

(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2016-503425

(P2016-503425A)

(43) 公表日 平成28年2月4日 (2016. 2. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47 Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-543121 (P2015-543121)	(71) 出願人	508285606
(86) (22) 出願日	平成25年11月19日 (2013. 11. 19)		ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメ
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月12日 (2015. 6. 12)		リカ, アズ リプレゼンテッド バイ
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/070813		ザ セクレタリー, デパートメント オ
(87) 国際公開番号	W02014/081728		ブ ヘルス アンド ヒューマン サービ
(87) 国際公開日	平成26年5月30日 (2014. 5. 30)		シーズ
(31) 優先権主張番号	61/774, 066		アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 9
(32) 優先日	平成25年3月7日 (2013. 3. 7)		2-7 6 6 0, ベセスダ, エグゼキュ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ティブ プールバード 6 0 1 1, スイ
(31) 優先権主張番号	61/728, 368		ート 3 2 5, エムエスシー 7 6 6 0
(32) 優先日	平成24年11月20日 (2012. 11. 20)		, オフィス オブ テクノロジー トラ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ンスファー ナショナル インスティチュ
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞特異的代替的 p 3 8 活性化経路の阻害剤および使用法

(57) 【要約】

Tリンパ球では、p 3 8 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (M A P K) は、チロシン 3 2 3 におけるリン酸化を伴う代替的経路を介して活性化され得る。T細胞においてチロシン 3 2 3 リン酸化 p 3 8 に結合しこれを阻害するために必要とされる増殖停止および DNA 損傷誘導性アルファ (G a d d 4 5 α) タンパク質の最小領域の同定が、本明細書で開示される。開示される G a d d 4 5 α ポリペプチドは、T細胞受容体刺激に応答したT細胞の増殖を阻害し、T h 1 細胞または T h 1 7 細胞へのT細胞の分化を阻害し、炎症促進性サイトカインの産生を阻害し、腫瘍形成および臓器がんなどの炎症性がんの増殖を低減させる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

25 アミノ酸長以下の単離された増殖停止およびDNA損傷誘導性アルファ（G a d d 4 5 α）ポリペプチドであって、前記ポリペプチドのアミノ酸配列は、L Q I H F T L I X A F C C E N（配列番号 1）を含み、式中、XはQまたはRである、ポリペプチド。

【請求項 2】

20 アミノ酸長以下である、請求項 1 に記載の単離された G a d d 4 5 α ポリペプチド。

【請求項 3】

アミノ酸配列 L Q I H F T L I Q A F C C E N（配列番号 2）または L Q I H F T L I R A F C C E N（配列番号 3）を含む、請求項 1 に記載の単離された G a d d 4 5 α ポリペプチド。

10

【請求項 4】

アミノ酸配列 L Q I H F T L I Q A F C C E N（配列番号 2）または L Q I H F T L I R A F C C E N（配列番号 3）からなる、請求項 1 に記載の単離された G a d d 4 5 α ポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の G a d d 4 5 α ポリペプチドおよび異種ペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項 6】

20

前記異種ペプチドが細胞透過性ペプチド（C P P）である、請求項 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

前記 C P P がポリアルギニンを含む、請求項 6 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

ポリアルギニンが、11 個のアルギニン（11 R）残基を含むまたは 11 個のアルギニン（11 R）残基からなる、請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

前記 G a d d 4 5 α ポリペプチドの N 末端と融合した 11 R からなる、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 10】

アミノ酸配列 L Q I H F T L I Q A F C C E N（配列番号 2）または L Q I H F T L I R A F C C E N（配列番号 3）と融合した 11 R からなる、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質および薬的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 12】

T 細胞受容体刺激に応答した T 細胞の増殖を阻害する、または T h 1 細胞もしくは T h 1 7 細胞への T 細胞の分化を阻害する、i n v i t r o または e x v i v o の方法であって、前記 T 細胞を、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質と接触させ、それによって前記 T 細胞の増殖を阻害するまたは前記 T 細胞の分化を阻害するステップを含む、方法。

40

【請求項 13】

前記 T 細胞が、被験体から単離されており、そして単離された前記 T 細胞を、前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質と接触させる、e x v i v o の方法である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

被験体において T 細胞受容体刺激に応答した T 細胞の増殖を阻害するため、または被験体において T h 1 細胞もしくは T h 1 7 細胞への T 細胞の分化を阻害するための医薬の調

50

製における、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質の使用。

【請求項 15】

T細胞媒介性および／または p38 媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害を有する被験体を処置するための医薬の調製における、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質の使用。

【請求項 16】

前記 T細胞媒介性および／または前記 p38 媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害が、多発性硬化症、関節リウマチまたは膵臓がんを含む、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質が、静脈内投与、腫瘍内投与または腹腔内投与によって投与される、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 18】

前記 T細胞媒介性および／または前記 p38 媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害が、膵臓がんを含み、そして前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質が、腫瘍内注射によって投与される、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 19】

被験体において腫瘍血管新生を阻害するための医薬の調製における、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質の使用。

【請求項 20】

前記腫瘍が膵臓腫瘍である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質が、腫瘍内投与によって投与される、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 22】

前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質が、約 20 μg～約 100 μg の用量で投与される、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 23】

前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質が、約 20 μg～約 100 μg の用量で投与される、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 24】

前記ポリペプチドまたは前記融合タンパク質が、約 20 μg～約 100 μg の用量で投与される、請求項 15 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2013年3月7日に出願された米国仮出願第 61/774,066号、および2012年11月20日に出願された米国仮出願第 61/728,368号（これらの両方は、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

【0002】

本開示は、T細胞特異的代替的 p38 活性化経路の阻害剤、ならびに p38 関連疾患、例えば炎症性がんを含む自己免疫性障害および炎症性障害の処置のためのその使用に関する。特に、本開示は、T細胞において p38 活性化を阻害することが可能な Gadd45 αポリペプチドに関する。

【背景技術】

【0003】

p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）は、環境ストレス後に放出される炎症促進性サイトカイン受容体の下流のシグナル伝達中間体である。このキナーゼは、関節リウマチおよび多発性硬化症を含む炎症性疾患および自己免疫性疾患において、

10

20

30

40

50

重要な役割を果たすことが公知である。p38MAPKファミリーには、4種の別々にコードされたメンバーp38 α 、p38 β 、p38 γ およびp38 δ が含まれる；p38 α 、p38 β およびp38 δ は、T細胞において発現されるが、p38 γ は、骨格筋において主に発現される（Jirmanovaら、Blood 118巻（12号）：3280～3289頁、2011年）。p38キナーゼは、遍在して発現され、スレオニン180およびチロシン182における二重リン酸化を生じる一連の逐次的リン酸化ステップによって全ての細胞において活性化される。しかし、T細胞では、その抗原受容体を介したT細胞の直接的刺激が、代替的p38経路の活性化を生じ、チロシン323上でのp38 α およびp38 β のリン酸化をもたらす（Salvadorら、Nat Immunol 6巻（4号）：396～402頁、2005年）。

10

【0004】

残基323におけるチロシンからフェニルアラニンへの置換（Y323F）を含有するp38 α およびp38 β を発現する遺伝子改変マウスが開発されており、in vivoでのT細胞特異的代替的p38活性化経路の役割をより良く理解するために特徴付けられてきた。このフェニルアラニン置換に起因して、改変形態のp38 α およびp38 β は、残基323においてリン酸化されることができず、代替的p38経路の活性化を防止する。この遺伝子改変マウスは、T細胞増殖、炎症促進性サイトカイン産生における顕著な低減、ならびに多発性硬化症および関節リウマチなどの自己免疫性疾患の動物モデルに対する低減された感受性を示す。これらのマウスの研究により、T細胞における代替的p38活性化経路が、T細胞活性化ならびに自己免疫性疾患および炎症性疾患の発症において重要な役割を果たすことが確立されている（Jirmanovaら、Blood 118巻（12号）：3280～3289頁、2011年）。

20

【0005】

Gadd45（増殖停止およびDNA損傷誘導性遺伝子（growth arrest and DNA damage-inducible gene））は、細胞増殖調節、分化およびアポトーシスにおいて役割を果たすタンパク質のファミリーである。哺乳動物細胞では、3種の異なるGadd45ファミリーメンバーが同定されている—Gadd45 α 、Gadd45 β およびGadd45 γ 。Gadd45 α 欠損マウスを使用して、以前の研究では、Gadd45 α が代替的p38活性化経路を阻害すること、およびGadd45 α の非存在がT細胞過剰増殖および自己免疫を生じることが示されている（Salvadorら、Nat Immunol 6巻（4号）：396～402頁、2005年）。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Jirmanovaら、Blood（2011年）118巻（12号）：3280～3289頁

【非特許文献2】Salvadorら、Nat Immunol（2005年）6巻（4号）：396～402頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

T細胞特異的代替的p38活性化経路を阻害することが可能な増殖停止およびDNA損傷誘導性アルファ（Gadd45 α ）ポリペプチドが、本明細書に提供される。一部の実施形態では、このGadd45 α ポリペプチドは、25アミノ酸長以下または20アミノ酸長以下であり、ヒトまたはマウスのGadd45 α の残基71～85を含む。一部の場合、これらのGadd45 α ポリペプチドは、合成または組換えポリペプチド（即ち、天然に存在しないポリペプチド）である。Gadd45 α ポリペプチドおよび細胞透過性ペプチドなどの異種ペプチドを含む融合タンパク質もまた提供される。本明細書に開示されるGadd45 α ポリペプチドおよび融合タンパク質を含む組成物がさらに提供される。

40

50

【0008】

T細胞を、本明細書に開示されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物と接触させることによって、T細胞受容体刺激に応答したT細胞の増殖を阻害するための方法もまた、提供される。T細胞を、本明細書に開示されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物と接触させることによって、Th1細胞またはTh17細胞へのT細胞の分化を阻害する方法が、さらに提供される。一部の実施形態では、この方法は、T細胞が被験体から単離されている、ex vivoの方法である。他の実施形態では、この方法は、ポリペプチド、融合タンパク質または組成物を被験体に投与するステップを含む、in vivoの方法である。

【0009】

T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害を有する被験体を処置する方法もまた、本開示によって提供される。一部の実施形態では、この方法は、T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害を有する被験体を選択するステップ、ならびに治療有効量の本明細書に開示されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物を被験体に投与するステップを含む。

【0010】

被験体において腫瘍血管新生を阻害する方法が、本明細書でさらに提供される。一部の実施形態では、この方法は、脾臓腫瘍などの腫瘍を有する被験体を選択するステップ、および治療有効量の本明細書に開示されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物をこの被験体に投与するステップを含む。

【0011】

被験体から取得された腫瘍試料中のチロシン323においてリン酸化されたp38 (p38 pY323) について陽性の腫瘍浸潤性T細胞の百分率を計算し；T細胞の少なくとも10%がp38 pY323について陽性の場合にこの被験体が予後不良を有することを決定することによって、膵管腺癌 (PDAC) を有すると診断された被験体の予後を決定する方法もまた、本明細書に提供される。一部の実施形態では、この予後不良は、生存時間における減少である。

【0012】

本開示の上記および他の目的、特徴および利点は、添付の図面を参照して進められる以下の詳細な説明からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、(11R)-71-85および(11R)-Ctrlの細胞取り込みを示すグラフである。精製されたCD4⁺T細胞を、37℃で2時間、FITC結合体化(11R)-71-85もしくは(11R)-Ctrlのいずれかで処理したか、または未処理のままにした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、FITC陽性についてフローサイトメトリーによって分析した。

【図2】図2は、(11R)-71-85によるp38代替的経路活性化の阻害を示す図である。精製されたp38タンパク質を、キナーゼ緩衝液中で活性Zap70と共に1時間インキュベートすることによって活性化した。次いで、(11R)-71-85または(11R)-Ctrlを添加し、30℃で30分間インキュベートした。次いで、1μgのATF2および10μCiの[³²P] ATPを添加し、30℃で45分間インキュベートした。リン酸化産物を、SDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロースメンブレンに移し、ホスフォイメージャーによって可視化した。

【図3】図3は、(11R)-71-85に応答したT細胞増殖を示すグラフである。T細胞を脾臓から精製し、異なる濃度の(11R)-71-85または対照ペプチド(11R)-Ctrlで処理した。次いで、細胞を洗浄し、抗CD3および抗CD28で2日間刺激し、最後に1μCi [³H]-チミジンでパルスして、14時間後に回収した。 [³H]-チミジン取り込みを、Wallac 1450 MicroBeta Liquid Scintillation Counterを用いて決定した。

10

20

30

40

50

【図4A】図4A～4Bは、 $CD4^{+}$ （図4A）および $CD8^{+}$ （図4B）T細胞による炎症性サイトカイン分泌を示す一連のフローサイトメトリープロットである。T細胞を脾臓から精製し、抗CD3+抗CD28で3日間刺激した。次いで、細胞を一晩未刺激にし、示された濃度の（11R）-71-85、対照ペプチド（11R）-CtrlまたはDMSO（ペプチドなし）で処理した。処理後、細胞を、抗CD3+抗CD28、またはモネンシンを補充したPMA+イオノマイシンのいずれかで再刺激した。サイトカイン発現を、フローサイトメトリーによって測定した。

【図4B】図4A～4Bは、 $CD4^{+}$ （図4A）および $CD8^{+}$ （図4B）T細胞による炎症性サイトカイン分泌を示す一連のフローサイトメトリープロットである。T細胞を脾臓から精製し、抗CD3+抗CD28で3日間刺激した。次いで、細胞を一晩未刺激にし、示された濃度の（11R）-71-85、対照ペプチド（11R）-CtrlまたはDMSO（ペプチドなし）で処理した。処理後、細胞を、抗CD3+抗CD28、またはモネンシンを補充したPMA+イオノマイシンのいずれかで再刺激した。サイトカイン発現を、フローサイトメトリーによって測定した。

【図5A】図5A～5Dは、（11R）-71-85がTh1分化を阻害することを示す一連のフローサイトメトリープロットである。ナイーブ $CD4^{+}$ T細胞を、 $2\mu M$ の（11R）-71-85または（11R）-Ctrlのいずれかで2時間処理し、洗浄後、細胞を、Th0条件（中立、図5Aおよび図5C）またはTh1極性化条件（図5Bおよび図5D）下で抗CD3+抗CD28で3日間刺激した。細胞を、再度同じ濃度の培地（第1の列）、（11R）-Ctrl（第2の列）または（11R）-71-85（第3の列）のいずれかで2時間処理し、ゴルジ阻害剤の存在下で4時間、PMA+イオノマイシンで再刺激した。Tbetおよびインターフェロン（IFN）- γ （炎症促進性応答に典型的なTh1細胞の指標）の発現を、フローサイトメトリーによって分析した。（11R）-Ctrl処理した細胞は、培地で処理した細胞と同様に応答したが、TbetおよびIFN γ の誘導は、（11R）-71-85による処理によって鈍化された。

【図5B】図5A～5Dは、（11R）-71-85がTh1分化を阻害することを示す一連のフローサイトメトリープロットである。ナイーブ $CD4^{+}$ T細胞を、 $2\mu M$ の（11R）-71-85または（11R）-Ctrlのいずれかで2時間処理し、洗浄後、細胞を、Th0条件（中立、図5Aおよび図5C）またはTh1極性化条件（図5Bおよび図5D）下で抗CD3+抗CD28で3日間刺激した。細胞を、再度同じ濃度の培地（第1の列）、（11R）-Ctrl（第2の列）または（11R）-71-85（第3の列）のいずれかで2時間処理し、ゴルジ阻害剤の存在下で4時間、PMA+イオノマイシンで再刺激した。Tbetおよびインターフェロン（IFN）- γ （炎症促進性応答に典型的なTh1細胞の指標）の発現を、フローサイトメトリーによって分析した。（11R）-Ctrl処理した細胞は、培地で処理した細胞と同様に応答したが、TbetおよびIFN γ の誘導は、（11R）-71-85による処理によって鈍化された。

【図5C】図5A～5Dは、（11R）-71-85がTh1分化を阻害することを示す一連のフローサイトメトリープロットである。ナイーブ $CD4^{+}$ T細胞を、 $2\mu M$ の（11R）-71-85または（11R）-Ctrlのいずれかで2時間処理し、洗浄後、細胞を、Th0条件（中立、図5Aおよび図5C）またはTh1極性化条件（図5Bおよび図5D）下で抗CD3+抗CD28で3日間刺激した。細胞を、再度同じ濃度の培地（第1の列）、（11R）-Ctrl（第2の列）または（11R）-71-85（第3の列）のいずれかで2時間処理し、ゴルジ阻害剤の存在下で4時間、PMA+イオノマイシンで再刺激した。Tbetおよびインターフェロン（IFN）- γ （炎症促進性応答に典型的なTh1細胞の指標）の発現を、フローサイトメトリーによって分析した。（11R）-Ctrl処理した細胞は、培地で処理した細胞と同様に応答したが、TbetおよびIFN γ の誘導は、（11R）-71-85による処理によって鈍化された。

【図5D】図5A～5Dは、（11R）-71-85がTh1分化を阻害することを示す一連のフローサイトメトリープロットである。ナイーブ $CD4^{+}$ T細胞を、 $2\mu M$ の（11R）-71-85または（11R）-Ctrlのいずれかで2時間処理し、洗浄後、細胞

10

20

30

40

50

胞を、Th 0 条件（中立、図 5 A および図 5 C）または Th 1 極性化条件（図 5 B および図 5 D）下で抗 CD 3 + 抗 CD 2 8 で 3 日間刺激した。細胞を、再度同じ濃度の培地（第 1 の列）、（1 1 R）- C t r l（第 2 の列）または（1 1 R）- 7 1 - 8 5（第 3 の列）のいずれかで 2 時間処理し、ゴルジ阻害剤の存在下で 4 時間、PMA + イオノマイシンで再刺激した。T b e t およびインターフェロン（I F N）- γ （炎症促進性応答に典型的な Th 1 細胞の指標）の発現を、フローサイトメトリーによって分析した。（1 1 R）- C t r l 処理した細胞は、培地で処理した細胞と同様に応答したが、T b e t および I F N γ の誘導は、（1 1 R）- 7 1 - 8 5 による処理によって鈍化された。

【図 6】図 6 A および 6 B は、全長 G a d d 4 5 α による Th 1 7 分化の阻害を示す図である。（図 6 A）WT マウスから精製された CD 4⁺ T 細胞を、4 μ M の T A T - C t r l、T A T - G 4 5 F L または T A T - G 4 5 Δ 1 0 のいずれかで処理し、プレート被覆した抗 CD 3 + 抗 CD 2 8 で 4 8 時間刺激し、示された転写因子についてプロットした。（図 6 B）ナイーブ CD 4⁺ T（CD 4⁺ CD 6 2 L^{h i}）細胞を、WT マウスから精製し、（A）と同様に T A T - C t r l または T A T - G 4 5 F L のいずれかで処理し、中立条件（Th 0）または Th 1 7 傾斜条件（1 0 n g / m l I L - 6 + 5 n g / m l T G F - β ）下で 4 8 時間刺激した。R o r c および I l 1 7 a の mRNA 発現レベルを評価した。 ≤ 0.05 の P 値を、統計的に有意な差異とみなし、アスタリスク（*）を付した。

【図 7】図 7 は、（1 1 R）- 7 1 - 8 5 による i n v i v o 処理後のインターフェロン調節因子 4（I r f 4）mRNA の発現を示すグラフである。（1 1 R）- 7 1 - 8 5（4 0 μ g）またはビヒクル対照を、野生型マウス中に腹腔内注射した。注射の 4 時間後、脾細胞を収集し、可溶性抗 CD 3 + 抗 CD 2 8 で 2 4 時間刺激した。I r f 4 mRNA 発現を、定量的リアルタイム PCR によって評価した。

【図 8】図 8 は、（1 1 R）- 7 1 - 8 5 の注射後の CD 4⁺ T 細胞における N f a t c 1 および I r f 4 の発現における低減を示す一連のグラフである。WT C 5 7 B L / 6 マウスに、5 0 μ g の DMSO、（1 1 R）- スクランプルまたは（1 1 R）- 7 1 - 8 5 を i . v . 注射し、総 T 細胞または CD 4⁺ T 細胞のいずれかを、異なる時点において脾臓から精製した。精製された細胞を、抗 CD 3 / CD 2 8 で i n v i t r o で 2 4 時間刺激し、示された転写因子の mRNA レベルを、定量的リアルタイム PCR によって決定した。

