

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7577647号  
(P7577647)

(45)発行日 令和6年11月5日(2024.11.5)

(24)登録日 令和6年10月25日(2024.10.25)

(51)国際特許分類 F I  
G 0 1 N 33/68 (2006.01) G 0 1 N 33/68  
C 1 2 Q 1/48 (2006.01) C 1 2 Q 1/48 Z Z N A

請求項の数 15 (全37頁)

(21)出願番号	特願2021-510976(P2021-510976)	(73)特許権者	591003013
(86)(22)出願日	令和1年8月30日(2019.8.30)		エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
(65)公表番号	特表2021-535392(P2021-535392 A)		F . HOFFMANN - LA ROCH E AKTIENGESELLSCHA FT
(43)公表日	令和3年12月16日(2021.12.16)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル ・グレンツアーヘルストラツセ 1 2 4
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/073180	(74)代理人	100118902
(87)国際公開番号	WO2020/043868		弁理士 山本 修
(87)国際公開日	令和2年3月5日(2020.3.5)	(74)代理人	100106208
審査請求日	令和4年8月19日(2022.8.19)		弁理士 宮前 徹
(31)優先権主張番号	16/118,572	(74)代理人	100196508
(32)優先日	平成30年8月31日(2018.8.31)		弁理士 松尾 淳一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100157923
			弁理士 鶴喰 寿孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D L B C L についての予後指標におけるチミジンキナーゼ ( T K - 1 )

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 ( D L B C L ) 患者の予後指標 ( P I ) ( 危険スコアまたは P I スコアとも呼ばれる ) を決定する方法であって、

a ) 少なくとも次のパラメータ、

i ) 節外性疾患の状態、 i i ) A n n A r b o r 病期、 i i i ) チミジンキナーゼ 1 ( T K - 1 ) のレベル、 i v ) 年齢、 および v ) E C O G ( 米国東海岸癌臨床試験グループ ) パフォーマンスステータス

を決定することであって、

節外性疾患の非存在を 0 点の値とし、節外性疾患の存在を 1 点の値とし、

I または I I の A n n A r b o r 病期を 0 点の値とし、 I I I または I V の A n n A r b o r 病期を 1 点の値とし、

カットオフ以下の T K - 1 のレベルを 0 点の値とし、前記カットオフを上回る T K - 1 のレベルを少なくとも 1 点の値とする、決定することと、

年齢がカットオフを下回る場合、値が 0 点であり、また年齢がカットオフを上回る場合、値が 1 点であり、かつ

E C O G パフォーマンスステータスが 1 以下の場合、値が 0 点であり、また E C O G パフォーマンスステータスが 2 以上の場合、値が 1 点である、

b ) 前記 P I の前記決定において、 i ) 、 i i ) 、 および i i i ) に対する前記値を合計することと

を含む方法。

【請求項 2】

前記 TK - 1 カットオフレベルが、健常個体において決定されるような TK - 1 レベルの平均値の 4 倍に設定され、前記カットオフ以下の TK - 1 レベルを 0 点の値とし、かつカットオフ値を上回るいかなる TK - 1 レベルも 1 点の値とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 TK - 1 カットオフレベルが、健常個体において決定されるような TK - 1 レベルの平均値の 4 倍に設定され、低い TK - 1 レベル、すなわち前記カットオフ以下の TK - 1 のレベルを 0 点の値とし、中間 TK - 1 レベル、すなわち前記カットオフを上回りかつ健常個体において決定されるような平均値の 20 倍に相当する値以下の TK - 1 のレベルを 1 点の値とし、かつ高 TK - 1 レベル、すなわち、健常個体において決定されるような平均値の 20 倍を超える TK - 1 のレベルを 2 点の値とする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

TK - 1 についてのタンパク質レベルのカットオフが、TK - 1 酵素活性における 18 U / l と同等であり、かつこれを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 TK - 1 のレベルが TK - 1 のタンパク質レベルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記タンパク質レベルの前記カットオフが 18 U / l と同等であり、かつこれを含んでおり、また 18 U / l を上回り、かつ 88 U / l 以下の TK - 1 のレベルを 1 点の値とし、また 88 U / l を上回る TK - 1 のレベルを 2 点の値とする、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記 PI の前記決定において、前記年齢が 60 以下である場合、前記値が 0 点であり、前記年齢が 60 を上回る場合、前記値が 1 点である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

年齢というパラメータおよび ECOG パフォーマンスステータスというパラメータをさらに含み、前記 PI の前記決定において、前記年齢が 40 以下の場合、前記値が 0 点であり、前記年齢が 40 を超えかつ 60 以下の場合、前記値が 1 点であり、前記年齢が 60 を超えかつ 75 以下の場合、前記値が 2 点であり、前記年齢が 75 を超える場合、前記値が 3 点である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

DLBCL 患者についての予後指標の決定における、i) 節外性疾患の状態、ii) Ann Arbor 病期、iii) チミジンキナーゼ 1 (TK - 1) のレベル、iv) 年齢、および v) ECOG (米国東海岸癌臨床試験グループ) パフォーマンスステータスについての値の、使用であって、カットオフを上回る予後指標は、好ましくない疾患転帰の増加した危険を示す、使用。

【請求項 10】

前記 i) から v) の値が、IPI、年齢調整された IPI、R - IPI、または NCCN - IPI で使用されるようなその他のパラメータと組み合わせられる、請求項 9 に記載の使用。

40

【請求項 11】

TK - 1 の前記レベルについての前記値が、このような PI における LDH のレベルについての値を置換するために使用されることを条件とする、請求項 9 または 10 に記載の使用。

【請求項 12】

コンピュータ可読プログラム製品であって、該プログラムがコンピュータにより実行された場合に、i) 節外性疾患の状態、ii) Ann Arbor 病期、iii) チミジンキナーゼ 1 (TK - 1) のレベル、iv) 年齢、および v) ECOG (米国東海岸癌臨床試験グループ) パフォーマンスステータスについての値を含む DLBCL のための予後指標 (PI) の決定をコンピュータに実行させる命令を含む、プログラム製品。

50

**【請求項 1 3】**

前記プログラムはアプリ内に実装される、請求項 1 2 に記載のコンピュータ可読プログラム製品。

**【請求項 1 4】**

前記 P I は、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項で定義されるように計算される、請求項 1 2 または 1 3 に記載のコンピュータ可読プログラム製品。

**【請求項 1 5】**

前記 P I が、I P I、年齢調整された I P I、R - I P I、または N C C N - I P I から選択される、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のコンピュータ可読プログラム製品。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、チミジンキナーゼ 1 ( T K - 1 ) が、急速進行性 B 細胞リンパ腫、特にびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 ( D L B C L ) に罹患している患者のリスク層別化の予後指標 ( P I ) を決定するための方法における貴重なバイオマーカーであるという発見、このような P I における T K - 1 の使用、およびマーカー T K - 1 を含む P I に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

異なる危険群への D L B C L 患者の層別化は通常、予後指標の採点に基づいて行われる。現在、このような患者の層別化に使用されるいくつかの予後指標 ( P I ) がある ( W i g h t e t a l . B l o o d R e v i e w s , 2 0 1 8 ) 。 N C C N ガイドラインには次のもの、すなわち、I P I、年齢調整済 I P I、病期変更済 I P I および N C C N - I P I が含まれる。E S M O ガイドラインでは、I P I および年齢調整済 I P I を推奨している。

20

**【0 0 0 3】**

標準的な国際予後指数 ( I P I ) [ Z i e p e r t M . e t a l . , J o u r n a l o f C l i n i c a l O n c o l o g y : 2 8 / 1 4 ( 2 0 1 0 ) 2 3 7 3 ] は、R - C H O P ( リツキシマブ + C H O P 化学療法 ) で処置した D L B C L 患者の予後を予測するために、診療所において広く使用されている。また、全米総合がん情報ネットワーク国際予後指標 ( N C C N - I P I ) も非常に一般的である [ Z h o u e t a l . , B l o o d , 1 2 3 , 6 : ( 2 0 1 4 ) 8 3 7 ] 。

30

**【0 0 0 4】**

D L B C L の分野において使用される異なる P I を決定するために使用されるパラメータに関してはいくつかの違いがあるが、A n n A r b o r 病期、節外性疾患の状態、および - 唯一のバイオマーカーとして - 乳酸脱水素酵素 ( L D H ) が、先に言及した P I の各々の鍵となる要素であるという一般受容概念がある。

**【0 0 0 5】**

すべての予後指標または予後スコアを用いる場合、改善が高水準で所望されており、その理由は、この指標 / スコアがより正確でありかつ信頼できるほど、患者の層別化はより良好であるからである。

40

**【0 0 0 6】**

それゆえ、本開示に対する本発明者らの課題は、例えば、予後指標または予後スコアを決定することによって D L B C L 患者の層別化を改善するために使用することができるバイオマーカーが存在するかどうかを調査することとした。

**【0 0 0 7】**

この課題は、特許請求の範囲で定義されたように、明細書、例、および実施形態を提供することによって、本開示において対処される。

**【0 0 0 8】**

パラメータ、すなわち、節外性疾患の状態、A n n A r b o r 病期、チミジンキナー

50

ゼ1のレベルは、DLBCL患者についての何らかの予後指標の決定のための鍵となることがわかっている。

【0009】

驚くべきことに、また、バイオマーカーチミジンキナーゼ1は、調査したPIにおけるマーカーLDHを置き換えることができるだけでなく、PIにおいて使用した他のパラメータとの併用においても、このようなPIの改善、すなわち患者の層別化の改善をもたらすことができることも発見された。

【発明の概要】

【0010】

一実施形態では、本開示は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)患者についての予後指標(PI)を決定する方法であって、a)少なくとも次のパラメータ、すなわち、i)節外性疾患の状態、ii)Ann Arbor病期、およびiii)チミジンキナーゼ1のレベルを決定することであって、節外性疾患の非存在を0点の値とし、節外性疾患の存在を1点の値とし、IまたはIIのAnn Arbor病期を0点の値とし、IIIまたはIVのAnn Arbor病期を1点の値とし、かつカットオフ以下のチミジンキナーゼのレベルを0点の値とし、カットオフを上回るチミジンキナーゼのレベルを少なくとも1点の値とする、決定することと、b)PIの決定においてi)、ii)およびiii)に対する値を合計することを含む方法に関する。

10

【0011】

また、DLBCL患者についての予後指標およびチミジンキナーゼ1のレベルについての値を含むDLBCLについての予後指標(PI)の決定におけるTK-1のレベルについての値の使用も本明細書に開示されている。

20

本発明のある特定の態様はまた、添付の図面によっても説明されている。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】免疫検定法データのグラフ表示。図面の左側部分には、箱ひげ図(ボックスプロット)が付与されている。y軸(対数目盛)には、ng/ml単位の濃度が示されている。図面の右側部分には、曲線下面積(AUC)が示されている。(略語: Ctr = 対照試料、DLBCL = びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫患者からの試料)。

30

【図2】LIAISON(登録商標)チミジンキナーゼ(活性)アッセイデータのグラフ表示。図2の左側部分には、2つの箱ひげ図(ボックスプロット)があり、y軸(対数尺度)に1mlあたりの単位が示されている。この図面の右側部分には、曲線下面積(AUC)が示されている。(略語: Ctr = 対照試料、DLBCL = びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫患者からの試料)。

【図3】方法の比較 Doming回帰適合度は、図3のLIAISON(登録商標)チミジンキナーゼ(活性)アッセイデータのx軸とプロトタイプの免疫検定法のy軸との相関関係について示されている。

【発明を実施するための形態】

【0013】

詳細な説明

40

一実施形態では、本開示は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)患者の予後指標(PI; 危険スコアまたはPIスコアとも呼ばれる)を決定する方法であって、

a) 少なくとも次のパラメータ、すなわち

i) 節外性疾患の状態、ii) Ann Arbor病期、およびiii) チミジンキナーゼ1のレベル

を決定することであって、

節外性疾患の非存在を0点の値とし、節外性疾患の存在を1点の値とし、

IまたはIIのAnn Arbor病期を0点の値とし、IIIまたはIVのAnn Arbor病期を1点の値とし、かつ

カットオフ以下のチミジンキナーゼのレベルを0点の値とし、前記カットオフを上回る

50

チミジンキナーゼのレベルを少なくとも1点の値とする、決定することと、

b) P Iの決定において、i)、ii)、およびiii)に対する値を合計することとを含む方法に関する。

【0014】

本明細書では、特許出願および製造元のマニュアルを含む多くの文書が引用されている。これらの文書の開示は、本発明の特許性に関連するとは見なされないが、その全体が参照により本明細書とともに組み込まれる。より具体的には、参照されたすべての文書は、個々の文書が参照により組み込まれることが具体的かつ個々に示されている場合と同程度まで、参照により組み込まれる。

【0015】

ヒトチミジンキナーゼ1(略語:TK-1、hTK-1、hTK1またはTK1)、(ATP:チミジン5'-ホスホトランスフェラーゼ、EC2.7.1.21)は、DNA前駆体合成に関与する酵素である。ヒトチミジンキナーゼ1は、配列番号1に示されるような234個のアミノ酸からなる。ヒトの体内では、TK-1は、二量体、四量体、高分子量のポリマーなどのさまざまな形態で存在する。これらの形態は、ある特定の分子の存在、例えば、アデノシン三リン酸(ATP)の有無、hTK-1タンパク質自体の濃度、タンパク質、すなわち天然または組換えTK1の種類、およびタンパク質の、すなわち血清または細胞質中での部位/位置に依存しているようである。

【0016】

関心対象の試料中のチミジンキナーゼ1のレベルは、いずれかの適切な手段によって決定することができる。この決定は、インビトロで行われる。一実施形態では、チミジンキナーゼ1のレベルは、関心対象の試料からインビトロで決定される。

