

(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2018-535404

(P2018-535404A)

(43) 公表日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(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 H O 4 5
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
CO 7 K 16/24 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
	CO 7 K 16/24	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁)		

(21) 出願番号	特願2018-516740 (P2018-516740)	(71) 出願人	518098047 ユリウス・マクシミリアン・ユニヴェルシ テート・ヴェルツブルク
(86) (22) 出願日	平成28年9月30日 (2016. 9. 30)		
(85) 翻訳文提出日	平成30年5月29日 (2018. 5. 29)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/073519		ドイツ・97070・ヴェルツブルク・ザ ンデルリング・2
(87) 国際公開番号	W02017/055612	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開日	平成29年4月6日 (2017. 4. 6)		
(31) 優先権主張番号	1517527.6	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(32) 優先日	平成27年10月2日 (2015. 10. 2)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(31) 優先権主張番号	1607800.8	(72) 発明者	イェルク・ヴィッシュフーゼン ドイツ・97082・ヴェルツブルク・ロ イトフレサーヴェーク・14アー
(32) 優先日	平成28年4月29日 (2016. 4. 29)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の臨床アウトカムを予測するための診断マーカーとしてのGDF-15

(57) 【要約】

本発明は、例えば、抗PD-1を用いる免疫チェックポイントブロッカー治療に対するヒト癌患者の治療奏効の確率を予測するための方法及び免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存の確率を予測するための方法、並びにこれらの方法において使用できる装置及びキットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

免疫チェックポイントブロッカー治療に対するヒト癌患者の治療奏効の確率を予測するための方法であって、

- a) 前記患者から得られたヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを決定する工程と、
- b) 決定された前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルに基づいて、前記治療奏効の確率を予測する工程とを含み、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減が、治療奏効の確率の増大を示し、癌が固形癌である、方法。

【請求項2】

免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存の確率を予測するための方法であって、

- a) 前記患者から得られたヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを決定する工程と、
- b) 決定された前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルに基づいて、前記生存の確率を予測する工程とを含み、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減が、生存の確率の増大を示し、癌が固形癌である、方法。

【請求項3】

工程b)が、工程a)において決定された前記hGDF-15のレベルを、hGDF-15閾値レベルと比較する工程を含み、工程a)において決定された前記hGDF-15のレベルの、前記hGDF-15閾値レベルとの比較に基づいて前記確率が予測され、前記hGDF-15閾値レベルと比較して低減される前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルは、前記確率が、前記hGDF-15閾値レベルでの確率と比較して増大されるか又は前記hGDF-15閾値レベルでの確率を上回ることを示す、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

ヒト血液サンプルがヒト血清サンプルである、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

hGDF-15閾値レベルが、1.2ng/mlから8.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、1.5ng/mlから7.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、2.0ng/mlから6.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、2.5ng/mlから5.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、3.0ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記hGDF-15閾値レベルと比較した前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減は、前記確率の増大が、5%より高い、10%より高い、20%より高い、30%より高い、40%より高い、50%より高い、60%より高い、70%より高い、80%より高い、又は90%より高い確率であることを示す、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

固形癌が、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、脳腫瘍、乳癌、胃癌、腎細胞癌、ユーイング肉腫、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌からなる群から選択され、癌が、好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌及び子宮頸癌からなる群から選択され、癌が、より好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌及び胃癌からなる群から選択される、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

癌が、黒色腫、口腔扁平上皮癌、結腸直腸癌及び前立腺癌からなる群から選択される、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

癌が黒色腫である、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項10】

hGDF-15閾値レベルが、3.0ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであり、hGDF-15閾値レベルが、好ましくは、3.2ng/mlから3.7ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであり、hGDF-15閾値レベルが、最も好ましくは、3.4ng/mlのhGDF-15レベルである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

工程a)が、hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分を使用することによってhGDF-15のレベルを決定する工程を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、hGDF-15と複合体を形成する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

1種又は複数の抗体が、少なくとも1種のポリクローナル抗体を含む、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項14】

1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、少なくとも1種のモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、請求項11、12又は13に記載の方法。

【請求項15】

結合が、hGDF-15上のコンフォメーション的又は不連続エピトープとの結合であり、コンフォメーション的又は不連続エピトープが、配列番号25及び配列番号26のアミノ酸配列に含まれる、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

抗体又はその抗原結合部分が、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分が、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域、及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む、請求項14又は15に記載の方法。

【請求項17】

免疫チェックポイントブロッカーが、
i)好ましくは、ヒトPD-1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である、ヒトPD-1の阻害剤、及び
ii)好ましくは、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である、ヒトPD-L1の阻害剤
からなる群の1種又は複数から選択される、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

免疫チェックポイントブロッカーが、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

免疫チェックポイントブロッカーが、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、請求項17又は18に記載の方法。

【請求項20】

ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、前記免疫チェックポイントブロッカーを受けていた患者由来のサンプルである、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、免疫チェックポイントブロッカー及び/又はその生物学的代謝産物を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、免疫チェックポイントブロッカーを受けていない患者由来のサンプルである、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 3】

in vitro方法である、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイによって決定される、請求項1から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、電気化学発光アッセイによって決定される、請求項1から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

電気化学発光アッセイが、

10

(A)ストレプトアビジンコーティングされたビーズ又はストレプトアビジンコーティングされた常磁性ナノ粒子、

(B)hGDF-15と結合可能な、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分、

(C)サンプル由来のhGDF-15、及び

(D)hGDF-15と結合可能な、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分

の間の検出複合体を形成する工程を含むサンドイッチ検出法であり、

前記検出複合体が構造(A)-(B)-(C)-(D)を有し、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分が第1のhGDF-15エピトープと結合し、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分が前記第1のhGDF-15エピトープとは異なる第2のhGDF-15エピトープと結合し、

20

方法が、電気化学発光を測定することによって検出複合体を検出する工程を更に含み、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが電気化学発光測定に基づいて決定される、請求項25に記載の方法。

【請求項 2 7】

ヒト血液サンプルがヒト血清サンプルであり、前記治療奏効の確率が、0.159~0.698の95%信頼区間で、連続予測変数としてng/mlでのhGDF-15の血清レベルについて0.389のオッズ比を使用して予測される、請求項1及び3から26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

治療奏効が、RECIST基準、バージョン1.1による奏効である、請求項1及び3から27のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 9】

生存の確率が、アウトカム変数として全生存を、連続予測変数としてGDF-15を用いるハザード比を使用して予測され、GDF-15血清レベルの1ng/mlの増大につき、死亡のリスクが1.10~1.47の95%信頼区間で1.27倍増大することが予測される、請求項2から26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

工程a)において、hGDF-15のレベルが、請求項14から16のいずれか一項に定義される抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を捕捉することと、ポリクローナル抗体を用いてhGDF-15を検出すること、又はhGDF-15を捕捉する抗体とは異なるエピトープと結合するモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を検出することによって決定される、請求項11から29のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 1】

請求項1から30のいずれか一項に記載の方法を実行するように構成された装置。

【請求項 3 2】

請求項25又は26に記載の方法を実行するように構成された電気化学発光分析器である、請求項28に記載の装置。

【請求項 3 3】

(i)ストレプトアビジンコーティングされたビーズ、

(ii)hGDF-15と結合可能な、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分、

50

(iii)組換えhGDF-15、

(iv)hGDF-15と結合可能な、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分、及び任意選択で、

(v)使用のための説明書、好ましくは、請求項1から30のいずれか一項に記載の方法における使用のための説明書

を含む検出キットであって、

ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分が第1のhGDF-15エピトープと結合可能であり、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分が前記第1のhGDF-15エピトープとは異なる第2のhGDF-15エピトープと結合可能である、検出キット。

【請求項34】

hGDF-15と結合可能な第1の抗体又はその抗原結合部分、及びhGDF-15と結合可能な第2の抗体又はその抗原結合部分の一方が、請求項15又は16に定義される抗体又はその抗原結合部分である、請求項33に記載の検出キット。

【請求項35】

免疫チェックポイントブロッカーに対するヒト癌患者の奏効を予測するためのin vitro方法における、請求項33又は34に記載のキットの使用であって、癌が固形癌である、使用。

【請求項36】

免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存の確率を予測するためのin vitro方法における、請求項33又は34に記載のキットの使用であって、癌が固形癌である、使用。

【請求項37】

免疫チェックポイントブロッカーが、請求項17から19のいずれか一項において定義される通りである、請求項33から36のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫チェックポイントブロッカー治療に対するヒト癌患者の治療奏効の確率を予測するための方法、及び免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存の確率を予測するための方法、並びにこれらの方法において使用できる装置及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

今日まで、多数の癌が、依然として満たされていない医学的必要性の領域である。更に、いくつかの癌については、患者のサブセットは癌療法に対して奏効を示し、患者の他のサブセットでは奏効しない。多数の場合には、患者が特定の癌治療に対して奏効するか否かを決定する因子は、まだ知られていない。

【0003】

多数の種類 of 癌が、VEGF、PDGF、TGF- β 及びGDF-15等を含む増殖因子を発現することがわかっている。GDF-15、成長分化因子-15は、TGF- β スーパーファミリーの多様なメンバーである。それは前駆体として細胞内で発現され、続いてプロセシングされ、最終的に細胞から環境中に分泌されるようになるタンパク質である。GDF-15の、活性で十分にプロセシングされた(成熟した)形態及び前駆体の両方とも、細胞の外側で見られることがある。前駆体は、COOH-末端アミノ酸配列を介して細胞外マトリックスと共有結合によって結合し(Bauskin ARら、Cancer Research 2005年)、そのようにして、細胞の外部にある。GDF-15の活性で十分にプロセシングされた(成熟した)形態は可溶性であり、血液の血清中に見られる。したがって、GDF-15のプロセシングされた形態は、潜在的標的細胞が可溶性GDF-15リガンドの受容体を発現する限り、血液循環とつながっている身体内の任意の標的細胞に対して潜在的に作用し得る。

【0004】

10

20

30

40

50

妊娠の際は、GDF-15は、生理学的条件下で胎盤中に見られる。しかし、多数の悪性癌(特に、高悪性度脳腫瘍、黒色腫、肺癌、胃腸腫瘍、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌及び乳癌(Mimeault M及びBatra SK、J. Cell Physiol 2010年))は、腫瘍において、並びに血液の血清においてGDF-15レベルの増大を示す。同様に、高いGDF-15発現と化学療法抵抗性の間(Huang CYら、Clin. Cancer Res. 2009年)及び高いGDF-15発現と予後不良の間(Brown DAら、Clin. Cancer Res. 2009年)それぞれに相関関係が記載されている。Wallentin Lら(PLoS One. 2013年12月2日;8(12):e78797)では、ヒトにおいて心血管及び癌罹病率及び死亡率を予想するためにGDF-15を使用した。

【 0 0 0 5 】

GDF-15は、免疫組織化学によって評価されるような種々のWHOグレードの神経膠腫において発現される(Rothら、Clin. Cancer Res. 2010年)。更に、Rothらは、SMA560神経膠腫細胞において、内因性GDF-15を標的とする低分子ヘアピン型RNAを発現するDNA構築物又は対照構築物を安定に発現させた。これらの予め確立された安定な細胞株を使用する場合に、GDF-15ノックダウンSMA560細胞を有するマウスにおける腫瘍形成が、対照構築物を有するマウスと比較して遅延されることを観察した。

【 0 0 0 6 】

特許出願WO2005/099746及びWO2009/021293は、マウスにおいてin vivoで、腫瘍誘発性質量損失に対するヒトGDF-15(hGDF-15)の効果をアンタゴナイズ可能な抗ヒトGDF-15抗体(Mab26)に関する。同様に、Johnen Hら(Nature Medicine、2007)は、癌誘発性拒食症及び質量損失に対する抗ヒトGDF-15モノクローナル抗体の効果を報告したが、癌によって形成された腫瘍の大きさに対する抗ヒトGDF-15抗体の効果は全く観察しなかった。

【 0 0 0 7 】

WO2014/049087及びPCT/EP2015/056654は、hGDF-15に対するモノクローナル抗体及びその医学的使用に関する。

【 0 0 0 8 】

癌療法への最近開発されたアプローチは、ヒトPD-1の阻害剤及びヒトPD-L1の阻害剤等の免疫チェックポイントブロッカーの使用である。これらの免疫チェックポイントブロッカーの使用の背後にある論理的根拠は、免疫系が癌抗原及びそれぞれの癌細胞をターゲットिंगすることを防ぐ免疫チェックポイントをブロックすることによって、癌に対する免疫応答がより効果的になり得るということである。免疫チェックポイントブロッカー並びに免疫チェックポイントブロッカーの特定の組合せが、黒色腫患者において患者の生存を改善することがわかっているが(Cully M、「Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy」、Nat Rev Drug Discov. 2015年6月14日(6):374-5頁)、すべての黒色腫患者が完全奏効を示したわけではなく、多数のその他の癌についての結果は公開されておらず、依然として、その他の適応症における結果はあまり好適なものではないと示唆する理由(変異負荷のような)がある。現在のランドマークは、KEYNOTE-006(ClinicalTrials.gov番号、NCT01866319)試験であり、わずか34%未満の奏効率しか有さない。RobertらPembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med 2015年;372:2521-2532頁。

【 0 0 0 9 】

癌患者が免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対して応答するか否かを予測する予後因子の現在の知識は、依然としてかなり限定されている。PD-1阻害剤を用いて治療された非小細胞肺癌患者における客観的奏効の改善、耐久性のある臨床的有用性及び無増悪生存期間と相関することがわかっている1つの特定の因子として、腫瘍におけるより高い非同義変異負荷がある(Rizvi NAら:「Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer」Science 2015年4月3日;348(6230):124~8頁)。しかし、全エキソームのレベルでのこのような変異負荷を決定するには、面倒な全エキソームシーケンシングが必要である。

【 0 0 1 0 】

黒色腫及び非小細胞肺癌を含むいくつかの腫瘍実体における抗PD-1療法に対する客観的

10

20

30

40

50

奏効と相関する別の特定の予後因子として、腫瘍細胞のPD-L1発現がある(Taubeら、「Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy」、Clin Cancer Res. 2014年10月1日;20(19):5064-74頁)。しかし、対照的に、メタ解析によって、抗PD-1療法を用いて治療されていなかった非小細胞肺癌患者を含んでいた患者集団については、高いPD-L1発現は、順調な予後とではなく、むしろ予後不良と相関していたことがわかった(Wang Aら:「The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis」Eur J Surg Oncol. 2015年4月;41(4):450-6頁)。更に、抗PD-1治療に対する奏効はまた、その切り出された腫瘍切片が、PD-L1発現について識別可能な染色を示さなかった患者においても観察されている。更に、進行型腎細胞癌における最近の研究によって、患者における、PD-L1の発現と抗PD-1抗体ニボルマブに対する応答の間に有意な相関がないことがわかった(Motzer RJら、Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2015年9月25日)。更に、PD-L1発現の検出は組織サンプルを必要とするが、これは常に入手可能ではない。したがって、PD-L1発現の検出は、可能性ある診断マーカーとしての使用に関する多数の不利点を有する。

10

【0011】

その他の患者グループと比較して、抗PD-1治療された患者グループにおける高PD-L1発現の予測値に関するこれらの反対の結果から、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療が、その他の癌療法とは異なる、異なるセットの予後因子に従う特定の形態の癌治療であることは明らかである。

20

【0012】

従来の癌療法と、免疫チェックポイントブロッカーを用いる療法の間のこれらの相違の理由の1つは、免疫チェックポイントブロッカーによる免疫系の活性化であり、これは、その他の癌療法において一般に観察されない機序である。

【0013】

更に、全エキソームシーケンシング又は存在する腫瘍サンプル及びその解析のいずれかを必要とするという事実により、上記の診断のための方法は不利である。その他のマーカーを探索して、KK Tsaiらは弱い予測変数しか見出さなかったが、それらの中では、転移のパターン(肺転移の存在及び肝臓転移の不在)、先行イピリムマブ(すなわち、抗PD-1を用いる早期治療)がないこと、及び正常LDHレベルが最良であった(KK Tsaiら、JCO 33, 2015年 (suppl. abstr. 9031)。しかし、全奏効率は40%であったが、最良のサブグループ(肺転移及び肝臓転移なし)は62.2%の奏効率を示した。低い又は正常LDHを有する患者の中では、奏効率は52.2%であった。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】WO2005/099746

【特許文献2】WO2009/021293

【特許文献3】WO2014/049087

【特許文献4】PCT/EP2015/056654

40

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Bauskin ARら、Cancer Research 2005年

【非特許文献2】Mimeault M及びBatra SK、J. Cell Physiol 2010年

【非特許文献3】Huang CYら、Clin. Cancer Res. 2009年

【非特許文献4】Brown DAら、Clin. Cancer Res. 2009年

【非特許文献5】Wallentin Lら(PLoS One. 2013年12月2日;8(12):e78797)

【非特許文献6】Rothら、Clin. Cancer Res. 2010年

【非特許文献7】Johnen Hら(Nature Medicine、2007)

【非特許文献8】Cully M、「Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront

50

- of cancer immunotherapy」, Nat Rev Drug Discov. 2015年6月14日(6):374-5頁
- 【非特許文献9】Robert Pembrolicumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med 2015年;372:2521-2532頁
- 【非特許文献10】Rizvi NA: 「Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer」 Science 2015年4月3日;348(6230):124~8頁
- 【非特許文献11】Taube: 「Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy」, Clin Cancer Res. 2014年10月1日;20(19):5064-74頁
- 【非特許文献12】Wang A: 「The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis」 Eur J Surg Oncol. 2015年4月;41(4):450-6頁 10
- 【非特許文献13】Motzer RJ: Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2015年9月25日
- 【非特許文献14】KK Tsai, JCO 33, 2015年 (suppl. abstr. 9031)
- 【非特許文献15】Cheng PF: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 2015年9月16日;145:w14183
- 【非特許文献16】Li B and Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics.2011年8月4日;12:323.doi:10.1186/1471-2105-12-323 20
- 【非特許文献17】Paul, W.E.(編):Fundamental Immunology第2版Raven Press, Ltd., New York 1989年の第7章
- 【非特許文献18】Kabat (Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983年)
- 【非特許文献19】Chothia (Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989年12月21~28日;342(6252):877~83頁)
- 【非特許文献20】Giudicelli (IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res.2004年7月1日;32(Web Server issue):W435-40) 30
- 【非特許文献21】Kohler及びMilstein(Nature、1975年8月7日;256(5517):495~7頁)
- 【非特許文献22】Harlow及びLane(「Antibodies: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988年)
- 【非特許文献23】Clackson (Nature. 1991年8月15日;352(6336):624~8頁)
- 【非特許文献24】Marks (J Mol Biol. 1991年12月5日;222(3):581~97頁)
- 【非特許文献25】Riechmann (Nature. 1988年3月24日;332(6162):323~7頁)
- 【非特許文献26】Jones (Nature. 1986年5月29日~6月4日;321(6069):522~5頁)
- 【非特許文献27】Holliger P (「Diabodies」:small bivalent and bispecific fragments」Proc Natl Acad Sci U S A. 1993年7月15日;90(14):6444~8頁)
- 【非特許文献28】Holt LJ (「Domain antibodies: proteins for therapy」Trends Biotechnol. 2003年11月;21(11):484~90頁) 40
- 【非特許文献29】Saerens D (「Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics」Curr Opin Pharmacol. 2008年10月;8(5):600~8頁. Epub 2008年8月22日)
- 【非特許文献30】Arbabi Ghahroudi M (「Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies」FEBS Lett. 1997年9月15日;414(3):521~6頁)
- 【非特許文献31】Weinberg R. The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006年、850頁
- 【非特許文献32】Gouttefangeas C: 「Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Ap 50

plications, Quality Assurance and Future.」(2015年)、Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (N. Rezaei editor). Springer. 第25章:471 ~ 486頁

【非特許文献 3 3】Van der Burg SHら:「Immunoguiding, the final frontier in the immunotherapy of cancer.」(2014年)、Cancer Immunotherapy meets oncology (CM Britten, S Kreiter, M. Diken & HG Rammensee編). Springer International Publishing Switzerland 37 ~ 51頁 ISBN: 978-3-319-05103-1

【非特許文献 3 4】Eisenhauerら: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur. J. Cancer. 第45巻、第2号、2009年1月、228 ~ 47頁

【非特許文献 3 5】Tanno Tら:「Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease」Curr Opin Hematol. 2010年5月;17(3):184 ~ 190頁

【非特許文献 3 6】Sambrookら(「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989年)

【非特許文献 3 7】Ausubelら(「Current Protocols in Molecular Biology」Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992年)

【非特許文献 3 8】Altschulら(1990)「Basic local alignment search tool」Journal of Molecular Biology 215.403 ~ 410頁

【非特許文献 3 9】Altschulら:(1997年) Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389 ~ 3402頁

【非特許文献 4 0】Siegel DL(「Recombinant monoclonal antibody technology」Transfus Clin Biol. 2002年1月;9(1):15 ~ 22頁

【非特許文献 4 1】Suckauら Proc Natl Acad Sci U S A. 1990年12月;87(24):9848 ~ 9852頁

【非特許文献 4 2】R.Stefanescuら、Eur.J.Mass Spectrom. 13、69 ~ 75頁(2007年)

【非特許文献 4 3】Zhang, J., Yao, Y.-H., Li, B.-G., Yang, Q., Zhang, P.-Y.及びWang, H.-T.(2015年).Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. Scientific Reports 5、9800

【非特許文献 4 4】Tumehら、Nature. 2014年11月27日; 515(7528):568 ~ 71頁

【非特許文献 4 5】Lasithiotakis,KGら、Cancer/107/1331 ~ 9. 2006年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

これらの理由のために、当技術分野では、免疫チェックポイントブロッカーを用いるこれらの新規治療の臨床アウトカムの確率を予測するために使用できる予後因子を同定する必要がある。更に、さほど面倒ではなくより容易な方法で、このような治療の臨床アウトカムの確率を予測することを可能にする予後因子が必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、以下に記載される実施形態を提供することによって、当技術分野において、上記の必要性を満たし、上記の問題を解決する:

【0018】

特に、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する奏効を予測するために使用できる因子を同定する試みにおいて、本発明者らは、驚くべきことに、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する正の臨床アウトカムの確率が、患者血清中のhGDF-15レベルが増大するにつれ有意に低減すること、逆もまた同様であることを見出した。したがって、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の正の臨床アウトカムの確率は、hGDF-15レベルと逆相関する。この臨床アウトカムは、例えば、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する奏効又は免疫チェックポイントブロッカーを用いる治

10

20

30

40

50

療後の患者の生存であり得る。

【0019】

例えば、黒色腫患者におけるhGDF-15血清レベルが1ng/ml増大すると、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する奏効の確率が約60%低減する。逆に、黒色腫患者におけるhGDF-15血清レベルが1ng/ml低減すると、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する奏効の確率が約60%増大する。同様に、hGDF-15血清レベルが1ng/ml増大すると、患者の死亡の確率が1.27倍増大する。

【0020】

hGDF-15発現は黒色腫に限定されず、多数のその他の固形癌にも存在する。同様に、黒色腫以外の固形腫瘍も免疫チェックポイントブロッカーを用いて治療できる。したがって、本発明によれば、有利なことに、患者由来の血液サンプル中のhGDF-15のレベルを使用して、黒色腫においてだけでなく、本明細書において言及される固形癌のすべてにおいて、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療後の患者の正の臨床アウトカムの確率を予測できる。

10

【0021】

更に、本発明の方法はまた、全エキソームシーケンシング又は存在する腫瘍サンプル(常に入手可能であるわけではない)を必要とせず、血液サンプルの簡単な解析に基づくものであり得るので有利である。

【0022】

したがって、本発明は、以下に記載される好ましい実施形態を提供することによって、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の臨床アウトカムを予測する改善された手段を提供する：

20

【0023】

1.免疫チェックポイントブロッカー治療に対するヒト癌患者の治療奏効の確率を予測するための方法であって、

- a)前記患者から得られたヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを決定する工程と、
- b)前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15の決定されたレベルに基づいて、前記治療奏効の確率を予測する工程とを含み、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減が、治療奏効の確率の増大を示し、癌が固形癌である方法。

2.免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存の確率を予測するための方法であって、

30

- a)前記患者から得られたヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを決定する工程と、
- b)前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15の決定されたレベルに基づいて、前記生存の確率を予測する工程とを含み、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減が、生存の確率の増大を示し、癌が固形癌である方法。

3.工程b)が、工程a)において決定された前記hGDF-15のレベルを、hGDF-15閾値レベルと比較する工程を含み、工程a)において決定された前記hGDF-15のレベルの、前記hGDF-15閾値レベルとの比較に基づいて前記確率が予測され、前記hGDF-15閾値レベルと比較して低減される前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルは、前記確率が、前記hGDF-15閾値レベルでの確率又はそれを上回る確率と比較して増大されることを示す、項目1又は2に記載の方法。

40

4.ヒト血液サンプルがヒト血清サンプルである、項目1、2又は3に記載の方法。

5.hGDF-15閾値レベルが、1.2ng/mlから8.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、1.5ng/mlから7.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、2.0ng/mlから6.0ng/mlの範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、2.5ng/mlから5.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、3.0ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルである、項目4に記載の方法。

6.前記hGDF-15閾値レベルと比較した前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減は、前記確率の増大が、5%より高い、10%より高い、20%より高い、30%より高い、40%より

50

高い、50%より高い、60%より高い、70%より高い、80%より高い、又は90%より高い確率であることを示す、項目1から5のいずれか一項に記載の方法。

7. 固形癌が、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌(stomach cancer)、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、脳腫瘍、乳癌、胃癌(gastric cancer)、腎細胞癌、ユーイング肉腫、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌からなる群から選択され、癌が、好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌(stomach cancer)、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌及び子宮頸癌からなる群から選択され、癌が、より好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌及び胃癌(stomach cancer)からなる群から選択される、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

10

8. 癌が、黒色腫、口腔扁平上皮癌、結腸直腸癌及び前立腺癌からなる群から選択される、項目1から7のいずれか一項に記載の方法。

9. 癌が黒色腫である、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

10. hGDF-15閾値レベルが、3.0ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであり、hGDF-15閾値レベルが、好ましくは、3.2ng/mlから3.7ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであり、hGDF-15閾値レベルが、最も好ましくは、3.4ng/mlのhGDF-15レベルである、項目9に記載の方法。

