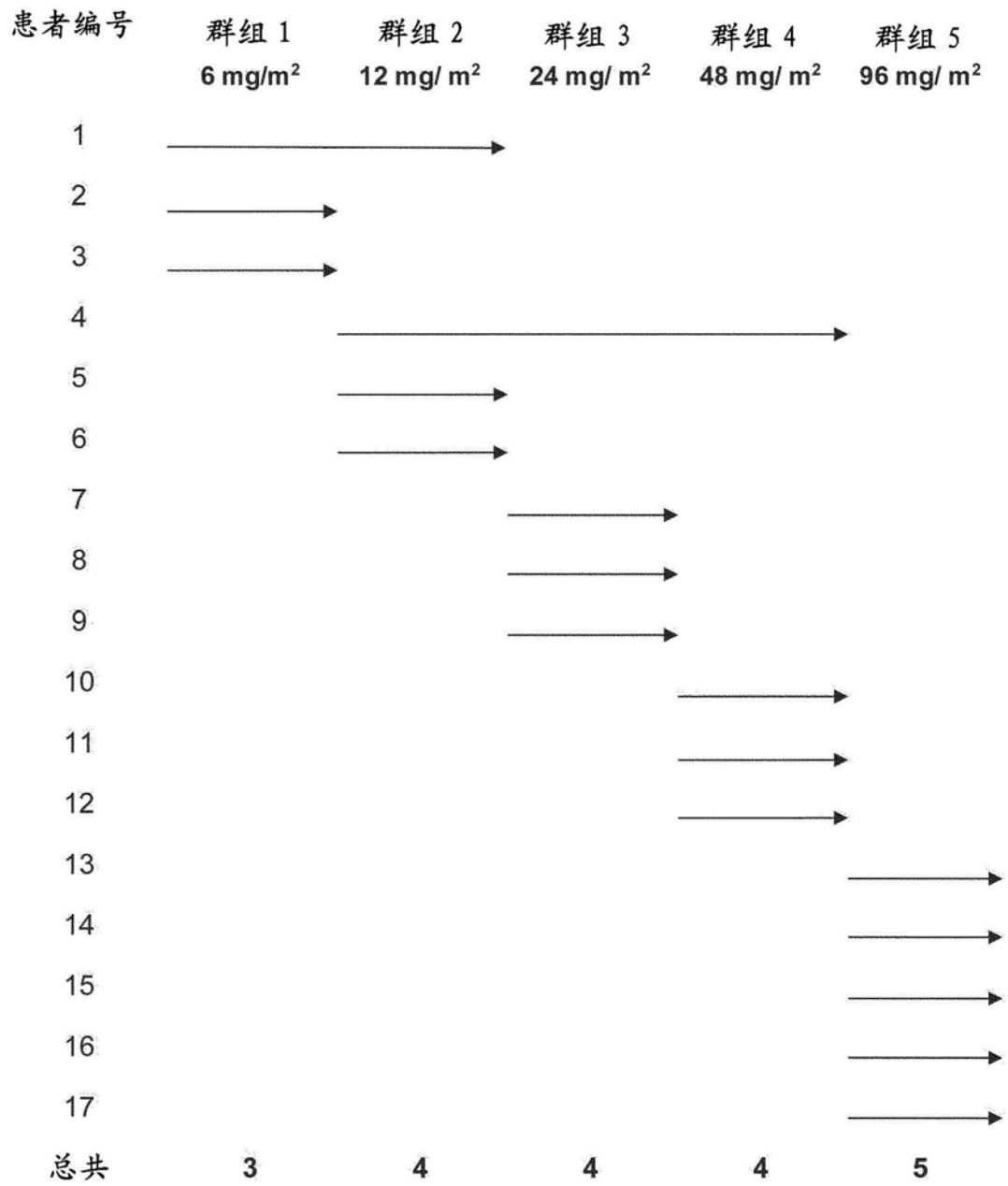


图1

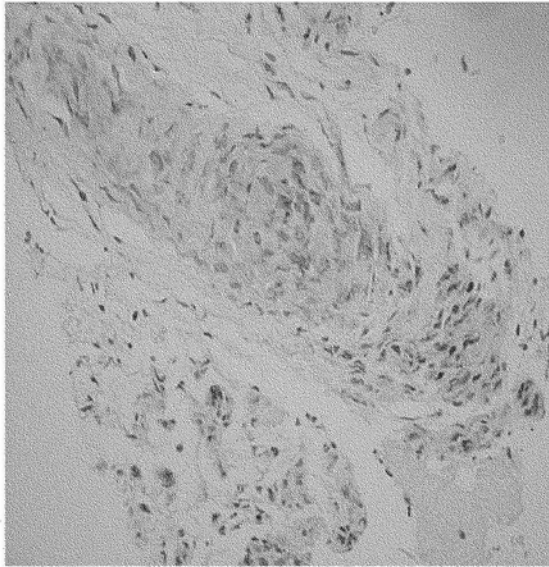


