

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-512669

(P2019-512669A)

(43) 公表日 令和1年5月16日 (2019.5.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A D 4 C O 8 4
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10	4 C O 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-540823 (P2018-540823)	(71) 出願人	507137416
(86) (22) 出願日	平成29年2月2日 (2017.2.2)		イミューン システム キー リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年9月25日 (2018.9.25)		イスラエル国 97460 エルサレム、
(86) 国際出願番号	PCT/IL2017/050129		ローゼンブラット 318/7 ストリート
(87) 国際公開番号	W02017/134668	(74) 代理人	100114775
(87) 国際公開日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		弁理士 高岡 亮一
(31) 優先権主張番号	62/291,190	(74) 代理人	100121511
(32) 優先日	平成28年2月4日 (2016.2.4)		弁理士 小田 直
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 癌治療における予測的ツールとしての小胞体ストレスおよび癌の治療用の併用療法

(57) 【要約】

本発明は、癌患者に対する治療の効果を評価する際に使用するための方法、剤およびキットを提供する。加えて、本発明は、治療される癌患者における抗癌剤の治療用量の投与される基準を低下させるための併用療法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測するための方法であって、

(a) 前記患者の少なくとも 1 つの生体試料中の少なくとも 1 つの小胞体 (ER) ストレスマーカの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、前記生体試料の少なくとも 1 つが前記治療の開始後に得られるステップと、

(b) ステップ (a) で得られた前記少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの前記発現値が前記少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップと

を含み、

所定の標準における前記少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの発現値より高い (a) で得られた前記少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの発現値が、前記患者が前記治療に対する応答者であることを示す、方法。

【請求項 2】

前記所定の標準における前記少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの発現値より高い前記少なくとも 1 つの生体試料中の前記少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの発現値が、前記治療が継続されるべきであることを示唆する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの ER ストレスマーカが、結合免疫グロブリンタンパク質 (BiP)、真核生物開始因子 2 のリン酸化サブユニット α (p-eIF2 α)、リン酸化イノシトール要求性 1 (p-IRE)、リン酸化 PKR 様 ER キナーゼ (p-PERK)、または C/EBP 相同タンパク質 (CHOP) またはこれらの任意の組み合わせである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 ER ストレスマーカが、結合免疫グロブリンタンパク質 (BiP) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (a) における前記少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの前記発現レベルが、前記患者の少なくとも 2 つの時間的に離された生体試料において決定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 2 つの生体試料の 1 つが、前記治療の開始前に得られる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも 2 つの時間的に離された生体試料が、1 週間、2 週間、3 週間または 4 週間、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月または 4 ヶ月間離される、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法が、前記患者に配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む前記単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を投与することをさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む前記単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩が、約 5 mg/m² ~ 約 100 mg/m² の用量で投与される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む前記単離されたペプチド、または前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩が、1 週間に 1 回、2 回

10

20

30

40

50

または3回の頻度で投与される、請求項8または9に記載の方法。

【請求項11】

前記治療が、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記癌が、膀胱癌、卵巣癌、神経起源の紡錘形細胞新生物、紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、結腸腺癌、直腸癌、直腸腺癌、肺癌、非小細胞肺癌、脊髄新生物、乳癌、皮膚癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、頭頸部癌、胃腸癌、胃癌、小腸癌、肝癌、肝臓癌および女性生殖系悪性腫瘍からなる群から選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項13】

前記癌が、神経起源の紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、肺癌、直腸癌、膀胱癌および脊髄新生物からなる群から選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記患者における前記癌細胞が、ST2陽性細胞である、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記方法が、前記少なくとも1つのERストレスマーカに特異的な少なくとも1つの検出剤を前記少なくとも1つの生物学的試料またはそれから得られる任意の核酸またはタンパク質産物と接触させることを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項16】

前記少なくとも1つのERストレスマーカに特異的な前記少なくとも1つの検出剤が、抗体または検出可能な部分にコンジュゲートされた抗体であり、前記抗体が、前記ERストレスマーカを特異的に認識しかつ結合する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測する方法での使用のためのERストレスマーカに特異的な検出剤であって、前記方法が、

30

(a) 前記患者の少なくとも1つの生体試料中において前記検出剤を用いて前記ERストレスマーカの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、前記生体試料の少なくとも1つが治療の開始後に得られるステップと、

(b) ステップ(a)で得られた前記ERストレスマーカの前記発現値が前記ERストレスマーカの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップとを含む、

所定の標準における前記ERストレスマーカの発現値より高い(a)で得られた前記ERストレスマーカの発現値が、前記患者が前記治療の応答者であることを示す、検出剤。

【請求項18】

前記所定の標準における前記ERストレスマーカの発現値より高い前記少なくとも1つの生体試料中の前記ERストレスマーカの発現値が、前記治療が継続されるべきであることを示唆する、請求項17に記載の使用のための検出剤。

40

【請求項19】

前記少なくとも1つのERストレスマーカが、結合免疫グロブリンタンパク質(BiP)、真核生物開始因子2のリン酸化サブユニットα(p-eIF2α)、リン酸化イノシトール要求性1(p-IRE)、リン酸化PKR様ERキナーゼ(p-PERK)またはC/EBP相同タンパク質(CHOP)またはこれらの任意の組み合わせである、請求項17または18に記載の使用のための検出剤。

【請求項20】

50

前記 E R ストレスマーカが、結合免疫グロブリンタンパク質 (B i P) である、請求項 17～19 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 21】

ステップ (a) における前記 E R ストレスマーカの前記発現レベルが、前記患者の少なくとも 2 つの時間的に離された生体試料において決定される、請求項 17～20 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 22】

前記少なくとも 2 つの生体試料の 1 つが、前記治療の開始前に得られる、請求項 17～21 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 23】

前記少なくとも 2 つの時間的に離された生体試料が、1 週間、2 週間、3 週間または 4 週間、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月または 4 ヶ月間離される、請求項 17～22 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 24】

前記治療が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩を用いる、請求項 17～23 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 25】

前記癌が、膀胱癌、卵巣癌、神経起源の紡錘形細胞新生物、紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、結腸腺癌、直腸癌、直腸腺癌、肺癌、非小細胞肺癌、脊髄新生物、乳癌、皮膚癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、頭頸部癌、胃腸癌、胃癌、小腸癌、肝癌、肝臓癌および女性生殖系悪性腫瘍からなる群から選択される、請求項 17～24 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 26】

前記癌が、神経起源の紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、肺癌、直腸癌、膀胱癌および脊髄新生物からなる群から選択される、請求項 17～25 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 27】

前記患者における前記癌細胞が、S T 2 陽性細胞である、請求項 17～26 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 28】

E R ストレスマーカに特異的な前記検出剤が、抗体または検出可能な部分にコンジュゲートされた抗体であり、前記抗体が、前記 E R ストレスマーカを特異的に認識しかつ結合する、請求項 17～27 のいずれか一項に記載の使用のための検出剤。

【請求項 29】

(a) 生体試料中の少なくとも 1 つの E R ストレスマーカの発現値を決定することに特異的な少なくとも 1 つの検出剤、および任意で

(b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩の治療の開始前およびこれらの投与時に癌患者について決定される前記少なくとも 1 つの E R ストレスマーカの所定の標準発現値、

(c) 少なくとも 1 つの対照試料、
の少なくとも 1 つを含むキット。

【請求項 30】

生体試料中の少なくとも 1 つの E R ストレスマーカの発現のレベルを決定するための少なくとも 1 つの試薬をさらに含む、請求項 29 に記載のキット。

【請求項 31】

(d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチド、または前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩
をさらに含む、請求項 29 または 30 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

使用のための説明書をさらに含む、請求項 2 9～3 1 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 3】

前記少なくとも 1 つの E R ストレスマーカが、B i P である、請求項 2 9～3 2 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 4】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の前記応答を予測することにおける使用のための、請求項 2 9～3 3 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 3 5】

癌を治療する方法での使用のための抗癌剤と配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩とを含む併用療法であって、前記抗癌剤が、前記抗癌剤の治療用量の基準より低い用量で投与される、併用療法。

【請求項 3 6】

前記抗癌剤の投与される量が、抗癌剤の治療用量の基準より少なくとも約 1 %～5 0 %、約 5 %～4 5 %、約 1 0 %～4 0 %、約 1 5 %～3 5 %または約 2 0 %～3 0 %低い、請求項 3 8 に記載の使用のための併用療法。

【請求項 3 7】

前記抗癌剤が、化学療法剤、チロシンキナーゼ阻害剤、免疫療法剤、ホルモン剤、生物学的剤、分化因子、抗血管新生因子、抗オートファジ剤または免疫刺激剤である、請求項 3 8 または 3 9 に記載の使用のための併用療法。

20

【請求項 3 8】

前記抗癌剤が、タキソールである、請求項 3 8～4 0 のいずれか一項に記載の使用のための併用療法。

【請求項 3 9】

前記単離されたペプチドおよび前記抗癌剤が、同時にまたは連続して投与される、請求項 3 8～4 1 のいずれか一項に記載の使用のための併用療法。

【請求項 4 0】

前記癌が、膀胱癌、卵巣癌、神経起源の紡錘形細胞新生物、紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、結腸腺癌、直腸癌、直腸腺癌、肺癌、非小細胞肺癌、脊髄新生物、乳癌、皮膚癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、頭頸部癌、胃腸癌、胃癌、小腸癌、肝癌、肝臓癌または女性生殖系悪性腫瘍である、請求項 3 8～4 2 のいずれか一項に記載の使用のための併用療法。

30

【請求項 4 1】

前記癌が、卵巣癌または膀胱癌である、請求項 3 8～4 2 のいずれか一項に記載の使用のための併用療法。

【請求項 4 2】

前記癌が、S T 2 陽性癌細胞を含む、請求項 3 8～4 2 のいずれか一項に記載の使用のための併用療法。

40

【請求項 4 3】

前記単離されたペプチドが、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩からなる、請求項 3 8～4 5 のいずれか一項に記載の使用のための併用療法。

【請求項 4 4】

単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩が、約 5 m g / m²～約 1 0 0 m g / m²の用量で投与される、請求項 3 8～4 6 のいずれか一項に記載の使用のための併用療法。

【請求項 4 5】

前記単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩が、1 週間に 1 回、2 回また

50

は3回の頻度で投与される、請求項38～47のいずれか一項に記載の使用のための併用療法。

【請求項46】

(a) 抗癌剤、および

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を含む、治療用キット。

【請求項47】

使用のための説明書をさらに含む、請求項46に記載の治療用キット。

【請求項48】

前記抗癌剤が、前記抗癌剤の治療用量の基準よりも低い用量で投与される、癌を治療する方法での使用のための請求項46または47に記載の治療用キット。

【請求項49】

それを必要とする患者における癌の治療の方法であって、前記抗癌剤と組み合わせて治療有効量の配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは前記単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を前記患者に投与することを含み、前記単離されたペプチドが、前記抗癌剤の投与される治療用量の基準を下げる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

開示は、個人化された医薬品に関する。より具体的には、本開示は、癌治療の効果を予測するのに使用するための方法、キットおよび組成物を提供する。加えて、本開示は、治療される癌患者における抗癌剤の治療用量の基準を低下させるための併用療法に関する。

【背景技術】

【0002】

現在開示される主題の背景として関連すると考えられる参考文献を以下に列挙する：

[1] Mehtaら、2010年、Therapeutic Advances in Medical Oncology 2 (2) 125-148

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

[3] Zheng, Y. Z. ら、2014年、Breast Cancer Research and Treatment 145 : 349-358

[4] Sato, M. ら、2010年、Advances in Genetics 69 : 97-114

[5] Han, K. S. ら、2015年、Oncotarget 6 : 34818-30

[6] 国際公開出願第2008/042508号

[7] 米国特許第2009/0181472号

[8] 国際公開出願第02/082076号

[9] 国際公開出願第02/077176号

[10] 国際公開出願第2006/046239号

[11] 国際公開出願第2007/122622号

[12] 国際公開出願第2007/091240号

[13] 国際公開出願第2008/075349号

[14] Sandler, U. ら、2010年、Recent advances in clinical medicine, ISSN : 1790-5125

[15] Sandler, U. ら、2010年、J Experimental Therapeutics and Oncology 8 : 327-339.

[16] 国際公開出願第2015/083167号

[17] Eisenhauer, E. A ら、2009年、European Journ

10

20

30

40

50

a l o f C a n c e r 4 5 : 2 2 8 - 2 4 7

【0003】

本明細書中の上記の参考文献の認知は、これらがいずれかの点で、本明細書に開示された主題の特許性にいかなる意味でも関係していることを意味することを暗示するものではない。

【0004】

背景

技術的進歩により、腫瘍進行の分子基盤の理解が大幅に深まり、多数の腫瘍および治療応答バイオマーカーが現在までに確認されている(1)。

【0005】

これらのマーカーは一般に、標準治療後の癌再発の可能性などの、患者の全体的な結果を客観的に評価することを目的とする予後マーカー、および特定の臨床的介入による恩恵の可能性を評価することを目的とする予測マーカーの2つのタイプに分けることができる(1)。

【0006】

癌の発生および予後に関与する細胞マーカーの中には、小胞体(E R)に主に存在する、B i P (結合免疫グロブリンタンパク質)とも呼ばれるグルコース調節タンパク質G R P 7 8がある。H S P 7 0タンパク質ファミリーに属するG R P 7 8は、適切なタンパク質の折り畳みを促進し、中間体が凝集するのを防ぎ、誤った折り畳みタンパク質をプロテアソーム分解の標的とする。さらに、G R P 7 8はE Rストレスシグナル伝達調節因子として働く。G R P 7 8は、腫瘍増殖、生存、転移および広範な治療に対する耐性を促進し、したがってG R P 7 8の発現は、腫瘍の挙動および治療応答のバイオマーカーとして役立ち得る(2)。

【0007】

上記と一致して、癌細胞は、G R P 7 8の発現を誘導することによって、腫瘍環境における慢性ストレスに適応し(2)、それは強力な抗アポトーシス因子として機能し薬剤耐性を付与する(3)。実際に、癌患者の血清中のG R P 7 8自己抗体の存在が、一般に予後不良と関連することが示されている(4)。抗血管新生療法後のG R P 7 8 / B i Pアップレギュレーションは、複数の研究において実証されている。例えば、H a nらは、スニチニブ治療が、C a k i - 1異種移植において低酸素症を誘発し、それに続いて対照群と比較して治療群においてG R P 7 8 / B i Pの発現が増えたことを示した(5)。

【0008】

したがって、G R P 7 8は、とりわけ、癌を有する対象がホルモン療法に対する耐性を発現させる危険があるかどうかを決定するための、種々の条件のマーカーとして(6)、頭頸部癌の場合に腫瘍等級を評価するための予後マーカーとして(7)または様々な癌の腫瘍マーカーとして(8、9)提唱された。しかし、G R P 7 8が癌進行または癌治療の間に作用する機構は、依然として明確ではない。

【0009】

ヒト胸腺に特有のc D N Aによってコードされる「T 1 0 1」と称されるペプチドが、これまでに同定されている。このペプチドおよびその誘導体は、とりわけ、免疫系の刺激物質としてのT 1 0 1の役割を介して癌治療に関与していた(国際公開出願第2 0 0 6 / 0 4 6 2 3 9号、10)。国際公開出願第2 0 0 6 / 0 4 6 2 3 9号は、T 1 0 1が免疫系を刺激し腫瘍サイズを減少させることができ、このペプチドが癌細胞の増殖に影響を及ぼすことを示唆している。国際公開出願第2 0 0 6 / 0 4 6 2 3 9号はまた、例えば標準化学療法の過程で患者を保護することにおける、T 1 0 1の免疫に基づく役割を示唆する。

【0010】

国際公開出願第2 0 0 7 / 1 2 2 6 2 2号(11)では、T 1 0 1を用いる癌の治療も示唆された。これは、とりわけ、種々のタイプの腫瘍の発症に対するT 1 0 1の効果を実証している。ペプチドT 1 0 1はまた、免疫学的疾患の治療に関連して、国際公開出願第

10

20

30

40

50

2007/091240(12)に、およびT1/ST2受容体を有する細胞を伴う疾患の治療または予防に関連して、国際公開出願第2008/075349号(13)ならびにSandlerらによる刊行物(14および15)に記載されている。

【0011】

さらに、「Nerofe」と称されるT101のペプチド誘導体は、癌細胞による癌転移に関連することが公知であるタンパク質の分泌を減少させ、かつインビトロでの癌細胞の移動を直接阻害することが報告されている。加えて、このペプチドは、癌患者における血管内皮増殖因子(VEGF)の血清レベルに影響を及ぼすことが示されており(国際公開出願第2015/083167号、16)、癌転移を予防または治療する方法での使用が示唆された。

【発明の概要】

【0012】

その態様の1つにより、本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測するための方法を提供する。この方法は、

(a)患者の少なくとも1つの生体試料中の少なくとも1つの小胞体(ER)ストレスマーカの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、生体試料の少なくとも1つが治療開始後に得られる、ステップと、

(b)ステップ(a)で得られた少なくとも1つのERストレスマーカの発現値が少なくとも1つのERストレスマーカの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップと

を含み、

所定の標準における少なくとも1つのERストレスマーカの発現値より高い(a)で得られた少なくとも1つのERストレスマーカの発現値は患者が治療に対して応答者であることを示す。

【0013】

いくつかの実施形態では、所定の標準における少なくとも1つのERストレスマーカの発現値より高い少なくとも1つの生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現値は、治療を継続すべきであることを示唆する。

【0014】

他の実施形態では、少なくとも1つのERストレスマーカは、結合免疫グロブリンタンパク質(BiP)、真核生物開始因子2のリン酸化サブユニットα(p-eIF2α)、リン酸化イノシトール要求性1(p-IRE)、リン酸化PKR様ERキナーゼ(p-PERK)またはC/EBP相同タンパク質(CHOP)またはこれらの任意の組み合わせである。本開示の様々な実施形態は、結合免疫グロブリンタンパク質(BiP)であるERストレスマーカに関する。

【0015】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)における少なくとも1つのERストレスマーカの発現レベルは、患者の少なくとも2つの時間的に離された生体試料において決定される。他の特定の実施形態では、少なくとも2つの生体試料の1つは、治療の開始前に得られる。さらなる実施形態では、少なくとも2つの時間的に離された生体試料は、1週間、2週間、3週間、または4週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月または4ヶ月間離される。

【0016】

種々の実施形態では、本明細書で定義される方法は、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を患者に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩は、約5mg/m²~約100mg/m²の用量で投与される。いくつかの実施形態では、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容

10

20

30

40

50

される塩は、1週間に1回、2回または3回の頻度で投与される。

【0017】

さらなる実施形態では、本明細書で定義される治療は、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる。

【0018】

本開示の様々な実施形態では、本開示の癌は、膀胱癌、卵巣癌、神経起源の紡錘形細胞新生物、紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、結腸腺癌、直腸癌、直腸腺癌、肺癌、非小細胞肺癌、脊髄新生物、乳癌、皮膚癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、頭頸部癌、胃腸癌、胃癌、小腸癌、肝癌、肝臓癌および女性生殖系悪性腫瘍からなる群から選択される。他の特定の実施形態では、癌は、神経起源の紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、肺癌、直腸癌、膀胱癌および脊髄新生物からなる群から選択される。さらなる実施形態では、患者中の癌細胞はS T 2陽性細胞である。

10

【0019】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、少なくとも1つのERストレスマーカに特異的な少なくとも1つの検出剤を、少なくとも1つの生体試料またはそれから得られる任意の核酸またはタンパク質産物と接触させるステップを含む。様々な実施形態では、少なくとも1つのERストレスマーカに特異的な少なくとも1つの検出剤は、抗体または検出可能な部分にコンジュゲートされた抗体であり、抗体はERストレスマーカを特異的に認識し結合する。

20

【0020】

本開示は、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測する方法における使用のための、ERストレスマーカに特異的な検出剤をさらに提供する。この方法は、