11. 工程a)が、hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分を使用することによってhGDF-15のレベルを決定する工程を含む、項目1から10のいずれかに記載の方法。

20

12. hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、hGDF-15と複合体を形成する、項目11に記載の方法。

13. 1種又は複数の抗体が、少なくとも1種のポリクローナル抗体を含む、項目11又は12に記載の方法。

14. 1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、少なくとも1種のモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、項目11、12又は13に記載の方法。

15. 結合が、hGDF-15上のコンフォメーション又は不連続エピトープとの結合であり、コンフォメーション又は不連続エピトープが、配列番号25及び配列番号26のアミノ酸配列によって含まれる、項目14に記載の方法。

16. 抗体又はその抗原結合部分が、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分が、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む、項目14又は15に記載の方法。

30

17. 免疫チェックポイントブロッカーが、

i) 好ましくは、ヒトPD-1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である、ヒトPD-1の阻害剤

ii) 好ましくは、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である、ヒトPD-L1の阻害剤

からなる群のうち1種又は複数から選択される、項目1から16のいずれかに記載の方法。

40

18. 免疫チェックポイントブロッカーが、ヒトPD-1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、項目17に記載の方法。

19. 免疫チェックポイントブロッカーが、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、項目17又は18に記載の方法。

20. ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、前記免疫チェックポイントブロッカーを受けていた患者由来のサンプルである、項目1から19のいずれか一項に記載の方法。

21. ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、免疫チェックポイントブロッカー及び/又はその生物学的代謝産物を含む、項目20に記載の方法。

22. ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、免疫チェックポイントブロッカーを受けていない患者由来のサンプルである、項目1から19のいずれか一項に記載の方法。

50

23. in vitro方法である、項目1から22のいずれか一項に記載の方法。

24. 工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイによって決定される、項目1から23のいずれかに記載の方法。

25. 工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、電気化学発光アッセイによって決定される、項目1から23のいずれか一項に記載の方法。

26. 電気化学発光アッセイが、

(A) ストレプトアビジンコーティングされたビーズ又はストレプトアビジンコーティングされた常磁性ナノ粒子、

(B) hGDF-15と結合可能な、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分、

(C) サンプル由来のhGDF-15、及び

(D) hGDF-15と結合可能な、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分の間の検出複合体を形成する工程を含むサンドイッチ検出法であり、

前記検出複合体が構造(A)-(B)-(C)-(D)を有し、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分が第1のhGDF-15エピトープと結合し、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分が前記第1のhGDF-15エピトープとは異なる第2のhGDF-15エピトープと結合し、

方法が、電気化学発光を測定することによって検出複合体を検出する工程を更に含み、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが電気化学発光測定に基づいて決定される、項目25に記載の方法。

27. ヒト血液サンプルがヒト血清サンプルであり、前記治療奏効の確率が、0.159~0.698の95%信頼区間で、連続予測変数としてng/mlでのhGDF-15の血清レベルについて0.389のオッズ比を使用して予測される、項目1及び3から26のいずれか一項に記載の方法。

28. 治療奏効が、RECIST基準、バージョン1.1による奏効である、項目1及び3から27のいずれか一項に記載の方法。

29. 生存の確率が、アウトカム変数として全生存を、連続予測変数としてGDF-15を用いるハザード比を使用して予測され、GDF-15血清レベルが1ng/ml増大するにつれ、死亡のリスクが1.10~1.47の95%信頼区間で1.27倍増大することが予測される、項目2から26のいずれか一項に記載の方法。

30. 工程a)において、hGDF-15のレベルが、項目14から16のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を捕捉すること、及びポリクローナル抗体を用いてhGDF-15を検出すること、又はhGDF-15を捕捉する抗体とは異なるエピトープと結合するモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を検出することによって決定される、項目11から29のいずれか一項に記載の方法。

31. 項目1から30のいずれか一項に記載の方法を実施するように構成された装置。

32. 項目25又は項目26のいずれかに記載の方法を実施するように構成された電気化学発光分析器である、項目28に記載の装置。

33. (i) ストレプトアビジンコーティングされたビーズ、

(ii) hGDF-15と結合可能な、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分、

(iii) 組換えhGDF-15、

(iv) hGDF-15と結合可能な、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分、及び任意選択で、

(v) 使用のための説明書、好ましくは、項目1から30に記載の方法における使用のための説明書

を含む検出キットであって、

ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分が第1のhGDF-15エピトープと結合可能であり、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分が前記第1のhGDF-15エピトープとは異なる第2のhGDF-15エピトープと結合可能である、検出キット。

34. hGDF-15と結合可能な第1の抗体又はその抗原結合部分、及びhGDF-15と結合可能な第2の抗体又はその抗原結合部分が、項目15から16のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合部分である、項目33に記載の検出キット。

10

20

30

40

50

35. 癌が固形癌である、免疫チェックポイントブロッカーに対するヒト癌患者の奏効を予測するための *in vitro* 方法における、項目33から34のいずれか一項に記載のキットの使用。

36. 癌が固形癌である、免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存の確率を予測するための *in vitro* 方法における、項目33から34のいずれか一項に記載のキットの使用。

37. 免疫チェックポイントブロッカーが、項目17から19のいずれか一項において定義される通りである、項目33から36のいずれか一項に記載の使用。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、治療レジメンに対するレスポンドー及びノンレスポンドーのGDF-15血清レベルを示す図である。

【図2】図2は、それぞれ、 $<1.8\text{ng/ml}$ 、 $1.8\sim 4.2\text{ng/ml}$ 及び $>4.2\text{ng/ml}$ のhGDF-15血清レベルを有する患者グループ中のレスポンドー及びノンレスポンドーの数を示す図である。

【図3】図3は、連続予測変数としてGDF-15を使用する一般化された線形モデルによって予測されるような、治療に対する奏効(レスポンドー1)の確率を示す図である。丸はデータを示し、曲線はモデルを示す。垂直線は、治療奏効の確率が0.5である場合のGDF-15濃度を示す。

【図4】図4は、GDF-15血清レベル(<1.8 、 $1.8\sim 4.2$ 、 $>4.2\text{ng/ml}$)によって規定される3種のグループにおける生存のカプラン・マイヤー曲線を示す図である。

【図5A】図5Aは、連続予測変数としてLDHを使用する一般化された線形モデルによって予測された、治療に対する奏効の確率(レスポンドー1)を示す図である。丸はデータを示し、曲線はモデルを示す。垂直線は、治療奏効の確率が0.5である場合のLDH濃度を示す。患者コホートは同一であった。しかし、4人の患者では、溶血によりLDHレベルの信頼のける決定ができなかった。

【図5B】図5Bは、レスポンドー及びノンレスポンドー並びにそれぞれのhGDF-15及びLDHレベルのグラフである。すべてのレスポンドーを対象とするようにカットオフ値が選択される場合には、GDF-15に基づく試験では、6人(9人のうち)のノンレスポンドーの同定が可能となるが、LDHレベルに基づく解析は、4人(9人のうち)のノンレスポンドーしか識別できない。LDH試験については、データの喪失を引き起こす4つの溶血サンプルは排除しなければならなかった。

【図6】図6は、図中に示されるように、それぞれ、GDF-15について並びにT細胞マーカータンパク質CD3及びCD8について免疫組織化学によって染色された、GDF-15免疫反応性のない(上のパネル)又は高いGDF-15免疫反応性を有する(下のパネル)黒色腫脳転移から得た例示的組織切片を示す図である。CD3及びCD8陽性細胞は、高GDF-15サンプル中で矢印によって示されている。CD3及びCD8染色は、連続切片の同一領域から作製した(ただし同一切片からではない)。

【図7A】図7Aは、種々の黒色腫脳転移にわたる、GDF-15スコアに対するCD3⁺細胞のパーセンテージのプロットを示す図である(7A)。

【図7B】図7Bは、種々の黒色腫脳転移にわたる、GDF-15スコアに対するCD8⁺細胞のパーセンテージのプロットを示す図である(7B)。

【図8】図8は、種々の腫瘍実体(黒色腫、CRC、RCC、NSCLC及びSCLC)からの脳転移における、CD8⁺及びCD3⁺T細胞それぞれのパーセンテージに対するGDF-15スコアのプロットを示す図である。

【図9-1】図9Aは、1秒あたりの視野あたりのローリングT細胞数を示す図である。データは、チャンネル番号3(「GDF-15」)及びチャンネル番号2(「対照」)から得た。

【図9-2】図9Bは、T細胞のローリング速度を示す図である(0.2秒あたりのピクセルで測定された)。データは、チャンネル番号3(「GDF-15」)及びチャンネル番号2(「対照」)から得た。図9Cは、視野あたりの接着細胞数を示す図である。データは、チャンネル番号3(「GDF-15」)及びチャンネル番号2(「対照」)から得た。

10

20

30

40

50

【図9-3】図9Dは、視野あたりの接着細胞数を示す図である。データは、チャンネル番号3(「GDF-15」)及びチャンネル番号2(「対照」)から得た。

【図10】図10は、1秒あたりの視野あたりのローリングT細胞数を示す図である。データは、チャンネル番号1(「陰性対照」としての刺激されていないHUVECでの対照T細胞)、チャンネル番号2(「陽性対照」としての刺激されたHUVECでの対照T細胞)、チャンネル番号3(「GDF-15」)、チャンネル番号4(「UACC257」:分泌されたGDF-15を含有するUACC257黒色腫細胞の上清中で培養されたT細胞)及びチャンネル番号5(「UACC257+抗hGDF-15」:hGDF-15阻害剤として抗hGDF-15抗体B1-23で分泌されたGDF-15を枯渇させたUACC257黒色腫細胞の上清中で培養されたT細胞)から得た。

【図11】図11は、それぞれ、 $<1.5\text{ng/ml}$ 及び 1.5ng/ml のGDF-15レベルを有する患者グループにおける累積生存率を示す図である。

【図12】図12は、それぞれ、高GDF-15レベルを有する患者グループ(すなわち、最高GDF-15レベルを有する50人の患者)及び低GDF-15レベルを有する患者グループ(すなわち、最低GDF-15レベルを有する49人の患者)における累積生存率を示す図である(全研究コホートの中央値折半)。

【図13A】図13Aは、hGDF-15血清レベルが腫瘍の遺伝子変異量と有意に相関しないことを示す図である。癌患者から得たサンプル中のhGDF-15 mRNAレベルを、癌において同定された体細胞変異の数に対してプロットした。体細胞変異は、エキソームシーケンシングの使用によって決定した。データは、University Hospital Zurich(Cheng PFら: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly.2015年9月16日;145:w14183)から得たUZHウェブツールを使用することによって解析した。図13Aは、高悪性度悪性黒色腫を有する患者のみを考慮するthe Cancer Genome Atlas (TCGA)から得た癌患者データのプロットを示す図である(Cancer Genome Atlasは、Cheng PFら:Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine . Swiss Med Wkly.2015年9月16日;145:w14183の参考文献中に記載されている)。GDF-15発現は、RSEM(「期待値最大化によるRNA Seq」)ソフトウェアパッケージを使用する正規化によって評価した(Li B and Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics.2011年8月4日;12:323.doi:10.1186/1471-2105-12-323)。

【図13B】図13Bは、hGDF-15血清レベルが腫瘍の遺伝子変異量と有意に相関しないことを示す図である。癌患者から得たサンプル中のhGDF-15 mRNAレベルを、癌において同定された体細胞変異の数に対してプロットした。体細胞変異は、エキソームシーケンシングの使用によって決定した。データは、University Hospital Zurich(Cheng PFら: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly.2015年9月16日;145:w14183.)から得たUZHウェブツールを使用することによって解析した。図13Bは、個別に解析された、University Hospital Zurichから得た40人の更なる転移性悪性黒色腫患者から得た癌患者データのプロットを示す図である。

【図14】図14は、野生型腫瘍又はトランスジェニック(tg)hGDF15を過剰発現する腫瘍を有するマウスにおけるCD8aの免疫細胞化学写真を示す図である。組織切片を、抗CD8a(eBioscience社から購入した1:100希釈;4SM15抗体)を用いて染色した。

【発明を実施するための形態】

【0025】

定義及び一般的技術

以下に別途定義されない限り、本発明において使用される用語は、当業者に公知のその一般的な意味に従って理解されなければならない。

【0026】

用語「抗体」とは、本明細書において、参照により本明細書に組み込まれるPaul, W.E.(編):Fundamental Immunology第2版Raven Press, Ltd., New York 1989年の第7章に一般的に概説されるように、対象となる抗原と特異的に結合可能である任意の機能的抗体を指す。特定の制限なく、用語「抗体」は、ニワトリ並びにマウス、ヤギ、非ヒト霊長類及び

10

20

30

40

50

ヒト等の哺乳動物を含む任意の適当な供給源種に由来する抗体を包含する。好ましくは、抗体はヒト化抗体である。抗体は、好ましくは、当技術分野で周知の方法によって調製できるモノクローナル抗体である。用語「抗体」は、IgG-1、-2、-3又は4、IgE、IgA、IgM又はIgDアイソタイプ抗体を包含する。用語「抗体」は、モノマー抗体(IgD、IgE、IgG等)又はオリゴマー抗体(IgA又はIgM等)を包含する。用語「抗体」はまた、特定の制限なく、単離された抗体及び遺伝子操作された抗体、例えばキメラ抗体等の修飾された抗体も包含する。

【0027】

抗体のドメインの命名法は、当技術分野で公知のような用語に従う。抗体の各モノマーは、当技術分野で一般的に知られるように、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む。これらのうち、各重鎖及び軽鎖は、抗原結合にとって重要である可変ドメイン(重鎖についてはV_Hと、軽鎖についてはV_Lと呼ばれる)を含む。これらの重鎖及び軽鎖可変ドメインは、(N末端からC末端の順に)領域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4(FR、フレームワーク領域;CDR、超可変領域としても知られる相補性決定領域)を含む。抗体配列内の上記の抗体領域の同定及び割り当ては、一般に、Kabatら(Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983年)又はChothiaら(Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989年12月21~28日;342(6252):877~83頁)と一致し、又は参照により本明細書に組み込まれる、Giudicelliら(IMG/QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res.2004年7月1日;32(Web Server issue):W435-40)に記載されるIMG/QUESTソフトウェアを使用することによって実施できる。上記で示される抗体領域は、IMG/QUESTソフトウェアを使用することによって同定され、割り当てられることが好ましい。

10

20

30

40

【0028】

「モノクローナル抗体」は、抗体の本質的に同種の集団に由来する抗体であり、抗体は、配列が実質的に同一である(すなわち、N末端及びC末端のアミノ酸修飾等の天然に存在する配列修飾を含有する抗体のわずかな割合を除いて同一である)。単一エピトープ又は多数の異なるエピトープのいずれかに向けられた異なる抗体の混合物を含有するポリクローナル抗体とは異なり、モノクローナル抗体は、同一エピトープに向けられ、したがって、高度に特異的である。用語「モノクローナル抗体」は、(これらに限らないが)例えば、Kohler及びMilstein(Nature、1975年8月7日;256(5517):495~7頁)又はHarlow及びLane(「Antibodies: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988年)に記載されるハイブリドーマ法によって作製された抗体のような、単細胞クローンに由来するモノクローナル細胞集団から得られる抗体を含む。モノクローナル抗体はまた、Clacksonら(Nature. 1991年8月15日;352(6336):624~8頁)又はMarksら(J Mol Biol. 1991年12月5日;222(3):581~97頁)に記載されるもの等のファージディスプレイ技術を含むその他の適した方法から得ることができる。モノクローナル抗体は、当技術分野で公知の方法によって、低減されたKd値、最適化された会合及び解離動態等の抗原-結合特性について最適化されている抗体であり得る。例えば、Kd値は、親和性成熟モノクローナル抗体をもたらす、ファージディスプレイを含むディスプレイ法によって最適化できる。用語「モノクローナル抗体」は、起源の特定の種又は起源の1つの単一種に由来する抗体配列に制限されない。したがって、用語「モノクローナル抗体」の意味は、ヒト化モノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を包含する。

40

50

【0029】

「ヒト化抗体」は、ヒト配列、及び対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)に対する結合特異性を付与する非ヒト配列のわずかな部分を含有する抗体である。通常、ヒト化抗体は、ヒトアクセプター抗体由来の超可変領域配列を、対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)と結合する非ヒトドナー抗体(例えば、マウス、ウサギ、ラットドナー抗体)に由来する超可変領域配列によって置換することによって作製される。いくつかの場合には、アクセプ

ター抗体のフレームワーク領域配列もまた、ドナー抗体の対応する配列によって置換され得る。「ヒト化抗体」は、ドナー及びアクセプター抗体に由来する配列に加えて、その他の(更なる又は代替)残基又は配列を含有する場合もあり、含有しない場合もある。このようなその他の残基又は配列は、結合特性(例えば、Kd値を低減するように)及び/又は免疫原性特性(例えば、ヒトにおける抗原性を低減するように)等の抗体特性を更に改善するように役立ち得る。ヒト化抗体を作製するための方法の非限定例は当技術分野で公知であり、例えば、Riechmannら(Nature. 1988年3月24日;332(6162):323~7頁)又はJonesら(Nature. 1986年5月29日~6月4日;321(6069):522~5頁)に由来するものがある。

【0030】

用語「ヒト抗体」は、ヒト可変及び定常ドメイン配列を含有する抗体に関する。この定義は、結合特性(例えば、Kd値を低減するように)及び/又は免疫原性特性(例えば、ヒトにおける抗原性を低減するように)等の抗体特性を更に改善するように役立ち得る、単一アミノ酸置換又は修飾を有するヒト配列を有する抗体を包含する。用語「ヒト抗体」は、非ヒト配列の部分が対象となる抗原に対する結合特異性を付与する、ヒト化抗体を排除する。

10

【0031】

抗体の「抗原結合部分」とは、本明細書において、抗体の、抗原(例えば、hGDF-15、PD-1又はPD-L1)と特異的に結合する能力を保持する抗体の部分を目指す。この能力は、例えば、当技術分野で公知の方法によって、抗原との特異的結合について、抗体と競合する抗原結合部分の能力を決定することによって決定できる。抗原結合部分は、抗体の1つ又は複数の断片を含有し得る。特に制限なく、抗原結合部分は、組換えDNA法及び抗体の化学的又は酵素的断片化による調製を含む、当技術分野で公知の任意の適した方法によって製造できる。抗原結合部分は、Fab断片、F(ab')断片、F(ab')₂断片、一本鎖抗体(scFv)、単ドメイン抗体、ダイアボディー又は抗原と特異的に結合する抗体の能力を保持する抗体の任意のその他の部分であり得る。

20

【0032】

「抗体」(例えば、モノクローナル抗体)又は「抗原結合部分」は、誘導体化されていても、又は異なる分子と連結されていてもよい。例えば、抗体と連結できる分子は、その他のタンパク質(例えば、その他の抗体)、分子標識(例えば、蛍光、発光、着色又は放射活性分子)、医薬品及び/又は毒物である。抗体又は抗原結合部分は、直接(例えば、2種のタンパク質間の融合の形態で)連結してもよく、リンカー(例えば、当技術分野で公知の任意の適した種類の化学的リンカー)分子を介して連結してもよい。

30

【0033】

本明細書において、用語「結合」又は「結合する」とは、対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)との特異的結合を指す。好ましくはKd値は100nM未満、より好ましくは50nM未満、更により好ましくは10nM未満、いっそうより好ましくは5nM未満、最も好ましくは2nM未満である。

【0034】

用語「エピトープ」とは、本明細書において、抗体に対する結合部位を形成する抗原のわずかな部分を指す。

40

【0035】

本発明に関連して、抗体の結合特性を特徴付けする目的で、抗体又はその抗原結合部分の、対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)との結合又は競合結合は、好ましくは、以下に記載されるように参照標準アッセイとして表面プラズモン共鳴測定を使用することによって測定される。

【0036】

用語「K_D」又は「K_D値」とは、当技術分野で公知の平衡解離定数に関する。本発明との関連で、これらの用語は、特定の対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)に関する抗体の平衡解離定数に関する。平衡解離定数は、複合体(例えば、抗原-抗体複合体)の、その構成成分(例えば、抗原及び抗体)に可逆的に解離する傾向の尺度である。本発明の抗体につい

50

ては、 K_D 値(抗原ヒトGDF-15に対するもの等)は、好ましくは、以下に記載されるように、表面プラズモン共鳴測定を使用することによって決定される。

【0037】

「単離された抗体」とは、本明細書において、同定されており、その供給源環境の構成成分の大部分から(質量で)、例えば、その製造のために使用されたハイブリドーマ細胞培養物又は異なる細胞培養物(例えば、抗体を組み換え発現するCHO細胞等の産生細胞)の構成成分から分離されている抗体である。分離は、そうでなければ所望の適用(例えば、本発明の抗ヒトGDF-15抗体の治療的使用を用いる)に対する抗体の適合性を干渉し得る構成成分を十分に除去するように実施される。単離された抗体を調製するための方法は当技術分野で公知であり、プロテインAクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ウイルス保持性濾過及び限外濾過が挙げられる。好ましくは、単離された抗体調製物は、ローリータンパク質アッセイを使用することによって測定されるように、少なくとも70%純粋(w/w)、より好ましくは少なくとも80%純粋(w/w)、更により好ましくは少なくとも90%純粋(w/w)、更により好ましくは少なくとも95%純粋(w/w)、最も好ましくは少なくとも99%純粋(w/w)である。

10

【0038】

「ダイアボディー」とは、本明細書において、同一鎖上で2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるペプチドリンカーによって連結された、同一ポリペプチド鎖上の軽鎖可変ドメインに連結された重鎖可変ドメインを含む、小さい二価の抗原結合性抗体部分である。これは、別の鎖の相補的ドメインとの対合及び2つの抗原結合部位を有するダイマー分子の組み立てをもたらず。ダイアボディーは、二価で単一特異的である(ヒトGDF-15に対する2つの抗原結合部位を有するダイアボディー等)場合もあり、又は二価で二重特性である(例えば、一方はヒトGDF-15に対する結合部位であり、もう一方は異なる抗原に対する結合部位である、2つの抗原結合部位を有するダイアボディー)場合もある。ダイアボディーの詳細な説明は、Holliger Pら(「Diabodies」:small bivalent and bispecific fragments」Proc Natl Acad Sci U S A. 1993年7月15日;90(14):6444~8頁)に見出すことができる。

20

【0039】

「単一ドメイン抗体」(「Nanobody(商標)」とも呼ばれる)とは、本明細書において、単一モノマー可変抗体ドメインからなる抗体断片である。単一ドメイン抗体の構造及びそれを製造するための方法は、例えば、Holt LJら(「Domain antibodies: proteins for therapy」Trends Biotechnol. 2003年11月;21(11):484~90頁)、Saerens Dら(「Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics」Curr Opin Pharmacol. 2008年10月;8(5):600~8頁. Epub 2008年8月22日)及びArbabi Ghahroudi Mら(「Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies」FEBS Lett. 1997年9月15日;414(3):521~6頁)から当技術分野で公知である。

30

【0040】

用語「有意な」、「有意に」等は、本明細書において、当技術分野で公知の適当な方法によって評価されるような、また本明細書において言及される方法によって評価されるような値間の統計的に有意な差を指す。

40

【0041】

本発明による用語「含む(comprising)」の各使用は任意選択で、用語「からなる(consisting of)」と置換されてもよい。

【0042】

用語「癌」及び「癌細胞」は、本明細書において、当技術分野におけるその一般的な意味と一致して使用される(例えば、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる、Weinberg R.ら: The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006年、850頁を参照のこと)。

【0043】

本発明に従って臨床アウトカムの予測が提供される癌は、固形癌である。「固形癌」と

50

は、1つ又は複数の固形腫瘍を形成する癌である。このような固形腫瘍を形成する固形癌は一般に、当技術分野で公知である。用語「固形癌」は、癌によって形成された原発腫瘍、及び転移としても知られる、あり得る続発性腫瘍の両方を包含する。好ましい固形癌は、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌(stomach cancer)、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、脳腫瘍、乳癌、胃癌(gastric cancer)、腎細胞癌、ユーイング肉腫、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌からなる群から選択され、好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌(stomach cancer)、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌及び子宮頸癌からなる群から選択され、より好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌及び胃癌(stomach cancer)からなる群から選択され、最も好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌及び前立腺癌からなる群から選択される。

10

【0044】

本明細書において言及されるように、用語「脳腫瘍(brain cancer)」とは、当技術分野で公知のすべての脳腫瘍を指す。これは、これらに限らないが、神経膠腫(WHOグレードI~IV)、星状細胞腫、髄膜腫及び髄芽腫を含む。

【0045】

本明細書において言及されるように、用語「頭頸部癌」とは、当技術分野で公知のすべての頭頸部癌を指す。これは、これらに限らないが、食道癌、口腔扁平上皮癌及び下咽頭癌を含む。本発明による特に好ましい頭頸部癌は、口腔扁平上皮癌である。

【0046】

本明細書において、「癌の治療」又は「癌を治療すること」等の用語は、治療的処置を指す。

20

【0047】

本明細書において言及されるように、癌の治療は、第一選択療法、第二選択療法又は第三選択療法又は第三選択療法を超える療法であり得る。これらの用語の意味は当技術分野で公知であり、米国国立癌研究所(US National Cancer Institute)によって一般に使用される技術用語に従う。

【0048】

癌の治療は、患者において更なる又は二次的治療効果も起こることを排除しない。例えば、更なる又は二次的利益は、癌誘発性質量損失に対する影響であり得る。しかし、本明細書において言及されるような「癌の治療」は、癌自体を治療するためのものであること、及び任意の二次的又は更なる効果は、癌の治療の任意選択の更なる利点のみを反映するという事は理解される。