图2A

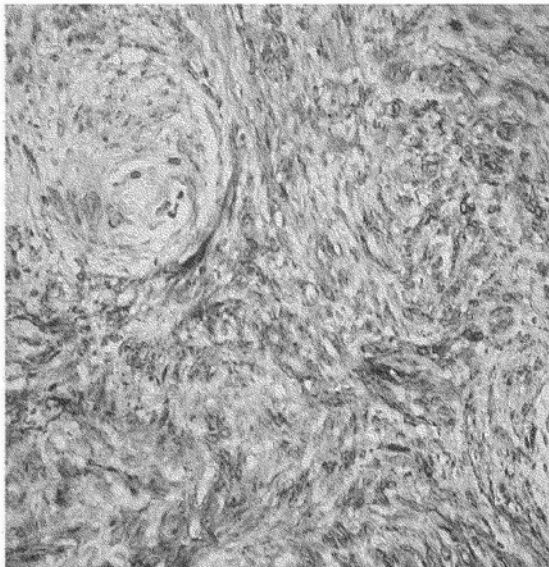


图2B

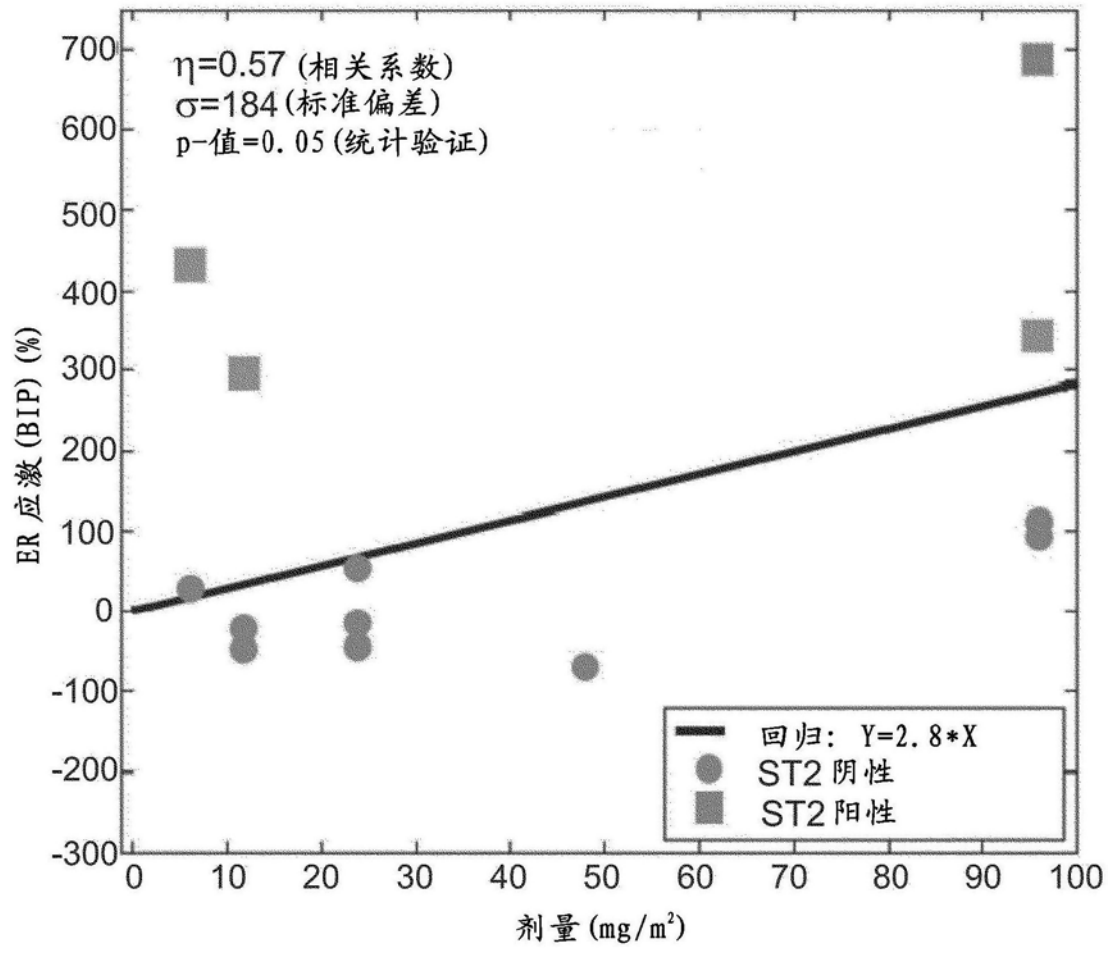