【図 9】図 9 A ~ 9 C は、（1 1 R）- 7 1 - 8 5 の注射が、樹立された P A N C 0 2 腫瘍の増殖を停止させることを示す図である。WT C 5 7 B L / 6 マウスに、 7.5×10^5 の P A N C 0 2 細胞を注射した。1 6 日後、マウスに、示された量の（1 1 R）- 7 1 - 8 5 または DMSO の腫瘍内注射を、1 日おきに受けさせた。（図 9 A）対照マウスおよび 4 0 μ g または 8 0 μ g の（1 1 R）- 7 1 - 8 5 を注射したマウスにおける、注射開始時（1 6 日目）から 4 2 日目までの腫瘍体積。4 2 日目現在のマウスの犠牲（s a c .）が示される。3 8 日目の対照（左）腫瘍および処置（右）腫瘍の（図 9 B）重量および（図 9 C）外観。

【図 1 0 A】図 1 0 A ~ 1 0 B は、（1 1 R）- 7 1 - 8 5 の腫瘍内注射が腫瘍浸潤性 T 細胞からの腫瘍壊死因子（T N F）- α 分泌を阻害することを実証する一連のフローサイトメトリープロットである。WT C 5 7 B L / 6 マウスに、 7.5×10^5 の P A N C 0 2 細胞を注射した。1 6 日後、マウスに、8 0 μ g の（1 1 R）- 7 1 - 8 5 または（1 1 R）- スクランプル（S c r）のいずれかを、1 週間にわたり 1 日おきに注射した。最後の腫瘍内注射の 2 4 時間後、腫瘍浸潤性細胞を回収し、ゴルジ阻害剤の存在下で 4 時間、PMA およびイオノマイシンで再刺激したか、または未刺激のままにした。サイトカイン（I L - 1 7 A および T N F α - 図 1 0 A ; I L - 1 0 および I F N γ - 図 1 0 B）の発現を、フローサイトメトリーによって決定した。

【図 1 0 B】図 1 0 A ~ 1 0 B は、（1 1 R）- 7 1 - 8 5 の腫瘍内注射が腫瘍浸潤性 T 細胞からの腫瘍壊死因子（T N F）- α 分泌を阻害することを実証する一連のフローサイトメトリープロットである。WT C 5 7 B L / 6 マウスに、 7.5×10^5 の P A N C

10

20

30

40

50

02細胞を注射した。16日後、マウスに、80 μ gの(11R)-71-85または(11R)-スクランブル(Scr)のいずれかを、1週間にわたり1日おきに注射した。最後の腫瘍内注射の24時間後、腫瘍浸潤性細胞を回収し、ゴルジ阻害剤の存在下で4時間、PMAおよびイオノマイシンで再刺激したか、または未刺激のままにした。サイトカイン(IL-17AおよびTNF α -図10A; IL-10およびIFN γ -図10B)の発現を、フローサイトメトリーによって決定した。

【図11】図11は、(11R)-71-85の腫瘍内注射が腫瘍血管新生を低減させることを示す一対の画像である。WT C57BL/6マウスに、 7.5×10^5 のPAN C02細胞を注射し、16日後に、80 μ gの(11R)-71-85または(11R)-スクランブルのいずれかを注射した。マウスに、2.5週間にわたり1日おきに腫瘍内注射を受けさせた。最後の注射の24時間後、腫瘍を収集し、ホルマリン中で固定し、腫瘍血管新生の指標である内皮マーカーCD31について染色した。

【図12】図12は、(11R)-71-85の腹腔内注射が、KPCマウス由来の腫瘍浸潤性T細胞からのTNF α 分泌を阻害することを示すフローサイトメトリープロットのパネルである。KPCマウスは、オンコジーン発現およびp53ハプロ不全に起因して膵臓がんを発症するように遺伝子操作されている。KPCマウスに、80 μ gの(11R)-71-85または(11R)-スクランブルのいずれかの腹腔内注射を、1カ月間にわたり1日おきに受けさせた。最後の注射の24時間後、腫瘍浸潤性細胞を回収し、ゴルジ阻害剤の存在下で4時間、PMAおよびイオノマイシンで再刺激したか、または未刺激のままにした。細胞内TNF α の発現を、フローサイトメトリーによって決定した。

【図13-1】図13A~13Dは、(11R)-71-85がKPCマウスにおいてPanINおよびがん形成を阻害することを示すグラフである。(図13A)KPCマウスを、6週齢の時点で致死未満で照射し、 10×10^6 の造血性骨髄細胞を詰め、生存をモニタリングした(1群当たりn=5; *p<0.05、ログランク検定)。(図13B)(A)と同様に処置したKPCマウスの正常管およびPanINの定量(1群当たりn=6)。(図13C)膵臓中の浸潤したCD4⁺T細胞を、(11R)-71-85または(11R)-Scrによる処置の後に、フローサイトメトリーによってTNF α およびIFN γ の発現について分析した。棒グラフは、示されたサイトカイン分泌細胞の平均百分率を示す(1群当たりn=8; *p<0.05、NS=有意でない、対応なし両側スチューデントt検定)。(図13D)KPCマウスを、(A)と同様に処置し、異なる腫瘍促進因子の発現を、定量的リアルタイムPCRによって、単離された膵臓上皮細胞において分析した(1群当たりn=6)。

【図13-2】図13A~13Dは、(11R)-71-85がKPCマウスにおいてPanINおよびがん形成を阻害することを示すグラフである。(図13A)KPCマウスを、6週齢の時点で致死未満で照射し、 10×10^6 の造血性骨髄細胞を詰め、生存をモニタリングした(1群当たりn=5; *p<0.05、ログランク検定)。(図13B)(A)と同様に処置したKPCマウスの正常管およびPanINの定量(1群当たりn=6)。(図13C)膵臓中の浸潤したCD4⁺T細胞を、(11R)-71-85または(11R)-Scrによる処置の後に、フローサイトメトリーによってTNF α およびIFN γ の発現について分析した。棒グラフは、示されたサイトカイン分泌細胞の平均百分率を示す(1群当たりn=8; *p<0.05、NS=有意でない、対応なし両側スチューデントt検定)。(図13D)KPCマウスを、(A)と同様に処置し、異なる腫瘍促進因子の発現を、定量的リアルタイムPCRによって、単離された膵臓上皮細胞において分析した(1群当たりn=6)。

【図14-1】図14A~14Cは、T細胞中のより高いp38の代替的発現が、ヒトPDACにおけるより短い生存および腫瘍新血管形成と関連することを示すグラフである。(図14A)ヒト膵臓中の、代替的経路によって活性化されたより低い(0~10%、n=153)対より高い($\geq 10\%$ 、n=40)レベルの腫瘍浸潤性T細胞との、患者の生存の相関(ログランク検定)。(図14B)ヒトPDAC切片を、CD3について染色し、高倍率視野当たりのCD3⁺細胞の絶対数を、p38で代替的に活性化されたより低い

10

20

30

40

50

(0~10%、n=153) およびより高い ($\geq 10\%$ 、n=40) レベルの腫瘍浸潤性 T 細胞の全ての試料において分析した (NS=有意でない、対応なし両側スチューデント t 検定)。(図 14C) p38 代替的経路のより低い (0~10%、n=10) 対より高い ($\geq 10\%$ 、n=10) 活性化を有する患者の試料の血管密度の検出のための、抗 CD31 抗体による免疫組織化学 (* p<0.05、対応なし両側スチューデント t 検定)。

【図 14-2】図 14A~14C は、T 細胞中のより高い p38 の代替的発現が、ヒト PDAC におけるより短い生存および腫瘍新血管形成と関連することを示すグラフである。

(図 14A) ヒト膵臓中の、代替的経路によって活性化されたより低い (0~10%、n=153) 対より高い ($\geq 10\%$ 、n=40) レベルの腫瘍浸潤性 T 細胞との、患者の生存の相関 (ログランク検定)。(図 14B) ヒト PDAC 切片を、CD3 について染色し、高倍率視野当たりの CD3⁺ 細胞の絶対数を、p38 で代替的に活性化されたより低い (0~10%、n=153) およびより高い ($\geq 10\%$ 、n=40) レベルの腫瘍浸潤性 T 細胞の全ての試料において分析した (NS=有意でない、対応なし両側スチューデント t 検定)。(図 14C) p38 代替的経路のより低い (0~10%、n=10) 対より高い ($\geq 10\%$ 、n=10) 活性化を有する患者の試料の血管密度の検出のための、抗 CD31 抗体による免疫組織化学 (* p<0.05、対応なし両側スチューデント t 検定)。

【発明を実施するための形態】

【0014】

配列表

添付の配列表に列挙されたアミノ酸配列は、米国特許法施行規則 1.822 条に規定されるように、アミノ酸のための標準的な 3 文字コードを使用して示される。配列表は、本明細書で参照によって組み込まれる、2013 年 10 月 29 日に作成された 2.61 KB の ASCII テキストファイルとして提出される。添付の配列表において：

配列番号 1 は、Gadd45 α の残基 71~85 に対応する Gadd45 α ポリペプチドのアミノ酸コンセンサス配列である。

【0015】

配列番号 2 は、ヒト Gadd45 α の残基 71~85 のアミノ酸配列である。

【0016】

配列番号 3 は、マウス Gadd45 α の残基 71~85 のアミノ酸配列である。

【0017】

配列番号 4 は、ヒト Gadd45 α タンパク質のアイソフォーム 1 (GenBank 受託番号 NP_001915) のアミノ酸配列である。

【0018】

詳細な説明

I. 略語

ATF2	活性化転写因子 2	
CIA	コラーゲン誘導性関節炎	
CPP	細胞透過性ペプチド	
EAE	実験的自己免疫性脳脊髄炎	
Gadd45 α	増殖停止および DNA 損傷誘導性アルファ	40
IFN	インターフェロン	
IL	インターロイキン	
IRF	インターフェロン調節因子	
i.v.	静脈内	
LT	リンホトキシン	
MAPK	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ	
MS	多発性硬化症	
NFATc1	活性化 T 細胞の核因子、細胞質、カルシニューリン依存性 1 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1)	50

P a n I N	膵臓上皮内新生物前駆病変
P D A C	膵管腺癌
R A	関節リウマチ
T C R	T細胞受容体
T G F	トランスフォーミング増殖因子
T h	Tヘルパー
T I L	腫瘍浸潤性リンパ球
T N F	腫瘍壊死因子。

【0019】

I I. 用語および方法

10

特記しない限り、技術用語は、従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般的用語の定義は、Benjamin Lewin、Genes V、Oxford University Press刊、1994年（ISBN 0-19-854287-9）；Kendrewら（編）、The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd. 刊、1994年（ISBN 0-632-02182-9）；およびRobert A. Meyers（編）、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc. 刊、1995年（ISBN 1-56081-569-8）において見出すことができる。

20

【0020】

本開示の種々の実施形態の概説を容易にするために、特定の用語の以下の説明が提供される：

投与する：本明細書で使用する場合、被験体に組成物（例えば、ポリペプチド）を投与するとは、組成物を被験体に与える、組成物を被験体に適用する、または組成物を被験体と接触させることを意味する。投与は、例えば、静脈内、髄腔内、外用、経口、皮下、筋内、腹腔内、筋内、または組織中、例えば腫瘍中への直接的注射などのいくつかの経路のいずれかによって達成され得る。

【0021】

自己免疫性疾患：身体中に通常存在する物質または組織に対して標的化された不適切な免疫応答から生じる疾患の型。自己免疫性疾患には、筋萎縮性側索硬化症、自己免疫性肝炎、セリアック病、クローン病（炎症性腸疾患）、1型糖尿病、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、多発性硬化症、重症筋無力症、乾癬、関節リウマチ、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスおよび潰瘍性大腸炎が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0022】

臨床転帰：疾患もしくは障害（例えば膵臓がん）に対する処置後または処置の非存在下での患者の健康状態を指す。臨床転帰には、がんの発生率における減少、死亡までの時間の長さにおける増加、死亡までの時間の長さにおける減少、生存機会における増加、死亡のリスクにおける増加、生存、無病生存期間、慢性疾患、転移、進行疾患または攻撃的疾患、疾患再発、死亡、および治療に対する好ましいまたは不十分な応答が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0023】

細胞透過性ペプチド（CPP）：共有結合または非共有結合相互作用によって連結された別のタンパク質または分子カーゴの細胞取り込みを促進するペプチド。CPPは一般に、エンドサイトーシスによって細胞中にカーゴを送達する。多くの場合、CPPは、荷電アミノ酸、例えばリシンもしくはアルギニンに富んだアミノ酸組成を有するか、または極性／荷電アミノ酸および非極性／疎水性アミノ酸の交互のパターンを含有する配列を有する。

【0024】

50

コラーゲン誘導性関節炎（C I A）モデル：関節リウマチの最も一般に使用される自己免疫モデル。このモデルは、疾患病因を研究するためおよび治療剤を検証するために使用され得る。自己免疫性関節炎は、フロイント完全アジュバントおよびI I型コラーゲン（C I I）のエマルジョンによる免疫化によって、このモデルにおいて誘導される。C I Iの取り扱いおよび調製のためのプロトコル、ならびにマウス系統、適切な免疫化技術の選択、ならびに関節炎の発生率および重症度の評価は、当該分野で公知である（例えば、Brandら、Nat Protoc 2巻（5号）：1269～1275頁、2007年を参照のこと）。典型的には、関節炎の最初の徴候は、免疫化の21～28日後に、このモデルにおいて出現する。C I Aの主な病理学的特徴には、多形核細胞および単核細胞の浸潤を伴う増殖性滑膜炎、パンヌス形成、軟骨分解、骨のびらん、ならびに線維症が含まれる。ヒトにおける関節リウマチと同様、炎症促進性サイトカイン、例えばTNF- α およびIL-1 β は、C I Aを有するマウスの関節炎関節において豊富に発現され、これらの分子の遮断は、疾患重症度の低減を生じる。

10

【0025】

接触させる：直接的な物理的会合状態に置かれること；固体形態および液体形態での両方を含む。

【0026】

生存における減少：本明細書で使用する場合、「生存における減少」とは、患者の死亡の前の時間の長さにおける減少、または患者にとっての死亡のリスクにおける増加を指す。生存における減少とは、膵臓がんと診断された患者の群などの群における、死亡までの平均時間における減少もまた指し得る。

20

【0027】

分化：ある細胞が特定の型の細胞へと発生するプロセスを指す。例えば、T細胞は、特定のT細胞サブタイプ、例えばTh1、Th2、Th17、T調節細胞または細胞傷害性T細胞へと発生し得る。特定のTヘルパーサブタイプへのT細胞の分化は、サイトカイン環境によって影響される（例えば、IFN- γ およびIL-12は、Th1分化を促進する；IL-4は、Th2分化を促進する；TGF- β 、IL-6、IL-21およびIL-23は、Th17分化を促進する）。

【0028】

実験的自己免疫性脳脊髄炎（E A E）：MSの動物モデル（例えば、Goldら、Brain 129巻：1953～1971頁、2006年を参照のこと）。E A E動物は、中枢神経系中に散在する組織傷害の特徴的なプラークを示す。プラークは、脳および脊髄中の神経細胞軸索を取り囲むミエリン鞘の破壊を引き起こす、リンパ球、形質細胞およびマクロファージによる神経組織の浸潤を示す。一部の場合には、E A Eは、ミエリンまたはミエリンの種々の構成要素のいずれかによる、マウス、ラット、モルモットまたは非ヒト霊長類などの感受性動物の免疫化によって誘導される。例えば、E A Eは、ミエリン鞘の構成要素、例えば、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質またはミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（M O G）による免疫化によって誘導され得る。E A Eは、自己免疫性C N S組織傷害の機構を研究するため、およびMSのための潜在的治療を試験するための、有用かつ広く受容されたモデルである。E A Eには、ドナー動物と同じ様式で誘導される「受動的E A E」もまた含まれるが、ドナー動物のリンパ節から回収された活性化T細胞の、ナイーブレシピエント動物への移入を伴う。

30

40

【0029】

融合タンパク質：少なくとも2つの異なる（異種）タンパク質またはペプチド由来のアミノ酸配列を含有するタンパク質。本明細書中の一部の例では、この融合タンパク質は、Gad45 α の一部および細胞透過性ペプチドを含む。融合タンパク質は、例えば、2つの異なる（異種）タンパク質の少なくとも一部分をコードする核酸配列から作出された核酸配列の発現によって、生成され得る。融合タンパク質を創出するために、これらの核酸配列は、同じリーディングフレーム中に存在すべきであり、内部終止コドンを含むべきではない。融合タンパク質、特に短い融合タンパク質は、化学合成によっても生成

50

され得る。

【0030】

増殖停止およびDNA損傷誘導性アルファ（Gadd45α）：その転写物レベルがストレスの多い増殖条件およびDNA損傷剤による処理の後に増加する、一群の遺伝子のメンバー。Gadd45αタンパク質は、MTK1/MEKK4キナーゼを介してp38/JNK経路の活性化を媒介することによって、環境ストレスに応答する。Gadd45αは、T細胞において代替的p38活性化経路を阻害することが以前に示されており、Gadd45αの非存在は、T細胞過剰増殖および自己免疫を生じる（Salvadorら、Nat Immunol 6巻（4号）：396～402頁、2005年）。Gadd45αのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、NCBIデータベースなどにおいて、（例えば、ヒトGadd45αについてGene ID 1647の下で）公に入手可能である。ヒトGadd45αについての例示的な配列は、配列番号4として本明細書に示される。

10

【0031】

異種：異種タンパク質または異種ポリペプチドとは、異なる供給源または種由来のタンパク質またはポリペプチドを指す。

【0032】

炎症性疾患または炎症性障害：炎症（即ち、感染、傷害、組織損傷、刺激作用などから生じる発赤、熱、腫脹および／または疼痛）の存在を特徴とする、任意の疾患、障害または状態。炎症性疾患の例には、自己免疫性疾患（例えば、炎症性腸疾患、関節リウマチおよびセリアック病）、喘息、血管炎、慢性前立腺炎、骨盤腹膜炎、がん、アテローム動脈硬化症、虚血性心臓疾患、再灌流傷害、移植片拒絶、サルコイドーシス、アレルギー性過敏症および糸球体腎炎が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0033】

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）経路：増殖、生存および遊走などの細胞プロセスを調節する細胞シグナル伝達経路。哺乳動物は、特異的MAPKK：ERK1/2についてはMEK1/2、p38についてはMKK3/6、JNKについてはMKK4/7（JNKK1/2）、およびERK5についてはMEK5、によって活性化される、少なくとも4つの別個に調節されるMAPKの群、細胞外シグナル関連キナーゼ（ERK）-1/2、Junアミノ末端キナーゼ（JNK1/2/3）、p38タンパク質（p38アルファ/ベータ/ガンマ/デルタ）およびERK5を発現する。各MAPKKは、1種より多いMAPKKKによって活性化され得、これが、MAPKシグナル伝達の複雑性および多様性を増加させる。各MAPK経路は、MAPキナーゼキナーゼキナーゼ（MAPKKK、MAP3K、MEKKまたはMKKK）、MAPキナーゼキナーゼ（MAPKK、MAP2K、MEKまたはMKK）およびMAPKを含む3段階のキナーゼカスケードを含有する。この3段階モジュールは、刺激に対する超高感度スイッチ様応答を媒介する。

30

【0034】

MAPKファミリー：マイトジェン、浸透圧ストレス、熱ショックおよび炎症促進性サイトカインを含む刺激の多様なアレイに対する細胞応答の指向に関与するセリン/スレオニンプロテインキナーゼのファミリー。MAPKは、例えば、増殖、遺伝子発現、分化、有糸分裂、細胞生存およびアポトーシスを調節する。MAPK/ERKファミリーのメンバーには、MAPK1（ERK2）、MAPK3（ERK1）、MAPK4（ERK4）、MAPK6（ERK3）、MAPK7（ERK5）、MAPK8（JNK1）、MAPK9（JNK2）、MAPK10（JNK3）、MAPK11（p38-β）、MAPK12（p38-γ）、MAPK13（p38-δ）およびMAPK14（p38-α）が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0035】

転移：がん細胞が、元の腫瘍から身体中の他の部位へ広がることを指す。

【0036】

50

多発性硬化症：患者の80～85%において再発寛解型疾病として存在する、時間および空間において散在性の中枢神経系白質障害として古典的に記載される自己免疫性疾患。診断は、脳および脊髄の磁気共鳴画像化（MRI）、体性感覚誘発電位の分析、ならびに増加した量の免疫グロブリンまたはオリゴクローナルバンドを検出するための脳脊髄液の分析によって行われ得る。MRIは、特に高感度の診断ツールである。MSの存在または進行を示すMRI異常には、T2強調およびフレアー画像上の高強度白質シグナル、活性病変のガドリニウム増強、低強度「ブラックホール」（グリオーシスおよび軸索病態を示す）、ならびにT1強調研究での脳萎縮症が含まれる。連続的MRI研究が、疾患の進行を示すために使用され得る。再発寛解型多発性硬化症（RRMS）は、発作間に完全回復または部分的回復を有し、疾患進行を有さない、明確に規定された急性発作を特徴とする、MSの臨床経過である。二次性進行型多発性硬化症（SPMS）は、最初は再発寛解型であり、次いで、変動する速度で進行型になり、おそらくは時折の再発および軽微な寛解を有する、MSの臨床経過である。一次性進行型多発性硬化症（PPMS）は、最初は進行型形態で存在する。