30

【0049】

本発明によって言及されるような癌の治療として、好ましくは、癌免疫療法がある。用語「癌免疫療法」は当技術分野で公知であり、一般に、患者の免疫系が癌を治療するために使用される癌の治療に関する。癌細胞は、癌細胞に対して特異的であり、非癌性細胞の抗原とは異なる癌細胞抗原を生じさせるゲノム変異を有する。したがって、本発明によって言及される癌免疫療法は、好ましくは、このような癌細胞抗原が免疫系によって認識され、これらの抗原を発現する癌細胞が免疫系によって死滅させられる癌免疫療法である。癌免疫療法は、当技術分野で公知の免疫モニタリング法によって、例えば、血液サンプル中の(例えば、CD8⁺T細胞及び/又はNK細胞中の)細胞内IFN- γ 発現を測定すること、血液サンプル中のCD107a細胞表面発現(例えば、CD8⁺T細胞及び/又はNK細胞上の)を測定すること、血液サンプル中の細胞内TNF- α 発現(例えば、白血球上の)、血液サンプル中の細胞内インターロイキン-2発現(例えば、CD8⁺T細胞中及び/又はCD4⁺T細胞中の)、血液サンプル中のCD154細胞表面発現(例えば、CD8⁺T細胞中及び/又はCD4⁺T細胞中の)、血液サンプル中の腫瘍抗原特異的T細胞についてのテトラマー又はデキストラマー(dextramer)染色、自己腫瘍細胞に対するCTL活性又は腫瘍特異的変異に由来するネオ抗原に対するT細胞の存在を測定することによって評価され得る。癌免疫療法を評価するための好ましい方法として、Gottfangeas C5:「Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality

40

50

Assurance and Future.」(2015年)、Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (N. Rezaei editor). Springer. 第25章:471～486頁の方法及びVan der Burg SHら:「Immunoguiding, the final frontier in the immunotherapy of cancer.」(2014年)、Cancer Immunotherapy meets oncology (CM Britten, S Kreiter, M. Diken & HG Rammensee編). Springer International Publishing Switzerland 37～51頁 ISBN: 978-3-319-05103-1の方法がある。

【0050】

本明細書において、「癌免疫療法」は任意選択で、癌を治療するために使用される免疫系に加えて、癌治療の更なる機序が使用される治療を包含する。癌治療の更なる機序が使用され得る癌免疫療法の1つの例として、公知の化学療法薬を用いる併用療法がある。公知の化学療法薬を用いるこのような併用療法は、例えば、癌を治療するために免疫系が使用される癌の治療だけでなく、癌細胞が前記化学療法薬によって直接的に死滅させられる癌の治療も含み得る。

10

【0051】

本明細書において言及されるように、「免疫チェックポイントブロッカー治療」とは、以下に示されるような1種又は複数の免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療である。

【0052】

本発明に従って予測するための方法は、好ましくは、免疫チェックポイントブロッカー治療の開始の前に実施される。

20

【0053】

或いは、本発明に従って予測するための方法はまた、免疫チェックポイントブロッカー治療が既に開始されている時点で実施され得る。

【0054】

したがって、固形癌の免疫チェックポイントブロッカー治療又は固形癌の異なる治療(例えば、癌に対して医薬上活性であるその他の薬剤を用いる治療)を受ける患者に、本発明に従って予測するための方法を使用できることは理解されるべきである。しかし、免疫チェックポイントブロッカー治療工程も、任意のその他の治療工程も、本発明に従って予測するための方法の一部を形成しないことも理解される。

【0055】

本明細書において言及されるように、癌に対して医薬上活性な薬剤は、例えば、既知抗癌剤及び/又は免疫賦活性分子であり得る。公知の抗癌剤として、これらに限らないが、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル及びイホスファミド等のアルキル化剤;アザチオプリン及びメルカププリン等の代謝拮抗剤;ピンカアルカロイド類(例えば、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルピン及びピンデシン)、タキサン類(例えば、パクリタキセル、ドセタキセル)エトポシド及びテニポシド等のアルカロイド類;カンプトテシン類(例えば、イリノテカン及びトポテカン)等のトポイソメラーゼ阻害剤類;アクチノマイシン、アントラサイクリン、ドキシルピシン、ダウノルピシン、バルルピシン、イダルピシン、エピルピシン、プレオマイシン、プリカマイシン及びマイトマイシン等の細胞傷害性抗生物質類;並びに放射性同位元素類が挙げられる。

30

40

【0056】

血液サンプル:

本明細書において言及されるように、用語「血液サンプル」は、これらに限らないが、全血、血清及び血漿サンプルを含む。血清及び血漿以外の血液画分等のその他のサンプル種も含む。このようなサンプル及び画分は、当技術分野で公知である。

【0057】

本発明による方法のために使用される血液サンプルは、hGDF-15を含有する任意の種類血液サンプルであり得る。hGDF-15を含有する適した種類の血液サンプルは当技術分野で公知であり、血清及び血漿サンプルを含む。或いは、hGDF-15を含有する更なる種類の

50

血液サンプルも、例えば、本明細書において開示される方法を使用することによって、これらのサンプル中にhGDF-15が含有されるか否か、及びこれらのサンプル中にどのレベルのhGDF-15が含有されるかを測定することによって、当業者によって容易に同定され得る。

【0058】

ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、前記免疫チェックポイントブロッカーを受けていた患者由来のサンプルである場合には、ヒト患者から得られた血液サンプルは、免疫チェックポイントブロッカー及び/又はその生物学的代謝産物を含有し得る。

【0059】

免疫チェックポイントブロッカーは当技術分野で公知であり、当業者によってその存在を調べることができる。治療用抗体の代謝産物等の薬物の代謝産物の例も公知であり、例えば、適当な二次抗体を使用することによって検出できる。

10

【0060】

臨床アウトカム：

本発明によれば、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを使用して、ヒト癌患者において免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の正の臨床アウトカムの確率を予測できる。

【0061】

本明細書において言及されるように、「正の臨床アウトカム」は、治療的処置の利益の任意の治療指標であり得る。このような指標は、当技術分野で周知である。

20

【0062】

したがって、本発明によれば、好ましい実施形態では、正の臨床アウトカムは、免疫チェックポイントブロッカー治療に対するヒト癌患者の治療奏効であり得る。

【0063】

本実施形態の好ましい一態様では、治療奏効の有無は、治療が、治療された患者において癌成長を阻害するか否かの評価によって評価される。好ましくは、阻害は、当技術分野で公知の適当な統計検定によって評価されるように統計的に有意である。癌成長の阻害は、未治療患者の対照グループに対して、本発明によって治療された患者のグループにおける癌成長を比較することによって、又は当技術分野の標準癌治療及び本発明による治療を施される患者のグループを、当技術分野の標準癌治療のみを施される患者の対照グループと比較することによって評価できる。癌成長の阻害を評価するためのこのような研究は、臨床研究のために承認された標準、例えば、十分な検出力を有する二重盲検無作為化研究に従って設計される。

30

【0064】

用語「癌成長」とは、本明細書において、癌の任意の測定可能な成長に関する。固形腫瘍を形成する癌について、「癌成長」は、経時的な腫瘍体積の測定可能な増大に関する。癌が、単一腫瘍のみを形成した場合には、「癌成長」は、単一腫瘍の体積の増大にのみ関する。癌が転移等の複数の腫瘍を形成した場合には、「癌成長」は、すべての測定可能な腫瘍の体積の増大に関する。固形腫瘍については、腫瘍体積は、磁気共鳴画像法及びコンピュータ断層撮影法(CTスキャン)を含む当技術分野で公知の任意の方法によって測定できる。

40

【0065】

この実施形態の極めて好ましい態様では、治療に対する奏効の評価は、固形腫瘍における効果判定基準、バージョン1.1(RECIST v1.1)(Eisenhauerら: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur. J. Cancer. 第45巻、第2号、2009年1月、228~47頁)を使用することによって、レスポンドー及びノンレスポンドーの分類に基づいて行う。同様に、これらの基準はまた、本発明による予測方法にとって極めて好ましい。

【0066】

奏効の適当な評価期間は当技術分野で公知であり、特定の固形癌及び前記癌の重症度及

50

び癌疾患のそれぞれのステージ等の既知因子を正当に考慮して当業者によって選択される。例えば、治療奏効は、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の開始後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18及び/又は24ヶ月の時点で評価され得る。好ましくは、治療奏効は、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の開始の12週間後又は4ヶ月後又は6ヶ月後に評価される。逆に、本発明による治療奏効の確率の予測は、上記の時点のうち1つ又は複数について提供されてもよい。

【0067】

別の好ましい実施形態では、正の臨床アウトカムは、免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存であり得る。患者グループの生存は、当技術分野で公知の方法によって、例えば、カプラン・マイヤー曲線によって解析され得る。

10

【0068】

生存の評価のための適当な期間は当技術分野で公知であり、特定の固形癌及び前記癌の重症度及び癌疾患のそれぞれのステージ等の既知因子を正当に考慮して当業者によって選択される。例えば、生存、好ましくは短期生存は、例えば免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の開始後1ヶ月、6週間、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月及び/又は18ヶ月後の時点で評価され得る。短期生存は、好ましくは、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の開始後6週間、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月又は6ヶ月後に評価される。或いは、生存、好ましくは長期生存は、例えば免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の開始後24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月、42ヶ月、48ヶ月、54ヶ月、60ヶ月、6年、7年、8年、9年及び/又は10年の時点で評価され得る。黒色腫では、長期生存は、好ましくは、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の開始後36ヶ月の時点で評価される。逆に、本発明による生存の確率の予測は、これらの時点のうち1つ又は複数について提供されてもよい。

20

【0069】

本発明によれば、更なる実施形態では、「正の臨床アウトカム」は、免疫チェックポイントブロッカー治療後にヒト癌患者の疾患進行がないことであり得る。疾患進行の有無についての指標は当技術分野で公知であり、それぞれの固形癌及び癌疾患のそれぞれのステージを正当に考慮して当業者によって選択される。

【0070】

本発明による正の臨床アウトカムの確率の予測

30

hGDF-15レベルに基づいて本発明によって正の臨床アウトカムの確率を予測するために、上記で定義される予測するための方法が使用されることが好ましい。

【0071】

本発明の方法を実施するために、当技術分野で公知の統計的手法を使用できる。

【0072】

これらの方法では、免疫チェックポイントブロッカーを用いて固形癌を患う患者を治療した1つ又は複数の臨床研究から得られた患者データを、統計モデルを作製するための基礎として使用できる。次いで、これらのモデルを使用して、正の臨床アウトカムの確率を予測するための適当なhGDF-15閾値レベルを決定できる。

40

【0073】

例えば、連続予測変数としてhGDF-15レベル(ng/ml)を用いてモデルをフィッティングすることによって、コックス比例ハザード生存モデルによって生存を解析できる。

【0074】

好ましい実施形態では、生存の確率は、アウトカム変数として全生存(死亡までの時間)を、連続予測変数としてGDF-15を用いたハザード比(HR)を使用して予測され、GDF-15血清レベルが1ng/ml増大すると、死亡のリスクが1.27倍増大することが予測される(95%信頼区間1.10~1.47、P=0.00109)。

【0075】

代替実施形態では、生存の確率は、カテゴリ予測変数としてGDF-15に基づくグループ化変数を使用して、例えば、グループ<1.8ng/ml、1.8{4.2ng/ml、>4.2ng/ml)を用いて予

50

測される。

【0076】

臨床研究から得た患者データの統計モデルを作製するために本発明に従って使用できる好ましい統計的手法は、実施例1に開示されている。高度に有意な効果を考慮すると、精度の低い統計モデルも適している。実施例1に開示される統計的手法は、癌の種類(黒色腫)、免疫チェックポイントブロッカーの種類、及び実施例において得られた特定の統計値等の実施例1の特定の特征に限定されないということは理解される。むしろ、実施例1において開示されるこれらの方法は、本発明の任意の実施形態と関連して一般に使用できる。

【0077】

hGDF-15レベル

本発明によれば、免疫チェックポイントブロッカーを用いて治療されたヒト癌患者におけるhGDF-15レベルと正の臨床アウトカムの確率(例えば、生存の確率又は治療奏効の確率)間に逆相関がある。したがって、本発明によれば、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減は、前記ヒト癌患者における正の臨床アウトカムの確率(例えば、生存の確率又は治療奏効の確率)の増大を示す。

【0078】

したがって、本明細書において、「前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減は確率の増大を示す」等の用語は、免疫チェックポイントブロッカーを用いて治療されたヒト癌患者における、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベル及び正の臨床アウトカムの確率(例えば、生存の確率又は治療奏効の確率)が、逆相関をたどることを意味する。したがって、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが高いほど、正の臨床アウトカムの確率(例えば、生存の確率又は治療奏効の確率)は低い。

【0079】

例えば、本明細書において定義される本発明に従って予測するための方法に関連して、hGDF-15閾値レベルを使用できる。

【0080】

本発明によると、hGDF-15レベルと正の臨床アウトカムの間の逆相関は任意の閾値に当てはまり、したがって、本発明は特定の閾値に制限されない。

【0081】

好ましいhGDF-15閾値レベルは、好ましい実施形態において上記で定義されるようなhGDF-15血清レベルである。

【0082】

或いは、正の臨床アウトカムの確率を予測するために上記の統計的手法を使用することによって、本発明によるhGDF-15閾値レベルを得る、及び/又は更に調整することができる。

【0083】

hGDF-15閾値レベルは、単一hGDF-15閾値レベルであり得る。本発明はまた、2以上のhGDF-15閾値レベル、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のhGDF-15閾値レベルの使用も包含する。本発明はまた、hGDF-15閾値レベルの連続体の使用も包含する。このようなhGDF-15閾値レベルの連続体の非限定例は、図3に示されている。

【0084】

1種又は複数のhGDF-15閾値レベルのうち単一のhGDF-15閾値レベル各々について、対応する正の臨床アウトカムの確率(例えば、生存の確率又は治療奏効の確率)を予測できる。本発明によるhGDF-15閾値レベル等と比較して血液サンプル中のhGDF-15のレベルが低減される場合、これは、正の臨床アウトカムの確率(例えば、生存の確率又は治療奏効の確率)が増大される、すなわち、前記hGDF-15閾値レベルについて予測できる正の臨床アウトカムの確率と比較して増大されることを示す。非限定例では、実施例1の図3は、hGDF-15閾値レベルの連続体及び対応する治療奏効について予測された確率の曲線を例示する。

【0085】

更なる非限定例では、治療奏効の確率を、表2に示されるオッズ比等のオッズ比に基づ

10

20

30

40

50

いて予測できる。したがって、0.159~0.698の信頼区間で、連続予測変数としてng/mlでのhGDF-15の血清レベルについて0.389のオッズ比を使用して治療奏効の確率を予測できる。

【0086】

血液サンプル中のhGDF-15レベルは、当技術分野で公知の任意の方法によって測定できる。例えば、血清レベルを含む血液サンプル中のhGDF-15レベルを測定する好ましい方法は、GDF-15に対する抗体を使用する酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)による、又はGDF-15に対する抗体を使用するウエスタンブロッティング(例えば、濃縮血清からのウエスタンブロッティング)によるhGDF-15レベルの測定である。このようなELISA法が実施例1に例示されているが、Luminex技術等のようなビーズベースの方法も含み得る。或いは、血清レベルを含む血液サンプル中のhGDF-15レベルは、GDF-15に対する抗体を使用する公知の電気化学発光免疫アッセイによって決定してもよい。例えば、このような電気化学発光イムノアッセイのために、Roche Elecsys(登録商標)技術を使用できる。その他の可能性ある方法として、電場におけるタンパク質の分離後の体液からの抗体ベースの検出が挙げられる。

10

【0087】

健常なヒト対照個体の中程度のhGDF-15血清レベルは、<0.8ng/mlである。予測される範囲は、健常なヒト対照では0.2ng/mlから1.2ng/mlの間である(参考文献:Tanno Tら:「Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease」Curr Opin Hematol. 2010年5月;17(3):184~190頁)。

20

【0088】

本発明によれば、好ましいhGDF-15閾値レベルは、1.2ng/mlから8.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15血清レベル、又は1.5ng/mlから7.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベル、又は2.0ng/mlから6.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベル、又は2.5ng/mlから5.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベル、又は3.0ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルである。

【0089】

好ましい実施形態では、患者の癌は黒色腫である。この実施形態の好ましい態様では、hGDF-15閾値レベルは、3.0ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベル、好ましくは、3.2ng/mlから3.7ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベル、最も好ましくは、3.4ng/mlのhGDF-15レベルである。

30

【0090】

これらのhGDF-15血清レベルについて、本明細書において提供される本発明の開示に基づいて、その他の血液サンプル中の対応するhGDF-15レベルは、当業者によって(例えば、その他の血液サンプル中のそれぞれのレベルと、血清中のhGDF-15の相対レベルと比較することによって)日常的に得ることができるということは理解される。したがって、本発明はまた、好ましいhGDF-15血清レベル及び上記で示される範囲の各々に対応する、血漿、全血及びその他の血液サンプル中の好ましいhGDF-15レベルを包含する。

【0091】

本発明によって使用できるhGDF-15と結合可能な抗体

40

本発明の方法、装置及びキットは、上記で定義されたような、hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分を使用し得る。

【0092】

ヒトGDF-15タンパク質は、有利なことに、モノクローナル抗体(参照によりその全文が本明細書に組み込まれるWO2014/049087)によってターゲティングされ得ること及びこのような抗体は、組換えヒトGDF-15の約790pMの平衡解離定数によって実証されるような、ヒトGDF-15に対する高結合親和性を含む有利な特性を有することがこれまでに示された(参照実施例1を参照のこと)。したがって、好ましい実施形態では、本発明は、hGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分を使用する。好ましくは、抗体は、hGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である。

50

【0093】

したがって、より好ましい実施形態では、本発明によるhGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、重鎖可変ドメインは、配列番号5のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%同一のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む。この実施形態では、好ましくは、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域及び配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域及びアミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域を含む軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0094】

したがって、更により好ましい実施形態では、本発明に従うhGDF-15又はその抗原結合部分と結合可能な抗体は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域及び配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0095】

ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の上記の実施形態に従う別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号1のアミノ酸配列又はそれと85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%同一の配列を含むFR1、CDR1、FR2、CDR2及びFR3領域を含む領域を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号2のアミノ酸配列又はそれと85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%同一の配列を含む、FR1、CDR1、FR2、CDR2及びFR3領域を含む領域を含む。

20

【0096】

ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の上記の実施形態に従う別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域及び配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR2領域を含む。この実施形態の好ましい態様では、抗体は、上記で記載される本発明の実施形態のいずれかにおいて定義されるようなCDR3配列を有し得る。

30

【0097】

ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分に従う別の実施形態では、抗原結合部分は、単一ドメイン抗体(「Nanobody(商標)」とも呼ばれる)である。この実施形態の一態様では、単一ドメイン抗体は、それぞれ、配列番号3、配列番号4及び配列番号5のCDR1、CDR2及びCDR3アミノ酸配列を含む。この実施形態の別の態様では、単一ドメイン抗体は、それぞれ、配列番号6、ser-ala-ser及び配列番号7のCDR1、CDR2及びCDR3アミノ酸配列を含む。この実施形態の好ましい態様では、単一ドメイン抗体は、ヒト化抗体である。

40

【0098】

好ましくは、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、100nM以下、20nM以下、好ましくは10nM以下、より好ましくは5nM以下、最も好ましくは0.1nMから2nMの間である、ヒトGDF-15の平衡解離定数を有する。

【0099】

ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の上記の実施形態に従う別の実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)に受託番号DSM ACC3142の下で寄託された細胞株B1-23から得ることができるヒトGDF-15に対する抗体と同一のヒトGDF-15エピトープと結合する。本明細書において記載されるように、本発明によるヒト

50

GDF-15との抗体結合は、参照実施例1に記載される手順に従った、参照標準法として表面プラズモン共鳴測定によって評価されることが好ましい。ヒトGDF-15上の同一エピトープとの結合を、細胞株B1-23から得ることができるヒトGDF-15に対する抗体の、及び細胞株B1-23から得ることができるヒトGDF-15に対する抗体と同一のヒトGDF-15エピトープと結合すると予測される抗体の、表面プラズモン共鳴競合結合試験によって同様に評価できる。

【0100】

極めて好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、結合は、配列番号25及び配列番号26のアミノ酸配列からなるヒトGDF-15上のコンフォメーション又は不連続エピトープとの結合である。この実施形態の好ましい態様では、抗体又はその抗原結合部分は、上記の実施形態のいずれか1つの配列によって規定されるような抗体又はその抗原結合部分である。

【0101】

上記の実施形態による更なる実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分を含む抗体を、例えば、タグ又は標識によって修飾できる。

【0102】

タグは、例えば、ビオチンタグ又はアミノ酸タグであり得る。このような酸タグの非限定例として、ポリヒスチジン(His-)タグ、FLAG-タグ、血球凝集素(HA)タグ、糖タンパク質D(gD)タグ及びc-mycタグが挙げられる。タグは種々の目的のために使用できる。例えば、タグをヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分の精製を補助するために使用できる。好ましくは、このようなタグは、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分のC末端又はN末端に存在する。

【0103】

本明細書において、用語「標識」は、抗体の検出を容易にできる任意の分子又は分子の群に関する。例えば、標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)又はグルコースオキシダーゼ等の酵素性であり得る。酵素的に標識された抗体は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイにおいて使用され得る。標識はまた、放射性同位元素、DNA配列(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって抗体を検出するために使用され得る)、蛍光発生的レポーター及び電気化学発光基(例えば、ルテニウム錯体)であり得る。標識の代替法として、本発明によって使用される抗体、特に、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分を、例えば、表面プラズモン共鳴測定によって直接的に検出できる。

【0104】

免疫チェックポイントブロッカー

本発明は、ヒト癌患者における免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の正の臨床アウトカム(確率)の予測、特に、免疫チェックポイントブロッカー治療に対するヒト癌患者の治療奏効(確率)の予測及び免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存(確率)の予測に関する。

【0105】

癌細胞は、癌細胞に対して特異的であり、非癌性細胞の抗原とは異なる癌細胞抗原を生じさせるゲノム変異を有する。したがって、阻害されない無傷の免疫系はこれらの癌細胞抗原を認識し、その結果、これらの抗原に対する免疫応答が誘発されるはずである。しかし、ほとんどの癌は、これらの抗原に対する免疫寛容機序を発達させている。癌細胞がこのような免疫寛容に達する機序の1つのクラスが、免疫チェックポイントの利用である。

【0106】

「免疫チェックポイント」とは、本明細書において、一般に、免疫応答が阻害され得る免疫学的機序を意味する。より詳しくは、免疫チェックポイントは、免疫系の分子(又は免疫系の分子の群)が、免疫系の細胞の活性化を阻害することによって免疫応答を阻害することを特徴とする機序である。免疫系の細胞の活性化を阻害することによって免疫応答を阻害する免疫系のこのような分子(又は分子の群)はまた、チェックポイント分子として

10

20

30

40

50

も知られる。

【0107】

本明細書において、「免疫チェックポイントブロッカー」は、免疫チェックポイントをブロックすることができる分子である。用語「免疫チェックポイントブロッカー」は、本明細書において、hGDF-15と結合可能な抗体等のhGDF-15阻害剤を指さず、hGDF-15阻害剤とは異なる分子を意味する。

【0108】

今日までに知られている最も一般的な免疫チェックポイントブロッカーは、ヒトPD-1の阻害剤及びヒトPD-L1の阻害剤等の免疫チェックポイント分子の阻害剤である。更なる免疫チェックポイントブロッカーとして、抗LAG-3、抗B7H3、抗TIM3、抗VISTA、抗TIGIT、抗KIR、抗CD27、抗CD137並びにIDOの阻害剤がある。したがって、本発明によって言及されるように、免疫チェックポイントブロッカーの好ましい形態は、免疫チェックポイント分子の阻害剤である。或いは、免疫チェックポイントブロッカーは、免疫チェックポイントを無効にする同時刺激シグナルのアクチベーターであり得る。

10

【0109】

好ましい免疫チェックポイントブロッカーとして、ヒトPD-1の阻害剤及びヒトPD-L1の阻害剤がある。本発明の実施形態のすべてに従う1つの好ましい実施形態では、免疫チェックポイントブロッカーはヒトCTLA4の阻害剤ではない。

【0110】

本明細書において、「ヒトPD-1の阻害剤」は、ヒトPD-1の機能を特異的に阻害可能である任意の分子であり得る。このような分子の非限定例として、ヒトPD-1と結合可能な抗体及びヒトPD-1と結合可能なDARPs(Designed Ankyrin Repeat Proteins)がある。好ましくは、本発明によって言及されるPD-1の阻害剤は、ヒトPD-1と結合可能な抗体、より好ましくは、ヒトPD-1と結合可能なモノクローナル抗体である。最も好ましくは、ヒトPD-1と結合可能なモノクローナル抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピディリズマブ及びAMP-224からなる群から選択される。

20

【0111】

本明細書において、「ヒトPD-L1の阻害剤」は、ヒトPD-L1の機能を特異的に阻害可能である任意の分子であり得る。このような分子の非限定例として、ヒトPD-L1と結合可能な抗体及びヒトPD-L1と結合可能なDARPs(Designed Ankyrin Repeat Proteins)がある。好ましくは、本発明によって言及されるヒトPD-L1の阻害剤は、ヒトPD-L1と結合可能な抗体、より好ましくは、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体である。最も好ましくは、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体は、BMS-936559、MPDL3280A、MEDI4736及びMSB0010718Cからなる群から選択される。

30

【0112】

方法及び技術

一般に、本明細書において別に定義されない限り、本発明において使用される方法(例えば、抗体に関するクローニング法)は、当技術分野で公知の手順、例えば、すべて参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら(「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York 1989年)、Ausubelら(「Current Protocols in Molecular Biology」Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992年)並びにHarlow及びLane(「Antibodies: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York 1988年)に記載される手順に従って実施される。

40

【0113】

抗体のそれぞれの標的タンパク質との結合は、当技術分野で公知の方法によって評価できる。モノクローナル抗体のそれぞれの標的との結合は、表面プラズモン共鳴測定によって評価されることが好ましい。これらの測定は、参照実施例1において抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23について例示されるように、Biorad ProteOn XPR36システム及びBiorad GLCセンサーチップを使用することによって実施されることが好ましい。