图3

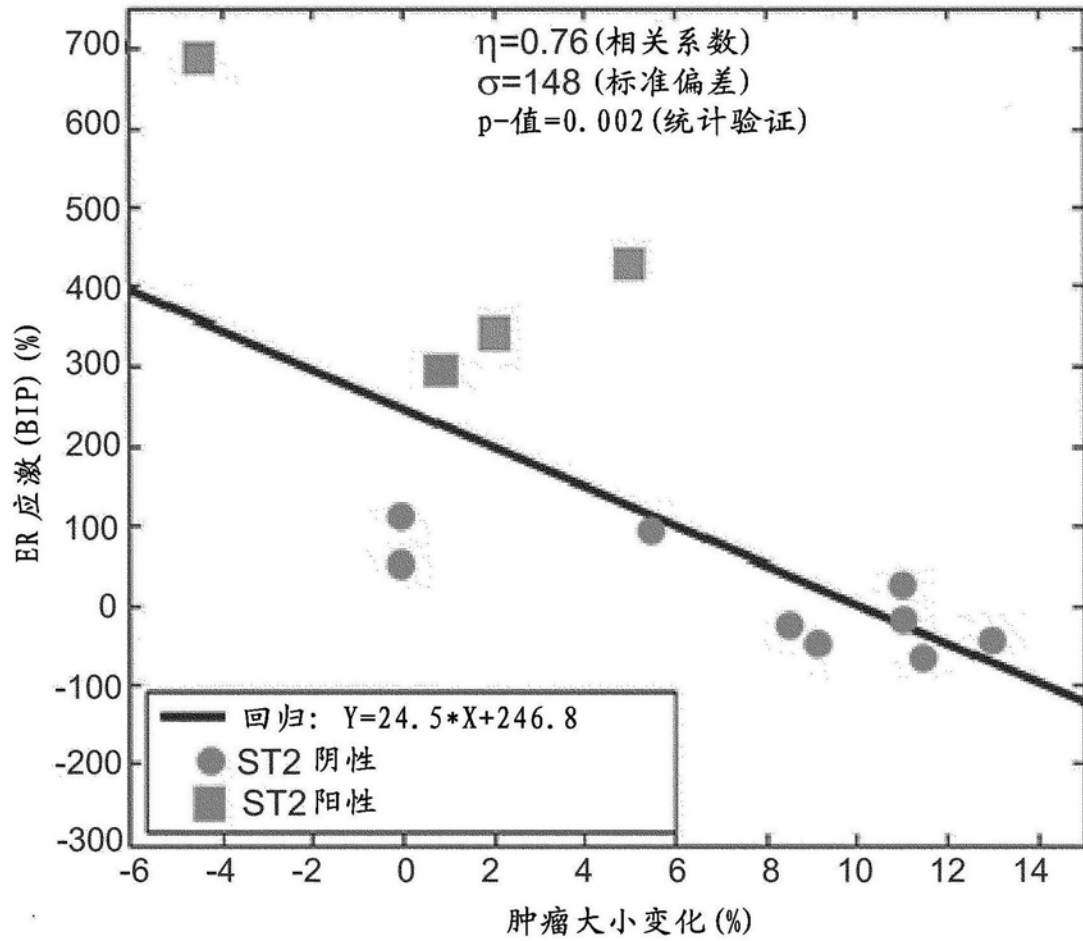


图4