10

【0037】

新生物、悪性疾患、がんまたは腫瘍：新生物は、過剰な細胞分裂から生じる組織または細胞の異常な増殖である。新生物性増殖は、腫瘍を生じ得る。個体中の腫瘍の量は、腫瘍の数、体積または重量として測定され得る「腫瘍負荷」である。転移しない腫瘍は、「良性」と称される。周辺組織に浸潤しおよび／または転移し得る腫瘍は、「悪性」と称される。

20

【0038】

p38マイトジェン活性化プロテインキナーゼ：細胞ストレス、例えば、炎症性サイトカイン、紫外線照射、リポポリサッカリド、熱ショック、浸透圧ショックおよび増殖因子に対して応答性のMAPKのクラス。p38タンパク質は、細胞分化、アポトーシスおよびオートファジーを含むいくつかの細胞プロセスに関与する。4種のp38 MAPK、p38-α（MAPK14）、p38-β（MAPK11）、p38-γ（MAPK12）およびp38-δ（MAPK13）が同定されており；これらのうち、p38α、p38βおよびp38δは、T細胞において発現される。本明細書で使用する場合、「p38」とは、これらのp38タンパク質（p38α、p38β、p38γおよびp38δ）のうちいずれかを指す。特定の実施形態では、「p38」とは、p38α、p38βおよびp38δを含む、T細胞において発現される任意のp38タンパク質を指す。

30

【0039】

膵臓がん：悪性（がん）細胞が膵臓の組織において見出される疾患。外分泌がんとも呼ばれる。

【0040】

膵管腺癌（PDAC）：最も一般的な型の膵臓悪性疾患。PDACは、米国におけるがん死亡の第4位の原因であり、6カ月未満の平均生存期間を有する。この型のがんは、リンパ系および遠隔臓器への迅速な散在が可能である。PDACは、腫瘍がその周りに構築する生物学的障壁に起因して、他のがんから識別される。その疾患が初期段階において捕捉された患者は、長期生存のより良い機会を有するが、膵臓は、発癌性プロセスが開始したことをシグナル伝達するために、公知の手がかりをほとんど排出しない。従って、現在、初期検出試験は存在しない。

40

【0041】

薬学的に許容される担体：本明細書に開示される方法において有用な薬学的に許容される担体は、従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第15版（1975年）は、ポリペプチドの薬学的送達に適した組成物および製剤を記載している。

【0042】

一般に、担体の性質は、利用されている投与の特定の様式に依存する。例えば、非経口

50

製剤は通常、ビヒクルとして例えば水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどの薬学のおよび生理学的に許容される流体を含む、注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤またはカプセル剤形態）のために、従来の非毒性固体担体には、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムが含まれ得る。生物学的に中立の担体に加えて、投与される医薬組成物は、非毒性補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、防腐剤、塩、アミノ酸およびpH緩衝剤など、例えば、塩化ナトリウムもしくはリン酸ナトリウムまたは塩化カリウムもしくはリン酸カリウム、T w e e n、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含むし得る。

【0043】

10

ポリアルギニンまたはポリリシン：それぞれ、複数のアルギニン残基またはリシン残基のポリマー。本開示の文脈において、「ポリアルギニン」または「ポリリシン」は、それぞれ、約4～約20個のアルギニン残基またはリシン残基、例えば約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアルギニン残基またはリシン残基から構成されるペプチドを含む。本明細書の特定の実施形態では、ポリアルギニンペプチドは、6～12個のアルギニン残基を含み、またはポリリシンペプチドは、6～12個のリシン残基を含む。1つの非限定的な例では、ポリアルギニンペプチドは、11個のアルギニン（11R）残基からなる。

【0044】

20

ポリペプチド：モノマーがアミド結合によって一緒に接合されたアミノ酸残基であるポリマー。アミノ酸がアルファアミノ酸である場合、L-光学異性体またはD-光学異性体のいずれかが使用され得る。用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、本明細書で使用する場合、任意のアミノ酸配列を包含するよう意図され、糖タンパク質などの改変配列を含む。用語「ポリペプチド」は、具体的には、天然に存在するタンパク質、ならびに組換えによりまたは合成により産生されるタンパク質を網羅するよう意図される。用語「残基」または「アミノ酸残基」には、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチド中に組み込まれたアミノ酸に対する参照が含まれる。

【0045】

30

ポリペプチド中の保存的置換は、類似した生化学的特性を有する異なるアミノ酸残基について、タンパク質配列中の1つのアミノ酸残基の置換である。典型的には、保存的置換は、得られたポリペプチドの活性に対して、ほとんど～全く影響を有さない。例えば、1つまたは複数の保存的置換（例えば、1、2、3、4または5個以下の置換）を含むタンパク質またはペプチドは、野生型のタンパク質またはペプチドの構造および機能を保持する。ポリペプチドは、例えば部位特異的変異誘発またはPCRなどの標準的手順を使用して、そのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を操作することによって、1つまたは複数の保存的置換を含有するように生成され得る。一例では、かかるバリエーションは、抗体の交差反応性または免疫応答を誘導するその能力を試験することによって、容易に選択され得る。保存的置換の例を以下に示す。

【0046】

【表 1】

元の残基	保存的置換	
Ala	Ser	
Arg	Lys	
Asn	Gln, His	
Asp	Glu	
Cys	Ser	
Gln	Asn	
Glu	Asp	10
His	Asn; Gln	
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile; Val	
Lys	Arg; Gln; Glu	
Met	Leu; Ile	
Phe	Met; Leu; Tyr	
Ser	Thr	
Thr	Ser	
Trp	Tyr	
Tyr	Trp; Phe	
Val	Ile; Leu	20

【0047】

保存的置換は、一般に、（a）置換のエリア中のポリペプチド骨格の構造、例えば、シートまたはヘリックスのコンフォメーションとして、（b）標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖の嵩を維持する。

【0048】

タンパク質特性における最大の変化、例えば、（a）親水性残基、例えば、セリルもしくはスレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バシルもしくはアラニルの代わりに使用される（または、これらの疎水性残基によって置換される）変化；（b）システインもしくはプロリンが、任意の他の残基の代わりに使用される（または、任意の他の残基によって置換される）変化；（c）電氣的陽性側鎖を有する残基、例えば、リシル、アルギニルもしくはヒスタジル（h i s t a d y l）が、電氣的陰性残基、例えば、グルタミルもしくはアスパルチルの代わりに使用される（または、これらの電氣的陰性残基によって置換される）変化；または（d）嵩高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を有さない残基、例えばグリシンの代わりに使用される（または、側鎖を有さない残基によって置換される）変化を生じると一般に予測される置換は、非保存的である。

【0049】

疾患を予防、処置または改善する：疾患を「予防する」とは、疾患の完全な発症を阻害することを指す。「処置する」とは、疾患または病理学的状態の徴候または症状を、それが発症し始めた後に改善する治療的介入を指す。「改善する」とは、疾患、例えばT細胞媒介性および／またはp38媒介性の疾患または障害の徴候または症状の数または重症度における低減を指す。

【0050】

予後：特定の疾患または障害、例えば膵臓がん罹患した被験体についての臨床転帰の見込み。がんに関して、予後は、被験体が生存する（例えば、1年間、2年間、3年間、4年間または5年間）および／もしくは抗がん処置に応答する見込み（確率）、ならびに／または腫瘍が転移する見込み（確率）の表示である。一部の実施形態では、「予後不良」は、被験体が、特定の時点（例えば、1年間、2年間、3年間、4年間または5年間）までは生存しない可能性が50%よりも高いこと、および／または腫瘍が転移する可能性が50%よりも高いことを示す。いくつかの例では、予後不良は、被験体が生存しない可

能性が60%、70%、80%もしくは90%よりも高いこと、および／または腫瘍が転移する可能性が60%、70%、80%もしくは90%よりも高いことを示す。逆に、「予後良好」は、被験体が、特定の時点（例えば、1年間、2年間、3年間、4年間または5年間）まで生存する可能性が50%よりも高いこと、および／または腫瘍が転移しない可能性が50%よりも高いことを示す。いくつかの例では、予後良好は、被験体が生存する可能性が60%、70%、80%もしくは90%よりも高いこと、および／または腫瘍が転移しない可能性が60%、70%、80%もしくは90%よりも高いことを示す。

【0051】

精製された：用語「精製された」は、絶対的純度を必要としない；むしろ、この用語は、相対的用語として意図される。従って、例えば、精製されたペプチド調製物は、ペプチドまたはタンパク質が、そのペプチドまたはタンパク質が細胞内のその天然の環境にあるときよりも富化されている調製物である。一実施形態では、調製物は、タンパク質またはペプチドが、調製物の総ペプチド含量または総タンパク質含量の少なくとも50%を表すように、精製される。実質的な精製は、他のタンパク質または細胞構成要素からの精製を示す。実質的に精製されたタンパク質は、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または98%純粋である。従って、1つの特定の非限定的な例では、実質的に精製されたタンパク質は、他のタンパク質または細胞構成要素が90%存在しない。

【0052】

組換え：組換え核酸またはタンパク質は、天然に存在しない配列を有するもの、または配列の他の方法で分離された2つのセグメントの人工的組合せによって作製された配列を有するものである。この人工的組合せは、化学的合成によって、または例えば遺伝子操作技術による核酸の単離されたセグメントの人工的操作によって、達成される場合が多い。用語組換えは、天然の核酸分子またはタンパク質の一部分の付加、置換または欠失によってもっぱら変更された核酸およびタンパク質を含む。

【0053】

関節リウマチ：関節の慢性炎症を特徴とする全身性自己免疫性障害。この疾患は、肺、心臓および眼などの身体の他のエリアにおける組織の炎症もまた含み得る。

【0054】

試料（または生物学的試料）：被験体から取得された、ゲノムDNA、RNA、タンパク質またはそれらの組合せを含有する生物学的検体。例としては、末梢血、尿、唾液、組織生検材料（例えば脾臓組織）、外科的検体および剖検材料が含まれるがこれらに限定されない。一例では、試料には、脾臓腫瘍の生検材料、または脾臓組織などの正常組織（既知の疾患または障害に罹患していない被験体、例えばがんなしの被験体由来）の試料が含まれる。

【0055】

配列同一性／類似性：2つ以上の核酸配列間または2つ以上のアミノ酸配列間の同一性／類似性は、これらの配列間の同一性または類似性という観点で表される。配列同一性は、百分率同一性という観点で測定され得る；百分率が高くなるほど、配列はより同一になる。配列類似性は、百分率類似性という観点で測定され得る（これは、保存的アミノ酸置換を考慮に入れる）；百分率が高くなるほど、配列はより類似する。核酸配列またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準的な方法を使用してアラインされる場合に、比較的高い程度の配列同一性／類似性を有する。

【0056】

比較のための配列のアラインメントの方法は、当該分野で周知である。種々のプログラムおよびアラインメントアルゴリズムは、以下に記載されている：SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2巻：482頁、1981年；NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48巻：443頁、1970年；PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻：2444頁、1988年；HigginsおよびSharp、Gene、73巻：237～44頁、1988年；HigginsおよびSharp

10

20

30

40

50

、CABIOS 5巻：151～3頁、1989年；Corpetら、Nuc. Acids Res. 16巻：10881～90頁、1988年；Huangら Computer Appls. in the Biosciences 8巻、155～65頁、1992年；ならびにPearsonら、Meth. Mol. Biol. 24巻：307～31頁、1994年。Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403～10頁、1990年は、配列アラインメント方法および相同性計算の詳細な検討を示している。

【0057】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403～10頁、1990年)は、配列分析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと併せた使用のための、National Center for Biological Information (NCBI、National Library of Medicine、Building 38A、Room 8N805、Bethesda、MD 20894)を含むいくつかの供給源から、インターネット上で入手可能である。さらなる情報は、NCBIのウェブサイトにおいて見出すことができる。

【0058】

BLASTNは、核酸配列を比較するために使用されるが、BLASTPは、アミノ酸配列を比較するために使用される。2つの比較された配列が相同性を共有する場合、指定されたアウトプットファイルは、アラインされた配列との相同性の領域を示す。2つの比較された配列が相同性を共有しない場合、指定されたアウトプットファイルは、アラインされた配列を示さない。

【0059】

被験体：ヒトまたは非ヒト動物。一実施形態では、被験体は、T細胞媒介性またはp38媒介性の障害を有する。

【0060】

合成：実験室において人工的手段によって生成されることであり、例えば、合成ポリペプチドは、実験室において化学的に合成され得る。

【0061】

T細胞媒介性またはp38媒介性の障害：T細胞および／またはT細胞における代替的p38活性化経路の異常なまたは病理学的活性化に関連する、任意の疾患、障害または状態。T細胞媒介性またはp38媒介性の障害には、例えば、自己免疫性障害（例えば、多発性硬化症、関節リウマチおよび炎症性腸疾患であるが、これらに限定されない）および局所炎症性応答に関連する腫瘍（例えば、膵臓がん）を含む炎症性障害が含まれる。

【0062】

T細胞受容体（TCR）：主要組織適合複合体（MHC）分子に結合した抗原を認識することを担うTリンパ球の表面上で発現される分子。TCRは、アルファ（α）およびベータ（β）鎖またはガンマ（γ）およびデルタ（δ）鎖のいずれかからなるヘテロダイマーである。哺乳動物では、TCRは、4つのCD3鎖（γ鎖、δ鎖および2つのε鎖）およびζ鎖との複合体の一部として発現される。

【0063】

Tヘルパー（Th）細胞：他の免疫細胞を活性化または指向させるが、食作用活性の固有の細胞傷害性を有さない、T細胞の型。Th細胞は、B細胞抗体クラススイッチ、細胞傷害性T細胞の活性化および増殖、ならびに食作用細胞の殺菌活性において、重要な役割を果たす。Th1細胞およびTh2細胞は、それぞれマクロファージおよびB細胞と主に相互作用するTh細胞のサブセットである。Th1細胞は、インターフェロン（IFN）-γ、インターロイキン（IL）-2、リンホトキシン（LT）-αおよびトランスフォーミング増殖因子（TGF）-βを産生し、マクロファージの殺傷効率および細胞傷害性CD8⁺T細胞の増殖を最大化するように機能する。Th2細胞は、IL-4、IL-5

、I L-6、I L-13およびI L-25を産生し、そしてB細胞増殖を刺激し、B細胞クラススイッチを誘導し、中和抗体産生を増加させることによって機能する。T h 1 7細胞は、エフェクターサイトカインI L-17、I L-21およびI L-22を産生するTヘルパー細胞の別のサブセットである。T h 1 7細胞は、T h 1細胞およびT h 2細胞とは発生的に別個であるとみなされる。過剰な数のT h 1 7細胞は、いくつかの自己免疫性疾患において役割を果たすと考えられている。T G F- β 、I L-6、I L-21およびI L-23は、T h 1 7細胞へのT細胞の分化に関連している。

【0064】

治療有効量：疾患の進展を予防するのに十分な、または疾患の退縮を引き起こすのに十分な、または疾患、例えばT細胞媒介性もしくはp38媒介性の障害（例えば、自己免疫性疾患、例えば多発性硬化症もしくは関節リウマチ、または炎症性障害、例えばがん）によって引き起こされる症状を低減させることが可能な、用量。

【0065】

腫瘍血管新生：腫瘍における、新たな血管の形成および／または既存の血管の成長。

【0066】

特に説明しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。単数形の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」および「この(the)」は、文脈が明確に他を示さない限り、複数形の指示対象を含む。「AまたはBを含む」とは、A、またはB、またはAおよびBを含むことを意味する。核酸またはポリペプチドについて与えられる全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量値は、おおよそであり、記述のために提供されていることが、さらに理解されるべきである。本明細書に記載されるものと類似または等価な方法および材料が、本開示の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料は以下に記載される。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が参照によって組み込まれる。矛盾する場合、用語の説明を含む本明細書が支配する。さらに、材料、方法および実施例は、例示的であるに過ぎず、限定的である意図はない。

【0067】

I I I. G a d d 4 5 α ポリペプチド、融合タンパク質および組成物

T細胞においてp38に結合し代替的p38活性化経路を阻害するために必要とされる増殖停止およびDNA損傷誘導性アルファ(G a d d 4 5 α)タンパク質の最小領域の同定が、本明細書で開示される。特に、本明細書に開示されるG a d d 4 5 α ポリペプチドは、チロシン323リン酸化p38の酵素活性を阻害し、TCR活性化に応答した（しかし、古典的なp38活性化経路を活性化する刺激に応答したのではない）T細胞増殖を阻害し、T h 1細胞およびT h 1 7細胞へのT細胞の傾斜を阻害し、そして炎症促進性サイトカイン産生を低減させることが可能である。さらに、開示されたG a d d 4 5 α ポリペプチドの投与は、i n v i v oでT細胞特異的代替的p38活性化経路の活性化を阻害し、炎症性膵臓腫瘍の腫瘍形成および増殖を顕著に低減させる。

【0068】

T細胞特異的代替的p38活性化経路を阻害することが可能なG a d d 4 5 α ポリペプチドが、本明細書で提供される。一部の実施形態では、G a d d 4 5 α ポリペプチドは、25アミノ酸長以下または20アミノ酸長以下であり、G a d d 4 5 α の残基71～85を含む。一部の実施形態では、このG a d d 4 5 α は、ヒトまたはマウスのG a d d 4 5 α である。一部の例では、G a d d 4 5 α ポリペプチドのアミノ酸配列は、L Q I H F T L I X A F C C E N（配列番号1）を含み、式中、XはQまたはRである。特定の実施形態では、このG a d d 4 5 α ポリペプチドは、アミノ酸配列L Q I H F T L I Q A F C C E N（配列番号2）もしくはL Q I H F T L I R A F C C E N（配列番号3）を含むか、またはこれらからなる。一部の例では、このG a d d 4 5 α ポリペプチドは、ポリペプチド配列L Q I H F T L I Q A F C C E N（配列番号2）またはL Q I H F T L I R A F C C E N（配列番号3）中の1～5個、例えば、1、2、3、4または5個の保存的アミノ

10

20

30

40

50

酸置換を含有する。保存的アミノ酸置換は、当該分野で周知であり、例示的な置換が本明細書に記載される（例えば、用語および方法を参照のこと）。一部の実施形態では、この G a d d 4 5 α ポリペプチドは、合成または組換え（即ち、天然に存在しない）ポリペプチドである。

【0069】

G a d d 4 5 α ポリペプチドおよび異種タンパク質または異種ペプチドを含む融合タンパク質もまた、本明細書に提供される。一部の実施形態では、この異種ペプチドは、融合タンパク質の細胞取り込みを促進するペプチド、例えば、細胞透過性ペプチド（C P P）である。

【0070】

C P Pは、受容体非依存的様式で膜を横切るタンパク質、核酸または他の化合物の伝達を促進するポリペプチドのファミリーである（W a d i a および D o w d y, C u r r. P r o t e i n P e p t. S c i. 4 巻（2 号）：9 7 ～ 1 0 4 頁、2 0 0 3 年）。典型的には、C P Pは、細胞のエンドソームに連結された化合物の細胞取り込みを促進し得る短いポリカチオン性配列である。

【0071】

タンパク質または核酸を細胞中に送達するある特定のペプチドの能力は、膜を横切り転写を開始させることが示された、H I V がコードする T a t タンパク質について元々記載された。次いで、このタンパク質の形質導入に必要とされる T a t タンパク質の部分が、T a t ペプチドと称される 1 1 アミノ酸のポリペプチドのみであることが発見された。他のタンパク質と融合した場合、この T a t ペプチドは、組織培養物中の細胞中へ、1 5 ～ 1 2 0 k D a でサイズが変動するこれらのタンパク質を送達することが実証されている（F r a n k e l および P a b o, C e l l 5 5 巻（6 号）：1 1 8 9 ～ 9 3 頁、1 9 8 8 年；G r e e n および L o e w e n s t e i n, J. G e n. M i c r o b i o l. 1 3 4 巻（3 号）：8 4 9 ～ 5 5 頁、1 9 8 8 年；V i v e s ら, J. B i o l. C h e m. 2 7 2 巻（2 5 号）：1 6 0 1 0 ～ 7 頁、1 9 9 7 年；Y o o n ら, J. M i c r o b i o l. 4 2 巻（4 号）：3 2 8 ～ 3 5 頁、2 0 0 4 年；C a i ら, E u r. J. P h a r m. S c i. 2 7 巻（4 号）：3 1 1 ～ 9 頁、2 0 0 6 年）。