50

【0114】

本発明の配列の配列アラインメントは、BLASTアルゴリズム(Altschulら(1990)「Basic local alignment search tool」Journal of Molecular Biology 215:403~410頁;Altschulら:(1997年) Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389~3402頁、それらのすべては、参照により本明細書に組み込まれる)を使用することによって実施される。好ましくは、以下のパラメータを使用する:最大標的配列10;ワードサイズ3;BLOSUM 62マトリックス;ギャップコスト:存在11、伸長1;条件付き組成スコアマトリックス補正(conditional compositional score matrix adjustment)。したがって、配列に関連して使用される場合、「同一性」又は「同一の」等の用語は、BLASTアルゴリズムを使用することによって得られた同一性の値を指す。

10

【0115】

本発明のモノクローナル抗体は、これに限らないが、Siegel DL(「Recombinant monoclonal antibody technology」Transfus Clin Biol. 2002年1月;9(1):15~22頁、それらは参照により本明細書に組み込まれる)において言及される方法を含む当技術分野で公知の任意の方法によって作製できる。一実施形態では、本発明の抗体は、ブダペスト条約の下、Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)に受託番号DSMZ ACC3142の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株B1-23によって作製される。寄託は、2011年9月29日に提出された。

【0116】

ヒトGDF-15(hGDF-15)のレベルは、(これらに限らないが)ヒトGDF-15に由来するタンパク質又はペプチドの質量分析、ヒトGDF-15に対して特異的な抗体を使用するウエスタンブロットティング、ヒトGDF-15に対して特異的な抗体を使用するストリップ試験又はヒトGDF-15に対して特異的な抗体を使用する免疫細胞化学を含む方法による、hGDF-15タンパク質レベルの測定を含む当技術分野で公知の任意の方法によって測定できる。hGDF-15血清レベルを測定する好ましい方法は、GDF-15に対する抗体を使用することによる酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によるhGDF-15血清レベルの測定である。このようなELISA法は、実施例1に例示されている。或いは、hGDF-15血清レベルは、GDF-15に対する抗体を使用する公知の電気化学発光イムノアッセイによって決定できる。例えば、このような電気化学発光イムノアッセイのために、Roche Elecsys(登録商標)技術を使用できる。

20

30

【0117】

本発明の装置

本発明はまた、上記で定義される装置に関する。

【0118】

本発明の装置は、本発明の方法を実施するように構成される任意の装置であり得る。

【0119】

本明細書において、用語「実施するように構成される」とは、装置が、列挙された方法工程のために特別に構成されることを意味する。例えば、特定の閾値レベルを使用する方法を実施するように構成された装置は、その特定の閾値を使用するように特別に構成される。ELISA測定のためには、吸収を測定できる任意のリーダーが適しているであろう。ピーズベースのアッセイのためには、Luminex分析器又はフローサイトメーターを使用できるであろう。

40

【0120】

好ましい実施形態では、装置は、これらに限らないが、Cobas(登録商標)4000、Cobas(登録商標)6000、Cobas(登録商標)8000、Cobas c 111及びCobas INTEGRA(登録商標)400 plusシリーズの分析器を含むCobas(登録商標)分析器等の電気化学発光(Elecsys(登録商標))分析器である。

【0121】

本発明のキット

本発明はまた、上記で定義されるキットに関する。

50

【 0 1 2 2 】

キット中に含有される組換えhGDF-15は、好適に較正目的で使用できる形態で存在し得る。例えば、0~15ng/mlの範囲中のいくつかの濃度、例えば、0~1ng/mlの範囲中の少なくとも1つの濃度、1~3ng/mlの範囲中の少なくとも1つの濃度、3~6ng/mlの範囲中の少なくとも1つの濃度、好ましくは、6~10ng/mlの範囲中の少なくとも1つの更なる濃度に及び、より好ましくは、10~15ng/mlの範囲中の少なくとも1つの更なる濃度を更に含むストック溶液の形態で存在し得る。

【 0 1 2 3 】

これらの濃度の複数のhGDF-15溶液を用いる較正は、不十分な予測される臨床アウトカムを伴う、患者の血清中で観察される高濃度のhGDF-15により正確な測定にとって特に有利となる。

10

【 0 1 2 4 】

配列

本出願において言及されるアミノ酸配列は以下の通りである(N末端からC末端の順で;一文字アミノ酸コードで表される):

配列番号1 (モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23のポリペプチド配列に由来するFR1、CDR1、FR2、CDR2及びFR3領域を含む重鎖可変ドメインの領域):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYC

配列番号2 (モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23のポリペプチド配列に由来するFR1、CDR1、FR2、CDR2及びFR3領域を含む軽鎖可変ドメインの領域):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALISASRYRSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC

20

配列番号3 (モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の重鎖CDR1領域ペプチド配列):
GFSLSTSGMG

配列番号4 (モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の重鎖CDR2領域ペプチド配列):
IYWDDDK

配列番号5 (モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の重鎖CDR3領域ペプチド配列):
ARSSYGAMDY

配列番号6 (モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の軽鎖CDR1領域ペプチド配列):
QNVGTN

30

モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の軽鎖CDR2領域ペプチド配列:
SAS

配列番号7 (モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の軽鎖CDR3領域ペプチド配列):
QQYNNFPYT

配列番号8 (組換え成熟ヒトGDF-15タンパク質):

GSARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAVCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI

配列番号9 (ヒトGDF-15前駆体タンパク質):

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRLFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAVCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI

40

配列番号10 (ヒトGDF-15前駆体タンパク質+N末端及びC末端GSGSリンカー):

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRLFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAVCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI GSGSGSG

配列番号11 (Flagペプチド):DYKDDDDKGG

50

配列番号12 (HAペプチド): YPYDVPDYAG

配列番号13 (ヒトGDF-15由来ペプチド): ELHLRPQAARGRR

配列番号14 (ヒトGDF-15由来ペプチド): LHLPQAARGRRR

配列番号15 (ヒトGDF-15由来ペプチド): HLRPQAARGRRRA

配列番号16 (ヒトGDF-15由来ペプチド): LRPQAARGRRRAR

配列番号17 (ヒトGDF-15由来ペプチド): RPQAARGRRRARA

配列番号18 (ヒトGDF-15由来ペプチド): PQAARGRRRARAR

配列番号19 (ヒトGDF-15由来ペプチド): QAARGRRRARARN

配列番号20 (ヒトGDF-15由来ペプチド): MHAQIKTSLHRLK

配列番号25 (B1-23と結合するGDF-15エピトープの一部を含むGDF-15ペプチド):
EVQVTMCIGACPSQFR

10

配列番号26 (B1-23と結合するGDF-15エピトープの一部を含むGDF-15ペプチド):
TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

【0125】

本出願において言及される核酸配列は以下の通りである(5'から3'の順に;標準核酸コードに従って表される):

配列番号21 (配列番号1において定義されるアミノ酸配列をコードするDNAヌクレオチド配列):

CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCCTCAGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGTT
TTCAGTACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTT
ACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACCCAACCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATCCCTCCAGAAACCAGGTA
TTCCTCAAGATCACCAAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGT

20

配列番号22 (配列番号2において定義されるアミノ酸配列をコードするDNAヌクレオチド配列):

GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCA
GAATGTGGTACTAATGTGGCCTGGTTTCTACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTTATTTACTCGGCATCCTACC
GGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACGTGCAGTCT
GAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGT

配列番号23 (配列番号5において定義されるアミノ酸配列をコードするDNAヌクレオチド配列):

GCTCGAAGTTCCTACGGGGCAATGGACTAC

30

配列番号24 (配列番号7において定義されるアミノ酸配列をコードするDNAヌクレオチド配列):

CAGCAATATAACAACCTTCCGTACACG

【実施例】

【0126】

参照実施例1~3は、本発明による方法、キット及び装置において使用できるhGDF-15に対する抗体を例示する。このhGDF-15抗体は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれるWO2014/049087から知られているモノクローナル抗体である:

【0127】

参照実施例1: GDF-15抗体B1-23の作製及び特徴付け

GDF-15ノックアウトマウスにおいて抗体B1-23を作製した。組換えヒトGDF-15(配列番号8)を免疫原として使用した。

40

【0128】

mAb-B1-23を産生するハイブリドーマ細胞株B1-23は、ブダペスト条約に従い、Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Sanderring 2, 97070 Würzburg, Germanyによって、Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)に受託番号DSMZ ACC3142の下で寄託された。

【0129】

市販の試験ストリップシステムによって、B1-23を、IgG2a(鎖)アイソタイプとして同

50

定した。表面プラズモン共鳴測定を使用して、解離定数(Kd)を以下の通りに決定した：

【 0 1 3 0 】

Biorad ProteOn XPR36システム及びBiorad GLCセンサーチップを使用する表面プラズモン共鳴測定を用いることによって、本発明のモノクローナル抗ヒト-GDF-15抗体抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の結合を測定した。

【 0 1 3 1 】

バイオセンサーを調製するために、組換え成熟ヒトGDF-15タンパク質をフローセル1及び2上に固定化した。一方のフローセル上の、バキュロウイルス(Baculovirus)によってトランスフェクトされた昆虫細胞(HighFive昆虫細胞)に由来する組換えGDF-15及び大腸菌(E. coli)における発現に由来するもう一方の組換えタンパク質を使用した。GLCセンサーチップを、スルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)及びEDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド)(Biorad ProteOnアミンカップリングキット)を製造業者の推奨に従って使用して活性化し、続いて、センサー表面にタンパク質を、最大約600RU(1Ru=1pg mm⁻²)の密度でロードした。次いで未反応のカップリング基を、1MエタノールアミンpH8.5を用いて灌流することによってクエンチし、チップにランニングバッファーを灌流することによってバイオセンサーを平衡化させた(HBS150と呼ばれる10M HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005% Tween-20、pH7.4)。対照として、2つのフローセルを使用し、1つはタンパク質がカップリングされていない空のフローセルであり、1つは同一カップリング化学及び同一カップリング密度を使用して固定された非生理学的タンパク質パートナー(ヒトインターロイキン-5)とカップリングされたフローセルであった。相互作用測定のために、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23をHBS150に溶解し、分析物として6種の異なる濃度(濃度:0.4、0.8、3、12、49及び98nM)で使用した。断続的な再生を避けるためにワンショット動力学(one-shot kinetics)設定を使用して分析物をバイオセンサー中に灌流し、すべての測定を25 で、100 µl分⁻¹の流速を使用して実施した。処理のために、すべてのその他のSPRデータから空のフローセル(フローセル3)のSPRデータを差し引くことによって、バルクフェイス効果(bulk face effect)及びセンサーマトリックスとの非特異的結合を除去した。ソフトウェアProteOn Managerバージョン3.0を使用して得られたセンサーグラムを解析した。結合動力学の解析のために、1:1 ラングミュア型相互作用を仮定した。会合速度定数については、 $5.4 \pm 0.06 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} (k_{on})$ の値、解離速度定数については、 $4.3 \pm 0.03 \times 10^{-4} \text{s}^{-1} (k_{off})$ の値を決定できた(値は、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の、昆虫細胞発現に由来するGDF-15tとの相互作用についてである)。方程式 $K_D = k_{off}/k_{on}$ を使用して平衡解離定数を算出し、約790pMの値を得た。大腸菌(E. coli)発現由来のGDF-15と、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の相互作用の親和性値は2倍未満異なり、昆虫細胞及び大腸菌(E. coli)由来のGDF-15の速度定数は約45%逸脱し、したがって、SPR測定の正確性内にあり、親和性の真の相違を反映しない可能性が高い。使用される条件下で、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23はヒトインターロイキン-5との結合を示さず、したがって、相互作用データ及び抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の特異性が確認される。

【 0 1 3 2 】

組換えヒトGDF-15のアミノ酸配列(バキュロウイルスによってトランスフェクトされた昆虫細胞において発現されたような)は：

GSARNGDHCP LGPGRCCRLH TVRASLEDLG WADWVLSPRE VQVTMCIGAC PSQFRAANMH AQIKTSLHRL KPD TVPAPCC VPASYNPMVL IQKTDGTGVS L QTYDDLLAKD CHC I

である。

(配列番号8)

【 0 1 3 3 】

したがって、表面プラズモン共鳴測定を使用して、790pMの解離定数(Kd)を決定した。比較として、治療上使用した抗体リツキシマブは有意に低い親和性(Kd=8nM)を有する。

【 0 1 3 4 】

これまでに、mAb B1-23がin vitroで癌細胞増殖を阻害すること及びmAb B1-23が、in vivoで腫瘍の成長を阻害することが示された(WO2014/049087)。

【 0 1 3 5 】

参照実施例2:mAb B1-23は、ヒトGDF-15のコンフォメーション的又は不連続エピトープを認識する。

エピトープマッピング:GDF-15に由来する13 merの直鎖状ペプチドに対するモノクローナルマウス抗体GDF-15

【 0 1 3 6 】

抗原:GDF-15:

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSW
EDSNTDLVPAPAVRILTPPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRLFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAP
ALHLRLSPPPSQDQLLAESSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR
EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCIGSGSG
SG(リンカー付きの322アミノ酸)(配列番号10)

10

【 0 1 3 7 】

タンパク質配列は、1個のアミノ酸のシフトを有する13 merのペプチドに翻訳された。末端切断型ペプチドを避けるためにC末端及びN末端を中性GSGSリンカーによって伸長した(太字)。

【 0 1 3 8 】

対照ペプチド:

Flag:DYKDDDDKGG(配列番号13)、78スポット;HA:YPYDVDPYAG(配列番号14)、78スポット(各アレイコピー)

20

【 0 1 3 9 】

ペプチドチップ識別子:

000264_01(10/90、Ala2Aspリンカー)

【 0 1 4 0 】

染色条件:

標準バッファー:PBS、pH7.4+0.05% Tween 20

ブロッキングバッファー:RocklandブロッキングバッファーMB-070

インキュベーションバッファー:標準バッファー及び10% RocklandブロッキングバッファーMB-070

一次サンプル:モノクローナルマウス抗体GDF-15(1 µg/µl):インキュベーションバッファー中、4、1:100の希釈、500rpmでわずかに振盪しながら16時間の染色

30

二次抗体:ヤギ抗マウスIgG(H+L)IRDye680、インキュベーションバッファー中、1:5000の希釈、室温(RT)で30分間の染色

対照抗体:モノクローナル抗HA(12CA5)-LL-Atto680(1:1000)、モノクローナル抗FLAG(M2)-FluoProbes752(1:1000);インキュベーションバッファー中、RTで1時間の染色

【 0 1 4 1 】

スキャナー:

Odysseyイメージングシステム、LI-COR Biosciences

設定:オフセット:1mm;解像度:21 µm;輝度 緑/赤: 7/7

【 0 1 4 2 】

結果:

標準バッファー中での30分及びブロッキングバッファー中での30分の予備膨潤後、10、12及び15 merのB7H3由来直鎖状ペプチドを有するペプチドアレイを、二次ヤギ抗マウスIgG(H+L)IRDye680抗体とともに1:5000の希釈でのみ、室温で1時間インキュベートして、二次抗体のバックグラウンド相互作用を解析した。PEPperCHIP(登録商標)を標準バッファーを用いて2×1分洗浄し、蒸留水ですすぎ、空気流中で乾燥させた。21 µmの解像度及び7/7の緑/赤輝度でOdysseyイメージングシステムを用いて読み取りを行った:本発明者らは、高頻度結合剤として知られるアルギニンリッチペプチド(ELHLRPQAARGRR(配列番号15)、LHLRPQAARGRRR(配列番号16)、HLRPQAARGRRRA(配列番号17)、LRPQAARGRRRAR(配列番号18)、RQAARGRRRRARA(配列番号19)、QAARGRRRRRARAR(配列番号20)及びQAARGRRRRRARARN(配列番号21)

40

50

)の弱い相互作用を観察し、荷電抗体色素とのイオン性相互作用により塩基性ペプチドMHA QIKTSLHRLK(配列番号22)を用いた。

【0143】

標準バッファー中で10分の予備膨潤後に、ペプチドマイクロアレイを、1:100の希釈のモノクローナルマウス抗体GDF-15とともに4 で一晩インキュベートした。標準バッファーで反復洗浄(2×1分)し、1:5000の希釈の二次抗体とともに室温で30分間インキュベーションを続けた。標準バッファーで2×10秒洗浄し、蒸留水で短くすすいだ後、PEPperCHIP(登録商標)を空気流中で乾燥させた。抗HA及び抗FLAG(M2)抗体による対照ペプチドの染色の前後に、21 μmの解像度及び7/7の緑/赤輝度でOdysseyイメージングシステムを用いて読み取りを行った。

10

【0144】

GDF-15に由来する直鎖状の13 merのペプチドのうち、過剰調節された輝度のもとでさえ、モノクローナルマウス抗体GDF-15と相互作用するものはないと示された。しかし、アレイを構成するFlag及びHA対照ペプチドの染色は、良好な均一なスポット輝度を生じさせなかった。

【0145】

まとめ:

GDF-15に対するモノクローナルマウスGDF-15抗体のエピトープマッピングは、抗原に由来する13 merのペプチドを有する直鎖状エピトープを全く示さなかった。この知見によれば、モノクローナルマウス抗体GDF-15が、低い親和性の部分的エピトープを有するコンフォメーション又は不連続エピトープを認識する可能性が極めて高い。二次抗体のみのバックグラウンド染色を上回る任意のGDF-15シグナルが明らかにならないことにより、PepSlide(登録商標)分析器を用いるスポット輝度の定量化及びそれに続くペプチドアノテーションを省略した。

20

【0146】

参照実施例3:質量分析のエピトープ切り出し及びエピトープ抽出によるペプチドリガンドエピトープの構造的同定

抗体B1-23と結合する組換えヒトGDF-15のエピトープは、エピトープ切り出し法及びエピトープ抽出法によって同定された(Suckauら Proc Natl Acad Sci U S A. 1990年12月; 87(24):9848~9852頁;R.Stefanescuら、Eur.J.Mass Spectrom. 13、69~75頁(2007年))。

30

【0147】

抗体カラムの調製のために、抗体B1-23をNHS活性化6-アミノヘキサン酸がカップリングされたセファロースに添加した。次いで、セファロースがカップリングされた抗体B1-23を0.8mlマイクロカラム中にロードし、ブロッキング及び洗浄バッファーで洗浄した。

【0148】

エピトープ抽出実験:

組換えヒトGDF-15を、トリプシンを用いて37 (溶液中)で2時間消化し、タンパク質中のトリプシン切断部位に従って種々のペプチドが得られた。完全に消化した後、ペプチドを、固定された抗体B1-23を含有する親和性カラム上にロードした。GDF-15の、結合していないペプチド並びに結合している可能性があるペプチドを、質量分析解析に使用した。質量分析によるペプチドの同定は可能ではなかった。これは、免疫複合体B1-23中のGDF-15の結合領域が、不連続又はコンフォメーションエピトープを含むという更なる指標であった。連続直鎖状エピトープの場合には、消化されたペプチドはエピトープペプチド中にトリプシン切断部位がない限り、その相互作用パートナーと結合するはずである。不連続又はコンフォメーションエピトープは、以下の部分に記載されるエピトープ切り出し法によって確認され得る。

40

【0149】

エピトープ切り出し実験:

次いで、親和性カラム上に固定された抗体B1-23を、組換えGDF-15とともに2時間インキュベートした。次いで、親和性カラム上に形成された免疫複合体を、トリプシンとともに

50

37 で2時間インキュベートした。切断は、組換えGDF-15に由来する種々のペプチドをもたらした。固定された抗体自体は、タンパク質分解的に安定である。抗体によって遮蔽され、このように、タンパク質分解による切断から保護された消化されたGDF-15タンパク質の得られたペプチドを酸性条件下(TFA、pH2)で溶出し、集め、質量分析によって同定した。

【0150】

MS/MS同定を使用するエピトープ切り出し法は、以下のペプチドをもたらした：

【0151】

【表A】

10

ペプチド	配列中の位置	質量	イオン/電荷
EVQVTMCIGACPSQFR (配列番号25)	40~55	1769.91	590.50(3+)
TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (配列番号26)	94~114	2310.96	771.33(3+)

20

【0152】

抗体B1-23と結合するヒトGDF-15の一部は、不連続又はコンフォメーションナルエピトープを含む。質量分析によって、免疫複合体の形成に預かるGDF-15タンパク質中に2つのペプチドが同定された。これらのペプチドは、GDF-15アミノ酸配列中の位置40~55(EVQVTMCIGACPSQFR)及び94~114(TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI)に限定される。したがって、これら2種のペプチドは、抗体B1-23と結合するGDF-15タンパク質のエピトープを含む。

【0153】

本発明は、以下の非限定例によって例示される：

30

【0154】

(実施例1)

イピリムマブ(モノクローナル抗CTLA4抗体)を用いる前治療を受けており、完全奏効を示すことができなかつた、ペムプロリズマブ(モノクローナル抗PD-1抗体)を用いる治療を受けたヒト黒色腫患者では、hGDF-15血清レベルは、ペムプロリズマブを用いる治療の開始後4ヶ月の時点で不十分な治療奏効と相関する。

【0155】

本発明者らは、免疫チェックポイントブロッカーを投与されている癌患者が、hGDF-15の阻害から恩恵を受けることができたか否かを調べるように設定した。この可能性を調べるために、イピリムマブ(モノクローナル抗CTLA4抗体)を用いる前治療を受けている、臨床研究においてペムプロリズマブ(モノクローナル抗PD-1抗体)を用いる治療を受けた黒色腫患者から得た血清をhGDF-15血清レベルについて分析した。次いで、hGDF-15が免疫チェックポイントブロッカーに対する患者の奏効に影響を及ぼすか否かを調べるために、得られたhGDF-15血清レベルを患者の奏効と相関させた。血清は、ペムプロリズマブを用いる治療の前に患者から採取した。

40

【0156】

研究及びその後の解析は以下の通りに実施した：

【0157】

臨床研究の組み入れ基準：

適格な患者は18歳以上であり、組織学的又は細胞学的に確認された切除不能なステージ

50

III又はステージIVの黒色腫を有しており、局所療法に適しておらず、最後のイピリムマブ用量(最小2用量、3週間ごとに3mg/kg 1回)の24週以内に疾患進行が確認され、以前のBRAFi又はMEK阻害剤療法又は両方(BRAFV600変異体陽性の場合)、イピリムマブ関連有害事象のグレード0~1への解決又は改善及び研究薬物の第1の用量の前の少なくとも2週間のプレドニゾン用量10mg/日以下、米国東海岸癌臨床試験グループ(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG)実施状態0又は1、固形癌の効果判定基準(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)バージョン1.1(RECIST v1.1)で測定可能な疾患、並びに絶対好中球カウント(mLあたり 1500個細胞)、血小板(mLあたり 100000個細胞)、ヘモグロビン(90g/L)、血清クレアチニン(1.5正常の上限[ULN])、血清総ビリルビン(1.5ULN又は総ビリルビン濃度>1.5ULNを有する患者について直接ビリルビン ULN)、アスパラギン酸及びアラニンアミノトランスフェラーゼ(2.5ULN又は肝臓転移を有する患者について 5ULN)、国際標準比又はプロトロンビン時間(抗凝固薬を使用しない場合 1.5ULN)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(抗凝固薬を使用しない場合 1.5ULN)、について事前に特定した範囲内の値とした。患者は、直近の療法の最後の用量とペムプロリズマブの第1の用量の間に少なくとも4週間のウォッシュアウト期間を有していた。既知活動性脳転移又は癌性髄膜炎、活動性自己免疫疾患、全身療法を必要とする活動性感染、HIV感染の既知病歴、活動性B型肝炎ウイルス又はC型肝炎ウイルス感染、12週間よりも長く持続するグレード4イピリムマブ関連有害事象又はグレード3イピリムマブ関連有害事象の病歴、又は任意のその他の抗PD-1若しくは抗PD-L1療法を用いる以前の治療を有する患者は、研究から排除された。

10

20

【0158】

患者の治療:

上記で定義された組み入れ基準を満たすヒト黒色腫患者(2人の例外を含む)は、イピリムマブ(モノクローナル抗CTLA4抗体)を用いて既に治療されており、完全奏効を示すことができなかった。ペムプロリズマブ(モノクローナル抗PD-1抗体)を、2mg/体重1kg又は10mg/体重1kgのいずれかで与えた。2つの治療グループ間で用量依存性相違は観察されなかったため、治療された患者を一緒に評価した。

【0159】

奏効の判定基準:

固形癌の効果判定基準(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)バージョン1.1(RECIST v1.1)を使用して、治療に対するレスポナー及びノンレスポナー並びに進行中の応答を分類した(Eisenhauerら:New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)、Eur. J. Cancer. 45、第2号、2009年1月、228~47頁)。

30

【0160】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によるhGDF-15血清レベルの解析:

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によってヒトGDF-15血清レベルを測定した。

【0161】

バッファー及び試薬:

緩衝ブロッキング溶液:PBS中1% BSA(画分V pH7.0、PAA社)

洗浄溶液:PBS-Tween(0.05%)

標準:ヒトGDF-15(ストック濃度120 µg/ml、R&D Systems社製)

捕捉抗体:ヒトGDF-15 MAb(クローン147627)R&D Systems社製、マウスIgG2B(カタログ番号MAB957、R&D Systems社製、ストック濃度360 µg/ml)

検出抗体:ヒトGDF-15ビオチン化された親和性精製されたPAb、ヤギIgG(カタログ番号BAF940、R&D Systems社製、ストック濃度9 µl/ml)

ストレプトアビジン-HRP(カタログ番号DY998、R&D Systems社製)

基質溶液:10ml 0.1M NaOAc pH6.0+100 µl TMB+2 µl H₂O₂

停止溶液:1M H₂SO₄

40

【0162】

50

解析手順:

1. プレート調製:

a. 捕捉抗体を、PBSで2 µg/mlの作業濃度に希釈した。96ウェルマイクロプレート(Nunc maxisorp(登録商標))を、外側の列(A及びH)を除いて、ウェルあたり50 µlの希釈捕捉抗体を用いて直ちにコーティングした。列A及びHを、実験の間のサンプルの蒸発を防ぐためにバッファーで満たした。プレートを穏やかに軽くたたいて、各ウェルの底が完全に覆われることを確実にした。プレートを湿潤チャンバー中に入れ、室温(RT)で一晩インキュベートした。

b. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。

c. 各ウェルに150 µlのブロッキング溶液を添加し、続いて、RTで1時間インキュベートした。

d. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。

【0163】

2. アッセイ手順:

a. 標準を調製した。GDF-15を、緩衝ブロッキング溶液で1ng/mlの最終濃度に希釈した(4.17 µl GDF+496 µl緩衝ブロッキング溶液)。1:2段階希釈を作製した。

b. 二連のサンプル1:20(6 µl+114 µl緩衝ブロッキング溶液)を調製した。

c. ウェルあたり50 µlの希釈サンプル又は標準を添加し、続いて、RTで1時間インキュベートした。

【0164】

【表B】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	s1	s2	...									s12
C	s1	s2	...									s12
D	s13	s14	...									s24
E	s13	s14	...									s24
F	標準							希釈				
G					段階							
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

【0165】

a. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。

b. 検出抗体を、50ng/mlの最終濃度に希釈した(56 µl+10mlブロッキングバッファー)。各ウェルに50 µlの希釈検出抗体を添加し、続いて、RTで1時間インキュベートした。

c. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween (0.05%)を用いて3回洗浄した。

d. ストレプトアビジン-HRPを、1:200希釈した(50 µl+10mlブロッキングバッファー)。各ウェルに50 µLのストレプトアビジン-HRPの作業希釈を添加し、続いて、RTで20分間インキュベートした。

e. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。

f. 基質溶液を調製した。各ウェルに50 µLの基質溶液を添加し、続いて、RTで20分間インキュベートした。

g. 各ウェルに50 µLの停止溶液を添加した。

h. 450nmに設定したマイクロプレートリーダーを使用して、各ウェルの光学濃度を直ちに調べた。

【0166】

3. GDF-15血清力価の算出:

50

a. 各サンプル/GDF-15標準希釈を二連で適用した。GDF-15力価を調べるために、2連の平均を算出し、バックグラウンド(GDF-15を含まないサンプル)を差し引いた。

b. 標準曲線を作製するために、線形範囲から得た値をX-Y-図(X軸:GDF-15濃度、Y軸:OD450)にプロットし、線形曲線フィットを適用した。既知濃度を有する標準希釈のOD450値から補間することによって、試験サンプルのGDF-15血清力価を算出した。

c. サンプルの最終GDF-15濃度を算出するために、それぞれの希釈係数を考慮した。標準範囲を下回る又は上回るOD値をもたらすサンプルを、適当な希釈で再解析した。

【0167】

hGDF-15血清レベルの患者データとの比較:

次いで、測定されたhGDF-15血清レベルを、研究から得られた患者奏効データと比較した。

10

【0168】

図1は、治療レジメンに対するレスポンドー及びノンレスポンドーのGDF-15血清レベルを示す。すべての血清サンプルは、抗PD-1抗体を用いる治療の前に得られていた。図からわかるように、ノンレスポンドーのほとんどは、すべてのレスポンドーよりも高いGDF-15血清レベルを有する。

【0169】

この結果はまた、それぞれ、 $<1.8\text{ng/ml}$ 、 $1.8\sim 4.2\text{ng/ml}$ 及び $>4.2\text{ng/ml}$ のhGDF-15血清レベルを有する患者中のレスポンドー及びノンレスポンドーの数を示す図2に反映されている。

20

【0170】

これらの知見は、高いGDF-15レベルが不十分な治療奏効と関連していることを示唆した。したがって、これらの知見をその統計的有意性について試験した:

【0171】

hGDF-15血清レベルの患者データとの統計的相関:

データ:

データ解析は、列(変数)サンプル表示、GDF-15(ng/ml)、レスポンドー/ノンレスポンドー、日数(死亡又は打ち切りまでの)及び進行中(進行中の生命の指数変数)を含有する35人の患者から得たサンプルから得たデータを含有するデータファイルに基づいていた。ペムプロリズマブを用いる治療の開始後4ヶ月の時点で、これらのデータのレスポンドー/ノンレスポンドー分類を行った。一部の血清サンプルは、解析のわずか前にしか得られなかったため、奏効は29人においてしか評価できなかった。1人の部分レスポンドー(腫瘍の大きさの $>30\%$ 低減)は、レスポンドーとして評価した。LDH決定のために、4サンプルは溶血により排除されなければならなかった。

30

【0172】

アウトカム変数(エンドポイント):

a. 全生存(死亡までの時間)。このエンドポイントは、データファイルに由来する死亡についてのイベント指標(1=死亡/0=生存)、変数「日数」に対応する、死亡又は打ち切りまでの時間(患者が生存しているとわかっていた最後の時間)から構成される。

b. 治療に対する奏効、例えば、患者がレスポンドーであったか否か(1=レスポンドー、0=ノンレスポンドーとしてコードされる)。部分レスポンドーは、レスポンドーと考えた。

40

【0173】

【表 C】

サンプル表示	GDF-15 (ng/ml)	LDH[U/l]	レスポンド ー/ノンレ スポンダー	抗 PD-1 からの 日数	以前のイピ リムマブ治 療	進行中 奏効
HG12.950	2.010	398	NR	72	x	
HG13.1002	0.479	340	R	538		x
HG13.1012	12.010	3734	NR	71	x	
HG13.1067	9.173	591	NR	83	x	
HG13.1069	4.635	2419	NR	53	x	
HG13.1099	1.285	370	R	693	x	x
HG13.1202	1.641	480	R	575	x	
HG13.1341	4.595	1930	NR	15	x	
HG13.1377	0.539	388	R	269	x	
HG13.1419	0.914	317	R	617		x
HG13.1432	1.195	269	R	611	x	x
HG13.1458	0.433	453	R	605	x	x
HG13.1557	4.045	564	R	293	x	
HG13.1587	0.345	371	R	186	x	
HG13.1663	1.320	溶血	R	176	x	
HG13.516	0.641	342	R	264	x	
HG13.578	2.841	1143	R	266	x	
HG13.596	1.085	溶血	R	772	x	x
HG13.757	3.310	溶血	NR	117	x	
HG13.811	4.029	763	R	596	x	x
HG14.1080	5.979	1359	NR	43	x	
HG14.1108	0.979	555	R	206	x	x
HG14.1147	2.084	227	R	154	x	x
HG14.1159	2.150	333	R	227	x	x
HG14.161	0.889	343		108	x	x
HG14.557	2.014	368	R	317	x	x
HG14.707	2.783	442	NR	71	x	
HG14.853	0.846	343	NR	71	x	
HG14.885	0.874	溶血	PR	63	x	
HG15.299	0.412	354		86	x	x
HG15.47	1.465	475		80	x	x
HG15.49	3.912	631		93	x	x
HG15.546	0.358	溶血		23	x	x
HG15.560	2.389	768		21	x	x
HG15.59	8.122	588	NR	23	x	

10

20

30

40

【0174】

データ解析:

全生存をコックス比例ハザード生存モデルによって解析した。あるモデルを連続予測変数としてGDF-15(ng/ml)を用いて、別のモデルをカテゴリー予測変数としてGDF-15に基づくグループ化変数を用いて(グループは<1.8ng/ml、1.8~4.2ng/ml、>4.2ng/mlのGDF-15とした)フィッティングした。全体で、生存データは35人の患者から入手可能であった。

【0175】

50

治療に対する奏効(2値変数)を、二項誤差分布及びロジットリンク関数(ロジスティック回帰)を用いて一般化線形モデル(GLM)によって解析した。4ヶ月後にRECIST1.1基準によって評価されるような治療に対する奏効について、連続予測変数としてGDF-15(ng/ml)を用いてモデルをフィッティングした。GDF-15>4.2ng/mlを有するグループにおいて奏効した患者がなかったため、このグループ対GDF-15<1.8ng/mlのグループについてのオッズ比推定値は極めて大きくなり、極めて広い信頼区間を有する。カテゴリー予測変数としてGDF-15に基づくグループ化変数を用いて別のモデルをフィッティングする代わりに、カイ二乗(χ^2)検定を使用して、グループを比較した(レスポナーの割合の同等性を試験する)。レスポナー/ノンレスポナーの数は極めて小さい(<5)ことがあるので、フィッシャーの正確確率検定を使用する感度解析を更に行った。最後の4ヶ月内に抗PD-1のみを投与されていた患者は、レスポナー又はノンレスポナーとしてまだ分類できなかった。したがって、29人の患者のみを療法に対する奏効について評価できた。

10

【0176】

データ解析は、統計ソフトウェアパッケージR(R Core Team、2014、バージョン3.1.0)を使用して実施した。

【0177】

結果:

表1~2は、連続予測変数としてGDF-15を用いたモデルから得た結果を示す。死亡のハザードは、高濃度のGDF-15について有意に増大した(HR>1、表1)が、治療に対する奏効の確率は、オッズ比(OR)によって示されるように有意に低下した(OR<1、表2)。図3は、レスポナー/ノンレスポナーでの対応するデータ並びにモデルによって予測される治療に対する奏効の確率を示す。

20

【0178】

表3は、カテゴリー予測変数としてGDF-15に基づくグループを用いたコックス比例ハザードモデルから得た結果を示す。GDF-15<1.8ng/mlを有するグループは、参照グループとして使用されている(表中に示されていない)。表3中の2つのハザード比は、1.8から4.2の間のGDF-15を有するグループ及びGDF-15>4.2を有するグループの参照グループとの比較を表す。これらのグループの両方において、死亡のハザードは増大されるが(参照グループと比較して)、GDF-15>4.2を有するグループより大きな程度までである。図4Aは、3つのグループにおける生存についての Kaplan-Meier 曲線を示す。

30

【0179】

レスポナーの割合は、グループ間で有意に異なっていた(レスポナー1: $\chi^2_{df=2}=16.04$, $P=0.0003$)。この結果は、フィッシャーの正確確率検定の結果によって確認された($P=0.0003$)。グループあたりの死亡及びレスポナーの数は、Table 1(表1)に示されている。更に、Table 2(表2)は、各グループのGDF-15のいくつかの記述統計学を示す。

【0180】

【表1】

Table 1:

	HR	95% CI	z	p
GDF-15	1.27	[1.10,1.47]	3.27	0.00109

40

Table 1は、アウトカム変数として全生存(死亡までの時間)を、連続予測変数としてGDF-15を用いたコックス比例ハザードモデルから得たハザード比(HR)推定値を示す。解析は、35人の患者から得たサンプルを含んでいた。

【0181】

【表2】

Table 2:

	推定値(OR)	95% CI	z	p
(インターセプト)	25.281	[4.219,364.950]	2.94	0.00324
GDF-15	0.389	[0.159,0.698]	-2.54	0.01120

Table 2は、アウトカム変数として治療に対する奏効(レスポナー1)及び連続予測変数としてGDF-15を用いた一般化線形モデルから得たオッズ比(OR)推定値を示す。解析は、29人の患者から得たサンプルを含んでいた。

10

【0182】

【表3】

Table 3:

	HR	95% CI	z	p
GDF-15・グループ (1.8,4.2]	1.54	[0.48,4.92]	0.73	0.466
GDF-15・グループ (4.2,13]	21.52	[5.20,89.06]	4.24	<0.001

20

Table 3は、アウトカム変数として全生存(死亡までの時間)及びカテゴリー予測変数としてGDF-15に基づくグループを用いたコックス比例ハザードモデルから得たハザード比(HR)推定値を示す。解析は、35人の患者から得たサンプルを含んでいた。

【0183】

【表4】

Table 4:

変数	レベル	n _[0,1.8]	% _[0,1.8]	n _{(1.8,4.2]}	% _{(1.8,4.2]}	n _{(4.2,13]}	% _{(4.2,13]}	n _{すべて}	% _{すべて}
死亡	0	11	61.1	6	54.5	0	0.0	17	48.6
	1	7	38.9	5	45.5	6	100.0	18	51.4
	すべて	18	100.0	11	100.0	6	100.0	35	100.0
レスポナー1	0	1	7.1	3	33.3	6	100.0	10	34.5
	1	13	92.9	6	66.7	0	0.0	19	65.5
	すべて	14	100.0	9	100.0	6	100.0	29	100.0

40

Table 4は、GDF-15(<1.8、1.8~4.2、>4.2ng/ml)によって定義される3つのグループにおける死亡及びレスポナー(「レスポナー1」)の数を示す。

【0184】

【表5】

Table 5:

変数	レベル	n	\tilde{x}	\bar{x}	s	最小	最大
GDF-15	[0,1.8]	18	0.9	0.9	0.4	0.3	1.6
	(1.8,4.2]	11	2.8	2.9	0.8	2.0	4.0
	(4.2,13]	6	7.1	7.4	2.9	4.6	12.0
	すべて	35	1.6	2.6	2.7	0.3	12.0

10

Table 5: GDF-15(<1.8、1.8~4.2、>4.2ng/ml)によって定義される3つのグループにおける連続予測変数GDF-15(ng/ml)。患者数(n)、中央値(\tilde{x})、平均(\bar{x})、標準偏差(s)、最小(Min)及び最大(Max)が示されている。

【0185】

乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)は、固形腫瘍の予後的に関連するマーカーであると考えられる。これは、臨床研究の大きなプール(31,857人の患者)に基づく包括的メタ解析によって最近確認された。すべての疾患サブグループ及びステージにわたって、OSに対するLDHの上昇の一貫した効果(HR=1.48、95%CI=1.43~1.53)が見られた。更に、非転移性疾患と比較して転移性疾患においてLDHのより強い予後値への傾向があり、これは、より大きな腫瘍負荷を反映すると考えられた。正確な機序は未知のままであるが、低酸素、及びワールブルグ効果による代謝のリプログラミングと関連する可能性があり、LDHは、高腫瘍負荷又は腫瘍の攻撃性を反映すると解釈され得る(Zhang, J., Yao, Y.-H., Li, B.-G., Yang, Q., Zhang, P.-Y.及びWang, H.-T.(2015年). Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. Scientific Reports 5, 9800)。血清LDHレベルは、黒色腫の進行度診断スキーム中に組み込まれているので、このパラメータは、大学リファレンス研究施設によって臨床診断の際に日常的に測定される。

20

30

【0186】

【表6】

Table 6:

	GDF-15 (ng/ml)		LDH (U/l)	
	レスポンドー (n=19)	ノンレスポ ンダー(n=10)	レスポンドー (n=9)	ノンレスポ ンダー(n=16)
中央値	1.2	4.6	371	591
平均	1.7	5.6	455	1312
標準偏差	1.2	3.6	218	1108
t検定(両側、タイプ3)	0.012		0.061	

40

Table 6: レスポンドー対ノンレスポンドーにおけるGDF-15及びLDH

【0187】

4つの血液サンプルでは、溶血によりLDH決定は失敗した。

【0188】

50

Table 7(表7)は、GDF-15の代わりに治療の奏効(レスポナー1)の連続予測変数としてLDHを使用した点を除いて、Table 2(表2)の類似物である。治療に対する奏効の確率は、LDHの値が増大するにつれ、わずかではあるが有意に低減した(OR<1、p<0.1)。図5は、レスポナー/ノンレスポナーでの対応するデータ並びにモデルによって予測される治療に対する奏効の確率を示す。

【0189】

GDF-15が、治療に対する奏効(レスポナー1)についてLDHよりも良好な予測変数であるか否かを決定するために、2つの異なるモデルをフィッティングした:予測変数として両方のマーカーを含有するモデル(自動的に両方のマーカーで測定値を有する患者のみを含む)及びGDF-15を唯一の予測変数として用いるが、LDHの測定値を有する患者のみを使用するモデル。次いで、3種すべてのモデルについて赤池情報量基準(Akaike's information criterion)(AIC)を算出した(Table 5(表5))。AICが小さいほど、より効率的なモデルを示す。実際、予測変数として、GDF-15を用いるモデルのAICは、LDHを用いるモデルのAICよりも小さかった。GDF-15のみを用いるモデルは更に、両方の予測変数を用いるモデルよりも小さいAICを有し、これは、異なる予測変数としてのLDHはモデルを改善しないことを示す。もちろん、両方の予測変数を用いるモデルが治療に対する奏効をより悪く説明するはずはないが、「モデル効率」の尺度としてAICは、モデルを相当に改善しない予測変数を用いるモデルにペナルティーを課し、より簡単なモデルを支持する。逸脱度の解析(分散分析と同様であるが、一般化線形モデルについてである)によって、すなわち、両方の予測変数を用いるより複雑なモデルと予測変数の一方のみを用いるより簡単なモデルの両方(LDH又はGDF-15のいずれかによるモデルの低減に対応する)の間で説明される逸脱度の相違を比較して、代替モデル比較を行った。より複雑なモデルからGDF-15を除去することは、説明される逸脱度の有意な低減をもたらしたが(P=0.02)、LDHを除去することはもたらさなかった(P=0.41)。

10

20

【0190】

【表7】

Table 7:

	推定値(OR)	95% CI	z	p
(インターセプト)	9.741	[2.055,89.308]	2.44	0.0146
LDH	0.997	[0.994,0.999]	-1.79	0.0727

30

Table 7:アウトカム変数として治療に対する奏効(ファイルAにおいて定義されるようなレスポナー1)及び連続予測変数としてLDHを用いた一般化線形モデルから得たオッズ比(OR)推定値。解析は、25人の患者から得たサンプルを含んでいた。

【0191】

40

【表 8】

Table 8:

	df	AIC
LDH及びGDF-15を用いるモデル	3.00	25.10
LDHのみを用いるモデル	2.00	28.55
GDF-15のみを用いるモデル	2.00	23.77

Table 8:小さい値ほどより効率的なモデルを示す赤池情報量基準(AIC)に基づくモデル比較。

df:自由度。すべてのモデルは、25人の患者から得たサンプルを含んでいた。

10

【0192】

図5Aは、連続予測変数としてLDHを使用する一般化線形モデルによって予測されるような治療に対する奏効(レスポナー1)の確率を示す。丸はデータを示し、曲線はモデルを示す。垂直線は、治療奏効の確率が0.5であるLDH濃度を示す。患者コホートは、同一であった。しかし、4人の患者では、LDHレベルの信頼のおける決定は溶血のために失敗した。図5Bは、レスポナー及びノンレスポナー並びにそれぞれのhGDF-15及びLDHレベルのグラフを示す。カットオフ値がすべてのレスポナーを網羅するように選択される場合には、GDF-15に基づく試験によって、6人(9人のうち)のノンレスポナーの同定が可能となるが、LDHレベルに基づく解析は、4人(9人のうち)のノンレスポナーしか識別できない。LDH試験については、データの喪失を引き起こす4つの溶血サンプルが排除されなければならなかった。

20

【0193】

したがって、本発明によるhGDF-15レベルに基づく臨床アウトカムの予測は、固形腫瘍についての診断標準マーカーLDHを上回る以下の利点を含む：

- ・LDHレベルと正の臨床アウトカムの間よりも、hGDF-15レベルと正の臨床アウトカムの間により強い逆統計相関があり、したがって、hGDF-15レベルは、LDHレベルと比較して、予測について優れている。更に、上記で示される赤池情報量基準(Akaike's information criterion)によって反映されるように、hGDF-15レベルは単独で、LDHレベルと組み合わせたhGDF-15レベルよりもいっそうより良好な予測変数である。

30

- ・hGDF-15測定は、LDH測定よりも溶血に対して感度が高くなく、したがって、臨床実施において有利である。

- ・hGDF-15レベルは、LDHレベルよりも多数のノンレスポナーを識別可能にする。LDHは現在、固形腫瘍の最良の利用可能な臨床マーカーと考えられるので、これらの利点は特に特筆すべきことである。

【0194】

まとめ：

総合すると、上記の実施例1の統計結果は、治療に対する奏効の確率が、患者血清中のhGDF-15レベルが増大するにつれ有意に低減することを示した。例えば、Table 2(表2)中に示される0.389のオッズ比は、hGDF-15血清レベルが1ng/mlだけ増大すると、治療に対する奏効の確率が元の値の0.389倍の値に低減する、すなわち、約60%低減することを示す。hGDF-15血清レベルが2ng/mlだけ増大すると、治療に対する奏効の確率が元の値の 0.389×0.389 倍=0.151倍の値に低減する、すなわち、約85%低減する。

40

【0195】

同様に、表1に示される1.27のハザード比は、hGDF-15血清レベルが1ng/mlだけ増大されると、患者の死亡の確率が1.27倍増大することを示す。

【0196】

50

実施例1の結果は、hGDF-15の血清レベルと、例えば、患者の奏効及び患者の生存を含む、患者における抗PD-1ベースの免疫療法の正の臨床アウトカムの確率との間に強い逆相関があることを示す。したがって、本発明によれば、有利なことに、患者由来の血液サンプル中のhGDF-15のレベルを使用して、抗PD-1のような免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効の確率を予測できる。

【0197】

本実施例は、固形腫瘍の一例として黒色腫の結果を示すが、hGDF-15発現は黒色腫に限定されず、多数のその他の固形癌中にも存在する。同様に、黒色腫以外の固形腫瘍もまた、免疫チェックポイントブロッカーを用いて治療され得ることが知られている。したがって、本発明によれば、有利なことに、黒色腫においてだけでなく、本明細書において言及される固形癌のすべてにおいて、患者由来の血液サンプル中のhGDF-15のレベルを使用して、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効の確率を予測できる。

10

【0198】

(実施例2)

GDF-15レベルは、種々の腫瘍実体の転移中のCD8⁺腫瘍浸潤リンパ球(TIL)と逆相関する。

患者の奏効に対するhGDF-15の負の効果の一因となるhGDF-15の機序を同定するために、種々の固形腫瘍からの脳転移をhGDF-15の発現について、及び免疫系の細胞の存在について解析した：

【0199】

組織検体及び組織処理：

記録保存された脳転移から得た、ホルマリン固定されパラフィン包埋された(FFPE)組織を解析し、それらは組織マイクロアレイ(TMA)として集められ処理された。すべての検体は、UCT腫瘍バンク(Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany, member of the German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg, Germany and German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany)から、又は癌レジストリー腫瘍バンク「Blut-und Gewebebank zur Erforschung des malignen Melanoms」(Department of Dermato-oncology, University Hospital Tubingen, Germany)から入手した。この研究の承認は、2つの独立倫理委員会(倫理委員会UCT Frankfurt /Goethe University Frankfurt am Main, Germany:プロジェクト番号:GS 4/09;SNO_01-12;倫理委員会University of Tubingenプロジェクト番号:408/2013BO2)によって付与された。黒色腫(n=98)、NSCLC(n=33)、乳癌(n=18)、RCC(n=10)、SCLC(n=7)、結腸直腸癌(n=7)、特定不能であった癌(癌NOS n=11)及びその他としてまとめられた稀な腫瘍の検体(n=6)を含む、脳転移を有する合計190人の患者を調べた。155人の患者の生存データ(腫瘍切除後の生存時間)を集め、更に、169人の患者における脳転移の数及び55人の黒色腫患者のサブコホートにおける脳転移の大きさを解析した。

20

30

【0200】

免疫組織化学：

自動化IHC染色システムDiscovery XT(Roche/Ventana社、Tucson, Arizona, USA)で3µm厚のスライド及び標準プロトコールを使用して、すべての抗体の免疫組織化学を実施した。以下の抗体を使用した:抗GDF-15(HPA011191、希釈1:50、Sigma/Atlas社、プロトコール番号730)、CD3(クローンA0452、希釈1:500、DAKO社、Glostrup, Denmark)、CD8(クローンC8/144B、希釈1:100、DAKO社、Glostrup, Denmark)、PD-1(クローンNAT105;希釈1:50;Abcam社、Cambridge, United Kingdom)、PD-L1(E1L3N;希釈1:200;Cell Signaling社、Boston、U.S.A.)、FOXP3(クローン236A/E7;希釈1:100;eBioscience社、San Diego, U.S.A.)。スライドをヘマトキシリンを用いて対比染色し、マウントした。

40

【0201】

統計解析：

すべてのサンプルを、染色されたTMAコア上のすべての細胞と関連する陽性細胞の頻度(パーセンテージとして)に従ってスコア化した。hGDF-15発現については、これまでに詳細に記載されたような[21,22]スコアを使用した:頻度0~1% スコア0;1~10% スコア1;10

50

~25% スコア2;25~50% スコア3;>50% スコア4;更に、頻度スコアに染色の強度を乗じ(1弱い染色、2中程度の染色、3強い染色)、最後に順序尺度化hGDF-15スコア(0、1、2、3、4、6、8、9、12)を得た。順序尺度化変数を、ノンパラメトリックウィルコクソン/クラスカル-ウォリス検定及びダンの方法と比較して、複数の試験について補正した。連続変数については、ANOVAと、それに続くテューキー-クレーマー-HSDポスト-ホック試験を使用して種々の脳転移実体間で平均を比較した。脳転移の大きさとマーカー発現の相関解析のために、線形フィットとそれに続くANOVAを実施し、順序尺度化変数の場合には、スピアマンのロー相関解析を使用した。すべての統計解析について、 $p<0.05$ の有意レベルを設定した。

【0202】

すべての統計解析を、JMP8及びJMP11(SAS、Cary、U.S.A.)を使用して実施し、Prism 6(GraphPadソフトウェア、La Jolla、U.S.A.)を用いて更なるグラフを作製した。

【0203】

結果:

図6は、図中に示されるように、それぞれGDF-15並びにT細胞マーカータンパク質CD3及びCD8について免疫組織化学によって染色された、高いGDF-15免疫反応性を有さない(上のパネル)又は高いGDF-15免疫反応性を有する(下のパネル)黒色腫脳転移から得た例示的組織切片を示す。GDF-15発現を有さない切片では、多数の浸潤免疫細胞が暗いスポットとして見られる。高レベルのGDF-15を発現する転移を示す写真中で、稀な浸潤免疫細胞が矢印によって表されている(CD3及びCD8陽性細胞が矢印によって示されている)。図からわかるように、驚くべきことに、高いhGDF-15免疫反応性を有する組織切片(下のパネル)では、hGDF-15免疫反応性がない組織切片(上のパネル)と比較して、CD3⁺及びCD8⁺細胞の数が強く低減されたことが見出された。注目すべきことに、PD-L1、PD-1のような染色されたその他のマーカーはすべて、腫瘍浸潤性CD3⁺及びCD8⁺T細胞の数と正の相関を示した。