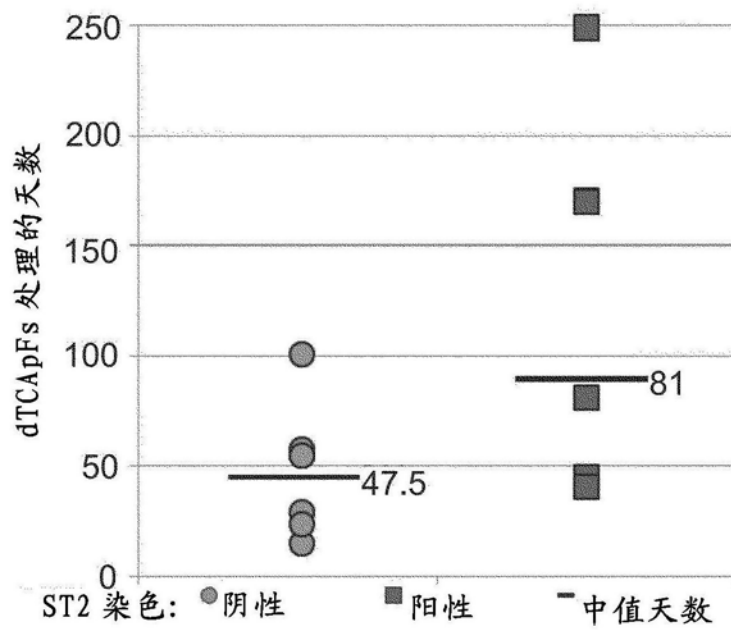


图5

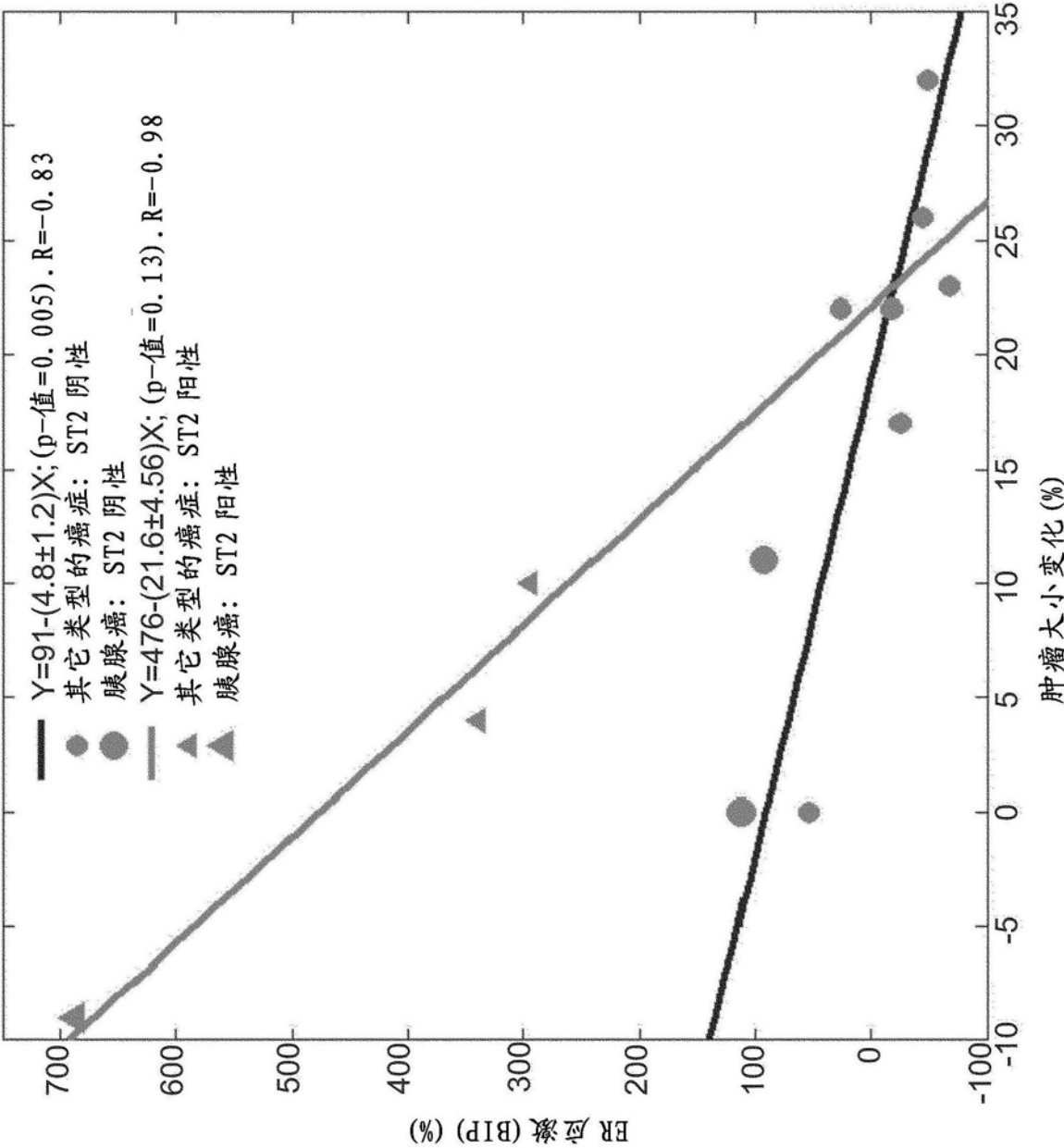


图6