【0072】

他の公知の C P P には、以下が含まれる：D r o s o p h i l a アンテナペディアルホメオボックス（h o m e b o x）遺伝子の 3 番目のヘリックス由来の 1 6 アミノ酸ペプチド、P E N E T R A T I N（商標）（米国特許第 5, 8 8 8, 7 6 2 号；D e r o s s i ら, J. B i o l. C h e m. 2 6 9 巻：1 0 4 4 4 ～ 1 0 4 5 0 頁、1 9 9 4 年；S c h w a r z e ら, T r e n d s P h a r m a c o l. S c i. 2 1 巻：4 5 ～ 4 8 頁、2 0 0 0 年）；1 つのリシンを介して接続された、ニューロペプチドガラニンの N 末端由来の 1 2 アミノ酸および 1 4 アミノ酸タンパク質マストランから構成される 2 7 アミノ酸のキメラペプチド、トランスポートタン（米国特許第 6, 8 2 1, 9 4 8 号；P o o g a, F A S E B J. 1 2 巻：6 7 ～ 7 7 頁、1 9 9 8 年；H a w i g e r, C u r r. O p i n. C h e m. B i o l. 3 巻：8 9 ～ 9 4 頁、1 9 9 9 年）；単純ヘルペスウイルス（H S V）1 型の V P 2 2 タンパク質由来のペプチド（E l l i o t t ら, C e l l 8 8 巻：2 2 3 ～ 2 3 3 頁、1 9 9 7 年）；H S V-2 の U L-5 6 タンパク質（米国付与前公開第 2 0 0 6 / 0 0 9 9 6 7 7 号）；および H I V-1 の V p r タンパク質（米国付与前公開第 2 0 0 5 / 0 2 8 7 6 4 8 号）。さらに、例えばポリアルギニン、ポリリシンなどの、いくつかの人工的ペプチドもまた、C P P として機能することが公知である（例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 0 6 1 9 7 号；米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 2 4 3 3 1 号；米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 8 7 6 4 8 号；および米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 2 5 2 4 2 号；Z h i b a o ら, M o l. T h e r. 2 巻：3 3 9 ～ 3 4 7 頁、2 0 0 0 年；ならびに L a u s ら N a t u r e B i o t e c h n o l. 1 8 巻：1 2 6 9 ～ 1 2 7 2 頁、2 0 0 0 年を参照のこと

10

20

30

40

50

）。

【0073】

一部の例では、C P Pは、リシンまたはアルギニンなどの荷電アミノ酸に富んでいる。他の例では、C P Pは、極性／荷電アミノ酸および非極性／疎水性アミノ酸の交互のパターンを含有する。特定の非限定的な例では、C P Pは、ポリアルギニン、例えば、6、7、8、9、10、11または12個のアルギニン残基を含む。一例では、ポリアルギニンは、11個のアルギニン（11R）残基を含むまたは11個のアルギニン（11R）残基からなる。他の非限定的な例では、C P Pは、ポリリシン、例えば、6、7、8、9、10、11または12個のリシン残基を含む。

【0074】

他の実施形態では、この異種タンパク質またはペプチドは、タンパク質タグ、例えばアフィニティタグ（例えば、キチン結合タンパク質、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼまたはポリHis）、エピトープタグ（例えば、V5、c-myc、HAまたはFLAG）または蛍光タグ（例えば、GFPまたは別の周知の蛍光タンパク質）である。

【0075】

一実施形態では、この融合タンパク質は、Gadd45αポリペプチドのN末端と融合した11Rを含む。一部の例では、この融合タンパク質は、アミノ酸配列LQIHFTLLIQAFCCEN（配列番号2）もしくはLQIHFTLLIRAFCCEN（配列番号3）と融合した11Rを含むか、またはこれらからなる。

【0076】

本明細書に開示されるGadd45αポリペプチドまたはGadd45α融合タンパク質を含む組成物が、本明細書でさらに提供される。一部の実施形態では、この組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0077】

IV. Gadd45αポリペプチドの使用

p38と相互作用する最小領域（Gadd45αの残基71～85）を含むGadd45αポリペプチドは、*in vitro*、*ex vivo*および*in vivo*でT細胞特異的代替的p38活性化経路の活性化を阻害することが可能であることが、本明細書に開示される。特に、本明細書に開示されるGadd45αポリペプチドは、TCR活性化に応答したT細胞増殖を阻害し、Th1細胞およびTh17細胞へのT細胞の傾斜を阻害し、そして炎症促進性サイトカイン産生を低減させる。開示されたGadd45αポリペプチドの投与は、腫瘍形成および炎症性膵臓腫瘍の増殖を顕著に低減させることもまた、本明細書で実証される。さらに、本明細書に開示されるデータは、チロシン323リン酸化（phosphorylated）p38について陽性の腫瘍浸潤性T細胞の検出が、膵管腺癌（PDAC）を有すると診断された患者の予後を決定するために使用され得ることを実証している。

【0078】

T細胞の増殖を阻害する方法、例えば、TCR刺激に応答したT細胞の増殖を阻害する方法が、本明細書に提供される。一部の実施形態では、この方法は、T細胞を、本明細書に開示されたGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物と接触させ、それによってT細胞の増殖を阻害するステップを含む。一部の例では、T細胞の増殖を阻害する方法は、T細胞が、被験体から単離されており、この単離されたT細胞を、このGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物と接触させる、*ex vivo*の方法である。他の例では、T細胞の増殖を阻害する方法は、このGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物を被験体に投与するステップを含む、*in vivo*の方法である。特定の例では、この被験体は、T細胞の異常な増殖および／または代替的p38経路の異常な活性化を示す。例えば、この被験体は、自己免疫性または炎症性の疾患または障害、例えば、多発性硬化症、関節リウマチまたはがん、例えば膵臓がん（例えば、PDAC）に罹患している被験体であり得る。

【0079】

一部の例では、T細胞増殖は、対照（例えば、未処理のT細胞）と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%または少なくとも80%阻害される。例えば、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン組み込みを測定すること、またはT細胞特異的マーカーに基づく蛍光活性化細胞選別を使用してT細胞集団を測定することを含む、T細胞の増殖を検出および定量する方法が、当該分野で周知である。

【0080】

Th1細胞またはTh17細胞へのT細胞の分化を阻害する方法が、さらに提供される。一部の実施形態では、この方法は、T細胞を、本明細書に開示されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物と接触させ、それによってT細胞の分化を阻害するステップを含む。一部の例では、T細胞の分化を阻害する方法は、T細胞が、被験体から単離されており、この単離されたT細胞を、このGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物と接触させる、*ex vivo*の方法である。他の例では、T細胞の分化を阻害する方法は、このGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物を被験体に投与するステップを含む、*in vivo*の方法である。特定の例では、この被験体は、T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害、例えば多発性硬化症、関節リウマチまたはがん（例えば、膵臓がん）を有する被験体である。

【0081】

一部の例では、Th1細胞またはTh17細胞へのT細胞の分化は、対照（例えば、未処理のT細胞）と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%または少なくとも80%阻害される。特定のTヘルパー（Th）サブタイプへのT細胞の分化を評価するための方法は、実施例に記載される方法を含め、当該分野で周知である。例えば、Thサブタイプは、サイトカイン発現プロファイルまたはサブタイプ特異的転写因子発現を評価することによって決定され得る。Th1細胞は、IFN- γ 、IL-2およびLT- α を含むサイトカイン、ならびに転写因子T-betの発現を特徴とする；Th2細胞は、典型的には、IL-4、IL-5、IL6およびIL-13を産生する；ならびにTh17細胞は、IL-17、IL-21およびIL-22を主に発現する（ZhuおよびPaul、Blood 112巻（5号）：1557～1568頁、2008年）。

【0082】

T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害を有する被験体を処置する方法もまた、本明細書に提供される。一部の実施形態では、この方法は、T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害を有する被験体を選択するステップ、ならびに治療有効量の本明細書に開示されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物を被験体に投与し、それによってこの被験体を処置するステップを含む。このT細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害は、T細胞および／またはT細胞における代替的p38活性化経路の異常なまたは病理学的活性化に関連する、任意の疾患、障害または状態である。一部の実施形態では、このT細胞媒介性および／またはp38媒介性の障害は、自己免疫性障害、例えば、筋萎縮性側索硬化症、自己免疫性肝炎、セリアック病、クローン病（炎症性腸疾患）、1型糖尿病、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、多発性硬化症、重症筋無力症、乾癬、関節リウマチ、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスおよび潰瘍性大腸炎であるが、これらに限定されない。他の実施形態では、このT細胞媒介性および／またはp38媒介性の障害は、炎症性障害、例えば、喘息、血管炎、慢性前立腺炎、骨盤腹膜炎、がん、アテローム動脈硬化症、虚血性心臓疾患、再灌流傷害、移植片拒絶、サルコイドーシス、アレルギー性過敏症および糸球体腎炎であるがこれらに限定されない。一部の例では、このT細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害は、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患または膵臓がん（例えばP

DACであるがこれに限定されない)を含む。

【0083】

被験体において腫瘍血管新生を阻害する方法が、本明細書でさらに提供される。一部の実施形態では、この方法は、腫瘍を有する被験体を選択するステップ、および治療有効量の本明細書に開示されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物をこの被験体に投与するステップを含む。一部の例では、この腫瘍は、膵臓腫瘍、例えばPDAC腫瘍である。一部の例では、投与は、腫瘍内注射を含む。非限定的な例では、腫瘍血管新生は、対照と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%または少なくとも80%阻害される。腫瘍血管新生を検出および評価する方法は、当該分野で公知である。例えば、腫瘍血管新生は、内皮マーカー、例えばCD31またはCD34について腫瘍細胞を染色することによって評価され得る。

10

【0084】

治療タンパク質を投与する方法は、当該分野で周知であり、全身投与および局所投与の両方が含まれる。一部の実施形態では、このGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物は、静脈内投与または腹腔内投与される。被験体が腫瘍を有する一部の例では、このGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物は、腫瘍中に直接投与される。単回または複数回の投与（例えば、2、3、4、5回またはそれより多い投与）は、例えば、処置される疾患の型および重症度、ならびに被験体の全体的な健康に依存して、利用され得る。

20

【0085】

被験体に投与されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物の量は、一般に、p38の活性化を少なくとも部分的に阻害するのに十分な量および／または疾患の1つもしくは複数の徴候もしくは症状を処置もしくは改善するのに十分な量である。治療有効量のGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物は、医師によって決定され得る。一部の実施形態では、治療有効量の本明細書に開示されるGadd45αポリペプチド、融合タンパク質または組成物は、臨床医または他の有資格の観察者によって留意されるような、1つもしくは複数の症状の自覚的軽減、または客観的に同定可能な改善のいずれかを提供する量である。一部の例では、このGadd45αポリペプチドまたは融合タンパク質は、約20μg～約100μg、例えば、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約80、約90または約100μgの用量で投与される。

30

【0086】

被験体から取得された腫瘍試料中のチロシン323リン酸化p38（p38 pY323）について陽性の腫瘍浸潤性T細胞の百分率を計算し；T細胞の少なくとも10%がp38 pY323について陽性の場合にこの被験体が予後不良を有することを決定することによって、PDACを有すると診断された被験体の予後を決定する方法もまた、本明細書に提供される。

【0087】

予後不良とは、任意の陰性の臨床転帰を指す。例えば、一部の実施形態では、予後不良は、生存時間における減少である。一部の実施形態では、予後不良は、がんの転移の見込みにおける増加である。他の実施形態では、予後不良とは、治療、例えば放射線療法または化学療法に応答できないことを指す。特定の実施形態では、この予後不良は、生存時間における減少である。一部の例では、予後不良は、被験体が、1年未満生存する可能性が高いことを示す。

40

【0088】

腫瘍試料中のチロシン323リン酸化p38を検出するための方法は、当該分野で周知であり、例えば、チロシン323リン酸化p38に特異的な抗体を使用した免疫組織化学的検出が含まれる（以下の実施例5を参照のこと）。

【0089】

50

V. さらなる実施形態

1. 25アミノ酸長以下の単離された増殖停止およびDNA損傷誘導性アルファ（G a d d 4 5 α）ポリペプチドであって、このポリペプチドのアミノ酸配列は、L Q I H F T L I X A F C C E N（配列番号1）を含み、式中、XはQまたはRである、ポリペプチド。

【0090】

2. 20アミノ酸長以下である、1の単離されたG a d d 4 5 αポリペプチド。

【0091】

3. アミノ酸配列L Q I H F T L I Q A F C C E N（配列番号2）またはL Q I H F T L I R A F C C E N（配列番号3）を含む、1または2の単離されたG a d d 4 5 αポリペプチド。

10

【0092】

4. アミノ酸配列L Q I H F T L I Q A F C C E N（配列番号2）またはL Q I H F T L I R A F C C E N（配列番号3）からなる、1または2の単離されたG a d d 4 5 αポリペプチド。

【0093】

5. 1～4のいずれか1つのG a d d 4 5 αポリペプチドおよび異種ペプチドを含む、融合タンパク質。

【0094】

6. 異種ペプチドが細胞透過性ペプチド（C P P）である、5の融合タンパク質。

20

【0095】

7. C P Pがポリアルギニンを含む、6の融合タンパク質。

【0096】

8. ポリアルギニンが、11個のアルギニン（11R）残基を含むまたは11個のアルギニン（11R）残基からなる、7の融合タンパク質。

【0097】

9. G a d d 4 5 αポリペプチドのN末端と融合した11Rからなる、8の融合タンパク質。

【0098】

10. アミノ酸配列L Q I H F T L I Q A F C C E N（配列番号2）またはL Q I H F T L I R A F C C E N（配列番号3）と融合した11Rからなる、8の融合タンパク質。

30

【0099】

11. 1～10のいずれか1つのポリペプチドまたは融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【0100】

12. T細胞受容体刺激に応答したT細胞の増殖を阻害する、またはTh1細胞もしくはTh17細胞へのT細胞の分化を阻害する、in vitroまたはin vivoの方法であって、このT細胞を、1～11のいずれか1つのポリペプチド、融合タンパク質または組成物と接触させ、それによってT細胞の増殖を阻害するステップを含む、方法。

40

【0101】

13. T細胞が、被験体から単離されており、この単離されたT細胞を、ポリペプチドまたは融合タンパク質と接触させる、ex vivoの方法である、12の方法。

【0102】

14. 被験体においてT細胞受容体刺激に応答したT細胞の増殖を阻害する方法、または被験体においてTh1細胞もしくはTh17細胞へのT細胞の分化を阻害する方法であって、1～11のいずれか1つのポリペプチド、融合タンパク質または組成物を被験体に投与するステップを含む、方法。

【0103】

50

15. T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害を有する被験体を処置する方法であって、T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害を有する被験体を選択するステップ、ならびに治療有効量の1～11のいずれか1つのポリペプチド、融合タンパク質または組成物を被験体に投与し、それによって被験体を処置するステップを含む、方法。

【0104】

16. T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害が、多発性硬化症、関節リウマチまたは膵臓がんを含む、16の方法。

【0105】

17. 投与が静脈内投与、腫瘍内投与または腹腔内投与を含む、15または16の方法。

【0106】

18. T細胞媒介性および／またはp38媒介性の自己免疫性障害または炎症性障害が、膵臓がんを含み、投与が腫瘍内注射を含む、17の方法。

【0107】

19. 被験体において腫瘍血管新生を阻害する方法であって、腫瘍を有する被験体を選択するステップ、および治療有効量の1～11のいずれか1つのポリペプチド、融合タンパク質または組成物を被験体に投与し、それによって被験体において腫瘍血管新生を阻害するステップを含む、方法。

【0108】

20. 腫瘍が膵臓腫瘍である、19の方法。

【0109】

21. 投与が腫瘍内投与を含む、19または20の方法。

【0110】

22. ポリペプチドまたは融合タンパク質が、約20μg～約100μgの用量で投与される、19の方法。

【0111】

23. ポリペプチドまたは融合タンパク質が、約20μg～約100μgの用量で投与される、14の方法。

【0112】

24. ポリペプチドまたは融合タンパク質が、約20μg～約100μgの用量で投与される、15の方法。

【0113】

25. 膵管腺癌（PDAC）を有すると診断された被験体の予後を決定する方法であって：

被験体から取得された腫瘍試料中のチロシン323リン酸化p38（p38 pY323）について陽性の腫瘍浸潤性T細胞の百分率を計算するステップ；および

T細胞の少なくとも10%がp38 pY323について陽性の場合にこの被験体が予後不良を有することを決定するステップを含む、方法。

【0114】

26. 予後不良が、生存時間における減少である、25の方法。

【0115】

以下の実施例は、ある特定の特別な特徴および／または実施形態を例示するために提供される。これらの実施例は、記載される特定の特徴または実施形態に本開示を限定すると解釈すべきでない。

【実施例】

【0116】

実施例1：Gadd45αポリペプチドによる代替的p38活性化経路のin vitro阻害

10

20

30

40

50

この実施例は、細胞透過性ペプチド（11R）と融合したGadd45αの71～85ポリペプチドおよびT細胞特異的代替的p38活性化経路を遮断するその能力を記載する。p38に結合することが可能なGadd45αの最小領域を、Gadd45αの種々の短縮された一部分をGSTと融合させ、この産物を使用してin vitroで組換えp38αをプルダウンすることによって同定した。71～85断片は、p38αならびに全長タンパク質をプルダウンした。さらに、全長Gadd45αからの71～80の欠失は、p38αをプルダウンできなくした。

【0117】

（11R）－71－85

Gadd45αの71～85ペプチドの細胞透過性形態を生成するために、11個のアルギニン残基をN末端に付加して、本明細書で（11R）－71－85と呼ばれる融合タンパク質を生成した。（11R）－71－85の細胞透過性を、精製されたCD4⁺T細胞を使用して試験した。（11R）－71－85および11個のアルギニン残基と融合させた対照ペプチド（（11R）－Ctrlと呼ぶ）を、FITCに結合体化した。精製されたCD4⁺T細胞を、37℃で2時間、FITC結合体化（11R）－71－85もしくは（11R）－Ctrlのいずれかで処理したか、または未処理のままにした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、FITC陽性についてフローサイトメトリーによって分析した。図1に示すように、両方の11R－結合体化ペプチドが、T細胞によって取り込まれた。

【0118】

p38代替的経路のin vitro阻害

（11R）－71－85が代替的p38活性化経路をin vitroで阻害できるかどうかを試験するために、（11R）－71－85の存在下および非存在下で、アッセイを実施して、活性化p38の標的である活性化転写因子2（ATF2）のリン酸化を検出した。精製されたp38タンパク質を、キナーゼ緩衝液中で活性Zap70との1時間のインキュベーションによって活性化した。次いで、（11R）－71－85（0.2、0.5、1.0、2.0または4.0μg）または（11R）－Ctrl（4.0μg）を添加し、30℃で30分間インキュベートした。1μgのATF2および10μCiの[³²P]ATPを添加し、30℃で45分間インキュベートした。リン酸化産物を、SDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロースメンブレンに移し、ホスフォイメージャーによって可視化した。図2に示すように、（11R）－71－85とのインキュベーションは、ATF2のリン酸化における減少をもたらしたが、（11R）－Ctrlとのインキュベーションはこれをもたらさなかった。さらに、ATF2リン酸化における減少は、（11R）－71－85の用量に依存した。これらの結果は、（11R）－71－85が代替的p38活性化経路を阻害することが可能であることを実証している。

【0119】

T細胞増殖および炎症性サイトカイン産生の阻害

（11R）－71－85がT細胞増殖および炎症性サイトカイン産生を阻害する能力もまた評価した。T細胞を脾臓から精製し、異なる濃度（0.2、0.5、1.0、2.0または4.0μg）の（11R）－71－85または対照ペプチド（11R）－Ctrlで処理した。次いで、細胞を洗浄し、抗CD3および抗CD28で2日間刺激し、最後に1μCi[³H]－チミジンでパルスして、14時間後に回収した。[³H]－チミジン取り込みを、Wallac 1450 MicroBeta Liquid Scintillation Counterを用いて決定した。図3に示すように、（11R）－71－85による処理は、T細胞受容体（TCR）刺激に応答したT細胞増殖における用量依存的な減少をもたらしたが、（11R）－Ctrlによる処理はこれをもたらさなかった。