【0017】

一実施形態では、TK-1のレベルは酵素活性レベルである。血清TK-1酵素活性は、例えば、放射性基質1251-dUrd(PROLIFIGEN(登録商標)TK-REA, DiaSorin Inc.)または非放射性基質TK-1活性アッセイ(TK LIAISON(登録商標)アッセイ, DiaSorin Inc.)を使用して測定することができる。一実施形態では、チミジンキナーゼ1のレベルは、チミジンキナーゼ1のタンパク質レベルである。

【0018】

「カットオフ値」という用語は、判定点、通常、値および/または濃度に関する。カットオフ値以下の値は、第1の群へと群別され、カットオフ値を上回る値は、第2の群へと群別される。時には1つを超えるカットオフ値点を使用される。この場合、第1のカットオフ値以下の値は、第1の群へと群別され、第1のカットオフ値を上回りかつ第2のカットオフ値以下の値は、第2の群へと群別され、第2のカットオフ値を上回りかつ~以下の値などである。

【0019】

DLBCL患者のチミジンキナーゼ1のレベルが、健常個体からの試料において測定されたTK-1のレベルをはるかに上回っていることは非常に驚くべき発見であった。一実施形態では、カットオフ値は、新たに診断されたDLBCL患者のベースライン試料において決定され、新たに診断されたDLBCL患者の25%百分位数から35%百分位数の範囲にある。

【0020】

一実施形態では、カットオフ値は、健常対照から採取された試料に基づいて決定される。一実施形態では、チミジンキナーゼ1のカットオフ値のレベルは、健常個体において決定されるようなTK-1レベルの平均値の4倍である。

【0021】

TK-1についての単一のカットオフ値点を使用し、2つの群の患者、すなわちカットオフ値以下のチミジンキナーゼ1レベルの患者、およびカットオフ値を上回るTK-1レベルの患者を構築することは可能であることが発見された。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 2 】

一実施形態では、本開示は、先に規定したように P I を決定するための方法に関するものであり、チミジンキナーゼ 1 カットオフ値レベルは、健常個体において決定されるような T K - 1 レベルの平均値の 4 倍に設定され、カットオフ値以下のチミジンキナーゼ 1 レベルを 0 点の値とし、かつカットオフ値を上回るいかなる T K - 1 レベルも 1 点の値とする。

## 【 0 0 2 3 】

さらに、T K - 1 のレベルに基づいて 2 つの群の患者、すなわちチミジンキナーゼ 1 レベルが低い、すなわちカットオフ値以下の T K - 1 レベルの患者、中間群、すなわち、T K - 1 レベルがカットオフ値を上回り、健常個体において決定される平均値の 2 0 倍に相当する値以下の患者、およびチミジンキナーゼレベルが高い、すなわち、T K - 1 のレベルが健常個体において決定される平均値の 2 0 倍超の患者を構築することは有利である可能性があることが発見された。

10

## 【 0 0 2 4 】

一実施形態では、本開示は、先に規定されたように P I を決定するための方法に関するものであり、チミジンキナーゼ 1 カットオフ値レベルは、健常個体において決定されるような T K - 1 レベルの平均値の 4 倍に設定され、チミジンキナーゼ 1 レベル、すなわちカットオフ値以下の T K - 1 のレベルを 0 点の値とし、かつ中間的なチミジンキナーゼレベル、すなわち、カットオフ値を上回り、健常個体において決定されるような平均値の 2 0 倍に相当する値以下の T K - 1 のレベルを 1 点と評価し、高いチミジンキナーゼレベル、すなわち健常個体において決定されるような平均値の 2 0 倍超の T K - 1 のレベルを 2 点の値とする。

20

## 【 0 0 2 5 】

まだ完全に標準化されていない免疫検定法を用いて決定されたタンパク質濃度に関する T K - 1 レベル、および D i a S o r i n から市販されている酵素活性アッセイを用いて決定された T K - 1 酵素活性レベルは、非常に良好な相関を示すことがわかっている（図 3 参照）。それゆえ、また、酵素活性（U / l）に関するカットオフ値を与えることも可能である。

## 【 0 0 2 6 】

一実施形態では、本開示は、P I を決定するための方法であって、T K - 1 についてのタンパク質レベルのカットオフが、T K - 1 酵素活性における 1 8 U / l と同等であり、かつこれを含む方法に関する。

30

## 【 0 0 2 7 】

一実施形態では、本開示は、P I を決定するための方法であって、タンパク質レベルのカットオフ値が、1 8 U / l と等価であり、かつこれを含む方法であって、1 8 U / l を上回りかつ 8 8 U / l 以下の T K - 1 のレベルを 1 点の値とし、8 8 U / l を上回る T K - 1 のレベルを 2 点の値とする方法に関する。

## 【 0 0 2 8 】

いかなる患者についても、特に最近 D L B C L と診断された患者については、T K - 1 が測定され、あらかじめ規定されたカットオフ値と比較されるものとすることが発見された。新たに診断された患者についての測定値が、あらかじめ規定されたカットオフ値（2 値化アプローチ）を上回る場合、該患者は、より高い危険スコアを有し、好ましくない疾患転帰を経験する可能性が高いと見なされる。

40

## 【 0 0 2 9 】

また、上昇するカットオフ値のセットに基づいて、例えば、T K - 1 のレベルが低い患者についての P I の決定において 0（危険）点を、T K - 1 のレベルが中程度の患者についての P I の決定において 1（危険）点を、および T K - 1 のレベルが高い患者についての P I の決定において 2（危険）点を用いる三分法アプローチにおいて、2 つを超える危険群を規定することも可能である。次に、患者は、T K - 1 測定値に基づいて危険群の 1 つに割り当てられるであろうし、危険スコアが高いほど、疾患の転帰は不利になる。

50

## 【 0 0 3 0 】

あるいは、あらかじめ規定された適切な変換関数（例えば、 $\log_2$ 変換）に基づいて、TK-1の測定値を連続的な危険スコアに直接的に変換することもできるであろう。本開示による方法における一実施形態では、PIは、 $\log_2$ 変換されたTK-1測定値に基づいて決定される。本開示による方法における一実施形態では、PIは、TK-1測定値の連続的な危険スコアに基づいて決定される。これらの層別化されたまたは変換されたTK-1値のいかなるものも、既存の予後指標のいずれかに（LDHの置き換えの有無にかかわらず）追加することができる。

## 【 0 0 3 1 】

一実施形態では、本明細書に開示されるような、すなわち、節外性疾患の状態、Ann Arbor病期、およびチミジンキナーゼ1のレベルというパラメータを含む、予後指標を決定するための方法は、パラメータ年齢をさらに含み、年齢がカットオフ値を下回る場合、値は0点であり、年齢がカットオフ値を上回る場合、値は、PIの決定において1点である。

10

## 【 0 0 3 2 】

一実施形態では、本明細書に開示されるような、すなわち、節外性疾患の状態、Ann Arbor病期、およびチミジンキナーゼ1のレベルというパラメータを含む、予後指標を決定するための方法は、ECOGパフォーマンスステータスというパラメータをさらに含み、ECOGパフォーマンスステータスが1以下の場合、値は、PIの決定において0点であり、ECOGパフォーマンスステータスが2以上の場合、値は、1点である。

20

## 【 0 0 3 3 】

DLBCLについての少なくとも4つの異なるものの関連している予後指数は、現に利用可能であり、臨床診療、国際予後指標（IPI）、「年齢調整済IPI」、改訂標準国際予後指数（R-IPI）、および全米総合がん情報ネットワーク国際予後指数（NCCN-IPI）において使用されている。

## 【 0 0 3 4 】

「予後指標」（PI）（危険スコアまたはPIスコアとも呼ばれる）は、数値を提供する。このようなPIの数値は、例えば、このようなPIの各個々のパラメータ（構成要素）について決定された値を合計することによって生成される。一実施形態では、本開示によりPIを決定する方法は、コンピュータ可読プログラムにおいて実施される。一実施形態では、本開示によりPIを決定する方法は、アプリ内へと実装される。予後指標またはPIスコアは、例えば、患者を複数の群へと分割/層別化するために使用することができる。このような群は、例えば、疾患の進行の危険が異なる群であることができる。通常、約3つまたは4つの群が構築され、それぞれ、低危険群、中間危険群、および高危険群、または低危険群、中間低危険群、中間高危険群、および高危険群である。

30

## 【 0 0 3 5 】

DLBCLの分野における「元の」国際予後指標（IPI）は、1993年にShipp MA and Harrington DP, "A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma"; The international non-Hodgkin's Lymphoma prognostic factors project, N. Engl. J. Med. 1993; 329(14): 987-94によって説明されている。また、この論文では、60歳を超える患者と60歳以下の患者とに群分けする年齢調整済IPIについても説明されている。この参考文献の開示は、参照により明示的に本明細書とともに含まれる。

40

## 【 0 0 3 6 】

「元の」国際予後指標（IPI）は、年齢（60歳超 = 1点）、ECOGパフォーマンスステータス（2以上 = 1点）、Ann Arbor病期（IIIまたはIV = 1点）、LDH（ULN（正常値上限）超 = 1点）および節外部位（1超 = 1点）というパラメータを含む。IPIスコアから生じる危険群は次のとおり、すなわち、低危険群（0 ~ 1点）、低中間危険（2点）、高中間危険（3点）、および高危険（4または5点）である。

50

## 【0037】

年齢調整済IPIの最小複雑性版は、60歳超の患者に適用される。該版は、Ann Arbor病期（IIIまたはIV = 1点）、LDH（ULN超 = 1点）および節外部位（1超 = 1点）というパラメータを含む。4つの危険群、つまり低危険群（0点）、低中間危険（1点）、高中間危険（2点）、および高危険（3点）が決定される。

## 【0038】

60歳以下の患者に適用される年齢調整済IPIはまた、Ann Arbor病期（IIIまたはIV = 1点）、LDH（ULN超 = 1点）および節外部位（1超 = 1点）というパラメータも含むが、わずかに異なる採点を使用する。本明細書では4つの危険群とは、低危険群（0～1点）、低中間危険（1～2点）、高中間危険（2～3点）、および高危険（4点）である。

10

## 【0039】

本発明に対して本発明者らによって発見されたように、TK-1は、IPIおよび年齢調整済IPIの両方においてLDHの代わりに使用することができる。

## 【0040】

（改訂）国際予後指標（R-IPI）[Sehn, et al., 2007]は、R-CHOP（リツキシマブ+CHOP化学療法）を用いて処置されたDLBCL患者の転帰を予測するために診療所で広く使用されている。R-IPIは、5つの構成要素を含み、該構成要素は、最終的な危険スコアとして合計される（表1）。

## 【表1】

20

表1：R-IPI予後指標の構成要素および閾値。

R-IPI 構成要素	スコア
年齢 > 60	1
ECOG パフォーマンスステータス $\geq$ 2	1
乳酸脱水素酵素（LDH）の上昇	1
Ann Arbor病期 III～IV	1
節外部位の数 > 1	1

30

## 【0041】

一実施形態では、PIを決定するための、すなわち、節外性疾患の状態、Ann Arbor病期、およびチミジンキナーゼ1のレベルというパラメータを含む、本発明に開示される方法は、年齢というパラメータとAnn Arbor病期というパラメータをさらに含み、年齢が60以下である場合、PIの決定において値は0点であり、年齢が60を超える場合、値は1点であり、Ann Arbor病期がII以下である場合、PIの決定において値は0点であり、Ann Arbor病期がIIIまたはIVである場合、値は1点である。この方法の一実施形態では、節外性疾患とは、1つを超える節外部位（骨髄を含む）における疾患であり、満たされた場合、PIの決定において1点になる。一実施形態では、本発明は、表1からの先のパラメータ（構成要素）を含む改善されたR-IPIであって、LDHのレベルの代わりにTK-1のレベルが使用されるR-IPIに関する。改善されたR-IPIにおける一実施形態では、チミジンキナーゼ1カットオフ値レベルは、健常個体において決定されたようなTK-1レベルの平均値の4倍に設定され、カットオフ値以下のチミジンキナーゼ1レベルは、0点になり、カットオフ値を上回るいかなるTK-1レベルも1点となる。改善されたR-IPIにおける一実施形態では、チミジンキナーゼ1のカットオフ値レベルは、健常個体において決定されるようなTK-1レベルの平均値の4倍に設定され、低いチミジンキナーゼレベル、すなわちカットオフ値以下のTK-1のレベルは0点となり、中間チミジンキナーゼレベル、すなわちカットオフ値を上回りかつ健常個体において決定されるような平均値の20倍に相当する値以下の

40

50

TK - 1のレベルは1点となり、高チミジンキナーゼレベル、すなわち、健常個体において決定されるような平均値の20倍を超えるTK - 1のレベルは2点となる。

【0042】

「TK - 1 IPI」(LDHの代わりにTK - 1を使用するIPI)危険群は、先に説明したようなTK - 1のレベルについての単一のカットオフ値点を使用する場合、公表されたとおりにとどまり、すなわち、低危険群(0~1点)、低中間危険(2点)、高中間危険(3点)、および高危険(4または5点)である。「TK - 1 IPI」(LDHの代わりにTK - 1を使用するIPI)の予後能力は、TK - 1レベルについて決定された値を三分することによってさらに改善することができる。相当する危険群は、低危険群(0点)、低中間危険(1点)、高中間危険(2~3点)、および高危険(4~6点)である。

10

【0043】

「TK - 1 R-IPI」(LDHの代わりにTK - 1を使用するR-IPI)危険群は、先に説明したようなTK - 1のレベルについての単一のカットオフ値点を使用される場合、公表されるとおりにとどまり、すなわち、低危険群(「非常によい」、0点)、中間危険(「よい」、1~2点)、高危険(「悪い」3~5点)である。「TK - 1 R-IPI」(LDHの代わりにTK - 1を使用するIPI)の予後能力は、TK - 1レベルについて決定された値を三分することによってさらに改善することができる。相当する危険群は、低危険群(「非常によい」、0点)、中間危険(「よい」、1~3点)、高危険(「悪い」4~6点)である。