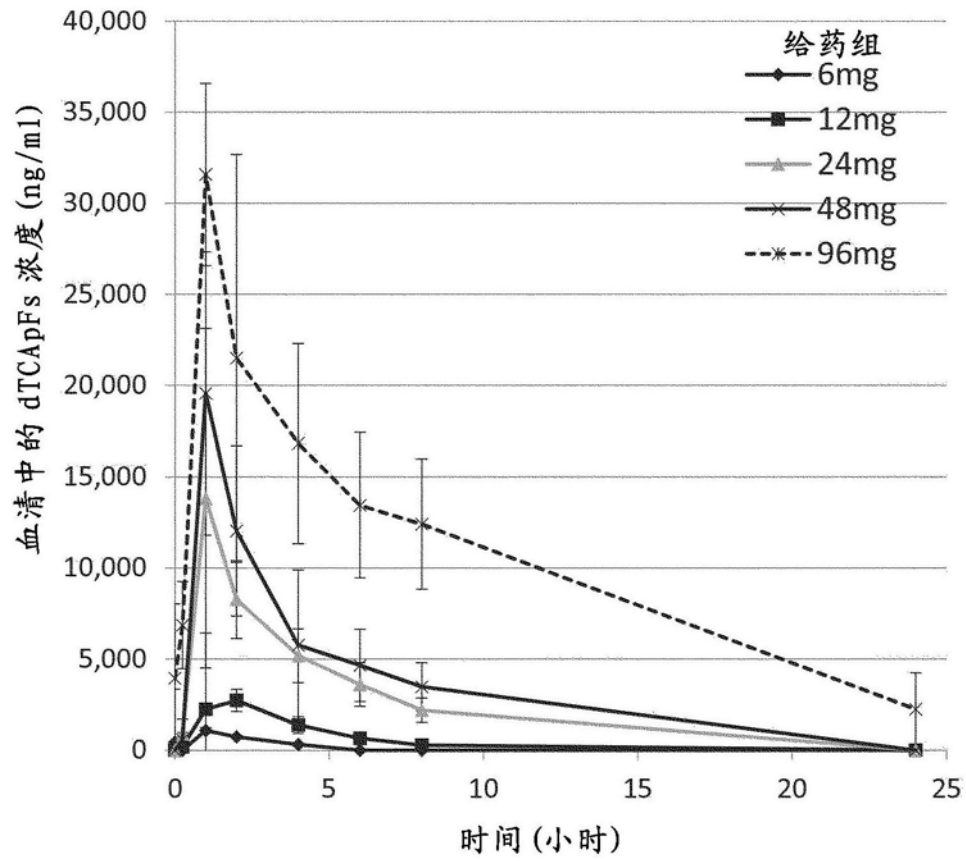


图7

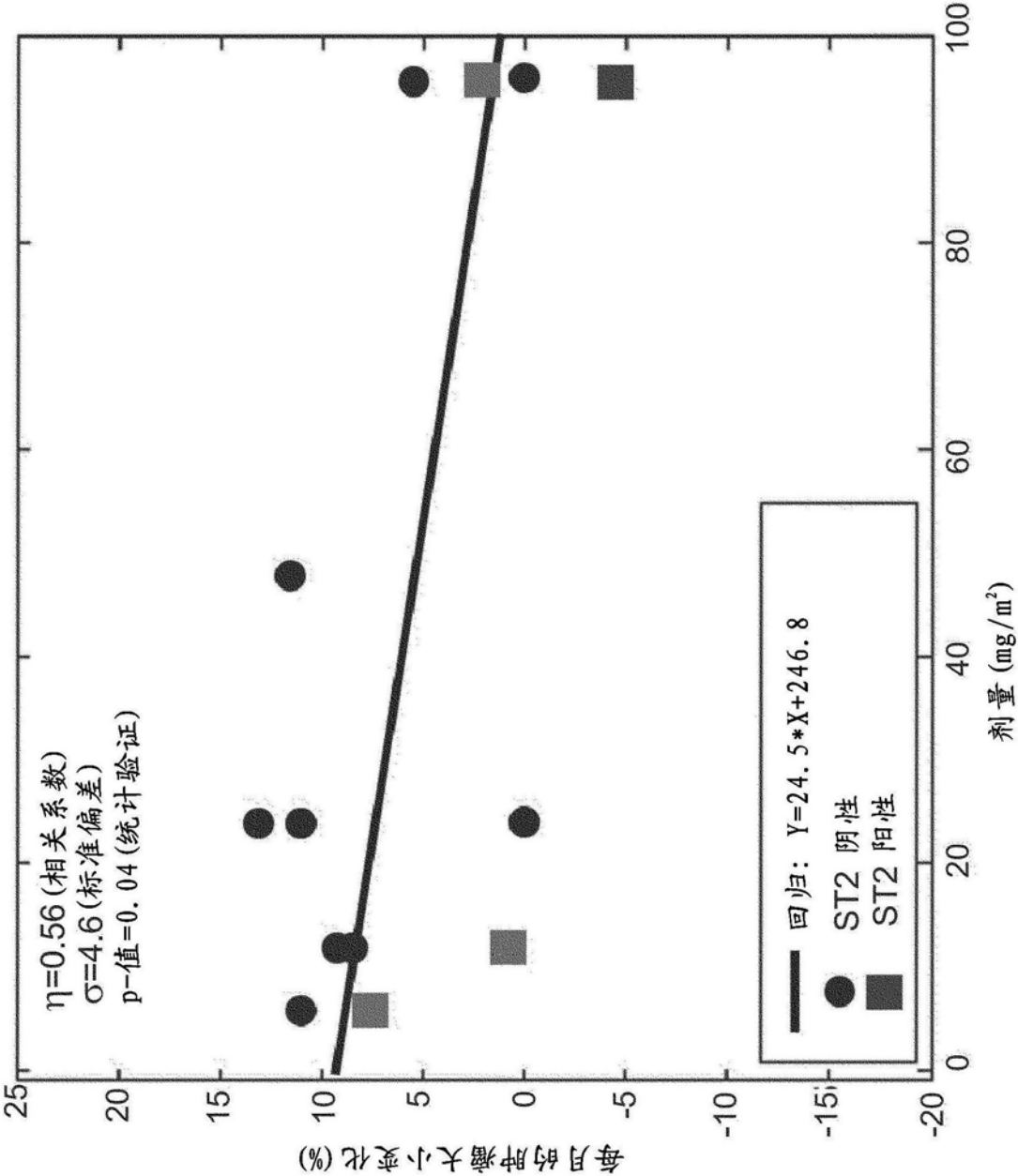