【0120】

サイトカイン産生を評価するために、T細胞を脾臓から精製し、抗CD3＋抗CD28で3日間刺激した。次いで、細胞を一晩未刺激にし、1μMもしくは2μMの（11R）

10

20

30

40

50

ー 7 1 - 8 5 もしくは対照ペプチド (1 1 R) - C t r l で、または D M S O のみで処理した。処理後、細胞を、抗 C D 3 + 抗 C D 2 8 (T C R および代替的 p 3 8 経路を刺激するため)、またはモネンシンを補充した P M A + イオノマイシン (古典的 p 3 8 経路を刺激するため) のいずれかで再刺激した。サイトカイン発現を、フローサイトメトリーによって測定した。図 4 A ~ 4 B に示すように、(1 1 R) - 7 1 - 8 5 による処理は、T C R 刺激に応答した T N F - α の産生を阻害するが、P M A + イオノマイシンでの刺激に応答したサイトカイン産生に対しては、顕著な影響を有さない。2 μ M の (1 1 R) - 7 1 - 8 5 による処理が、1 μ M の (1 1 R) - 7 1 - 8 5 による処理よりも高い程度まで、T N F - α および I F N - γ の産生を阻害するので、(1 1 R) - 7 1 - 8 5 の効果は用量依存的である。

10

【0 1 2 1】

T h 1 および T h 1 7 分化の阻害

T ヘルパー (T h) 細胞分化に対する (1 1 R) - 7 1 - 8 5 の影響を評価するために、さらなる研究を実施した。I F N - γ および T - b e t の発現を、炎症促進性応答に典型的な T h 1 細胞の指標として使用した。ナイーブ C D 4 ⁺ T 細胞を、培地または 2 μ M の (1 1 R) - 7 1 - 8 5 もしくは (1 1 R) - C t r l のいずれかで 2 時間処理し、洗浄後、細胞を、T h 0 条件 (中立) または T h 1 極性化条件下で抗 C D 3 + 抗 C D 2 8 で 3 日間刺激した。細胞を、再度同じ濃度の (1 1 R) - 7 1 - 8 5 または (1 1 R) - C t r l のいずれかで 2 時間処理し、ゴルジ阻害剤の存在下で 4 時間、P M A + イオノマイシンで再刺激した。T b e t および I F N γ の発現を、フローサイトメトリーによって分析した (図 5 A ~ 5 D)。(1 1 R) - 7 1 - 8 5 で処理した細胞は、培地または (1 1 R) - C t r l で処理した細胞と比較して、I F N - γ および T - b e t の低減された発現を示した。これらの結果は、(1 1 R) - 7 1 - 8 5 による処理が T h 1 分化を阻害することを示している。

20

【0 1 2 2】

T h 1 7 分化に対する全長 G a d d 4 5 α の効果もまた評価した。W T マウスから精製された C D 4 ⁺ T 細胞を、4 μ M の T A T - C t r l、T A T - G 4 5 F L または T A T - G 4 5 Δ 1 0 のいずれかで処理し、プレート被覆した抗 C D 3 + 抗 C D 2 8 で 4 8 時間刺激し、転写因子 N F A T c 1、I R F 4 または I R F 8 についてプロットした (図 6 A)。(全長 G a d d 4 5 α による C D 4 ⁺ T 細胞の処理は、N F A T c 1 および I R F 4 の発現を阻害したが、I R F 8 の発現は阻害しなかった。同様に、ナイーブ C D 4 ⁺ T (C D 4 ⁺ C D 6 2 L ^{h i}) 細胞を、W T マウスから精製し、T A T - C t r l または T A T - G 4 5 F L のいずれかで処理し、中立条件 (T h 0) または T h 1 7 傾斜条件 (1 0 n g / m l I L - 6 + 5 n g / m l T G F - β) 下で 4 8 時間刺激した。R o r c および I l 1 7 a の m R N A 発現レベルを評価した (図 6 B)。(全長 G a d d 4 5 α の発現は、T h 1 7 傾斜条件下で、R o r c および I l 1 7 a の両方の発現を顕著に阻害した。これらの結果は、全長 G a d d 4 5 α が T h 1 7 分化を阻害することを示している。

30

【0 1 2 3】

実施例 2 : 1 1 R - 7 1 - 8 5 は、T 細胞活性化マーカーの発現を i n v i v o で阻害する

40

実施例 1 に記載した研究は、残基 7 1 ~ 8 5 を含む G a d d 4 5 α ポリペプチドが、代替的 p 3 8 活性化経路を i n v i t r o および e x v i v o で阻害することが可能であることを実証している。この実施例は、残基 7 1 ~ 8 5 を含む G a d d 4 5 α ポリペプチドが、i n v i v o でも代替的 p 3 8 活性化経路を阻害できるという知見を記載する。

【0 1 2 4】

(1 1 R) - 7 1 - 8 5 が p 3 8 代替的経路を i n v i v o で阻害する能力を、T C R 刺激後に上方調節される転写因子であるインターフェロン調節因子 4 (I r f 4) m R N A の発現を評価することによって評価した。(1 1 R) - 7 1 - 8 5 (4 0 μ g) またはビヒクル対照を、野生型マウス中に腹腔内注射した。注射の 4 時間後、脾細胞を収集し

50

、可溶性抗CD3＋抗CD28で24時間刺激した。Irf4 mRNA発現を、定量的リアルタイムPCRによって評価した。図7に示すように、(11R)－71－85による処理は、対照と比較して、Irf4の発現を顕著に阻害した。

【0125】

TCR刺激の際に活性化される2つの転写因子NFATc1およびIRF4の発現もまた、(11R)－71－85の静脈内(i.v.)注射の後に評価した。WT C57BL/6マウスに、50 µgのDMSO、(11R)－スクランブルまたは(11R)－71－85をi.v.注射し、総T細胞またはCD4⁺T細胞のいずれかを、異なる時点において脾臓から精製した。精製された細胞を、抗CD3/CD28でin vitroで24時間刺激し、Nfatc1およびIrf4のmRNAレベルを、定量的リアルタイムPCRによって決定した。図8に示すように、(11R)－71－85による処理は、総T細胞およびCD4⁺T細胞において、TCR刺激後のNfatc1およびIrf4の両方の発現を阻害する。

【0126】

実施例3：11R－71－85の投与は、膵臓腫瘍の増殖および血管新生を阻害し、腫瘍浸潤性T細胞からのTNF-α分泌を阻害する

p38 MAPKは、膵臓がんなどの、局所炎症性応答を引き起こす一部の腫瘍の増殖に関与している。従って、(11R)－71－85を、膵臓腫瘍モデルにおいて試験した。WT C57BL/6マウスに、7.5×10⁵のPANC02細胞を注射した。16日後、マウスに、40 µgもしくは80 µgの(11R)－71－85またはDMSOの腫瘍内注射を、1日おきに受けさせた。対照マウスおよび(11R)－71－85またはDMSOを注射したマウスにおける、注射開始時(16日目)から42日目までの腫瘍体積を決定した(図9A)。対照腫瘍および処置腫瘍の重量(図9B)および外観(図9C)を、38日目に評価した。腫瘍体積および腫瘍重量の両方が、対照動物と比較して、(11R)－71－85で処置したマウスにおいて顕著に減少した。これらの結果は、(11R)－71－85の注射が、樹立されたPANC02腫瘍の増殖を停止させることを実証している。

【0127】

腫瘍浸潤性T細胞からのサイトカイン分泌に対する、(11R)－71－85の腫瘍内注射の効果もまた、膵臓腫瘍を有するマウスにおいて評価した。WT C57BL/6マウスに、7.5×10⁵のPANC02細胞を注射し、16日後、マウスに、80 µgの(11R)－71－85または(11R)－スクランブルの腫瘍内注射を、1週間にわたり1日おきに受けさせた。最後の注射の24時間後、腫瘍浸潤性細胞を回収し、ゴルジ阻害剤の存在下で4時間、PMAおよびイオノマイシンで再刺激したか、または未刺激のままにした。TNF-α、IFNγ、IL-10およびIL-17の発現を、フローサイトメトリーによって決定した。図10Aに示すように、TNF-α分泌は、in vivoでのそれらの状態を示す未刺激の細胞において、(11R)－71－85注射後に低減された。TNF-α分泌においては、TCRシグナル伝達を迂回し、古典的MAPKカスケードを活性化する再刺激後に、差異は存在しなかった。試験した他のサイトカイン(IFNγ、IL-10およびIL-17；図10A～10B)について、未刺激細胞と再刺激細胞との間に差異は存在しなかった。

【0128】

腫瘍血管新生もまた、(11R)－71－85で処置したWTマウスにおいて評価した。WT C57BL/6マウスに、7.5×10⁵のPANC02細胞を注射した。16日後、マウスに、80 µgの(11R)－71－85または(11R)－スクランブルの腫瘍内注射を、2.5週間にわたり1日おきに受けさせた。最後の注射の24時間後、腫瘍を収集し、ホルマリン中で固定し、腫瘍血管新生の指標である内皮マーカーCD31について染色した。図11に示すように、(11R)－71－85で処置したマウスは、対照処置マウスと比較して、CD31染色における顕著な低減を示し、これは、(11R)－71－85の投与が腫瘍血管新生を阻害することを示している。

【0129】

膵臓がんの第2のマウスモデルを使用して、腫瘍細胞によるサイトカイン分泌に対する(11R)-71-85の効果を評価した。KPCマウスは、オンコジーン発現およびp53ハプロ不全に起因して膵臓がんを発症するように遺伝子操作されている。KPCマウスに、80 μgの(11R)-71-85または(11R)-スクランブルのいずれかを、腹腔内注射によって1カ月間にわたり1日おきに投与した。最後の注射の24時間後、腫瘍浸潤性細胞を回収し、ゴルジ阻害剤の存在下で4時間、PMAおよびイオノマイシンで再刺激したか、または未刺激のままにした。細胞内TNF-αの発現を、フローサイトメトリーによって決定した(図12)。これらの結果は、(11R)-71-85の投与が腫瘍浸潤性T細胞によるTNF-α分泌を阻害することを実証している。

10

【0130】

実施例4：(11R)-71-85は、KPCマウスにおいてPanINの進行およびがん形成を阻害する

KPCマウスは、ヒト疾患を密接に模倣するマウス膵臓腫瘍の遺伝的モデルを提供する。KPC(KrasG12D/+;LSLTrp53R172H/+;Pdx-1-Cre)マウスは、膵臓上皮においてK-rasを発現し、p53についてヘテロ接合性になった場合、およそ8~10週齢で開始する自発的腫瘍を発症する(Hingoraniら、Cancer Cell 7巻(5号):469~483頁、2005年)。これは、膵臓上皮内新生物前駆病変(PanIN)の形成ならびに周囲の間質および炎症性反応を伴う完全に発達した癌腫への進行を伴う(Hingoraniら、Cancer Cell 7巻(5号):469~483頁、2005年)。8~13週齢のKPCマウス由来の膵臓組織の組織学的試験により、膵管上皮の組織学的変化ならびに周囲の線維炎症性反応の形成、ならびに完全に発達した侵襲性癌腫のエリアによって規定される種々の発達段階にあるPanINが明らかになった。ヒト疾患において見られるように、浸潤性T細胞は、これらの病変において見出された。特に、T細胞リッチ領域では、この代替的経路のための明確なリン酸化部位p38 pY323に特異的な抗体で染色された単核細胞、およびT細胞が乏しい領域には存在しなかったTNFαを容易に検出できる。

20

【0131】

T細胞中のTCRシグナル伝達されたp38活性化が腫瘍発生に関与するかどうかを調べるために、6週齢のKPCマウスを、致死未満で照射し、WTまたはDKI骨髄で再構築した。前者は侵襲性がんを発症し、37±9日間の平均生存時間で死亡した(図13A)。対照的に、DKI骨髄を受けたマウスは、80±16日間の平均で、かなり長く生存した(図13A)。従って、p38代替的経路の遺伝的除去は、オンコジーン媒介性膵臓がんの進行を低減させた。

30

【0132】

これらの知見を考慮して、さらなる実験を実施して、KPCマウスにおける代替的経路の阻害が疾患進行を変更するかどうかを決定した。KPCマウスを、9週齢の時点で開始して静脈内(11R)-71-85または(11R)-スクランブルで処置し、膵臓を、3.5週間後に組織学的に評価した。(11R)-スクランブルで処置したマウスの33パーセント(6匹のうち2匹)は、膵臓において侵襲性癌腫を発症した。対照的に、(11R)-71-85で処置したマウスは、侵襲性の徴候を示さなかった。H&E染色切片の組織学的評価は、(11R)-スクランブル処置した腫瘍と比較して、(11R)-71-85処置した腫瘍において、膵臓内線維炎症性反応の低減を示した。(11R)-71-85は、侵襲性癌腫の形成を予防しただけでなく、高悪性度PanIN形成(PanIN3、上皮内癌)に向かう進行を遅延させもした(図13B)。PANC02モデルと類似して、(11R)-71-85で処置したKPCマウス由来の腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)は、対照と比較して低減した数のTNFα発現CD4+細胞を有したが、IFNγの発現は僅かに低減された(図13C)。TNFα分泌の低減と合致して、Irf4 mRNA発現は、(11R)-71-85処置後にCD4+TILにおいて減少した。これと一致して、Ccl2、Ccl5、VegfおよびTgfβの発現もまた、KPCマウ

40

50

スの膵臓上皮細胞において低減された（図13D）。（11R）-71-85処置マウスにおいて、初期PanIN形成が存在したが、後の前侵襲性段階が低減されたという事実は、侵襲性癌腫に向かうPanINの進行におけるT細胞由来TNF α の役割を支持する。

【0133】

実施例5：ヒトPDAC TILにおける高レベルのpY323 p38は、予後不良を示す

マウス膵臓がん、および特にオンコジーン駆動KPCマウスにおけるp38代替的活性化の重要性は、この経路がヒト膵管腺癌（PDAC）にも同様に関与し得るかどうかを扱う研究を促進した。組織学的に検証されたPDACを有する193人の患者由来の膵臓組織を、浸潤性p38 pY323陽性細胞について分析した。全ての試料において、p38 pY323に対する抗体で染色したT細胞の顕著な浸潤が存在したが、かかる細胞の数は、患者ごとに変動した。大多数の症例において（n=153、約80%）、10%未満のCD3⁺腫瘍浸潤性T細胞が、pY323についても陽性であり、残りは、p38 pY323を発現する $\geq 10\%$ のT細胞を有した。p38 pY323陽性T細胞もまた、逐次的腫瘍切片中で検出されたように、TNF α を発現した。二重免疫蛍光は、これらの知見を支持し、p38 pY323陽性T細胞がTNF α を産生したことを実証している。10%より多いp38 pY323陽性T細胞を有する浸潤物を有する患者は、10%未満のp38 pY323陽性細胞を有する患者（診断後613日間の生存期間中央値）と比較して、統計的に有意に短い生存（診断後296日間の生存期間中央値）を有した（図14A）。他の臨床的または病理学的知見（年齢、性別、腫瘍サイズ、TNM段階、組織学的段階分け、UICC段階、腫瘍陽性リンパ節の数）との間には、かかる相関は存在しなかった。2群間のT細胞浸潤の量においても差異は存在せず、これは、単に浸潤性T細胞の存在だけでなく、p38代替的経路の活性化が、転帰と相関することを示している（図14B）。CD31陽性腫瘍血管の密度を、高い数のp38 pY323陽性T細胞を有する10人のランダムに選択した患者および低い数のp38 pY323陽性T細胞を有する10人のランダムに選択した患者において試験した。前者は、血管新生における統計的に有意な増加を有し（図14C）、これは、TILにおけるp38代替的活性化が、PDACにおける不良な生存の既知の予測因子である腫瘍新血管新生をもたらすことを示している。

【0134】

実施例6：多発性硬化症（MS）の動物モデルにおけるGadd45 α ポリペプチドの評価

この実施例は、Gadd45 α ポリペプチドによる処置の効果を評価するための、多発性硬化症の動物モデルを記載する。実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）マウスモデルは、CNS関連の脱髄性自己免疫性疾患の認識されたモデルである。EAEを誘導する方法およびEAEを天然に発症する動物モデルは、当該分野で周知である（例えば、Matsushitaら、J. Clin. Invest. 118巻（10号）：3420～3430頁、2008年；Grewalら、Immunity 14巻：291～302頁、2001年；Tranら、Eur. J. Immunol. 30巻：1410～1415頁、2000年；またはButzkeuvenら、Nat. Med. 8巻：613～619頁、2002年；および米国特許出願公開第2008/0166318号を参照のこと）。C57BL/6 EAEモデルは一般に、慢性および進行性のMSを示す。

【0135】

EAEは、マウス1匹当たり4mg/mLのMycobacterium tuberculosisを含有するフロイント完全アジュバント中およそ200 μ gのミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質（MOG）35-55ペプチドによる皮下注射による免疫化によって、C57BL/6雌性マウスにおいて誘導される。百日咳毒素を、免疫化後0日目および2日目に、腹腔内投与する。免疫化後の種々の段階で、マウスに、Gadd4

5 αポリペプチドまたはビヒクル単独を投与する。

【0136】

マウスを、EAEの徴候について毎日試験する。EAEは、5ポイントスケール（0、麻痺なし；1、尾の引きずり（limp tail）；2、後肢不全麻痺および立ち直り自体の困難；3、後肢麻痺；4、後肢および前肢麻痺；ならびに5、瀕死）を使用してスコア付けする。ビヒクル単独と比較した、Gadd45αポリペプチドによる処置後の平均スコアにおける減少は、Gadd45αポリペプチドが、ミエリン化を促進しMSを処置するために有効であることを示している。画像化技術もまた、種々の段階でのミエリン化の程度を評価するために使用され得る。

【0137】

実施例7：MS患者におけるGadd45αポリペプチドの評価

この実施例は、ヒトにおけるGadd45αポリペプチドの使用を評価するための方法を記載する。この方法は、網膜神経線維層（RNFL）のミエリン化を研究するための眼コヒーレンストモグラフィ（OCT）および磁気共鳴画像化（MRI）の使用を伴う。

【0138】

MSの一般的な症状発現である視神経炎は、しばしば、中枢神経系脱髄の初期の症状発現として発生するか、または疾患の経過の間に発症する。RNFLは、ミエリン化されていない軸索のみから構成されるので、RNFLの厚さを測定することが、MS患者における軸索喪失をモニタリングする実行可能な方法を示す。OCTは、乳頭周囲RNFLの厚さ、窩および黄斑を定量する、非侵襲性の、非接触性で正確かつ再現性のある技術である。RNFLを、Gadd45αポリペプチドによる処置の前および後に、MS患者において評価する。Gadd45αポリペプチドによる処置の後の軸索の厚さにおける増加は、このGadd45αポリペプチドが、ミエリン化の促進およびMSの処置に有効であることを示している。

【0139】

実施例8：MSの処置のためのGadd45αポリペプチドの効力の評価

この実施例は、MSの処置のためのGadd45αポリペプチドの効力の評価のための方法を記載する。

【0140】

MSを有する被験体を、Gadd45αポリペプチドを含む組成物で処置する。当業者は、Gadd45αポリペプチド組成物の適切な用量および投薬スケジュールを決定することが可能である。被験体を、治療の開始前に、治療期間の間に周期的に、および処置過程の最後に、以下に記載されるMSの基準について評価する。

【0141】

多発性硬化症を有する被験体におけるGadd45αポリペプチド組成物の効力は、以下の基準によって評価できる。

【0142】

1. MRI基準、例えば：

T₂ 病変負荷

T₁ 低強度の体積

N-アセチルアスパルテート（NAA）レベル

全脳萎縮症。

【0143】

2. 臨床的基準、特に：

EDSS（総合障害度評価尺度）における変化

SRSS（スクリプス神経学的評価尺度）における変化

再発率

9ホールペグテスト。

【0144】

3. 免疫学的基準、特に：

10

20

30

40

50

Th 1 および Th 2 T 細胞系統のマーカー
 種々の T 細胞マーカーの FACS 分析
 T 細胞による *in vitro* のサイトカイン産生
 T 細胞の増殖。

【0145】

T₂ 病変負荷

T₂ 病変負荷に対する分析は、以下を含む：

- ・処置期間の間の T₂ 病変の平均体積に対する、処置前期間の間の T₂ 病変の平均体積の比較
- ・処置期間の最後の 4 週間の T₂ 病変の平均体積に対する、処置前期間の間の T₂ 病変の平均体積の比較。

10

【0146】

T₁ 低強度の体積

T₁ 低強度の体積に対する分析は、以下を含む：

- ・処置期間の間の T₁ 低強度の平均体積に対する、処置前期間の間の T₁ 低強度の平均体積の比較
- ・処置期間の最後の 4 週間の T₁ 低強度の平均体積に対する、処置前期間の間の T₁ 低強度の平均体積の比較。

【0147】

EDSS

20

ベースライン EDSS スコアが、処置の開始の前に被験体について決定される。EDSS は、処置過程の間に周期的に測定される。ベースライン EDSS から処置期間の間の EDSS への変化が、決定される。また、処置期間の間の SRS および 9 ホールペグテストについてのベースラインスコアからの変化が決定される。