20

【0044】

全米総合がん情報ネットワーク国際予後指標(NCCN-IPI)は、R-IPIの派生物であり、以下の危険構成要素を含有している(表2)。

【表2】

表2：NCCN-IPI予後指標の構成要素および閾値。ULN=正常値上限

NCCN-IPI構成要素	スコア
年齢	
>40~≤60	1
>60~≤75	2
>75	3
正規化したLDH [ULN]	
>1~≤3	1
>3	2
Ann Arbor病期III~IV	1
節外性疾患(骨髄、中枢神経系、肝臓、消化管、肺における疾患)	1
ECOGパフォーマンスステータス≥2	1

30

40

【0045】

一実施形態では、PIを決定するための、すなわち、節外性疾患の状態、Ann Arbor病期、およびチミジンキナーゼ1のレベルというパラメータを含む、本発明に開示される方法は、年齢というパラメータおよびECOGパフォーマンスステータスというパラメータをさらに含み、年齢が40以下の場合、PIの決定において値は0点であり、年齢が40を超えかつ60以下の場合、値は1点であり、年齢が60を超えかつ75以下の場合、値は2点であり、年齢が75を超える場合、PIの決定において値は3点であり、ECOGパフォーマンスステータスが1以下の場合、PIの決定において値は0点であり

50

、ECOGパフォーマンスステータスが2以上の場合、値は1点である。この方法の一実施形態では、節外性疾患とは、骨髄、中枢神経系、肝臓、消化管および肺から選択される1つ以上の部位における疾患であり、この基準が満たされる場合、1点となる。一実施形態では、本発明は、表2からの先のパラメータ（構成要素）を含む改善されたNCCN-IPIであって、LDHのレベルの代わりにTK-1のレベルが使用される改善されたNCCN-IPIに関する。改善されたNCCN-IPIにおける一実施形態では、チミジンキナーゼのカットオフ値レベルは、健常個体において決定されるようなTK-1レベルの平均値の4倍に設定され、低いチミジンキナーゼレベル、すなわちカットオフ値以下のTK-1のレベルは0点となり、中間チミジンキナーゼレベル、すなわちカットオフ値を上回りかつ健常個体において決定されるような平均値の20倍に相当する値以下のTK-1のレベルは1点となり、高チミジンキナーゼレベル、すなわち、健常個体において決定されるような平均値の20倍を超えるTK-1のレベルは2点となる。

10

## 【0046】

「TK-1 NCCN-IPI」（LDHの代わりにTK-1を使用するNCCN-IPI）危険群は、公表されたとおりにとどまり、すなわち、低危険群（0～1点）、高中間危険（2～3点）、高中間危険（4～5点）、および高危険（6点以上）である。

## 【0047】

表1および表2、ならびに先の「より古い」IPIの説明から明らかなように、Ann Arbor病期および節外性疾患、および唯一のバイオマーカーとしての乳酸脱水素酵素（LDH）が、先に述べたDLBCLについての各PIの鍵となる要素であるという共通認識がある。

20

## 【0048】

IPI、年齢調整済IPI、R-IPI、およびNCCN-IPIについてわかるように、乳酸脱水素酵素（LDH）値は通常、正常上限（ULN）を使用して決定される。ULN以下のLDHレベルは、0となり、ULNを超えるLDHレベルは、少なくとも1点となる。

## 【0049】

Ann Arborの病期分類は、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5121694>および<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2809679>において説明されているように実行される。その開示は、その全体が参照により本明細書により含まれる。

30

## 【0050】

ECOG（米国東海岸癌臨床試験グループ）のパフォーマンスステータス（＝「ECOGステータス」）は、Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al., Eastern Cooperative Oncology Group, Robert Comis M.D., Group Chair. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol. 1982 Dec; 5(6): 649-55によって定義および説明されているように決定される。

## 【0051】

先に述べたすべてのDLBCL PIは、ECOGステータス（ECOGパフォーマンスステータス）について同じカットオフ値を使用しており、すなわち、2以上のECOGステータスは、これらの各指標の決定において1点となるのに対し、0または1のECODステータスは0点となる。同じことが、本明細書に開示される方法または予後指標の一部としてのECOGステータスに適用される。

40

## 【0052】

「節外性疾患」が、先に述べたPIのいずれかのさらに1つのさらなる中心的な要素を示すという広範な共通認識がある。先により詳細に説明したさまざまなIPI間における節外性疾患の定義に関してわずかな違いがある。所与の実施例から明らかなように、TK-1のレベルについての値を使用することができ、先に説明したPIのいずれかと組み合

50

わせることができる。それゆえ、一実施形態では、本発明は、P Iを決定する方法またはP Iそれ自体に関するものであり、節外性疾患についての定義は、1つを超える節外部位（骨髄を含む）における疾患または骨髄、中枢神経系、肝臓、消化管、肺における疾患（1つ以上）から選択される。

#### 【0053】

「試料」または「関心対象の試料」または「検査試料」という用語は、本明細書では相互交換可能に使用される。試料は、インピトロでの試料であり、インピトロで分析されることになり、体内に戻されることはない。一実施形態では、関心対象の試料は、DLBCLに罹患していると新たに診断され、処置が開始される前の患者から採取される。試料の例は、限定されるものではないが、血液、血清、血漿、滑液、尿、唾液、およびリンパ液などの流体試料、または組織抽出物、軟骨、骨、滑膜、および結合組織などの固形試料を含む。一実施形態では、試料は、血液、血清、血漿、滑液、および尿から選択される。一実施形態では、試料は、血液、血清、および血漿から選択される。一実施形態では、試料は、血清または血漿である。

10

#### 【0054】

本明細書で使用される「参照試料」という用語は、関心対象の試料と実質的に同一の様式で分析され、その情報が関心対象の試料の情報と比較される試料を指す。これにより、参照試料は、関心対象の試料から入手された情報の評価を可能にする標準を提供する。参照試料は、健常なまたは正常な組織、器官、または個体に由来することができ、それにより、組織、器官、または個体の健康状態の標準を提供する。一実施形態では、TK-1の平均値を決定するための参照試料は、健常個体に由来する。

20

#### 【0055】

先にさらに示すように、予後指標を決定するために使用されるチミジンキナーゼのレベルは、一実施形態ではタンパク質レベルである。タンパク質レベルを決定するためのさまざまな方法が利用可能であり、当業者の技術の範囲内である。

#### 【0056】

一実施形態では、チミジンキナーゼのタンパク質レベルは、免疫検定法において決定される。いかなる種類の免疫検定法を使用しても、試料中のTK-1タンパク質レベルを測定することができる。P Iの決定において後の使用のためにTK-1レベルを測定するために利用することができる免疫検定法の例は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、酵素免疫検定法（EIA）、放射性免疫検定（RIA）、または発光、化学発光、電気化学発光、もしくは蛍光に基づく免疫検定法である。

30

#### 【0057】

市販の免疫検定法の1つは、マイクロタイタープレート法に基づくArocell製TK-1アッセイである。

#### 【0058】

一実施形態では、予後指標を決定するために使用されるTK-1レベルは、サンドイッチアッセイ法において測定される。

#### 【0059】

典型的なサンドイッチ型法では、固相に結合した、または固相に結合することができる一次抗体、および検出可能に標識された二次抗体は各々、異なる重複しないエピトープで分析物に結合する。第1の分析物特異的結合剤（例えば、抗体）は、固体表面に共有結合しているかまたは受動結合している（passively bound）かのいずれかである。固体表面は、典型的にはガラスまたはポリマーであり、最も一般的に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンである。固体支持体は、管、ビーズ、マイクロプレートの円盤、または免疫検定法を実施するのに適したその他の表面であってもよい。結合プロセスは、当技術分野で周知であり、概して、架橋性共有結合、または物理的吸着からなり、ポリマー-抗体複合体は、検査試料のための調製において洗浄される。次に、検査されることになる試料の一定分量を固相複合体に添加し、十分な時間（例えば、2~40分またはより

40

50

便利な場合は一晚)かつ適切な条件(例えば、25 ~ 37 など、室温から40 まで)下でインキュベートして、一次抗体または捕捉抗体と、相当する抗原との間の結合を可能にする。インキュベーション期間に続いて、一次抗体または捕捉抗体を含み、該抗体に結合した固相を洗浄することができ、抗原上の別のエピトープに結合する二次抗体または標識抗体とともにインキュベートすることができる。第2の抗体を、第1の抗体と関心対象の抗原との複合体に対する第2の抗体の結合を示すために使用するレポーター分子に結合させる。

#### 【0060】

非常に用途の広い代替サンドイッチアッセイ法には、結合対の第1のパートナーでコーティングされた固相、例えば、常磁性ストレプトアビジンでコーティングした微粒子の使用が含まれる。このような微粒子を、結合対の第2のパートナー(例えば、ビオチン化抗体)に結合した分析物特異的結合剤、結合対の該第2のパートナーが該分析物特異的結合剤に結合している分析物を含むと疑われるまたは含んでいる試料、および例えば、本明細書で使用されるような電気化学発光標識で検出可能に標識された第2の分析物特異的結合剤と混合およびインキュベートする。当業者には明らかなように、これらの構成要素を適切な条件下で、分析物、結合対の第2のパートナーおよび結合対の第1のパートナー(に結合した)分析物特異的結合剤を介して、標識抗体を固相微粒子へ結合させるのに十分な時間インキュベートする。適宜、このようなアッセイは、1つ以上の洗浄ステップ(複数可)を含むことができる。

#### 【0061】

当業者には明らかなように、試料は、いずれかの所望の順序で、すなわち、一次抗体が最初であり、二次抗体であり、一次抗体よりも最初に二次抗体、または同時に、一次抗hTK-1抗体/hTK-1/二次抗hTK-1抗体複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、一次および二次抗体と接触させることができる。

#### 【0062】

当業者が容易に認識するように、特異的抗hTK-1抗体とhTK-1抗原/分析物との間の複合体(抗hTK-1抗体/hTK-1複合体)の形成、またはhTK-1と、hTK-1(分析物)と第2の抗hTK-1抗体複合体(=第1の抗hTK-1抗体/hTK-1/第2の抗hTK-1抗体複合体)とを含む二次複合体またはサンドイッチ複合体の形成に適切であるまたは十分である時間および条件を確立することは常に、常用の実験法である。

#### 【0063】

抗hTK-1抗体/hTK-1複合体の検出は、何らかの適切な手段によって実施することができる。当業者は、このような手段/方法に完全に精通している。

#### 【0064】

hTK-1のレベルを測定するためのイムノアッセイ法では、通常、hTK-1に対する少なくとも1つの抗体は、検出可能な標識を含む。

#### 【0065】

検出可能に標識したという用語は、直接的または間接的に検出することができる標識を包含する。

#### 【0066】

直接的に検出可能な標識が、検出可能なシグナルを提供するか、または該標識が、第2の標識と相互作用するかのいずれかをして、第1または第2の標識によって提供される検出可能なシグナルを改変して、例えば、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)を与える。蛍光色素および発光(化学発光および電気化学発光を含む)色素などの標識(Briggs et al "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1 (1997) 1051-1058)は、検出可能なシグナルを提供し、標識法に概して適用可能である。一実施形態では、検出可能に標識したは、検出可能なシグナルを提供する

10

20

30

40

50

、または提供するように誘導可能な標識、すなわち、それぞれ、蛍光標識、発光標識（例えば、化学発光標識または電気化学発光標識）、放射性標識または金属キレート系標識を指す。

【0067】

多数の標識（色素ともいう）が利用可能であり、これらは概して、以下の区分に分類することができ、該区分はすべてまとめて、および該区分の各々が本開示による実施形態である。

【0068】

(a) 蛍光色素

蛍光色素は、例えば、Briggs et al "Synthesis of Functionalized Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1 (1997) 1051 - 1058) によって説明されている。

【0069】

蛍光標識または蛍光体には、希土類キレート（ユーロピウムキレート）、フルオレセイン型標識（FITC、5-カルボキシフルオロセイン、6-カルボキシフルオロセインを含む）、ローダミン型標識（TAMRAを含む）、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサスレッド、およびこれらの類似体が含まれる。蛍光標識は、本明細書に開示される技術を使用して、標的分子内に含まれるアルデヒド基に結合させることができる。蛍光色素および蛍光標識試薬には、Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) および Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Ill.) から市販されるものが含まれる。

【0070】

(b) 発光色素

発光色素または標識は、化学発光色素および電気化学発光色素にさらに下位分類することができる。

【0071】

化学発光標識の異なるクラスには、ルミノール、アクリジニウム化合物、セレンテラジンおよび類似体、ジオキセタン、ペルオキシしゅう酸およびペルオキシしゅう酸誘導体に基づく系が含まれる。免疫診断手順のためには、主にアクリジニウム系標識が使用される（詳細な概要は、Dodeigne C. et al., Talanta 51 (2000) 415 - 439 において付与されている）。

【0072】

電気化学発光標識として使用される主な関連性のある標識は、それぞれルテニウムおよびイリジウム系の電気化学発光錯体である。電気化学発光（ECL）は、高感度かつ選択的な方法として、分析上の応用において非常に有用であることが証明された。ECLは、化学発光分析の分析上の利点（背景光信号の非存在）を、電極電位を適用することによる反応制御の容易さと組み合わせている。概して、ルテニウム錯体、特に液相または液固界面においてTPA（トリプロピルアミン）を用いて再生する[Ru(Bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>（約620nmで光子を放出）がECL標識として使用される。

【0073】

電気化学発光（ECL）アッセイは、関心対象の分析物の存在および濃度の高感度かつ正確な測定を提供する。このような技術は、適切な化学的環境において電気化学的に酸化または還元したときに発光するように誘導することができる標識または他の反応物を使用する。このような電気化学発光は、特定の時間に特定の様式で作用電極に印加される電圧によって生じる。標識によって生成された光は、測定され、分析物の存在または量を示す。このようなECL技術のより完全な説明については、米国特許第5,221,605号、米国特許第5,591,581号、米国特許第5,597,910号、PCT出願公開