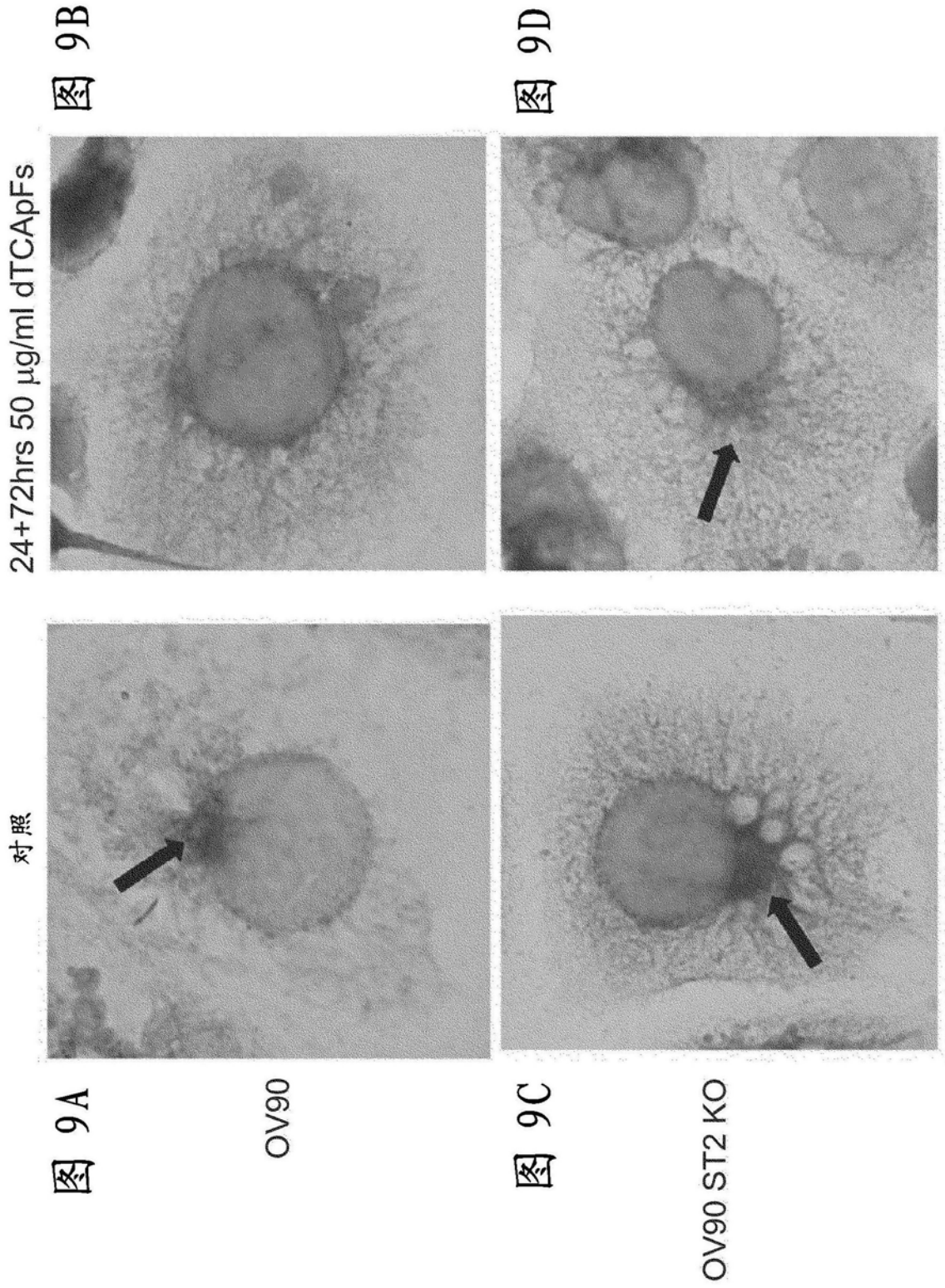
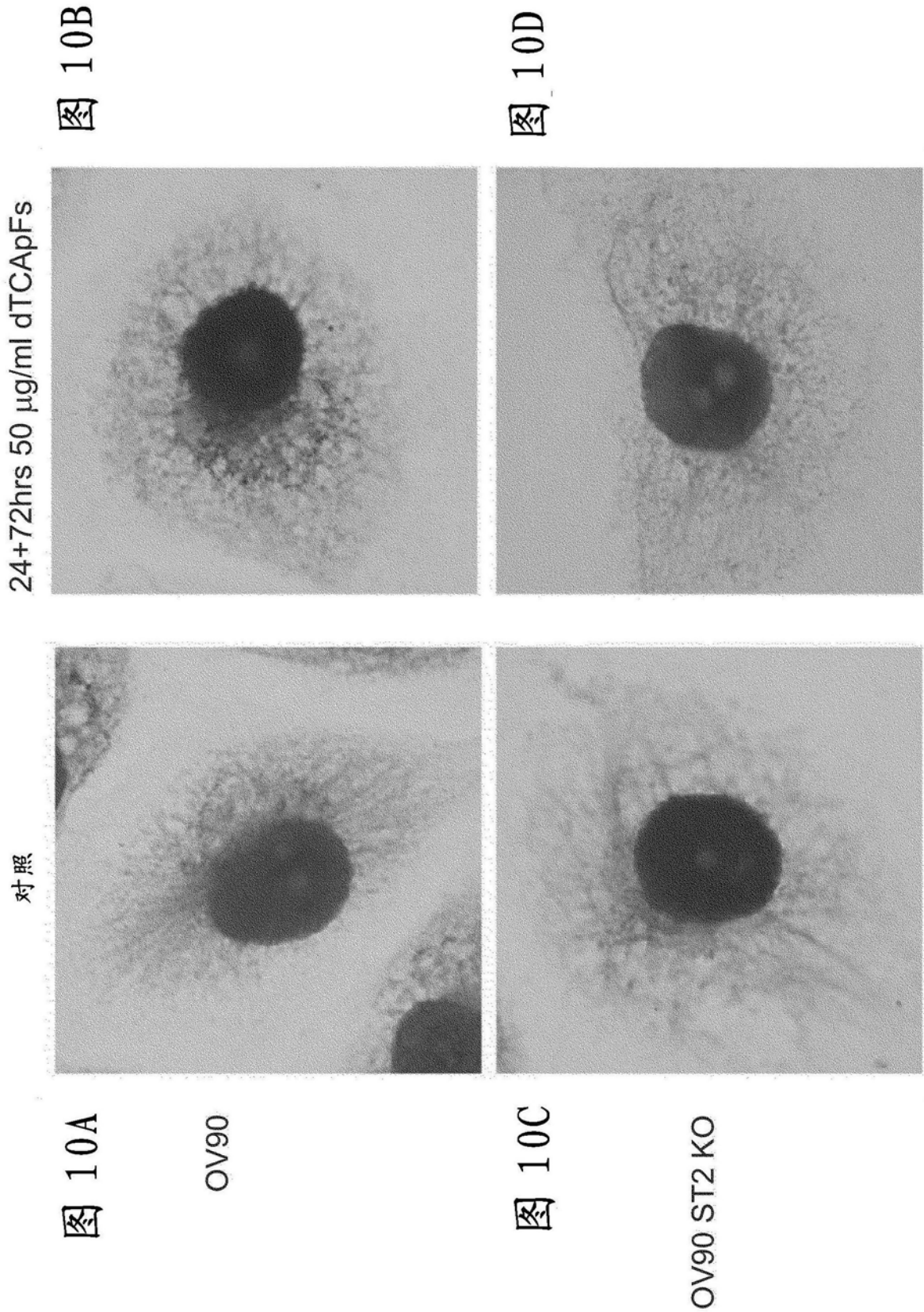