(a) 患者の少なくとも1つの生体試料中において検出剤を用いてERストレスマーカの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、生体試料の少なくとも1つが治療開始後に得られる、ステップと、

(b) ステップ(a)で得られたERストレスマーカの発現値がERストレスマーカの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップと

30

を含み、
所定の標準におけるERストレスマーカの発現値より高い(a)で得られたERストレスマーカの発現値は患者が治療に対して応答者であることを示す。

【0021】

本開示は、

(a) 生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現値を決定することに特異的な少なくとも1つの検出剤、および任意で

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩の治療の開始前およびこれらの投与時に癌患者について決定される少なくとも1つのERストレスマーカの所定の標準発現値、

40

(c) 少なくとも1つの対照試料、
の少なくとも1つを含むキットをさらに提供する。

【0022】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのERストレスマーカの発現値を決定するためのキットは、生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現レベルを決定するための少なくとも1つの試薬をさらに含む。

【0023】

他の実施形態では、少なくとも1つのERストレスマーカの発現値を決定するためのキ

50

ットは、

(d) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチド、または単離されたペプチドの薬学的に許容される塩をさらに含む。

【0024】

さらなる実施形態では、少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの発現値を決定するためのキットは、使用説明書をさらに含む。

【0025】

種々の実施形態では、本明細書に定義されるキットは、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測することにおける使用のためのキットである。

【0026】

本開示は、癌を治療する方法における使用のための、抗癌剤と、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩とを含む併用療法をさらに提供し、抗癌剤は、抗癌剤の治療用量の基準より少ない用量で投与される。

【0027】

いくつかの実施形態では、使用のための併用療法は、抗癌剤の投与量が抗癌剤の治療用量の基準より少なくとも約 1 % ~ 50 %、約 5 % ~ 45 %、約 10 % ~ 40 %、約 15 % ~ 35 % または約 20 % ~ 30 % 少ない。

【0028】

他の実施形態では、使用のための併用療法は、抗癌剤が化学療法剤、チロシンキナーゼ阻害剤、免疫療法剤、ホルモン剤、生物学的剤、分化因子、抗血管新生因子、抗オートファジ剤または免疫刺激剤である。さらなる実施形態では、使用のための併用療法は、抗癌剤がタキソールである。

【0029】

さらなる実施形態では、使用のための併用療法は、単離されたペプチドおよび抗癌剤が同時に、または連続して投与される。

【0030】

使用のための併用療法の態様の様々な実施形態では、癌は、膵癌、卵巣癌、神経起源の紡錘形細胞新生物、紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、結腸腺癌、直腸癌、直腸腺癌、肺癌、非小細胞肺癌、脊髄新生物、乳癌、皮膚癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、頭頸部癌、胃腸癌、胃癌、小腸癌、肝癌、肝臓癌または女性生殖系悪性腫瘍である。使用のための併用療法の態様の特定の実施形態では、癌は、卵巣癌または膵癌である。使用のための併用療法の態様のさらなる実施形態では、癌は ST2 陽性癌細胞を含む。

【0031】

使用のための併用療法の態様のいくつかの実施形態では、単離されたペプチドは、配列番号 1 によって示されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩からなる。

【0032】

使用のための併用療法の態様の他の実施形態では、単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、約 5 mg/m^2 ~ 約 100 mg/m^2 の用量で投与される。使用のための併用療法の態様のさらなる実施形態では、単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、1 週間に 1 回、2 回または 3 回の頻度で投与される。

【0033】

その態様の別の 1 つでは、本開示は、

(a) 抗癌剤、および

(b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩、

を含む治療用キットを提供する。

【0034】

いくつかの実施形態では、治療用キットは、使用説明書をさらに含むキットである。

【0035】

他の実施形態では、治療用キットは、癌を治療する方法における使用のためのものであり、抗癌剤は、抗癌剤の治療用量の基準より少ない用量で投与される。

【0036】

さらに別の態様により、本開示は、それを必要とする患者における癌の治療の方法であって、治療的有効量の配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を抗癌剤と組み合わせて患者に投与することを含み、単離されたペプチドが抗癌剤の投与治療量の基準を下げる、方法を提供する。

【0037】

本明細書に開示された主題をより良く理解し、実際にどのように実施できるかを例示するために、以下の実施形態を添付の図面を参照して非制限的な例として説明する。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】患者の無作為化および割り当ての要約であり、患者数および特定の cohorts への割り当て、ならびに研究で使用される投薬量を示す。

【図2A-B】脊髄新生物に罹患している患者002~006から採取した生検の顕微鏡写真である。図2Aは、dTCAPFが投与される前に患者から得られた生検の結合免疫グロブリンタンパク質 (BiP) 染色を示し、図2BはdTCAPFでの11ヶ月の治療後に得られた生検のBiP染色を示す。染色に用いた抗体は抗BiP抗体 (Abcam) であった。

【図3】ERストレスマーカーBiPの血清レベルの変化とdTCAPFの用量との間の相関を示すグラフである。

【図4】ERストレスマーカーBiPの血清レベルの変化と腫瘍サイズの変化との間の相関を示すグラフである。

【図5】患者のT1/S T2発現による臨床試験への参加日数を示すグラフである。

【図6】S T2陰性およびS T2陽性集団について、ERストレスマーカーBiPの血清レベルの変化と腫瘍サイズの変化との間の相関を示すグラフである。

【図7】用量群による経時的なdTCAPFの血清濃度を示すグラフである。エラーバーはSDを表す。

【図8】腫瘍サイズの変化とdTCAPFの投与量との間の相関を示すグラフである。

【図9A-D】対照OV90細胞 (図9A)、示したようにdTCAPFペプチドで処理したOV90細胞 (図9B)、対照OV90 S T2ノックアウト (KO) 細胞 (図9C) および示したようにdTCAPFペプチドで処理したOV90 S T2ノックアウト (KO) 細胞 (図9D) の、 β -copを対象とした抗体を用いた免疫細胞化学的画像である。

【図10A-D】対照OV90細胞 (図10A)、示したようにdTCAPFペプチドで処理したOV90細胞 (図10B)、対照OV90 S T2ノックアウト (KO) 細胞 (図10C) および示したようにdTCAPFペプチドで治療したOV90 S T2ノックアウト (KO) 細胞 (図10D) の、GRP78 BiPを対象とした抗体を用いた免疫細胞化学的画像である。

【図11A-B】治療終了時のdTCAPF治療患者における血清CRTレベル (図11A) およびdTCAPF治療患者におけるCRTレベルの変化 (図11B) を示す棒グラフである。

【図12】dTCAPFの存在下でのナチュラルキラー細胞 (NK細胞) の活性化を示すグラフである。

【図13A-B】タキソール (2 nMまたは4 nM)、dTCAPF (25 μ g/ml) またはそれらの組み合わせ (dTCAPF 25 μ g/ml、タキソール2または4 nM)

10

20

30

40

50

の存在下における、ヒト卵巣癌細胞（図 1 3 A）およびヒト膵癌細胞（図 1 3 B）における BrdU 取り込みのレベルを示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本開示は、全Dアミノ酸配列 Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys を有する本明細書の dTCApF（または Nerofe）（配列番号 1 と示す）と呼ばれるペプチドによる治療が、ER ストレスマーカー結合免疫グロブリンタンパク質（BiP）の発現レベルの上昇から明らかのように、様々な癌において小胞体（ER）ストレスを増加させたという驚くべき発見に基づく。注目すべきことに、ER ストレスマーカー BiP の観察された増加は、治療期間の終わりでの腫瘍サイズの減少によって示されるように、dTCApF 治療患者における腫瘍増殖の阻害と相関することが見出された。

【0040】

したがって、とりわけ、本開示は、癌患者におけるペプチド dTCApF を用いる治療の効果を評価するためのバイオマーカーとして、ER ストレスマーカー、例えば BiP を使用できることを示す。

【0041】

従って、その態様の 1 つにおいて、本開示は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測するための方法を提供し、この方法は、

（a）患者の少なくとも 1 つの生体試料中の少なくとも 1 つの小胞体（ER）ストレスマーカーの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、生体試料の少なくとも 1 つが治療開始後に得られる、ステップと、

（b）ステップ（a）で得られた少なくとも 1 つの ER ストレスマーカーの発現値が少なくとも 1 つの ER ストレスマーカーの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップと

を含み、

所定の標準における少なくとも 1 つの ER ストレスマーカーの発現値より高い（a）で得られた少なくとも 1 つの ER ストレスマーカーの発現値は患者が治療に対して応答者であることを示す。

【0042】

換言すれば、本開示は、初期段階で（例えば、以下に例示されるような治療開始から約 1 ヶ月後、またはさらなる時点で）、癌患者が治療に応答するか否か（すなわち、治療が好適であるか）を決定するため、および（例えば、治療の開始または終了の後に、これらの結論に基づいてさらなる治療選択肢、例えば、このタイプの治療を進めることが推奨されるか否か、を決定するための方法を提供する。

【0043】

多数の治療プロトコールが多くの場合望ましくない副作用と関連し、さらには奏効しない可能性があるという事実を考慮すると、好適な治療プロトコールを調整することは、非常に価値があり、臨床的に望ましい。したがって、治療開始後の初期の段階で、および／または全治療期間もしくは治療期間後に治療プロトコールを最適化することは、不適切な治療を避け、不要な副作用および薬物負荷を低減し奏効する機会を向上し得る。

【0044】

癌患者の治療に対する応答に関して本明細書で使用される用語「予測」または「予測する」は、本明細書に定義した治療に対して、患者が好ましく応答する、すなわち有益な応答を有する、または好ましくない（すなわち、有益な応答を経験しない）応答をする可能性の決定または評価を指す。本明細書で定義される治療に対して全体的に好ましい応答を有する患者は、「応答者」と称され、治療に対して好ましくない応答をする患者は、「非応答者」と称される。

10

20

30

40

50

【0045】

本開示の文脈における用語「応答」は、治療の結果としての患者の全体的な結果を指し、それは本発明の当業者に公知の任意の臨床パラメータを用いて評価できる。したがって、本明細書で定義される治療の文脈における用語「応答者」は、同じ状態（例えば、本明細書で定義される癌疾患の、同じタイプ、病期、程度および／もしくは分類）と診断された未治療の対象と比較して、または治療開始前（もしくはその最初の日、最初の投与の前）の同じ対象の臨床パラメータと比較して、または少なくとも1つの臨床パラメータの改善が達成されなかった患者集団（本明細書では「非応答者」と定義される）の臨床パラメータと比較して、少なくとも1つの臨床パラメータにおいて全体的な改善を経験する患者を指す。

10

【0046】

治療に対する「非応答者」という用語は、臨床的パラメータの少なくとも1つにおいて改善を経験せずに同じ状態（例えば、病理の同じタイプ、病期、程度、および／または分類）と診断されるか、または本明細書に定義される治療前の同じ対象の臨床パラメータを経験する患者を指す。

【0047】

癌の文脈における「臨床パラメータの改善」の意味は、当技術分野で周知であり、これらに限定されないが、腫瘍サイズの縮小、少なくとも部分的な腫瘍増殖の阻害、腫瘍の数の減少、受容可能な疾患マーカー（すなわち、疾患の診断またはモニターに使用される当該分野で公知の任意のマーカー）の減少、腫瘍細胞転移の（少なくとも部分的な）阻害、抗腫瘍免疫応答の増強、腫瘍に関連する1つ以上の複数の症状の少なくとも部分的な軽減、治療後の生存期間の延長、治療後の所与の時点での死亡率の減少などを含む。したがって、いくつかの実施形態では、有益な応答は、RECISTガイドライン（17）に従って評価され得る腫瘍負荷の減少である。

20

【0048】

上に詳述したように、本開示は、患者の少なくとも1つの生体試料中の少なくとも1つの小胞体（ER）ストレスマーカーの発現レベルを最初に決定して発現値を得ることによって、本明細書で定義される治療に対する癌患者の応答を予測するための方法を提供し、ここで生体試料の少なくとも1つは、治療の開始後に得られる。次いでステップ（b）では、ステップ（a）で得られた少なくとも1つのERストレスマーカーの発現値が、少なくとも1つのERストレスマーカーの所定の標準発現値よりも高いか低いかが決定される。本発明の方法によれば、（a）で得られた少なくとも1つのERストレスマーカーの発現値が、所定の標準における少なくとも1つのERストレスマーカーの発現値より高い場合は、患者は治療に対する「応答者」として診断される。

30

【0049】

対照試料の対応する所定の標準発現値（またはカットオフ値）と比較して高いまたは低い、以下に定義される発現値は、患者が「応答者」または「非応答者」であるかどうかを予測することを理解されたい。

【0050】

したがって、本方法は、試験されるERストレスマーカーのいずれか1つの発現値が標準集団の発現値もしくはこうした集団のカットオフ値の範囲内であるか、または、標準集団発現値もしくはこうした集団のカットオフ値よりも高いかどうかを調べることを含む。発現値は、治療のある時点での特定のERストレスマーカーについて得られる発現値が、標準集団（すなわち、所定の標準発現値）について対応する治療時点で得られる発現値より約1%～99.9%のいずれか1つだけ高い、具体的には、約1%～約5%、約5%～10%、約10%～15%、約15%～20%、約20%～25%、約25%～30%、約30%～35%、約35%～40%、約40%～45%、約45%～50%、約50%～55%、約55%～60%、約60%～65%、約65%～70%、約75%～80%、約80%～85%、約85%～90%、約90%～95%、約95%～99%、または約99%～99.9%、またはそれを超えて高い場合、対応する所定の標準発現値よりも「高

40

50

い」と言われる。

【0051】

したがって、用語「低い」は、例えば、約1%～99.9%、具体的には約1%～約5%、約5%～10%、約10%～15%、約15%～20%、約20%～25%、約25%～30%、約30%～35%、約35%～40%、約40%～45%、約45%～50%、約50%～55%、約55%～60%、約60%～65%、約65%～70%、約75%～80%、約80%～85%、約90%～95%、約95%～99%、または約99%～99.9%のうちのいずれか1つ、所定の標準発現値より低い任意の発現値を指す。

【0052】

換言すれば、試験試料の特定の発現値は、所定のカットオフ値または標準値と比較される。本明細書中で使用される場合、用語「比較する」は、少なくとも2つの異なる試料間の類似性または相違を発見するために、本発明に従って試験される試料について得られる発現レベルおよび／または発現値の任意の調査を示す。本発明による比較は、コンピュータベースのアプローチを使用する可能性を包含することに留意されたい。

【0053】

本明細書で定義される用語「所定の標準発現値（複数可）」は、好ましくは本発明の方法により発現値が得られる時点（複数可）に対応する時点で、本明細書で定義される治療に対する応答者の集団におけるERストレスマーカの、以下に定義される発現値を得るために任意により標準化される、発現レベルを指す。これらに限定されないが、例えば、以下に記載される臨床試験に登録された患者について得られた発現レベルである。これらの患者は、例示的な所定の標準応答者集団、または治療前に得られた試料中の、および治療29日目に得られた試料中のERストレスマーカBiPの所定の標準発現値としての役割を果たす。

【0054】

ここで単に「カットオフ」と称されることもある所定の標準発現値は、高い診断感受性（真陽性率）および高い診断特異性（真陰性率）の両方の要件を満たす値であることに留意すべきである。用語「感受性」および「特異性」は、本明細書で定義された治療に対する応答性に関連する予め確立された集団に属するものとして試料を正しく分類するために、1つ以上のERストレスマーカの能力に関して本明細書で使用されることに留意すべきである。

【0055】

ある代替的实施形態では、対照試料（または対照生体試料）を使用できる（所定の標準発現値の代わりに、またはそれに加えて）。したがって、ERストレスマーカの発現値は対照試料中の発現値と比較される。対照試料は、健康な対象、同じ病理学的障害を患っており本明細書に定義される単離されたペプチドによって治療されない対象、治療前の治療される患者、治療に応答する対象および非応答の対象の少なくとも一人から得ることができる。

【0056】

上に示したように、本開示は、ペプチドdTCAPF（配列番号1によって示される）を用いる治療が、治療に対し陽性の患者の応答に相関して、種々の癌患者から得られた腫瘍において小胞体（ER）でのストレスを増加させたという驚くべき発見に基づく。ERは、新たに合成されるタンパク質の折り畳みおよび成熟において重要な役割を有する。ERストレスは、当技術分野で公知のように、ERにおける誤った折り畳みのおよび折り畳まれなかったタンパク質の蓄積によって現れるERホメオスタシスの崩壊を指す。ERストレスは、複雑なシグナル伝達ネットワーク、例えば、ERストレスを減少させホメオスタシスを回復させるように作用する、折り畳み不全タンパク質応答（Unfolded Protein response、UPR）と呼ばれるネットワークを活性化する。

【0057】

UPRは、3つのER膜貫通タンパク質：イノシトール要求性1（IRE1）、PKR様ERキナーゼ（PERK）、および活性化転写因子6（ATF6）によって開始される

。ストレスのない状態では、E Rシャペロンである免疫グロブリン結合タンパク質（B i P）がこれらのマスター調節因子の内腔ドメインに結合してそれらを不活性に保つ。E Rストレス時に、B i Pはこれらのセンサーから解離し、それらの活性化をもたらす。

【0058】

活性化されたU P Rは、下流のエフェクタを、適応応答、フィードバック制御、および細胞運命制御という3つの異なる機能で調節する。U P R適応応答は、とりわけ、折り畳みを増加させるための分子シャペロンおよびタンパク質プロセッシング酵素のアップレギュレーションを含む。フィードバック制御は、E Rホメオスタシスが再度確立されるようなU P R活性化の負の調節を含む。U P Rによる細胞運命の調節は、E Rストレス関連障害の病因において重要な役割を果たす。当技術分野で公知のように、細胞が、U P Rにより緩和できるE Rストレスに遭遇する場合には、細胞は生き残る。しかし、解明できないE Rストレス状態の間、U P RはE Rストレスを減少させホメオスタシスを回復することができず、細胞死を促進する。

【0059】

E Rストレスに関連する他の経路は小胞体関連タンパク質分解（E R A D）であり、これは、ユビキチン化ならびにその後のタンパク質分解複合体（すなわちプロテアソーム）による分解およびE Rストレス媒介アポトーシスのために小胞体の誤った折り畳みタンパク質を標的とする、細胞経路である。

【0060】

したがって、用語「小胞体ストレスマーカ」または「E Rストレスマーカ」は、小胞体ストレス応答に関連する任意の分子、例えば、これらに限定されないが、E Rストレスを低減しホメオスタシスを回復するように作用する、U P Rと呼ばれるシグナル伝達ネットワークに関連する任意の分子、小胞体関連タンパク質分解（E R A D）に関連する任意の分子、またはE Rストレス媒介性アポトーシスに関連する任意の分子を指す。

【0061】

いくつかの実施形態では、本明細書で定義されるE Rストレスマーカは、結合免疫グロブリンタンパク質（B i P）とも称されるグルコース調節タンパク質（G R P-78）、イノシトール要求性1（I R E 1）、P K R様E Rキナーゼ（P E R K）、真核生物開始因子2のサブユニットα（e I F 2 α）、I I型E R膜貫通型転写因子（A T F 6）またはC/E B P相同タンパク質（C H O P）である。

【0062】

上に詳述したように、結合免疫グロブリンタンパク質（B i P）E Rマーカの発現レベルの上昇が、ペプチドd T C A p Fを投与された患者において、これらの患者における腫瘍増殖の阻害と相関して検出された。

【0063】

したがって様々な実施形態では、方法、本開示による使用およびキットのためのE Rストレスマーカに特異的な検出剤は、E Rストレスマーカが結合免疫グロブリンタンパク質（B i P）であるものである。用語結合免疫グロブリンタンパク質（B i P）およびグルコース調節タンパク質G R P 7 8は、同義的に使用され、同じE Rストレスマーカを指す。

【0064】

78 k D aグルコース調節タンパク質（G R P-78）または熱ショック70 k D aタンパク質5（H S P A 5）としても知られている、用語「結合免疫グロブリンタンパク質」（B i P）は、ヒトにおいてH S P A 5遺伝子によってコードされ、かつ小胞体（E R）の内腔に位置する分子シャペロンとして作用するタンパク質を指す。B i Pは、新たに合成されたタンパク質を、それらがE R中に転座されるときに結合し、それらをその後の折り畳みおよびオリゴマー化に適した状態に維持する。B i Pは、転座機構の必須成分でもあり、プロテアソームによる分解に向けられる異常タンパク質のE R膜を通過する輸送において役割を果たす。B i Pは、全ての増殖条件下で豊富なタンパク質であるが、その合成は、E R中で折り畳まれていないポリペプチドの蓄積をもたらす条件下で顕著に誘導

10

20

30

40

50

される。本開示の特定の実施形態では、B i Pは、受託U n i P r o t K B番号P 1 1 0 2 1を有するヒトB i Pである。

【0065】

具体的には、その態様の別の1つでは、本開示は、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測するための方法を提供する。この方法は、

(a) 患者の少なくとも1つの生体試料中のB i Pの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、生体試料の少なくとも1つが治療開始後に得られる、ステップと、

(b) ステップ(a)で得られたB i Pの発現値がB i Pの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップと

を含み、

所定の標準におけるB i Pの発現値より高い(a)で得られたB i Pの発現値は患者が治療に対して応答者であることを示す。

【0066】

他の特定の実施形態では、本開示によるERストレスマーカは、イノシトール要求性1(I R E 1)である。I R E 1、タイプI ER膜貫通キナーゼは、そのN末端管腔ドメインによりERストレスを感知する。折り畳まれていないまたは誤って折り畳まれたタンパク質の存在を感知すると、I R E 1は二量体化し自己リン酸化して活性化する。

【0067】

他の特定の実施形態では、本開示によるERストレスマーカは、P K R様ERキナーゼ(P E R K)である。P E R KはI型ER膜貫通キナーゼでもあり、ERストレスによって活性化されると、オリゴマー化し、自己リン酸化し次いで真核生物開始因子2のサブユニットα(e I F 2 α)上のS e r 5 1を直接リン酸化する。

【0068】

したがって、さらなる特定の実施形態では、本開示によるERストレスマーカは、真核生物開始因子2のサブユニットα(e I F 2 α)である。

【0069】

さらに特定の実施形態では、本開示によるERストレスマーカは、I I型ER膜貫通転写因子(A T F 6)である。A T F 6は2つのアイソフォーム、A T F 6 αおよびA T F 6 βを有する。

【0070】

他の特定の実施形態では、本開示によるERストレスマーカは、C / E B P相同タンパク質(C H O P)などのERストレス媒介アポトーシスである。

【0071】

さらなる具体的な実施形態では、本明細書で定義されるERストレスマーカは、リン酸化タンパク質、例えばp-e I F 2 α、p-I R E 1またはp-P E R Kである。

【0072】

したがって、上記および他の実施形態では、本開示によるERストレスマーカは、結合免疫グロブリンタンパク質(B i P)、真核生物開始因子2のリン酸化サブユニットα(p-e I F 2 α)、リン酸化イノシトール要求性1(p-I R E)、リン酸化P K R様ERキナーゼ(p-P E R K)またはC / E B P相同タンパク質(C H O P)またはこれらの任意の組み合わせである。

【0073】

いくつかの実施形態では、本開示による使用またはキットのためのERストレスマーカに特異的な方法、検出剤は、その治療が継続されるべきであることを示す。言い換えると、本開示による使用またはキットのためのERストレスマーカに特異的な方法、検出剤のいくつかの実施形態では、所定の標準における少なくとも1つのERストレスマーカの発現値より高い少なくとも1つの生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現値は、その治療が継続されるべきであることを示唆する。

10

20

30

40

50

【0074】

いくつかの実施形態では、患者が癌退行、無増悪生存、無病生存、完全応答、または部分応答のうちの少なくとも1つを経験する場合、その患者は本開示による治療に対する応答者である。

【0075】

あるいは、患者の少なくとも1つの生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現値が、所定の標準における同じERストレスマーカの発現値よりも低い場合、治療は停止されるべきである。

【0076】

上記のように、本開示の方法は、生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現レベルを決定することに基づく。用語「発現レベル (level of expression)」または「発現レベル (expression level)」は、同義的に使用され、生体試料中のアミノ酸産物またはタンパク質をコードするポリペプチド (タンパク質) またはポリヌクレオチドの量 (数量) の数値表現を一般に指す。「発現」は一般に、細胞中で存在し作用する構造へと遺伝子コード化情報が変換されるプロセスを指し、それをコードするポリペプチド (タンパク質) またはポリヌクレオチドの量の測定を介して評価され得る。

【0077】

少なくとも1つのERストレスマーカの発現レベルの決定はまた、ポリペプチド (タンパク質) またはそのコードするポリヌクレオチドの断片の発現レベル、または任意の翻訳後修飾タンパク質 (例えば、リン酸化タンパク質) またはその断片の発現レベルに基づいて行われ得る。

【0078】

小胞体ストレスマーカ (例えば、BiP) またはポリペプチド断片もしくはその誘導体またはそれらをコードする任意の核酸の発現レベルを決定することは、調査される小胞体ストレスマーカに特異的な検出剤を用いて、当該分野で公知の任意の方法によって行うことができる。例えば、ERストレスマーカの発現レベルを決定することは、ELISA、イムノアッセイ、免疫蛍光、免疫組織化学、免疫沈降、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、PCR、免疫PCR、または表面プラズモン共鳴を用いて行うことができる。

【0079】

特に、ERストレスマーカBiPの発現レベルを決定することは、ELISAベースの方法を用いて、または標識抗体 (例えば、BiPに対する標識抗体) を使用して、以下に記載するように実施できる。ERストレスマーカ (例えば、BiP) の発現レベルを決定することは、BiPタンパク質をコードする核酸 (例えば、mRNA) の発現レベルを決定することに基づいてもよく、または生体試料中のBiPの任意のポリペプチド断片もしくは誘導体の発現レベルを決定することによってもよい。

【0080】

ある特定の具体的な実施形態では、本発明の方法による発現レベルを決定して発現値を得るステップは、追加および任意の正規化のステップをさらに含む。この実施形態によれば、本明細書に定義される少なくとも1つのERストレスマーカの発現レベルの決定に加えて、少なくとも1つの好適な対照参照遺伝子 (例えば、ハウスキーピング遺伝子) の発現レベルが同試料中で決定される。このような実施形態によれば、ステップ(a)で得られる本発明の少なくとも1つのストレスマーカの発現レベルが、試験試料中の追加の任意のステップで得られる少なくとも1つの参照対照遺伝子の発現レベルに従って正規化され、これにより正規化された発現値を得る。任意により、同様の正規化は、適用可能な場合に少なくとも1つの対照試料または代表的な標準 (すなわち、本明細書で定義される所定の標準) においても実施される。

【0081】

したがって、用語「発現値」は、実験的に得られる、または本明細書で詳述される少なくとも1つの正規化ステップによって、「発現のレベル (level of expression)

10

20

30

40

50

ssion)」または「発現レベル (expression level)」を正規化することによって得られる「発現のレベル」または「発現レベル」を入力値として使用する計算の結果を指し、本明細書で「発現値」と呼ばれる計算値が得られる。

【0082】

より具体的には、本明細書中で使用される場合、「正規化値」または「発現値」は、ERストレスマーカの未加工の発現値を、同じ試料からの対照参照遺伝子、例えば安定発現ハウスキーピング対照遺伝子の発現値で割った商である。ERストレスマーカの未加工の発現レベルを対照参照遺伝子の未加工の発現レベルでの除算は、技術的な失敗または不正確さが本質的になくマーカ遺伝子の正規化された発現値を構成する、商または尺度を与える。この正規化された発現値は次いで、正規化されたカットオフ値、すなわち正規化された発現値から計算されるカットオフ値と比較され得る。ある実施形態では、対照参照遺伝子は、マイクロアレイ分析において分析されるすべての試料において安定性を維持する遺伝子であり得る。

【0083】

特定の実施形態では、本明細書に定義される方法およびキットは、少なくとも1つのERストレスマーカに特異的な少なくとも1つの検出剤を少なくとも1つの生体試料とまたはそれから得られる任意の核酸またはタンパク質産物と接触させることを含む。

【0084】

以下に示すように、ERストレスマーカBiPの決定は、BiPに対する抗体の使用に基づいた。従って本開示による使用およびキットのためのERストレスマーカに特異的な方法、検出剤のいくつかの実施形態では、(少なくとも1つの)ERストレスマーカに特異的な検出剤は抗体または検出可能な部分にコンジュゲートされた抗体であり、この抗体はERストレスマーカを特異的に認識し結合する。

【0085】

本明細書において定義される「ERストレスマーカに特異的な検出剤」という用語は、試料中の関連ERストレスマーカの発現レベルを定量するために使用され得るERストレスマーカに特異的な任意の剤(例えば、これらに限定されないが、関連するERストレスマーカをコードするmRNAを検出するために特異的な核酸剤または関連するERストレスマーカもしくはその断片を結合し認識する特異的抗体)を意味する。

【0086】

さらに、本キットによりまたは本発明の方法のいずれかのステップにおいて使用されるERストレスマーカに特異的な検出剤または試薬のいずれかは天然に存在しない生成物または化合物であることが理解されなければならない。そのようなものとして、本発明の検出分子はいずれも、天然に存在する化合物または生成物を対象としない。

【0087】

いくつかの実施形態では、ERストレスマーカはBiPであり、用語「BiPに特異的な検出剤」は、試料中のBiP発現のレベルを定量するために使用され得るBiPに特異的な任意の剤(例えば、BiPをコードするmRNAの検出に特異的な核酸剤またはBiPもしくはその断片を結合し認識する特異的抗体)を意味する。

【0088】

用語「抗体」は、本明細書においてその最も広い意味で使用され、これらに限定されないが、一本鎖抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、合成抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、またはその活性断片もしくはこれらの相同体を含む。上記および他の実施形態では、本明細書に定義される抗体は、天然に存在しない抗体である。検出可能な部分にコンジュゲートされた抗体は、蛍光、化学発光などによって検出可能なタグ(本明細書では「標識抗体」とも呼ばれる)を有するように、検出可能な部分にコンジュゲートされる任意の抗体を指す。

【0089】

用語「接触させること」は、一緒にする、置く、インキュベートするまたは混合することを意味する。このように、2つの物が例えば、それらを互いに触れ合わせるまたはそれ

10

20

30

40

50

らを組み合わせることによって、一緒にされるまたは一緒に置かれるとき、第1の物は第2の物と接触される。本発明の文脈において、用語「接触させること」は、ERストレスマーカの検出分子の少なくとも1つ（および任意により1つの好適な対照参照遺伝子）と試験される試料（複数可）の核酸またはアミノ酸分子との間の相互作用を可能にするすべての手段またはステップを含む。

【0090】

このようにその態様の別の1つにより、本開示は、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測する方法において使用するためのERストレスマーカに特異的な検出剤を提供する。この方法は、

（a）患者の少なくとも1つの生体試料中で検出剤によりERストレスマーカの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、生体試料の少なくとも1つが治療開始後に得られる、ステップと、

（b）ステップ（a）で得られたERストレスマーカの発現値がERストレスマーカの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップとを含む、

所定の標準におけるERストレスマーカの発現値より高い（a）で得られたERストレスマーカの発現値は患者が治療に対して応答者であることを示す。

【0091】

本発明の方法は、治療中の様々な時点で、すなわち患者の「時間的に離された」生体試料において、本明細書で定義される治療に対する患者の応答を反復測定すること、それにより患者の継続的な応答をモニターすることにさらに関する。時間的に離された生体試料の各々の1つについて本明細書で定義される方法のステップ（a）で得られる少なくとも1つのERストレスマーカの発現値が、治療に沿った対応する時点（複数可）における対応する集団（応答者）について得られる所定の標準における同じ少なくとも1つのERストレスマーカの発現値よりも高い場合、治療は継続されてよい。

【0092】

例えば、ERストレスマーカレベル、例えばBiPレベルの差は、同一の患者から得られた2つの生体試料間のERストレスマーカの発現レベルを比較することによって計算できる。第1の生体試料は、治療前または治療の第1日目（初回投与前）に患者から得られた対照生体試料であるか、または第1の生体試料は、治療前と同じ状態および臨床状況を有する患者から得られた、関連ERストレスマーカの所定の標準発現レベルである。第2の生体試料は、治療の開始後に得られた患者の生体試料である。上記の手順を繰り返してもよい。

【0093】

例えば、以下に例示するように、第2の生体試料は、治療開始後約4週間（例えば29日目）に得られてよく、第1の生体試料（対照生体試料）は、治療前または治療第1日目の初回投与前に得られる。具体的には、ERストレスマーカがBiPである場合、BiP発現レベルの差は、以下のとおり測定される： $[(29 \text{ 日目での BiP レベル}) - (1 \text{ 日目での BiP レベル})] \times 100 / (1 \text{ 日目での BiP レベル})$

【0094】

したがって特定の実施形態では、本明細書に定義される方法のステップ（a）における少なくとも1つの生体試料は、治療の開始後約4週間で得られる。

【0095】

種々の実施形態では、本開示による使用またはキットのためのERストレスマーカに特異的な方法、検出剤は、ステップ（a）における少なくとも1つのERストレスマーカの発現レベルが、少なくとも2つの時間的に離された患者の生体試料において決定されるものである。

【0096】

本明細書において定義される生体試料の文脈における「時間的に離された」という用語

は、異なる時点で、例えばこれらに限定されないが、治療前および治療 29 日目に得られる生体試料を指す。

【0097】

他の実施形態では、本開示による使用またはキットのための ER ストレスマーカに特異的な方法、検出剤は、少なくとも 2 つの生体試料の 1 つが治療の開始前に得られるものであり、ここで「治療の開始 (initiation of treatment)」または「治療開始 (treatment initiation)」は、本明細書に定義される単離されたペプチドの最初の用量の投与を意味すると解釈されるべきである。用語「治療の開始前」は、単離されたペプチドの最初の投与前を意味する。いくつかの実施形態では、用語「治療の開始前」は、最初の投与が行われる前の治療の第 1 日目を指す。

10

【0098】

他の具体的な実施形態では、本開示による使用またはキットのための ER ストレスマーカに特異的な方法、検出剤は、少なくとも 2 つの時間的に離された生体試料が、1 週間、2 週間、3 週間または 4 週間、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月または 4 ヶ月離れている。さらなる実施形態では、本開示による使用またはキットのための ER ストレスマーカに特異的な方法、検出剤は、少なくとも 2 つの時間的に離された生体試料が 4 ヶ月を超えて離れているものである。

【0099】

用語「生体試料」は、本明細書においてその最も広い意味で使用され、哺乳動物対象から得られる試料を指す。生体試料は、哺乳類（ヒトを含む）から得られてよく、流体、固体および組織を包含する。いくつかの実施形態では、生体試料は、血液、血漿、血清、リンパ液、尿、組織試料、生検試料または細胞溶解物である。

20

【0100】

上に詳述したように、生体試料は、本明細書中で定義される治療の開始後、または治療の開始前に（開始に先立って）得られる。生体試料は、当業者に公知の任意の方法によって得られてよい。

【0101】

以下の実施例に記載するように、ヒトナチュラルキラー（NK）細胞に対する dTCAPF の効果も調べた。図 12 に示すように、受容体 CD335 および CD337 の発現の増加は、dTCAPF によって誘導された。ナチュラルキラー細胞は、ウイルス感染細胞に対する迅速な応答をもたらし、腫瘍形成に応答する。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、dTCAPF による受容体 CD335 および CD337 の活性化は、これらの細胞における ER ストレスの増加に関連する。したがって、いくつかの実施形態では、ER ストレスの測定が患者の細胞、例えば NK 細胞において行われる。

30

【0102】

さらに、生体試料に関して用語「少なくとも 1 つの」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 またはそれを超える生体試料を指す。変更すべきところは変更して、ER ストレスマーカの文脈における「少なくとも 1 つの」という用語は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 またはそれを超える ER ストレスマーカを指す。

【0103】

以下の実施例 1 に示す結果によれば、BiP のレベルの明らかな差は、11 ヶ月の治療後に同じ患者から得られた生検材料（図 2B）において観察された BiP のレベルと比較して、治療開始前の脊髄新生物患者から得られた生検材料（図 2A）で観察された。上記の結果は、dTCAPF ペプチドが、脊髄新生物癌患者から得られた腫瘍において ER ストレスを増加させたことを実証する。

40

【0104】

さらに、以下の実施例 2 に示される結果は、BiP のレベルの増加が、本明細書に特定された条件下でペプチド dTCAPF により治療された異なる癌型を有する患者における腫瘍増殖の完全な阻害と相関したことを実証する。

【0105】

50

本開示を記載するために本明細書中で使用される場合、「癌」または「腫瘍」は、同等に、組織または器官の過形成に関連する。組織がリンパ系または免疫系の一部である場合、悪性細胞は、循環細胞の非固形腫瘍を含み得る。他の組織または器官の悪性腫瘍は、固形腫瘍を生じ得る。一般に、本開示の方法および組成物は、非固形および固形腫瘍の治療で使用され得る。

【0106】

いくつかの実施形態では、本開示の癌は、膵癌、卵巣癌、神経起源の紡錘形細胞新生物、紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、結腸腺癌、直腸癌、直腸腺癌、肺癌、非小細胞肺癌、脊髄新生物、乳癌、皮膚癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、頭頸部癌、胃腸癌、胃癌、小腸癌、肝癌、肝臓癌および女性生殖系悪性腫瘍からなる群から選択される。

10

【0107】

本開示のさらなる実施形態では、癌は、神経起源の紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、肺癌、直腸癌、膵癌および脊髄新生物からなる群から選択される。

【0108】

下記の臨床研究では、患者の腫瘍細胞においてdTCApFの抗腫瘍活性とT1/S T2の発現状況との間に相関が見られた。直接的な相関がT1/S T2陽性、腫瘍サイズの変化およびERストレスの誘導の間で認められた。これらの所見は、S T2遺伝子ノックアウトOV-90細胞とdTCApFのインキュベーションがERストレスをもたらさないことを示す、以下の実施例4に記載される前臨床試験と一致する。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、これらの観察は、T1/S T2受容体が、dTCApFに陽性に応答する可能性が高いT1/S T2陽性患者を選択するためのバイオマーカーであり得ることを示唆する。

20

【0109】

従って、さらなる実施形態では、本開示の方法は、dTCApF治療下で患者から得られた生体試料（複数可）中の細胞のS T2受容体の状態を決定することをさらに含む。以下に詳述するように、可溶性T1/S T2受容体および末梢血単核細胞（PBMC）T1/S T2受容体発現のレベルでのベースラインからの変化もまた、dTCApFを用いる治療を受けている患者から得られる前治療および/または治療中の腫瘍組織試料においてモニターされる。

30

【0110】

いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、癌細胞でのS T2受容体の発現はdTCApFの細胞への進入を促進する。したがって、本明細書中で定義される使用またはキットのためのERストレスマーカに特異的な方法、検出剤のいくつかの実施形態では、患者の癌細胞は、S T2陽性細胞である。

【0111】

本明細書において定義される用語「S T2受容体」またはT1/S T2受容体（「T1/S T2」および「S T2/T1」とも呼ばれる）は、3つの細胞外免疫グロブリンドメインおよび細胞内TIRドメインを有するIL-1Rスーパーファミリーのメンバーを指す。T1/S T2は、心臓血管疾患に関与すると示されている。本明細書中で定義される用語「S T2陽性細胞」は、細胞上のS T2受容体の存在が、例えば以下に記載の方法に限定されるものではないが当該分野で公知の任意の方法によって同定される、細胞を指す。

40

【0112】

さらなる実施形態では、本開示による使用のためのERストレスマーカに特異的な方法または検出剤は、本方法が、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を患者に投与することをさらに含む。

【0113】

さらなる態様により、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を

50

含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測するための方法を提供する。この方法は、

(a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を患者に投与するステップと、

(b) 患者の少なくとも 1 つの生体試料中の少なくとも 1 つの小胞体 (ER) ストレスマーカの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、生体試料の少なくとも 1 つが治療開始後に得られる、ステップと、

(c) ステップ (b) で得られた少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの発現値が少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップと

を含み、

所定の標準における少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの発現値より高い (a) で得られた少なくとも 1 つの ER ストレスマーカの発現値は患者が治療に対して応答者であることを示す。

【0114】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩は、当業者に公知の任意の投与経路、例えば静脈内 (iv) で投与され得る。

【0115】

本明細書で定義される単離されたペプチドは、所望の治療結果を達成するのに必要な「有効量」で投与され得る。「有効量」は、治療目的、投与経路および患者の一般的状態 (年齢、性別、体重および主治医が知っている他の考慮事項) に関連する疾患の重篤度によって決定される。

【0116】

以下に詳述するように、進行中の臨床試験が、決定された癌型、用量、投与回数、治療期間、投与および他のパラメータに従って本発明者らにより行われる。以下に詳述するように、投薬レジメンは、6、12、24、48 または 96 mg/m² であった (例えば、図 1 に示すとおり)。

【0117】

さまざまな実施形態では、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩は、約 5 mg/m² ~ 約 100 mg/m²、90 mg/m²、80 mg/m²、70 mg/m²、60 mg/m² または約 10 mg/m² ~ 約 50 mg/m² の用量で投与される。

【0118】

特定の実施形態では、本明細書で定義される使用のための ER ストレスマーカに特異的な方法または検出剤は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩が約 5 mg/m² ~ 約 100 mg/m² の用量で投与される。

【0119】

さらに特定の実施形態では、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチド、または単離されたペプチドの薬学的に許容される塩は約 6、12、24、48 または 96 mg/m² d TCApF の用量で投与される。

【0120】

さらに特定の実施形態では、本明細書で定義される使用またはキットのための ER ストレスマーカに特異的な方法、検出剤は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩が 1 週間に 1 回、2 回または 3 回の頻度で投与される。

【0121】

なおさらなる特定の実施形態では、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩

10

20

30

40

50

は、3回／週の頻度で投与される。

【0122】

以下に例示するように、局所進行性または転移性固形腫瘍におけるdTCApFを用いる治療（6、12、24、48および96mg/m²にて、3回／週、連続28日間のサイクル）は、安全で十分に耐性があり、用量依存直線PKを有した。dTCApFは抗原因子を抑制し、抗癌サイトカインの産生を誘導し、かつERストレスを引き起こし、これがおそらく患者の一部で観察された臨床転帰をもたらした。陽性T1／ST2染色は、dTCApFに対する応答の予測マーカーとして働く可能性がある。

【0123】

したがって、本発明は、それを必要とする患者における癌の治療方法であって、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩の治療有効量を患者に投与することを含む方法をさらに提供する。いくつかの実施形態では、単離されたペプチドの治療有効量は、約6、12、24、48、または96mg/m²である。さらなる実施形態では、単離されたペプチドは、少なくとも約4週間の連続する期間の間、週に3回投与される。さらに特定の実施形態では、単離されたペプチドは、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなる本明細書でdTCApFと呼ばれるペプチドである。

【0124】

他の特定の実施形態では、単離されたペプチドの治療有効量は、約24、48、または96mg/m²またはそれを超える。さらに特定の実施形態では、治療有効量は、少なくとも約4週間の期間、約24mg/m²（またはそれより多い）であり、患者は、約48、96mg/m²以上の治療有効量で単離されたペプチドをさらに投与される。

【0125】

本明細書で使用される「治療（処理）する（treat）」、「治療（処理）している（treating）」、「治療（処理）（treatment）」という用語は、癌を有する患者における疾患活性の1つ以上の臨床的パラメータ、症状または徴候を改善する、緩和するまたは排除することを意味する。当技術分野で公知であり、上で詳述したような癌に関連する臨床パラメータは、例えば腫瘍サイズ、腫瘍増殖、腫瘍の数、疾患マーカー、腫瘍細胞転移などである。「患者」は、本明細書で定義される単離されたペプチド、または本発明のいずれかの医薬組成物の投与が望ましい任意の哺乳類を意味し、すなわち本明細書に定義される癌に罹患した患者、特にヒト患者を意味する。

【0126】

本明細書で定義される治療のモニターは、例えばRECISTガイドライン（17）に従って、治療に対する癌患者の応答をモニターするための当技術分野で公知の任意の手段によって実施できる。

【0127】

以下に詳述するように、本開示は、とりわけ、Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys（配列番号1）の全Dアミノ酸配列を有するペプチドdTCApFで行われる進行中の臨床試験と関連する結果に関する。

【0128】

本明細書中で定義される用語「単離されたペプチド」は、本明細書において「dTCApF」または「Nerofe」と称される配列番号1で示されるアミノ酸配列（すなわち、すべてDコンフォメーションでのアミノ酸配列Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys）および配列番号1で示されるアミノ酸配列の機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を包含する。

【0129】

本明細書に定義される単離されたペプチドのいずれかの薬学的に許容される塩は、本開示に包含され、特にペプチドの酢酸塩である。

10

20

30

40

50

【0130】

いくつかの実施形態では、単離されたペプチドは、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなり、Trp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lysの全Dアミノ酸配列を有する。特定の実施形態では、本開示による単離されたペプチドは、配列番号1によって示されるアミノ酸配列の薬学的に許容される塩、例えばその酢酸塩である。

【0131】

言い換えれば、種々の実施形態では、本発明による使用またはキットのためのERストレスマーカに特異的な方法、検出剤は、治療が配列番号1で示されるアミノ酸配列からなる単離ペプチドによるまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩によるものである。

10

【0132】

他の特定の実施形態では、本開示は、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドを用いるまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測するための方法を提供する。この方法は、

(a) 患者の少なくとも1つの生体試料中のBiPの発現レベルを決定して発現値を得るステップであって、生体試料の少なくとも1つが治療開始後に得られる、ステップと、
(b) ステップ(a)で得られたBiPの発現値がBiPの所定の標準発現値よりも高いか低いかを決定するステップと

20

を含み、

所定の標準におけるBiPの発現値より高い(a)で得られたBiPの発現値は患者が治療に対して応答者であることを示す。

【0133】

言い換えれば、本開示は、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなる単離されたペプチドを用いるまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測するための、使用、組成物およびキットのためのERストレスマーカに特異的な方法、検出剤を提供する。

【0134】

本明細書において定義される用語「ペプチド」は、アミノ酸残基の分子鎖を指し、これらは、必要に応じて、そのアミノ酸残基の各々の1つにおいて、例えばマンノシル化、グリコシル化、アミド化(例えば、C末端アミド)、カルボキシル化またはリン酸化により修飾され得る。ペプチドは、遺伝子工学的な方法、宿主細胞での発現を介して、または任意の他の適切な手段を介して、合成的に得ることができる。ペプチドを産生するための方法は、当技術分野において周知である。

30

【0135】

用語「単離された」は、天然環境から取り出され、単離または分離されたアミノ酸配列またはペプチドなどの分子を指す。

【0136】

本明細書中で使用される用語「アミノ酸」は、天然のアミノ酸残基および合成アミノ酸残基、ならびに天然のアミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然に発生するアミノ酸は、遺伝子コードによってコードされるもの、ならびに後で修飾されるアミノ酸(例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸塩、およびO-ホスホセリン)である。

40

【0137】

アミノ酸という用語は、L-アミノ酸およびD-アミノ酸を含み、D-アミノ酸はL-アミノ酸の鏡像であり、炭素アルファにおけるキラリティが反転されている。D-アミノ酸は、プロテアーゼ媒介分解に対して高度に耐性であり、低い免疫原性応答を有する。

【0138】

用語「アミノ酸配列」または「ペプチド配列」は、ペプチド結合によって連結されるア

50

ミノ酸残基がペプチドおよびタンパク質の鎖中に並ぶ順序にも関係する。この配列は一般に、遊離アミノ基を含むN末端から遊離カルボキシル基を含むC末端へと報告される。

【0139】

用語「含む (comprising)」は、本開示による単離されたペプチドは配列番号1によって示されるペプチドを含むが、ペプチドのN末端もしくはC末端または両方の末端に追加のアミノ酸残基も含み得ることを意味する。

【0140】

上に示したように、本開示はまた、配列番号1によって示されるアミノ酸配列を有するペプチドの誘導体を含む単離されたペプチドも包含する。

【0141】

「誘導体」または「誘導体 (複数可)」という用語は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むが、それらの全体的な配列において1つ以上のアミノ酸が異なる、すなわち配列番号1の全配列内の欠失、置換 (例えば、少なくとも1つのアミノ酸の別のアミノ酸による置換)、逆位または付加を有するペプチドを含むことを意味する。この用語はまた、その全体的な配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基の、そのそれぞれのLアミノ酸残基による置換を包含する。

【0142】

特定の実施形態では、本開示は、配列番号1によって示されるアミノ酸配列の機能的誘導体に関する。この機能的誘導体は、配列番号1で示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、より好ましくは95%、特に99%の同一性を有する。

【0143】

アミノ酸の「置換」は、1つのアミノ酸を類似の構造的および/または化学的性質を有する別のアミノ酸で置換すること、すなわち保存的アミノ酸置換の結果である。アミノ酸置換は、関連する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。例えば、以下の8つのグループの各々は、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)、
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)、
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)、
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)、
- 7) セリン (S)、スレオニン (T)、および
- 8) シス테인 (C)、メチオニン (M)。

【0144】

これらのペプチド誘導体は元のペプチドの生物学的活性を変えてはならないことが理解される。用語「機能的」は、修飾されたペプチド (すなわち誘導体) が修飾されていないペプチドのものと質的に類似している生物学的活性を保持することを示すことを意味する。誘導体の生物学的活性は、本明細書に記載されるように、すなわち当技術分野で公知のように、動物モデルへの投与時の誘導体の効果をモニターすることによって測定できる。

【0145】

いくつかの実施形態では、本明細書で定義される単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、医薬組成物中に含まれる。

【0146】

本明細書において定義される用語「医薬組成物」は、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチド、または単離されたペプチドの薬学的に許容される塩および任意により当技術分野で公知の少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤または担体を含むペプチドを指す。本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」は、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌

10

20

30

40

50

剤などを含む。医薬活性物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または剤が活性成分と適合しない場合を除いて、治療組成物におけるその使用が意図される。

【0147】

本開示によるそれを必要とする対象を治療するために使用される医薬組成物は任意によりまた、緩衝剤、その浸透圧を調整する剤、および任意により、当技術分野で公知の1つ以上の薬学的に許容される添加剤も含む。

【0148】

本発明によるそれを必要とする対象を治療するために使用される医薬組成物は、単位剤形で簡便に提示でき、例えば以下の実施例に詳述されるような、製薬業界で周知の従来の技術に従って調製できる。

【0149】

本開示による組成物はまた、本明細書中で特に言及される成分に加えて、問題の製剤のタイプに関して当該分野で慣用である他の薬剤も含み得ることが理解されるべきである。

【0150】

さらにまた、本開示は、

(a) 生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現値を決定することに特異的な少なくとも1つの検出剤、および任意で

(b) 治療の開始前および配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩の投与時に癌患者について決定される少なくとも1つのERストレスマーカの所定の標準発現値、

(c) 少なくとも1つの対照試料、
の少なくとも1つを含むキットを提供する。

【0151】

少なくとも1つのERストレスマーカの「発現値を決定するための特異的な検出剤」という用語は、本明細書で定義されるERストレスマーカに特異的な任意の検出剤、および任意により、上記で定義した少なくとも1つの好適な対照参照遺伝子の発現レベルを決定するために特異的な追加の検出剤を意味する。

【0152】

対照試料は、生体試料またはそれらに由来する任意のポリペプチド／核酸を含み得る。

【0153】

特定の実施形態では、本開示によるキットは、生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現レベルを決定するための少なくとも1つの試薬をさらに含む。そのような目的のために当該分野で公知の任意の試薬、これらに限定されないが、例えば二次抗体色素および蛍光剤が包含される。

【0154】

さらなる実施形態では、本開示によるキットは、

(d) 配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチド、または単離されたペプチドの薬学的に許容される塩
をさらに含む。

【0155】

他の実施形態では、本開示によるキットは、使用説明書をさらに含む。このような指示書は、生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現値の決定を行うための指示；および生体試料中の少なくとも1つのERストレスマーカの発現値を少なくとも1つのERストレスマーカの所定の標準発現値と比較するための指示：の少なくとも1つを含んでよい。

【0156】

さらなる実施形態では、本開示によるキットは、少なくとも1つのERストレスマーカがBiPであるものである。

【0157】

他の実施形態では、本開示のキットは、配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を用いる治療に対する癌患者の応答を予測することにおける使用のためである。

【0158】

以下に例示されるように、細胞上のより豊富なST2受容体は、dTCApFペプチドの細胞への進入を促進した。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、これは、治療される患者の癌細胞におけるERストレスの増加を可能にし、かつ単離されたペプチドまたはそれと共に投与される任意の追加の剤の投与量を低下させることができる。

【0159】

ほとんどの抗癌剤は、安全性および有効性の理由から、かなり狭い用量範囲を有する強力な医薬品である。剤の少なすぎる摂取は癌をうまく治療できず、過剰に摂取すると生命を脅かす副作用を引き起こす可能性がある。化学療法はそれに伴う副作用が知られている。一般的な副作用は、とりわけ、疲労、痛み、口および喉の痛み、下痢、悪心ならびに嘔吐である。投与される化学療法剤の用量を制限するまたは減少させる方法がしたがって望ましい。

【0160】

以下に示すように、癌細胞に対するdTCApFペプチドの有益な治療効果およびERストレスとのその独特な関連性を理解することは、本発明のさらなる態様の基礎としての役割を果たし、それによりdTCApFが別の抗癌治療剤と組み合わせられる。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、ERストレスに及ぼすdTCApFの効果の結果として、dTCApFは、追加の抗癌剤の投与量を有意に減少させることができ、それにより関連する副作用を間接的に減少させ、一方で薬物の抗腫瘍効果を維持する。

【0161】

dTCApFを追加の抗癌治療剤、例えばタキソールと組み合わせて投与した研究を以下に記載する。驚くべきことに、剤、すなわちdTCApFおよびタキソール、の各々の1つは、細胞生存率に対しわずかな効果のみ有したが、dTCApFをタキソールと組み合わせることで、相乗効果がもたらされ、細胞生存率が大幅に低下した。従って、dTCApFと抗癌剤との組合せは、癌治療中の抗癌剤の治療投与用量の基準を低減できる。

【0162】

したがって、その態様のさらに別の1つでは、本開示は、癌を治療する方法での使用のための抗癌剤および配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を含む併用療法を提供し、抗癌剤は、抗癌剤の治療用量の基準より少ない用量で投与される。

【0163】

本明細書で使用される用語「併用療法」は、2種以上の剤、すなわち配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドと抗癌剤との附随（同時）または連続投与を指す。例えば、同時投与は、2つ以上の剤を含有する1つの剤形または2つ以上の剤の混合物の投与を意味してよく、連続投与は、異なる時点で、さらには異なる投与経路により得る、患者に投与される別個の剤形を意味する。

【0164】

したがって、本開示のいくつかの実施形態では、本発明の単離されたペプチドおよび抗癌剤は、同時に、または連続して投与される。

【0165】

したがって、本明細書で使用される用語「抗癌剤の標準的治療量」は、投与される抗癌剤（複数可）、患者の年齢、性別、体重および患者の疾患ならびに全身健康状態に関連する臨床パラメータなどの考慮事項に基づき、癌患者における特定の癌の型の治療について熟練した医師により推奨される用量を指す。いくつかの抗癌剤は患者の体重（キログラム）によって決定されるが、いくつかの抗癌剤用量は、医師が身長および体重を用いて計算する体表面積（BSA）に基づいて決定される。BSAは、平方メートル（ m^2 ）で表さ

10

20

30

40

50

れる。B S Aを考慮した後であっても、小児および成人の投与量は異なる。

【0166】

以下に示すように、ペプチド d T C A p F をタキソールと組み合わせることは、相乗効果および細胞生存率の実質的な低下をもたらした。したがって、d T C A p F ペプチドと抗癌剤との併用療法は、癌治療中の抗癌剤の治療投与用量の基準を低下させることができる。

【0167】

本開示のいくつかの実施形態では、本開示による使用のための併用療法は、抗癌剤の投与量が抗癌剤の治療用量の基準より少なくとも約 1 % ~ 5 0 %、約 5 % ~ 4 5 %、約 1 0 % ~ 4 0 %、約 1 5 % ~ 3 5 % または約 2 0 % ~ 3 0 % 少ない。

10

【0168】

「抗癌薬」または「抗腫瘍薬」としても公知の用語「抗癌剤」は、その広い意味で使用され、悪性または癌性疾患の治療において有効な任意の薬物または剤を包含する。抗癌薬のいくつかのクラス、とりわけ、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド）、代謝拮抗剤（例えば、5 F U）、天然産物、免疫療法剤、ホルモンおよび阻害剤がある。

【0169】

いくつかの実施形態では、本開示による抗癌剤は、化学療法剤、チロシンキナーゼ阻害剤、免疫療法剤（例えば、阻害性免疫受容体をダウンレギュレートする抗体、抗体断片またはモノクローナル抗体）、ホルモン剤、生物学的剤、分化因子、抗血管形成因子、抗オートファジ剤または免疫刺激剤である。

20

【0170】

当技術分野で公知の「化学療法剤」は、新しい細胞を形成するプロセスの異なる段階で細胞を標的とする薬物である。化学療法剤の例としては、これらに限定されないが、いくつかの例を挙げれば、アルキル化剤、代謝拮抗物質（例えば 5 - F U）、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤（例えばパクリタキセルまたはタキソール）またはコルチコステロイドである。

【0171】

当技術分野で公知の用語「チロシンキナーゼ阻害剤」は、チロシンキナーゼを阻害する薬物を指す。チロシンキナーゼは、シグナル伝達カスケードによる多くのタンパク質の活性化を担う酵素である。タンパク質は、タンパク質にリン酸基を付加することによって活性化され（リン酸化）、リン酸化はチロシンキナーゼ阻害剤が阻害するステップである。

30

【0172】

本開示の文脈における用語「免疫療法剤」または「免疫刺激剤」は癌免疫療法を指し、これは免疫系を刺激して腫瘍を破壊しようと試みる。

【0173】

当技術分野で公知の癌治療の文脈における用語「生物学的剤」（「免疫療法」と呼ばれることもある）は、生物、生物由来の物質、またはそのような物質の実験室で製造されたものを使用して疾患を治療することを伴う。癌のためのいくつかの生物学的療法は、身体の免疫系を刺激して癌細胞に対して作用するワクチンまたは細菌を使用する。腫瘍の増殖および進行に關与する特定の分子を妨害する生物学的療法は、標的療法とも呼ばれる。

40

【0174】

当該技術分野で公知の用語「抗血管新生因子」は、血管新生、すなわち新しい血管の生成プロセス、を妨害する物質を指す。抗血管新生剤は、薬物または他の物質を用いて、腫瘍が、それらが増殖し続けるために必要とする新しい血管を作るのを止める標的療法のタイプである。

【0175】

当技術分野で公知の用語「抗オートファジ剤」は、プロセスオートファジ、すなわち不要なまたは機能不全の成分を分解する細胞の調節された破壊的メカニズム、を妨害する薬物を指す（例えば、プレオマイシン、ドキソルビシン）。

【0176】

50

さらなる実施形態では、本開示による抗癌剤は、化学療法剤、チロシンキナーゼ阻害剤、免疫療法剤、ホルモン剤、生物学的剤、分化因子、抗血管新生因子、抗オートファジ剤または免疫刺激剤である。

【0177】

特定の実施形態では、抗癌剤はタキソールである。

【0178】

いくつかの実施形態では、癌を治療する方法における使用のための、抗癌剤と配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体からなる単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩とを含む併用療法を提供し、この方法では、抗癌剤は、抗癌剤の治療用量の基準より少ない用量で投与される。

10

【0179】

さらに特定の実施形態では、本開示は、癌を治療する方法における使用のための、タキソールと配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体からなる単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩とを含む併用療法を提供し、この方法では、タキソールはこの抗癌剤の治療用量の標準より少ない用量で投与される。

【0180】

いくつかの実施形態では、単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、約 $5 \text{ mg/m}^2 \sim \text{約 } 100 \text{ mg/m}^2$ の用量で投与される。

【0181】

さらなる実施形態では、単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、1週間に1回、2回または3回の頻度で投与される。特定の実施形態では、単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、週に3回の頻度で投与される。

20

【0182】

さらなる実施形態では、単離されたペプチド、抗癌剤、またはその薬学的に許容される塩は、一緒にまたは別々に、医薬組成物中に含まれる。

【0183】

いくつかの実施形態では、本開示による使用のための併用療法は、癌が膵癌、卵巣癌、神経起源の紡錘形細胞新生物、紡錘形細胞新生物、転移性結腸直腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、結腸腺癌、直腸癌、直腸腺癌、肺癌、非小細胞肺癌、脊髄新生物、乳癌、皮膚癌、腎臓癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、前立腺癌、腺癌、頭頸部癌、胃腸癌、胃癌、小腸癌、肝癌、肝臓癌または女性生殖系悪性腫瘍である。

30

【0184】

他の実施形態では、本開示による使用のための併用療法は、癌が卵巣癌または膵癌であるものである。さらなる実施形態では、本開示による使用のための併用療法は、癌が乳癌であり、好ましくは乳癌がトリプルネガティブ乳癌（TNBC）である。

【0185】

さらなる実施形態では、本開示による使用のための併用療法は、癌がST2陽性癌細胞を含む。

【0186】

さらに別の実施形態では、本開示による使用のための併用療法は、単離されたペプチドが配列番号1で示されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩からなるものである。

40

【0187】

さらなる実施形態では、本開示による使用のための併用療法は、単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩が約 $5 \text{ mg/m}^2 \sim \text{約 } 100 \text{ mg/m}^2$ の用量で投与される。

【0188】

さらなる実施形態では、本開示による使用のための併用療法は、単離されたペプチドまたはその薬学的に許容される塩が1週間に1回、2回または3回の頻度で投与されるもの

50

である。

【0189】

本開示は、

(a) 抗癌剤、および

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩を含む治療用キットをさらに提供する。

【0190】

いくつかの実施形態では、本明細書に定義される治療用キットは、使用指示書をさらに含む。

【0191】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の治療用キットは、癌を治療する方法での使用のためであり、ここで抗癌剤は、その抗癌剤の治療用量の基準より少ない用量で投与される。

【0192】

本開示は、それを必要とする患者における癌の治療の方法であって、抗癌剤と組み合わせて配列番号1で示されるアミノ酸配列もしくはその機能的誘導体を含む単離されたペプチドまたは単離されたペプチドの薬学的に許容される塩の治療有効量を患者に投与することを含む方法をさらに提供し、ここで単離されたペプチドは抗癌剤の治療投与量の基準を下げる。

【0193】

本明細書で使用される用語「約」は、言及される値よりも最大で、1%、より具体的には5%、より具体的には10%、より具体的には15%、および場合によっては最大20%高いまたは低い偏差し得る値を示し、偏差範囲は整数値を含み、該当する場合は非整数値も含み、連続範囲を構成する。

【0194】

本発明は、開示され記載されているが、このような方法ステップおよび組成物などが幾分変化し得るので、本明細書に開示された特定の例、方法ステップ、および組成物に限定されないことを理解されたい。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態を説明する目的でのみ使用され、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲およびその同等物によってのみ限定されるので、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0195】

用語「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (having)」およびこれらの活用形は、「含むがこれらに限定されない」を意味する。この用語は、「からなる (consisting of)」および「から本質的になる (consisting essentially of)」という用語を包含する。「から本質的になる」という句は、追加の成分および／またはステップが、特許請求された組成物または方法の基本的なかつ新規な特徴を実質的に変更しない場合にのみ、組成物または方法が追加の成分および／またはステップを含み得ることを意味する。本明細書および以下の実施例および特許請求の範囲全体を通じて、文脈上他の意味を必要としない限り、「含む (comprise)」という用語、ならびに「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (having)」などの変形は、記載された整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループを含むが他の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループを除外するものではないことを示すと理解される。

【0196】

本明細書で使用される場合、用語「方法」は、これらに限定されないが、化学的、薬理的、生物学的、生化学的および医学的技術の実践者により知られる、または既知の様式、手段、技法および手順から容易に開発される様式、手段、技法および手順を含む、所定のタスクを達成するための様式、手段、技法および手順を指す。

【0197】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形の「a」、「an」、および「the」は、内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。

【0198】

本明細書および以下の実施例および特許請求の範囲全体を通じて、文脈上他の意味を必要としない限り、「含む (comprise)」という用語、ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」などの変形は、記載された整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループを含むが他の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループを除外するものではないことを示すと理解される。

10

【0199】

以下の実施例は、本発明の態様を実施する際に本発明者らが使用した技術の代表例である。これらの技術は、本発明の実施のための好ましい実施形態の例示であることが認識されるが、当業者であれば、本開示に照らして、本発明の趣旨および意図する範囲から逸脱することなく多くの変更を行うことができることを認識するであろう。

【0200】

実施例

さらなる詳述なく、当業者は、上記の説明を用いて、本発明を最大限に利用することができると考えられる。したがって、以下の好ましい具体的な実施形態は、単なる例示として解釈されるものであり、決して特許請求された発明を限定するものではない。

20

【0201】

当該分野で公知であり、本明細書に具体的に記載されない標準的な分子生物学プロトコールは、一般に、Sambrook & Russell、2001年のように行われる。

【0202】

実験手順

生検

生検材料は、当業者に周知の手順により、熟練した医師によって患者から得られた。

【0203】

生検材料により得られた組織のBiP染色

30

溶液および試薬

- －キシレン (Sigma # 534056)、
- －エタノール、無水変性、組織学的等級 (100% Solufix # E003 および 95% Sigma # 32294)、
- －脱イオン水 (dH₂O)
- －ヘマトキシリン Gill 2 (Sigma # GHS 216)、
- －洗浄緩衝液：1×TBS / 0.1% Tween-20 (1×TBS-T)、1 L を調製する場合は、50 ml の 20× TBS (Amresco # J640) を 950 ml の dH₂O に加え、1 ml の Tween-20 (Amresco # J640) を添加し、緩衝液を混合した。
- －抗体希釈剤：Signal Stain (登録商標) 抗体希釈液 # 8112、
- －抗原アンマスキング：
クエン酸塩：10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液：1 L を調製する場合は 2.94 g のクエン酸ナトリウム三ナトリウム塩二水和物 (C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O) を 1 L の dH₂O に添加した。pH を 6.0 に調整した。
- －TE：10 mM トリス / 1 mM EDTA、pH 9.0：1 L を調製する場合は、1.21 g の Trizma (登録商標) 塩基 (C₄H₁₁NO₃) および 0.372 g の EDTA を 1 L の dH₂O に添加した。
- －3% 過酸化水素：100 mL の溶液を調製する場合は、10 mL の 30% H₂O₂ (Sigma # 216763) を 90 mL の dH₂O に添加した。

40

50

- ーブロッキング溶液：バックグラウンドバスター（Innovex #NB306）；
- ー一次抗体：免疫組織化学のための抗BiP抗体（抗BiP ab21685、abcam）；
- ービオチン化二次抗体：SignalStain（登録商標）ブースト免疫組織化学（IHC）検出試薬（HRP、ウサギ）#8114；
- ーDAB試薬（Sigma #D6190）；
- ーEukitt Mounting Media（Sigma #03989）；

【0204】

脱パラフィン／再水和

この手順の間、いずれのときにもスライドは乾燥させなかった。生検組織の切片を当該分野で公知のように調製し、以下のように脱パラフィン／水和した：切片を各5分間のキシレンの3回洗浄でインキュベートし、各10分間の100%エタノールの2回洗浄でさらにインキュベートし、次に各10分間の95%エタノールの2回洗浄でインキュベートし、最後に切片を各5分間dH₂O中で2回洗浄した。

【0205】

抗原アンマスキング

クエン酸塩については、スライドを10mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）中で煮沸し、次いで10分間、沸点未満の温度で維持した。スライドをベンチトップ上で30分間冷却した。トリスEDTA（TE）については、スライドを10mM TE／1mM EDTA（pH9.0）中で煮沸し、次いで18分間、沸点未満の温度で維持した。スライドをベンチ上で30分間冷却した。

【0206】

染色

切片をdH₂Oで各5分間3回洗浄し、3%過酸化水素中で10分間インキュベートし、dH₂Oで各5分間2回洗浄し、洗浄緩衝液で5分間洗浄した。次に、切片の各々の1つを室温にて30分間、100～400μlのブロッキング溶液でブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、抗体希釈液中で1：500に希釈した100～400μlの一次抗体（すなわち抗BiP）を切片の各々の1つに加えた。処理した切片を4℃で一晩インキュベートした。次に、抗体溶液を除去し、切片を洗浄緩衝液で各5分間3回洗浄した。ビオチン化二次抗体（100～400μl）を切片の各々の1つに加え、処理した切片を二次抗体の存在下で室温にて30分間インキュベートした。次いで、二次抗体溶液を除去し、切片を各5分間、洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、試薬3，3'-ジアミノベンジジン（DAB、100～400μl）を切片の各々の1つに加え、染色を注意深くモニターした。切片ができるとすぐに、スライドをdH₂O中に浸漬した。切片を、製造業者の使用説明書に従ってヘマトキシリンで任意に対比染色し、次いで各5分間dH₂Oで2回洗浄した。

【0207】

切片の脱水

切片を各10秒間95%エタノール中で2回インキュベートし、インキュベーションを100%エタノール中で繰り返し、切片を各10秒間2回インキュベートした。インキュベーションを次いでキシレン中で繰り返し、切片を各10秒間2回インキュベートし、次にカバースリップを分析のためにマウントした。

【0208】

dTCaPFペプチドおよびそれを含む組成物の調製

ペプチドdTCaPFまたはNEROFE（商標）（両方の用語は、本明細書で同義的に使用され、上記の同じペプチドを指す）は14アミノ酸残基の長さのペプチドであり、ここでアミノ酸残基のすべてはTrp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lys（または配列番号1で示される、一文字表記でWWTFFLPSTLWERK）のアミノ酸配列を有する、D-立体配置である。

10

20

30

40

50

【0209】

このペプチドを以下のようにして合成した。臨床試験で使用するための最終医薬品である dTCApF アセテートを、Nextar Ltd. (Israel) による Good Manufacturing Practices (GMP) の下で製造し、包装し、試験し、ラベル付けおよびリリースした。

【0210】

注射用溶液用の dTCApF 粉末を、バイアル当たり注射用水 (WFI) で 2 mL の最終容量に再構成するために、4.8% マンニトールとともに、凍結乾燥した、活性物質の 15 mg を含む 5 mL バイアル (7.5 mg/mL の濃度) または 80 mg を含む 10 mL バイアル (40 mg/mL の濃度) として供給した。

10

【0211】

注射用溶液として再構成した 2 mL の dTCApF 粉末のバイアルをその後、注入のために水性デキストロース 5% 中で 100 または 250 mL の最終容量に希釈しなければならない。dTCApF を、第 I 相臨床試験での使用のために指定された臨床現場用に Nextar Ltd から供給した。

【0212】

薬物生成物は、注射用水中での単回の再構成用の白色で無菌の、非発熱性の凍結乾燥ケーキである。再構成後、この薬物生成物は透明で無色の溶液の外観を有する。バイアルは、タイプ I 透明注入ガラス 5 mL または 10 mL バイアルであり、20 mm のアルミニウムフリップオフキャップを備えた 20 mm の凍結乾燥タイプのゴム栓で栓をされる。各 10 本のバイアルは、白色のラベル付き外箱中に二次包装される。バイアルおよび二次包装箱の臨床研究 GCP 標準ラベル付けは、Nextar Ltd. による制御条件下で行われる。

20

【0213】

進行中の臨床試験概要

患者

この試験は、病理学的に確認された局所進行性および／または転移性固形悪性腫瘍を有する、以前の標準療法が奏効しなかったまたは許容できなかった成人患者 (18 歳以上) を含んだ。主要試験対象患者基準は、評価可能／測定可能な疾患および ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) のパフォーマンスステータス (PS) 1 以下を含んだ。肝癌／肝転移を有する患者は、肝機能が一定の基準を満たしていれば適格であり、脳転移を有する患者は、放射線療法が登録の 4 週間以上前に完了しかつ患者が 4 mg/日以下のデキサメタゾンを受けた場合、適格であった。主要除外基準は、治験薬の開始 14 日前に抗癌治療を受けていること、および 16 週末満の平均余命を含んだ。患者の特徴を以下の表 1 に要約する。

30

【表 1】

表 1. 患者の人口統計およびベースライン特性

	dTCApF 用量				
	6mg/m ² n=3	12mg/m ² n=3	24mg/m ² n=3	48mg/m ² n=3	96mg/m ² n=3
年齢、年					
中央値 (範囲)	63 (62～	61 (58～	65 (57～	72 (51～	64 (55～
中央値 (S E)	77)	62)	67)	94)	77)
	68 (5)	67 (4)	67 (2)	72 (8)	64 (9)
性別、男性／女性、n/n	3/0	2/1	1/2	2/1	3/2
腫瘍、型、n					
結腸直腸	3	2	0	2	1
膵臓	0	0	1	0	4
その他 ^a	0	1	2	1	0
以前の治療法、n					
化学療法	3	4	4	1	3
放射線療法	1	2	1	1	0
手術	2	2	1	1	2
生物剤による治療	0	0	1	0	0
チロシンキナーゼ阻害剤	0	0	0	1	0
などの小分子による治療					

^a小腸、肺、肝臓、および脊髄での新生物を含む。

【0214】

研究デザイン

現在の臨床研究は、公式のオープンラベル第 I 相用量漸増研究である。第一の目的は、dTCApF の最大耐量 (MTD) および安全性プロファイルを決定することであった。評価は、薬物暴露、有害事象 (AE: 有害事象共通用語規準 (CTCAE)) に準拠した等級付け、および用量制限毒性 (DLT) の特徴付けを含んだ。他の目的は、dTCApF 投与後の血管新生因子の血清レベル、薬物動態学 (PK) および薬力学 (PD) 分析、ならびに受容体染色および腫瘍応答の評価を含んだ。

【0215】

用量漸増試験は、伝統的な「3+3」スキームに従い、連続 28 日間のサイクルで 3 回／週、6、12、24、48、および 96 mg/m² の静脈内 (iv) dTCApF の用量を含んだ。患者の割り当ては図 1 に示される。すべての 3 名の患者コホートにおいて、第 1 および第 2 の患者について第 1 回投与の間隔は 2～4 週間であり、第 3 の患者では 1 週間以上であった。新たな用量レベルを、前のレベルでの 3 名の患者について 28 日以上を追跡調査後に開始した。MTD を、3 名の対象のうちの 1 名以上が最初の治療サイクル中に DLT を経験する最高用量レベルとして定義した。AE とは関係のない理由で最初の治療サイクルを完了しなかった患者を、交代させた。さらに、曲線下面積 (AUC)、最大血漿濃度 (Cmax)、および血漿半減期 (t_{1/2}) を含む、PK パラメータを決定した。PK パラメータを、非コンパートメントモデルを用いて推定した。

【0216】

言い換えれば、患者に、疾患が進行していない限り、週 3 回、6 mg/m² で dTCApF を静脈内投与した。12 mg/m² の用量が安全であることが証明され、かつ疾患が進行していた場合、患者に 12 mg/m² を投与した。例えば、図 1 での患者番号 1 は、2 サイクルの治療 (6 および 12 mg/m² の dTCApF にて) を投与された。図 1 での患者番号 4 は、3 サイクルの治療を受けた (12、24 および 48 mg/m² の dTCApF にて)。

【0217】

dTCApFの臨床活性を、RECIST v1.1を用いて、身体検査、コンピュータ断層撮影（CT）、または磁気共鳴画像法（MRI）技術（評価可能な疾患のみ）により8週間ごとに評価し、かつ適切な場合には、各サイクルで有益な腫瘍マーカを評価した。この研究は、Rabin Medical Centerの制度審査委員会およびイスラエル保健省によって承認され、ヘルシンキ宣言に従ってRabin Medical CenterのDavidoff Centerで実施された。すべての患者は登録前にインフォームドコンセントに署名した。試験はClinicalTrials.gov（NCT01690741）に登録された。

【0218】

10

投与

注射用溶液用のdTCApF粉末を、上記のとおりバイアル当たり注射用水で2mLの最終容量に再構成するために、4.8%マンニトールとともに、凍結乾燥した、活性物質の15mgを含む5mLバイアル（7.5mg/mL）または80mgを含む10mLバイアル（40mg/mL）として供給する。注射用溶液として再構成した2mLのdTCApF粉末のバイアルをその後、48mg/m²以下の用量レベルの注入のために水性デキストロース5%中で最終容量100mLに希釈する必要がある。48mg/m²を超える用量レベルの場合、最終希釈容量は250mLであった。注射用のdTCApFを60分間静脈内（iv）投与した。

【0219】

20

薬物動態分析

AUC（0-24）、C_{max}、C_{min}、T_{max}およびt_{1/2}を含むPKパラメータを、非コンパートメントモデルを使用して推定する。用量レベルにわたり比較を行って、比例性を評価する。PKパラメータの要約を以下の表2に示す。

【表 2】

表 2. サイクル 1 および 2 の初日の dTCApF の薬物動態 (各サイクルは 28 日間であった)。

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

薬力学的分析

循環サイトカインおよび可溶性 T 1 / S T 2 受容体および末梢血単核細胞 (P B M C) T 1 / S T 2 受容体発現のレベルにおけるベースラインからの変化を解釈のために提示し、P K および抗腫瘍活性分析と関連させた。前治療および／または治療中の腫瘍組織試料が得られる場合、T 1 / S T 2 受容体アッセイの結果を臨床的解釈のために提示する。

【 0 2 2 1 】

バイオマーカ分析

血液試料を患者から採取し、以下に記載するように定期的に氷上に 1 0 分間置いた。血清を 4 ° C で 1 0 分間 3 0 0 0 r p m にて遠心することによって集め、- 2 0 ° C 以下で別個のバイアル中に保持し、- 2 0 ° C で I m m u n e S y s t e m K e y L t d に輸送し、そこで解凍し、等分し、- 2 0 ° C 以下で保存する。反復凍結融解サイクルを回避した。

10

【 0 2 2 2 】

全長抗 S T 2 抗体 (G e n M e d 、 P l y m o u t h 、 M N) を用いて、T 1 / S T 2 受容体について免疫組織化学 (I H C) 染色を行った。種々の因子の血清レベルを、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) を用いて測定した。測定した追加の因子は、血管内皮成長因子 (V E G F) 、血管内皮成長因子 D (V E G F - D) 、上皮成長因子 (E G F) 、アンジオポエチン- 1 、線維芽細胞成長因子 1 (F G F - 1) 、線維芽細胞成長因子 2 (F G F - 2) 、血小板由来成長因子 A A (P D G F - A A) 、血小板由来成長因子 B B (P D G F - B B) 、形質転換成長因子 β 1 (T G F - β 1) (いずれも R & D s y s t e m s (A b i n g d o n , U K) の E L I S A キットを用いて) ; 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) 、インターロイキン 2 (I L - 2) 、インターロイキン 1 2 p 7 0 (I L - 1 / 2 p 7 0) 、インターロイキン 2 1 (I L - 2 1) および腫瘍壊死因子 α (T N F - α) (M i l l i p o r e , B i l l e r i c a , M A) ; およびグルコース調節タンパク質 7 8 (G R P 7 8) / B i P (E n z o , N e w Y o r k , N Y) を含んだ。ペプチドを用いる治療を受けている患者において測定された様々な血管新生因子およびサイトカインの血清レベルの要約を以下の表 3 に示す。

20

【表 3】

表 3. d T C A p F 投与による血管新生因子およびサイトカインの血清レベルの平均変化

dTCApF 用量	6mg/m ² n=3	12Mg/m ² n=3	24Mg/m ² n=3	48Mg/m ² n=3	96Mg/m ² n=5
d T C A p F を用いる治療前から治療後の血清レベルの変化、%					
血管新生因子					
アンジオイチン-	+960	-80	-77	-50	+70
1	+120	-62	-20	-27	+457
FGF-1	+199	-74	-34	-13	+44
FGF-2	+1379	-92	-79	-73	+57
PDGF-AA	+2271	-95	-82	-78	+185
PDGF-BB	+265	-47	-62	-72	-2
VEGF-A	+18	-80	-59	-20	データなし
TGF-β 1	+117	-40	-54	-63	+3
VEGF-D					
サイトカイン					
GM-CSF	+2173	-97	+11	+5613	+974
	+469	-76	+83	+477	+332
IL12-p70	データなし	-100	データなし	+242	+577
IL-2	+100	-61	+84	+1326	+29
IL-21	+4	-5	+31	+74	+97
TNF-α					

FGF、線維芽細胞成長因子；GM-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；IL、インターロイキン、PDGF、血小板由来成長因子；TGF、形質転換成長因子；VEGF、血管内皮成長因子；TNF、腫瘍壊死因子。

【0223】

免疫原性

循環抗 d T C A p F 抗体のレベルにおけるベースラインからの変化を、解釈のために提示する。

【0224】

抗腫瘍活性分析

評価可能または測定可能な疾患を有する対象を、固形腫瘍（RECIST）バージョン 1.1 の応答評価基準に従って 2 サイクル毎に評価する。サイクルを週 3 回の投与での 4 週間の治療と定義する。腫瘍病変の測定およびベースラインからの変化を、サイクルおよび用量コホート毎に要約する。d T C A p F 用量群毎の有害事象の要約を以下の表 4 に示す。

【表 4】

表 4. d T C A p F 投与群毎の有害事象の要約

	dTCApF 用量				
	6mg/m ² n=3	12mg/m ² n=3	24mg/m ² n=3	48mg/m ² n=3	96mg/m ² n=5
グレード 1					
血液疾患					
貧血	3	0	0	0	0
INR の上昇	0	0	0	1	0
GI 障害					

腹痛	0	1	2	0	0
腸閉塞症	1	0	0	0	0
下痢	0	2	0	0	2
G I 出血	1	0	0	0	0
嘔吐	2	0	0	0	1
一般的な障害					
脱水	0	0	0	0	1
疲労	0	1	0	1	0
高血圧	3	1	1	0	1
神経系障害					
神経障害	0	1	1	0	0
グレード2					
<u>疼痛</u>					
疼痛、脚	0	2	0	0	0
疼痛、背中	0	0	0	0	1
<u>呼吸器系疾患</u>					
咳	0	1	0	0	0
<u>皮膚疾患</u>					
掻痒症	0	0	0	0	1
蕁麻疹	0	0	0	0	1
<u>肝障害および泌尿器疾患</u>					
A L T 上昇	0	0	0	0	1
A S T 上昇	0	0	0	0	1
ビリルビン増加	0	0	0	1	1
肝機能障害	0	0	0	0	1
尿路感染	0	1	0	0	0
グレード3					
血液疾患					
INR の上昇	0	0	0	1	0
一般的な障害					
高血圧	2	1	1	0	2
肝障害および泌尿器疾患					
ビリルビン増加	0	0	0	1	1
消化管障害					
腸閉塞症	1	0	0	0	0
下痢	0	1	0	0	1
GI 出血	1	0	0	0	0
グレード4					
G I 障害					
嘔吐	0	0	0	0	1

10

20

30

40

A L T、アラニントランスアミナーゼ；A S T、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ；G I、消化器；I N R、国際標準比。

【0225】

客観的腫瘍応答率（完全応答および部分応答）、客観的腫瘍応答の持続時間、客観的腫瘍応答時間、および無増悪生存を提示する。時間－事象推定値および生存曲線を、K a p l a n－M e i e r 法およびC o x モデルを使用して、計算された粗ハザード比および計算された調整ハザード比（交絡変数のために調整された）を用いて生成する。有益な腫瘍

50

マーカ評価（例えば、C A 1 2 5 または P S A）を有する対象は、サイクル毎に適切な評価を受ける。腫瘍マーカパラメータを、評価可能な場合、サイクルおよび用量コホートによって要約する。d T C A p F の P K、P D および臨床効果の間の関係の探索的評価を行う。試験に登録された患者の無増悪生存期間（P F S）の要約を以下の表 5 に示す。

【表 5】

表 5. 試験登録前の最後のレジメンでおよび d T C A p F での P F S。グレーの列は、最後のレジメン前登録の P F S と同等かまたはそれを上回った d T C A p F での P F S を経験した患者を表す。

患者番号	最後のレジメンの前登録時の P F S、日数	d T C A p F の P F S、日数
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

P F S、無増悪生存

【0 2 2 6】

統計分析

記述統計学をすべての分析に使用し、S A S（登録商標）バージョン 9. 1（S A S I n s t i t u t e I n c.、C a r y、N C）で実施した。回帰分析を、月ごとの腫瘍変化、d T C A p F の投与量、および E R ストレスバイオマーカ（B i P）のレベル間の双方向相関を研究するために使用した。相関の統計的有意性を、F 統計を用いて検証した

【0 2 2 7】

E L I S A による G R P 7 8 / B i p マーカ血中濃度の測定

d T C A p F ペプチドによる治療を受けている患者における B i P の血漿レベルの測定を以下のように行った。

【0 2 2 8】

試料の採取

血液を、ラベンダー上部バキュテイナーチューブ中で d T C A p F により治療される患者から採集し、その後氷上に 1 0 分間置いた。次に、バキュテイナーを 4 °C にて 3 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心した。血漿画分を別のバイアルに集め、- 2 0 °C で W o r l d C o u r i e r により R & D d e p a r t m e n t に出荷するまで - 2 0 °C 以下で保った。受領時に、血清試料を解凍し、5 6 μ l のアリコート を 0. 5 m l のバイアル中に入れ、- 2 0 °C 以下で保存した。反復凍結融解サイクルを回避した。血液を、最初のサイクルの 1 日目、1 5 日目および 2 9 日目に、およびその後のサイクルの 2 9 日目に採取した。

【0 2 2 9】

G R P 7 8 / B I P の血中濃度の測定

GRP78/BIPの血中濃度の測定を、キットGRP/BIP ELISAキット (cat #ADI-900-214 Enzo)を用いて実施した。血漿試料のアリコートをして4℃で解凍し、4℃にて6分間10,000Gで遠心した。試料を次いで、BSAおよび界面活性剤(キットアッセイ)緩衝液を含有するトリス緩衝食塩水で1:5に希釈した。試料を次いでロバ抗ヒツジIgGでプレコートした提供された96ウェルプレート上に二重で載せた。校正試料およびブランク試料もまたプレート上に装填し、次いでBIP(黄色)に向けられた抗体を、ブランクのウェルを除いてウェルのすべてに添加した。ELISAプレートを密閉し、1時間750RPMで振とうしながら室温(RT)でインキュベートした。

【0230】

10

上記のインキュベーション期間後、プレートを洗浄せず、BIPコンジュゲート(青色)をブランク以外のウェルのすべてに添加した。プレートを、さらに1時間(RT)振とうしながらインキュベートした。

【0231】

追加のインキュベーション期間後、ウェルの内容物を吸引し、各ウェルに界面活性剤を含有する300μlのトリス緩衝食塩水(キットの洗浄緩衝液)を添加することにより、ウェルを自動洗浄(Bio-plex pro II Washステーション)を用いて洗浄した。洗浄手順をさらに3回繰り返し、合計4回洗浄した。最後洗浄の後、ウェルを吸引し、プレートをリントフリーのペーパータオル上でしっかりと上下逆さまに軽くたたいて、残留する洗浄緩衝液を取り除いた。

20

【0232】

3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)溶液を各ウェルに添加し、プレートを密閉し、振とうしながら暗所で室温にて19分間インキュベートした。停止溶液をその後、各ウェルに添加し、デルタODを450nm/570nmで読み取った。ブランクウェル値をすべての結果から差し引いた。校正曲線を作成し、BIP ng/mL値をそれに応じて計算し希釈係数(x5)を掛けた。

【0233】

血漿BIP発現量の差の算出

BIPの血漿発現レベルの差を、治療の29日目にdTCApFで治療される患者の血漿中で測定したBIP発現レベルと、治療の1日目(dTCApFペプチドの最初の投与前)にdTCApFで治療される患者の血漿中で測定したBIP発現レベルとの間の差を計算すること、およびその結果を治療の1日目に測定した上記のBIP発現レベルで割る(正規化)ことにより求めた。つまり、(29日目のBIPレベル) - (1日目のBIPレベル) * 100 / (1日目のBIPレベル)である。

30

【0234】

カルレティキュリン(CRT)血中濃度の測定

血清CRTレベルを、キットElisa CRTキット(ヒト)(OKEH01054、Aviva system Biology)を用いて測定した。サイクル1の1日目および15日目または29日目(C1D1、C1D15およびC1D29)の患者の試料を解凍し、10,000Gで10分間遠心し、製造業者のプロトコールに従ってプレートに装填した。

40

【0235】

腫瘍サイズの決定

腫瘍サイズを、固体腫瘍ガイドラインの応答評価基準(RECIST)に従って、医療現場で評価した(例えば、コンピュータ断層撮影スキャン(CT)の実施により)。試験の最終日(すなわち、ペプチドの最後の投与後)の腫瘍サイズを、試験の最初の日(ペプチドの最初の投与前)の腫瘍サイズと比較した(百分率で)。

【0236】

癌細胞におけるST2の状態の評価

癌細胞におけるST2の状態を、特定の抗ヒトst2受容体抗体を用いて、免疫組織化

50

学によって患者から得られた生検試料について評価した。染色ステップ後、生検を病理学者によって評価した。

【0237】

dTCAPFで処理したOV90細胞の免疫組織化学（ICC）

細胞培養の増殖および処理のための材料

成長培地：

- －DMEM高グルコース、L-グルタミン（Gibco 41965-039）；
- －ピルビン酸ナトリウム11.0mg/ml（100mM）（Biological industries cat No. 03-042-1B）；
- －50mlのFBS（Biological industries cat no. 04-121-1A）；
- －0.5mlアンフォテリシンB2500μg/ml（Biological industries cat no. 03-029-1）；
- －5mlの硫酸ゲンタマイシン50mg/ml（Biological industries cat no. 03-035-1）；

処理培地：

処理培地は、5%マンニトール（Sigma cat no. M4125-500G）を補充した増殖培地に基づいた。培地を、マンニトール添加後0.2μmフィルターでろ過した。

追加材料：

- －トリプシンEDTA（Biological industries cat no. 03-052-1B）；
- －75cm²培養フラスコ（Nunc cat no. 178905）；
- －25cm²培養フラスコ（Nunc cat no. 136196）；
- －マンニトール中20mg/mlのdTCAPF（アリコートを使用し、凍結融解サイクルの繰り返しを回避する）；
- －ヒト卵巣癌細胞株OV90を使用した：レギュラーOV90（アメリカンタイプカルチャーコレクション、ATCC）およびT1/ST2 KO OV90（発明者により製造）；

ICC用の材料：

- －スライド：Nunc（商標）Lab-Tek（商標）II Chamber Slide System（154534 Nunc）；
- －洗浄緩衝液：PBS（02-023-5A Biological Industries）；
- －固定溶液：PBS中の3%ホルムアルデヒド（252549 Sigma）；
- －浸透溶液：PBS中の0.25%トリトンX-100（0694 Amresco）；
- －ブロッキング緩衝液：0.1%Tween-20（0777 Amresco）を含むPBS中の1%BSA（A7906 Sigma）、22.52mg/mLグリシン（G8898-500G Sigma）；
- －抗体緩衝液：0.1%Tween-20（0777 Amresco（登録商標））を含むPBS中の1%BSA（A7906）；
- －一次抗体：1：500に希釈した抗58kゴルジマーカ（ab27043）、1：250に希釈した抗β-COP（ab6323）、1：1,000に希釈した抗GRP78 BiP（ab21685）（抗体はAbcamから購入）；
- －二次抗体：58kゴルジマーカおよびβ-COP：ZytoChem Plus（HRP）ポリマー抗ウサギ（ZUC032-006）。BiP：ZytoChem Plus（HRP）ポリマー抗マウス（ZUC050-006）；
- －DAB（3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド、D3939 Sigma）；
- －水性マウント培地（Ab128982 Abcam）。

【0238】

細胞培養の増殖

OV90およびOV90 ST2 KO細胞を、最大70～80%の密度に達するまで37℃、5%CO₂および100%湿度でインキュベーター中のフラスコ中で増殖させた。培地を、ピペットを用いてフラスコから除いた。次に、4mlのトリプシンEDTAを各フラスコに添加し、フラスコを、細胞の大部分がフラスコから分離するまで数分間インキュベーター中に置いた。細胞の分離を増やすためにフラスコを軽く叩くことを避けた。培地(10ml)を次いでフラスコに加え、培地およびトリプシン中の培養物を2つのフラスコに分け、その各々に15mlの新しい培地を添加した。細胞を、70～80%に達するまで増殖のために2～3日間インキュベートし、継代手順を必要に応じて繰り返した。

10

【0239】

細胞の処理

培地およびトリプシン中で上に詳述したように増殖させた細胞培養物を50mlコニカルチューブに移し、チューブを4℃で10分間300gで遠心した。次に上清を捨て、ペレットを流動化するために、15mlの新鮮な培地を細胞ペレットに添加した。細胞を計数し、1mlの増殖培地中のチャンバースライド上に10,000細胞/ウェルで播種した。チャンバースライドを1時間フード中に静置した後、インキュベーターに一晩移した。翌日、細胞処理培地を、50μg/mLのdTCApFを含んで調製した。細胞を、チャンバースライドから培地を吸引し廃棄することにより、および各ウェルにdTCApF(または対照)を含む0.5mlの細胞処理培地を添加することにより処理し、次いでインキュベーター中で48時間インキュベートした。その期間の後、dTCApFを含む処理培地の追加用量を処理細胞ウェルに加え、細胞を、さらなる24時間のインキュベートの後に回収した。

20

【0240】

免疫化学

上で詳述したように処理した細胞を、以下のICCプロトコールに供した。インキュベーション期間の完了後、培地を吸引し、細胞を、各ウェルを洗浄緩衝液で満たすことによって洗浄した。次に、緩衝液を捨て、300μlの固定溶液を各ウェルに加えた。細胞を15分間室温でインキュベートした。固定溶液を次いで捨て、ウェルを簡単に2回すすいだ。次に、300μlの浸透溶液を各ウェルに加え、細胞を10分間室温でインキュベートした。浸透化溶液を捨て、ウェルを3回、それぞれ洗浄について5分間、洗浄した。ブロッキング緩衝液(1ml)を各ウェルに加え、細胞を1時間室温でインキュベートした。インキュベーション時間の終了前に、上で詳述した一次抗体を抗体希釈緩衝液で希釈した。次に、ブロッキング緩衝液をウェルから捨て、120μlの一次抗体を各ウェルに添加した。細胞を次いでパラフィルム(またはダクトテープ)で覆い、4℃で一晩インキュベートした。

30

【0241】

翌日、一次抗体を捨て、ウェルを洗浄緩衝液で3回、それぞれの洗浄について5分間、洗浄した。二次抗体を次いで各ウェル(1～2滴)に加え、細胞ウェルを30分間室温でインキュベートした。次いで、ウェルを洗浄緩衝液で3回、それぞれの洗浄について5分間、洗浄した。DAB基質(新たに調製し、0.2μmフィルターでろ過した)を各ウェル(1～2滴)に添加し、発育を確認しながら細胞ウェルを5～15分間インキュベートした。細胞ウェルを5分間PBSで洗浄した。ウェルを次いでスライドから取り出し、スライドを風乾した。マウント媒体を加え、スライドをカバースリップ上に置いた。視覚化を、光学顕微鏡を用いて行った。

40

【0242】

タキソールまたはdTCApFの存在下でのBrdU取り込みアッセイ

ヒト膀胱癌細胞(BxPC3)およびヒト卵巣癌細胞(OV90)を、以下に詳述するように、BrdUの存在下で24時間、dTCApFまたはタキソールで処理した。

50

【0243】

細胞を、5%CO₂で37℃にてインキュベーター中で24時間、100μlのDMEM (life science 41965-039) および10%ウシ胎児血清 (FBS、Biological industries 14-127-1A) の入った96ウェルプレートの真ん中に2,000細胞/ウェルで置いた。培地を次に、2.5%FBSおよびDMSO中の最終濃度2nMまたは4nMのタキソール (sigma T7402) またはDMSO中の最終濃度25μg/mlのdTCApF (nextar ISK 353-01 バッチ351-01/1.68) を含む200μlのDMEMに置き換えた。対照細胞での培地を、上記のようにDMEMおよびFBSで置き換えた。細胞ウェル中のDMSOの最大濃度は0.5%未満であった。4つのウェルを各濃度について使用した。

10

【0244】

タキソールおよびdTCApF処理細胞ならびに対照細胞を、以下のようにBrdUの存在下で24時間さらにインキュベートした：20μlのBrdU試薬 (2.5%FBSを補充したDMEM中で1:100希釈) を細胞に添加し、プレートを5%CO₂で37℃のインキュベーター中で24時間インキュベートした。BrdU ELISAをキットプロトコール (Millipore #2752) に従って実施した。

【0245】

タキソールおよびdTCApFの存在下でのBrdU取り込みアッセイ

癌細胞 (BxPC3) およびヒト卵巣癌細胞 (OV90) を、以下に詳述するように、BrdUの存在下で24時間、dTCApFおよびタキソールで処理した。

20

【0246】

細胞を、5%CO₂で37℃にてインキュベーター中で24時間、100μlのDMEMおよび10%FBSを含む96ウェルプレートの真ん中に2,000細胞/ウェルで置いた。培地を次に、2.5%FBSおよびDMSO中の最終濃度25μg/mlのdTCApF (nextar ISK 353-01 バッチ351-01/1.68) を含む200μlのDMEMに置き換えた。細胞ウェル中のDMSOの最大濃度は0.5%未満であった。4つのウェルを各濃度について使用した。最終濃度2nMまたは4nMでタキソール (2.5%FBSを補充したDMEM5μl中で) を次に、dTCApFを含有する細胞に添加し、処理した細胞をBrdUの存在下で以下のようにさらに24時間インキュベートした：2.5%FBSを補充したDMEM中で1:100に希釈したBrdU試薬20μlを、実験終了24時間前に細胞に添加した。最後に、BrdU ELISAをキットプロトコール (Millipore #2752) に従って実施した。

30

【0247】

実施例1

ペプチドdTCApFは、癌細胞における小胞体 (ER) ストレスを増加させる

上に示したように、ヒト胸腺に特有のcDNAによってコードされる「T101」と呼ばれるペプチドが同定され、とりわけ癌腫瘍サイズを減少させることが報告された。さらに、本明細書でdTCApF (または「Nerofe」) と称される、T101のペプチド誘導体は、癌細胞による癌転移に関連することが公知であるタンパク質の分泌を減少させ、かつインビトロでの癌細胞の移動を直接阻害することが報告されている (16)。

40

【0248】

上記のとおり、進行中の臨床試験は現在、ペプチドdTCApFを用いて行われている。このペプチドは、配列番号1によって示されるTrp Trp Thr Phe Phe Leu Pro Ser Thr Leu Trp Glu Arg Lysの全Dアミノ酸配列を有し、上記のとおり調製された。

【0249】

ペプチドdTCApFを、上で説明した癌患者 (表1) に、示された投薬レジメンで、週3回、静脈内 (iv) 投与した。

【0250】

50

癌細胞に対する d T C A p F ペプチドの効果を調べるために、上記のレジメンの下で d T C A p F により 11 ヶ月間治療した脊髄腫瘍患者から生検を採取した。組織生検を、治療前および治療 11 ヶ月後に患者から得て、小胞体 (E R) ストレスのマーカーである B i P のレベルを検出するために抗 B i P 抗体で染色した。

【0251】

上で詳述したように、G R P 78 としても知られている結合免疫グロブリンタンパク質 (B i P) は、E R 中で分子シャペロンとして作用し、その合成は、E R 中の折り畳まれていないポリペプチドの蓄積をもたらす条件下で顕著に誘導される。

【0252】

図 2 に示すように、B i P のレベルの明らかな差が、治療開始前 (図 2 A) および 11 ヶ月治療後 (図 2 B) の患者から得られた生検で観察され、これは、d T C A p F ペプチドが脊髄新生物癌患者から得られた腫瘍において E R ストレスを増加させたことを示す。

【0253】

実施例 2

E R マーカー B i P レベルの上昇は腫瘍サイズの減少と相関する

上の実施例 1 で詳述したように、観察された B i P レベルの上昇に基づいて、d T C A p F ペプチドはこのペプチドでの治療を受けている患者から得られた腫瘍細胞において E R ストレスを増加させることが示された。驚くべきことに、E R ストレスマーカー B i P の増加は、以下に詳述するように、治療される患者における腫瘍増殖の阻害と高い相関関係にあることが見出された。

【0254】

B i P のレベルを、1 日目 (d T C A p F の最初の投与前) および d T C A p F での治療の 29 日目に上で詳述したように実施した d T C A p F ペプチドを用いる臨床試験に参加した癌患者の血漿中で測定した。治療の 1 日目に癌患者について得られた B i P の血漿レベル (「ベースライン」レベル) を次いで、治療の 29 日目の同じ癌患者について得られた B i P の血漿レベルから差し引いた。

【0255】

並行して、参加癌患者を、上記のとおり、治療の 1 日目 (または治療開始直前) および最終日に、コンピュータ断層撮影スキャン (C T) を用いて腫瘍サイズについて評価した。腫瘍サイズの差異 (本明細書では「腫瘍変化」とも呼ばれる) をその後、上記のようにして計算した。簡潔には、「腫瘍変化」は、治療の初日 (第 1 日) ~ 治療の最終日 (治療期間は上記の基準に基づいて決定された) の間に d T C A p F による治療時に得られた腫瘍サイズの差の尺度である。

【0256】

全体として、39 名の患者をスクリーニングし、そのうち 17 名が登録され試験を完了した。患者の大半 (64%) は男性で、年齢中央値 (範囲) は 65 歳 (51 ~ 94) 歳であった。患者のほぼ半分 (47%) が結腸直腸癌 (C R C) を有し、約 1/4 (29%) が膵癌を有した。1 名を除く全患者は、登録前に複数の抗癌療法 (例えば、化学療法、放射線療法、生物学的療法) を受けた (表 1)。患者は、図 1 に詳述されるように、漸増用量 (6 mg/m²、12 mg/m²、24 mg/m²、48 mg/m²、および 96 mg/m²) の d T C A p F を 1 ~ 3 サイクル受けた。

【0257】

上記のように、G R P 78/B i P タンパク質 (E R ストレスバイオマーカーとして) の血清レベルを、上に示されるように d T C A p F 治療の開始前および治療の 29 日後に測定した。統計的に有意な相関が、図 3 に示されるように、投与された d T C A p F 用量と血清 G R P 78/B i P レベルの変化との間に ($P \leq 0.05$)、ならびに腫瘍サイズの変化と G R P 78/B i P の血清レベルの変化との間に ($P \leq 0.002$) (図 4) 見られ、d T C A p F が E R ストレスを誘導したことを示唆する。

【0258】

図 4 に示すように、B i P のレベルの変化と腫瘍サイズの変化との間に (負の) 直線的

10

20

30

40

50

相関があり、すなわち、B i P のレベルの増加は腫瘍増殖の完全な阻害と相関した。これらの結果は、d T C A p F が、とりわけ、癌細胞中で E R ストレスを増加させることによって、かついかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、ゴルジ複合体を破壊することを介して作用し、それによって癌細胞死をもたらすことを実証する。

【0259】

上記のとおり治療の1日目および29日目に決定された臨床試験に参加する患者における B i P の血清レベルを以下の表6に示す。

【表6】

表6. 臨床試験に参加している患者の B i P の血清レベル

患者	コホート	サイクル	日数	BiP ng/ml	標準偏差(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
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

【0260】

興味深いことに、上の表3に示すように、 6 mg/m^2 の用量での d T C A p F を用いる治療は、アンジオポイエチン-1、F G F - 1、F G F - 2、P D G F - A A、P D G F - B B、V E G F - D、T G F - β 、および V E G F の血清レベルの上昇を導いた。しかし、 $12 \sim 48\text{ mg/m}^2$ の用量では、これらの因子の血清レベルの低下が観察され、 96 mg/m^2 では、V E G F - D を除くすべての因子の増加が認められた。また、G /

M-C S F、I L 2、I L-1 2 p 7 0、I L-2 1、およびT N F- α などのすべての抗癌サイトカインの血清レベルは、すべての用量レベルにおいて、d T C A p Fの投与により上昇した。

【0261】

d T C A p Fの活性の様式(M O A)を探索するために、患者をT 1 / S T 2の状態ごとに検査した。図5に示すように、腫瘍がT 1 / S T 2陽性である(I H Cによって決定される)患者は、腫瘍がT 1 / S T 2陰性である患者よりも長く治験に留まり、かつd T C A p F治療中に安定な疾患(S D)を経験したことが見出された。

【0262】

T 1 / S T 2受容体(本明細書では「S T 2」および「S T 2 / T 1」とも称される)は、インターロイキン1受容体(I L-1 R)スーパーファミリーのメンバーである。当技術分野で公知のように、インターロイキン-1受容体(I L-1 R)スーパーファミリーのメンバーは、細胞外免疫グロブリン様ドメインおよび細胞内T o l l / インターロイキン-1 R (T I R)ドメインを特徴とする。このファミリーのメンバーは宿主の防衛、傷害およびストレスにおいて重要な役割を果たす。ペプチドd T C A p Fが由来する胸腺ペプチドT 1 0 1は、T 1 / S T 2受容体のリガンドとして機能し得ることがこれまでに報告されている(13~15)。

【0263】

したがって、集団の各々(T 1 / S T 2陰性陽性患者およびT 1 / S T 2陽性患者)について、B i Pレベルを再分析した(すなわち、腫瘍サイズの変化対d T C A p F投与用量)。結果を図6にグラフで示す。

【0264】

S T 2陽性およびS T 2陰性癌が分離された図6に示すように、S T 2陽性であった癌細胞中のB i Pマーカレベルを腫瘍変化に相関させると、R値は-0.98であり、S T 2陰性であった癌細胞では、R値は-0.83であった。S T 2陽性のグラフのp値は、小さなデータセットであるために最適ではない。

【0265】

いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、この差は、S T 2陽性細胞上のS T 2受容体のより高い存在量がこれらの細胞中へのd T C A p Fペプチドの進入を容易にし、このためより少ない用量のペプチドをおそらく必要とすることを示している。

【0266】

「S T 2陰性」と定義された細胞においてでさえ、S T 2陽性細胞の場合よりも低い存在量であるが、細胞中にd T C A p Fペプチドを組み込むための十分なS T 2受容体が存在することは注目に値する。

【0267】

上に提示した結果は、E RストレスマーカB i Pが、このペプチドで治療される癌患者における腫瘍増殖を阻害する際のd T C A p Fペプチドの効率のマーカとして使用できることを示している。効果は既に治療の最初の1ヶ月で明らかであるので、治療の初期段階でB i Pのレベルを決定することは、治療効率の評価のための評価テストまたはツールとして役立ち得、かつこれらの患者のさらなる治療ステップの決定、例えば、d T C A p Fを使用する治療を続けるべきか否かの決定の助けとなる。

【0268】

実施例3

ペプチドd T C A p Fの安全性および耐容性

様々なパラメータを、以下に詳述するように、安全性、P Kおよび有効性を含み、上記実施例2で言及した臨床試験に参加する患者について分析した。

安全性および耐容性

【0269】

患者1名あたりの治療サイクルの平均数は 3.2 ± 1.4 であった。用量制限毒性(D L T)はコホート5までのいずれの患者においても観察されなかった。有害事象(A E)

10

20

30

40

50

を上表 4 に要約する。研究薬物に関連するものはなかった。高血圧、貧血、嘔吐、下痢、および腹痛が最も多く報告されたグレード 2 A E であり、高血圧が最も多く報告されたグレード 3 A E であった。嘔吐は 1 名の患者で報告された唯一のグレード 4 A E であった。ほとんどの A E は自己解決型であった。全体的に、d T C A p F の治療は、累積毒性がなく、耐容性が良好であった。M T D には達しなかった。

【0270】

薬物動態

サイクル 1 および 2 の初日の P K 結果を表 2 に要約する。t_{1/2}、C_{max} および AUC₀ は用量に線形に関係した。d T C A p F の用量依存性血漿濃度が観察された (図 7)。

10

【0271】

効能

3 ヶ月間以上 (12、24、48 mg/m²) 治療された 17 名の患者のうち 5 名が、治療期間全体を通じて安定な疾患 (S D) を経験した。特に、1 名の患者は、明らかに脊髄を圧迫する脊髄新形成のため、腰痛および衰弱を患い、様々な鎮痛薬 (例えば、トラマドール、オキシコドン/ナロキソン、モルヒネ、およびプレガバリン) を投与され、歩行器を使用した。6 ヶ月間の治療 (12、24、48 mg/m²) 後に、患者はいかなる鎮痛薬も必要とせず歩行を改善した。

【0272】

無増悪生存 (P F S) 分析は、6 名の患者が以前のレジメンと比較して d T C A p F に対してより長い P F S を経験し、かつ 1 名は以前のレジメンでの P F S と同等であった P F S を有したことを明らかにした (これらの P F S 値は、上の表 5 に太字で示される)。さらに、先立って治療を受けなかった 1 名の患者は、治療薬に 330 日間留まることができた (染色陽性) (表 5)。回帰分析は、腫瘍サイズの変化と d T C A p F 投与用量との間に統計的に有意な相関を明らかにした (図 8)。

20

【0273】

実施例 4

S T 2 ノックアウト細胞に対する d T C A p F ペプチドの効果

上記のように、S T 2 陽性細胞上の S T 2 受容体のより高い存在量は、これらの細胞中への d T C A p F ペプチドの侵入を促進し得る。癌細胞での S T 2 受容体の存在が、細胞への d T C A p F の侵入に及ぼす効果をさらに調べるために、下に詳述するとおり、S T 2 ノックアウト (K O) 細胞を調製し、d T C A p F 投与に応答したこれらの細胞における種々のタンパク質のレベルを調べた。

30

【0274】

S T 2 受容体のノックアウトに使用した細胞は、哺乳動物卵巣細胞 O V 9 0 (腺癌) であった。上に詳述したように、O V 9 0 細胞および K O O V 9 0 細胞に d T C A p F を投与し、次いでこれらを免疫細胞化学アッセイに供した。

【0275】

図 9 A (d T C A p F を投与されなかった対照 O V 9 0 細胞) と図 9 B (d T C A p F を投与された O V 9 0 細胞) との比較により明らかなように、d T C A p F はゴルジ装置の完全破壊を誘発し、その結果 E R ストレスを生じた。図 9 B は、消失したゴルジ、および E R 上に蓄積した破壊タンパク質を示し、これが次いで E R ストレスをもたらすことを示している。これらの結果は、ゴルジ装置タンパク質の 1 つである、β-c o p タンパク質の分析に基づいている。

40

【0276】

上記の結果とは対照的に、図 9 C (処理されていない対照 O V 9 0 S T 2 K O) および図 9 D (ペプチドを投与された O V 9 0 S T 2 K O 細胞) に示されるように O V 9 0 S T 2 K O 細胞において、d T C A p F のゴルジ体への効果は観察されなかった (矢印は無傷のゴルジ体を指す)。

【0277】

50

図10は、dTCApF投与の結果としてOV90およびOV90 ST2 KO細胞におけるBiP発現の評価を示す。OV90細胞では、図10A（dTCApFの非存在下）と図10B（dTCApFの存在下）との比較により示されるように、dTCApF処理によりBiP染色の明らかな増強が観察されるが、OV90 ST2 KO細胞では図10Cと図10Dとの比較により推測されるように、dTCApF処理の結果としてのBiPの染色の差がない。これは、OV90 ST2 KO細胞がdTCApFにตอบสนองせず、ERストレスがこれにより誘導されなかったことを意味する。

【0278】

いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、上記の結果は、ST2受容体が患者でのERストレスとどのように関連するかを実証する。dTCApFに対するST2陽性細胞の感受性の増大、および上記の結果はまた、図6に示されるST2陽性細胞において観察されたBiPの発現レベルの大きな差異を説明する。

【0279】

実施例5

正常細胞に対するdTCApFペプチドの効果

ペプチドdTCApFを健常なヒト末梢免疫細胞に適用し、正常な健常細胞とは対照的に癌細胞はERストレスに対して明らかに非常に感受性が高いことから、わずかな細胞死のみが生じた（データ示さず）。従って、いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、dTCApFは癌細胞に選択的に影響を及ぼすようである。

【0280】

実施例6

ERマーカーCRTのレベルはdTCApFペプチドの投与量と相関しない

カルレチキュリン（CRT）は、細胞のERにおいて正常な条件下で発現されるシャペロンであり、新たに合成されるタンパク質の折り畳みを助ける。さらに、dTCApFによる処理の結果としてのBiP ERストレスマーカーの増加を示す上に提示された結果に加えて、dTCApFにより治療されるヒト患者におけるCRT血清レベルの変化も調べた。異なる投与用量のdTCApF（ $6\text{ mg/mm}^2 \sim 96\text{ mg/mm}^2$ ）を受けた患者は、CRT血清レベルの変化を誘導したが、上に詳述したとおり、dTCApFの投与および腫瘍サイズと線形相関を示したBiPレベルとは対照的に、dTCApFを投与した用量との相関はなかった。

【0281】

上記臨床試験に参加した癌患者でのdTCApFによる治療の終了時のCRTの血清レベルを示す棒グラフを図11Aに示し、dTCApF治療を受けている患者での血清CRTレベルの変化を示す棒グラフを図11Bに示す。

【0282】

要約すると、dTCApFの用量とCRT血清レベルとの間に相関は観察されなかった。マウスで行われたインビトロ実験は、dTCApFによる処置の結果としてレベルが上昇したBiPとは対照的に、細胞中のCRTレベルはdTCApF処理による影響を受けなかったことを示した（データは示さず）。

【0283】

CRTは、dTCApFで処理した場合にそのレベルが細胞中で上昇しないシャペロンであり、BiPのレベルはdTCApFで処理した後にインビトロおよびインビボにおいて増加する。両方ともERストレス修復機構の一部であるが、dTCApFはインビトロおよびインビボのBiPを選択的に増加し、CRTレベルにいかなる影響も及ぼさない。CRTレベルの変化が起こらなかったという観察は、BiPの血清レベルの変化およびCRTレベルの「変化なし」と相関する。これは、患者におけるBiPレベルの変化がdTCApFのインビトロ／インビボ活性と完全に相関することを意味する。

【0284】

実施例7

ペプチドdTCApFはNK細胞を活性化する

ナチュラルキラー細胞または「NK細胞」は、先天性免疫系にとって重要な細胞傷害性リンパ球の一種である。NK細胞の役割は、適応免疫応答における細胞傷害性T細胞の役割と類似する。他の機能の中で特に、NK細胞は、ウイルス感染細胞への迅速な応答を提供し、腫瘍形成に応答する。

【0285】

dTCAPFの効果を、ヒトNK細胞(CD56+CD16+、Lonza(2W-501)から購入)についても調べた。NK細胞をLGM-3培地(IL-2およびIL-15を補充)に播種した。細胞をdTCAPFで24時間、およびさらに72時間処理した後、CD335およびCD337抗原(それぞれ、天然細胞傷害性誘発受容体1(Natural cytotoxicity triggering receptor 1)および天然細胞毒性誘発受容体3(Natural cytotoxicity triggering receptor 3))に焦点を当てたFACS分析を行った。図12に示すように、両方の受容体の発現の増加がdTCAPFによって誘導された。

【0286】

CD335およびCD337受容体は、癌細胞およびウイルス感染細胞に対するNK細胞活性にとって重要である。NK細胞活性の誘導は、患者006(脊髄新生物を有する)について上記した臨床試験中にも観察された。臨床試験中、患者の生検材料を、臨床試験への参加前および治療投与後に、特異的抗ヒトNK細胞抗体で染色した。dTCAPFを投与された後の患者の生検材料におけるNK細胞の強い染色が観察された(データは示さず)。

【0287】

実施例8

dTCAPFをタキソールと組み合わせると相乗効果が生じる

癌細胞に対するdTCAPFペプチドの有益な治療効果はさらなる研究を促し、この研究ではdTCAPFを上記の条件下で、追加の抗癌治療剤、すなわちタキソールと組み合わせて癌細胞に投与した。

【0288】

パクリタキセルとしても公知であるタキソールは、抗癌(「抗腫瘍性」または「細胞傷害性」)化学療法薬である。パクリタキセルは、乳癌、卵巣癌、肺癌、膀胱癌、前立腺癌、黒色腫、食道癌、および他のタイプの固形腫瘍癌の治療に使用される「植物アルカロイド」、「タキサン」および「抗微小管剤」に分類される。

【0289】

投与された剤の効果を、活性なDNA合成およびそれによる細胞の増殖および生存を検出するために使用される、ブロモデオキシウリジン(BrdU)取り込みアッセイによってモニターした。

【0290】

dTCAPFペプチドとタキソールの併用効果を評価するために、2種類の癌細胞、ヒト卵巣癌細胞(OV90、図13A)およびヒト膵癌細胞(BxPC3、図13B)を用いた。

【0291】

BrdU取り込みアッセイの結果に基づき、タキソールをヒト卵巣癌細胞(図13A)またはヒト膵癌細胞(図13B)に単独で投与した場合、対照の未処理細胞と比較して細胞生存率に対するいかなる効果も観察されなかった。

【0292】

さらに、図13Aに示すように、dTCAPFペプチド(25 µg/ml)をヒト卵巣癌細胞に単独で投与した場合、対照の未処理細胞と比較して細胞生存率に対するいかなる効果も観察されなかった。

【0293】

しかし、dTCAPFペプチド(25 µg/ml)をタキソール(2 nM)と組み合わせてヒト卵巣癌細胞に投与すると、BrdU取り込みの約50%の減少が観察された(図

10

20

30

40

50

13A)。この効果は、BrdU取り込みが観察されなかった4nMの濃度のタキソールとdTCApF(25μg/ml)との組み合わせで増強された。

【0294】

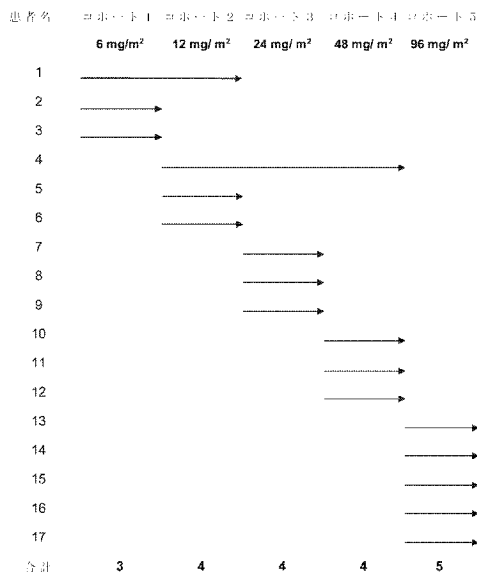
さらに、図13Bに示すように、dTCApFペプチド(25μg/ml)を単独でヒト膀胱癌細胞に投与した場合、対照の未処理細胞と比較して細胞生存率に対しわずかな効果のみが観察された。しかし、dTCApF(25μg/ml)をタキソール(2nM)と組み合わせてヒト卵巢癌細胞に投与すると、BrdU取り込みの約20%の減少が観察された(図13B)。この効果は、25μg/mlでのdTCApFと4nMの濃度でのタキソールの組み合わせを使用した場合より顕著であり、BrdU取り込みの40%を超える減少に達した。

【0295】

これらの結果は、タキソールの活性に対するdTCApFペプチドの相乗効果を示唆しており、それ自体は増殖にいかなる効果も有さず、それによって化学療法で使用されるタキソールの用量を減少させることができる。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、この相乗効果は、上で実証されるような、細胞死の促進に寄与するdTCApFによるERストレスの誘導により説明できる。

10

【図1】



【図2A】

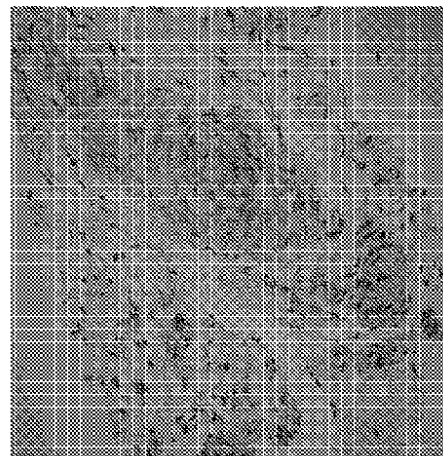


Fig. 2A

【図 2 B】

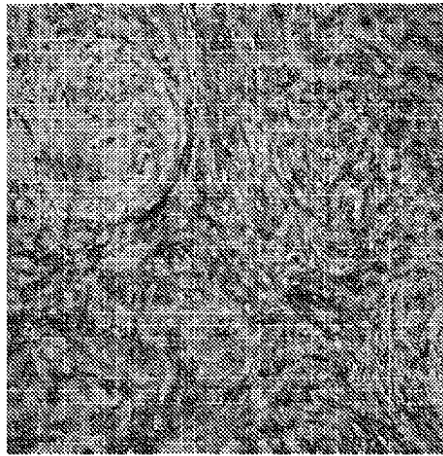
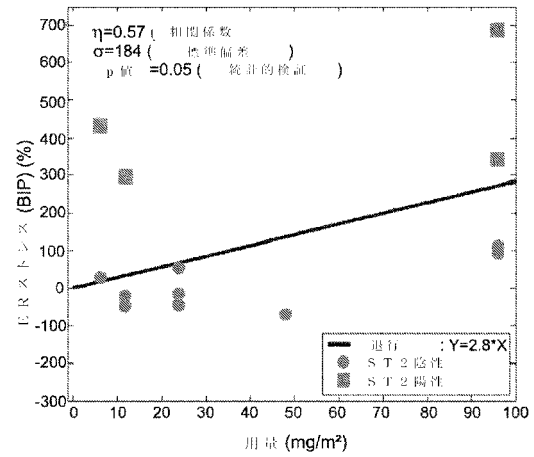
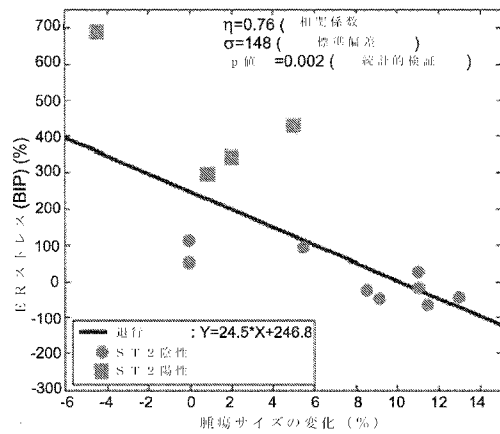


Fig. 2B

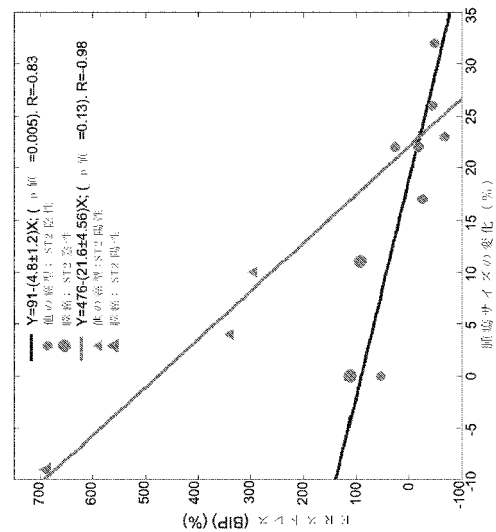
【図 3】



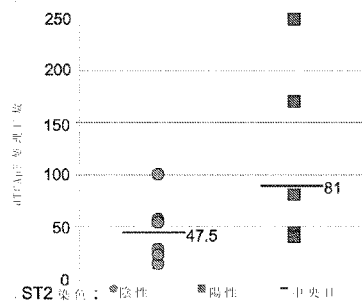
【図 4】



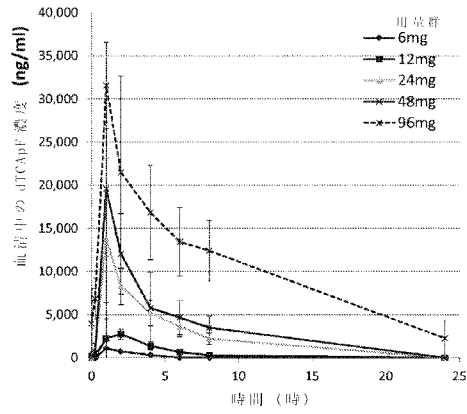
【図 6】



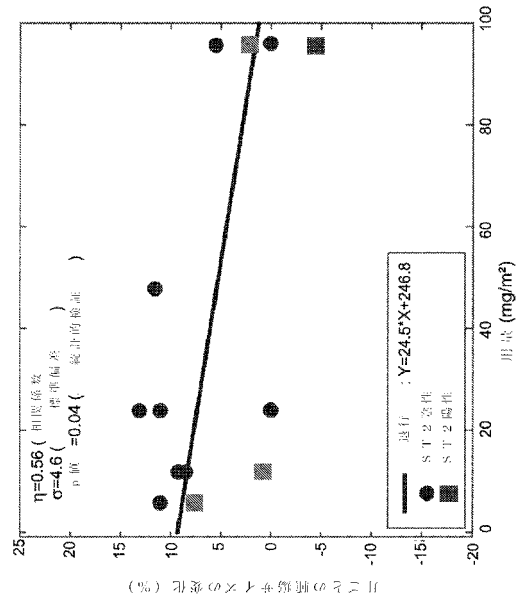
【図 5】



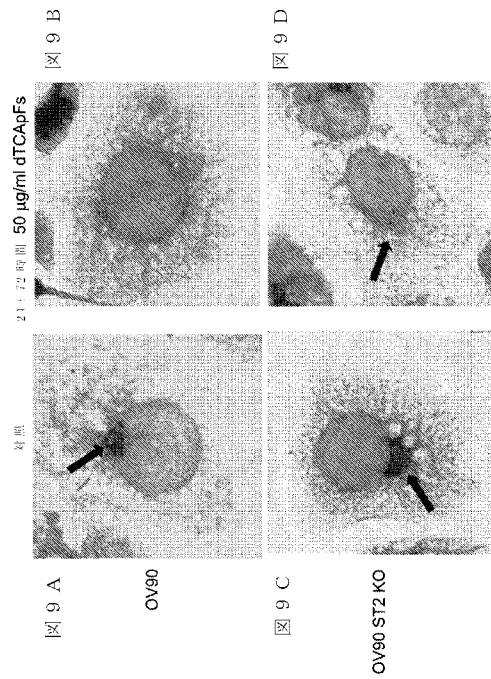
【図 7】



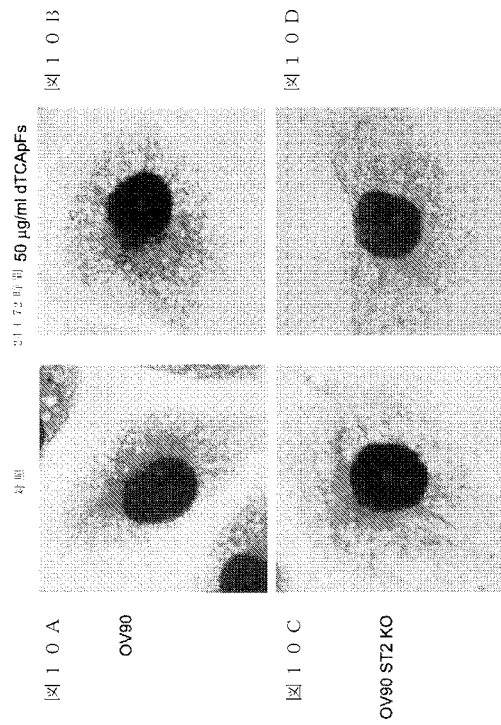
【図 8】



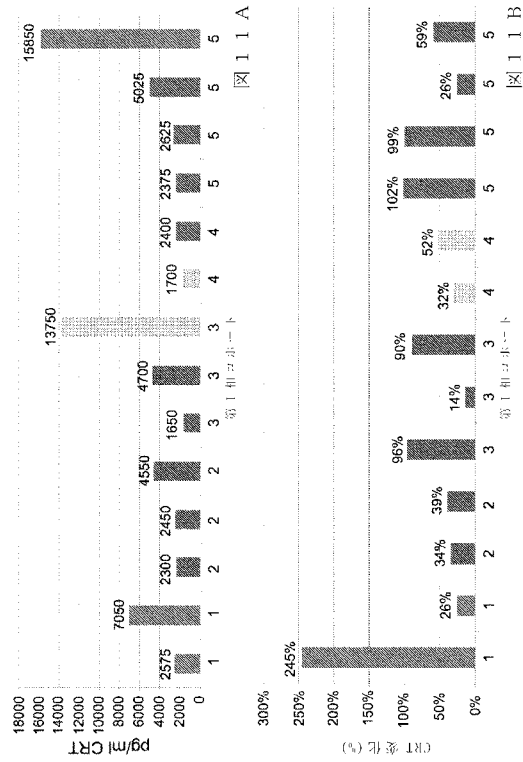
【図 9 A - D】



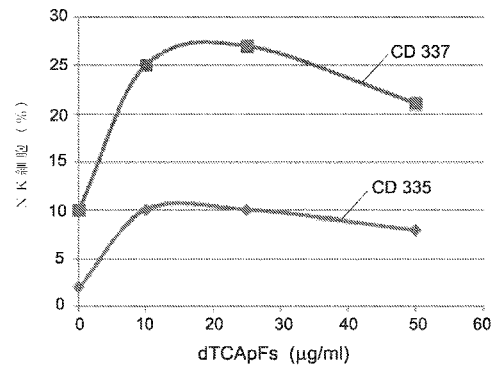
【図 10 A - D】



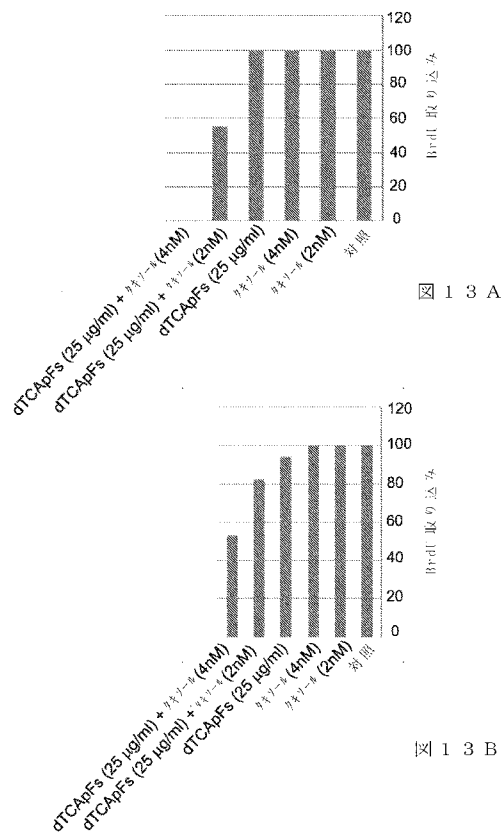
【図 1 1 A - B】



【図 1 2】



【図 1 3 A - B】



【配列表】

2019512669000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年10月23日(2018.10.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2019512669000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2017/050129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC (2017.01) G01N 33/53, C12Q 1/68, A61K 38/10, A61P 35/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (2017.01) G01N, C12Q, A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases consulted: THOMSON INNOVATION, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, REGISTRY, Google Scholar Search terms used: dTCAPFs, Nerofe, Sequence search, glucose-regulated protein 78, GRP78, binding immunoglobulin protein, BiP, HSPA5		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015083167 A1 IMMUNE SYSTEM KEY LTD[IL] 11 Jun 2005 (2005/06/11) examples, claims, pages 5, 22, 23	35-37,39-49
A	Lee, Eunjung, et al. "GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer." Cancer research 66.16 (2006): 7849-7853. DOI: 10.1158/0008-5472. Retrieved from the internet: http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/16/7849.full 31 Aug 2006 (2006/08/31) the whole document	1-34
A	Lee, Eunjung, et al. "GRP78 as potential predictor for breast cancer response to adjuvant taxane therapy." International journal of cancer 128.3 (2011): 726-731. DOI: 10.1002/ijc.25370. Retrieved from the internet: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.25370/full > 05 Apr 2010 (2010/04/05) the whole document	1-34
X	CN 102375061 A NAT POPULATION FAMILY PLANNING COMMITTEE SCIENCE TECHNOLOGY INST 14 Mar 2012 (2012/03/14) abstract	29,30,32,33
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 May 2017		Date of mailing of the international search report 09 May 2017
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jenusalem, 9695101, Israel Facsimile No. 972-2-5651616		Authorized officer HOROWITZ Anat Telephone No. 972-2-5651689

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2017/050129

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2017/050129

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2017/050129

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
WO 2015083167 A1	11 Jun 2005	WO 2015083167 A1	11 Jun 2015
		AU 2014358671 A1	02 Jun 2016
		CA 2931023 A1	11 Jun 2015
		CN 105939724 A	14 Sep 2016
		EP 3076988 A1	12 Oct 2016
		IL 245998 D0	31 Jul 2016
		JP 2017505755 A	23 Feb 2017
		KR 20160085361 A	15 Jul 2016
		US 2016303200 A1	20 Oct 2016
CN 102375061 A	14 Mar 2012	CN 102375061 A	14 Mar 2012
		CN 102375061 B	30 Jul 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2017/050129

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet):

* This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- | | | |
|---------------|--|---------------|
| Invention/s 1 | A method for predicting the response of a cancer patient to treatment with an isolated peptide comprising the amino acid sequence denoted by SEQ ID NO. 1, said method comprising determining the expression level of at least one endoplasmic reticulum (ER) stress marker in at least one biological sample of said patient as claimed in claim 1, a detecting agent specific for an ER stress marker for use in said method as claimed in claim 17, a kit as claimed in claim 29 | Claim/s 1-34 |
| Invention/s 2 | A combination therapy comprising an anti-cancer agent and an isolated peptide comprising the amino acid sequence denoted by SEQ ID NO. 1 as claimed in claim 35, a therapeutic kit comprising: (a) an anti-cancer agent; and (b) an isolated peptide comprising the amino acid sequence denoted by SEQ ID NO. 1, a method of treatment of cancer in a patient in need thereof, comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of an isolated peptide comprising the amino acid sequence denoted by SEQ ID NO. 1 a functional derivative thereof or a pharmaceutically acceptable salt of said isolated peptide in combination with an anti-cancer agent as claimed in claim 49. | Claim/s 35-49 |

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)		A 6 1 K 31/337	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		C 0 7 K 16/18	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TWE EN

(72)発明者 デバリー, ヨラム
イスラエル国, 9 7 4 6 0 2 4 エルサレム, ラモット ジー, ローゼンブラット ストリート
3 1 8 / 7

(72)発明者 サンドラー, ウジール
イスラエル国, 9 7 3 5 0 エルサレム, ネーヴェ ヤーコブ ストリート 5 0 8 / 2 4

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA19 BA08 BA18 BA23 CA59 NA05 ZB092 ZB261 ZB262
ZC032 ZC202
4C086 AA01 AA02 BA02 MA02 MA04 NA05 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA70 CA40 DA76 EA50

專利名称(译)	用于治疗内质网应激和癌症的联合疗法作为癌症治疗中的预测工具		
公开(公告)号	JP2019512669A	公开(公告)日	2019-05-16
申请号	JP2018540823	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)	免疫系统的关键有限公司		
发明人	デバリー,ヨラム サンドラー,ウジール		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/10 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 A61P37/04 A61K31/337 C07K16/18		
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		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D A61K38/10 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00.111 A61P37/04 A61K31/337 C07K16/18		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA59 4C084/NA05 4C084/ZB092 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC032 4C084/ZC202 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA02 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA70 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	62/291190 2016-02-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于评估癌症患者的治疗功效的方法，药剂和试剂盒。另外，本发明涉及用于降低在所治疗的癌症患者中治疗剂量的抗癌剂的给药标准的联合疗法。[选择图]无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公 表 特 許 公 報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2019-512669 (P2019-512669A) 令和1年5月16日 (2019. 5. 16)
(51) Int. Cl. G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2006. 01) A 6 1 K 3 8 / 1 0 (2006. 01) A 6 1 K 4 5 / 0 0 (2006. 01) A 6 1 P 3 5 / 0 0 (2006. 01) A 6 1 P 4 3 / 0 0 (2006. 01)	F I G 0 1 N 3 3 / 5 3 A 6 1 K 3 8 / 1 0 A 6 1 K 4 5 / 0 0 A 6 1 P 3 5 / 0 0 A 6 1 P 4 3 / 0 0 I 1 1 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く	テーマコード (参考) 4 C 0 8 4 4 C 0 8 6 4 H 0 4 5
(21) 出願番号 特願2018-540823 (P2018-540823) (86) (22) 出願日 平成29年2月2日 (2017. 2. 2) (85) 翻訳文提出日 平成30年9月25日 (2018. 9. 25) (86) 国際出願番号 PCT/IL2017/050129 (87) 国際公開番号 WO2017/134668 (87) 国際公開日 平成29年8月10日 (2017. 8. 10) (31) 優先権主張番号 62/291, 190 (32) 優先日 平成28年2月4日 (2016. 2. 4) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 507137416 イミューン システム キー リミテッド イスラエル国 9 7 4 6 0 エルサレム、 ローゼンブラット 3 1 8 / 7 ストリート (74) 代理人 100114775 弁理士 高岡 亮一 (74) 代理人 100121511 弁理士 小田 直 (74) 代理人 100202751 弁理士 岩堀 明代 (74) 代理人 100191086 弁理士 高橋 香元	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 癌治療における予測的ツールとしての小脳体ストレスおよび癌の治療用の併用療法		