10

20

30

40

50

WO 90 / 05296、PCT出願公開WO 92 / 14139、PCT出願公開WO 90 / 05301、PCT出願公開WO 96 / 24690、PCT出願公開US 95 / 03190、PCT出願US 97 / 16942、PCT出願公開US 96 / 06763、PCT出願公開WO 95 / 08644、PCT出願公開WO 96 / 06946、PCT出願公開WO 96 / 33411、PCT出願公開WO 87 / 06706、PCT出願公開WO 96 / 39534、PCT出願公開WO 96 / 41175、PCT出願公開WO 96 / 40978、PCT / US 97 / 03653および米国特許出願第08 / 437,348号(米国特許第5,679,519号)が参照される。また、Knight, et al. (Analyst, 1994, 119: 879-890)によるECLの分析上の応用の1994年の総説および該総説に引用されている参考文献も参照される。一実施形態では、本明細書による方法は、電気化学発光標識を使用して実施される。

10

## 【0074】

近年、イリジウム系ECL標識も説明されている(WO 2012107419(A1))。

## 【0075】

一実施形態では、直接敵に検出可能な標識は、化学発光標識または電気化学発光標識である。標識によって生成された光は、測定され、直接的にまたは間接的に分析物の存在または量を示す。

## 【0076】

放射性標識は、放射性同位体(放射性核種)、例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Gn}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、または $^{131}\text{Bi}$ を採用する。

20

## 【0077】

(d)撮像および治療目的のための標識として適切な金属キレート錯体は当技術分野で周知である(米国特許出願第2010/0111856、米国特許第5,342,606号、米国特許第5,428,155号、米国特許第5,316,757号、米国特許第5,480,990号、米国特許第5,462,725号、米国特許第5,428,139号、米国特許第5,385,893号、米国特許第5,739,294号、米国特許第5,750,660号、米国特許第5,834,456号、Hnatowich et al, J. Immunol. Methods 65(1983)147-157、Meares et al, Anal. Biochem. 142(1984)68-78、Mirzadeh et al, Bioconjugate Chem. 1(1990)59-65、Meares et al, J. Cancer(1990), Suppl. 10: 21-26、Izard et al, Bioconjugate Chem. 3(1992)346-350、Nikula et al, Nucl. Med. Biol. 22(1995)387-90、Camera et al, Nucl. Med. Biol. 20(1993)955-62、Kukis et al, J. Nucl. Med. 39(1998)2105-2110、Verel et al., J. Nucl. Med. 44(2003)1663-1670、Camera et al, J. Nucl. Med. 21(1994)640-646、Ruegg et al, Cancer Res. 50(1990)4221-4226、Verel et al, J. Nucl. Med. 44(2003)1663-1670、Lee et al, Cancer Res. 61(2001)4474-4482、Mitchell, et al, J. Nucl. Med. 44(2003)1105-1112、Kobayashi et al Bioconjugate Chem. 10(1999)103-111、Miederer et al, J. Nucl. Med. 45(2004)129-137、DeNardo et al, Clinical Cancer Research 4(1998)2483-90、Blend et al, Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18(2003)355-363、Nikula et al J. Nucl. Med. 4

30

40

50

0 ( 1 9 9 9 ) 1 6 6 - 7 6、K o b a y a s h i e t a l , J . N u c l . M e d . 3 9 ( 1 9 9 8 ) 8 2 9 - 3 6、M a r d i r o s s i a n e t a l , N u c l . M e d . B i o l . 2 0 ( 1 9 9 3 ) 6 5 - 7 4、R o s e l l i e t a l , C a n c e r B i o t h e r a p y & R a d i o p h a r m a c e u t i c a l s , 1 4 ( 1 9 9 9 ) 2 0 9 - 2 0 )。

【 0 0 7 8 】

実施例の節において使用した免疫検定法では、まだ公には入手可能ではない新たに開発された抗体をいくつか採用しており、それゆえ、以下でいくらか詳細において説明されている。使用される抗体はいずれも、配列番号1のヒトチミジンキナーゼ1 ( h T K - 1 ) に特異的に結合する。

10

【 0 0 7 9 】

「特異的に結合する」(本明細書では「特異的に相互作用する」ともいう)という用語は、本発明に従って、抗体がhTK-1のみを特異的に結合するが、異なるタンパク質、特に、例えば、チミジンキナーゼ2 (配列番号5)などの類似の構造の異なるタンパク質とは交差反応しないか、または本質的に交差反応しないことを意味する。

【 0 0 8 0 】

抗体の特異度を分析することに対応する方法は、例えば、Harlow & Lane ( 1 9 8 8 ) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press、およびHarlow & Lane ( 1 9 9 9 ) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Pressにおいて説明されている。適切な研究の非限定的な例は、例えば、構造のおよび/または機能的に密接に関連する分子を用いた結合研究、ブロッキングおよび競合研究である。これらの研究は、例えば、FACS分析、フローサイトメトリー滴定分析 ( F A C S 滴定 )、表面プラズモン共鳴 ( S P R、例えば、BIAcore (登録商標)による)、等温滴定熱量測定 ( I T C )、蛍光滴定のような方法によって、または放射性標識リガンド結合アッセイによって実施することができる。さらなる方法には、例えば、ウエスタンブロット、ELISA (競合ELISAを含む)検査、RIA検査、ECL検査、およびIRMA検査を含む。

20

【 0 0 8 1 】

本発明の文脈において、「抗体」という用語は、完全な免疫グロブリン分子、ならびにFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなどのその抗原結合フラグメントに関する。さらに、この用語は、改変および/または変化した抗体分子、ならびに組換えまたは合成で生成された/合成された抗体に関する。「抗体」という用語はまた、二機能性抗体、三機能性抗体、完全ヒト抗体、キメラ抗体、および一本鎖Fv ( s c F v ) または抗体融合タンパク質のような抗体コンストラクトを含む。

30

【 0 0 8 2 】

本明細書で使用される「Fabフラグメント」は、1つの軽鎖と、1つの重鎖のC<sub>H</sub>1および可変領域から構成される。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することはできない。「Fab'フラグメント」は、V<sub>H</sub>ドメインおよびC<sub>H</sub>1ドメイン、ならびにC<sub>H</sub>1ドメインとC<sub>H</sub>2ドメインの間の領域も含有し、それにより、2つのFab'フラグメントの2つの重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合を形成して、F(ab')<sub>2</sub>分子を形成することができるようにする、1つの軽鎖と1つの重鎖の一部とを含有する。「F(ab')<sub>2</sub>フラグメント」は、C<sub>H</sub>1ドメインとC<sub>H</sub>2ドメインの間の定常領域の一部を含有する2つの軽鎖と2つの重鎖とを含有しており、それにより2つの重鎖間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、2つの重鎖間のジスルフィド結合によって結合している2つのFab'フラグメントから構成される。

40

【 0 0 8 3 】

Fab/cフラグメントは、Fc決定基およびFab決定基の両方を含有しており、「

50

Fc」領域は、抗体のC<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3ドメインを含む2つの重鎖フラグメントを含有する。2つの重鎖フラグメントは、2つ以上のジスルフィド結合とC<sub>H</sub>3ドメインの疎水性相互作用とによって結合している。

【0084】

「Fv領域」は、重鎖および軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠いている。「一本鎖Fv」(「scFv」とも略される)は、本発明の文脈において、抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを有する抗体フラグメントであり、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。概して、scFvポリペプチドは、scFvによって抗原結合のための所望の構造を形成することができるV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含む。一本鎖抗体の産生について説明されている技術は、

10

例えば、Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Rosenberg and Moore編, Springer-Verlag, N.Y. 113 (1994), 269-315において説明されている。

【0085】

「キメラ抗体」という用語は、ヒトまたは非ヒト種の可変領域が、ヒトまたは非ヒト(例えば、マウス、ウマ、ウサギ、イヌ、ウシ、ニワトリ)のいずれかの別の種からの抗体領域(例えば、定常領域)に融合したまたはキメラ化したものを含む抗体を指す。

【0086】

先に記載したように、「抗体」という用語はまた、抗体が、特定のアミノ酸配列によって本明細書に定義するドメインに加えて、組換え生成したコンストラクトの単離および/または調製のための追加のドメイン(複数可)を含む、抗体融合タンパク質などの抗体コンストラクトも包含する。

20

【0087】

抗体は、それが組換え抗体、例えば組換えウサギ抗体、またはヘテロハイブリッド抗体でありながら、本発明で開示および定義されるCDRを含むように作製することができる。

【0088】

「組換え抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離されたすべての抗体を含む。組換え抗体は、例えば、B細胞PCRによって得られた抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物(例えば、マウス)から単離された抗体、宿主細胞内へトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現させた抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングすることを包含するいずれかの他の手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体である。B細胞PCRによって作製された組換えウサギ抗体は、ウサギ生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域と定常領域(存在する場合)とを有している。すなわち、B細胞PCRの直接の結果は、抗体の結合関連フラグメントであり、当業者は、例えば、全長抗体、キメラ抗体と解釈されるものはどんなものであれ、または所望される/必要とされる「抗体」はどんなものであれ、何の問題もない。

30

【0089】

1つのモノクローナル抗体であるMAB 6C6は、免疫検定法を介してタンパク質レベルでTK-1を測定するための非常に魅力的なツールであることがわかっている。MAB 6C6は、配列番号3の重鎖可変ドメインと配列番号4の軽鎖可変ドメインとを特徴とする。先に記載したように、一実施形態では、例えば、実施例の節において示されるように、TK-1レベルの測定のための免疫検定法において採用される抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号3の可変重鎖(vHC)と配列番号4の可変軽鎖(vLC)とを含む抗体と同じエピトープに結合する。

40

【0090】

配列番号3の可変重鎖(vHC)と配列番号4の可変軽鎖(vLC)とを含む抗体と同じエピトープに結合するいずれかのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント

50

は、TK-1の測定のための免疫検定法において採用されることができる。このような抗体、および同じ結合特性を有するいずれかの抗体は、例えば、所与の特定の抗体の変異体であることができ、例えば、アミノ酸置換を含むことができるか、あるいは、異なるVHCまたは異なるVLC、あるいはその両方を有することができる。

【0091】

本発明に従った「置換」という用語は、アミノ酸を別のアミノ酸と置き換えることを指す。したがって、アミノ酸の総数は同じままである。ある特定の位置でのアミノ酸の欠失および異なる位置での1つ（または複数）のアミノ酸の導入は、「置換」という用語に明示的に包含されるものではない。本発明に従った置換は、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換であってよい。「保存的アミノ酸置換」という用語は当技術分野で周知であり、アミノ酸の、類似の構造特性および/または化学特性を有する異なるアミノ酸との置き換えを指す。このような類似性には、例えば、関与する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性の性質における類似性を含む。次の基の1つのうちのあるアミノ酸が、同じ基の別のアミノ酸によって置換された場合、保存的アミノ酸置換である。非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれ、極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれ、正に帯電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれ、負に帯電した（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。

【0092】

抗体の「結合親和性」は、次式により、標的抗原上のエピトープと抗体の結合部位との間の相互作用の強度を測定する。

$$KD = k_d / k_a$$

式中、

$$KD = \text{解離平衡定数} [M]$$

$$k_d = \text{解離速度定数} [s^{-1}]$$

$$k_a = \text{会合速度定数} [M^{-1} \cdot s^{-1}]$$

【0093】

抗体の結合親和性についてのさらに関連するパラメータは次のとおりである。

$$t / 2 = \text{解離複合体半減期} = \ln 2 / k_d / 60 \text{ [分]}$$

$$R_{max} = \text{分析物の最大応答値} [RU]$$

$$MR : \text{モル比} = \text{分析物の最大応答比} (R_{max})$$

【0094】

一実施形態では、PIを決定するためのTK-1レベルの免疫学的検出に使用されるhTK-1に対するモノクローナル抗体は、37で10分以上のt/2解離定数でhTK-1に結合する。

【0095】

hTK-1上の同じエピトープに結合する抗体は、配列番号3の重鎖可変ドメインと配列番号4の軽鎖可変ドメインとを有する抗体と、hTK-1への結合について競合する抗体である。

【0096】

このような競合抗体は、モノクローナルウサギ抗体MAB 6C6、すなわち、標準的なhTK-1結合アッセイにおいて配列番号3の重鎖可変ドメインと配列番号4の軽鎖可変ドメインとを含む抗体と競合する能力に基づいて同定することができる。例えば、BIACore分析、ELISAアッセイまたはフローサイトメトリーを使用して、配列番号3の重鎖可変ドメインと配列番号4の軽鎖可変ドメインとを有するモノクローナル抗体またはその結合フラグメントとの競合を実証することができる。

【0097】

モノクローナルウサギ抗体MAB 6C6のヒトTK-1への結合を阻害する検査抗体

の能力は、モノクローナルウサギ抗体M A B 6 C 6とh T K - 1上での同じエピトープへの結合についてモノクローナルウサギ抗体M A B 6 C 6と競合することができ、したがって、該エピトープに結合することを実証している。

【0098】

記載したように、いくつかの異なる競合アッセイを使用して、配列番号3の重鎖可変ドメインと配列番号4の軽鎖可変ドメインとを有するその結合フラグメントについてウサギモノクローナル抗体M A B 6 C 6と競合する抗体を同定することができる。

【0099】

例示的な競合アッセイでは、固定したh T K - 1を、h T K - 1に結合する第1の標識抗体（例えば、抗h T K - 1モノクローナル抗体または配列番号3の重鎖可変ドメインと配列番号4の軽鎖可変ドメインとを有するその結合フラグメント）と、h T K - 1への結合について第1の抗体と競合する能力について検査されている第2の非標識抗体とを含む溶液中でインキュベートする。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在し得る。対照として、固定したh T K - 1を、第1の標識抗体を含むが第2の非標識抗体を含まない溶液中でインキュベートする。h T K - 1への第1の抗体の結合を許容する条件下でのインキュベーション後に、結合していない過剰な抗体を除去し、固定したh T K - 1と会合した標識の量を測定する。固定したh T K - 1と関係する標識の量が、対照試料と比較して検査試料中で実質的に低減した場合、そのことは、第2の抗体がh T K - 1への結合について第1の抗体と競合していることを示す。例えば、Harlow et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988)を参照されたい。