【0148】

再発

Gadd45α ポリペプチドによる処置を受ける前 2 年間にわたる再発の頻度を、Gadd45α ポリペプチドによって処置されている間の再発の頻度と比較する。

【0149】

MS を有する患者における、Gadd45α ポリペプチド組成物の投与を含む治療の有効性は、処置前の期間と比較した、所与の期間（例えば、6、12、18 または 24 カ月間）における被験体当たりの MS 増悪の平均数における低減によって実証される。例えば EDSS スコアによって測定されるような、ある期間（例えば、6、12、18 または 24 カ月間）にわたる被験体の能力障害スコアにおける増加の平均速度における低減、またはさらには能力障害スコアにおける改善もまた、Gadd45α ポリペプチド治療の有効性を実証する。

30

【0150】

実施例 9：関節リウマチの動物モデルにおける Gadd45α ポリペプチドの評価

この実施例は、Gadd45α ポリペプチドによる処置の効果を評価するための、関節リウマチの動物モデルを記載する。コラーゲン誘導性関節炎（CIA）モデルは、関節リウマチを研究するために最も一般的に使用される動物モデルである。このモデルにおいて自己免疫性関節炎を誘導する方法は、当該分野で周知である（例えば、Jirmanov ら、Blood 118 巻（12 号）：3280～3289 頁、2011 年；Brand ら、Nat Protoc 2 巻（5 号）：1269～1275 頁、2007 年を参照のこと）。

40

【0151】

この実施例では、関節炎は、尾の基部において 10 週齢 H-2^r マウスにフロイント完全アジュバント（CFA）中に乳化した 100 μg ウシ II 型コラーゲンを注射し、21 日後にフロイント不完全アジュバント（IFA）中に乳化した 100 μg ウシ II 型コラーゲンで追加免疫することによって、誘導される。関節炎の誘導後、マウスに、Gadd

50

45 α ポリペプチドまたはビヒクル単独を投与する。各足を、以下のようにスコア付ける：0、紅斑の証拠なし；1、足根に限局された紅斑および軽度の腫脹；2、足首から中足部（mid foot）にかけて広がる紅斑および軽度の腫脹；3、足首から中足骨関節にかけて広がる腫脹；4、足全体の重症腫脹／強直。ビヒクル単独と比較した、G a d d 45 α ポリペプチドによる処置後の平均スコアにおける減少は、そのG a d d 45 α ポリペプチドが、関節リウマチの処置のために有効であることを示す。

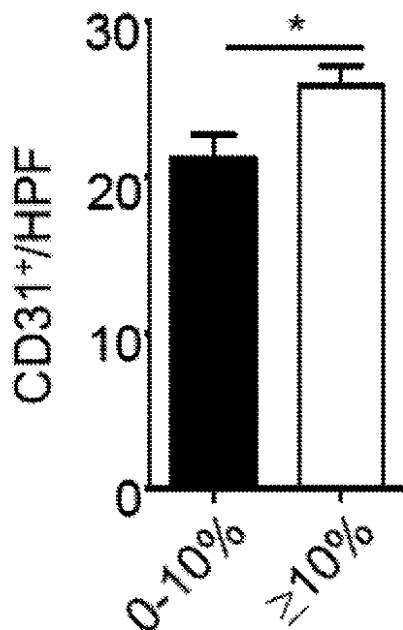
【0152】

開示された本発明の原理が適用され得る多くの可能な実施形態を考慮すると、例示された実施形態は、本発明の好ましい実施例にすぎないことを認識すべきであり、本発明の範囲を限定すると解釈すべきではない。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって規定される。従って、本発明者らは、本発明者らの発明が全て、これらの請求項の範囲および精神内に入ると主張する。

10

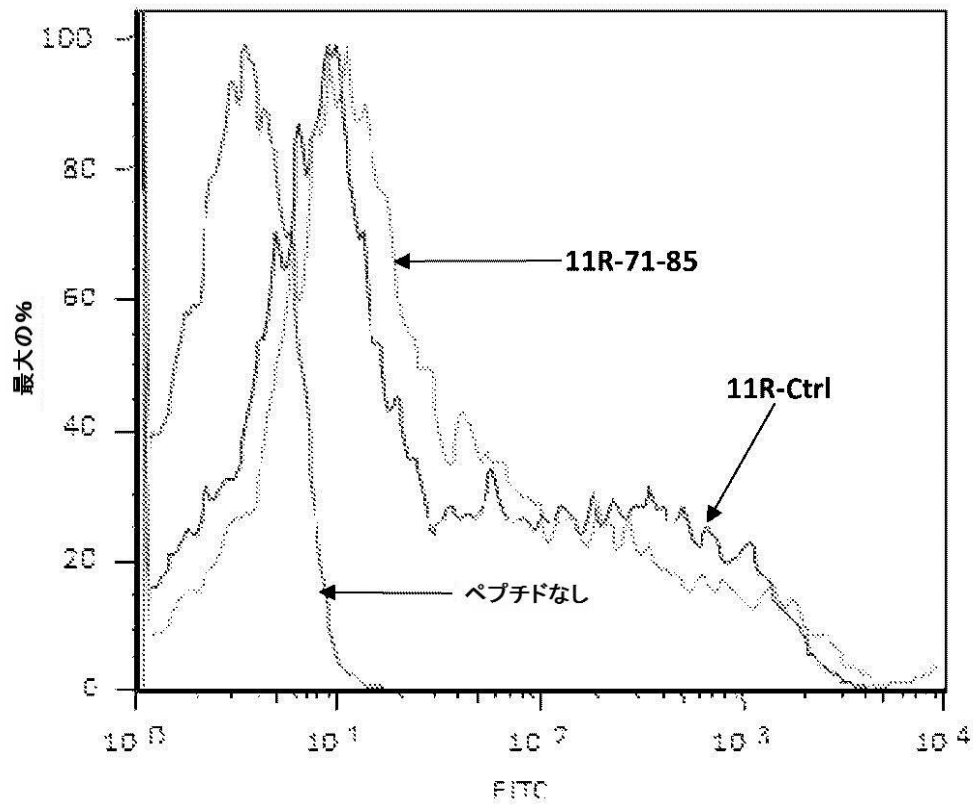
【図14-2】

FIG. 14C



【図 1】

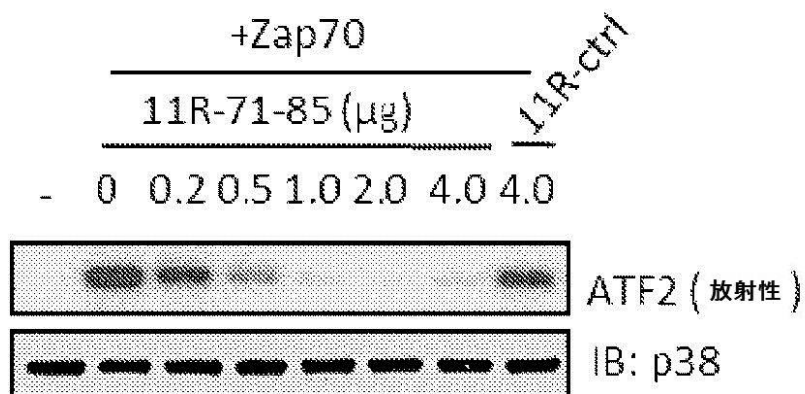
FIG. 1



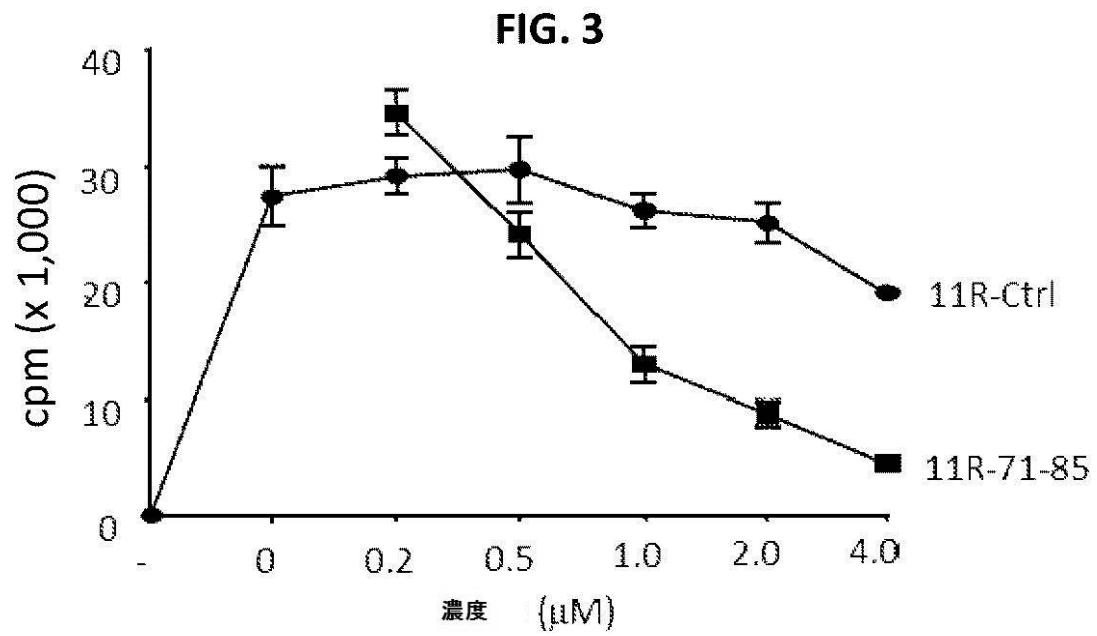
試料	%
11R-71-85	88.4
11R-Ctrl	83
ペプチドなし	94.7