【0204】

したがって、次に種々の黒色腫脳転移にわたって、hGDF-15レベルとCD3⁺T細胞のパーセンテージの間に逆相関が存在するか否かを解析した。図7Aは、GDF-15スコア(「統計解析」の節において上記で記載されたように得られた)に対するCD3⁺細胞のパーセンテージのプロットを示す。図7Aに示されるように、CD3⁺細胞のパーセンテージとGDF-15スコアの間に統計的に有意な逆相関があった($p=0.0015$)。

【0205】

同様に、種々の黒色腫脳転移にわたって、hGDF-15レベルとCD8⁺T細胞のパーセンテージの間に逆相関が存在するか否かも解析した。図7Bは、GDF-15スコア(「統計解析」の節において上記のように得られた)に対するCD8⁺細胞のパーセンテージのプロットを示す。図7Bに示されるように、CD8⁺細胞のパーセンテージとGDF-15スコアの間に統計的に有意な逆相関があった($p=0.0038$)。

【0206】

対照的に、スピアマンの順位相関係数(ロー)検定によれば、GDF-15をFOXP3と関連させることは、統計的に有意な結果をもたらさなかった(種々の腫瘍実体にわたって、 $p=0.8495$;黒色腫転移のみを評価した場合、 $p=0.2455$)。

【0207】

最後に、種々の腫瘍実体からの脳転移にわたって、hGDF-15レベルと、CD8⁺及びCD3⁺T細胞のパーセンテージの間に逆相関が存在するか否かも解析した。図8は、種々の腫瘍実体(黒色腫、CRC、RCC、乳癌、NSCLC及びSCLC)からの、それぞれ168の(CD3について)又はそれぞれ169の(CD8について)脳転移におけるCD8⁺及びCD3⁺T細胞のパーセンテージに対するGDF-15スコアのプロットを示す。プロットは、「統計解析」の節において上記で記載されたように得た。図8に示されるように、CD8⁺細胞のパーセンテージとGDF-15スコアの間の統計的に有意な逆相関($p=0.0311$)並びにCD3⁺細胞のパーセンテージとGDF-15スコアの間の統計的に有意な逆相関($p=0.0093$)があった。その他のマーカー(PD-L1、PD-1、FOXP3)もやはり、CD3及びCD8T細胞浸潤との正の相関関係を示した。

10

20

30

40

50

【0208】

まとめ:

上記の結果は、転移におけるhGDF-15の、一般的なT細胞マーカータンパク質CD3を発現するT細胞のパーセンテージとの逆相関だけでなく、転移におけるCD8⁺Tリンパ球のパーセンテージとの逆相関もあることを示す。CD8⁺Tリンパ球の存在は、抗PD-1抗体を用いる免疫チェックポイント阻害後の腫瘍退縮にとって特別に必要であるとこれまでに示されたので、これは特筆すべきことである(Tumehら、Nature、2014年11月27日; 515(7528):568~71頁)。

【0209】

したがって、本発明によれば、hGDF-15レベルと、好適な臨床アウトカム(例えば、患者の生存又は治療奏効の存在)の逆相関の好ましいが制限されない説明は、hGDF-15が、腫瘍転移を含む固形腫瘍中のCD8⁺Tリンパ球のパーセンテージを低減し、それによって、好適な臨床アウトカム(例えば、患者の生存又は治療奏効の存在)の確率を低減するというものである。この相関は種々の固形癌実体にわたって観察されるので、本発明は、黒色腫等の特定の固形癌に限定されない。

10

【0210】

したがって、本発明は、好ましい実施形態において言及されるような固形腫瘍のすべてに適用され得る。

【0211】

(実施例3)

GDF-15は、T細胞の内皮細胞との接着を低減する。

本発明者らは次いで、hGDF-15が固形腫瘍中のT細胞のパーセンテージに影響を及ぼす方法を決定しようと試みた。

20

【0212】

血流から腫瘍組織へのT細胞の浸潤にとって必要であるステップは、T細胞が内皮と最初に接着しなくてはならないことであり、その後、それらは腫瘍に入ることができる。このステップを刺激するために、またこのステップが、hGDF-15によって影響を受け得るか否かを評価するために、本発明者らは、T細胞のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)への接着を測定するモデル系を使用した:

【0213】

T細胞フロー/接着実験(HUVECでの):

1日目:

a. μ -スライドVI 0.4(ibidi GmbH, Germany)を、フィブロネクチン(100 μ g/mL):ローディングポートあたり30 μ Lを用いてコーティングした。それらを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした(又はプレコーティングされたスライドを使用した)。

b. フィブロネクチンを吸引し、続いて、HUVEC培地を用いて洗浄した。

c. 6ウェルプレートから得たHUVECをトリプシン処理した(カウント: 2×10^5 個/mL(合計2mL))。

d. それらを洗浄し、 1×10^6 個細胞/mLに希釈した。

e. 30 μ LのHUVECを μ -スライドVIのローディングポート中に適用し、顕微鏡下でチェックした。

f. μ -スライドVIを蓋で覆い、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂iでインキュベートした。

30

40

【0214】

2日目:

a. HUVECを、チャンネル2~5(以下の表を参照のこと)においてTNF (10ng/mL)及びIFN (10ng/mL)を用いて活性化した:チャンネルからすべての培地を吸引し、サイトカインを含有する予温した培地と置換した。

【0215】

3日目:

a. T細胞を単離した(汎T細胞の陰性単離)。

50

b. T細胞を、GDF-15(100ng/mL)を有する又は有さないウェル1(1×10^6 個細胞/mL)中で1時間プレインキュベートした。

c. GDF-15(100ng/mL)を有するチャンネル4及び5中でHUVECを1時間プレインキュベートした：ローディングポート中のすべての培地を吸引し、両ローディングポートをGDF15を含有する予温培地で満たした。

d. 顕微鏡に隣接したステージトッピンキュベーターを予温し、ガス-ミックスを接続した(5% CO₂、16% O₂、79% N₂)。

e. 3 × 50mLシリンジを調製した：

i. T細胞(1×10^6 個細胞/mL)：1mL

ii. T細胞GDF15(1×10^6 個細胞/mL)：1mL

iii. 培地

f. シリンジ1をチャンネル1に接続し(以下の表を参照のこと)、フローを開始した(0.5dyn/cm²：0.38mL/分=22.8mL/h)。

g. T細胞を3分間流し、その間に顕微鏡上で10視野を予め定義した。

h. 各視野を5秒間ビデオ録画した。

i. 残りのチャンネルを、以下の表において示されるようにT細胞サンプルを用いるチャンネル1(f~h)に類似して評価した。

【0216】

【表9】

チャンネル番号	内皮細胞	フロー中のT細胞	所見
1	刺激されていない HUVEC	T細胞	[陰性対照]
2	刺激されたHUVEC	T細胞	[陽性対照]
3	刺激されたHUVEC	T細胞 GDF-15	
4	刺激されたHUVEC GDF-15	T細胞	
5	刺激されたHUVEC GDF-15	T細胞 GDF-15	

組換えGDF-15は、Invigate GmbH, Jena, Germanyから入手した。

【0217】

統計解析：

非正規分布データの試験のためのマン-ホイットニー検定を使用して、すべてのデータを比較した。p<0.05の値を統計的に有意であると考えた。

【0218】

結果：

実験の結果は図9に示されている。この図は、いくつかの接着パラメータ、すなわち

a. T細胞の内皮細胞との中程度の接着の形態を反映する、秒あたりの視野あたりのローリングT細胞数(9A; データはチャンネル番号3(「GDF-15」)及びチャンネル番号2(「対照」)から入手した)

b. T細胞と内皮細胞間の接着の制限を増大する、T細胞のローリング速度(0.2秒あたりのピクセルで測定された)(9B; データはチャンネル番号3(「GDF-15」)及びチャンネル番号2(「対照」)から入手した)、及び

c. 視野あたりの接着細胞数(9C; データはチャンネル番号3(「GDF-15」)及びチャンネル番号2

10

20

30

40

50

(「対照」)から入手した;及び9D)の解析を示す。

【0219】

図9Cからわかるように、視野あたりの接着細胞数において反映されるように、hGDF-15を用いるT細胞の処置は、内皮細胞との接着を有意に低減することがわかった。同様の結果が、ローリングT細胞数をカウントすることによって接着を解析する場合に得られた(図9A)。更に、上記の結果に従って、hGDF-15を用いるT細胞の処置は、ローリング速度を有意に増大することがわかり、これは、T細胞と内皮細胞の間の相互作用時間の低減を示し、また、T細胞と内皮細胞の間の接着の低減を示す(図9B)。

【0220】

本発明者らは次に、hGDF-15によってどの細胞が標的とされるかを解析した(図9D)。hGDF-15を用いてHUVECのみが処理されたサンプルでは、T細胞の内皮細胞(HUVEC)との接着の中程度の低減が観察された。対照的に、hGDF-15を用いてT細胞のみが処理された場合又はhGDF-15を用いてT細胞及び内皮細胞(HUVEC)の両方が処置された場合のいずれかでは、T細胞の内皮細胞(HUVEC)との接着の強い低減が観察された。これらの結果は、hGDF-15がT細胞及び内皮細胞の両方に作用することを示すが、それらはまた、hGDF-15の主な接着効果はT細胞に対する効果であることも示す。

【0221】

次に本発明者らは、T細胞接着に対する腫瘍細胞によって分泌されるhGDF-15の効果がhGDF-15阻害剤を用いて阻害され得るか否かを試験した。これを試験するために、本発明者らは、hGDF-15を分泌する黒色腫細胞株、UACC257を使用した：

【0222】

腫瘍細胞上清中のGDF-15の存在下又は不在下でのT細胞フロー/接着実験(HUVECでの)：
1日目：

a. 1つの μ -スライドVI 0.4(ibidi GmbH, Germany; 以下 μ -スライドと呼ぶ)を、フィブロネクチン(100 μ g/mL)：ローディングポートあたり30 μ Lを用いてコーティングした。それらを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした(又はプレコーティングされたスライドを使用した)。

b. フィブロネクチンを吸引し、続いてHUVEC培地を用いて洗浄した。

c. 6ウェルプレートから得たHUVECをトリプシン処理した(カウント： 2×10^5 個/mL (合計2 mL))。

d. それらを洗浄し、 1×10^6 個細胞/mLに希釈した。

e. 30 μ LのHUVECを μ -スライドVIのローディングポート中に適用し、顕微鏡下でチェックした。

f. μ -スライドVIを蓋で覆い、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂でインキュベートした。

【0223】

2日目：

a. HUVECを、 μ -スライドのチャネル2~5(以下の表を参照のこと)においてTNF (10ng/mL)及びIFN (10ng/mL)を用いて活性化した：チャネルからすべての培地を吸引し、サイトカインを含有する予温した培地と置換した。

【0224】

3日目：

a. T細胞を単離した(汎T細胞の陰性単離)。

b. 並行して、96ウェルELISAプレート(Nunc maxisorb)の24ウェルを、200 μ Lの抗GDF-15(PBSで希釈した10 μ g/mL)を用いてコーティングし、45分間インキュベートし、PBSを用いて洗浄した。

c. GDF-15を分泌する(データは示されていない)黒色腫細胞株UACC257から得た上清のGDF-15を枯渇させるために、抗GDF-15を用いてプレコーティングしたELISAプレート(b.を参照のこと)のウェル中で上清をインキュベートした。

d. 対照として、黒色腫細胞株UACC257の上清を、抗GDF-15を用いてプレコーティングし

10

20

30

40

50

ていないELISAプレート(b.を参照のこと)のウェル中でインキュベートした。

e.GDF-15を枯渇させた黒色腫細胞株UACC257の上清中で(c.を参照のこと)、又はGDF-15を含有する黒色腫細胞株UACC257の上清中で(d.を参照のこと)、GDF-15(100ng/mL)とともに、GDF-15を伴わずに、12ウェル細胞培養プレート(1×10^6 個細胞/mL)中でT細胞を1時間プレインキュベートした。

f.顕微鏡に隣接したステージトップインキュベーターを予温し、ガス-ミックスを接続した(5% CO₂、16% O₂、79% N₂)。

g. マイクロ流体フローシステムの4×2mLのチューブを調製した：

i. T細胞(1×10^6 個細胞/mL)：1mL

ii. T細胞GDF15(1×10^6 個細胞/mL)：1mL

iii. T細胞UACC257(GDF-15を含有する)

iv. GDF-15を枯渇させたT細胞UACC257

h. チューブ1をチャンネル1に接続し(以下の表を参照のこと)、フローを開始した(0.4mL/分=24mL/時間)。

i. T細胞を3分間流し、その間に顕微鏡上で5視野を予め定義した。

j. 各視野を5秒間ビデオ録画した。

k. 残りのチャンネルを、以下の表において示されるようにT細胞サンプルを用いるチャンネル1(f~h)に類似して評価した。

【0225】

【表10】

チャンネル番号	内皮細胞	フロー中のT細胞	所見
1	刺激されていないHUVEC	T細胞	[陰性対照]
2	刺激されたHUVEC	T細胞	[陽性対照]
3	刺激されたHUVEC	T細胞 GDF-15	
4	刺激されたHUVEC	T細胞 UACC 257	
5	刺激されたHUVEC	T細胞 抗GDF-を用いてGDF-15を枯渇させたUACC257	

組換えGDF-15はInvigate GmbH, Jena, Germanyから入手した。

【0226】

結果：

実験の結果は図10に示されている。この図は、秒あたりの視野あたりのローリングT細胞数の解析を示す。データは、チャンネル番号1(「陰性対照」として刺激されていないHUVEC上の対照T細胞)、チャンネル番号2(「陽性対照」として刺激されたHUVEC上の対照T細胞)、チャンネル番号3(「GDF-15」)、チャンネル番号4(「UACC257」：分泌されたGDF-15を含有するUACC257黒色腫細胞の上清中で培養されたT細胞)及びチャンネル番号5(「UACC257+抗hGDF-15」：抗hGDF-15 B1-23を用いて、分泌されたGDF-15を枯渇させたUACC257黒色腫細胞の上清中で培養されたT細胞)から得た。

【0227】

刺激されていないHUVEC上を流されたT細胞と比較して(「陰性対照」;中央値=秒あたり視野あたり28個のローリング細胞)、刺激されたHUVEC上にT細胞を流すこと(「陽性対照」)は、秒あたり視野あたりのローリング細胞の数を増大した(中央値=46)。hGDF-15を用いるT細胞の処置は、秒あたり視野あたりのローリング細胞の数を実質的に低減する(中央値=29)。また、GDF-15を分泌する黒色腫細胞株UACC257の上清とのT細胞のプレインキュベーションは、刺激されたHUVEC上を流れるT細胞(「陽性対照」)と比較して、秒あたりの視野あたりのローリング細胞数を実質的に低減する(中央値=36)。これとは対照的に、抗GDF-15を用いて、分泌されたGDF-15を枯渇させた黒色腫細胞株UACC257の上清とのT細胞のプレインキュベーションは、刺激されたHUVEC上を流れるT細胞(陽性対照)に匹敵する、秒あたり視野あたりのローリング細胞の数(中央値=45)をもたらした。

10

【0228】

まとめ:

この実施例は、腫瘍細胞によって分泌されたGDF-15を含むhGDF-15が、T細胞の内皮細胞との接着を低減することを示す。固形癌へのCD8⁺T細胞の侵入及び固形癌中のこれらのCD8⁺T細胞の存在は、免疫チェックポイントブロッカーを使用する治療的アプローチにとって特に有利であるので、hGDF-15のレベルを使用して、免疫チェックポイントブロッカーを用いるこれらの癌患者の治療に対する奏効の確率を予測できる。

【0229】

(実施例4)

GDF-15血清レベルは、抗PD-1を用いて治療された黒色腫患者の生存を規定する

20

この実施例における研究は、実施例1の研究において得られた結果、例えば、hGDF-15が免疫チェックポイントブロッカーに対する患者の応答に影響を及ぼすという知見を、更なる独立研究によって更に検証するために実施した。

【0230】

この研究に関連して、以下の用語を使用した:

「打ち切られた」=更なるフォローアップデータが入手できない場合は、患者を研究コホートから除いた。

「イベント」=患者が死亡した。

「生存」=患者がフォローアップで生存していた。

【0231】

30

将来を見越して、ドイツ中の60を超える皮膚科学センターからの患者を記録する中央悪性黒色腫レジストリー(Central Malignant Melanoma Registry)(CMMR)データベースにおいて、組織学的に確認された黒色腫を有する、Department of Dermatology, University of Tübingen, Germanyからの患者を同定した。(a)記録保存された血清サンプルを有する、(b)フォローアップデータを入手可能な、(c)採血の時点での局所領域又は遠位転移の病歴又は存在及び(d)抗PD-1抗体を用いる実験的治療を有する99人の患者を選択した。CMMRによるデータ収集の目的及び方法は、これまでに詳細に公開されている(Lasithiotakis, KGら、Cancer/107/1331~9, 2006年)。各患者について得られたデータは、年齢、性別、最後のフォローアップの日付及び該当する場合には死亡の日付及び原因を含んでいた。すべての患者は、CMMRレジストリーによって記録される臨床データを有するための所与の書面でのインフォームドコンセントを行っていた。施設内倫理委員会Tübingenは研究を承認した(倫理的表明125/2015B02)。適格な患者は年齢18歳以上であり、組織学的又は細胞学的に確認された切除不能なステージIII又はステージIVの黒色腫を有しており、局所療法に適しておらず、現在のガイドラインに従う先行治療を受けているにもかかわらず疾患進行を示した。BRAFV600変異体腫瘍を有する患者は、推奨される第一選択又はBRAF若しくはMEK阻害剤療法を含む実験的治療又は両方を受けていた。該当する場合には、患者が、最小の2用量、3週間ごとに3mg/kg 1回を投与されていたが、最後のイピリムマブ用量の24週間以内に確認された疾患進行を示した場合に、イピリムマブを用いる先行治療が失敗したと考えられた。抗PD-1の投与の前に、イピリムマブ関連有害事象のグレード0~1への解決又は改善、及び研究薬物の第1の用量の少なくとも2週間前のプレドニゾン用量10mg/日以下

40

50

が求められた。適格な患者は、米国東海岸癌臨床試験グループ(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG)実施状態0又は1、固形癌の効果判定基準(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)バージョン1.1(RECIST v1.1)で測定可能な疾患、並びに絶対好中球カウント(mLあたり 1500個細胞)、血小板(mLあたり 100000個細胞)、ヘモグロビン(90g/L)、血清クレアチニン(1.5正常の上限[ULN])、血清総ビリルビン(1.5ULN又は総ビリルビン濃度>1.5ULNを有する患者について直接ビリルビン ULN)、アスパラギン酸及びアラニンアミノトランスフェラーゼ(2.5ULN又は肝臓転移を有する患者について 5ULN)、国際標準比又はプロトロンビン時間(抗凝固薬を使用しない場合 1.5ULN)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(抗凝固薬を使用しない場合 1.5ULN)を有していた。患者は、直近の療法の最後の用量とペムプロリズマブ又はニボルマブの第1の用量の間に少なくとも4週間のウォッシュアウト期間を有していた。

10

【0232】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によるhGDF-15血清レベルの解析:

ヒトGDF-15血清レベルを、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。

【0233】

バッファー及び試薬:

緩衝ブロッキング溶液: PBS中1% BSA(画分V pH7.0、PAA社、Pasching、Austria)

洗浄溶液: PBS-Tween(0.05%)

標準: ヒトGDF-15(ストック濃度120 µg/ml、R&D Systems社製)

捕捉抗体: ヒトGDF-15 MAb(クローン147627)、R&D Systems社製、マウスIgG2B(カタログ番号MAB957、R&D Systems社製、ストック濃度360 µg/ml)

20

検出抗体: ヒトGDF-15ビオチン化された親和性精製されたPAb、ヤギIgG(カタログ番号BAF940、R&D Systems社製、ストック濃度9 µl/ml)

ストレプトアビジン-HRP(カタログ番号DY998、R&D Systems社製)

基質溶液: 10ml 0.1M NaOAc pH6.0+100 µl TMB+2 µl H₂O₂

停止溶液: 1M H₂SO₄

【0234】

解析手順:

1. プレート調製:

e. 捕捉抗体を、PBSで2 µg/mlの作業濃度に希釈した。96ウェルマイクロプレート(Nunc maxisorp(登録商標))を、外側の列(A及びH)を除いて、ウェルあたり50 µlの希釈捕捉抗体を用いて直ちにコーティングした。列A及びHを、実験の間のサンプルの蒸発を防ぐためにバッファーで満たした。プレートを穏やかに軽くたたいて、各ウェルの底が完全に覆われることを確実にした。プレートを湿潤チャンパー中に入れ、室温(RT)で一晩インキュベートした。

30

f. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。

g. 各ウェルに150 µlのブロッキング溶液を添加し、続いて、RTで1時間インキュベートした。

h. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。

【0235】

2. アッセイ手順:

d. 標準を調製した。GDF-15を緩衝ブロッキング溶液で1ng/mlの最終濃度に希釈した(4.17 µl GDF+496 µl緩衝ブロッキング溶液)。1:2段階希釈を作製した。

e. 二連のサンプル1:20(6 µl+114 µl緩衝ブロッキング溶液)を調製した。

f. ウェルあたり50 µlの希釈サンプル又は標準を添加し、続いてRTで1時間インキュベートした。

40

【0236】

【表 1 1】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	s1	s2	...									s12
C	s1	s2	...									s12
D	s13	s14	...									s24
E	s13	s14	...									s24
F	標準							希釈				
G				段階								
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

【 0 2 3 7】

- i. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。
- j. 検出抗体を50ng/mlの最終濃度に希釈した(56 μ l+10mlプロッキングバッファー)。各ウェルに50 μ lの希釈検出抗体を添加し、続いてRTで1時間インキュベートした。
- k. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。
- l. ストレプトアビジン-HRPを1:200希釈した(50 μ l+10mlプロッキングバッファー)。各ウェルに50 μ lのストレプトアビジン-HRPの作業希釈を添加し、続いてRTで20分間インキュベートした。
- m. 各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。
- n. 基質溶液を調製した。各ウェルに50 μ lの基質溶液を添加し、続いてRTで20分間インキュベートした。
- o. 各ウェルに50 μ lの停止溶液を添加した。
- p. 450nmに設定したマイクロプレートリーダーを使用して、各ウェルの光学濃度を直ちに決定した。

20

30

【 0 2 3 8】

3.GDF-15血清力価の算出:

- d. 各サンプル/GDF-15標準希釈を二連で適用した。GDF-15力価を決定するために、2連の平均を算出し、バックグラウンド(GDF-15を含まないサンプル)を差し引いた。
- e. 標準曲線を作製するために、線形範囲から得た値をX-Y-図(X軸:GDF-15濃度、Y軸:OD450)にプロットし、線形曲線フィットを適用した。既知濃度を有する標準希釈のOD450値から補間することによって、試験サンプルのGDF-15血清力価を算出した。
- f. サンプルの最終GDF-15濃度を算出するために、それぞれの希釈係数を考慮した。標準範囲を下回る又は上回るOD値をもたらすサンプルを、適当な希釈で再解析した。

40

【 0 2 3 9】

hGDF-15血清レベルの患者データとの比較:

次いで、測定されたhGDF-15血清レベルを、研究から得られた患者奏効データと比較した。

【 0 2 4 0】

hGDF-15血清レベルの患者データとの統計的相関:

データ:

データ解析は、列(変数)サンプル表示、GDF-15(ng/ml)、日数(死亡又は打ち切りまでの)及び進行中(進行中の生命の指数変数)を含有する99人の患者から得たサンプルからのデータを含有するデータファイルに基づいていた。

50

【 0 2 4 1】

アウトカム変数(エンドポイント):

a. 全生存(死亡までの時間)。このエンドポイントは、データファイルに由来した死亡についてのイベント指標(1=死亡/0=生存)、変数「日数」に対応する、死亡又は打ち切りまでの時間(患者が生存しているとわかっていた最後の時間)から構成される。

【0242】

治療に対する奏効、例えば患者がレスポナーであったか否か(1=rとしてコードされる)。

【0243】

データ解析:

生存解析のためのフォローアップ時間は、血液サンプリングの日付から最後のフォローアップ(すなわち、患者から得られた最後の情報)又は死亡までと定義した。すべての血液サンプルは、抗PD1抗体を用いる治療の前の日付内に採取された。OSの解析のために、最後のフォローアップで生存していた患者を打ち切り、死亡していた患者を「イベント」と考えた。 Kaplan-Meier に従う累積生存確率を、95%の信頼区間(CI)と一緒に算出し、両側ログ・ランク検定統計学を使用して比較した。全生存のp値を、両側ログ・ランク統計学によって算出した。カテゴリー予測変数としてGDF-15に基づくグループ化変数を用いて、1つのモデルをフィッティングした(グループは、中央値分割に基づいて<1.5ng/ml (n=62)、1.5ng/ml (n=37)又はGDF-15^{low}(n=49)、GDF-15^{high}(n=50)とした)。得られた Kaplan-Meier 曲線は図11及び12に示されており、ここでは、打ち切りは垂直線によって示されている。更に、以下の表は、症例のまとめTable 9(表9)、<1.5ng/ml及び1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者グループの患者生存データ(Table 10(表10)及び11(表11))並びに<1.5ng/ml及び1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者グループの全体的な統計的比較(Table 12(表12))を含有する。

【0244】

【表12】

Table 9:症例のまとめ

	数	イベントの数	打ち切られた	
			H*	生存%
GDF-15<1.5ng/ml	62	11	51	82.3%
GDF-15≥1.5ng/ml	37	18	19	51.4%
合計	99	29	70	70.7%

*H=イベントがない

【0245】

10

20

30

【表 1 3】

Table 10:生存の平均及び中央値(生存の日数)

	平均 ^a				中央値	
	推定値	標準誤差	95%信頼区間		推定値	標準誤差
			下限	上限		
<1.5ng/ml	701.928	44.172	615.350	788.506	n/d.	n/d.
≥1.5ng/ml	381.683	48.882	285.875	477.491	309.000	127.570
合計	569.056	44.477	481.882	656.231	n/d.	n/d.

10

a.打ち切り後、推定値は最長既知生存に制限される。

n/d:グループ中の>50%生存者の存在により中央値生存データを算出できなかった。

【 0 2 4 6】

【表 1 4】

20

Table 11:生存期間の平均及び中央値(生存の日数)

	中央値 ^a	
	95%信頼区間	
	下限	上限
<1.5ng/ml	n/d.	n/d.
≥1.5ng/ml	58.963	559.037
合計	n/d.	n/d.

30

a.打ち切り後、推定値は最長既知生存に制限される。

n/d:グループ中の>50%生存者の存在により中央値生存データを算出できなかった。

【 0 2 4 7】

【表 1 5】

Table 12:総合比較

	カイ二乗	df*	有意性
Log Rank (Mantel-Cox)	8,129	1	.004

40

*df=自由度

異なるレベルのGDF-15(<1.5ng/ml、≥1.5ng/ml)の生存の均等分布に関する試験

【 0 2 4 8】

結果及び結論:

この実施例の上記の統計結果によって、実施例1の結果が更に確認された。例えば、患者の生存によって示されるような、治療の正の臨床アウトカムの確率は、患者血清中のhG

50

DF-15レベルが増大するにつれて有意に低減することが確認された。例えば、Table 12(表12)は、0.004の有意性レベルによって証明されるように、それぞれ<1.5ng/ml及び 1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する2つの患者グループ間の生存が有意に異なっていたことを示す。同様に、Table 9(表9)は、<1.5ng/mlのGDF-15レベルを有するグループでは、より高いパーセンテージの患者(82.3%)が生存したことを実証し、Table 10(表10)及び11(表11)及び図11及び12は、<1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者について、生存時間が 1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者と比較して著しく長かったことを実証する。

【0249】

したがって、この実施例の結果から、hGDF-15の血清レベルと、例えば、患者の奏効及び患者の生存を含む、患者における抗PD-1ベースの免疫療法の正の臨床アウトカムの確率の間に強い逆相関があることが更に確認される。したがって、本発明によれば、有利なことに、患者由来の血液サンプル中のhGDF-15のレベルを使用して、抗PD-1のような免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効の確率を予測できる。

10

【0250】

(実施例5)

抗PD1抗体を用いて治療されたヒト非小細胞肺癌(NSCLC)患者では、進行性疾患を有する患者における中央値hGDF-15血清レベルは、部分奏効を示す患者と比較して高い。

この実施例は、実施例1の研究において得られた結果、例えば、hGDF-15が、免疫チェックポイントブロッカーに対する患者の奏効を予測することを可能にするという知見を、異なる固形癌における更なる独立研究において更に検証するために実施された。

20

【0251】

患者:

NSCLC患者を、抗PD1抗体の承認された薬物ラベルに従って、抗PD1抗体を用いて治療した。患者は、その他の癌療法を用いて予め治療された患者を含んでいた。NSCLC患者では完全奏効は稀にしか観察されないという事実により、患者グループはPD-1治療の際に進行性疾患を示す及び部分奏効を示す患者を含んでいたが、PD-1治療の際に完全奏効を示す患者は含んでいなかった。

【0252】

血清サンプル:

血清サンプルは、抗PD1抗体を用いる治療の前に患者から採取した。

30

【0253】

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によるhGDF-15血清レベルの解析:

血清サンプル中のhGDF-15血清レベルを、実施例1に記載されるように酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって解析した。

【0254】

結果:

抗PD-1を用いる治療の際に部分奏効を示す5人の患者から、及び抗PD-1を用いる治療の際に進行性疾患を示す5人の患者からhGDF-15血清レベルを入手した。とりわけ、部分奏効を示す患者における中央値hGDF-15血清レベルが0.55ng/mlであったのに対し、進行性疾患を示す患者における中央値hGDF-15血清レベルは1.56ng/mlであった。したがって、進行性疾患を示す患者における中央値hGDF-15血清レベルは、部分奏効を示す患者と比較して約2.8倍高かった。

40

【0255】

結論:

この実施例の結果から、hGDF-15レベルが、免疫チェックポイントブロッカーに対する患者の奏効と負に相関することが更に確認される。したがって、本発明によれば、有利なことに、患者由来の血液サンプル中のhGDF-15のレベルを使用して、抗PD-1のような免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効の確率を予測できる。このような予測は黒色腫について行うことができるだけでなく、NSCLC等の肺癌においても、また本明細書において言及されるその他の固形癌のすべてにおいても行うことができる。

50

【0256】

(実施例6)

hGDF-15血清レベルは、腫瘍の遺伝子変異量と有意に相関しない

遺伝子変異量は、免疫チェックポイントブロッカーに対する癌患者の奏効の公知の正の予後因子である。一般に、癌細胞は、癌細胞に対して特異的であり、非癌性細胞の抗原とは異なる癌細胞抗原を生じさせるゲノム変異を有する。高い遺伝子変異量は、多数のこのような癌細胞特異的抗原につながる。このような多数の癌細胞特異的抗原を有する癌では、免疫チェックポイントブロッカーによる免疫応答の刺激は、より癌細胞特異的な抗原が免疫応答の標的抗原として利用可能であるので特に有効であると考えられる。

【0257】

hGDF-15が単に腫瘍の遺伝子変異量の代替マーカーではないということをも更に確認するために、またhGDF-15阻害剤を用いる治療が、腫瘍の遺伝子変異量と独立している機序によって作用することを更に確認するために、癌患者から得た癌サンプル中のhGDF-15 mRNAレベルを、癌において同定された体細胞変異の数に対してプロットした。体細胞変異は、エキソームシーケンシングの使用によって決定した。University Hospital Zurich製のUZ Hウェブツールを使用することによってデータを解析した(Cheng PFら:Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 2015年9月16日;145:w14183)。結果は図13に示されている。図13Aは、高悪性度悪性黒色腫を有する患者のみを考慮するthe Cancer Genome Atlas(TGCA)から入手した癌患者データのプロットを示す(the Cancer Genome Atlasは、Cheng PFら: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 2015年9月16日;145:w14183の参考文献に記載されている)。GDF-15発現を、RSEM(「期待値最大化によるRNA Seq(RNA Seq by expectation maximization)」)ソフトウェアパッケージ(Li B及びDewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011年8月4日;12:323. doi:10.1186/1471-2105-12-323)を使用する正規化によって評価した。図13Bは、個別に解析されたUniversity Hospital Zurichからの40人の更なる転移性悪性黒色腫患者から得た癌患者データのプロットを示す。

【0258】

とりわけ、図13A及び13Bの両方とも、0.5のp値を示し、これは、癌における遺伝子変異量とhGDF-15のレベルの間に有意な相関がないことを示す。これらの結果から、hGDF-15は、単に腫瘍の遺伝子変異量の代替マーカーではないということ、またhGDF-15レベルが、腫瘍の遺伝子変異量とは独立している方法で免疫チェックポイントブロッカーに対する患者の奏効を予測することを可能にすることが更に確認される。

【0259】

(実施例7)

野生型腫瘍又はヒトGDF-15(過剰)発現腫瘍におけるCD8⁺T細胞浸潤

免疫適格性同系マウスC57BL/6の右側腹部に移植された野生型又はヒトGDF-15(過剰)発現MC38結腸癌細胞のいずれかを使用するパイロット研究では、GDF-15過剰発現は免疫細胞浸潤の低減と関連していた。野生型腫瘍又はトランスジェニック(tg)hGDF15を過剰発現する腫瘍を有する、29日後に屠殺されたマウスにおけるCD8aの免疫細胞化学画像が図14に示されている。図からわかるように、野生型腫瘍は、トランスジェニック(tg)hGDF15を過剰発現する腫瘍よりも多くのCD8a陽性細胞を含有していた。

【0260】

これらの結果は、本発明によれば、hGDF-15が固形癌中のCD8⁺T細胞のパーセンテージを低減するという知見をも更に支持する。したがって、本発明によれば、hGDF-15レベルと、好適な臨床アウトカム(例えば、患者の生存又は治療奏効の存在)の逆相関の好ましいが制限されない説明は、hGDF-15が、腫瘍転移を含む固形腫瘍中のCD8⁺Tリンパ球のパーセンテージを低減し、それによって、好適な臨床アウトカム(例えば、患者の生存又は治療奏効の存在)の確率を低減するということである。この相関は種々の固形癌実体にわたって観

10

20

30

40

50

察されるので、本発明は、黒色腫等の特定の固形癌に限定されない。

【産業上の利用可能性】

【0261】

本発明による装置及びキットは、診断薬の製造のための公知の基準に従って工業的に製造し、特許請求される予測方法のための製品として販売してもよい。したがって、本発明は産業上利用可能である。

【0262】

【表 1 6】

参考文献

Arbabi Ghahroudi M et al.: "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies." FEBS Lett. 1997 Sep 15;414(3):521-6.

Ausubel et al.: "Current Protocols in Molecular Biology." Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992.

10

Bauskin AR et al.: "The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome." Cancer Res. 2005 Mar 15;65(6):2330-6.

Brown DA et al.: "Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer." Clin Cancer Res. 2009 Nov 1;15(21):6658-64.

Cheng PF et al.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 2015 Sep 16;145:w14183.

20

Chothia C et al.: Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989 Dec 21-28;342(6252):877-83.

Clackson T et al.: "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature. 1991 Aug 15;352(6336):624-8.

Cully M: "Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy." Nat Rev Drug Discov. 2015 Jun;14(6):374-5.

30

Eisenhauer et al.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur. J. Cancer. 45, No. 2, January 2009, pp 228-47.

Giudicelli V et al.: IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W435-40.

40

Gouttefangeas C et al.: "Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality Assurance and Future." (2015) In: Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (N. Rezaei editor). Springer. Chapter 25: pages 471-486; and the methods according to

【表 1 7】

Harlow and Lane: "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988.

Holliger P et al.: "'Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments." Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90(14):6444-8.

Holt LJ et al.: "Domain antibodies: proteins for therapy." Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90.

Huang CY et al.: "Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15." Clin Cancer Res. 2007 Oct 1;13(19):5825-33.

Johnen H et al.: "Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1." Nat Med. 2007 Nov;13(11):1333-40.

Jones PT et al.: "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature. 1986 May 29-Jun 4;321(6069):522-5.

Kabat et al.: Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983.

Kanasty R et al., "Delivery materials for siRNA therapeutics.", Nat Mater. 2013 Nov; 12(11):967-77.

Köhler G and Milstein C: "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.

Lasithiotakis, KG et al., Cancer / 107 / 1331-9. 2006.

Li B and Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011 Aug 4;12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323.

Marks JD et al.: "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97.

10

20

30

40

【表 1 8】

Mimeault M and Batra SK: "Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer." *J Cell Physiol.* 2010 Sep;224(3):626-35.

Motzer RJ et al., Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2015 Sep 25.

Paul, W.E. (Ed.): "Fundamental Immunology" 2nd Ed. Raven Press, Ltd., New York 1989.

Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20th edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Riechmann L et al.: "Reshaping human antibodies for therapy." *Nature.* 1988 Mar 24;332(6162):323-7.

Rizvi NA et al.: "Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer." *Science* 2015 Apr 3; 348(6230):124-8.

Roth P et al.: "GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas." *Clin Cancer Res.* 2010 Aug 1;16(15):3851-9.

Saerens D et al.: "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics." *Curr Opin Pharmacol.* 2008 Oct;8(5):600-8. Epub 2008 Aug 22.

Sambrook et al.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989.

Siegel DL: "Recombinant monoclonal antibody technology." *Transfus Clin Biol.* 2002 Jan;9(1):15-22.

Stefanescu R. et al., *Eur.J.Mass Spectrom.* 13, 69-75 (2007)

Suckau et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 December; 87(24): 9848-9852.

10

20

30

40

【表 1 9】

Taube et al., "Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy.", *Clin Cancer Res.* 2014 Oct 1;20(19):5064-74.

KK Tsai et al., *JCO* 33, 2015 (suppl. abstr. 9031).

Tumeh et al., PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014 Nov. 27; 515(7528):568-71.

10

Van der Burg SH, et al.: "Immunoguiding, the final frontier in the immunotherapy of cancer." (2014) In *Cancer Immunotherapy meets oncology* (CM Britten, S Kreiter, M. Diken & HG Rammensee eds). Springer International Publishing Switzerland p37-51 ISBN: 978-3-319-05103-1.

Yadav M et al.: Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature.* 2014 Nov 27;515(7528):572-6.

20

Wallentin L et al.: "GDF-15 for prognostication of cardiovascular and cancer morbidity and mortality in men." *PLoS One.* 2013 Dec 2;8(12):e78797.

Wang A et al.: "The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis." *Eur J Surg Oncol.* 2015 Apr; 41(4):450-6.

Weinberg R. et al.: *The Biology of Cancer.* Garland Science: New York 2006. 850p.

30

WO 2005/099746

WO 2009/021293

WO 2014/049087

WO 2014/100689

40

PCT/EP2015/056654

【表 2 0】

Zhang, J., Yao, Y.-H., Li, B.-G., Yang, Q., Zhang, P.-Y., and Wang, H.-T. (2015). Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 5, 9800).

Zhou et al. Growth differentiation factor-15 suppresses maturation and function of dendritic cells and inhibits tumor-specific immune response. *PLoS One*. 2013 Nov 13;8(11):e78618.

10

【 0 2 6 3 】

【表 2 1】

*RO/EP	0-1	Form PCT/RO/134 Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	PCT Online Filing Version 3.5.000.250e MT/FOF 20141031/0.20.5.20
	0-1-1	Prepared Using	
	0-2	International Application No.	PCT/EP 2016/073519
	0-3	Applicant's or agent's file reference	192307a/se

20

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	35
1-2	line	17-19
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
1-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Date of deposit	29 September 2011 (29.09.2011)
1-3-4	Accession Number	DSMZ DSM ACC3142
1-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

30

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

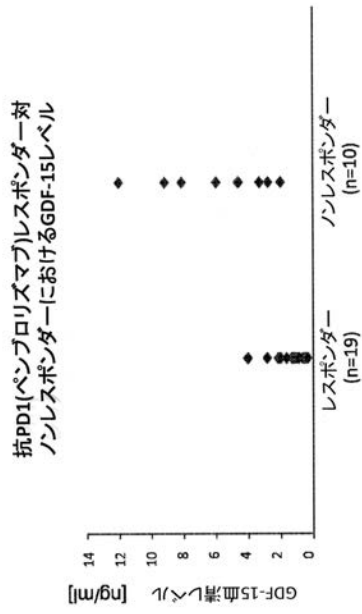
0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	YES
0-4-1	Authorized officer	Wilson, Patrick

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

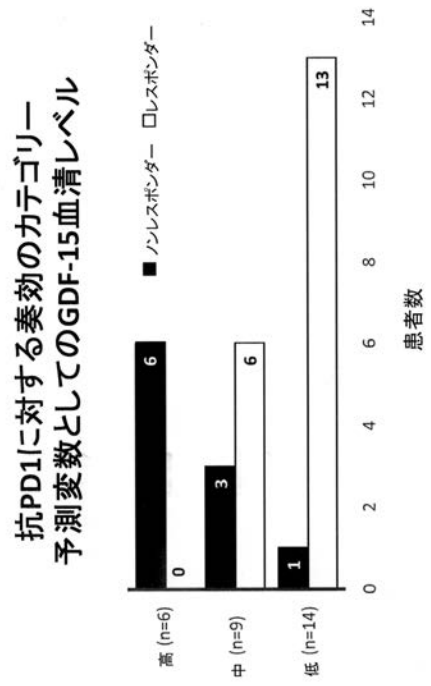
0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

40

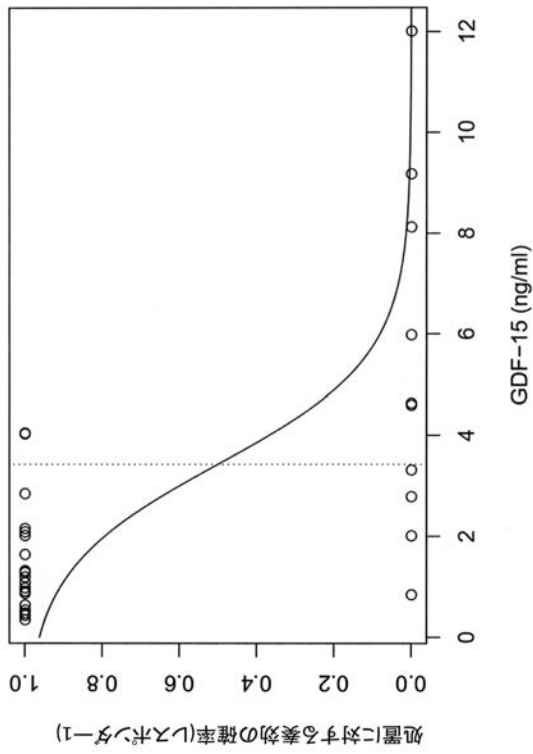
【 図 1 】



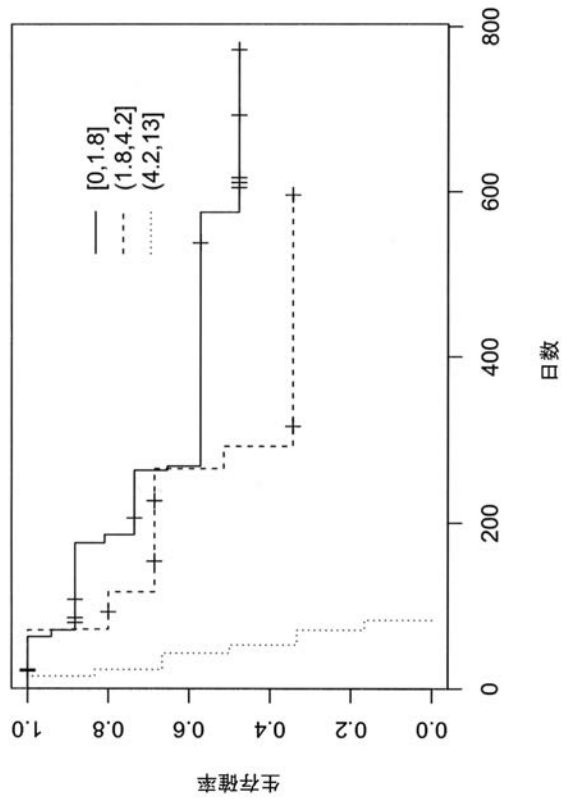
【 図 2 】



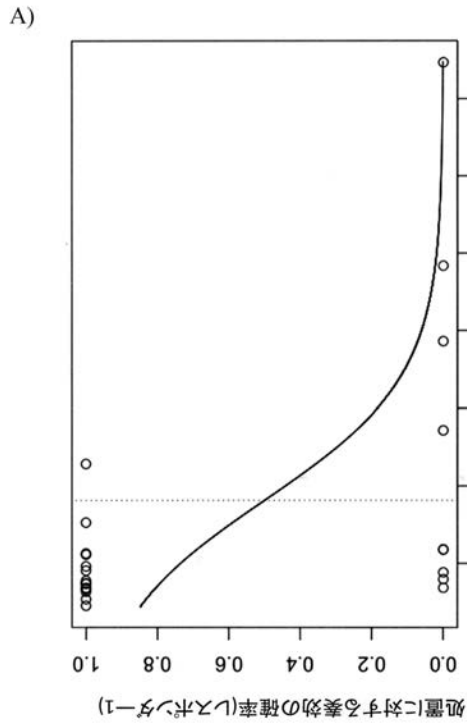
【 図 3 】



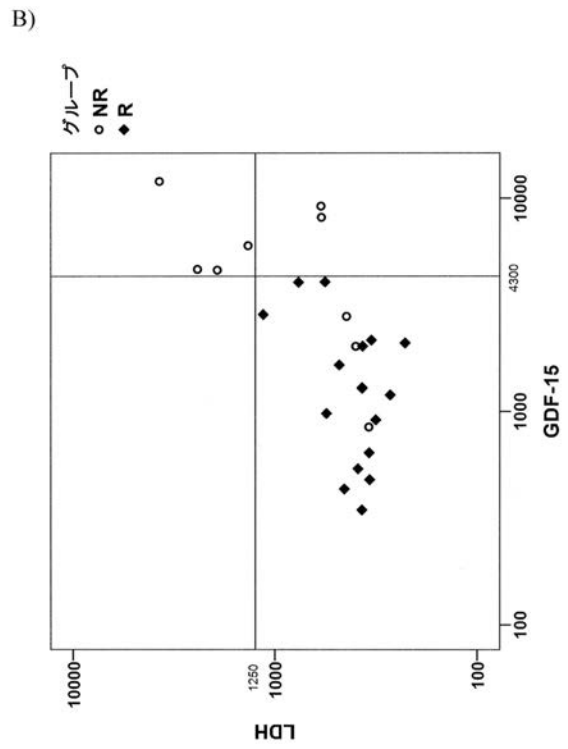
【 図 4 】



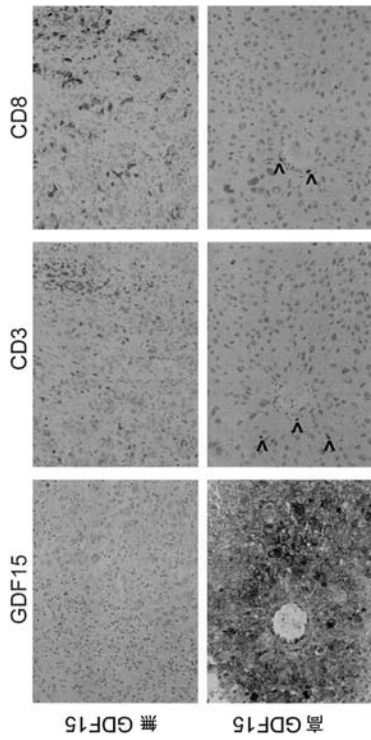
【 図 5 A 】



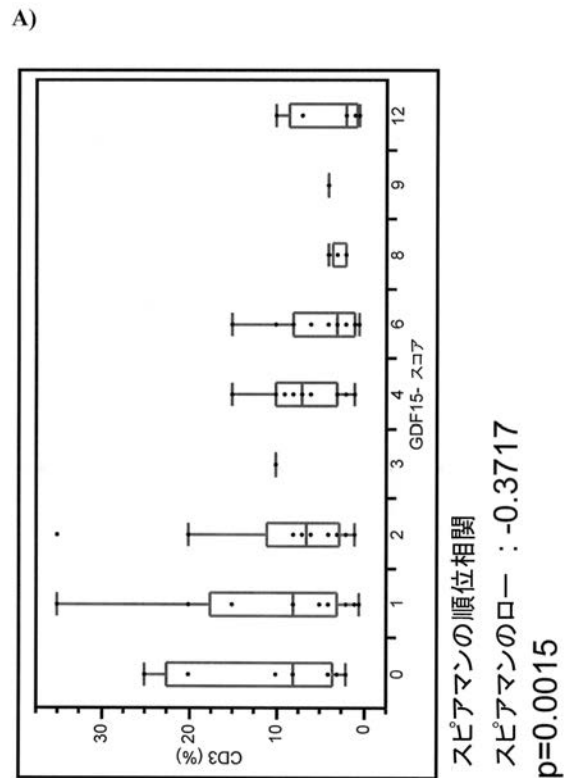
【 図 5 B 】



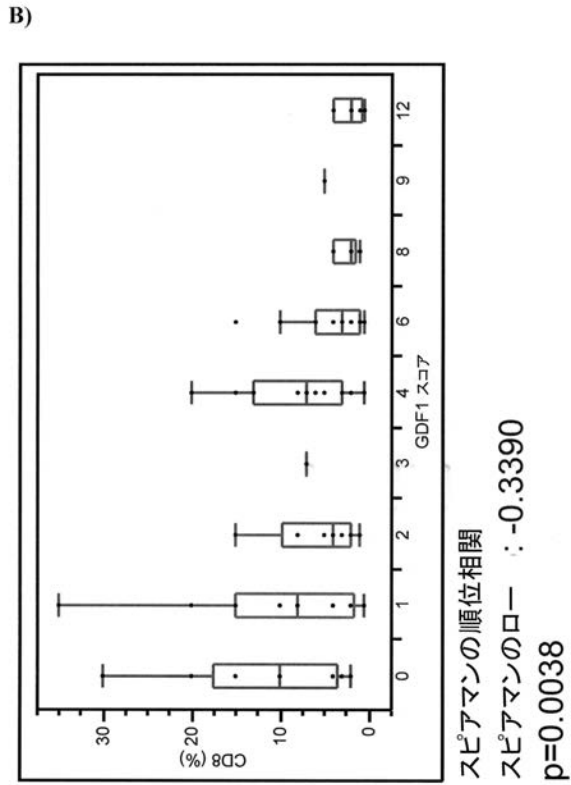
【 図 6 】



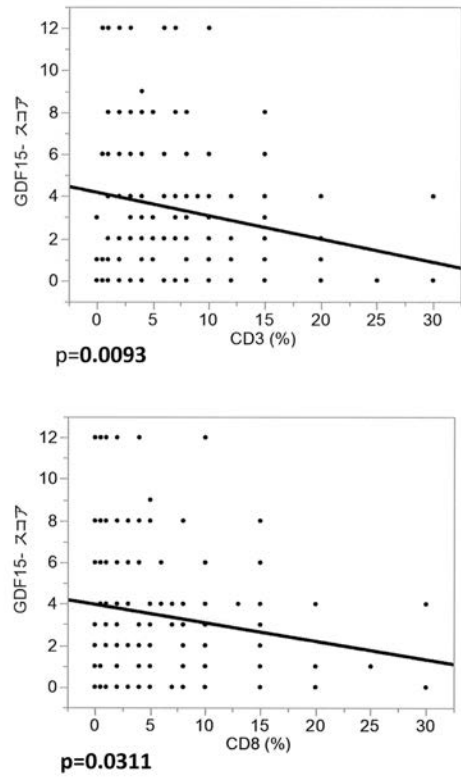
【 図 7 A 】



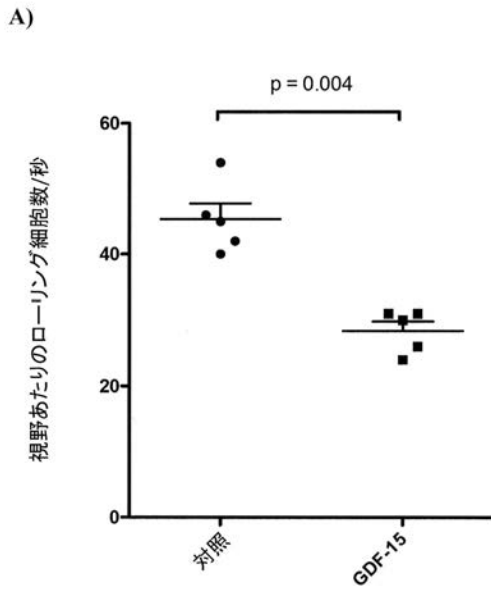
【 図 7 B 】



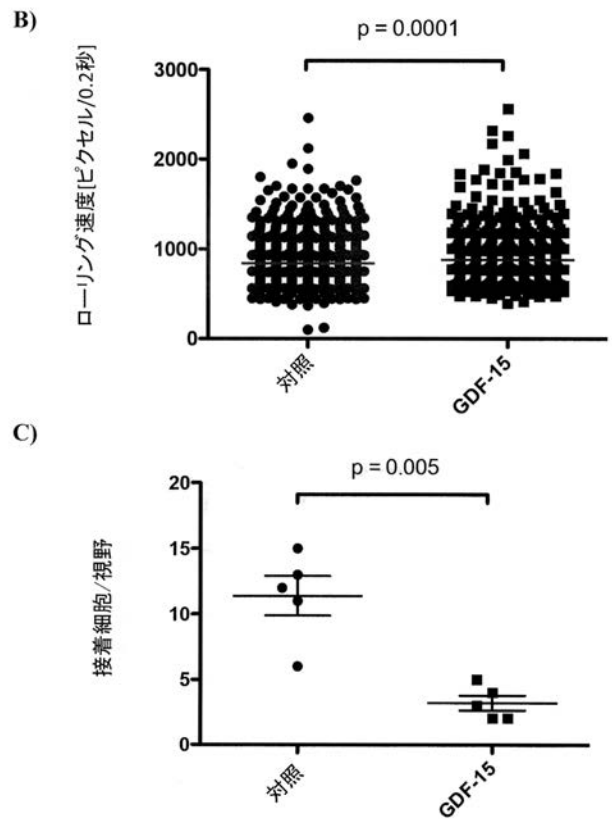
【 図 8 】



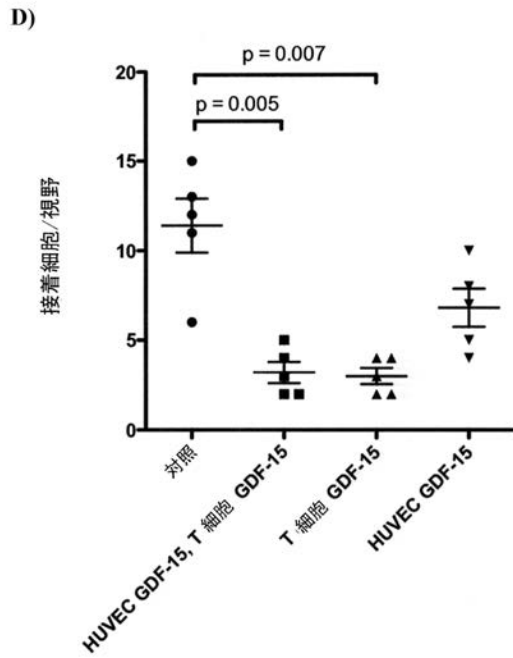
【 図 9 - 1 】



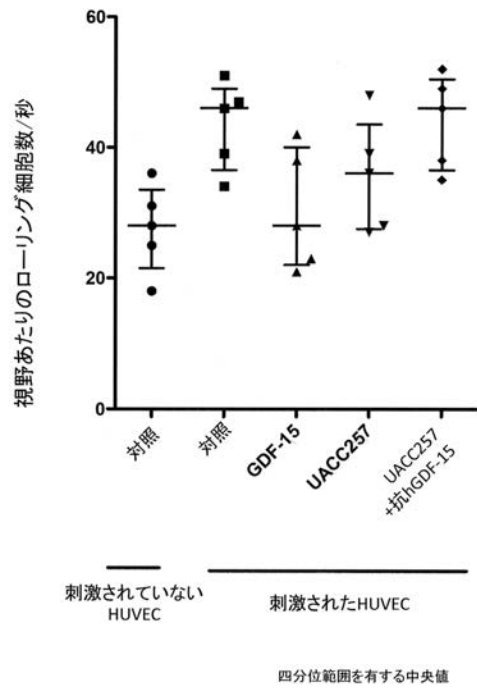
【 図 9 - 2 】



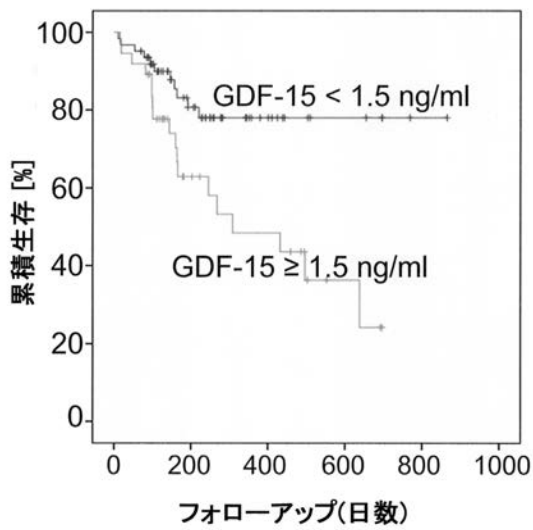
【 図 9 - 3 】



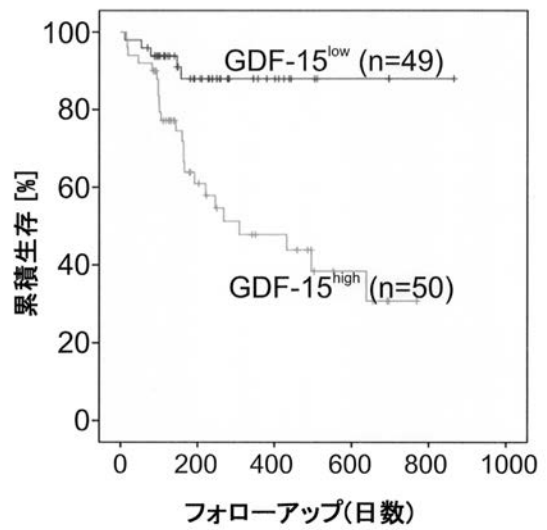
【 図 1 0 】



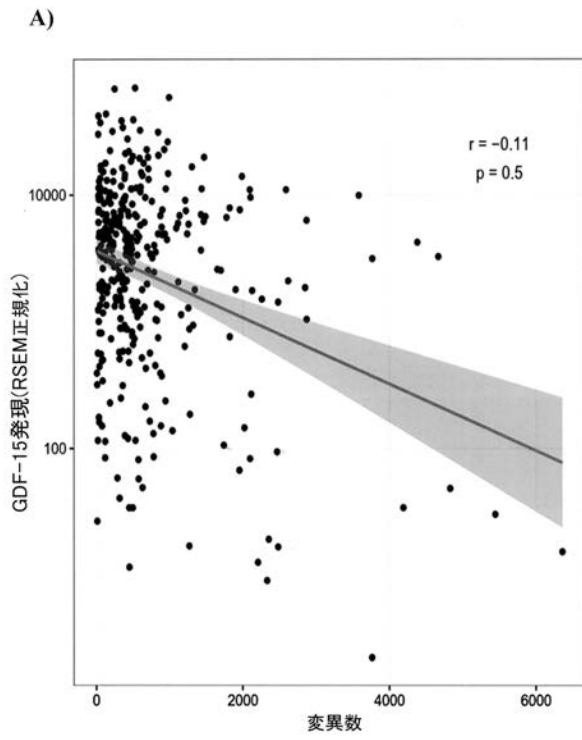
【 図 1 1 】



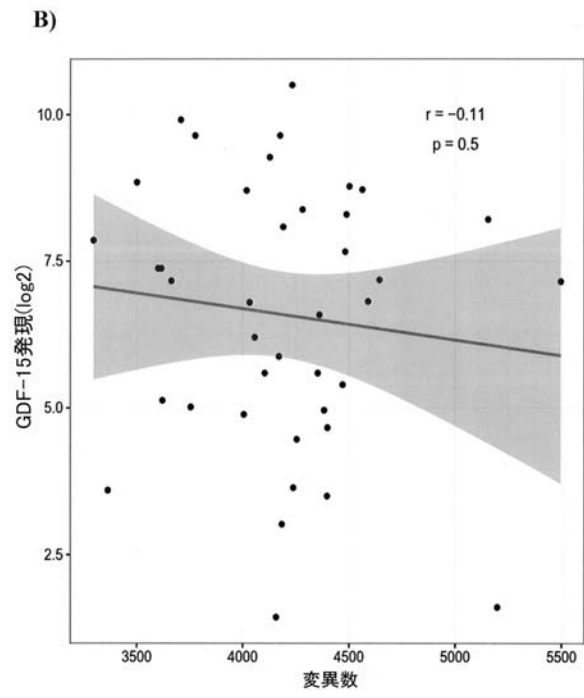
【 図 1 2 】



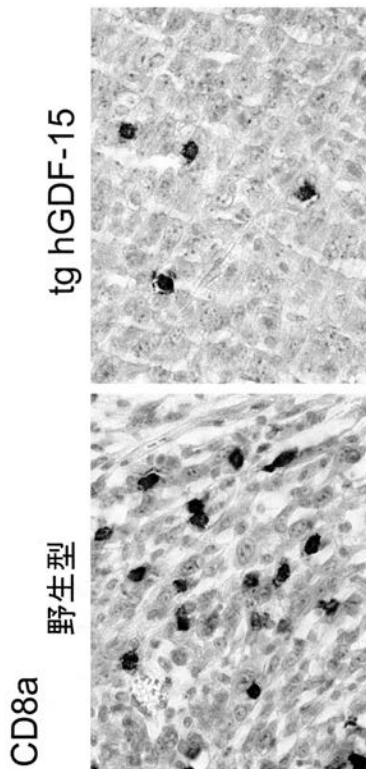
【 図 1 3 A 】



【 図 1 3 B 】



【 図 1 4 】



【配列表】

2018535404000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年5月31日(2018.5.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫チェックポイントブロッカー治療に対するヒト癌患者の治療奏効の確率を予測するための方法であって、

- a)前記患者から得られたヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを決定する工程と、
- b)決定された前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルに基づいて、前記治療奏効の確率を予測する工程とを含み、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減が、治療奏効の確率の増大を示し、癌が固形癌である、方法。

【請求項2】

免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存の確率を予測するための方法であって、

- a)前記患者から得られたヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを決定する工程と、
- b)決定された前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルに基づいて、前記生存の確率を予測する工程とを含み、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減が、生存の確率の増大を示し、癌が固形癌である、方法。

【請求項3】

工程b)が、工程a)において決定された前記hGDF-15のレベルを、hGDF-15閾値レベルと比較する工程を含み、工程a)において決定された前記hGDF-15のレベルの、前記hGDF-15閾値レベルとの比較に基づいて前記確率が予測され、前記hGDF-15閾値レベルと比較して低減される前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルは、前記確率が、前記hGDF-15閾値レベルでの確率と比較して増大されるか又は前記hGDF-15閾値レベルでの確率を上回ることを示す、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

ヒト血液サンプルがヒト血清サンプルであり、好ましくは、hGDF-15閾値レベルが、1.2ng/mlから8.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、1.5ng/mlから7.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、2.0ng/mlから6.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、2.5ng/mlから5.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであるか、又はhGDF-15閾値レベルが、3.0ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルである、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記hGDF-15閾値レベルと比較した前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減は、前記確率の増大が、5%より高い、10%より高い、20%より高い、30%より高い、40%より高い、50%より高い、60%より高い、70%より高い、80%より高い、又は90%より高い確率であることを示す、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

固形癌が、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、脳腫瘍、乳癌、胃癌、腎細胞癌、ユーイング肉腫、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌からなる群から選択され、癌が、好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌及び子宮頸癌からなる群から選択され、癌が、より好ましくは、黒色

腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌及び胃癌からなる群から選択され、並びに/又は、癌が、黒色腫、口腔扁平上皮癌、結腸直腸癌及び前立腺癌からなる群から選択される、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

癌が、黒色腫であり、hGDF-15閾値レベルが、3.0ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであり、hGDF-15閾値レベルが、好ましくは、3.2ng/mlから3.7ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであり、hGDF-15閾値レベルが、最も好ましくは、3.4ng/mlのhGDF-15レベルである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

工程a)が、hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分を使用することによってhGDF-15のレベルを決定する工程を含み、hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、好ましくはhGDF-15と複合体を形成し、及び/又は、1種又は複数の抗体が、少なくとも1種のポリクローナル抗体を含み、及び/又は、1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、少なくとも1種のモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含み、結合は、好ましくは、配列番号25及び配列番号26のアミノ酸配列に含まれるhGDF-15上のコンフォメーション又は不連続エピトープとの結合であり、好ましくは、抗体又はその抗原結合部分が、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分が、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域、及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

免疫チェックポイントブロッカーが、
i)好ましくは、ヒトPD-1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である、ヒトPD-1の阻害剤、及び
ii)好ましくは、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である、ヒトPD-L1の阻害剤
からなる群の1種又は複数から選択される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、前記免疫チェックポイントブロッカーを受けていた患者由来のサンプルであり、ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、好ましくは免疫チェックポイントブロッカー及び/又はその生物学的代謝産物含有するか、又は、ヒト患者から得られたヒト血液サンプルが、免疫チェックポイントブロッカーを受けていない患者由来のサンプルであるか、又は、方法が、固形癌の免疫チェックポイントブロッカー治療若しくは固形癌の異なる治療の対象である患者に使用される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

in vitro方法である、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイによって決定される、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、電気化学発光アッセイによって決定され、電気化学発光アッセイが、好ましくは、

- (A) ストレプトアビジンコーティングされたビーズ又はストレプトアビジンコーティングされた常磁性ナノ粒子、
- (B) hGDF-15と結合可能な、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分、
- (C) サンプル由来のhGDF-15、及び
- (D) hGDF-15と結合可能な、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部

分

の間の検出複合体を形成する工程を含むサンドイッチ検出法であり、

前記検出複合体が構造(A)-(B)-(C)-(D)を有し、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分が第1のhGDF-15エピトープと結合し、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分が前記第1のhGDF-15エピトープとは異なる第2のhGDF-15エピトープと結合し、

方法が、電気化学発光を測定することによって検出複合体を検出する工程を更に含み、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが電気化学発光測定に基づいて決定される、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

ヒト血液サンプルがヒト血清サンプルであり、前記治療奏効の確率が、0.159～0.698の95%信頼区間で、連続予測変数としてng/mlでのhGDF-15の血清レベルについて0.389のオッズ比を使用して予測される、請求項1及び3から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

治療奏効が、RECIST基準、バージョン1.1による奏効である、請求項1及び3から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

生存の確率が、アウトカム変数として全生存を、連続予測変数としてGDF-15を用いるハザード比を使用して予測され、GDF-15血清レベルの1ng/mlの増大につき、死亡のリスクが1.10～1.47の95%信頼区間で1.27倍増大することが予測される、請求項2から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

工程a)において、hGDF-15のレベルが、請求項8に定義されるモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を捕捉することと、ポリクローナル抗体を用いてhGDF-15を検出すること、又はhGDF-15を捕捉する抗体とは異なるエピトープと結合するモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を検出することによって決定される、請求項8から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

請求項1から17のいずれか一項に記載の方法を実行するように構成された装置であって、好ましくは、請求項13に記載の方法を実行するように構成された電気化学発光分析器である、装置。

【請求項19】

(i) ストレプトアビジンコーティングされたビーズ、
(ii) hGDF-15と結合可能な、ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分、
(iii) 組換えhGDF-15、
(iv) hGDF-15と結合可能な、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分、及び任意選択で、

(v) 使用のための説明書、好ましくは、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法における使用のための説明書

を含む検出キットであって、

ビオチン化された第1の抗体又はその抗原結合部分が第1のhGDF-15エピトープと結合可能であり、ルテニウム錯体標識された第2の抗体又はその抗原結合部分が前記第1のhGDF-15エピトープとは異なる第2のhGDF-15エピトープと結合可能であり、

好ましくは、hGDF-15と結合可能な第1の抗体又はその抗原結合部分、及びhGDF-15と結合可能な第2の抗体又はその抗原結合部分の一方が、モノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、結合が、配列番号25及び配列番号26のアミノ酸配列に含まれるhGDF-15上のコンフォメーション又は不連続エピトープとの結合であり、好ましくは、モノクローナル抗体又はその抗原結合部分が、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、モノクローナル抗体又はその抗原結合部分が、配列番号6のアミ

ノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域、及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む、検出キット。

【請求項20】

免疫チェックポイントブロッカーに対するヒト癌患者の奏効を予測するためのin vitro方法における、請求項19に記載のキットの使用であって、癌が固形癌であり、免疫チェックポイントブロッカーが、好ましくは請求項9に定義されるものである、使用。

【請求項21】

免疫チェックポイントブロッカー治療後のヒト癌患者の生存の確率を予測するためのin vitro方法における、請求項19に記載のキットの使用であって、癌が固形癌であり、免疫チェックポイントブロッカーが、好ましくは請求項9に定義されるものである、使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/073519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD.		
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) G01N		
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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JAYASHREE P JOSHI ET AL: "Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, ELSEVIER, US, vol. 82, no. 9, 14 July 2011 (2011-07-14), pages 1090-1099, XP028326986, ISSN: 0006-2952, DOI: 10.1016/J.BCP.2011.07.082 [retrieved on 2011-07-23] whole document, in particular p. 1090, col. 2 - p. 1091, col. 1, bridging par.; p. 1091, col. 2, par. 3; p. 1098, col. 2, par. 1 ----- -/--	1-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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		Date of mailing of the international search report
21 December 2016		05/01/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chrétien, Eva Maria

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/073519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PERNELLE LAVAUD ET AL: "Strategies to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: focus on new data from clinical trials", BMC MEDICINE, vol. 107, no. 1, 1 December 2014 (2014-12-01), page 1547, XP055330736, DOI: 10.1073/pnas.0908801107 whole document, in particular p. 7, col. 1, par. 1</p> <p>-----</p>	1-37
Y	<p>WO 2014/049087 A1 (UNIV WUERZBURG J MAXIMILIANS [DE]) 3 April 2014 (2014-04-03) whole document, in particular claim 1; p. 34, par. 4 - p. 35, par. 1</p> <p>-----</p>	11-16, 24-26, 30-37
Y	<p>WO 2015/144855 A1 (JULIUS MAXIMILIANS UNIVERSITÄT WÜRZBURG [DE]) 1 October 2015 (2015-10-01) whole document, in particular claim 1; p. 54, par. 1-3; D6: p. 2949, col 1-2; bridging par.; p. 2950, col. 2, par. 3</p> <p>-----</p>	11-16, 24-26, 30-37
Y	<p>SUNG JIN HUH ET AL: "Tumorigenesis and Neoplastic Progression Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Regulates Melanoma Vascular Development", AM J PATHOL, vol. 176, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 2948-2957, XP055330224, whole document, in particular p. 2949, col 1-2; bridging par.; p. 2950, col. 2, par. 3; p. 2956, col. 1, par. 1</p> <p>-----</p>	3-6,10, 27-29
A	<p>J. CORRE ET AL: "Concise Review: Growth Differentiation Factor 15 in Pathology: A Clinical Role?", STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE : SCTM, vol. 2, no. 12, 1 December 2013 (2013-12-01), pages 946-952, XP055330730, Durham ISSN: 2157-6564, DOI: 10.5966/sctm.2013-0055 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-37

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/073519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVID A REARDON ET AL: "An update on vaccine therapy and other immunotherapeutic approaches for glioblastoma", EXPERT REVIEW OF VACCINES, vol. 12, no. 6, 1 June 2013 (2013-06-01), pages 597-615, XP055277339, GB ISSN: 1476-0584, DOI: 10.1586/erv.13.41 the whole document -----	1-37
A	L. ZHAO ET AL: "Identification of Candidate Biomarkers of Therapeutic Response to Docetaxel by Proteomic Profiling", CANCER RESEARCH, vol. 69, no. 19, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 7696-7703, XP055004734, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4901 the whole document -----	1-37
A	WO 2015/108907 A2 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 23 July 2015 (2015-07-23) the whole document -----	1-37
A	US 2014/271546 A1 (WARF BRYAN [US] ET AL) 18 September 2014 (2014-09-18) the whole document -----	1-37
A	WO 2012/162561 A2 (ZYNGENIA INC [US]; ROSCHKE VIKTOR [US]; LAFLEUR DAVID [US]; HILBERT DA) 29 November 2012 (2012-11-29) the whole document -----	1-37
A	RUI-RU JI ET AL: "An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 61, no. 7, 7 December 2011 (2011-12-07), pages 1019-1031, XP035074379, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-011-1172-6 the whole document -----	1-37
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/073519

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MURIELLE MIMEAULT ET AL: "Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer", JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 224, no. 3, 12 May 2010 (2010-05-12), pages 626-635, XP055330227, US ISSN: 0021-9541, DOI: 10.1002/jcp.22196 the whole document -----</p>	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/073519

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2014049087	A1	03-04-2014	AU 2013322628 A1	09-04-2015
			CA 2886207 A1	03-04-2014
			CN 104853775 A	19-08-2015
			EP 2900263 A1	05-08-2015
			HK 1210950 A1	13-05-2016
			JP 2015532271 A	09-11-2015
			KR 20150082229 A	15-07-2015
			NZ 706189 A	30-09-2016
			SG 11201502279Y A	29-04-2015
			US 2015239968 A1	27-08-2015
			WO 2014049087 A1	03-04-2014
WO 2015144855	A1	01-10-2015	AU 2015238264 A1	20-10-2016
			CA 2943694 A1	01-10-2015
			WO 2015144855 A1	01-10-2015
WO 2015108907	A2	23-07-2015	AU 2015206603 A1	18-08-2016
			CA 2935804 A1	23-07-2015
			EP 3094736 A2	23-11-2016
			US 2016340407 A1	24-11-2016
			WO 2015108907 A2	23-07-2015
US 2014271546	A1	18-09-2014	AU 2014235380 A1	17-09-2015
			CA 2906523 A1	25-09-2014
			EP 2971156 A1	20-01-2016
			US 2014271546 A1	18-09-2014
			WO 2014151026 A1	25-09-2014
WO 2012162561	A2	29-11-2012	AU 2012258637 A1	19-12-2013
			CA 2837169 A1	29-11-2012
			CN 103857699 A	11-06-2014
			EP 2714738 A2	09-04-2014
			NZ 618334 A	27-05-2016
			US 2014065142 A1	06-03-2014
			US 2015210765 A1	30-07-2015
			WO 2012162561 A2	29-11-2012

フロントページの続き

(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, 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, UA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 マルクス・ハーケ
ドイツ・97230・エステンフェルト・デューラーシュトラッセ・37
(72)発明者 ラインハルト・ドゥマー
スイス・8044・チューリッヒ・クレピュールシュトラッセ・78
(72)発明者 マティアス・メーリング
スイス・4052・パーゼル・シャウエンブルガーシュトラッセ・14
Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA51 BA52 CA40 DA76 EA50 FA74

專利名称(译)	GDF-15作为诊断标志物，用于使用免疫检查点阻断剂预测治疗的临床结果		
公开(公告)号	JP2018535404A	公开(公告)日	2018-11-29
申请号	JP2018516740	申请日	2016-09-30
发明人	イエルク・ヴィッシュフーゼン マルクス・ハーケ ラインハルト・ドゥマー マティアス・メーリング		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/543 C07K16/24		
CPC分类号	G01N33/57488 G01N33/5743 G01N2333/475 G01N2333/495 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/574 G01N33/543.545.A G01N33/543.575 C07K16/24		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA51 4H045/BA52 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	2015017527 2015-10-02 GB 2016007800 2016-04-29 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
例如，本发明是用于预测使用抗PD-1的人类癌症患者对免疫检查点阻断剂治疗的治疗反应的可能性以及在免疫检查点阻断剂治疗后人类癌症患者存活的可能性的方法。可以在这些方法中使用的方法，设备和试剂盒。

(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2018-535404 (P2018-535404A)
		(43) 公表日 平成30年11月29日 (2018.11.29)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Z N A D	4 H O 4 5
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 5 A	
C O 7 K 16/24 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 7 5	
	C O 7 K 16/24	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁)	
(21) 出願番号 特願2018-516740 (P2018-516740)	(71) 出願人 518098047	
(86) (22) 出願日 平成28年9月30日 (2016.9.30)	ユリウス・マクスミリアン・ウニヴェルシ	
(85) 翻訳文提出日 平成30年5月29日 (2018.5.29)	テート・ヴェルツブルク	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2016/073519	ドイツ・97070・ヴェルツブルク・ザ	
(87) 国際公開番号 W02017/055612	ンゲルリング・2	
(87) 国際公開日 平成29年4月6日 (2017.4.6)	(74) 代理人 100108453	
(31) 優先権主張番号 1517527.6	弁理士 村山 靖彦	
(32) 優先日 平成27年10月2日 (2015.10.2)	(74) 代理人 100110364	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	弁理士 実広 信哉	
(31) 優先権主張番号 1607800.8	(74) 代理人 100133400	
(32) 優先日 平成28年4月29日 (2016.4.29)	弁理士 阿部 達彦	
(33) 優先権主張国 英国 (GB)	(72) 発明者	
	イエルク・ヴィッシュフーゼン	
	ドイツ・97082・ヴェルツブルク・ロ	
	イトフレザーヴェーク・14アー	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療の臨床アウトカムを予測するための診断マーカーとしてのGDF-15		