【0100】

抗体、例えば抗h T K - 1抗体の結合特性は、Biacore技術が同義語となった表面プラズモン共鳴分光法のようなリアルタイムのバイオセンサー系分子相互作用測定を介して最も良好に決定される。Biacoreシステムでは、抗体を同じエピトープへの競合的結合について（すなわち、同一のエピトープまたは重複するエピトープへの結合について）分析することもできる。実験の詳細を実施例3に与える。一実施形態では、本明細書で同定される立体配座依存性エピトープに結合させるための抗体を特徴付けるための競合実験は、実施例の節において説明されるように、B I A c o r e機で行われる。

【0101】

従来技術では、通常、血清または血漿の試料は、四量体でかつ酵素として非常に活性のある形態のh T K - 1を生成するために前処理される。試料の前処理およびこのような前処理された試料からのh T K - 1の測定は、非常に魅力的な方法であり、この方法により、例えば、h T K - 1酵素活性との非常に良い相関を達成することができる。

【0102】

適切な前処理試薬の選択は、完全に当業者の能力の範囲内である。このような前処理試薬は、オリゴマーのh T K - 1を四量体のh T K - 1に変換するために、少なくとも還元剤を含むであろう。説明されているように、例えば、Sharif et al., (*BMC Biochemistry* (2012), 13:12)によると、ゲル濾過実験を介して、還元剤が有効であったかどうか、およびh T K - 1が、処理後に、主に四量体として存在するかどうかを評価するのは容易である。当業者にとって、いくつかの異なる還元試薬、例えば、ジチオトレイトール(DTT)、ジチオエリトール(DTE)、またはジチオブチルアミン(DTBA)が危機に瀕している。加えて、前処理試薬の濃度は、適切なインキュベーション時間後または希釈ステップ後のいずれかで、h T K - 1タンパク質を測定するのに使用される抗体に負の影響を及ぼさないように選択される。ジチオブチルアミン(DTBA)を還元剤として使用する場合、試料前処理ステップ(試料と前処理試薬との混合物)の適切な終濃度は、5 mMの範囲内である。前希釈、および/もしくはDTTを遮断する薬剤の添加後、ならびに/または一次抗体を含む緩衝液を用いて希釈することにより、酸化形態のDTTの濃度は、好ましくは1.5 mM以下である。このように

10

20

30

40

50

、使用される免疫学的試薬のいずれにも還元剤の影響はない。

【0103】

先に説明したように、ATPは、hTK-1の四量体形態を安定化する。ATPの後者の機能は、例えば、前処理緩衝液に対する魅力的な助剤にする。一実施形態では、前処理緩衝液は、先に考察したような還元剤とATPとを含む。試料の前処理ステップにおけるATPの濃度は、1.25mMを下回らないものとする。前処理ステップにおけるATP濃度についての適切な選択は、2mM~20mMの範囲になるであろう。

【0104】

与えられた実施例から明らかなように、TK-1のレベルについての値は、DLBCL患者についての予後指標の決定に非常に有用である。一実施形態では、本開示は、DLBCL患者の予後指標の決定におけるTK-1のレベルについての値の使用に関する。

10

【0105】

一実施形態では、本開示は、先に詳細に説明した3つのPIのいずれかの標準的なパラメータ(構成要素)と組み合わせられたチミジンキナーゼ1のレベルについての値を含む、DLBCLについての予後指標(PI)に関する。

【0106】

一実施形態では、本発明は、該予後指標を決定する際に、DLBCL患者についての予後指標の他の標準的なパラメータと組み合わせた、TK-1のレベルについての値の使用に関する。一実施形態では、本開示は、DLBCL患者についての予後指標の決定におけるTK-1の使用に関するものであり、TK-1のレベルについての値は、IPI、年齢調整IPI、R-IPI、またはNCCN-IPIにおいて使用される他のパラメータと組み合わせられる。一実施形態では、本開示は、DLBCL患者についての予後指標の決定におけるTK-1の使用に関するものであり、TK-1のレベルについての値は、R-IPI、またはNCCN-IPIにおいて使用される他のパラメータと組み合わせられる。

20

【0107】

一実施形態では、TK-1のレベルについての値は、TK-1のレベルについての値が、このようなPIにおけるLDHのレベルについての値を置換するために使用されることを条件として使用される。

【0108】

いかなる患者についても、特に最近DLBCLと診断された患者については、TK-1を測定し、あらかじめ定義されたカットオフ値と比較し得る。新たに診断された患者についての測定値が、あらかじめ規定されたカットオフ値を上回る場合、該患者は、より高い危険スコアを有し、好ましくない疾患転帰を経験する可能性が高いと見なされるであろう。

30

【0109】

一実施形態では、本開示は、チミジンキナーゼ1のレベルについての値を含む、DLBCLについての予後指標(PI)に関する。

【0110】

一実施形態では、本開示は、チミジンキナーゼ1のレベルについての値を含むDLBCLについての予後指標(PI)に関するものであり、ここで、該PIは、IPI、年齢調整済みIPI、R-IPI、またはNCCN-IPIから選択される。一実施形態では、本開示は、チミジンキナーゼ1のレベルについての値を含むDLBCLの予後指標(PI)に関するものであり、ここで、該PIは、R-IPI、またはNCCN-IPIから選択される。

40

【0111】

これらおよび他の実施形態は、本発明の明細書および実施例によって開示され、包含される。本発明に従って採用されるべき方法、使用、および化合物のいずれか1つに関するさらなる文献は、例えば、電子デバイスを使用して、公共の図書館およびデータベースから検索することができる。例えば、インターネット上で利用可能な公共データベース「Medline」は、例えば、ワールドワイドウェブのncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.htmlで利用することができる。ncbi.nlm

50

.nih.gov / fini.ch / biology / research\_tools .html , tigr.org / など、ワールドワイドウェブにおいて利用可能なさらなるデータベースおよびアドレスは、当業者に公知でありまた、lycos.comの下でワールドワイドウェブにおけるアドレスを用いて入手することもできる。

【0112】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。矛盾する場合は、定義を含む特許明細書が優先される。

【0113】

本明細書で提供されるすべてのアミノ酸配列は、当技術分野で慣習的に行われるように、最もN末端の残基で始まり、最もC末端の残基で終わり(N C)、本発明のいたるところでアミノ酸を同定するために使用される1文字または3文字のコード略語は、アミノ酸について一般的に使用されるものに対応する。

10

【0114】

以下の実施形態、および本明細書に説明されているその他の実施形態が企図されている。本発明は、実施形態の一覧表によって制限されることを意図しておらず、本明細書のいずれかの部分によって適切に支持されるいずれかの実施形態は、本出願において、またはその後の訴追もしくは継続/分割実施中のいずれかにおいて請求の対象となる。

【0115】

1. びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)患者の予後指標(PI)(危険スコアまたはPIスコアとも呼ばれる)を決定する方法の第1の実施形態であって、該方法は、

20

a) 少なくとも次のパラメータ、すなわち

i) 節外性疾患の状態、ii) Ann Arbor病期、およびiii) チミジンキナーゼ1のレベル

を決定することであって、

節外性疾患の非存在を0点の値とし、節外性疾患の存在を1点の値とし、

IまたはIIのAnn Arbor病期を0点の値とし、IIIまたはIVのAnn Arbor病期を1点の値とし、かつ

カットオフ以下のチミジンキナーゼのレベルを0点の値とし、カットオフを上回るチミジンキナーゼのレベルを少なくとも1点の値とする、決定することと、

30

b) PIの決定において、i)、ii)、およびiii)に対する値を合計することとを含む方法に関する。

【0116】

2. チミジンキナーゼカットオフ値レベルが、健常個体において決定されるようなTK-1レベルの平均値の4倍に設定され、カットオフ以下のチミジンキナーゼレベルを0点の値とし、かつカットオフ値を上回るいかなるTK-1レベルも1点の値とする、実施形態1の方法。

【0117】

3. チミジンキナーゼカットオフレベルが、健常個体において決定されるようなTK-1レベルの平均値の4倍に設定され、低いチミジンキナーゼレベル、すなわちカットオフ以下のTK-1のレベルを0点の値とし、中間チミジンキナーゼレベル、すなわちカットオフを上回りかつ健常個体において決定されるような平均値の20倍に相当する値以下のTK-1のレベルを1点の値とし、かつ高チミジンキナーゼレベル、すなわち、健常個体において決定されるような平均値の20倍を超えるTK-1のレベルを2点の値とする、実施形態1の方法。

40

【0118】

4. TK-1についてのタンパク質レベルのカットオフが、TK-1酵素活性における18U/lと同等であり、かつこれを含む、実施形態1の方法。

【0119】

50

5. タンパク質レベルのカットオフが 18 U/l と同等であり、かつこれを含んでおり、また 18 U/l を上回り、かつ 88 U/l 以下の TK-1 のレベルを 1 点の値とし、また 88 U/l を上回る TK-1 のレベルを 2 点の値とする、実施形態 1 の方法。

【0120】

6. 年齢というパラメータをさらに含み、PI の決定において、年齢がカットオフ値を下回る場合、値は 0 点であり、年齢がカットオフ値を上回る場合、値は 1 点である、実施形態 1 ~ 5 の方法。

【0121】

7. PI の決定において、年齢が 60 以下の場合、値が 0 点であり、年齢が 60 を超える場合、値が 1 点である、実施形態 6 に記載の方法。

10

【0122】

8. ECOG パフォーマンスステータスというパラメータをさらに含み、PI の決定において、ECOG パフォーマンスステータスが 1 以下の場合、値が 0 点であり、ECOG パフォーマンスステータスが 2 以上の場合、値が 1 点である、実施形態 1 ~ 5 に記載の方法。

【0123】

9. 年齢というパラメータおよび ECOG パフォーマンスステータスというパラメータをさらに含み、PI の決定において、年齢が 60 以下の場合、値が 0 点であり、年齢が 60 を超える場合、値が 1 点であり、PI の決定において、ECOG パフォーマンスステータスが 1 以下の場合、値が 0 点であり、ECOG パフォーマンスステータスが 2 以上の場合、値が 1 点である、実施形態 1 ~ 5 に記載の方法。

20

【0124】

10. 年齢というパラメータおよび ECOG パフォーマンスステータスというパラメータをさらに含み、PI の決定において、年齢が 40 以下の場合、値が 0 点であり、年齢が 40 を超えかつ 60 以下の場合、値が 1 点であり、年齢が 60 を超えかつ 75 以下の場合、値が 2 点であり、年齢が 75 を超える場合、値が 3 点であり、かつ PI の決定において、ECOG パフォーマンスステータスが 1 以下の場合、PI の決定において値が 0 点であり、ECOG パフォーマンスステータスが 2 以上の場合、値が 1 点である、実施形態 1 ~ 5 に記載の方法。

【0125】

11. DLBC L 患者についての予後指標の決定における TK-1 のレベルについての値の使用である、実施形態。

30

【0126】

12. TK-1 のレベルについての値が、IPI、年齢調整された IPI、R-IPI、または NCCN-IPI において使用されるようなその他のパラメータと組み合わせられる、実施形態 11 による使用。

【0127】

13. TK-1 のレベルの値が、このような PI における LDH のレベルについての値を置換するために使用されることを条件とする、実施形態 11 または 12 に記載の使用。

【0128】

14. チミジンキナーゼ 1 のレベルについての値を含む DLBC L についての予後指標 (PI) である、実施形態。

40

【0129】

15. 該 PI が、IPI、年齢調整された IPI、R-IPI、または NCCN-IPI から選択される、実施形態 14 の予後指標 (PI)。

【0130】

本明細書、特に特許請求の範囲において特徴付けられる実施形態に関して、従属請求項において言及される各実施形態は、該従属請求項が依存する各請求項 (独立または従属) の各実施形態と組み合わせられることが企図される。例えば、3 つの代替案 A、B および C を列挙する独立請求項 1、3 つの代替案 D、E および F を列挙する従属請求項 2、ならび

50

に請求項 1 および 2 に依存し、3つの代替案 G、H および I を列挙する請求項 3 の場合、本明細書は、別段の具体的な記載がない限り、組み合わせ A、D、G；A、D、H；A、D、I；A、E、G；A、E、H；A、E、I；A、F、G；A、F、H；A、F、I；B、D、G；B、D、H；B、D、I；B、E、G；B、E、H；B、E、I；B、F、G；B、F、H；B、F、I；C、D、G；C、D、H；C、D、I；C、E、G；C、E、H；C、E、I；C、F、G；C、F、H；C、F、I に対応する実施形態を明確に開示していることは理解されたい。

【0131】

同様に、また、独立請求項および/または従属請求項が代替案を列挙していない場合、従属請求項が複数の先行請求項を参照している場合、それによって網羅される主題のいずれかの組み合わせが明示的に開示されていると見なされることは理解される。例えば、独立請求項 1、請求項 1 を参照する従属請求項 2、および請求項 2 および 1 の両方を参照する従属請求項 3 の場合、請求項 3 および 1 の主題の組み合わせが、請求項 3、2 および 1 の主題の組み合わせと同様に、明確かつ明瞭に開示されていることが後に続く。請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項を指すさらなる従属請求項 4 が存在する場合、請求項 4 および 1、請求項 4、2 および 1、請求項 4、3 および 1、ならびに請求項 4、3、2 および 1 の主題の組み合わせは、明確かつ明瞭に開示されていることが後に続く。

10

【0132】

先の考慮は、添付の特許請求全部に対して必要な変更を加えて適用される。非限定的な例を与えるために、請求項 8、5、および 1 の組み合わせは、請求項構造の観点から明確かつ明瞭に想定されている。同じことが、例えば、請求項 8、7 および 2 などの組み合わせに当てはまる。