图8





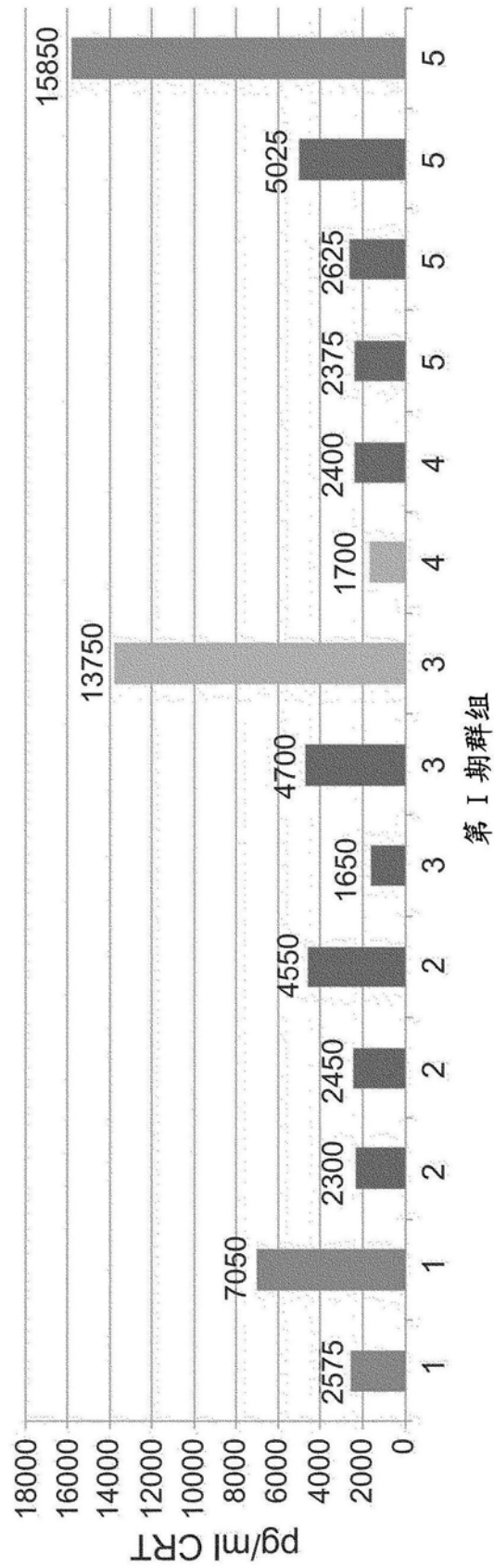


图11A

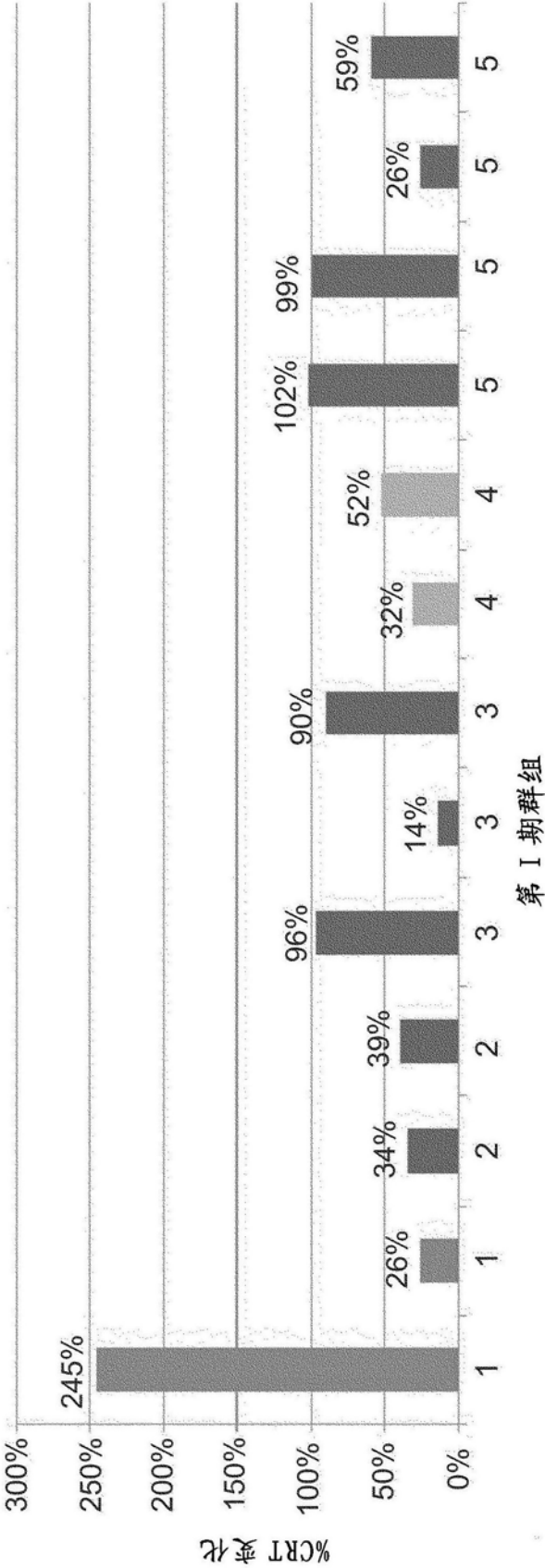


图11B

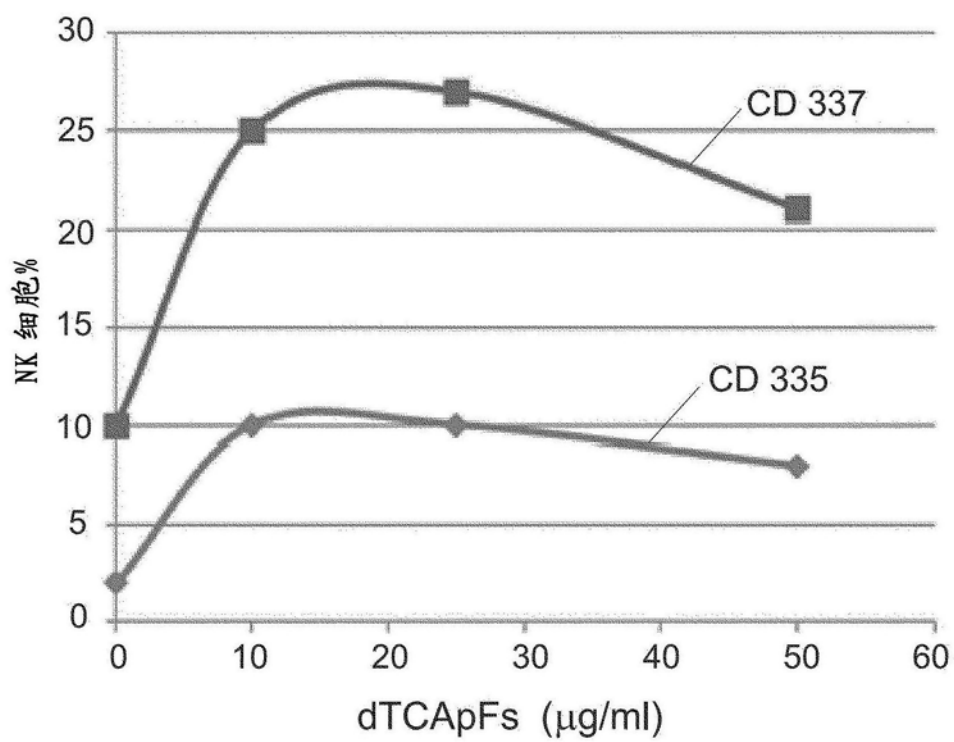


图12

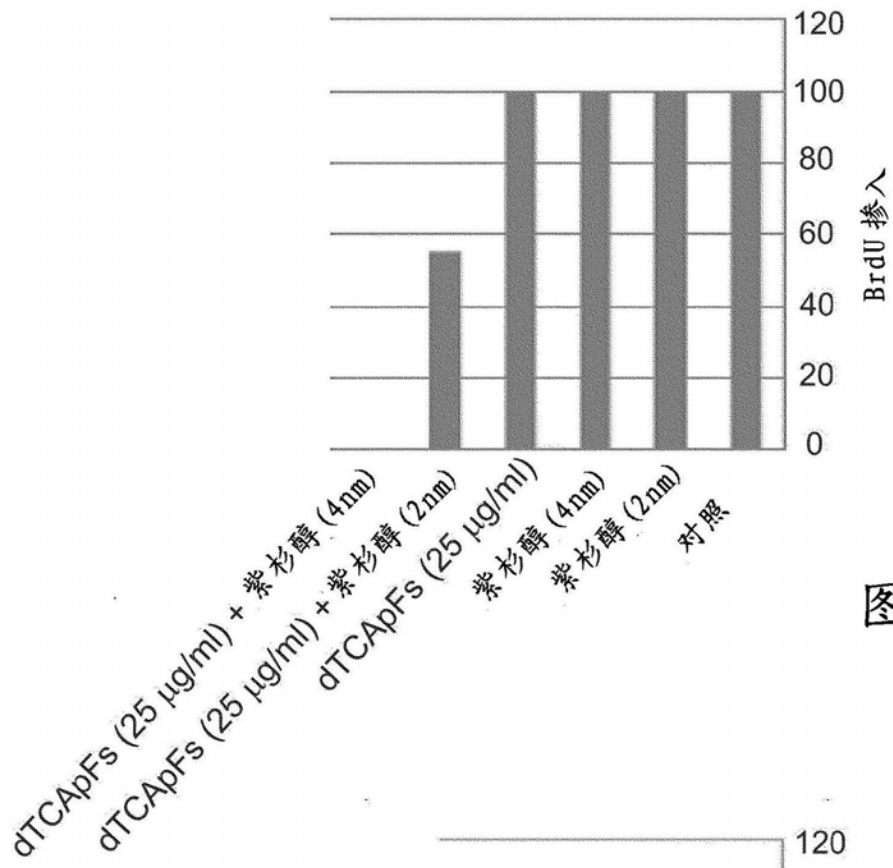


图 13A

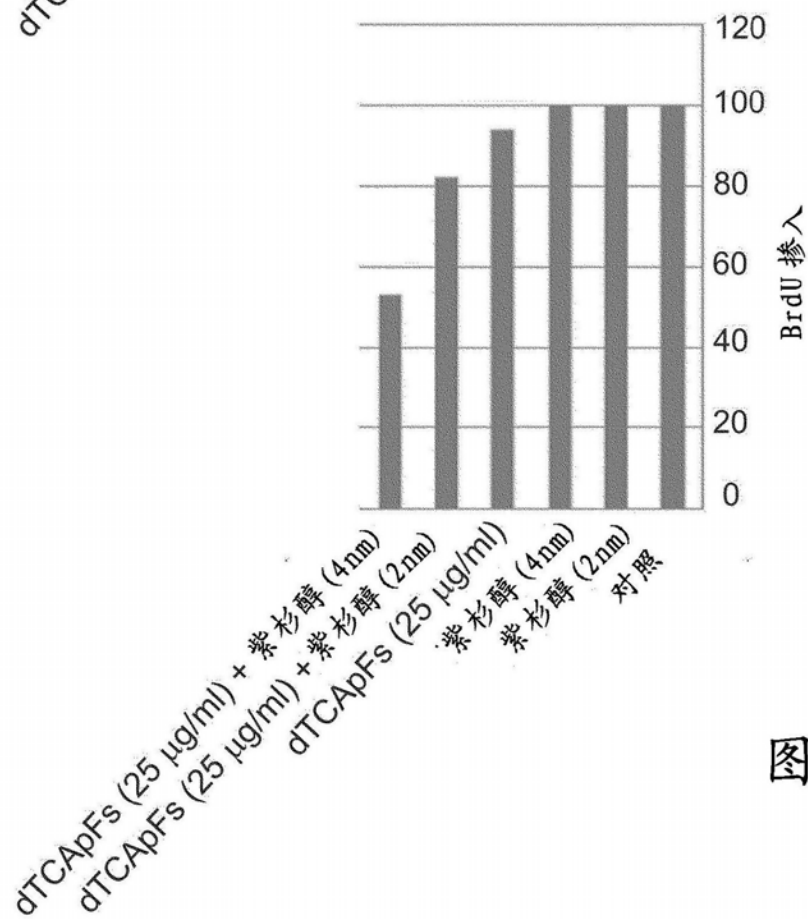


图 13B

专利名称(译)	在癌症疗法作为预测工具的内质网应激和用于癌症治疗的联合疗法		
公开(公告)号	CN109069585A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201780019808.6	申请日	2017-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	免疫系统密钥有限公司		
申请(专利权)人(译)	免疫系统密钥有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	免疫系统密钥有限公司		
[标]发明人	Y 德瓦雷 U 桑德勒		
发明人	Y·德瓦雷 U·桑德勒		
IPC分类号	A61K38/17 A61K31/337 G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/6886 A61K45/06		