【図 2】

FIG. 2

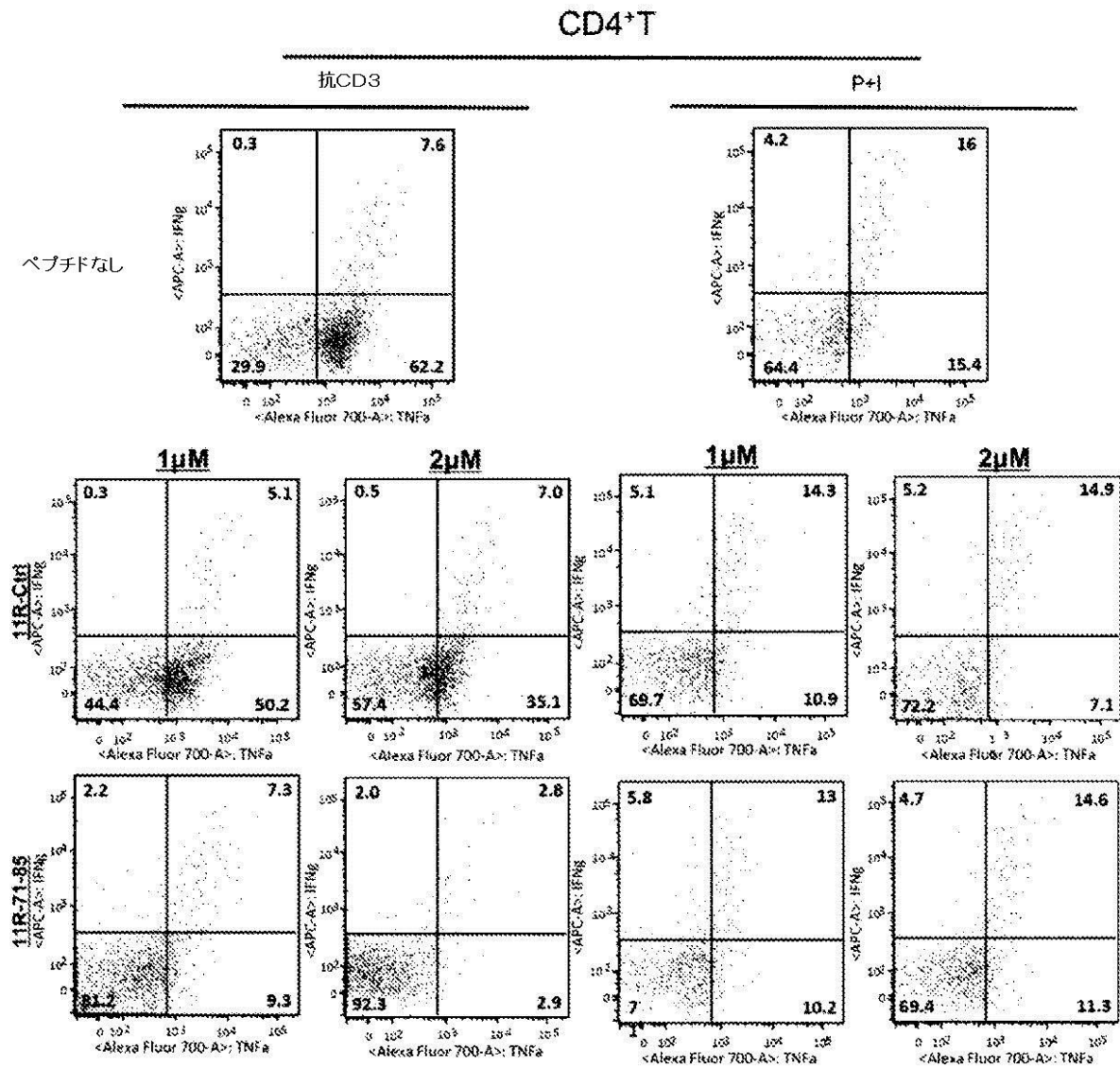


【図 3】



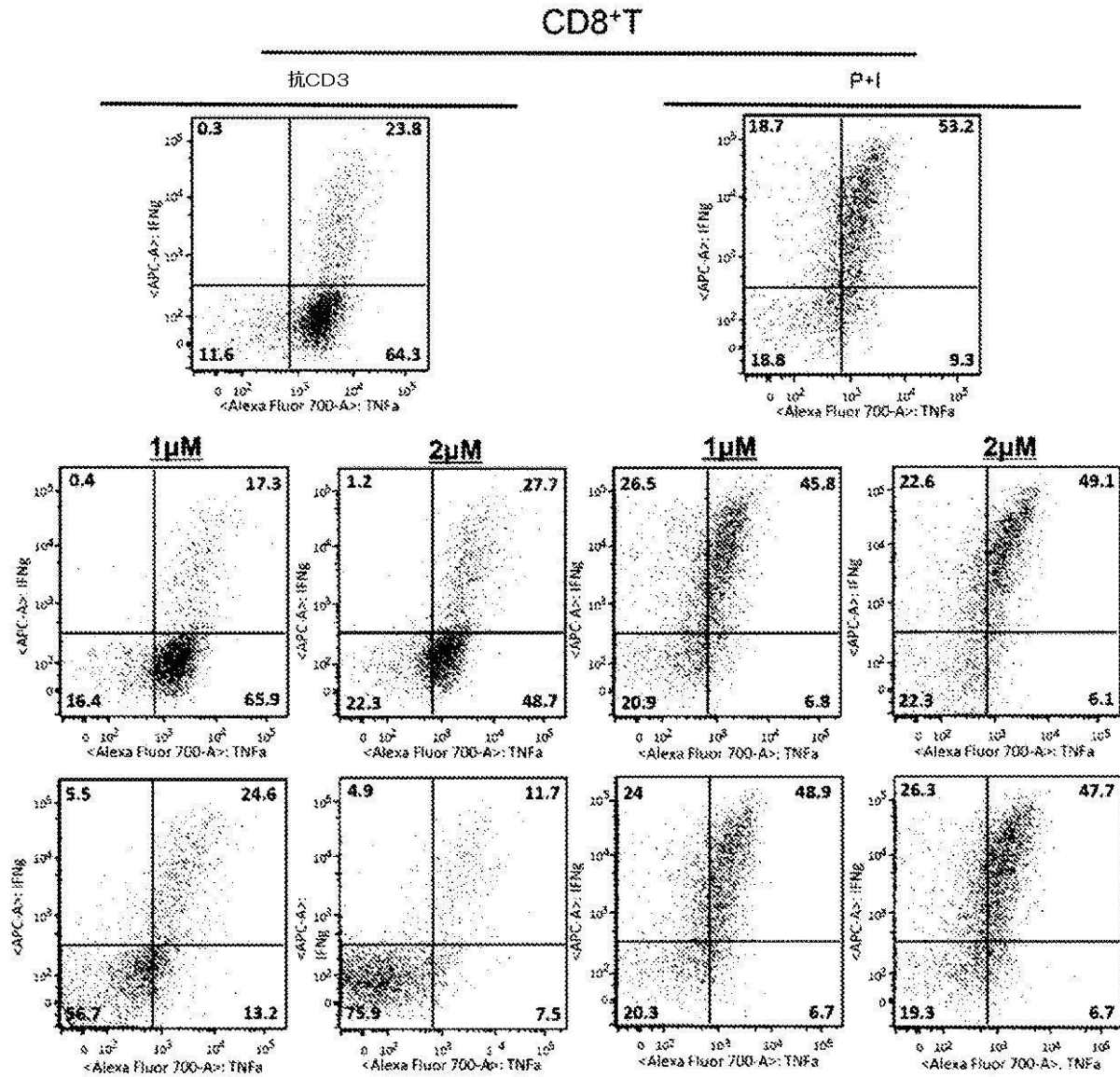
【図 4 A】

FIG. 4A



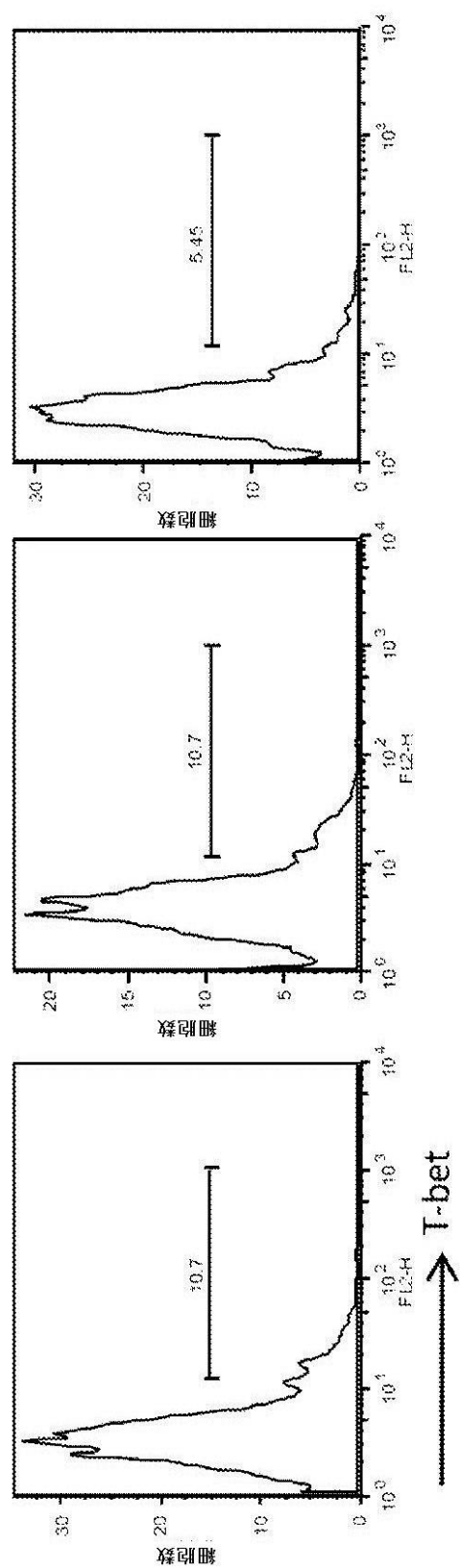
【図 4 B】

FIG. 4B



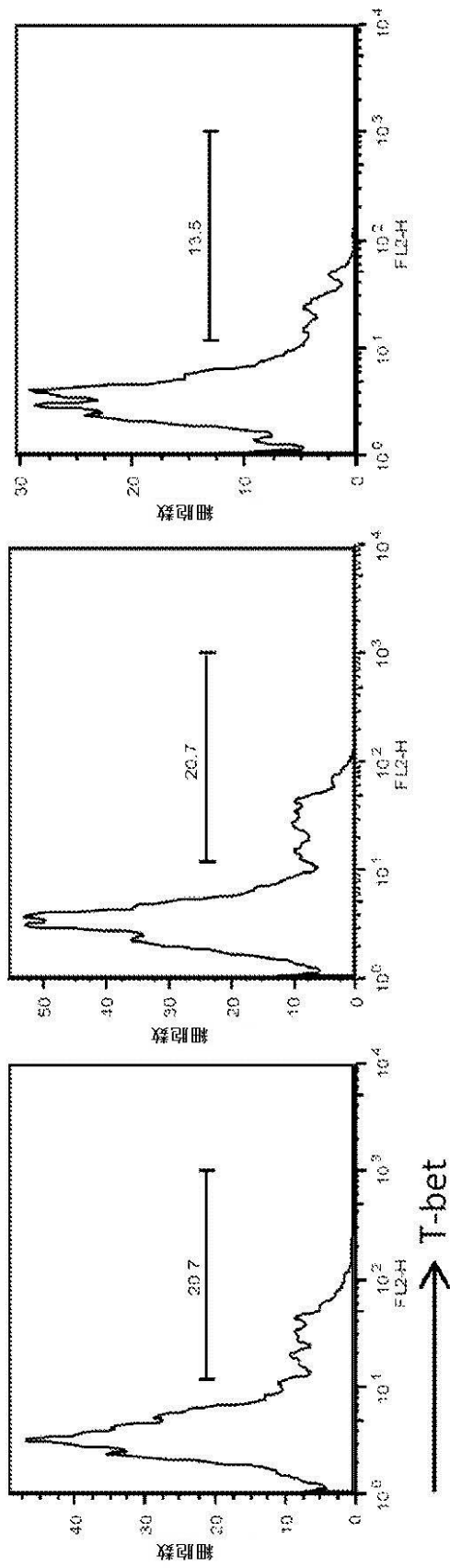
【図 5 A】

FIG. 5A



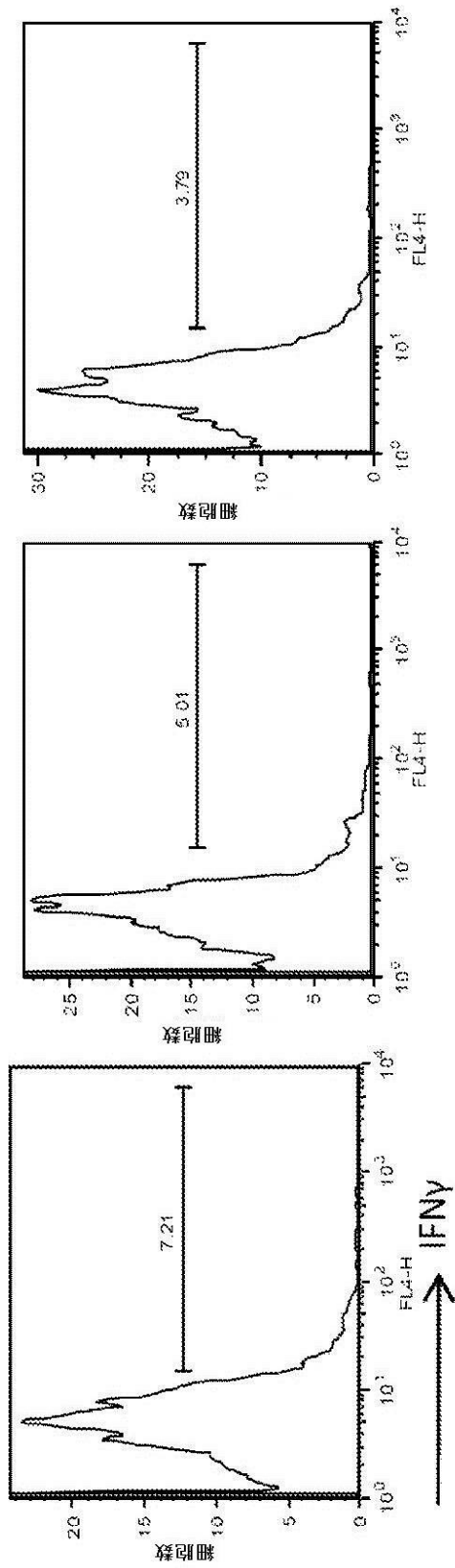
【図 5 B】

FIG. 5B



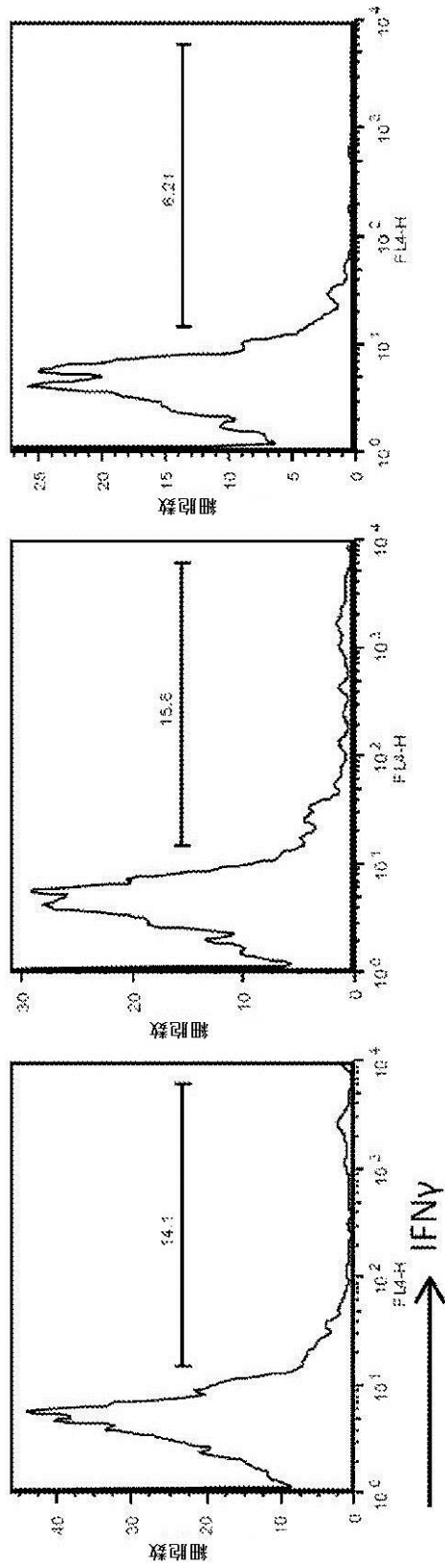
【図 5 C】

FIG. 5C



【図 5 D】

FIG. 5D



【図 6】

aCD3+aCD28	-	+	+	+
TAT-Ctrl	-	+	-	-
TAT-G45FL	-	-	+	-
TAT-G45D10	-	-	-	+

FIG. 6A

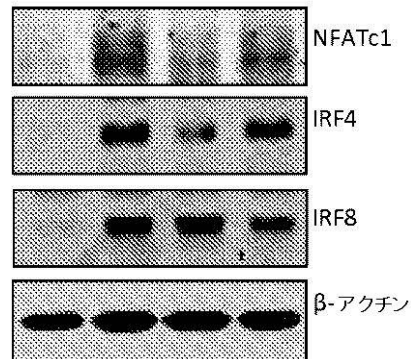
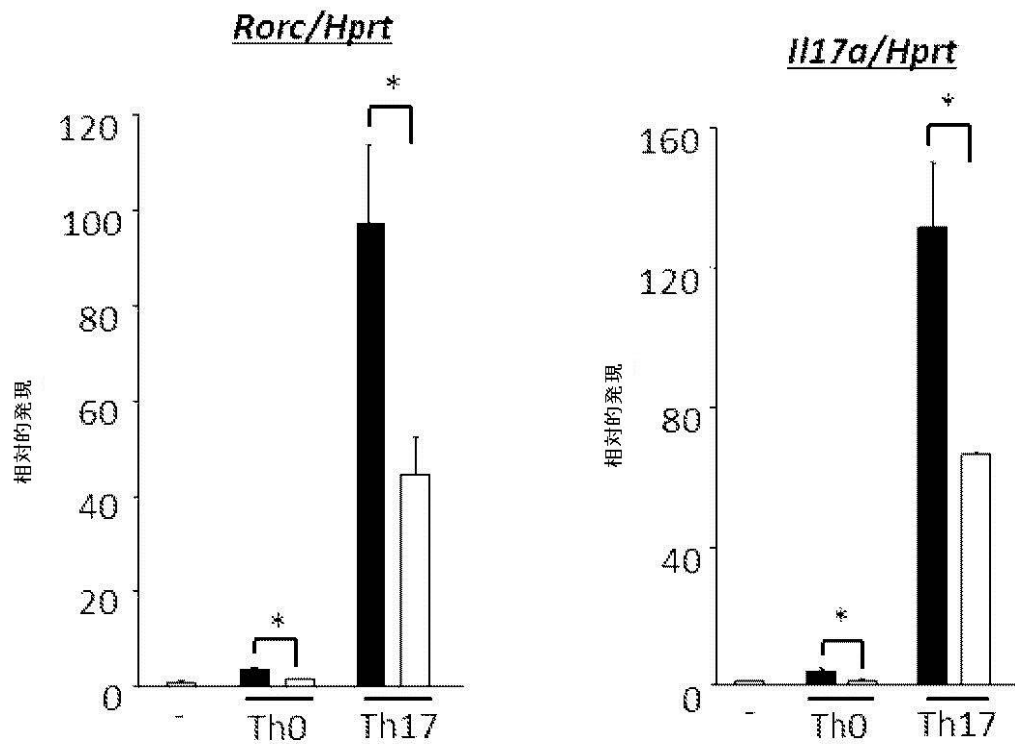


FIG. 6B

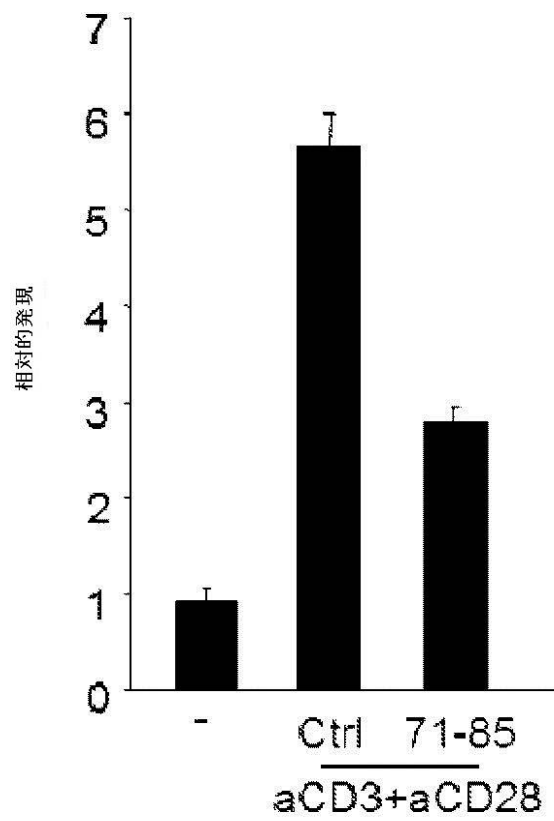
■ TAT-Ctrl

□ TAT-G45FL



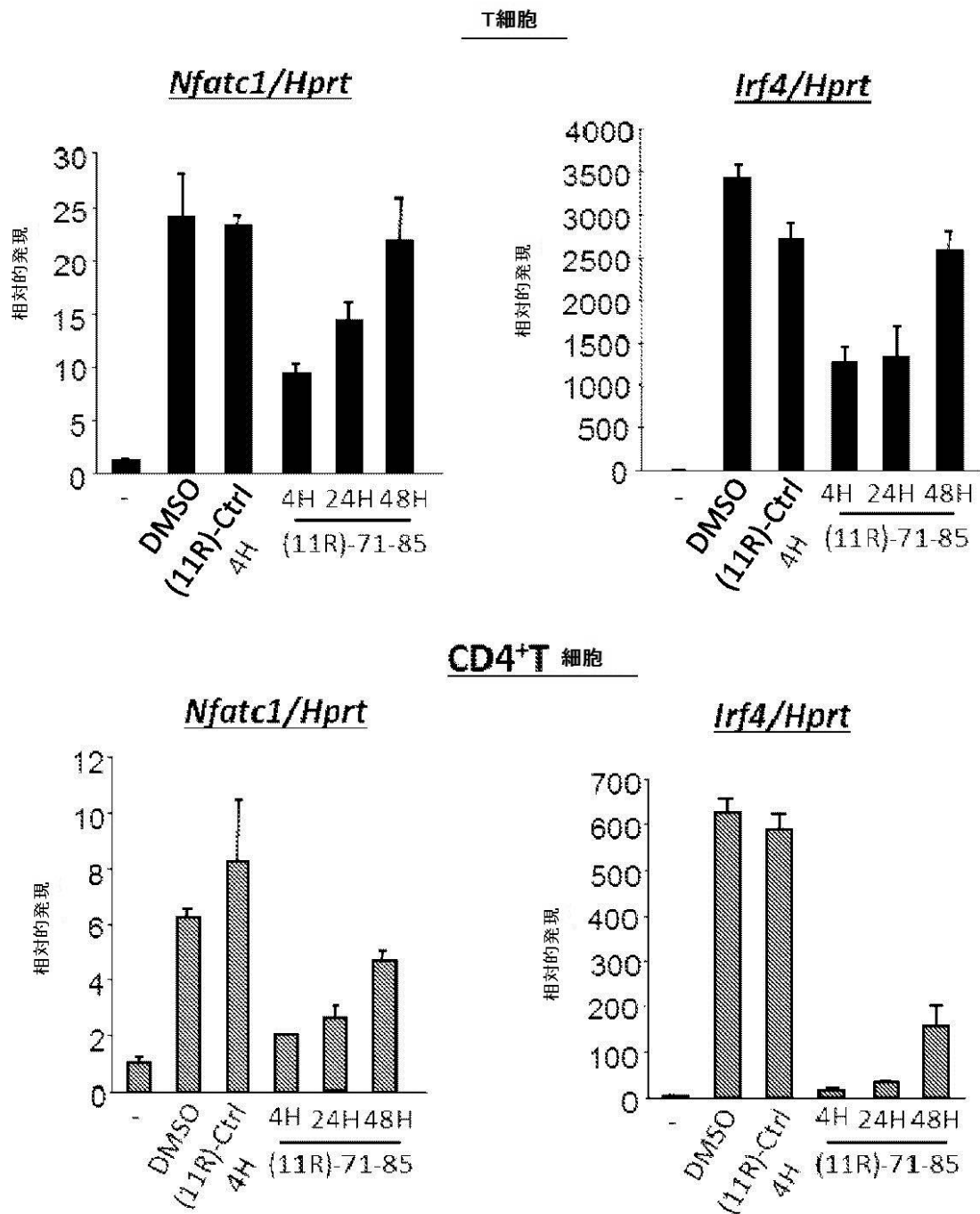
【図 7】

FIG. 7



【 図 8 】

FIG. 8



【図 9】

FIG. 9A

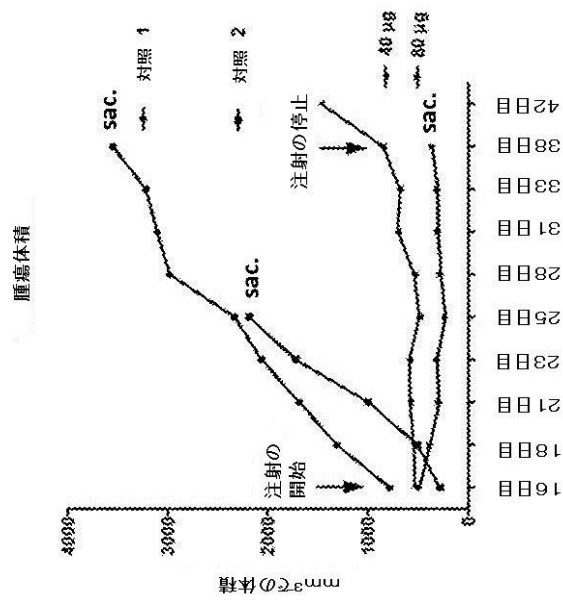


FIG. 9B

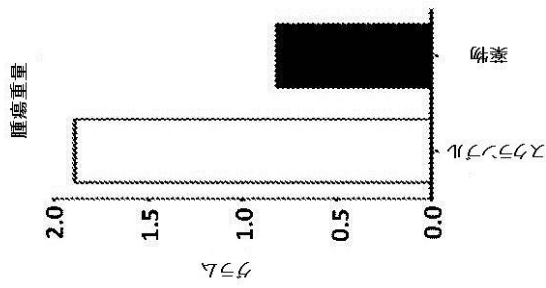


FIG. 9C

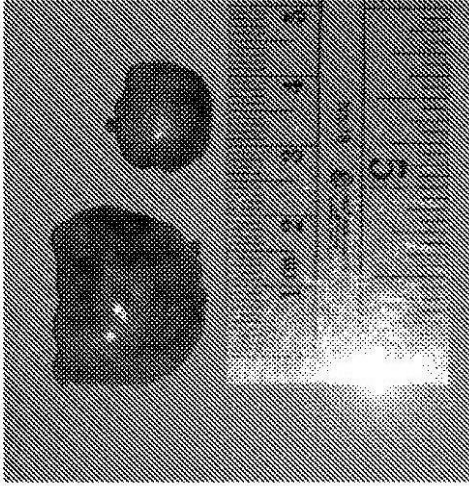
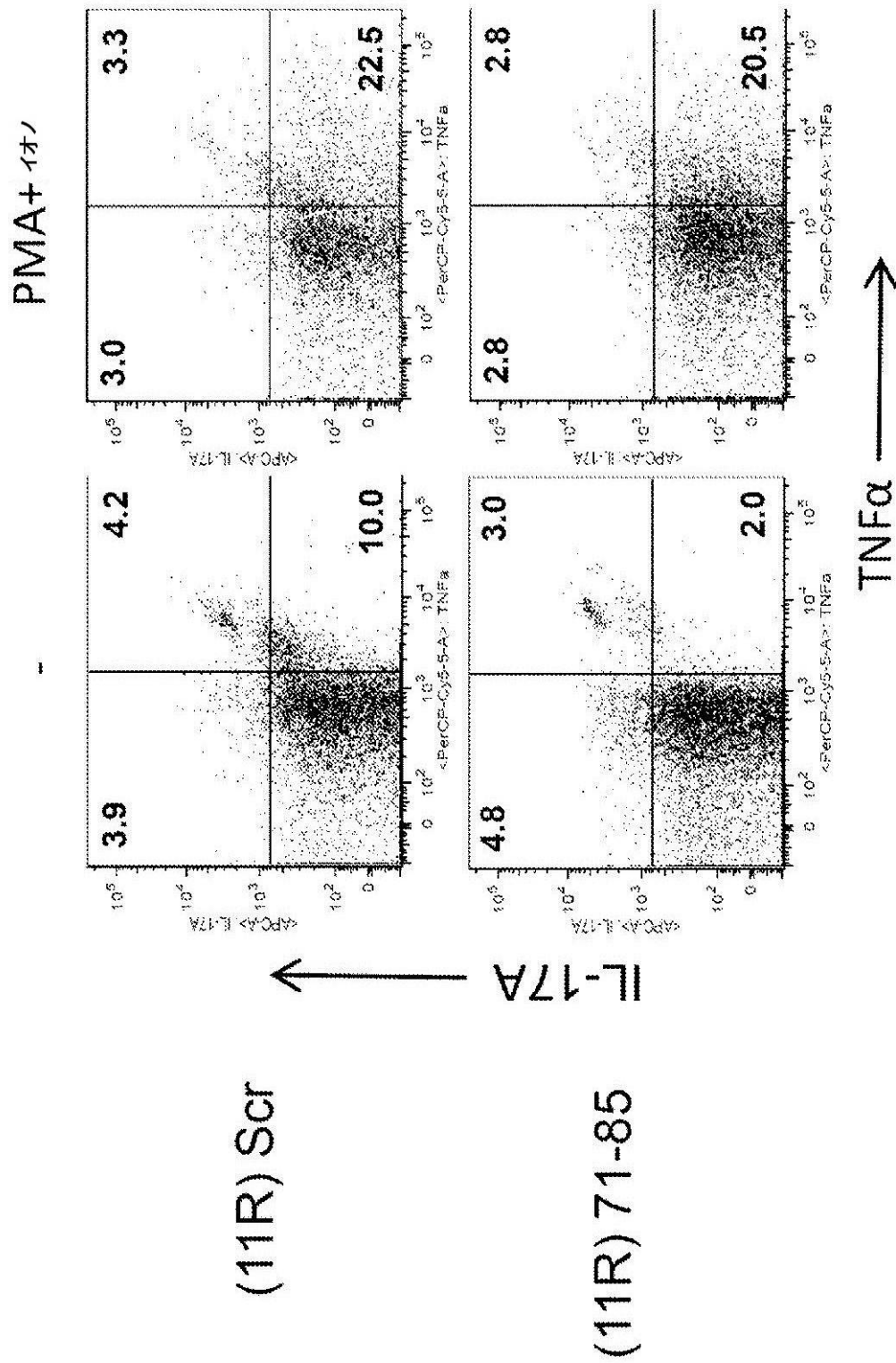