20

【実施例】

【0133】

(実施例)

以下の実施例は、本発明を説明する。

【0134】

実施例 1：材料および一般的な方法

タンパク質化学および標識技術

標準的なタンパク質化学および標識技術は、例えば、Hermanson, G. "Bioconjugate Techniques" 3rd Edition (2013) Academic Press において提供されている。

30

【0135】

生物情報学

生物情報学の方法は、例えば、Keith J. M. (編) "Bioinformatics" Vol. I および Vol. II, Methods in Molecular Biology Vol. 1525 および Vol. 1526 (2017) Springer において、ならびに Martin, A. C. R. & Allen, J. "Bioinformatics Tools for Analysis of Antibodies" in: Dubel S. & Reichert J. M. (編) "Elandbook of Therapeutic Antibodies" Wiley-VCH (2014) において提供されている。

40

【0136】

電気化学発光免疫検定法

免疫検定法および関連する方法は、例えば、Wild D. (編) "The Immunoassay Handbook" 4th Edition (2013) Elsevier において提供されている。電気化学発光標識としてのルテニウム錯体は、例えば、Staffilani M. et al. Inorg. Chem. 42 (2003) 7789-7798 において提供されている。通常、電気化学発光 (ECL) 系免疫検定法の性能について、Electsys 2010 分析装置または後継システムを使用し、例えば、E17

50

0、コーバス e 6 0 1 モジュール、コーバス e 6 0 2 モジュール、コーバス e 8 0 1 モジュールおよびコーバス e 4 1 1 などの Roche 分析装置 ( Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany )、ならびにこれらの分析装置に指定される Roche Elecsys アッセイとし、特に明記されていない場合、標準条件下で各々使用した。

【 0 1 3 7 】

( 実施例 2 ) : 抗 hTK - 1 抗体

hTK - 1、クローン 6 C 6、重鎖 : ( 配列番号 3 )

METGLRWL L L VAVLKGVCQEQLEESGGDLVKPEGS L T L  
TCTASRFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWIA CIYAGDSGSS  
YYASWAKGRFTVSKTSSTTVTLQTTS LTAADTATYFCARA  
SVGAAYDYFALWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDT  
PSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSG

10

【 0 1 3 8 】

hTK - 1、クローン 6 C 6、軽鎖 : ( 配列番号 4 )

MDTRAPTQLLGLLL L WLPGARCALVMTQTPASVEAAMGG  
TVT IKCQASEDVSSHLAWYQQRPGQP PKLLIYGASDLASG  
VPSRFTGSGSGTQFTLAISDLECADAAATY YCQGY Y I S D S  
PYVFGGGTEVVVKGDPVAPT V L I F P P A A D Q V A T G T V T I V C  
VANKYFPDVTVTWEVDGTTQT T G I E N S K T P Q N S A D C T Y N L  
SSTLTLTSTQYN SHKEYTCKVTQGTTSVVQS FNRGDC

20

【 0 1 3 9 】

hTK - 1、クローン 4 H 4、重鎖 : ( 配列番号 7 )

METGLRWL L L VAVLKGVCQSLEESGGGLVQPEGS L T L T  
CTASGF S F S S G Y D M C W V R Q T P G K G L E W I A C I S V D S D G V T Y  
YASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTS LTAADTATYFCARGY  
ESSSGVYIPYFTLWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCG  
DTPSSTVTLGCLVKGYLPEP V T V T W N S G

【 0 1 4 0 】

hTK - 1、クローン 4 H 4、軽鎖 : ( 配列番号 8 )

MDMRAPTQLLGLLL L WLPGARCADIVLTQTPASVEAAVGG  
GTVT IKCQASQSIYSYLA WYQH K P G Q P P K L L I Y K A S T L A S  
GVP S R F K G S G S G T E Y T L T I S D L E C A D A A T Y Y C Q H Y Y S S T  
SGGGVFGGGTEVVVKGDPVAPT V L I F P P A A D Q V A T G T V T I  
VCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQT T G I E N S K T P Q N S A D C T Y  
NLSSTLTLTSTQYN SHKEYTCKVTQGTTSVVQS FNRGDC

30

【 0 1 4 1 】

hTK - 1、クローン 2 3 C 1 1、重鎖 : ( 配列番号 9 )。

METGLRWL L L VAVLKGVCQSLEESGGRLVTPGTPLTLT  
CTASGFSLSNYMSWVRQAPGKGLEWIGI I YGDDNTYCAN  
WTKGRFTISKTSSTVDLITSP T T S T E D T A T Y F C A R G P D Y  
IAAKMDIWGPGLVTVSLGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSST  
VTLGCLVKGYLPEP V T V T W N S G

40

【 0 1 4 2 】

hTK - 1、クローン 2 3 C 1 1、軽鎖 : ( 配列番号 1 0 )

MDTRAPTQLLGLLL L WLPGARCDVVM T Q T P A S V E A A V G G  
TVT IKCQASQSIGYLSWYQKPGQRPKLLIYRASTLESG  
VPSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATY YCQCTYGSSTF  
SSYGNAFGGGTEVVVKGDPVAPT V L I F P P A A D Q V A T G T V T  
IVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQT T G I E N S K T P Q N S A D C T

50

Y N L S S T L T L T S T Q Y N S H K E Y T C K V T Q G T T S V V Q S F N R G D C  
【 0 1 4 3 】

明らかのように、完全長の免疫グロブリンまたはそのいずれかの結合フラグメント（所望の場合 / 必要な場合）は、先に開示した配列に基づいて、当業者によって容易に解釈することができる。

【 0 1 4 4 】

実施例 3 : : エピトープの特性評価

実施例 2 に説明したように、免疫検定法の開発において有用であることが必要とされる必要な結合特性を呈する示す 4 つの異なるモノクローナル抗体を生成することができた。

【 0 1 4 5 】

新たに生成された抗体が結合するエピトープを特徴付ける第 1 の試行では、P e p S c a n 分析を実行した。この分析のために、各々が 1 アミノ酸（1 ~ 1 5、2 ~ 1 6 など）だけ移行し、h T K - 1 の配列全体（配列番号 1）にまたがる、各々 1 5 アミノ酸からなる合成ペプチドを合成した。これらの P e p S c a n ペプチドを顕微鏡のスライドの上にスポットした。非特異的結合のためのブロッキングの後、さまざまな M A B の細胞培養上清を顕微鏡スライド上でインキュベートした。通常の方法により、結合していない M A B を洗い流し、H R P 標識ヤギ抗ウサギ I g G の使用によって、結合した M A B を検出した。

【 0 1 4 6 】

実施例 2 の方法によって得られた 4 つの M A B（抗体 4 H 1 1）のうちの 1 つだけが、線状エピトープと反応した。示され得るように、この抗体によって結合したエピトープは、h T K - 1 のアミノ酸残基 2 1 1 ~ 2 3 0 にまたがる配列（配列番号 6）に含まれる。

【 0 1 4 7 】

h T K - 1（配列番号 2）のアミノ酸 1 9 4 ~ 2 2 5 からなるポリペプチドに対応する合成ペプチドと反応するポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、先行技術において公知であり、例えば、W O 2 0 1 5 / 0 9 4 1 0 6 を参照されたい。3 つの M A B、すなわち 4 H 4、6 C 6、および 2 3 0 1 はそれぞれ、h T K - 1（配列番号 2）のアミノ酸 1 9 4 ~ 2 2 5 からなるポリペプチドに結合せず、検査した P e p S c a n ペプチドのいずれにも有意な結合を示さなかった。このことは、これら 3 つの M A B がすべて、h T K - 1 の立体配座依存性エピトープに結合することを示している。これら 3 つの M A B は当初から、さらなるアッセイ開発に非常に有望であるように見えたので、これら 3 つの M A B が結合するエピトープに関する知識を深めるために追加の努力が払われた。

【 0 1 4 8 】

競合実験によるエピトープの特性評価を、2 5 での G E H e a l t h c a r e B i a c o r e 4 0 0 0 において実行した。B i a c o r e ビオチン捕捉キット、シリーズ S センサー（カタログ番号 2 8 - 9 2 0 2 - 3 4）を機器に据え付け、製造元の説明書により、流体力学的にアドレス指定し、事前調整した。システム緩衝液は、H B S - N（1 0 m M H E P E S p H 7 . 4、1 5 0 m M N a C l）とした。試料緩衝液は、システム緩衝液とした。製造元 G E H e a l t h c a r e が提供するビオチン捕捉試薬をシステム緩衝液中で 1 : 5 0 希釈し、フローセル 1、2、3 および 4 に 1 0 μ l / 分で 6 0 秒間注入して、スポット 1、2 および 4、5 を処理した。スポット 3 は、基準として機能した。1 0 n M のビオチン化一次抗体を 3 0 μ l / 分で 1 2 0 秒間の接触時間で注入し、4 つのフローセルすべてにおいてスポット 1 およびスポット 5 を処理した。スポット 2 およびスポット 4 は対照として機能した。1 0 n M のヒト組換えチミジンキナーゼ 1（h T K - 1、R o c h e、1 1 4 k D a、四量体）を 3 0 μ l / 分ですべてのフローセルに 1 8 0 秒間の接触時間注入して、スポット 1、2 および 4、5 を処理した。一次抗体の残りの接近可能なエピトープをブロックするために、1 0 0 n M の非ビオチン化一次抗体を再び 3 0 μ l / 分で注入して、すべてのフローセルのスポット 1、2 および 4、5 を 1 8 0 秒間処理した。1 0 0 n M の二次抗体を 3 0 μ l / 分で 1 8 0 秒間の接触時間ですべてのフローセル内に注入し、スポット 1、2 および 4、5 を処理した。最後に、センサー表面上に形成された複合体を、製造元の G E H e a l t h c a r e が提供する再生溶液を使用

10

20

30

40

50

して、すべてのフローセルおよびすべてのスポットで120秒間の接触時間の再生ステップによって完全に除去した。

【0149】

このようにして、4つの組換えモノクローナルウサギIgG抗体について、hTK-1 エピトープの接近可能性特性を調べた。抗体4H11 (hTK-1およびウサギMAB 23C11、6C6および4H4のアミノ酸211~230 (配列番号6)に含まれるエピトープに結合する抗体)。

【0150】

各試料注入の前後に、レポートポイントを設定した。応答ユニット(RU)におけるレポートポイントの読み出しを、Biacore Evaluation第1.1版ソフトウェアを用いることによって行った。

10

【0151】

最初のビオチン化一次抗体捕捉シグナル(bi-Ab1、[RU])に、非ビオチン化一次抗体(ブロックAb1 [RU])の第2の結合応答シグナルを追加した。モル比エピトープ接近可能性 $MR_{EA} = Ab2 [RU] / (bi-Ab1 [RU] + ブロックAb1 [RU])$ を計算し、アッセイで使用したそれぞれの抗体のエピトープ接近可能性についての推定値として使用した。

【0152】

hTK分析物の四量体状態を検証するために、式 $MR = hTK [RU] / bi-Ab1 [RU] \times 分子量 bi-Ab1 (150 kDa) / 分子量 hTK (114 kDa)$ を用いることによって、ビオチン化一次抗体の捕捉レベルに対するhTK結合シグナルから第2のモル比を計算した。

20

【0153】

例えば、抗体4H11は、1:1の結合化学量論 (=モル比) 抗体4H11/hTK-1 MRを示した。このバイオセンサーアッセイでは、単一の四量体hTK-1分子が単一の抗体4H11分子に結合している。説明されている抗体のうち、ブロックAbとして使用すると、抗体4H11のみが相同のhTK-1複合体形成を示す。それゆえ、サンドイッチアッセイは、抗体4H11を2回使用する逐次アッセイプロトコルを使用することによって可能になるであろう。ウサギモノクローナル抗体MAB 23C11、6C6、および4H4については、相同複合体の形成は検出することができなかった。このことは、MAB 23C11、6C6、および4H4が、同じエピトープ領域に結合していることを意味する。抗体23C11、6C6および4H4は、二次抗体として抗体4H11とサンドイッチを形成する。このアッセイによると、最高性能のサンドイッチ対とは、ビオチン化一次抗体としての6C6であり、抗体4H11と複合体を形成し、モル比 $MR_{EA} = 0.4$ を示し、これは、hTK分析物で40%のエピトープ接近可能性を意味する。

30

【0154】

以下に示す表から明らかのように、抗体4H11 (配列番号6に含まれるC末端線状エピトープに結合する)は、23C11、6C6および4H4と免疫複合体を形成することができる。一方、ウサギモノクローナル抗体MAB 23C11、6C6、および4H4が同じエピトープを共有していることは明らかである (以下の表3を参照されたい)。

40

## 【表 3】

表 3 : エピトープ接近可能性マトリックス

ビオチン化一次抗体	二次抗体			
	4 H 1 1 I g G	2 3 C 1 1 I g G	6 C 6 I g G	4 H 4 I g G
4 H 1 1 I g G	0 . 1	0 . 1	0 . 1	0 . 1
2 3 C 1 1 I g G	0 . 2	0 . 0	0 . 0	0 . 0
6 C 6 I g G	0 . 4	0 . 0	0 . 0	0 . 0
4 H 4 I g G	0 . 2	0 . 0	0 . 0	0 . 0

## 【 0 1 5 5 】

溶液中の分析物として組換え h - T K - 1 を使用した 4 つの抗 h T K - 1 抗体のサンドイッチ形成が示されている。表の 0 . 0 の値は、使用した一次および二次抗体が同じエピトープに結合することを示す。0 . 1 以上の値は、中間のプロッキングステップにもかかわらず、サンドイッチ形成を示し、すなわち、研究した 2 つの抗体は、異なるエピトープに結合する。