CPC分类号	A61K31/337 A61K31/704 A61K38/10 A61K38/1709 A61K45/06 A61P35/00 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N33/574 G01N2800/52 A61K2300/00 G01N33/57484 G01N33/6893 A61K39/39558 G01N33/57496		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	62/291190 2016-02-04 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于评估治疗对癌症患者的影响的方法、药剂和试剂盒。另外，本发明涉及用于在被治疗的癌症患者中降低抗癌剂的施用标准护理剂量的联合治疗。

	dTCApF 剂量				
	6 mg/m ² <i>n</i> = 3	12 mg/m ² <i>n</i> = 3	24 mg/m ² <i>n</i> = 3	48 mg/m ² <i>n</i> = 3	96 mg/m ² <i>n</i> = 3
年龄, 岁数					
中位数(范围)	63	61	65	72	64
平均值(SE)	(62-77)	(58-62)	(57-67)	(51-94)	(55-77)
	68 (5)	67 (4)	67 (2)	72 (8)	64 (9)
性别, 男性/女性, <i>n/n</i>	3/0	2/1	1/2	2/1	3/2
肿瘤, 类型, <i>n</i>					
结直肠	3	2	0	2	1
胰腺	0	0	1	0	4
其它 *	0	1	2	1	0
先前疗法, <i>n</i>					
化学疗法	3	4	4	1	3
放射疗法	1	2	1	1	0
手术	2	2	1	1	2
利用生物药剂的治疗	0	0	1	0	0
利用小分子(诸如酪氨酸激酶抑制剂)的治疗	0	0	0	1	0