FIG. 10A



【図10B】

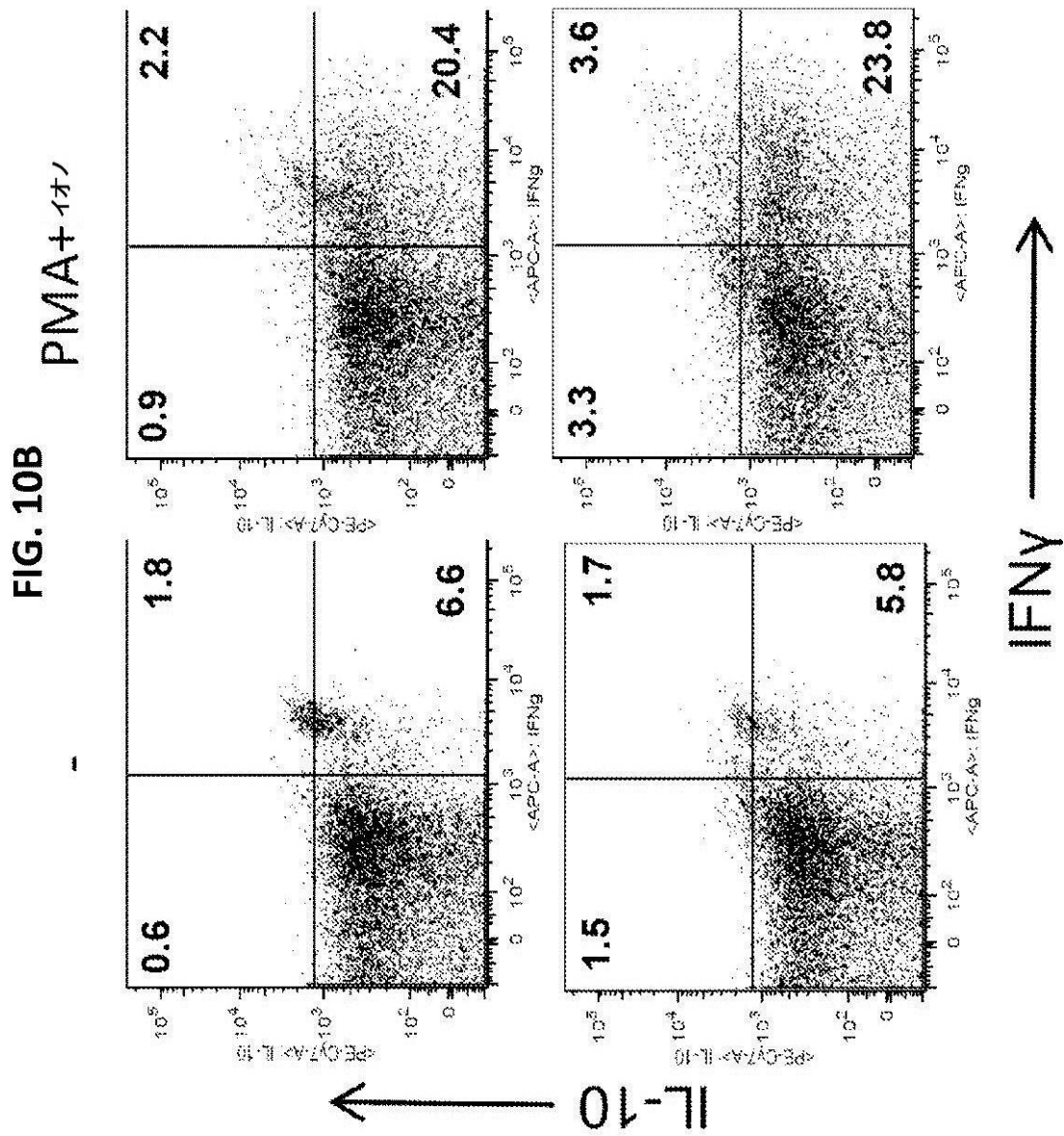
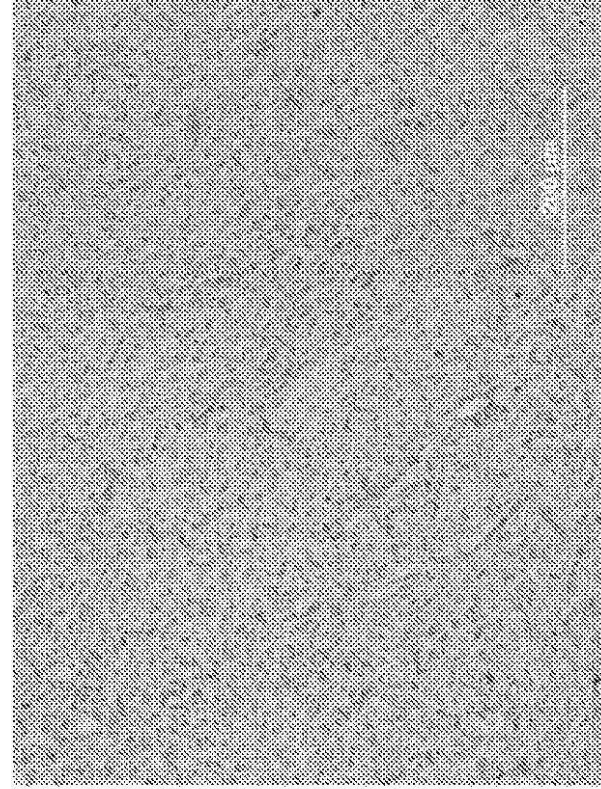
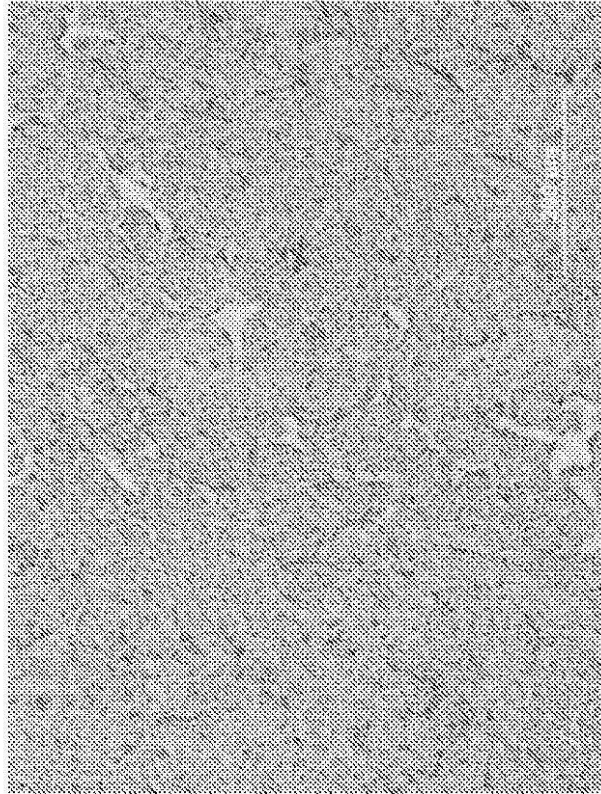


FIG. 11

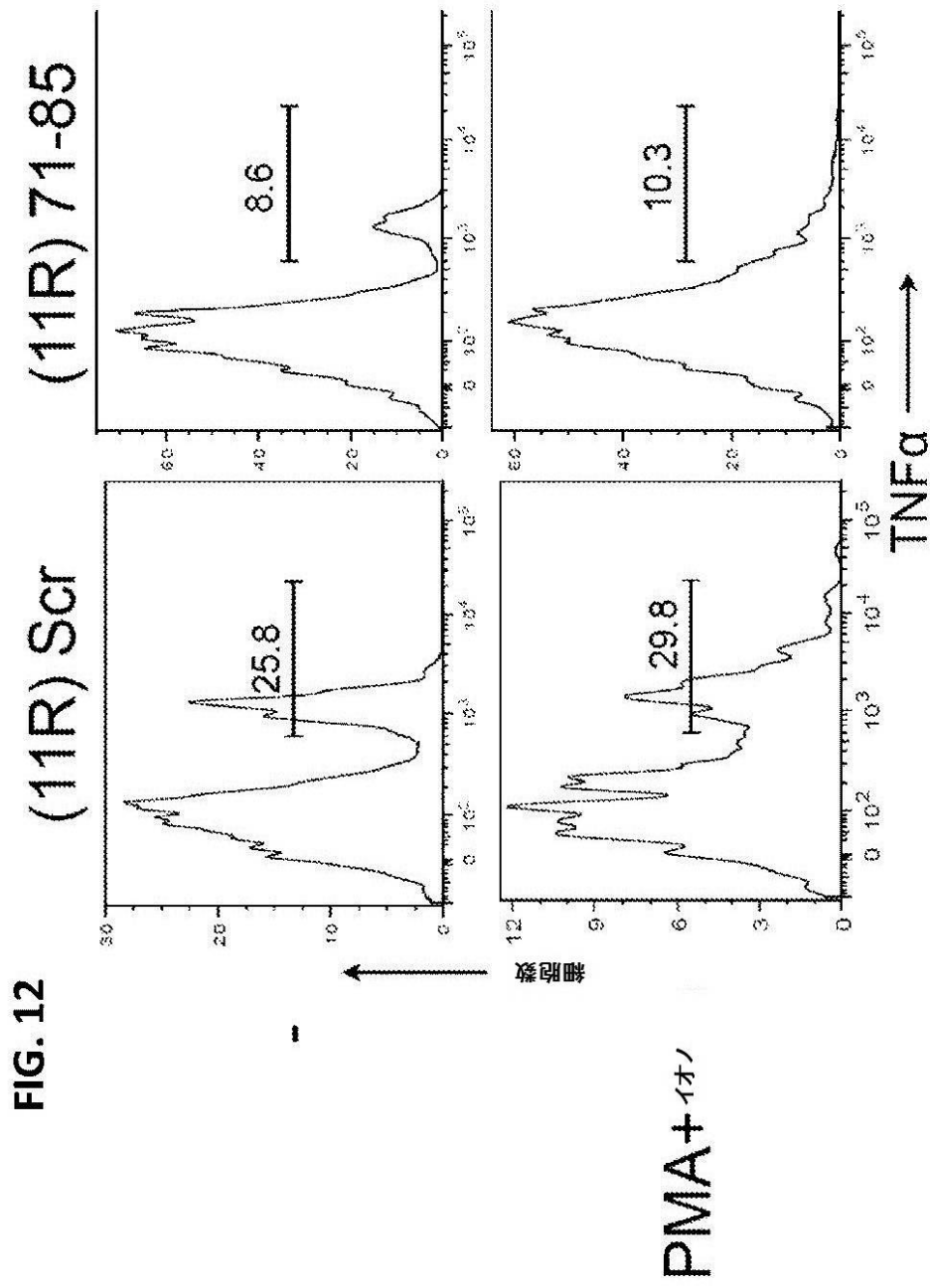
CD31+ 染色

(11R) Scr

(11R) 71-85



【図 12】



【図 13-1】

FIG. 13A

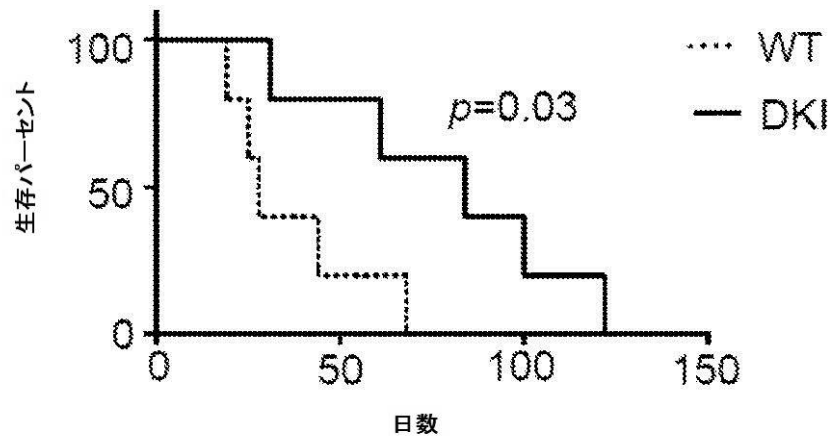
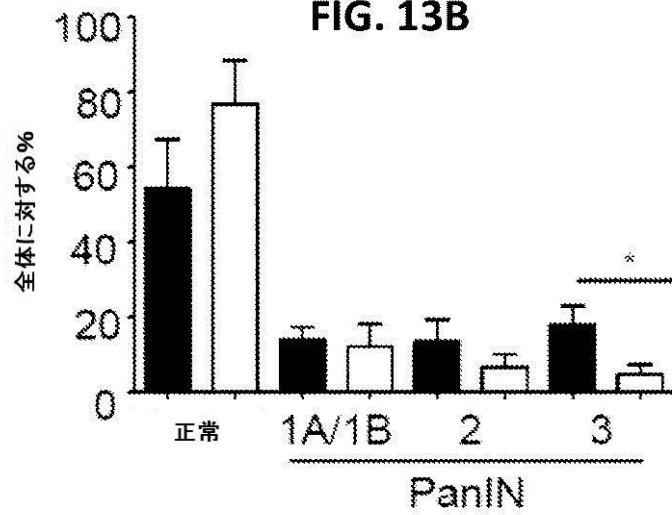
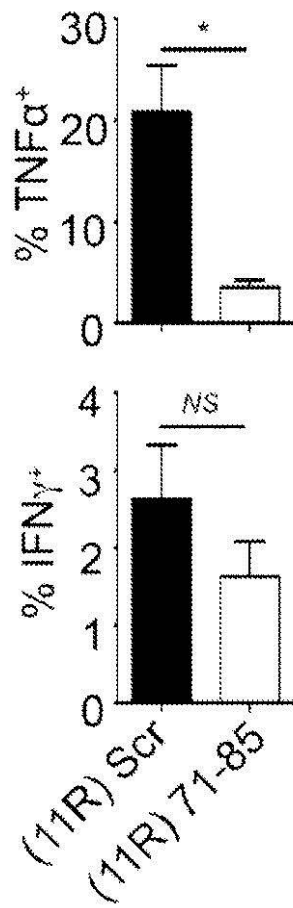
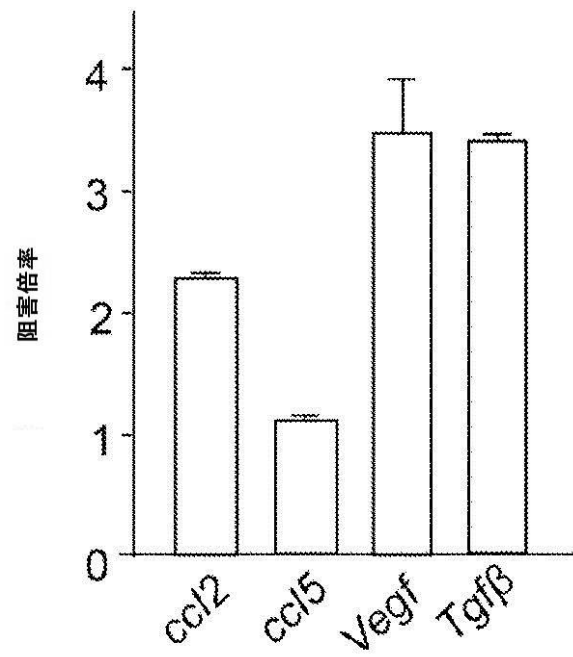


FIG. 13B



【図 13 - 2】

FIG. 13C**FIG. 13D**

【図 14 - 1】

FIG. 14B

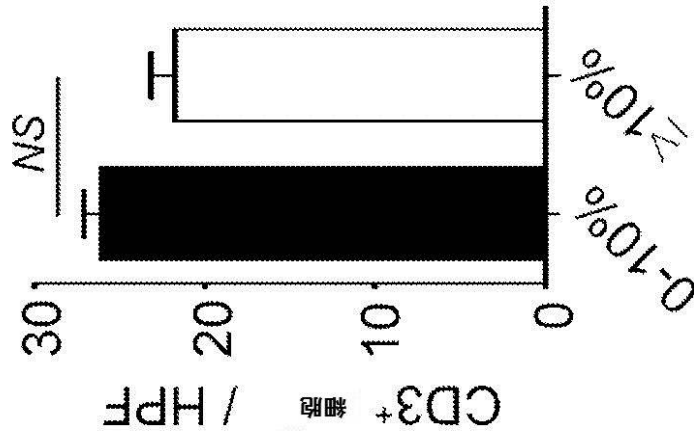
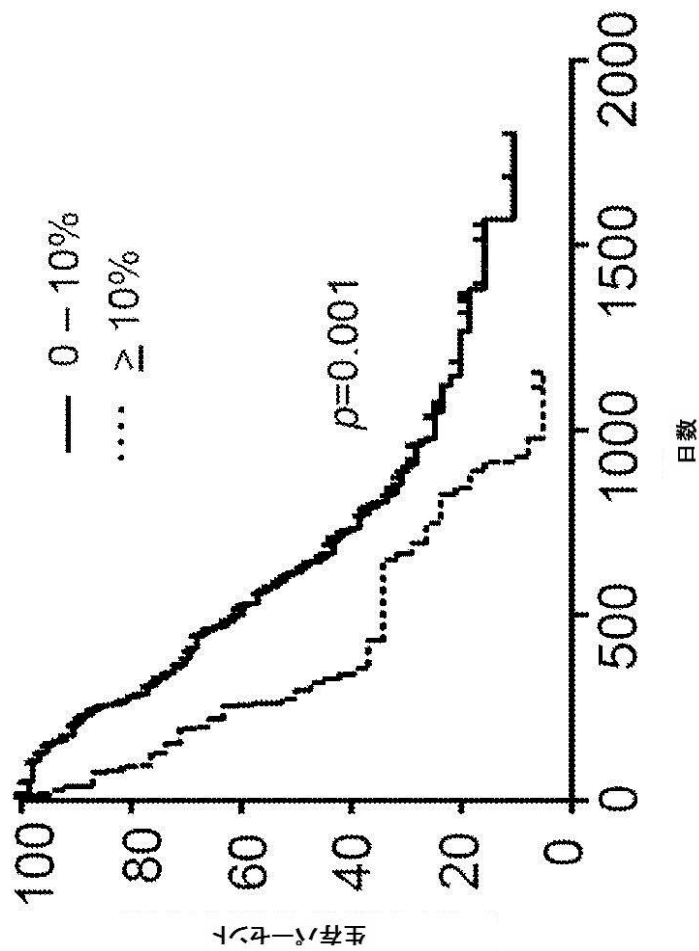


FIG. 14A



【配列表】

2016503425000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/070813
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 7/08(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, A61K 38/10(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i		
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) C07K 7/08; A61K 39/395; C07K 16/40; C07K 19/00; A61K 38/10; A61P 37/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: growth arrest and DNA-damage-inducible alpha (Gadd45a), T cell specific alternative p38 activation pathway, autoimmune		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI, GenBANK accession no.AE116541.1 (20 June 2011) See the whole document.	1-4, 11
Y		12-15, 17
A		5-10, 16, 18-20
Y	SALVADOR, JESUS M. et al., "The autoimmune suppressor Gadd45a inhibits the T cell alternative p38 activation pathway", Nature Immunology, 27 February 2005, Vol.6, No.4, pp.396-402 See abstract: p.396, left column, lines 19-20 and p.401, left column, lines 28-29.	12-15, 17
A		1-11, 16, 18-20
X	WO 2005-077983 A2 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATE OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 25 August 2005 See p.20, line 21 - p.21, line 4; claims 5-6.	1-4, 11
Y		12-15, 17
A		5-10, 16, 18-20
☒ 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 24 February 2014 (24.02.2014)		Date of mailing of the international search report 24 February 2014 (24.02.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung  Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2013/070813

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JIRMANOVA, LUDMILA et al., 'Lack of the T cell-specific alternative p38 activation pathway reduces autoimmunity and inflammation', Blood, 22 September 2011, Vol.118, No.12, pp.3280-3289 See abstract.	1-20
A	SALVADOR, JESUS M. et al., 'Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosin kinases', Nature Immunology, 27 February 2005, Vol.6, No.4, pp.390-395 See abstract.	1-20

Information on patent family members

PCT/US2013/070813

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	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P 1/18
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K 7/08

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, UA, UG, US

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 アシュウェル, ジョナサン ディー.
アメリカ合衆国 メリーランド 20815, チェビー チェース, ダニエル ロード 2703

(72)発明者 アラム, ムハンマド エス.
アメリカ合衆国 メリーランド 20852, ロックビル, ロックビル パイク 10444,
アパートメント ナンバー 201

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA18 CA59 MA56 MA66 NA14 ZA02 ZA66
ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB21 ZB26
4H045 AA10 AA30 BA17 BA41 CA40 EA20