## 【 0 1 5 6 】

実施例 4 : E l e c s y s 免疫検定法実験で使用するための M A B 複合体の生成

使用される手順は、当業者が精通している。それゆえ、実験の詳細を与えることは冗長であると見なされる。

## 【 0 1 5 7 】

手短に言えば、免疫学的アッセイの捕捉側および検出側のための抗体複合体を得るために、次の手順 / ステップを実施した。

## 【 0 1 5 8 】

B 細胞 P C R により作製した細胞 ( 上述を参照されたい ) から得られた細胞培養上清 ( そこに含まれる組換え抗体 ) を出発材料として使用した。

## 【 0 1 5 9 】

組織培養上清中に含まれる組換え抗体を、プロテイン A に対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

## 【 0 1 6 0 】

捕捉抗体として使用される抗体を、ペプシンで F ( a b ' ) 2 フラグメントに開裂させ、F ( a b ' ) 2 フラグメントをアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーとによってさらに精製した。次に、F ( a b ' ) 2 フラグメントを F a b ' に還元し、チオール化学的性質を介して部位特異的にビオチン化することにより、モノビオチン化 F a b ' フラグメントを得た。

## 【 0 1 6 1 】

検出抗体として使用される抗体を、スルホ - B P R u N H S エステル ( = 当技術分野でルテナート ( 2 - ) , ビス [ [ 2 , 2 ' - ビピリジン ] - 4 , 4 ' - ジメタンスルホナト ( 2 - ) - N <sup>1</sup> , N <sup>1</sup> ] [ 1 - [ 4 - ( 4 ' - メチル [ 2 , 2 ' - ビピリジン ] - 4 - イル - N <sup>1</sup> , N <sup>1</sup> ) - 1 - オキソプトキシ ] - 2 , 5 - ピロリジンジオン ] - , ナトリウム ( 1 : 2 ) , ( O C - 6 - 3 1 ) としても公知の C A S 登録番号 4 8 2 6 1 8 - 4 2 - 8 ) の使用によって、スルホ - ルテニウム ( W O 2 0 0 3 / 0 0 2 9 7 4 ) に化学的に結合させ、未結合の標識をサイズ除外クロマトグラフィーによって除去した。

## 【 0 1 6 2 】

実施例 5 : 試料および h T K - 1 測定

## 5 . 1 試料

「白黒」パネルを調査した。一方では、50人（一部の実験については49しかなおも入手できなかった）の健常ドナーからの血清試料が、さまざまなアッセイにおいてhTK-1の定量に使用されている。もう一方では、hTK-1は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）の患者からの48の試料（一部の実験では47しかなおも入手できなかった）において測定した。

【0163】

#### 5.2 原型の電気化学発光免疫検定法

実施例3において説明されるように得られたモノクローナルウサギ抗体に基づいて、それぞれ実施例4に説明されるように精製および結合させ、いくつかの原型免疫検定法が確立されている。

【0164】

原型の電気化学発光免疫検定法の典型的なセットアップは、ビオチン化捕捉抗体（またはその抗原結合フラグメント）およびルテニウム複合体で標識された検出抗体（またはその抗原結合フラグメント）を使用する。

【0165】

ほとんどの場合、免疫検定法データは、従来の手順により、ビオチン化した従来のFab'フラグメントを使用して生成した。Roche製のcobas（登録商標）E170分析装置でのサンドイッチアッセイフォーマットにおいて測定を実施した。cobas（登録商標）E170分析装置におけるシグナル検出は、電気化学発光に基づいている。このサンドイッチアッセイでは、ビオチン結合体（すなわち、捕捉抗体）を、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズの表面に固定する。検出抗体は、シグナル伝達部分として複合体化ルテニウムカチオンを有している。分析物の存在下で、発色性ルテニウム錯体を固相に架橋し、cobas（登録商標）E170分析装置の測定セルに含まれる白金電極で励起後、620nmで発光する。シグナル出力は、任意の光の単位である。

【0166】

測定は、例えば、HEK細胞からの組換えhTK-1でスパイクした較正物質、および先に述べたヒト血清試料を使用して実施した。

【0167】

実験的hTK-1アッセイは、次のように行った。25μlのヒト血清試料またはスパイクした較正物質、25μlの前処理試薬（10mM DTBAを含む）を混合し、9分間インキュベートし、その後、60μlの捕捉抗体-ビオチン複合体および60μlの検出抗体ルテニウム標識複合体をさらに9分間一緒にインキュベートした後、30μlのストレプトアビジンでコーティングした常磁性微粒子を添加した。最終混合物をさらに9分間インキュベートした。その後、hTK-1を通常通り検出した（すなわち、これらの実験において生成した電気化学発光シグナルを介して）。

【0168】

以下に、ビオチン化6C6（Fab'-Biとして使用）とルテニル化4H11（IgGとして使用）の組み合わせについて得られた結果を付与する。

【0169】

較正結果を、以下の表4に付与する。

10

20

30

40

50

## 【表 4】

表 4：免疫検定法原型による hTK-1 の測定

[hTK-1] (ng/mL)	TK-1：原型アッセイ 6C6 Fab'-Bi:4H11-IgG-subPRu		
	計数	濃度	分子量 <sup>濃度</sup>
0.0000	1837	0.0000	0.0000
	1826	0.0000	
1.00	30193	1.30	1.30
	30103	1.30	
5.00	105843	4.92	4.91
	105452	4.90	
10.0	198859	9.47	9.60
	204252	9.73	
100	1960303	99.5	100
	1994291	101	

## 【0170】

表 4 に、分析物としてさまざまな量の組換え hTK-1 を使用した原型免疫検定法において得られたシグナルを与える。二重測定を実行した。

## 【0171】

箱ひげ図を計算し、受信者操作者特性 (ROC) を分析し、曲線下面積 (AUC) を決定した。原型免疫検定法については、AUC は 0.965 であった。hTK-1 の濃度の決定された箱ひげ図 (ボックスプロット) および AUC の両方を図 1 に示す。

## 【0172】

## 5.3 DiaSorin TK-1 活性アッセイ

DiaSorin によって製造された LIAISON (登録商標) チミジンキナーゼアッセイは、ヒト血清および EDTA 血漿における TK を定量的に測定するための、間接的な修正された 2 段階の競合化学発光免疫検定法 (CLIA) である。LIAISON (登録商標) チミジンキナーゼアッセイは、50 の対照試料および DLBCL 患者からの 48 の試料を使用して、製造元によって与えられた説明書により実行した。これは、試料中の TK が AZT (3'-アジド-3'-デオキシチミジン) を AZTMP (3'-アジド-3'-デオキシチミジンモノホスファート) に変換する最初の酵素反応を利用し、これに続いて、AZTMP の定量的測定のための競合免疫検定法を利用する。AZTMP に変換された AZT の量は、試料中に存在する TK の量の尺度である。アッセイでは、50 μL の試料を 100 μL のアッセイ緩衝液 1、20 μL のアッセイ緩衝液 2、および抗 AZTMP ポリクローナル抗体でコーティングした 20 μL の常磁性粒子とともにインキュベートした。ウサギ抗ヤギ IgG、次に抗 AZTMP ヤギポリクローナルを固相にコーティングする。これを 40 分間インキュベートした後、100 μL のトレーサー (イソルミノール誘導体に結合した AZTMP 類似体) を添加する。第 1 のインキュベーション中に、AZTMP は固相に結合する。第 2 のインキュベーションでは、トレーサー複合体は、溶液中の AZTMP との結合について競合する。20 分間のインキュベーション後、未結合の材料を洗浄サイクルで除去する。次に、出発試薬を添加し、フラッシュ化学発光反応を開始する。光信号は、光電子増倍管によって相対光単位 (RLU) として測定され、校正装置、対照、または試料中に存在する TK の濃度に比例する。

## 【0173】

箱ひげ図を計算し、受信者操作者特性 (ROC) を分析し、曲線下面積 (AUC) を決定した。LIAISON (登録商標) チミジンキナーゼアッセイの場合、AUC は 0.9

58であることがわかった。箱ひげ図（ボックスプロット）およびAUCの両方を図2に示す。

【0174】

実施例6：活性アッセイ/免疫検定法を用いて測定されたTK-1値の比較

一方では、LIAISON（登録商標）チミジンキナーゼアッセイ、もう一方では原型免疫検定法で得られた値を互いに比較した。一方のアッセイがチミジンキナーゼ活性を測定するのに対し、もう一方のアッセイが免疫反応性hTK-1の量を測定することを考慮に入れると、2つの異なるアッセイ間に驚くほど高い相関（0.95以上の範囲 - 使用される統計的方法に依存）が認められた。hTK-1についてのこれらの異なるアッセイ間の良好な相関は、図3からも非常に明白である。

10

【0175】

実施例7：予後指標の鍵となる要素としてのTK-1値の使用

7.1 分析的アプローチ

チミジンキナーゼ1（TK-1）の予後能力は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）に罹患している患者を対象に実施された薬理学的MAIN試験の試料を用いて後向き評価を行い[Seymour et al., 2014]、血清中のTK-1濃度は、まだ利用可能な407のベースライン試料の各々について、実施例5.2における原型Bと呼ばれるアッセイを用いて測定した。この部分セット内での無増悪生存期間（PFS）事象率は、全試験対象集団のPFSと非常に類似していた（両方ともおよそ31%）。

20

【0176】

すべての多変量モデルを公正に比較するために、本発明者らは、関連するすべてのデータ点（TK-1測定値およびすべての指標構成要素）を有する試料のみを含めるよう、データ部分セットを作成した。これにより、370の試料を含有する最終的な分析データセットが得られ、そのうち116は、R-CHOP処置の開始後3年以内にPFS事象呈した患者に由来した。事象のない経過観察期間が3年を超える試料数が少ないので、試料は3年の時点で打ち切られた。

【0177】

TK-1の予後値が、公知の臨床的および人口統計学的危険因子から独立しているかどうかを評価するために、それぞれの指標の危険構成要素とlog<sub>2</sub>変換TK-1値とを含む3つの説明した予後指標の各々についてのCox比例ハザードモデルを計算した。

30

【0178】

7.2 R-IP IおよびNCCN-IP IへのTK-1の寄与

PFSの予後についての既存の危険スコアを改善するTK-1の能力を評価するために、指数構成要素をlog<sub>2</sub>変換されたTK-1値で拡張するか、またはFDH構成要素をlog<sub>2</sub> TK-1値と置き換えるかのいずれかを行った。拡張と置換の両方を、それぞれの危険構成要素を独立変数として含むCox分割ハザードモデルを作成することと、元のモデル（R-IP IおよびNCCN-IP I）のc指標をTK-1拡張モデルのc指標と比較することとによって実行した（それぞれLDH構成要素ありおよびなし）。それぞれの差のp値に関する有意性を、ブートストラップリサンプリングアプローチで評価した。

40

【0179】

a) R-IP Iの共変量としてのTK-1

R-IP Iに対してTK-1によって提供される寄与の統計分析の結果を、以下の表5に付与する。

## 【表 5】

表 5：表 1 のしきい値および TK-1 (log 2 変換) によって 2 値化された R-IPI の危険構成要素を含む多変量コックス比例ハザードモデル。ハザード比を、それぞれの 95% 信頼区間および p 値とともに付与する。

共変量	ハザード比 (HR)	95% 信頼区間 HR	p 値
IPI, 年齢 (2 値化)	1.083	0.750 ~ 1.564	0.671
IPI, Ann Arbor 病期 (2 値化)	1.577	0.971 ~ 2.561	0.066
IPI, ECOG (2 値化)	1.829	1.226 ~ 2.731	0.003
IPI, LDH (2 値化)	0.912	0.582 ~ 1.429	0.688
IPI, 節外部位 (2 値化)	1.183	0.785 ~ 1.784	0.422
TK-1 (log 2)	1.307	1.127 ~ 1.516	< 0.001

10

20

## 【0180】

バイナリ R-IPI 危険構成要素を TK-1 (log 2 変換) と組み合わせた Cox 比例ハザードモデルは、TK-1 がモデルに予後情報を実質的に追加することを明確に示している。ハザード比 (HR) はおよそ 1.3 であり、すべてのモデル構成要素の最小 p 値は < 0.001 である (表 5 を参照されたい)。ハザード比は、TK-1 の 2 倍増が、PFS 事象 (すなわち、疾患進行または死亡) についての危険の 1.3 倍の増加と関係していると解釈することができる。

30

## 【0181】

三分された TK-1 シナリオについて、TK-1 濃度をまず 3 群 (すなわち、低、中間および高レベル) に層別化した。最適なカットオフ値を、各群に少なくとも 10 個の試料が存在することを確保しながら、対数順位統計を最大化すること (すなわち、Kaplan-Meier 分析における 3 つの生存曲線間の差を最大化すること) によって単変量設定で決定した。これにより決定される範囲は次のとおりである。

## 【表 6】

TK-1 低	=	0% ~ 24%	(0 ~ 0.7 ng/ml)
TK-1 中間	=	24.1% ~ 86%	(0.71 ~ 3.5 ng/ml)
TK-1 高	=	86.1% ~ 100%	(3.5 ng/ml 超)

40

## 【0182】

Roche Elecsys TK-1 濃度と Diasorin TK-1 活性の測定値間の方法比較に基づいて、これらの範囲は、1 ng/ml の TK-1 (Roche) 約 25 U/L の TK-1 (Diasorin) の関連性に基づいて、U/L の点でさらに表すことができる。健常個体の平均活動は、カットオフ値についての相対参照として使用され

50

る *Diasorin* によって  $4.3 \text{ U/L}$  であると報告された。

【表 7】

・ TK-1 低	=	平均の 0 ~ 4 倍	(0 ~ 18 U/L)
・ TK-1 中間	=	平均の 4 ~ 20 倍	(17.6 ~ 88 U/L)
・ TK-1 高	=	平均の 20 倍超	(88 U/L 超)

【0183】

多変量 *Cox* モデルでは、三分された TK-1 値は、中間対低および高対低の TK-1 レベルについてそれぞれ  $0.013$  および  $< 0.001$  の p 値で予後能力に大きく寄与している (表 6 を参照されたい)。対応するハザード比は、 $2.11$  および  $5.40$  であり、TK-1 レベルが中間である患者は、TK-1 が低い患者よりも PFS 事象の危険がおよそ  $2.1$  倍高く、TK-1 レベルが高い患者は  $5.4$  倍さえあることを意味する。

【表 8】

表 6：表 1 のしきい値 + TK-1 (三分法) よって 2 値化された R-IPI の危険構成要素を含む多変量 *Cox* 比例ハザードモデル。ハザード比は、それぞれの 95% 信頼区間および p 値とともに付与する。

共変量	ハザード比 (HR)	95% 信頼区間 HR	p 値
IPI, 年齢 (2 値化)	1.040	0.720 ~ 1.503	0.834
IPI, Ann Arbor 病期 (2 値化)	1.582	0.978 ~ 2.560	0.062
IPI, ECOG (2 値化)	1.939	1.302 ~ 2.889	0.001
IPI, LDH (2 値化)	0.813	0.522 ~ 1.268	0.362
IPI, 節外部位 (2 値化)	1.163	0.771 ~ 1.753	0.471
TK-1, 中間 (2 値化)	2.113	1.171 ~ 3.814	0.013
TK-1, 高 (2 値化)	5.399	2.659 ~ 10.96	$< 0.001$

【0184】

b) NCCN - IPI における共変量としての TK-1

NCCN - IPI に対して TK-1 によって提供される寄与の統計分析の結果を、以下の表 7 に付与する。

10

20

30

40

50

## 【表 9】

表 7 : 表 2 のしきい値 + TK - 1 ( log 2 変換 ) によって 2 値化された NCCN - IPI の危険構成要素を含む多変量コックス比例ハザードモデル。ハザード比を、それぞれの 95% 信頼区間および p 値とともに付与する。

表 7

共変量	ハザード比 (HR)	95% 信頼区間 HR	p 値
NCCN. 年齢 40 ~ 60 (2 値化)	1. 978	0. 962 ~ 4. 064	0. 064
NCCN. 年齢 60 ~ 75 (2 値化)	1. 569	0. 762 ~ 3. 229	0. 221
NCCN. 年齢 > 75 (2 値化)	3. 377	1. 437 ~ 7. 932	0. 005
NCCN. LDH 1 ~ 3 (2 値化)	0. 967	0. 612 ~ 1. 527	0. 886
NCCN. LDH > 3 (2 値化)	1. 557	0. 708 ~ 3. 424	0. 271
NCCN. Ann Arbor 病期 (2 値化)	1. 593	0. 986 ~ 2. 575	0. 057
NCCN. 節外性疾患 (2 値化)	1. 003	0. 563 ~ 1. 785	0. 993
NCCN. ECOG (2 値化)	1. 795	1. 201 ~ 2. 682	0. 004
TK - 1 ( log 2 )	1. 248	1. 056 ~ 1. 476	0. 009

## 【 0 1 8 5 】

2 値化 NCCN - IPI 危険構成要素を TK - 1 ( log 2 変換 ) と組み合わせた多変量モデルはまた、TK - 1 の有意な追加の予後値も示している ( p 値 = 0 . 009、表 7 を参照されたい )。ハザード比 ( HR ) はおよそ 1 . 25 であり、R - IPI モデルよりもわずかに小さいだけである。

## 【 0 1 8 6 】

三分された TK - 1 によって NCCN - IPI に提供した寄与の統計分析の結果を以下の表 8 に与える。

10

20

30

40

50

## 【表 10】

表 8：表 2 のしきい値 + TK - 1（三分法）によって 2 値化された NCCN - IPI の危険構成要素を含む多変量コックス比例ハザードモデル。ハザード比は、それぞれの 95% 信頼区間および p 値とともに付与する。

共変量	ハザード比 (HR)	95% 信頼区間 HR	p 値
NCCN, 年齢 40 ~ 60 (2 値化)	1.899	0.923 ~ 3.908	0.082
NCCN, 年齢 60 ~ 75 (2 値化)	1.504	0.731 ~ 3.095	0.268
NCCN, 年齢 > 75 (2 値化)	2.975	1.261 ~ 7.016	0.013
NCCN, LDH 1 ~ 3 (2 値化)	0.851	0.542 ~ 1.338	0.485
NCCN, LDH > 3 (2 値化)	1.255	0.597 ~ 2.637	0.549
NCCN, Ann Arbor 病期 (2 値化)	1.614	1.001 ~ 2.602	0.050
NCCN, 節外性疾患 (2 値化)	0.904	0.506 ~ 1.615	0.733
NCCN, ECOG (2 値化)	1.908	1.279 ~ 2.845	0.002
TK - 1, 中間 (2 値化)	2.148	1.193 ~ 3.868	0.011
TK - 1, 高 (2 値化)	4.716	2.234 ~ 9.954	< 0.001

## 【0187】

2 値化 NCCN - IPI 危険構成要素を TK - 1 (三分法) と組み合わせたモデルは、TK - 1 の有意な追加の予後値を示している (中間対低: p 値 = 0.011、高対低: p 値 < 0.001、表 8 を参照されたい)。対応する HR はそれぞれ 2.15 および 4.72 であり、また R - IPI の対応物と非常によく似ている。

## 【0188】

7.3 TK - 1 は、R - IPI および NCCN - IPI の予後能力を改善する

危険モデルの予後能力の広く使用されている尺度は c 指標であり、これは生存モデルにおける ROC 曲線アナログの下面積 (AUC) と見なすことができる。表 9 は、調査された予後指標 (R - IPI および NCCN - IPI) の計算された c 指標と、それぞれの 2 値化 LDH 構成要素を除外した場合と除外していない場合の TK - 1 拡張モデルの c 指標を示している。TK - 1 を含めると、LDH の存在に関係なく、これらの指標が 3.2% ~ 4% 改善する (表 9 も参照されたい)。この改善は臨床的に関連があると見なすことができ、また、ほとんどの場合統計的に有意であるが、c 指標の有意な改善を示すことは

できなかった（すなわち、ブートストラップ系の信頼区間には0が含まれておらず、但し、 $NCCN - IPI$ 対 $NCCN - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$ でLDHなしおよび $KPI$ 対 $KPI + TK - 1 ( \log 2 )$ でLDHなしである（表10を参照されたい））。これは、 $TK - 1$ が調査された予後指標を改善するだけでなく、これらの指標におけるLDHを置き換える可能性さえあることを明確に示している。

【表11】

表9： $TK - 1 ( \pm LDH )$ による多変量予後指標のc指標

多変量モデル	c指標
$R - IPI$	0.626
$R - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$	0.661
$R - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$ でLDHなし	0.660
$R - IPI + TK - 1$ (三分化)	0.678
$R - IPI + TK - 1$ (三分化)でLDHなし	0.674
$NCCN - IPI$	0.639
$NCCN - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$	0.671
$NCCN - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$ でLDHなし	0.670
$NCCN - IPI + TK - 1$ (三分化)	0.686
$NCCN - IPI + TK - 1$ (三分化)でLDHなし	0.686

【表12】

表10：参照モデルと $TK - 1 ( \pm LDH )$ を含むモデルとの間のc指標の違い

指標の比較	c指数の差	95%信頼区間
$R - IPI$ 対 $R - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$	0.034	0.007~0.073
$R - IPI$ 対 $R - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$ でLDHなし	0.034	0.003~0.070
$R - IPI$ 対 $R - IPI + TK - 1$ (三分化)	0.052	0.020~0.096
$R - IPI$ 対 $R - IPI + TK - 1$ (三分化)LDHなし	0.048	0.014~0.091
$NCCN - IPI$ 対 $NCCN - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$	0.032	0.002~0.066
$NCCN - IPI$ 対 $NCCN - IPI + TK - 1 ( \log 2 )$ でLDHなし	0.031	-0.008~0.065
$NCCN - IPI$ 対 $R - IPI + TK - 1$ (三分化)	0.047	0.015~0.088
$NCCN - IPI$ 対 $R - IPI + TK - 1$ (三分法)LDHなし	0.047	0.006~0.086

【0189】

表9および表10にそれぞれ付与されているデータは、 $TK - 1$ を既存の予後指標と組み合わせて使用して、DLBC患者のための疾患転帰を予測する際の臨床スコアを大幅に改善することができることを明確に示している。 $TK - 1$ を含めることで、調査した各予後指標が改善された。

## 【 0 1 9 0 】

表 9 および表 1 0 から明らかなように、TK - 1 は、これらの指標内で LDH を置き換える可能性さえあり、これは、2 つの予後指数 ( R - I P I および K P I ) の場合、LDH を省略すれば c 値がわずかに良好になるためであり、N C C N - I P I の場合、LDH が含まれていなければわずかに悪化するに過ぎないからである。

## 【 0 1 9 1 】

D L B C L に罹患していると診断された新たな患者の場合、特に処置を開始する前に、TK - 1 を測定し、あらかじめ規定されたカットオフ値と比較するものとする。新たな患者についての測定値が、あらかじめ規定されたカットオフ値を上回っている場合、その患者はより高い危険スコアを持ち、好ましくない疾患の転帰を経験する可能性が高いと見なされるであろう。

10

20

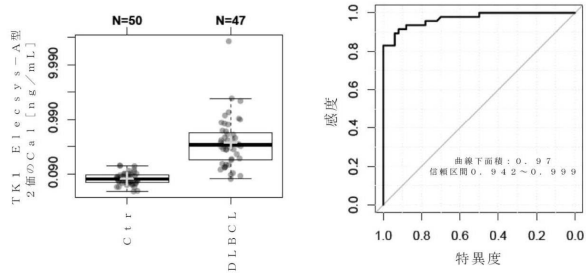
30

40

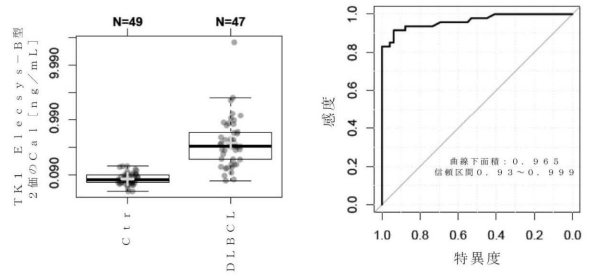
50

【図面】

【図 1】

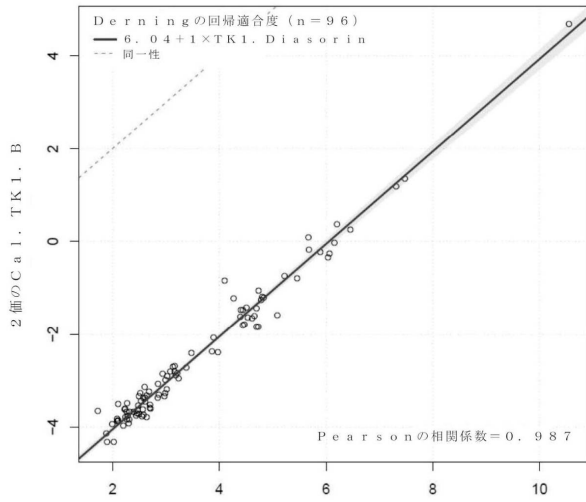


【図 2】



10

【図 3】



20

【配列表】

0007577647000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

- (72)発明者   ロルニー，ビンツェント  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク，ノンネンバルト 2，ロシュ ダイアグノスティックス ゲー  
エムベアー
- (72)発明者   ルッツ，ザンドラ  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク，ノンネンバルト 2，ロシュ ダイアグノスティックス ゲー  
エムベアー
- (72)発明者   モーゲンスターン，デービッド  
アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 2 5 0，インディアナポリス，ヘイグ・ロード 9 1 5 5，ロ  
シュ・ダイアグノスティックス・オペレーションズ，インコーポレーテッド
- (72)発明者   ピンチュク，ボリス  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク，ノンネンバルト 2，ロシュ ダイアグノスティックス ゲー  
エムベアー
- (72)発明者   ツィンマーマン，クリスティナ  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク，ノンネンバルト 2，ロシュ ダイアグノスティックス ゲー  
エムベアー
- (72)発明者   クランマー，マルティン  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク，ノンネンバルト 2，ロシュ ダイアグノスティックス ゲー  
エムベアー
- (72)発明者   ゾナー，フランツィスカ  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク，ノンネンバルト 2，ロシュ ダイアグノスティックス ゲー  
エムベアー

審査官   高田 亜希

- (56)参考文献   米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 7 7 8 9 1 ( U S , A 1 )  
米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 3 4 9 8 6 ( U S , A 1 )  
Yusuke Kanemasa, et al., , Beta-2 microglobulin as a significant prognostic factor and a ne  
w risk model for patients with diffuse large B-cell lymphoma , Hematol Oncol. , Wiley , 20  
17年12月 , 35(4) , 440-446  
SANDEEP K RAJAN , Serum Thymidine Kinase (TK) Distinguishes Grade of Non Hodg  
kins Lymphoma (NHL) and Predicts Complete Response Rate (CRR) and Progression  
Free Survival (PFS) , Blood , American Society of Hematology , 2004年11月16日 , 104  
(11) , 4558 , ISR D2  
SAMER SUKI et al., , Risk Classification for Large Cell Lymphoma using Lactate Dehy  
drogenase, Beta-2 Microglobulin, and Thymidine Kinase , LEUKEMIA AND LYMPHOM  
A , Taylor & Francis , 1995年01月01日 , 18(1-2) , 87-92 , ISR D3  
Kazuhito Suzuki, et al., , Prognostic value of high thymidine kinase activity in patient  
s with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma treated by rituximab, cycl  
ophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone , LEUKEMIA AND LYMPHOM  
A , Taylor & Francis , 2013年11月30日 , 54(11) , 2412-2417 , ISR D1
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
G 0 1 N   3 3 / 4 8   - 3 3 / 9 8  
C 1 2 Q   1 / 4 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )