

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7128399号
(P7128399)

(45)発行日 令和4年8月31日(2022.8.31)

(24)登録日 令和4年8月23日(2022.8.23)

(51)国際特許分類

G 0 1 N	33/574 (2006.01)	F I	G 0 1 N	33/574	A
A 6 1 K	45/00 (2006.01)		A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)		A 6 1 K	39/395	E

請求項の数 34 (全38頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-505328(P2019-505328)
 (86)(22)出願日 平成29年4月14日(2017.4.14)
 (65)公表番号 特表2019-514028(P2019-514028
 A)
 (43)公表日 令和1年5月30日(2019.5.30)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/027714
 (87)国際公開番号 WO2017/181073
 (87)国際公開日 平成29年10月19日(2017.10.19)
 審査請求日 令和2年4月10日(2020.4.10)
 (31)優先権主張番号 62/322,570
 (32)優先日 平成28年4月14日(2016.4.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 518362775
 クリエイティブ マイクロテック インコ
 ーポレーテッド
 C R E A T V M I C R O T E C H , I
 N C .
 アメリカ合衆国, 20854 メリーラ
 ンド, ポトマック, レイク ポトマック
 ドライブ 11609
 11609 Lake Potomac
 Drive, Potomac, Mar
 yland 20854, United
 States of America
 (74)代理人 100113398
 弁理士 寺崎 直
 (72)発明者 アダムス, ダニエル

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌治療のための治療決定におけるPD-L1発現の使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性を判定する方法であって、
 PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、癌関連マクロファージ様細胞(CAML)及び上皮間葉転換CTC(EMTCTC)をアッセイすることを含み、
 CAML及びEMTCTCにPD-L1発現が検出された場合、免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性を有すると判定する、前記方法。

【請求項2】

免疫チェックポイント阻害剤に対する応答性を予測する方法であって、
 PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、CAML及びEMTCTCをアッセイすることを含み、
 CAML及びEMTCTCにPD-L1発現が検出された場合、免疫チェックポイント阻害剤に対する応答性があると予測する、前記方法。

【請求項3】

癌を有する対象の治療を選択する方法であって、
 PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、CAML及びEMTCTCをアッセイすることを含み、
 CAML及びEMTCTCにPD-L1発現が検出された場合、前記対象の治療として前記対象への治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤の投与を選択する、前記方法。

【請求項4】

免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける癌を有する対象を同定するためのアッセイの方法であつて、

P D - L 1 発現について、癌を有する対象から単離された、C A M L 及び E M T C T C をアッセイすること含み、

C A M L 及び E M T C T C に P D - L 1 発現が検出された場合、前記対象は、免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける対象として同定される、前記方法。

【請求項 5】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、P D - L 1 アンタゴニスト、P D - 1 アンタゴニスト、及び C T L A - 4 アンタゴニストのうちの 1 つ以上である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、P D - L 1 と P D - 1 との間の結合を阻害する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、P D - L 1 のその結合パートナーへの結合を阻害する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、P D - 1 のその結合パートナーへの結合を阻害する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、C T L A - 4 のその結合パートナーへの結合を阻害する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記免疫チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ（オプジー）ボ、イピリムマブ（ヤーボイ）、ペムブロリズマブ（キイトルーダ）、アテゾリズマブ（テセントリク）、トレメリムマブ、及びデュルバルマブ（M E D 1 4 7 3 6）のうちの 1 つ以上である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 P D - L 1 発現のアッセイは、P D - L 1 タンパク質発現を検出すること及び P D - L 1 m R N A 産生を検出することのうちの 1 つ以上によって行われる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記 P D - L 1 タンパク質発現は、免疫組織化学（I H C）によって検出される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 I H C は、膜染色、細胞質染色、又はこれらの組み合わせによって行われる、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 I H C は、抗 P D - L 1 抗体を用いて行われる、請求項 1 5 又は 1 6 に記載の方法。

【請求項 18】

P D - L 1 タンパク質発現は、I H C によって低染色強度として検出される、請求項 1

50

5～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

P D - L 1 タンパク質発現は、I H C によって高染色強度として検出される、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

P D - L 1 タンパク質発現は、I H C によって誘導可能であるとして検出される、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

P D - L 1 タンパク質発現は、単離された細胞の染色として検出される、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項22】

I H C は、P D - L 1 に対する結合特異性を有する1つ以上の抗体を利用する免疫蛍光(I F)染色を用いて行われる、請求項15に記載の方法。

【請求項23】

P D - L 1 への抗P D - L 1 抗体の結合は、前記抗P D - L 1 抗体にコンジュゲートされた蛍光化合物を介して検出される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

P D - L 1 への抗P D - L 1 抗体の結合は、抗P D - L 1 抗体に対する結合特異性を有するフルオロフォアコンジュゲート二次抗体を介して検出される、請求項22に記載の方法。

20

【請求項25】

P D - L 1 発現レベルが、癌に罹患していない同じ種の対象由来の間質細胞の集団内のP D - L 1 発現よりも大きい場合、P D - L 1 発現が検出される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

E M T C T C 及び C A M L は、前記癌を有する対象から得た血液から単離される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記血液は末梢血である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記癌を有する対象は、標的薬剤、化学療法、又は放射線療法のうちの1つ以上を用いて治療を受けている、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項29】

前記癌は、固形腫瘍である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記固形腫瘍は、ステージI、ステージI I、ステージI I I、又はステージI V の癌である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記固形腫瘍は、癌腫、肉腫、神経芽細胞腫、又はメラノーマである、請求項29に記載の方法。

40

【請求項32】

前記癌は、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、メラノーマ、膀胱癌、腎臓癌、頭頸部癌、大腸癌、肝臓癌、卵巣癌、神経芽細胞腫、肉腫、骨肉腫、食道癌、脳及びその他神経系癌、喉頭癌、気管支癌、口腔及び咽頭癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮頸癌、又は子宮体癌の1つ以上である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

前記肺癌は、非小細胞肺癌(N S C L C)である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

E M T C T C 又は C A M L の少なくとも1つは、少なくとも1つのR A D 5 0 巢を示す、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

癌は、米国における死因の第二位であり、男性の42%、女性の38%が生涯のうちで癌を発症する[51-54]。免疫療法は、起原にかかわらず、患者の免疫系を利用して癌を攻撃する治療法である。免疫系は、細菌やウイルスなど、体内に侵入した異物を攻撃するために進化したチェックとバランスのネットワークによって調整されている。しかしながら、癌は、例えば、PD-L1及びPD-L2等のタンパク質を発現することによって免疫系を回避でき、これらによって免疫系が癌細胞を攻撃することを阻害する。

【0002】

具体的には、腫瘍細胞とT細胞との間の相互作用は、腫瘍細胞上の主要組織適合複合体(MHC)とT細胞上のT細胞受容体(TCR)とが接触することを含む[54]。MHCとT細胞受容体とが接触すると、T細胞が活性化され、腫瘍細胞が破壊される。

【0003】

腫瘍細胞は、表面に免疫チェックポイントタンパク質PD-L1を発現している場合、T細胞免疫監視を免れてしまうことがある。PD-L1は、存在する場合、T細胞によって発現されるPD-1に結合し、これにより、T細胞の活性化が阻止され、T細胞免疫監視が抑制される。

【0004】

PD-L1 / PD-1相互作用を遮断できる免疫チェックポイント阻害剤が開発されている。このような薬物は、T細胞免疫監視機構が再び正常に機能することを可能にし、従って、対象における正常な免疫応答によって腫瘍細胞を破壊できる。

【0005】

T細胞上のCTLA-4の遮断も同様の効果を有する可能性がある。FDAは、メラノーマについてのCTLA-4に基づく最初の免疫療法剤を2011年に承認した。FDA免疫療法承認のペースは、2014年に高まり、2016年末までに、メラノーマ、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞癌(RCC)、頭頸部癌、膀胱癌及びホジキンリンパ腫に対する18件の免疫療法が承認されている[55-59]。現在、複数の腫瘍にわたる広範な有効性の可能性を示す100以上のオープン免疫療法臨床試験が存在する。

【0006】

免疫チェックポイント阻害剤の有効な使用の鍵は、癌を有する特定の対象が薬物に応答するか否かを判定することである。PD-L1又はPD-1に結合し、免疫チェックポイント阻害剤として働く抗体を、腫瘍細胞がPD-L1を発現しない患者に投与しても、治療の効果はない。このような抗体ベースの治療は非常に高価であるため、患者がその治療に応答する少なくとも幾つかの徴候を確認することが重要である。

【0007】

PD-L1発現を検査するために腫瘍生検によって癌細胞を取得することは、患者に痛みや不快感を与えること、単離された腫瘍の領域以外を検査できないこと、腫瘍微小環境においてタンパク質発現プロファイルの変化が経時的に起こる可能性があることを含む重大な欠点を有する。

【0008】

血液ベースの生検は、腫瘍によって放出されるか、さもなくば分離する細胞のリアルタイムシーケンシャルトラッキングを提供できる点で優れた組織生検である。血液サンプルは、患者からより容易に及びより頻繁に取得できる。更に、タンパク質発現プロファイルの変化を経時的にモニタリングできる。循環腫瘍細胞(CTC)は、末梢血から容易に単離でき、組織生検から得られる腫瘍細胞の代替物として使用できる癌関連細胞型の1つである[1-4]。CTCは、固形腫瘍から離れて血流中に流入する腫瘍細胞である。CTCは、癌腫、肉腫、神経芽細胞腫、及びメラノーマ患者の血液中に見出される。

【0009】

血液ベースの生検から得ることができる更なる細胞型の同定は、この技術を更に発展さ

10

20

30

40

50

せて、免疫チェックポイント阻害剤による治療が有効な癌患者を特定するために重要なである。

【0010】

本発明は、癌を有する対象にとって、免疫チェックポイント阻害剤での治療が有益であるかを判定するための有効な手段を提供すること、並びに他の重要な目的を含む。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、その発現が対象における癌のスクリーニング、モニタリング、及び診断に使用される末梢ベースのバイオマーカー及び細胞に関する。また、本発明は、バイオマーカーの発現の有無又は発現の変化に基づいて癌を治療する方法に関する。本明細書で定義する方法により、腫瘍医は、従来の細胞傷害性療法と免疫療法のより良好な組合せ及び順序を選択でき、並びに免疫療法に対する耐性を有する応答を示す可能性が高い患者を識別しうる。

10

【0012】

第1の実施形態では、本発明は、免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性について、癌を有する対象をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、P D - L 1 発現について、癌を有する対象から単離された循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell : C T C)、上皮間葉転換 C T C (epithelial to mesenchymal transition CTC cell : E M T C T C)、癌関連マクロファージ様細胞 (cancer associated macrophage-like cell : C A M L)、及び癌関連血管内皮細胞 (cancer associated vascular endothelial cell : C A V E) のうちの1つ以上をアッセイすることを含み、P D - L 1 発現が検出された場合、対象は、免疫チェックポイント阻害剤が有効であるとみなす。

20

【0013】

第2の実施形態では、本発明は、免疫チェックポイント阻害剤による治療に対する、癌を有する対象の応答性を予測する方法を提供する。この方法は、P D - L 1 発現について、癌を有する対象から単離された C T C 、 E M T C T C 、 C A M L 、及び C A V E のうちの1つ以上をアッセイすることを含み、P D - L 1 発現が検出された場合、対象は、免疫チェックポイント阻害剤による処置に応答性があると予測する。

20

【0014】

第3の実施形態では、本発明は、癌を有する対象の治療を選択する方法を提供する。この方法は、P D - L 1 発現について、癌を有する対象から単離された C T C 、 E M T C T C 、 C A M L 、及び C A V E のうちの1つ以上をアッセイすることを含み、P D - L 1 発現が検出された場合、対象の治療として対象への治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤の投与を選択する。

30

【0015】

第4の実施形態では、本発明は、免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける癌を有する対象を同定するためのアッセイの方法を提供する。この方法は、癌を有する対象から単離された C T C 、 E M T C T C 、 C A M L 、及び C A V E のうちの1つ以上をアッセイすることを含み、P D - L 1 発現が検出された場合、対象は、免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける対象として同定される。

40

【0016】

第5の実施形態では、本発明は、癌を有する対象を治療する方法を提供する。この方法は、(a) P D - L 1 発現について、癌を有する対象から単離された C T C 、 E M T C T C 、 C A M L 、及び C A V E のうちの1つ以上をアッセイすることと、(b) P D - L 1 発現が検出された場合、対象に治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤を投与することとを含む。

【0017】

第6の実施形態では、本発明は、癌を有する対象を治療する方法を提供する。この方法は、癌を有する対象に治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含み、免疫チェックポイント阻害剤は、癌を有する対象から単離された C T C 、 E M T C T C 、

50

CAML、及びCAVEのうちの1つ以上において、PD-L1発現が検出された後に投与される。

【0018】

第7の実施形態では、本発明は、癌を有する対象におけるPD-L1発現をモニタリングする方法を提供する。この方法は、(a)PD-L1発現について、癌を有する対象から第1の時点で単離されたCTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上をアッセイすることと、(b)PD-L1発現について、癌を有する対象から第2の時点で単離されたCTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上をアッセイすることと、(c)第1及び第2の時点で単離された細胞においてアッセイされたPD-L1発現を比較することとを含む。この実施形態の特定の側面では、対象は、癌の治療を受けている。

10

【0019】

第8の実施形態では、本発明は、癌を有する対象における治療をモニタリングする方法を提供する。この方法は、(a)PD-L1発現について、癌の治療を受けている対象から第1の時点で単離されたCTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上をアッセイすることと、(b)PD-L1発現について、癌の治療を受けている対象から第2の時点で単離されたCTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEの1つ以上をアッセイすることと、(c)第1及び第2の時点で単離された細胞においてアッセイされたPD-L1発現を比較することにより、癌を有する対象における治療をモニタリングすることとを含む。この実施形態の特定の側面では、対象は、免疫チェックポイント阻害剤を用いて治療されている。

20

【0020】

関連する実施形態及び側面において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1アンタゴニスト、PD-1アンタゴニスト、及びCTL A-4アンタゴニストのうちの1つ以上である。

【0021】

上述のように定められる、所定の関連実施形態及び側面において、免疫チェックポイント阻害剤は、(i)PD-L1とPD-1との間の結合、(ii)PD-L1のその結合パートナーへの結合、(iii)PD-1のその結合パートナーへの結合、及び(iv)CTL A-4のその結合パートナーへの結合のうちの1つ以上を阻害する。

30

【0022】

上述のように定められる、所定の関連実施形態及び側面において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗体、例えば、モノクローナル抗体である。特定の側面において、免疫チェックポイント阻害剤は、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である。

【0023】

具体的な免疫チェックポイント阻害剤の例は、以下に限定されるものではないが、ニボルマブ(Nivolumab) (オブジーボ:Opdivo)、イピリムマブ(Ipilimumab) (ヤーボイ:Yervoy)、ペムブロリズマブ(Pembrolizumab) (キイトルーダ:Keytruda)、アテゾリズマブ(Atezolizumab) (テセントリク:Tecentriq)、トレメリムマブ(Tremelimumab)、及びデュルバルマブ(Durvalumab) (MED14736)のうちの1つ以上を含む。

40

上述のように定められる、所定の関連実施形態及び側面において、方法は、1つ以上の治療有効量の追加の抗癌剤を対象に投与することを更に含む。追加の抗癌剤は、以下に限定されるものではないが、免疫療法剤、化学療法剤、放射線治療薬、既存の癌剤、CCR5及びCXCR4等を含む。

【0024】

具体的な抗癌剤の例は、以下に限定されるものではないが、T-VEC、AM-0010、CXCR4アンタゴニスト、TGF-キナーゼ阻害剤ガルニセルチブ(galunisertib)、抗CSF-1Rモノクローナル抗体、アベマシクリブ(Abemaciclib)、ファスロデックス(Faslodex)、ネシツムマブ(necitumumab)、AZD9291、サイラムザ

50

(Cyramza) (ラムシルマブ(ramucirumab))、TPIV200、ガルニセルチブ(Galunisertib)、癌ワクチン、サイトカイン、細胞ベースの療法、二重及び多重特異性抗体、腫瘍ターゲティングmAbs、リツキシマブ(Rituximab)、腫瘍溶解性ウイルス、レオウイルス、ブリナツモマブ(Blinatumomab)、シブリューセル-T(Sipuleucel-T)、T-Vec、IL-2、IFN-、トラストズマブ(Trastuzumab)、セルキシマブ(Celuximab)、ベバシズマブ(bevacizumab)、Tim-3、BTLA、抗IL-10、GM-CSF、抗血管新生治療、VEGF遮断薬、HMG B1、Nrp1、TAM受容体チロシンキナーゼ、Ax1、MerTK、ALT-803、IL-15、免疫抑制リガンドホスファチジルセリン(Ligand Phosphatidylserine: PS)、バビツキシマブ(bavituximab)、ベバシズマブ(bevacizumab)(抗VEGF)、コブルメチニブ(cobimetinib)(MEK阻害剤)、ベムラフェニブ(vemurafenib)(BRAF阻害剤)、エルロチニブ(erlotinib)(EGFR)、アレクチニブ(alectinib)(ALK阻害剤)、ベバシズマブ(bevacizumab)(抗VEGF)、パゾパニブ(pazopanib)(チロシンキナーゼ阻害剤)、ダブラフェニブ(dabrafenib)(BRAF阻害剤)、トラメチニブ(trametinib)(MEK阻害剤)、デュルバルマブ(durvalumab)(抗PD-L1)、スニチニブ(sunitinib)(RTK阻害剤)、パゾパニブ(pazopanib)(RTK阻害剤)、サルグラモスチム(sargramostim)、VISTA、TIM-3、LAG-3、PRS-343、CD137(4-1BB)/HER2二重特異性抗体、USP7、抗HER2、SEMA4D、CTLA-4、PD-1、PD-L1、及びPD-L2のうちの1つ以上を含むことができる。10

【0025】

上述のように定められる、所定の関連する実施形態及び側面において、PD-L1発現のアッセイは、PD-L1タンパク質発現を検出すること及びPD-L1mRNA産生を検出することの1つ以上によって行っててもよい。PD-L1タンパク質発現は、例えば、免疫組織化学(immunohistochemistry: IHC)によって検出してもよい。IHCは、膜染色、細胞質染色、又はこれらの組み合わせによって行っててもよい。IHCは、抗PD-L1抗体、すなわち、PD-L1に対する結合特異性を有する抗体を用いて行っててもよい。PD-L1タンパク質発現は、IHCによる弱い染色強度、中程度染色強度、又は強い染色強度として検出してもよい。また、PD-L1タンパク質発現は、IHCによる低染色強度、中程度染色強度、又は高染色強度として検出してもよい。また、PD-L1タンパク質発現の検出は、低染色強度から高染色強度への変化から導いてもよく、低染色強度から中程度染色強度への変化から導いてもよく、中程度染色強度から高染色強度への変化から導いてもよい。PD-L1タンパク質発現は、単離された細胞の染色として検出してもよい。20

【0026】

ある側面において、IHCは、PD-L1に対する結合特異性を有する1つ以上の抗体を利用する免疫蛍光(IF)染色を用いて行われる。PD-L1への抗PD-L1抗体の結合は、抗PD-L1抗体にコンジュゲートされた蛍光化合物を介して検出してもよく、抗PD-L1抗体に対する結合特異性を有する標識コンジュゲート二次抗体を介して検出してもよい。適切な検出可能な標識としては、フルオロフォア(fluorophore)が挙げられる。40

【0027】

上述のように定められる、所定の関連する実施形態及び側面では、PD-L1発現レベルが、癌に罹患していない同じ種の対象由来の間質細胞の集団のPD-L1発現よりも大きい場合、PD-L1発現が検出される。

【0028】

上述のように定められる、所定の関連する実施形態及び側面では、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEは、癌を有する対象から得た血液から単離される。特定の側面では、血液は末梢血である。

【0029】

50

上述のように定められる、所定の関連する実施形態及び側面では、癌を有する対象は、標的薬剤、化学療法、又は放射線療法の1つ以上を用いて治療を受けていてもよい。

【0030】

上述のように定められる、所定の関連する実施形態及び側面では、癌は、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、メラノーマ、膀胱癌、腎臓癌、頭頸部癌、大腸癌、肝臓癌、卵巣癌、神経芽細胞腫、肉腫、骨肉腫、食道癌、脳及びその他神経系癌、喉頭癌、気管支癌、口腔及び咽頭癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮頸癌、又は子宮体癌である。癌は、固形腫瘍であってもよく、例えば、ステージI、ステージII、ステージIII、又はステージIVの固形腫瘍等の癌であってもよい。固形腫瘍は、癌腫、肉腫、神経芽細胞腫、又はメラノーマであってもよい。肺癌の例には、非小細胞肺癌（NSCLC）が含まれるが、これに限定されない。

10

【0031】

上で定義した特定の関連する実施形態及び側面において、少なくとも1つのEMTCTC、EMTCTC、CAML、又はCAVEは、少なくとも1つのRAD50巣（RAD50 foci）を示す。

【0032】

以上の記述は、以下の本発明の詳細な説明をより理解しうるよう、本発明の特徴及び技術的利点を包括的に概説したものである。以下では、本発明の特許請求の範囲の主題を構成する本発明の更なる特徴及び利点について記述する。本明細書に開示する任意の概念及び特定の実施形態は、本発明と同じ目的を達成するための他の構造を変更又は設計するための基礎として利用できることは、当業者によって理解されよう。このような均等な構成は、特許請求の範囲に記載されている本発明の思想及び範囲から逸脱するものではないことは、当業者によって理解されよう。その構成と運用方法の両方に関して本発明の特徴であると考えられる新規な特徴は、更なる目的及び利点と共に、添付図面を参照する以下の説明から一層理解される。なお、任意の説明、図、実施例等は、例示及び説明のためにのみ提供され、本発明の範囲を限定するものではない。

20

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】血液ベースの生検を用いて、DAPI、サイトケラチン、EpCAM、及びCD45によって循環細胞を同定及び亜型化し、QUAS-R蛍光クエンチ技術を使用してRAD50及びPD-L1について細胞を再染色した。（図1A）細胞のEMTCTCクラスターの例では、サイトケラチンについては弱陽性であり、EpCAMについては陰性であり、CD45については陰性である。ボックススケール=90 μm。（図1B）タンパク質エピトープに害を与えることなく蛍光体がクエンチされるQUAS-Rによってサンプルをクエンチした[13]。次いで、PD-L1、RAD50及びPD-1についてサンプルを再染色した。ボックススケール=90 μm。（図1C）Zenソフトウェアで細胞を追跡し、各細胞又は細胞クラスターの平均強度を算出することによってPD-L1を測定した。ボックススケール=35 μm。（図1D）RAD50巣（赤色）が、個々の核（シアン）で数えられる。ボックススケール=35 μm。

30

【0034】

【図2】図3のDAPI、サイトケラチン及びCD45の個別及び拡大画像。（図2A）線維性サイトケラチンシグナル、病理学的に異常な核あり、及びCD45なしのPDCCTC。白い矢印は、DAPI及びCD45陽性の典型的な白血球を示す。（図2B）拡散性サイトケラチンシグナルあり、CD45も異常な核もなしのEMTCTC。（図2C）CD45+及びサイトケラチン+の両方である複数の凝集した核及び拡大した細胞を有するCAML。ボックス=65 μm。

40

【0035】

【図3】ベースライン（T0）及び放射線療法の導入後（T1）、においてPD-L1を定量化するために使用できる細胞を含むサンプルのパーセンテージを示す図であり、血液ベースの生検には、循環腫瘍細胞及び循環間質細胞の2つの亜型が含まれる。標準的な生

50

検は、初期のベースラインの時点のみで行われ、P D - L 1についての分析のために十分な量の腫瘍を有していたものは、これらのサンプルのうち22%のみであった。茶色染色は、P D - L 1 / 青色染色は、ヘマトキシリンである。血液ベースの生検では、ベースラインサンプルの49%、及び治療後サンプルの66%においてE M T腫瘍細胞が同定された。更に、ベースラインサンプルの81%及びフォローアップサンプルの100%において、循環間質細胞(C A M L)が利用可能であった。青色=D A P I、緑色=サイトケラチン、紫色=C D 4 5、ポックス=65ミクロン。

【0036】

【図4】ダコ(DAKO)の臨床的に承認されたI H C P D - L 1 クローンとB B B P D - L 1 クローンの試験及び比較。(図4 A)腫瘍の10%において1+とスコアリングされた患者I D # 8サンプル由来のクローン22c3。(図4 B)腫瘍の20%において2+とスコアリングされた患者I D # 8の平行サンプル由来のクローン28-8。(図4 C)B B Bに最適化されたP D - L 1 クローンを使用して、P D - L 1 陽性細胞数及びセルシーブ(CellSieve:商標)マイクロフィルター上に見出される各細胞の強度を判定した。S I = ピクセル強度四分位数、% = 最大ピクセル強度四分位数の陽性細胞のパーセント、N / A = テスト可能なサンプルなし。

10

【0037】

【図5】循環細胞におけるP D - L 1 発現をスコアリングするための閾値の決定。Z e n B l u eによって各B B B細胞(n=374)のP D - L 1シグナルを判定し、それぞれの画像の相対的なバックグラウンドから減算した。バックグラウンドの標準偏差(n=373)をB B B I H Cスコア0(全細胞の26%)の閾値として用いた。標準偏差の2倍をB B B I H Cスコア1(全細胞の42%)の閾値として用いた。バックグラウンドの2倍をB B B I H Cスコア2(全細胞の22%)の閾値として用いた。残りの全ての強度、バックグラウンドの2倍~6倍は、3(全細胞の10%)とスコアリングした。

20

【0038】

【図6】血液ベースの生検法を使用した、治療期間を通しての循環腫瘍細胞及び間質細胞の両方における、核内のR A D 5 0 遺伝子座(RAD50 loci)の形成における動的变化及びP D - L 1の細胞へのアップレギュレーションの分析。(図6 A)R A D 5 0 巣の形成を正確に数えることができ、放射線療法の導入後のR A D 5 0 遺伝子座の明らかな増加が観察された。このことは、E M T C T C及びC A M Lの両方が放射線照射部位に由来していることを示唆している。(図6 B)P D - L 1は、原発腫瘍部位に由来するE M T C T C及びC A M Lの両方で評価できる。エラーバー=標準誤差。

30

【0039】

【図7】細胞型別での、放射線療法導入前後の各患者の平均P D - L 1 及びR A D 5 0 の変化。(図7 A及び図7 B)C A M L細胞では、患者の59%においてR A D 5 0 の増加が見られ、患者の15%は、変化がなく、患者の27%は、一方の時点でC A M Lを有していないかった。E M T C T Cでは、患者の44%においてR A D 5 0 の増加が見られ、患者の2%は、変化がなく、患者の54%は、一方の時点でE M T C T Cを有していないかった。(図7 C及び図7 D)C A M L細胞では、患者の51%において平均P D - L 1 の増加が見られ、患者の22%において減少が見られ、患者の27%は、一方の時点でC A M Lを有していないかった。E M T C T Cでは、患者の29%で平均P D - L 1 の増加が見られ、患者の17%において減少が見られ、患者の54%は、一方の時点でE M T C T Cを有していないかった。

40

【0040】

【図8】高/低P D - L 1 発現又はR A D 5 0 遺伝子座形成の前及び後の放射線療法に基づく患者のP F Sを比較。(図8 A)T 0における高P D - L 1 発現(2-3 B B B I H C)患者と低P D - L 1 発現(0-1 B B B I H C)患者のP F S、P F S中央値16対>24ヶ月。(図8 B)T 1における高P D - L 1 発現患者と低P D - L 1 発現患者のP F S、P F S中央値16対18ヶ月、p=0.958。(図8 C)T 0において循環細胞あたり平均1のR A D 5 0 遺伝子座の患者のP F S、P F S中央値19対18ヶ月

50

、 $p = 0.246$ 。（図8-D）T1において循環細胞当たり平均 1 の R A D 5 0 遺伝子座の患者の P F S、P F S 中央値 10 対 19 ヶ月、 $p = 0.034$ 。

【0041】

【図9】図1のEMTCTCクラスターの核内の R A D 5 0 を上部から底部まで画像化した共焦点画像。R A D 5 0 遺伝子座が細胞の核領域内にあることを確認するために、図3からのEMTCTCのクラスターを、Zeiss共焦点顕微鏡で画像化した。クラスターの上部（図9-A）からクラスターの底部（図9-G）までを画像化した。全ての R A D 5 0 巣は、核構造内に局在していることが見出され、R A D 5 0 巣は、核特有の成分であることが検証される。

【0042】

【図10】CD31（図10-C）、CD146（図10-B）、ビメンチン（Vimentin）（図10-B）、及びCD144（図10-C）について陽性に染色され、これらの内皮起源を確認するサイトケラチン陽性CAVEの代表例。全てのCAVEは、CD45陰性（図10-A）及びCD14陰性（図10-B）である。このCAVEは、EpCAM陰性（図10-A）に見えるが、一部のCAVEは、EpCAMを発現することが判明している。

10

【0043】

【図11】116人の患者のステージ毎のCTC及びCAVEの割合。

【0044】

【図12】CAVE集団（n = 119サンプル）における各ECマーカーの割合。

20

【0045】

【図13】染色によってCAVEと同定された細胞クラスターの画像。追加の染色は、併用免疫療法、PD-L1及びCXCR4の能力を示す。

【0046】

【図14】併用免疫療法、PD-L1及びCCR5について染色されたCAMLの画像を示す図である。

【0047】

【図15】PD-L1及びCCR5について染色されたCAMLの画像。PD-L1は、染色されていない。

【0048】

【図16】PD-L1について染色されたCAMLの画像。（図16-A）ペムブロリズマブによる治療前のPD-L1染色。（図16-B）ペムブロリズマブによる1ヶ月間治療後のPD-L1染色。

30

【0049】

【図17】核、PD-L1、ビメンチン、及びCD45について染色されたCAMLの画像。

【発明を実施するための形態】

【0050】

I. 定義

本明細書で使用する不定冠詞「a」又は「an」は、一以上を意味することがある。本明細書において、用語「comprising（含む、有する、備える）」等と関連して使用される場合、不定冠詞「a」又は「an」は、一又は複数を意味することがある。本明細書で使用する「他の（another）」は、少なくとも第2の又はこれ以上を意味することができる。更に、文脈による要求がない限り、単数形の用語は複数を含み、複数形の用語は単数を含む。

40

【0051】

本明細書で使用する「約」は、明示の有無にかかわらず、数値、例えば、整数、分数、及び百分率について言及する。「約」という用語は、包括的に、指示された値と等価である（例えば、同じ機能又は結果を有する）と当業者がみなすことができる数値の範囲（例えば、指示された値の+/-5~10%）を意味する。場合によっては、用語「約」は、最も近い有効数字に丸められた数値を含むことができる。

【0052】

50

I I . 本発明

液体生検は、末梢血中に見出される循環腫瘍細胞（C T C）のリアルタイムで連続的な追跡を提供し、このようなアッセイは組織生検の代替物として使用できる[1-4]。末梢血中の循環腫瘍細胞（C T C）を評価することによって、特定の治療を受ける特定の対象における癌診断、並びに腫瘍のスクリーニング、モニタリング治療、及び感受性判定のための手段として、上皮間葉転換が進行しているC T C亜型（E M T C T C）[2,3,5-9]及び予後に関連する病理学的に定義可能なC T C（P D C T C）[6-10]を含むC T Cの異種集団を検査できる。

【 0 0 5 3 】

近年、癌患者の末梢血において、癌に関連する他の循環細胞が同定されており、本明細書に開示する方法により、これをアッセイしうる。この癌間質細胞亜型は、癌関連マクロファージ様細胞、略してC A M Lと呼ばれている。C A M Lは、C T CとC A M Lの両方を捕捉する非親和性マイクロフィルトレーションベースの方法を用いて血液中で同定されており、これにより、これらの癌特異的循環細胞亜型の特異的又は並行分析が可能である[1,6-16]。C A M Lは、侵襲性悪性腫瘍及び様々な固体悪性腫瘍（例えば、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌（N S C L C）及び肺臓癌）の全てのステージで見出される、近年定義された循環骨髄由来間質細胞である[11,13,14,17]。C A M Lは、固体腫瘍の全てのステージにおける血液中の特殊化された骨髄性倍数体細胞である。これらは、大きなサイズ（25 μmより大）、倍数体核、及び形態、すなわち、丸型、棒状、1つ又は2つの尾部が180度離れていることによって容易に同定できる。C A M Lは、通常、C D 3 1、C D 1 4、C D 4 5及びサイトケラチンを発現し、E p C A M、C D 1 4 6、C D 1 1 c及びt i e 2を発現することもある[11,13,14,17]。C A M Lは、癌特異的であり、悪性臓器の臓器部位から播種すると考えられるが、これらが実際に原発腫瘍部位に存在するか、又はこれらの臨床的有用性は、不明のままである。

【 0 0 5 4 】

C T Cの異なるサブグループは、腫瘍の増悪、腫瘍の拡散、及び腫瘍治療に応答して、表現型をアップレギュレート及び/又はダウンレギュレートする。上皮間葉転換のように状態を転換させる個々の癌細胞の能力によって、本明細書で定義される方法においてアッセイ可能な更なる循環癌細胞亜型、すなわち、上皮間葉転換C T C（E M T C T C）が生じる。E M Tは、段階的形態形成過程であり、E M T C T Cは、様々な遷移段階の細胞を包含する[6]。E M T C T Cは、通常、上皮タンパク質、例えば、E p C A M及びC Kのダウンレギュレーション、及び間葉系幹細胞タンパク質、例えば、ビメンチン及びC D 3 4のアップレギュレーションによって表される[13]。E M T C T C亜型分類は、通常、非プロテオーム法、すなわち、m R N A発現又はD N A分析を用いて行われる[13]。

【 0 0 5 5 】

本明細書で定義される方法においてアッセイ可能な癌に関連する更なる循環細胞型は、癌関連血管内皮細胞、略してC A V Eである。C A V Eは、循環内皮細胞の亜型である。腫瘍は、腫瘍血管内皮細胞によって提供される血液供給を必要とする。C A V Eは、腫瘍部位から離脱して血流中に流入する腫瘍血管内皮細胞である。C A V Eは、クラスター内に見出されることが多い。C A V Eは、サイトケラチン及びC D 3 1、C D 1 4 6、C D 1 4 4、C D 1 0 5等の様々な亜型の内皮細胞マーカーを発現するが、C D 1 4又はC D 4 5を発現しない[50]。

【 0 0 5 6 】

このような循環細胞の利用は、液体生検では十分に研究されておらず、本発明は、異なる癌、特に、関連するC T C、C A M L、C A V E、及びE M T C T Cがその表面にP D - L 1を発現する癌のスクリーニング、モニタリング、診断、及び治療において、C T C、C A M L、C A V E、及びE M T C T Cを使用する方法を提供する。

【 0 0 5 7 】

免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性のスクリーニング方法

上述のように、本発明は、免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性について癌を有

10

20

30

40

50

する対象をスクリーニングする方法に関する。この方法は、PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、循環腫瘍細胞(CTC)、上皮間葉転換CTC(EMTCTC)、癌関連マクロファージ様細胞(CAML)、及び癌関連血管内皮細胞(CAVE)のうちの1つ以上をアッセイすることを含み、PD-L1発現が検出された場合、対象は免疫チェックポイント阻害剤の感受性を有するとみなす。

【0058】

免疫チェックポイント阻害剤への応答性を予測する方法

また、本発明は、免疫チェックポイント阻害剤による治療に対する癌を有する対象の応答性を予測する方法に関する。この方法は、PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上をアッセイすることを含み、PD-L1発現が検出された場合、対象は、免疫チェックポイント阻害剤による処置に応答性を有すると予測する。

10

【0059】

免疫チェックポイント阻害剤治療を選択する方法

更に、本発明は、癌を有する対象の治療法を選択するための方法に関する。この方法は、PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上をアッセイすることを含み、PD-L1発現が検出された場合、対象の治療として、治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤の対象への投与を選択する。

20

【0060】

免疫チェックポイント阻害剤治療のための対象を特定するためのアッセイ

更に、本発明は、免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける癌を有する対象を特定するためのアッセイに関する。この方法は、PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上をアッセイすることを含み、PD-L1発現が検出された場合、対象は、免疫チェックポイント阻害剤処置を受ける対象として特定される。

【0061】

免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療方法

また、本発明は、癌を有する対象を治療する方法に関する。この方法は、(a)PD-L1発現について、癌を有する対象から単離されたCTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上をアッセイすることと、(b)PD-L1の発現が検出された場合、治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与することとを含む。免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント阻害剤及び薬学的に許容される担体を含む医薬製剤として投与できる。

30

【0062】

関連する実施形態において、本発明は、癌を有する対象を治療する方法に関する。この方法は、治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤を癌を有する対象に投与することを含み、免疫チェックポイント阻害剤は、癌を有する対象から単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上においてPD-L1発現が検出された後に投与される。免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント阻害剤及び薬学的に許容される担体を含む医薬製剤として投与できる。

40

【0063】

治療方法に関する本発明の各実施形態及び側面において、この方法は、単独の免疫チェックポイント阻害剤を用いて実施してもよく、対象の癌を治療及び阻害するための追加の手段(例えば、本明細書で定義する追加の抗癌剤)を用いて実施してもよい。このような追加の手段は、当業者に周知であり、以下に限定されるものではないが、抗癌化学療法剤及び放射線療法、並びに腫瘍の外科的除去を含む。

【0064】

本明細書で使用する、用語「治療する(treat, treating)」及び「治療(treatment)」は、通常の及び慣習的な意味を有し、対象から腫瘍又は癌を完全に又は部分的に除去す

50

ること、対象の腫瘍のサイズを縮小すること、対象の腫瘍又は癌の細胞を死滅させること、対象の癌又は腫瘍の症状を改善することの1つ以上を含む。治療は、免疫チェックポイント阻害剤が投与されていない対象と対比して、約1%～約100%の除去、縮小、死滅、又は改善を意味する。除去、縮小、死滅又は改善は、好ましくは、約100%、約99%、約98%、約97%、約96%、約95%、約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%、約5%又は約1%である。治療の結果は、永久的であってもよく、数日間（例えば、1、2、3、4、5、6、又は7日間）、数週間（例えば、1、2、3、又は4週間）、数ヶ月間（1、2、3、4、5、又は6ヶ月間以上、又は数年間（例えば、1、2、3、4、5、又は6年間以上）継続するものであってもよい。

10

【0065】

本明細書で使用する場合、用語「阻害する (inhibit, inhibiting)」及び「阻害 (inhibition)」は、通常の及び慣習的な意味を有し、癌又は腫瘍の形成、癌又は腫瘍の発症、癌又は腫瘍の成長及び転移を遅らせること (hindering)、妨げること (impeding)、遮ること (obstructing)、防ぐこと (deterring)、又は抑制すること (restraining) の1つ以上を意味する。阻害は、免疫チェックポイント阻害剤が投与されていない対象と対比して、約1%～約100%の抑制を意味する。この抑制は、好ましくは、約100%、約99%、約98%、約97%、約96%、約95%、約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、40%、約30%、約20%、約10%、約5%又は約1%である。阻害の方法は、癌又は腫瘍の臨床症状の発症前、発症時、又は発症後に対象において実施しうる。したがって、対象は、癌又は腫瘍を有する者であってもよく、単に癌又は腫瘍を発症する傾向がある者であってもよい。阻害の結果は、永久的であってもよく、数日間（例えば、1、2、3、4、5、6、又は7日間）、数週間（例えば、1、2、3、又は4週間）、数ヶ月間（1、2、3、4、5、又は6ヶ月間以上、又は数年間（例えば、1、2、3、4、5、又は6年間以上）継続するものであってもよい。

20

【0066】

考慮すべき複数の要因の僅かな例として、この方法の特定の目的又は目標、対象の年齢及び体型、対象の包括的な健康状態に応じて、免疫チェックポイント阻害剤及び免疫チェックポイント阻害剤を含む薬学的製剤を異なるスケジュールで対象に投与しうる。包括的に言えば、免疫チェックポイント阻害剤及び医薬製剤は、治療又は阻害の過程に亘って、1回又は2回、3回、4回、5回、6回又はこれ以上の回数投与しうる。投薬スケジュールにおける各投薬のタイミングは、日、週、月、又は年を単位とすることができます、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30週毎、又はこれ以上の週毎に行ってもよい。投薬スケジュールにおいて、同量の免疫チェックポイント阻害剤を投与してもよく、投与毎に投与量を変化させてもよい。また、免疫チェックポイント阻害剤の同一性は、投薬スケジュールにおける投与毎に変化させてもよく、同じであってもよい。

30

【0067】

本発明の各方法において、「治療有効量」の免疫チェックポイント阻害剤又は免疫チェックポイント阻害剤を含む医薬製剤が対象に投与される。治療有効量は、対象によって異なる。なお、治療有効量は、阻害又は治療のいずれかにおいて、その方法の目的又は目標を達成するために十分な量を意味する。例えば、本発明の方法において使用される免疫チェックポイント阻害剤の治療有効量は、通常、ペプチドが投与される対象の体重1kgあたり、約0.1μg～約10,000μgの免疫チェックポイント阻害剤の量である。また、治療有効量は、対象の体重1kgあたり、約0.5μg～約5000μg、約1μg～約500μg、約10μg～約200μg、約1μg～約800μg、約10μg～約1000μg、約50μg～約500μg、約50μg～約1000μg、約250μg～約2500μg、約500μg～約2000μg、約10μg～約800μg、約10μg～約1000μg、約1μg～約300μg、及び

40

50

約 10 μ g ~ 約 300 μ g の免疫チェックポイント阻害剤であってもよい。

【 0 0 6 8 】

当業者は、必要以上の実験を行うことなく、周知の技術によって、適切な用量及び投与スケジュールを容易に決定できる。このような決定は、部分的に、特定の用量の忍容性及び有効性に基づいて行われる。

【 0 0 6 9 】

免疫チェックポイント阻害剤又は医薬製剤の投与は、ペプチド送達の分野で一般的に知られている手段のいずれかを用いて行いうる。このような経路には、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下及び皮内の経路、並びに鼻腔内投与が含まれ、これらは、吸入、眼科的手法、経口的手法、直腸的手法、経膣的手法、又は免疫チェックポイント阻害剤又は医薬製剤を粘膜組織に接触させる他の任意の手法を含む。

10

【 0 0 7 0 】

本発明の医薬製剤は、1つ以上の免疫チェックポイント阻害剤及び薬学的に許容される担体を含む。担体の適切な例は、当業者に周知であり、水、注射用水、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、プロピレン glycol、ポリソルベート 80 (Tween-80 (商標))、ポリ(エチレン)グリコール 300 及び 400 (PEG 300 及び 400)、PEG 化ヒマシ油 (例えば、クレモフォール EL)、ポロキサマー 407 及び 188、親水性及び疎水性担体、及びこれらの組み合わせ等が含まれる。疎水性担体は、例えば、脂肪乳剤、脂質、PEG 化リン脂質、ポリマーマトリックス、生体適合性ポリマー、リポスフィア、小胞、粒子、及びリポソームを含む。これらの用語は、特に、細胞培養培地を除外する。製剤は、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤及び防腐剤、等張化剤、增量剤、乳化剤、懸濁剤又は粘度剤、不活性希釈剤、充填剤、及びこれらの組み合わせを更に含んでいてもよい。

20

【 0 0 7 1 】

本明細書に開示する方法を実施するために必要な成分を含むキットも本発明の範囲内である。キットは、1つ以上の免疫チェックポイント阻害剤及び使用説明書を含む。幾つかの側面では、1つ以上の免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント阻害剤及び薬学的に許容される担体を含む医薬製剤中に存在する。

【 0 0 7 2 】

PD-L1 発現をモニタリングする方法

30

また、本発明は、癌を有する対象における PD-L1 発現をモニタリングする方法も包含する。この方法は、(a) PD-L1 発現について、第 1 の時点で癌を有する対象から単離された CTC、EMTCTC、CAML、及び CAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、(b) PD-L1 発現について、第 2 の時点で癌を有する対象から単離された CTC、EMTCTC、CAML、及び CAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、(c) 第 1 の時点及び第 2 の時点で単離された細胞においてアッセイされた PD-L1 発現を比較することとを含む。この実施形態の特定の側面では、対象は、癌の治療を受けている。

【 0 0 7 3 】

治療をモニタリングする方法

40

また、本発明は、癌を有する対象における治療をモニタリングする方法を更に包含する。本発明は、(a) PD-L1 発現について、第 1 の時点で癌治療中対象から単離された CTC、EMTCTC、CAML、及び CAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、(b) PD-L1 発現について、第 2 の時点で癌治療中対象から単離された CTC、EMTCTC、CAML、及び CAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、(c) 第 1 の時点及び第 2 の時点で単離された細胞においてアッセイされた PD-L1 発現を比較することにより、癌を有する対象における治療をモニタリングすることを含む。この実施形態の特定の側面では、対象は、免疫チェックポイント阻害剤を用いて治療されている。

【 0 0 7 4 】

免疫チェックポイント阻害剤

50

本明細書で使用する「免疫チェックポイント阻害剤」という用語は、例えば、T細胞等の免疫系の細胞及び幾つかのタイプの癌細胞によって発現されるタンパク質を阻害又は遮断する薬物（抗体を含む）を指す。これらのタンパク質は、免疫応答を阻害し、T細胞が癌細胞を死滅させることを阻止することがある。これらのタンパク質がブロックされると、免疫系の阻害が克服され、T細胞が癌細胞を死滅させることができる。T細胞又は癌細胞について見出されるチェックポイントタンパク質の例としては、PD-1 / PD-L1及びCTLA-4 / B7-1 / B7-2が挙げられる。このように、免疫チェックポイント阻害剤は、免疫系攻撃に対する癌の主な防御（すなわち、T細胞）の1つを克服しようとするものである。

【0075】

10

本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、以下に限定されるものではないが、PD-L1アンタゴニスト、PD-1アンタゴニスト、及びCTLA-4アンタゴニストが挙げられる。

【0076】

また、本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、以下に限定されるものではないが、(i)PD-L1とPD-1との間の結合、(ii)PD-L1のその結合パートナーへの結合、(iii)PD-1のその結合パートナーへの結合、及び(iv)CTLA-4のその結合パートナーへの結合のうちの1つ以上の阻害剤が挙げられる。

【0077】

20

更に、本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、以下に限定されるものではないが、モノクローナル抗体等の抗体が挙げられる。特定の側面において、免疫チェックポイント阻害剤は、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である。また、免疫チェックポイント阻害剤としては、その阻害活性を保持する抗体断片も挙げられる。このような抗体断片は、以下に限定されるものではないが、Fab断片、F(ab')2断片、及び一本鎖Fv(scfv)が挙げられる。一側面では、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1、PD-1、又はCTLA-4に対する結合特異性を有する抗体又はその抗体断片である。

【0078】

30

具体的な免疫チェックポイント阻害剤の例は、以下に限定されるものではないが、ニボルマブ（Nivolumab）（オブジーボ：Opdivo）、イピリムマブ（Ipilimumab）（ヤーボイ：Yervoy）、ペムブロリズマブ（Pembrolizumab）（キイトルーダ：Keytruda）、アテゾリズマブ（Atezolizumab）（テセントリク：Tecentriq）、トレメリムマブ（Tremelimumab）、及びデュルバルマブ（Durvalumab）（MED14736）のうちの1つ以上が挙げられる。

【0079】

抗癌剤

癌の治療に関する本発明の実施形態及び側面において、方法には、免疫チェックポイント阻害剤に加えて治療有効量の1つ以上の抗癌剤を対象に投与することが含まれうる。

【0080】

30

抗癌剤は、同じ対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤と適合性を有するという点においてのみ限定される。

【0081】

40

追加の抗癌剤としては、以下に限定されるものではないが、免疫療法剤、化学療法剤、放射線治療薬、既存の癌剤、CCR5及びCXCR4が挙げられる。具体的な抗癌剤の例には、以下に限定されるものではないが、T-VEC、AM-0010、CXCR4アンタゴニスト、TGF-βキナーゼ阻害剤ガルニセルチブ（galunisertib）、抗CSF-1Rモノクローナル抗体、アベマシクリブ（Abemaciclib）、ファスロデックス（Faslodex）、ネシツムマブ（necitumumab）、AZD9291、サイラムザ（Cyramza、ラムシルマブ（ramucirumab））、TPIV200、ガルニセルチブ（Galunisertib）、癌ワクチン、サイトカイン、細胞ベースの療法、二重及び多重特異性抗体、腫瘍ターゲティングmAbs、リツキシマブ（Rituximab）、腫瘍溶解性ウイルス、レオウイルス、ブリ

50

ナツモマブ (Blinatumomab) 、シプリューセル - T (Sipuleucel-T) 、T - Vec 、
 I L - 2 、I FN - 、トラスツズマブ (Trastuzumab) 、セルキシマブ (Celiximab) 、ベバシズマブ (bevacizumab) 、Tim - 3 、BTLA 、抗I L - 10 、GM - CS F 、抗血管新生治療、VEGF遮断薬、HMG B 1 、Nrp 1 、TAM受容体チロシンキナーゼ、Ax 1 、MertK 、ALT - 803 、IL - 15 、免疫抑制リガンドホスファチジルセリン (Ligand Phosphatidylserine: PS) 、バビツキシマブ (bavituximab) 、ベバシズマブ (bevacizumab、抗VEGF) 、コブルメチニブ (cobimetinib、MEK阻害剤) 、ベムラフェニブ (vemurafenib、BRAF阻害剤) 、エルロチニブ (erlotinib、EGFR) 、アレクチニブ (alectinib、ALK阻害剤) 、ベバシズマブ (bevacizumab、抗VEGF) 、パゾパニブ (pazopanib、チロシンキナーゼ阻害剤) 、ダブラフェニブ (dabrafenib、BRAF阻害剤) 、トラメチニブ (trametinib、MEK阻害剤) 、デュルバルマブ (durvalumab、抗PD - L1) 、スニチニブ (sunitinib、RTK阻害剤) 、パゾパニブ (pazopanib、RTK阻害剤) 、サルグラモスチム (sargramostim) 、VISTA 、TIM - 3 、LAG - 3 、PRS - 343 、CD137 (4 - 1BB) /HER2二重特異性抗体、USP7 、抗HER2 、SEMA4D 、CTLA - 4 、PD - 1 、PD - L1 、及びPD - L2 のうちの1つ以上が含まれる。

【0082】

PD - L1 発現をアッセイするための手段

本説明から明らかなように、本発明の方法は、細胞におけるPD - L1 発現のアッセイ、すなわち、検出及び/又は測定に基づいている。本発明の一側面では、単に、選択された細胞がPD - L1 を発現しているか否かを判定することで、本明細書で定義する方法のそれぞれを使用できる。したがって、これらの方法は、細胞内のPD - L1 発現の量を定量化する必要なく実施できる。なお、本発明の別の側面では、本明細書で定義する方法のそれぞれは、細胞によるPD - L1 発現の相対量又は特定量を判定することによって使用できる。相対量は、例えば、細胞が他の細胞又は標準よりも多くのPD - L1 を発現しているか否かを判定することによって判定してもよい。特定量は、例えば、細胞中のPD - L1 発現のレベルを定量化することによって判定してもよい。

【0083】

PD - L1 発現は、PD - L1 タンパク質発現を検出/測定すること、及びPD - L1 mRNA 産生を検出/測定することの1つ以上によってアッセイしうる。PD - L1 タンパク質発現は、例えば、免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) を介して検出/測定しうる。IHCは、膜染色、細胞質染色、又はこれらの組み合わせによって行いうる。IHCは、抗PD - L1 抗体、例えば、以下に限定されるものではないが、E1L3N 、SP142.2 、28 - 8 、22C3 、EPR19759 、MIH2 、MIH5 、MIH6 、ABM4E54 、130021 、EPR20529 、10F.9G2 、及びCD274 を用いて行いうる。PD - L1 タンパク質発現は、弱い染色強度、中程度染色強度、又は強い染色強度として検出/測定しうる。また、PD - L1 タンパク質発現は、低染色強度、中程度染色強度、又は高染色強度として検出しうる。また、PD - L1 タンパク質発現の検出は、低染色強度から高染色強度へ経時的に誘導可能であるとして検出してもよく、低染色強度から中程度染色強度へ経時的に誘導可能であるとして検出してもよく、中程度染色強度から高染色強度へ経時的に誘導可能であるとして推定してもよい。また、PD - L1 タンパク質発現は、単に単離された細胞のいずれかの染色、例えば、バックグラウンド上の任意の量の染色として検出/測定してもよい。

【0084】

特定の側面において、IHCは、免疫蛍光 (immunofluorescence: IF) 染色を用いて実施される。PD - L1 に対する結合特異性を有する1つ以上の抗体を利用してPD - L1 タンパク質発現を検出してもよい。PD - L1 に対する抗PD - L1 抗体の結合は、抗PD - L1 抗体にコンジュゲートされた蛍光化合物又は他の検出可能な標識を介して検出してもよく、抗PD - L1 抗体に対する結合特異性を有する、二次抗体にコンジュゲートされたフルオロフォア又は他の検出可能な標識を介して検出してもよい。

10

20

30

40

50

【0085】

上で定義した特定の関連する実施形態及び側面では、P D - L 1 発現レベルが癌に罹患していない同じ種の対象由来の間質細胞の集団の P D - L 1 発現よりも大きい場合に、P D - L 1 発現が検出されたと判定する。

【0086】

細胞のソース

本発明の方法で使用される細胞は、C T C、E M T C T C、C A M L、及びC A V E のうちの 1 つ以上を含む。したがって、これらの方法は、これらのタイプの循環細胞の 1 つ、2 つ、3 つ、又は 4 つ全てを使用して実施しうる。

【0087】

細胞は、末梢血等の血液を含む、細胞を見出すことができる任意の体液から取得しうる。例えば、セルセーブ保存チューブ（登録商標：CellSave preservative tubes）内に血液サンプルを採取し、例えば、低圧真空システムを使用するセルシーブ（CellSieve：商標）マイクロフィルトレーションアッセイ（CellSieve Microfiltration Assay）によって血液を処理してもよい。

【0088】

対象 (Subject(s))

本発明の方法において言及される対象は、ヒト、非ヒト霊長類、トリ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、並びにイヌ、ネコ、齧歯類等のペット動物、又は他の哺乳類が挙げられる。

【0089】

癌を有する対象は、癌の治療を受けている者であってもよい。このような治療には、以下に限定されるものではないが、標的薬剤投与、化学療法、及び放射線療法が挙げられる。癌は、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、メラノーマ、膀胱癌、腎臓癌、頭頸部癌、大腸癌、肝臓癌、卵巣癌、神経芽細胞腫、肉腫、骨肉腫、食道癌、脳及びその他神経系癌、喉頭癌、気管支癌、口腔及び咽頭癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮頸癌、又は子宮体癌の 1 つ以上でありうる。癌は、固形腫瘍、例えば、ステージ I、ステージ I I 、ステージ I I I 又はステージ I V の固形腫瘍であってもよい。固形腫瘍は、以下に限定されるものではないが、癌腫、肉腫、神経芽細胞腫又はメラノーマであってもよい。肺癌の例には、以下に限定されるものではないが、非小細胞肺癌（non-small cell lung carcinoma：N S C L C）でありうる。

【0090】

R A D 5 0 巢 (RAD50 Foci)

上で定義した特定の関連する実施形態及び側面において、少なくとも 1 つの C T C、E M T C T C、C A M L、又はC A V E は、少なくとも 1 つの R A D 5 0 巢を示す。

【0091】

部位指向性放射線を受ける腫瘍に由来する細胞は、電離放射線誘発性 D N A 損傷によってマーキングされ、腫瘍及び間質細胞を含む[18-24]。したがって、放射線治療における腫瘍部位に由来する循環細胞は、電離放射線誘発病巣（I R I F）等の D N A 損傷の証拠を有するはずであり、これは、R A D 5 0 で視覚化できる[18-24]。R A D 5 0 は、タンパク質N B S 1 及びM R E 1 1 と複合体を形成するタンパク質であり、放射線及び/又は化学薬品による治療に続く D N A 二本鎖修復プロセスにおいて重要である。正常な哺乳類細胞では、R A D 5 0 は、細胞質と核の両方に分布する。D N A の二本鎖切断に続いて、R A D 5 0 / N B S / M R E 1 1 複合体は、破壊された部位に急速に転位し、破壊が修復されるまで、凝集した核病巣、例えば、I R I F を形成する[18,20,23,25]。したがって、R A D 5 0 は、腫瘍塊を標的とした放射線に直接暴露された患者からの細胞の生物学的タグとして機能する、高レベルの放射線に曝された細胞の特定の識別子として使用できる[18-24,26-28]。

【0092】

I I I . 実施例

実施例 1

10

20

30

40

50

血液サンプル採取

ステージ I ~ I V 肺癌を有する 41 人の患者について、前向きパイロット研究を行った（表 1）。書面によるインフォームドコンセント及び現地 I R B の承認に従って、匿名化された末梢血サンプルを採取した。2013 年 7 月から 2014 年 5 月の期間、原発性肺癌の放射線療法を開始する前の患者を募集した。4 例の患者はステージ I 疾患のための体幹部定位放射線治療（Stereotactic Body Radiation Therapy : S B R T）を受け、37 例の患者は、ステージ I I - I V 疾患のための、プロトン療法（n = 16）又は強度変調放射線療法（Intensity-modulated radiation therapy : I M R T）（n = 21）を用いた化学放射線療法を受けた。匿名の血液サンプル（7.5 mL）を採取し、MD アンダーソン癌センター（MD Anderson Cancer Center : M D A）においてオンラインで処理した。スライドを匿名化し、クリーティービーマイクロテック社（CreativeMicroTech, Inc.）の臨床試験室に搬送し、ここで分析を行った。製造業者のプロトコール（ダコ（D A K O））に従って、原発腫瘍由来の匿名化生検サンプルを M D A において処理した。この施設からの結果は、研究の完了までは、共有されず、伝達されなかった。

【表 1】

表 1. 患者集団の概要

		患者数
ステージ	I	6
	II	6
	III A	11
	III B	13
	IV	5
化学療法歴	あり	14
	なし	27
病理学的等級	1	3
	2	10
	3	28
組織学	NSCLC	31
	扁平上皮細胞 NSCLC	6
	SCLC	1
	不明	3

【0093】

セルシーブ（CellSieve：商標）低フローマイクロフィルトレーション手順

低圧真空システムを用いたセルシーブ（商標）マイクロフィルトレーションアッセイ（CellSieve Microfiltration Assay）によって、セルセーブ保存チューブ（CellSave preservative tubes：商標）に採取した血液サンプル（7.5 mL）を処理した[1,12]。セルシーブ（商標）マイクロフィルトレーションアッセイは、> 7 ミクロンのサイズ排除に基づいて循環細胞を分離する。形態学的特徴及び C D 4 5、E p C A M、サイトケラチン 8, 18, 19 及び D A P I の表現型発現に基づいて、事前に知られている細胞学的特徴[6,11,14]を用いて、熟練した細胞学者が予後に病理学的に定義可能な C T C (P D C T C)、E M T C T C、及び C A M L を同定した（図 1 及び図 2）[1,6,12]。イメージングの全てにおいて、オリンパス B X 5 4 W I 蛍光顕微鏡と共にカールツァイス（CarlZeiss）A x i o C a m 及び Z e n 2 0 1 1 B l u e（カールツァイス）を使用した。

【0094】

P D C T C / E M T C T C 亜型及び C A M L の列挙

10

20

30

40

50

癌患者に見出される2つの最も一般的なCTC亜型(PDCTC S及びEMTCTC)の定義的な特徴及びCAML同定のための特徴は、既に開示されている[1,6,10~14]。本研究では、無傷のPDCTC、EMTCTC、及びCAMLのみを特徴付けた(図2及び図3)[1,6,10~14]。PDCTCは、CD45陰性であり、線維性サイトケラチン陽性であり、悪性病理学的基準を有するDAP I陽性核を有し、CTCのセルサーチ(CellSearch:登録商標)亜型として分類される[1,6,10~14]。EMTCTCは、これまでに定義されているように、CD45陰性であり、拡散性サイトケラチンシグナル及び異常な基準を有するDAP I陽性核を有する[1,6,9,12,13]。CAMLは、拡大された(>30 μm)、拡散した細胞質サイトケラチン染色を伴う多核細胞、及び/又はCD45+/CD14+として記述される[6,11,14,17,22,43]。3つの細胞型については、全て、熟練したCTC細胞学者が同定し、画像化し、病理学者が確認した。上述のような細胞学的分類ができるなかったアポトーシス性CTC及びCTCは、含まれなかった。同定の後、細胞を画像化し、将来の分析のために各セルのx-y軸をマークした。サンプルは、4で1~3年間保存した。

【0095】

PD-L1及びRAD50のQUAS-Rクエンチング及び再染色

PDCTC、EMTCTC、及びCAMLの最初の同定及び定量化の後、蛍光をクエンチし、RAD50-DyLight550(Pierce Thermo)、PD-L1-Alexa Fluor488(R&D systems社)、及びDAP I核染色(図1)によってサンプルを再染色した。既に開示された、QUAS-R(クエンチ、非誘導体化、アミンストリップ及び再染色(Quench, Underivatize, Amine-Strip and Restain)技術を使用した[13]。簡単に説明すると、サンプルを撮像し、マークした後のフィルターに、クエンチング溶液、トリス、及び洗浄ステップの順次的化学処理を施した。化学的クエンチングの後、フィルターをPBSで洗浄し、1XPBS/20%FBSでインキュベートし、次に、RAD50-Alexa Fluor550及びPD-L1-Alexa Fluor488に対する抗体と共に、室温で1時間インキュベーションの後、フィルターを1XPBSで洗浄し、Fluoromount-G/DAPI(Southern Biotech社)によってスライドマウントした。サンプルをx/y軸に沿って配向させ、Zen2011Blue(カールツァイス)マーク及び発見ソフトウェアを用いて先に画像化した細胞を再配置した。Zen2011Blue(Carl Zeiss社)を用いて画像を処理した。

【0096】

原発腫瘍生検におけるPD-L1の定量化

ダコpharmD xクローン22c3及びダコpharmD xクローン28-8の両方を用いて、製造業者のガイドラインに従い、利用可能な全ての原発腫瘍生検からのPD-L1発現を分析した(図4)。この研究の8人の患者については、両方のクローンをスクリーニングするために十分な腫瘍サンプルが保存されており、1つのサンプルは、クローン22c3に対する単一のIHC試験のために十分な腫瘍を保存していた。両方のクローンを、既に開示されている標準操作手順[29-31,38]に従って染色した。

【0097】

循環細胞におけるRAD50及びPD-L1の定量化

各細胞の核局在化RAD50遺伝子座を列挙することによってRAD50遺伝子座の形成を判定した(図1及び図5)[23]。細胞全体の面積を用いて、ZenBlueソフトウェアにより各細胞のPD-L1ピクセル強度を測定した。各画像の局所的バックグラウンドの平均ピクセル強度から各セルの平均ピクセル強度を減算した(図1C)。細胞の平均ピクセル強度を0-負(ピクセル平均0~150)、1-低(ピクセル平均151~300)、2-中(ピクセル平均301~750)、及び3-高(ピクセル平均751+)の4つのIHC群に四分化した(図5)。IHCスコアリングのためのPD-L1強度のIHC範囲閾値は、150ピクセル強度を、局所化されたバックグラウンドシグナルの標準偏差とし、300ピクセル強度を、局所化されたバックグラウンドの標準偏差の2倍とし

10

20

30

40

50

、750を、局所化されたバックグラウンドの強度の2倍とすることによって定義した(図5)。

【0098】

統計的方法

MATLAB R2013Aにおいて、全ての亜型及び既知の患者集団からのカウントを用いて解析を行った。無増悪生存期間 (progression free survival) 分析のために、増悪までの時間を、T0 血液サンプルを取得したときから、増悪の日までと定義し、24ヶ月のエンドポイントまで全ての患者について研究を行い、すなわち、研究を打ち切った患者はなかった。RAD50 巢形成及びPD-L1 発現の平均変化の有意性は、スチューデントのT検定によって判定した。個々の測定値について、ピアソン係数を使用して、RAD50 巢とPD-L1 発現との間の相関を判定した。カプランマイヤープロットの有意性は、ログランク分析によって判定した。

10

【0099】

結果

LC患者におけるPDCTC、EMTCTC、及びCAML

セルサーチ (CellSearch:登録商標) プラットフォームを使用するNSCLC患者におけるCTC亜集団は、通常、非転移性症例のうち、0~5%にしか見出されないことが報告されている。これに対し、EMTCTC集団は、通常、非転移性患者集団の約80%に見出され、CAMLについては、NSCLCにおける広範に亘る評価は行われていない[3-6,8,15,17,43-45]。放射線療法の開始前に採取された最初のベースライン血液サンプル (T0) では、41サンプル中35サンプル (85%) において、少なくとも1つのサイトケラチン陽性細胞 (すなわち、PDCTC、EMTCTC、又はCAML) を同定できた(図1及び図3)。その後、放射線療法開始から2~3週間後、又はSBRT患者については最後の分画の後に、患者の第2のフォローアップサンプル (T1) を採取した。T1については、41サンプル全て (100%) に少なくとも1つのサイトケラチン陽性細胞 (すなわち、PDCTC、EMTCTC、又はCAML) が見出された。具体的には、EMTCTCは、T0サンプルの49%及びT1サンプルの66%に見出された。CAMLは、T0サンプルの81%及びT1サンプルの100%に見出された(図3)。PDCTCは、T0において1サンプル (2%) のみ、T1において3サンプルのみ (7%) に見出された(図3)。PDCTCは、セルサーチ (CellSearch:登録商標) CTCシステムによって単離された同じCTC集団であることが示されており、これらの数値は、これまでの報告[7-9,15]に合致する。セルサーチシステムは、ステージIIのNSCLCでは0~5%の陽性、ステージIVでは21~32%の範囲で、NSCLC患者のCTCを単離した[7-9,15]。患者のうちの35人がステージI-IIとして病期分類されたので、2~7%は、通例的なCTC集団の範囲内である(表1)[7-9,15]。通例的なPDCTC集団の発生率が低いことは、サンプルの85% (T0) 及び100% (T1) に存在するEMTCTC及びCAMLとは対照的である(図3)。EMTCTC単独では、NSCLCにおける液体生検に対する感度が幾らか向上する可能性があると推論されてきたが[7-9,16]、これらの結果は、EMTCTC及びCAMLの両方の組み合わせによって、腫瘍由来細胞を分析する血液ベースの診断の感度が向上することを示唆している。

20

【0100】

放射線照射された細胞の生物学的トラッカーとしてのRAD50

これまで、原発腫瘍の部位からの末梢血への播種としてCTC及びCAMLが記述されてきたが、これらの細胞が循環に入る前に存在する正確な位置を確認した研究は未だなされていない。このように起原が不明であることの主な理由は、患者の腫瘍/間質細胞を標識し、これらの播種を追跡することが困難であり、このような実験が患者に危険をもたらす可能性があるためである。哺乳類細胞におけるIRIF形成物内のRAD50 巢が、細胞への直接放射線曝露の生物学的トラッカーとして示されたことはあったが、これは、放射線治療を受けている患者の循環腫瘍又は間質細胞においては、未だ評価されていない。

T0ベースラインにおける非照射LC患者において、EMTCTC細胞内のRAD50 巢

30

40

50

の核当たりの巣数は、0～4の範囲であり、平均は 0.59 ± 0.97 であり、CAMLでは、巣数は、0～5の範囲であり、平均 0.38 ± 1.07 であった（図6及び図7）。RAD50巣は、通常、少数の未治療細胞で同定される正常な生物学的修復メカニズムであるため、細胞内に幾つかのRAD50巣が存在することは、驚くべきことではない[2,1,23,24]。T1において患者を腫瘍指向性放射線療法に曝露した後、RAD50巣数は、EMTCTCにおいて、核当たり0～9、平均 4.27 ± 2.63 及びCAMLにおいて、核当たり0～20、平均 3.9 ± 3.93 に有意に増加した（図6）。この増加は、T0及びT1の両方の時点（n=35）で検出可能な細胞を有する全ての患者において観察され、正常なCD45+白血球のバックグラウンドでは殆ど見いだされなかつた（図1B）。このように、EMTCTC及びCAMLの両方において、RAD50は、T0における平均0.48からT1における平均4.05（p<0.0001）に増加した（図6）。これらの結果は、RAD50を使用して、腫瘍部位に由来する照射された細胞を標識及び追跡でき、したがつて、腫瘍動態を追跡できることを示唆している。

【0101】

循環細胞におけるPD-L1の動的発現

放射線を含む様々な細胞傷害性療法によって、腫瘍にPD-L1が誘発され得ることが示唆されている[29-34,36-40,42]。BBBを使用してこれを視認できるかを判定するために、T0及びT1の時点でPD-L1染色を評価した。従来の0-3IHC組織生検スコアリングと同様の方法で、標準化された比較スコアリングシステムを開発した（図5）。染色及び画像化の後、LC患者において見出された全ての373細胞のPD-L1発現及び局所バックグラウンドを測定した。各画像の局所的バックグラウンドのピクセル強度を 375 ± 150 に平均化した（図5）。局所化されたバックグラウンド効果を考慮するために、測定された各細胞から各画像のバックグラウンドを減算し、PD-L1ピクセル強度範囲を17-3090に補正した（図5）。次に、0～150ピクセルのバックグラウンドの標準偏差をスコア0（細胞の26%）とし、標準偏差の2倍（151-300ピクセル）をスコア1（低発現、細胞の42%）として、補正したピクセル強度で細胞を分類した。中程度の発現、すなわちスコア2（細胞の22%）は、平均バックグラウンドシグナル（301-750ピクセル）の2倍として判定し、高発現、すなわちスコア3（細胞の10%）を平均バックグラウンドシグナルの>2倍（>750ピクセル）に設定した（図5）。

【0102】

PD-L1のピクセル強度は、EMTCTCでは、T0で平均 384 ± 484 、T1で 672 ± 669 （p=0.021）であり、CAMLでは、T0で平均 182 ± 89 、T1で 282 ± 169 （p=0.004）であった（不図示）。回帰分析により、T0からT1にかけて、RAD50とPD-L1との間に弱いが有意な正の相関が見出された（ピアソンR $2=0.079$ 、p<0.0001、n=373）。患者間で、RAD50は、T0からT1にかけて確実に誘発されたが、個々の患者におけるPD-L1発現の変化は、遙かに多様であった（不図示）。T0およびT1の両時点で評価可能であった35人の患者において、T0とT1との間にPD-L1発現の3つの異なるパターンを見出した。18人の患者（51%）は、両方の時点でPD-L1の発現がなく/低く、6人の患者（17%）は、両方の時点で持続的に中/高PD-L1を有し、11人の患者（32%）は、低い0/1スコアから2/3スコアに増加した（不図示）。

【0103】

原発組織、CTC及びCAMLにおけるPD-L1レベルの比較

クローン22c3及び28-8（ダコ（DAKO））を使用する市販の2つのCLIA認定試験を使用して、IHCによる元の診断生検から利用可能な組織を染色した。病理学的アーカイブから有用な組織又は細胞ブロックを回収できたのは、41人の患者のうち9人のみであり、1回のIHC検査に十分な組織を有していたのは、これらの9人の患者のうち1人のみであった（図4）。これは、腫瘍壊死又は小結節の結果、PD-L1 IHC試験を行うために十分な集団が得られなかつたためである。9個のアーカイブサンプルの

10

20

30

40

50

うち、2個のみがPD-L1染色陽性であり、2個の試験間で発現スコア及びパーセンテージの変動があった(図4C)。これに対し、PD-L1発現は、BBBを使用して、T0患者サンプルの85%(n=35/41)及びT1患者サンプルの100%(n=41/41)で定量可能であった。具体的には、T0において、EMTCTC及びCAMLは、21人の患者(60%)において低/負(スコア0/1)のPD-L1発現を示し、9人の患者(26%)において中等度(スコア2)の発現を示し、5人の患者(14%)において高(スコア3)の発現を示した(図4C)。

【0104】

T0において、循環細胞におけるPD-L1の発現は、28-8IHCクローン結果を用いて評価した2つのIHC陽性染色サンプルについてのIHC生検結果との整合性が高かった(図4C)。3人の患者は、IHCによる陰性のPD-L1組織に一致し及び循環細胞での低い発現(0/1)を示したが、3人の患者は、陰性組織IHC PD-L1では不一致の結果を示し、循環細胞では2/3のスコアを示し、1人の患者は、T0サンプルにおいて循環細胞を欠いていた(図4)。サンプル数が限られているため、適切な統計解析は不可能であった。しかしながら、これらの結果は、一次生検では、PD-L1発現をアッセイするために組織が不十分であるが、血液ベースの生検(Blood Based Biopsy: BBB)法によって、内因性レベルを測定し、原発性肺腫瘍に見出される細胞集団に由来する循環細胞中に存在するPD-L1発現の変化をモニタリングできることを示唆している。

【0105】

潜在的な予後マーカーとしての循環細胞中のPD-L1及びRAD50

組織生検では、バイオマーカーPD-L1の発現のみでは、肺癌における生存の予後指標にならず、一方、RAD50の巣形成は、生存と正の相関を有することが示されている[14,18,20,24,29,30,32,35,39,40,42]。T0とT1の両方の時点でのPD-L1の発現又はRAD50の平均数に基づいて患者の臨床転帰を分析した(図8)。PD-L1の発現を用いてPFSを比較するために、カットオフ基準として中程度の発現、すなわち、2つのコホートについて、<2対2を使用した。T0においてPD-L1が低い患者は、1.8の僅かに悪いハザード比(hazard ratio: HR)を有し、これは、有意ではなかった(p=0.305)。T1では、PD-L1が低い患者は、全体的PFSがやや良好(HR=0.7)であったが、これも有意ではなかった(p=0.581)。このデータは、T0又はT1におけるPD-L1レベルの発現に基づく全体的PFSとの相関が限定的又は相関が認められないことを示唆している。PFS中央値を使用することにより、T0においてより高いPD-L1を有する細胞において、PFS中央値へのより良好な傾向(16ヶ月対>24ヶ月間)を見出しつたが、これを確認するには、遙かに大きなサンプルサイズが必要である。

【0106】

組織生検におけるRAD50巣の形成は、生存と正の相関を有することが示されているため[18,20,24,26]、循環細胞におけるその予後値を評価した(図8)。T0におけるEMTCTC及びCAMLのRAD50巣数は、全体的PFSにおいて臨床的に差がなかった(HR=1.0、p=0.775)。一方、T1においてRAD50巣が多い患者では、全体的PFSが改善される有意ではない傾向があった(HR 2.3、p=0.27)(図8)。このように、全体的PFSは、有意差がなかったが、RAD50巣/細胞が1の患者と比較して、RAD50巣/細胞が>1の患者では、PFS中央値が1.9倍長かった(それぞれ、9.8ヶ月対18.5ヶ月)。このデータは、放射線療法後の循環細胞におけるRAD50の増加は予後値を有する可能性があり、更なる検証とより大きなサンプルサイズの観察が必要であることを示唆している。

【0107】

前段に示した結果の通り、(化学療法)放射線療法を受けている41人の肺癌患者からの3つの循環血液細胞亜型PDCTC、EMTCTC、及びCAMLにおけるPD-L1レベル及びRAD50巣を前向きに及び逐次的に追跡した。放射線誘導RAD50巣形成

10

20

30

40

50

に基づいて、循環細胞を表現型分類し、原発性肺腫瘍塊に現れる細胞の明確な生物学的变化を定量的に追跡した。更に、これらの動的変化の追跡を用いて、放射線療法に対してより感受性が高まった腫瘍を有する患者を区別できる可能性があるが、より大規模な研究が必要である。

【0108】

多くのグループが、放射線損傷細胞の核における R A D 5 0 巢形成によって、 I R I F の形成が観察されることを立証し(図9)[18,20,23]、 D N A 損傷ストレッサーによる事前の感作による I R I F 形成の阻害が、多くの癌(すなわち、 N S C L C 、乳癌、扁平上皮癌等)において、臨床転帰と正の相関を有することが示された[18,20,23,24,26]。まず、放射線療法前の未治療の N S C L C 患者は、 R A D 5 0 巢の数が少なく、放射線療法の導入に直接的に並行して、 R A D 5 0 巢が大幅に増加することを観察した。この R A D 5 0 の増加は、放射線治療導入によって誘発される D N A 損傷の結果である可能性が高く、循環細胞における R A D 5 0 巢形成は、部位特異的放射線療法を受けている癌患者の非侵襲的トレーサーとして機能すると考えられる。 R A D 5 0 は、循環細胞の原発部位の器官を確認するために液体生検分析と同様に使用でき、これは、患者の原発肺塊から E M T C T C 及び C A M L の両方が播種していることを示唆していると考えられる。

【0109】

P D - L 1 発現に関する現在承認されている生検組織の I H C 試験は、非常に高レベルの P D - L 1 発現を伴う患者における応答の予測因子に過ぎないものの、やがて多くの P D - L 1 陰性患者も利益を得るであろう[29,30,33,39-42,46]。この不一致は、免疫調節発現の動的性質及び/又は間質細胞成分を分析できないことに起因する可能性がある。免疫チェックポイントタンパク質発現は、動的であり、複数の微小環境、炎症、及び治療因子の影響を受けるため、血液ベースの分析が患者における現在の P D - L 1 発現のより正確な表現を提供し得るとの仮説が立てられてきた[29,30,39,42,43,47,48]。興味深い点として、我々は、患者の循環細胞において持続的に低、持続的に高、又は低から高へ誘導可能な3つのクラスの P D - L 1 応答を見出し、これは、患者の約3分の1(32%)で生じた。これは、患者の約半分(49%)において、本質的に高レベル又は誘導性の P D - L 1 レベルが免疫療法応答を予測できることを示唆しており、これは、免疫療法と放射線療法を組み合わせた臨床試験において、将来の検証が必要な仮説である。

【0110】

実施例 2

腫瘍血管内皮細胞(tumor endothelial cell : T E C)[60-62]は、血管新生及び新生血管形成のための重要な構造を形成することによって、腫瘍の開始、生存及び成長に必要とされる間質細胞の集団である。 T E C は、全ての腫瘍部位において必須成分であり、腫瘍脈管構造に必要とされ、転移性ニッチのプライミングを補助し、腫瘍の分子不安定性に寄与する。循環において、共通の T E C 集団が同定されており、これらは、これらの大さなサイズ、多細胞クラスター化、及び周知の E C マーカー C D 3 1 及びビメンチン(Vimentin)[60]に基づいて、癌関連血管内皮細胞(C A V E)として定義されている。

【0111】

サイズ排除は、これらの表面マーカー発現にかかわらず、末梢患者の血液から大きな細胞を単離し、循環腫瘍 E C の多くの亜型の捕捉を可能にする技術である。セルシーブ(C e l l S i e v e : 商標)マイクロフィルターは、全血から C A V E 、 C A M L 、及び C T C を迅速かつ効率的に分離できるサイズ排除膜であり、これにより、悪性疾患と共に、及びこれと関連して、全ての細胞タイプを研究することが可能である[13,60-62]。更に、セルシーブ(C e l l S i e v e : 商標)マイクロフィルターを使用して、単離された細胞上の亜型のバイオマーカーの質量スクリーニングを可能にする多重表現型技術(multi-phenotyping technique)が開発されている

【0112】

この手法を実証するために、2012~2014年に亘って、116人の癌患者(ステージI~IV)の胸部(n = 42)、肺(n = 39)、及び前立腺(n = 35)を含む末

10

20

30

40

50

梢血サンプル並びに34人の健常対照群から血液を採取した。確立されたフィルタリング法、すなわち、セルシーブ (CellSieve: 商標) マイクロフィルトレーション技術 (クリエイティブマイクロテック社: Creatv MicroTech) によって血液を処理し、サイズ排除によって血液を濾過し、CK8、18、19、EpCAM及びCD45について細胞を染色した (図10A)。同定及び画像化の後、QUAS-R (クエンチ、非誘導体化、アミンストリップ及び再染色 (Quench, Underivatize, Amine-Strip and Restain) 技術を使用して、蛍光シグナルを除去し、CD146、CD14、ビメンチン、及びDAPIについて全ての細胞を再染色した (図10B)。再イメージングの後、再びQUAS-R を用いて蛍光を除去し、CD144、CD34 (又はCD105)、CD31、及びDAPIについて細胞を再染色した (図10C)。CAMLで観察されたCD14+及び倍数体核構造を用いて、CAVEの多核クラスターが癌関連マクロファージ様細胞と区別された。

【0113】

CAVEは、CD31、CD144又はCD146の陽性に基づいて、116人中63人 (54%) で同定されたが、健常対照群では検出されなかった。CAVEは、ステージI患者の43%、ステージII患者の66%、ステージIII患者の74%、及びステージIV患者の82%において見出された (図11)。CAVEは、胸部の69%、肺の60%、及び前立腺の77%のサンプルで見出された。CAVEは、CD14及びCD45について全て陰性であった。CD31がCAVEの96%で見出された最も多く存在するマーカーであり、これに、CD144 (85%)、サイトケラチン (68%)、CD34 (64%)、CD146 (45%)、EpCAM (23%) 及びCD105 (4%) が続いた (図12)。

【0114】

この結果は、マイクロフィルトレーションによって単離されたCECは、サイトケラチン陽性であり、CD45陰性であり、これは、 固形腫瘍を有する患者の循環系に共通に現れるが、健常対照群には現れないことを示している。複数の表現型の亜型によって、複数の 固形腫瘍タイプの癌患者のCECを適切に識別し、亜型化できる。このデータは、CECのサブセット、例えば、CAVEがCK+/CD45-として循環細胞に見出され、癌特異的循環細胞の異種集団として存在することを示唆している。

【0115】

実施例3

図13は、細胞のクラスター中に出現するCAVEを検証するための染色を示している。癌腫患者から捕捉された全ての細胞の最初の染色において、DAPI、サイトケラチン8、18及び19、EpCAM及びCD45についてサンプルを染色した。図13の一番上の列は、サイトケラチン発現、及びEpCAM、CD45発現なしのクラスターを示している。図13の二番目の列は、DAPI、PD-L1、CD14及びCD31について細胞が再染色されたことを示している。CD31+膜染色及び陰性CD45及びCD14染色は、これがCAVEクラスターであることを示している。このCAVEのクラスターは、PD-L1の高発現を有する。図13の三番目の列は、CD144、CXCR4及びビメンチンについて細胞が再染色されたことを示している。CXCR4は、他の薬剤標的である。再染色のためにQUAS-Rを使用し[13]、この再染色は、蛍光色素をクエンチングし、続いて再染色することからなる。この再染色は、併用免疫療法を分析する方法を示している。この例では、PD-L1とCXCR4の両方の発現が高く、この併用療法は、この患者にとって有効である可能性があることを示している。

【0116】

図14は、DAPI、サイトケラチン8、18及び19、EpCAM及びCD45について初期的に染色されたCAML細胞を示している (一番上の列)。図14の二番目の列は、DAPI、PD-L1、CCR5及びPD-1について細胞が再染色されたことを示している。この例では、PD-L1とCCR5の両方の発現が高く、この併用免疫療法がこの患者にとって有効である可能性があることを示している。

【0117】

10

20

30

40

50

図15は、DAPI、サイトケラチン8、18及び19、EpCAM及びCD45について初期的に染色されたCAML細胞を示している（一番上の列）。図15の二番目の列は、DAPI、PD-L1、CCR5及びPD-1について細胞が再染色されたことを示している。この例では、CCR5が存在するがPD-L1の発現はなく、この併用免疫療法がこの患者にとって有効である可能性があることを示している。

【0118】

実施例4

現在の免疫療法コンパニオン診断は、組織生検におけるPD-L1タンパク質発現に基づいている。しかしながら、IHC組織生検法は、生検を繰り返すことの臨床的実現可能性及びコスト、固有の腫瘍異質性、及びPD-L1 IHC陰性患者が依然として免疫療法に応答する可能性があるとの知識のために制限されている。

10

【0119】

図16A及び図16Bに示すように、PD-L1の発現は、CAML及びCTC上で検出できる。末梢循環細胞からPD-L1発現をリアルタイムでモニタリングできるか否かを判定するために、抗PD1免疫療法であるペムブロリズマブ(pembrolizumab)の開始前及び開始後のRCCについて、患者からの連続サンプルを評価した。PD-L1発現を定量的に測定し、(シグナル-バックグラウンド)/バックグラウンド、又は(S-N)/Nとして、蛍光シグナル強度に基づいて、これをスコアリングした。CAMLを用いて、治療中のPD-L1タンパク質発現の動的変化をモニタリングできることを実証した。

【0120】

1人の患者のペムブロリズマブによる最初の治療の前に、この発現は、CAML上で約6であった（図16A）。ペムブロリズマブ投与の1ヶ月後、CAML上のPD-L1発現は、バックグラウンドのレベルまで低下した（図16B）。図16Bは、(S-N)/N < 0.5である長さ74μmの棒状CAMLであり、PD-L1蛍光チャネルでは、殆ど不可視である。

20

【0121】

図17は、細胞の視覚化を可能にする他の染色を含む。この時点では、患者は依然として1本の血液管から26個のCAMLを有していたが、これらすべてにおいて、PD-L1は、ノイズレベルであった。ペムブロリズマブ治療を続けたが、患者は、数ヶ月後に死亡した。PD-L1発現の喪失は、異なるRCCサブクローニーの存在又はペムブロリズマブに応答するPD-L1低発現サブクローニーの選択を示している可能性がある。

30

【0122】

本発明について、特定の実施形態を参照して説明したが、本発明の思想及び範囲から逸脱することなく、様々な変更を行うことは、当業者にとって明らかである。特許請求の範囲は、ここに記述した特定の実施形態に限定されない。

<付記事項>

【付記事項1】

免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性について、癌を有する対象をスクリーニングする方法であって、

PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、循環腫瘍細胞(CTC)、上皮間葉転換CTC(EMTCTC)、癌関連マクロファージ様細胞(CAML)、及び癌関連血管内皮細胞(CAVE)のうちの1つ以上をアッセイすることを含み、

40

PD-L1発現が検出された場合、前記対象は、免疫チェックポイント阻害剤が有効であるとみなす、前記方法。

【付記事項2】

免疫チェックポイント阻害剤による治療に対する、癌を有する対象の応答性を予測する方法であって、

PD-L1発現について、癌を有する対象から単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVEのうちの1つ以上をアッセイすることを含み、

PD-L1発現が検出された場合、前記対象は、免疫チェックポイント阻害剤による処

50

置に応答性があると予測する、前記方法。

[付記事項 3]

癌を有する対象の治療を選択する方法であって、

PD-L1 発現について、癌を有する対象から単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVE の 1 つ以上をアッセイすることを含み、

PD-L1 発現が検出された場合、前記対象の治療として前記対象への治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤の投与を選択する、前記方法。

[付記事項 4]

免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける癌を有する対象を同定するためのアッセイの方法であって、

PD-L1 発現について、癌を有する対象から単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることを含み、

PD-L1 発現が検出された場合、前記対象は、免疫チェックポイント阻害剤治療を受ける対象として同定される、前記方法。

[付記事項 5]

癌を有する対象を治療する方法であって、

(a) PD-L1 発現について、癌を有する対象から単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、

(b) PD-L1 発現が検出された場合、前記対象に治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤を投与することと、

を含む方法。

[付記事項 6]

癌を有する対象を治療する方法であって、

癌を有する対象に治療有効量の免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含み、前記免疫チェックポイント阻害剤は、前記癌を有する対象から単離された CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVE のうちの 1 つ以上において、PD-L1 発現が検出された後に投与される、前記方法。

[付記事項 7]

癌を有する対象における PD-L1 発現をモニタリングする方法であって、

(a) PD-L1 発現について、癌を有する対象から第 1 の時点で単離された、CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、

(b) PD-L1 発現について、前記癌を有する対象から第 2 の時点で単離された CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、

(c) 前記第 1 及び第 2 の時点で単離された細胞においてアッセイされた PD-L1 発現を比較することと、

を含む方法。

[付記事項 8]

前記対象は、癌の治療を受けている、付記事項 7 に記載の方法。

[付記事項 9]

癌を有する対象における治療をモニタリングする方法であって、

(a) PD-L1 発現について、癌の治療を受けている対象から第 1 の時点で単離された CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、

(b) PD-L1 発現について、前記癌の治療を受けている対象から第 2 の時点で単離された CTC、EMTCTC、CAML、及びCAVE のうちの 1 つ以上をアッセイすることと、

(c) 前記第 1 及び第 2 の時点で単離された細胞においてアッセイされた PD-L1 発現を比較することにより、前記癌を有する対象における治療をモニタリングすることと、

を含む、前記方法。

[付記事項 10]

10

20

30

40

50

前記対象は免疫チェックポイント阻害剤を用いて治療されている、付記事項9に記載の方法。

[付記事項11]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1アンタゴニスト、PD-1アンタゴニスト、及びCTLA-4アンタゴニストのうちの1つ以上である、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項12]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1とPD-1との間の結合を阻害する、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項13]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1のその結合パートナーへの結合を阻害する、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項14]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1のその結合パートナーへの結合を阻害する、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項15]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4のその結合パートナーへの結合を阻害する、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項16]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、抗体である、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項17]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、モノクローナル抗体である、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項18]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項19]

前記免疫チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ(オブジーボ)、イピリムマブ(ヤーボイ)、ペムブロリズマブ(キイトルーダ)、アテゾリズマブ(テセントリク)、トレメリムマブ、及びデュルバルマブ(MED14736)のうちの1つ以上である、付記事項1~6及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項20]

1つ以上の追加の抗癌剤の治療有効量を対象に投与することを更に含む、付記事項5、6、8、及び10のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項21]

前記1つ以上の追加の抗癌剤は、免疫療法剤、化学療法剤、放射線療法剤、既存の癌剤、CCR5及びCXCR4からなる群から選択される、付記事項20に記載の方法。

[付記事項22]

前記1つ以上の追加の抗癌剤は、T-VEC、AM-0010、CXCR4アンタゴニスト、TGF-キナーゼ阻害剤ガルニセルチブ、抗CSF-1Rモノクローナル抗体、アベマシクリブ、ファスロデックス、ネシツムマブ、AZD9291、サイラムザ(ラムシルマブ)、TPIV200、ガルニセルチブ、癌ワクチン、サイトカイン、細胞ベースの療法、二重及び多重特異性抗体、腫瘍ターゲティングmAbs、リツキシマブ、腫瘍溶解性ウイルス、レオウイルス、ブリナツモマブ、シプリューセル-T、T-VEC、IL-2、IFN-、トラスツズマブ、セルキシマブ、ベバシズマブ、Timm-3、BTLA、抗IL-10、GM-CSF、抗血管新生治療、VEGF遮断薬、HMGBl、Nrp1、TAM受容体チロシンキナーゼ、AX1、MerTK、ALT-803、IL-15、免疫抑制リガンドホスファチジルセリン(PS)、バビツキシマブ、ベバシズマブ(抗VEGF)、コブルメチニブ(MEK阻害剤)、ベムラフェニブ(BRAF阻害剤)、

10

20

30

40

50

エルロチニブ (E G F R)、アレクチニブ (A L K 阻害剤)、ベバシズマブ (抗 V E G F)、パゾパニブ (チロシンキナーゼ阻害剤)、ダブラフェニブ (B R A F 阻害剤)、トラメチニブ (M E K 阻害剤)、デュルバルマブ (抗 P D - L 1)、スニチニブ (R T K 阻害剤)、パゾパニブ (R T K 阻害剤)、サルグラモスチム、V I S T A、T I M - 3、L A G - 3、P R S - 3 4 3、C D 1 3 7 (4 - 1 B B) / H E R 2 二重特異性抗体、U S P 7、抗 H E R 2、S E M A 4 D、C T L A - 4、P D - 1、P D - L 1、及び P D - L 2からなる群から選択される、付記事項 2 0 に記載の方法。

[付記事項 2 3]

前記 P D - L 1 発現のアッセイは、P D - L 1 タンパク質発現を検出すること及び P D - L 1 m R N A 産生を検出することのうちの 1 つ以上によって行われる、付記事項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

[付記事項 2 4]

前記 P D - L 1 タンパク質発現は、免疫組織化学 (I H C) によって検出される、付記事項 2 3 に記載の方法。

[付記事項 2 5]

前記 I H C は、膜染色、細胞質染色、又はこれらの組み合わせによって行われる、付記事項 2 4 に記載の方法。

[付記事項 2 6]

前記 I H C は、抗 P D - L 1 抗体を用いて行われる、付記事項 2 4 又は 2 5 に記載の方法。

20

[付記事項 2 7]

P D - L 1 タンパク質発現は、I H C によって低染色強度として検出される、付記事項 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項 2 8]

P D - L 1 タンパク質発現は、I H C によって高染色強度として検出される、付記事項 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項 2 9]

P D - L 1 タンパク質発現は、I H C によって誘導可能であるとして検出される、付記事項 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項 3 0]

P D - L 1 タンパク質発現は、単離された細胞の染色として検出される、付記事項 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

[付記事項 3 1]

I H C は、P D - L 1 に対する結合特異性を有する 1 つ以上の抗体を利用する免疫蛍光 (I F) 染色を用いて行われる、付記事項 2 4 に記載の方法。

[付記事項 3 2]

P D - L 1 への抗 P D - L 1 抗体の結合は、前記抗 P D - L 1 抗体にコンジュゲートされた蛍光化合物を介して検出される、付記事項 3 1 に記載の方法。

[付記事項 3 3]

P D - L 1 への抗 P D - L 1 抗体の結合は、抗 P D - L 1 抗体に対する結合特異性を有するフルオロフォアコンジュゲート二次抗体を介して検出される、付記事項 3 1 に記載の方法。

40

[付記事項 3 4]

P D - L 1 発現レベルが、癌に罹患していない同じ種の対象由来の間質細胞の集団の P D - L 1 発現よりも大きい場合、P D - L 1 発現が検出される、付記事項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項 3 5]

C T C、E M T C T C、C A M L、及び C A V E は、前記癌を有する対象から得た血液から単離される、付記事項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

[付記事項 3 6]

50

前記血液は末梢血である、付記事項 3 5 に記載の方法。

【付記事項 3 7】

前記癌を有する対象は、標的薬剤、化学療法、又は放射線療法のうちの 1 つ以上を用いて治療を受けている、付記事項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【付記事項 3 8】

前記癌は、固形腫瘍である、付記事項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【付記事項 3 9】

前記固形腫瘍は、ステージ I 、ステージ I I 、ステージ I I I 、又はステージ I V の癌である、付記事項 3 8 に記載の方法。

【付記事項 4 0】

前記固形腫瘍は、癌腫、肉腫、神経芽細胞腫、又はメラノーマである、付記事項 4 0 に記載の方法。

【付記事項 4 1】

前記癌は、肺癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、メラノーマ、膀胱癌、腎臓癌、頭頸部癌、大腸癌、肝臓癌、卵巣癌、神経芽細胞腫、肉腫、骨肉腫、食道癌、脳及びその他神経系癌、喉頭癌、気管支癌、口腔及び咽頭癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮頸癌、又は子宮体癌の 1 つ以上である、付記事項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【付記事項 4 2】

前記肺癌は、非小細胞肺癌 (N S C L C) である、付記事項 4 1 に記載の方法。

【付記事項 4 3】

少なくとも 1 つの C T C 、 E M T セル、 C A M L 、又は C A V E は、少なくとも 1 つの R A D 5 0 巢を示す、付記事項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 2 3 】

参考文献

本明細書で言及した全ての特許文献及び刊行物は、本発明が関係する当業者の技術水準を示すものである。引用された特許文献及び刊行物のそれぞれは、引用によってその全体が本明細書に援用される。以下の参考文献の全てが本出願に引用されている。

1. Adams DL, Zhu P, Makarova OV, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, et al. The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfilters. *RSC Advances*. 2014;4:4334-42.
2. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clinical chemistry*. 2011;57:1242-55.
3. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature reviews Cancer*. 2008;8:329-40.
4. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer letters*. 2007;253:180-204.
5. Adams D, Tsai S, Makarova OV, Zhu P, Li S, Amstutz PT, et al. Low cytokeratin-and low EpCAM-expressing circulating tumor cells in pancreatic cancer. *ASCO Annual Meeting Proceedings*; 2013. p. 11046.
6. Adams DL, Stefansson S, Haudenschild C, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, et al. Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the cellsearch((R)) CTC test. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2015;87:137-144.
7. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol*. 2012;7:306-15.

10

20

30

40

50

8. Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *British journal of cancer*. 2011;105:8 47-53.
9. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *British journal of cancer*. 2011;105:1338-41.
10. Adams DL, Adams DK, Stefansson S, Haudenschild C, Martin SS, Charpentier M, et al. Mitosis in circulating tumor cells stratifies highly aggressive breast carcinomas. *Breast cancer research : BCR*. 2016;18:44.
11. Adams DL, Adams DK, Alpaugh RK, Cristofanilli M, Martin SS, Chumsri S, et al. Circulating Cancer-Associated Macrophage-Like Cells Differentiate Malignant Breast Cancer and Benign Breast Conditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25:1037-42.
12. Adams DL, Alpaugh RK, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, Cristofanilli M, et al. Precision microfilters as an all in one system for multiplex analysis of circulating tumor cells. *RSC Advances*. 2016;6:6405-14.
13. Adams DL, Alpaugh RK, Tsai S, Tang CM, Stefansson S. Multi-Phenotypic subtyping of circulating tumor cells using sequential fluorescent quenching and restaining. *Sci Rep*. 2016;6:33488.
20. 14. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC, et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111:3514-9.
15. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6897-904.
30. 16. Anantharaman A, Friedlander T, Lu D, Krupa R, Premasekharan G, Hough J, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *BMC Cancer*. 2016;16:744.
17. Mu Z, Benali-Furet N, Uzan G, Znaty A, Ye Z, Paolillo C, et al. Detection and Characterization of Circulating Tumor Associated Cells in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2016;17.
18. Abuzeid WM, Jiang X, Shi G, Wang H, Paulson D, Araki K, et al. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy. *J Clin Invest*. 2009;119:1974-85.
40. 19. Adams DL, Edelman MJ, Fang P, Jiang W, He J, Xu T, et al. Sequential tracking of PD-L1 expression and RAD50 induction in CTCs and circulating stromal cells of lung cancer patients during treatment with radiotherapy. *Cancer Research*. 2016;76:4990-.
20. Flores-Perez A, Rafaelli LE, Ramirez-Torres N, Arechaga-Ocampo E, Frias S, Sanchez S, et al. RAD50 targeting impairs DNA damage response and sensitizes human breast cancer cells to cisplatin therapy. *Cancer Biol Ther*. 2014;15:777-88.
21. Garcia-Villa A, Balasubramanian P, Miller BL, Lustberg MB, Ramaswamy B, Chalmers JJ. Assessment of gamma-H2AX levels in circulating tumor cells from patients receiving chemotherapy. *Front Oncol*. 2012;2:128.
- 50.

22. Lin SH, He J, Edelman M, Xu T, Gao H, Reuben J, et al. Sequential Assessment of DNA Damage Response and PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells of Lung Cancer Patients during Radiotherapy. *JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY*; 2015: ELSEVIER SCIENCE INC 360 PARK AVE SOUTH, NEW YORK, NY 10010-1710 USA. p. S266-S7.
23. Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. 1997;17:6087-96.
24. Wang LH, Pfister TD, Parchment RE, Kummar S, Rubinstein L, Evrard YA, et al. Monitoring drug-induced gammaH2AX as a pharmacodynamic biomarker in individual circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2010;16:1073-84. 10
25. Gatei M, Jakob B, Chen P, Kijas AW, Becherel OJ, Gueven N, et al. ATM protein-dependent phosphorylation of Rad50 protein regulates DNA repair and cell cycle control. *J Biol Chem*. 2011;286:31542-56.
26. Teng SC, Wu KJ, Tseng SF, Wong CW, Kao L. Importin KPNA2, NBS1, DNA repair and tumorigenesis. *J Mol Histol*. 2006;37:293-9.
27. Demaria S, Golden EB, Formenti SC. Role of Local Radiation Therapy in Cancer Immunotherapy. *JAMA Oncol*. 2015;1:1325-32.
28. Derer A, Deloch L, Rubner Y, Fietkau R, Frey B, Gaipl US. Radio-Immunotherapy-Induced Immunogenic Cancer Cells as Basis for Induction of Systemic Anti-Tumor Immune Responses - Pre-Clinical Evidence and Ongoing Clinical Applications. *Front Immunol*. 2015;6:505. 20
29. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:123-35.
30. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2455-65.
31. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372:2018-28. 30
32. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L, Spigel DR, Antonia SJ, Rizvi NA, et al. Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33:2004-12.
33. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhlel L, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2016;27:147-53. 40
34. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016.
35. Sundar R, Cho BC, Brahmer JR, Soo RA. Nivolumab in NSCLC: latest evidence and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2015;7:85-96.
36. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2443-54.
37. Antonia S, Goldberg SB, Balmanoukian A, Chaff JE, Sanborn RE, Gupta A, 50

- et al. Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in no n-small cell lung cancer: a multicentre, phase 1b study. *The lancet oncology*. 2016;17:299-308.
38. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:1627-39.
39. Ma W, Gilligan BM, Yuan J, Li T. Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. *J Hematol Oncol*. 2016;9:47.
40. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, 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;20:5064-74. 10
41. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515:563-7.
42. Ung C, Kockx MM. Challenges & Perspectives of Immunotherapy Biomarkers & The HistoOncolimmune™ Methodology. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. 2016;1:9-24.
43. Zhu P, Stanton ML, Castle EP, Joseph RW, Adams DL, Li S, et al. Detection of tumor-associated cells in cryopreserved peripheral blood mononuclear cell samples for retrospective analysis. *J Transl Med*. 2016;14:198. 20
44. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nature reviews Cancer*. 2014;14:623-31.
45. Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A, Luttgen MS, Malchiudi M, Baehring F, et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys Biol*. 2012;9:016003.
46. Callahan MK, Ott PA, Odunsi K, Bertolini SV, Pan LS, Venhaus RR, et al. A phase 1 study to evaluate the safety and tolerability of MEDI4736, an anti-PD-L1 antibody, in combination with tremelimumab in patients with advanced solid tumors. *ASCO Annual Meeting Proceedings*; 2014. p. TPS3120. 30
47. Mazel M, Jacot W, Pantel K, Bartkowiak K, Topart D, Cayrefourcq L, et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol*. 2015;9:1773-82.
48. Satelli A, Battli IS, Brownlee Z, Rojas C, Meng QH, Kopetz S, et al. Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6:28910.
49. Nicolazzo C, Raimondi C, Mancini M, Caponnetto S, Gradilone A, Gandini O, et al. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. *Sci Rep*. 2016;6:31726. 40
50. Daniel L. Adams, R. Katherine Alpaugh, Steven H. Lin, Jeffrey R. Marks, Raymond Bergan, Stuart S. Martin, Saranya Chumsri, Massimo Cristofanilli, C ha-Mei Tang, Steingrimur Stefansson, "Multiplex phenotyping of circulating cancer associated macrophage-like cells in patients with solid tumors", *Proceedings of AACR*, Vol. 58, April 2017. Abstract #778.
51. American Cancer Society. <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/lifetime-probability-of-developing-or-dying-from-cancer>
52. SEER. <https://seer.cancer.gov/>
53. CDC. <https://www.cdc.gov/nchs/fastats/leading-causes-of-death.htm>
54. Burstein HJ, Krilov L, Aragon-Ching JB, Baxter † NN, Chiorean EG, Chow 50

WN, De Groot JF, Devine SM, and more, Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. J. of Clinical Oncology, 2017, February 1, 35. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.5292. <http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.71.5292>

55. Yervoy (ipilimumab) FDA approval history. <https://www.drugs.com/history/yervoy.html>

56. Opdivo (nivolumab) FDA approval history. <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>

57. Keytruda (pembrolizumab) FDA approval history. <https://www.drugs.com/history/keytruda.html>

10

58. Tecentriq (atezolizumab) FDA approval history. <https://www.drugs.com/history/tecentriq.html>

59. Yervoy and Opdivo combination FDA approval history. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm465274.htm>

60. Adams DL "Detection and monitoring of circulating immune cells in solid tumors: shifting priorities in liquid biopsies in solid tumors" (Chapter 5), Springer, 2017.

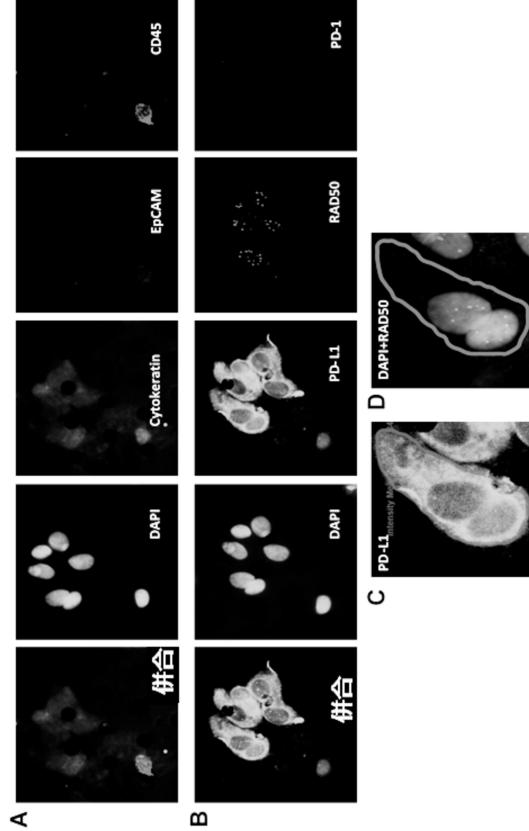
61. El-Heliebi A, et al "Are morphological criteria sufficient for the identification of circulating tumor cells in renal cancer?" J. Trans Med. 11:214, 2013

62. Cima I, et al "Tumor-derived circulating endothelial cell clusters in colorectal cancer." Sci Trans Med 8(345):345ra389 2016.

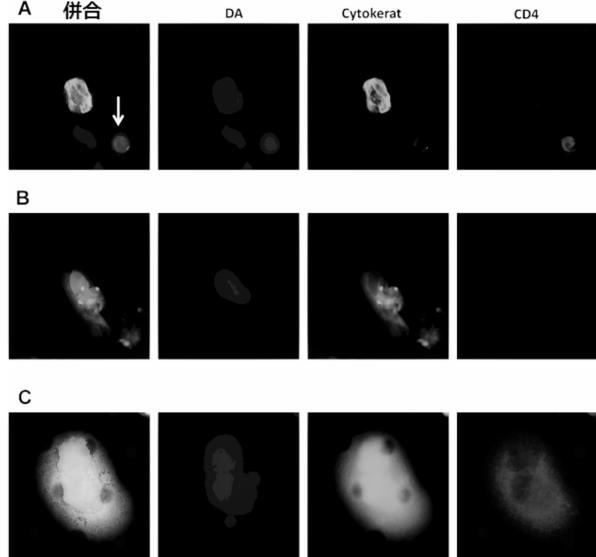
20

【図面】

【図 1】



【図 2】

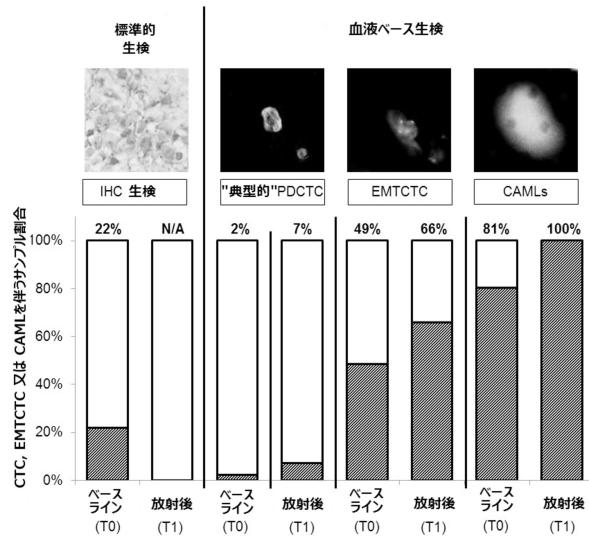


30

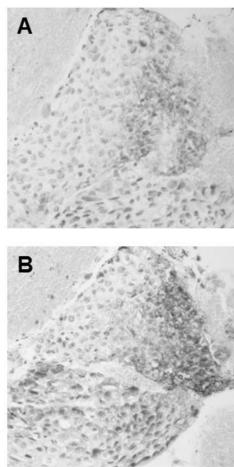
40

50

【図3】

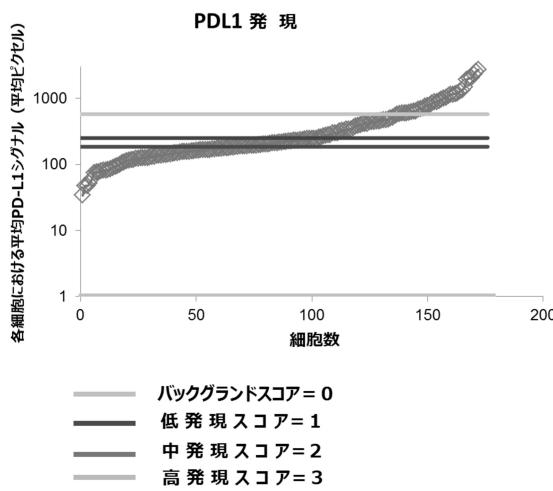


【図4】

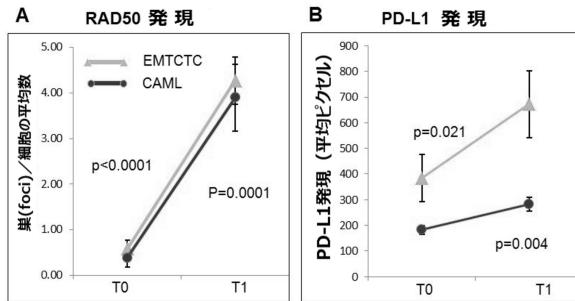


C	ID#	T0 (%/SI)	22c3 (%/SI)	28-8 (%/SI)
1	17/2	0	0	
2	100/3	0	0	
3	33/1	0	0	
4	100/1	0	0	
5	33/1	0	N/A	
6	N/A	0	0	
7	50/2	0	0	
8	33/2	10/1+	20/2+	
9	80/3	40/2+	80/3+	
10	25/0	N/A	N/A	
11	100/0	N/A	N/A	
12	100/0	N/A	N/A	
13	100/0	N/A	N/A	
14	51/1	N/A	N/A	
15	100/1	N/A	N/A	
16	50/1	N/A	N/A	
17	13/1	N/A	N/A	
18	100/1	N/A	N/A	
19	50/1	N/A	N/A	
20	100/1	N/A	N/A	
21	86/1	N/A	N/A	
22	75/1	N/A	N/A	
23	50/1	N/A	N/A	
24	100/1	N/A	N/A	
25	100/1	N/A	N/A	
26	50/1	N/A	N/A	
27	75/2	N/A	N/A	
28	20/2	N/A	N/A	
29	100/2	N/A	N/A	
30	72/2	N/A	N/A	
31	100/2	N/A	N/A	
32	100/2	N/A	N/A	
33	4/3	N/A	N/A	
34	13/3	N/A	N/A	
35	100/3	N/A	N/A	
36	100/0	N/A	N/A	
37	N/A	N/A	N/A	
38	N/A	N/A	N/A	
39	N/A	N/A	N/A	
40	N/A	N/A	N/A	
41	N/A	N/A	N/A	

【図5】



【図6】



10

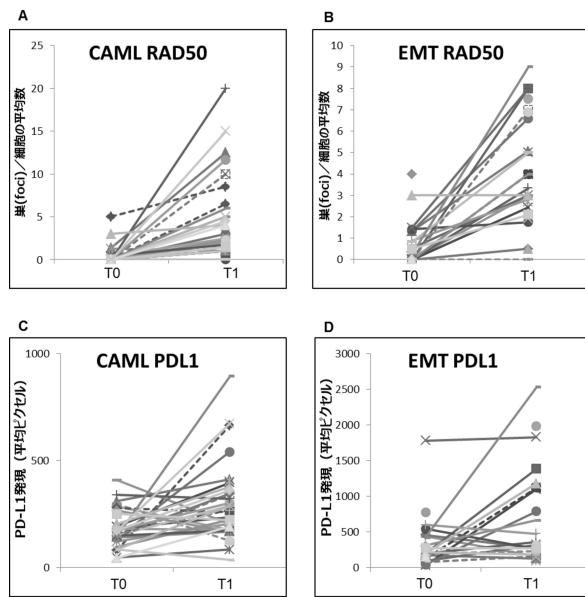
20

30

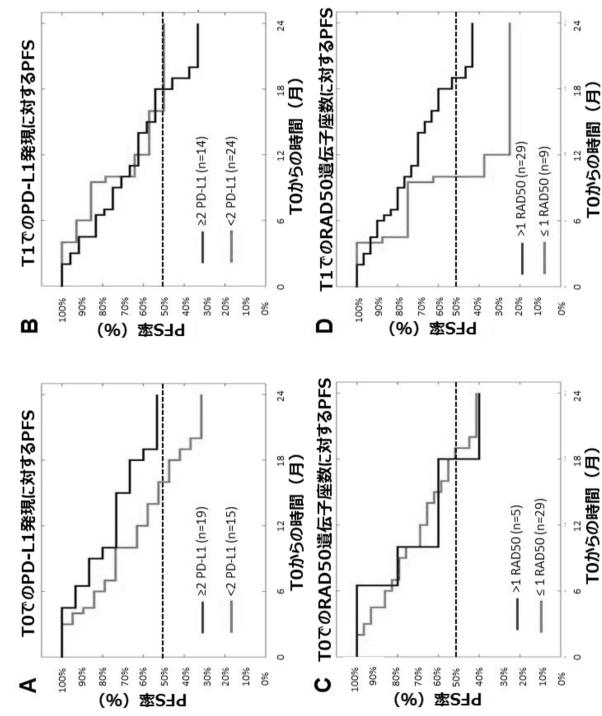
40

50

【図 7】



【図 8】



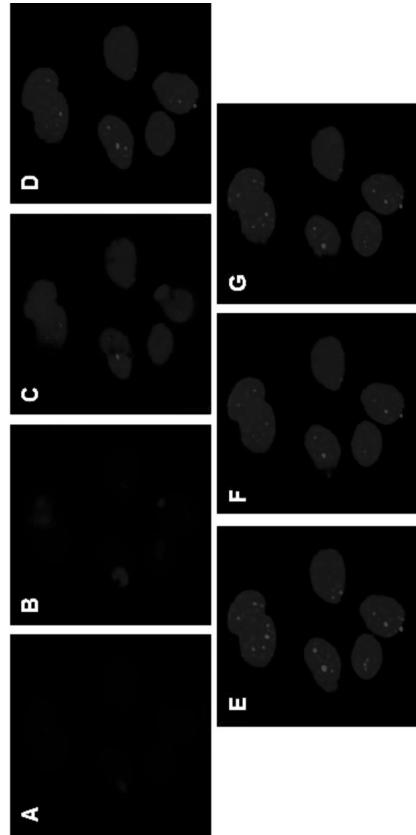
10

20

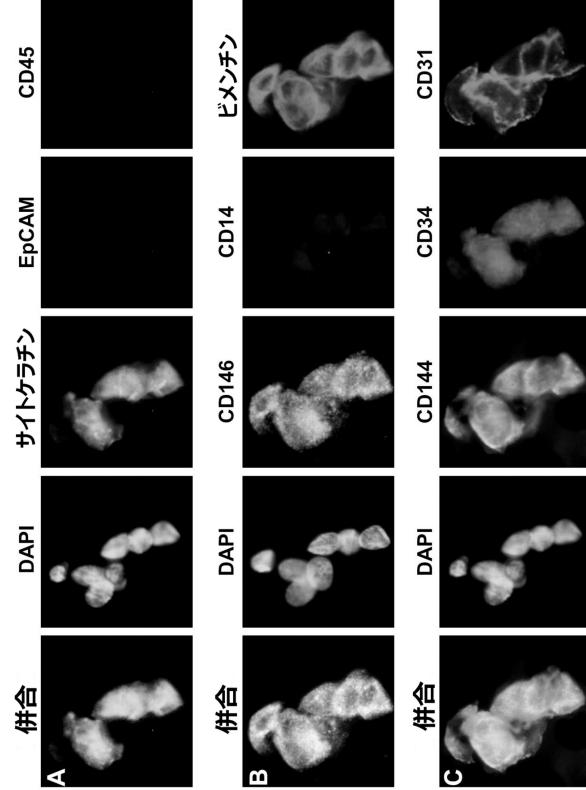
30

40

【図 9】

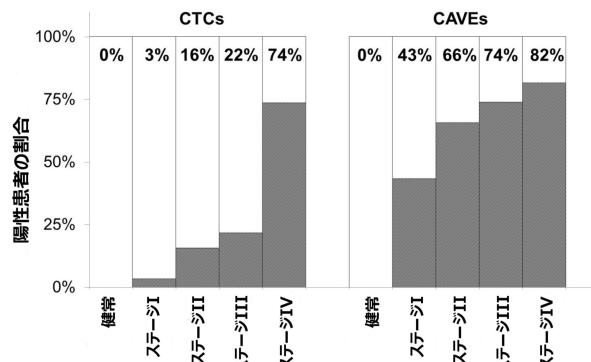


【図 10】

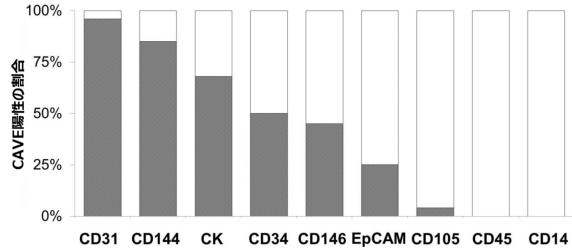


50

【図 1 1】

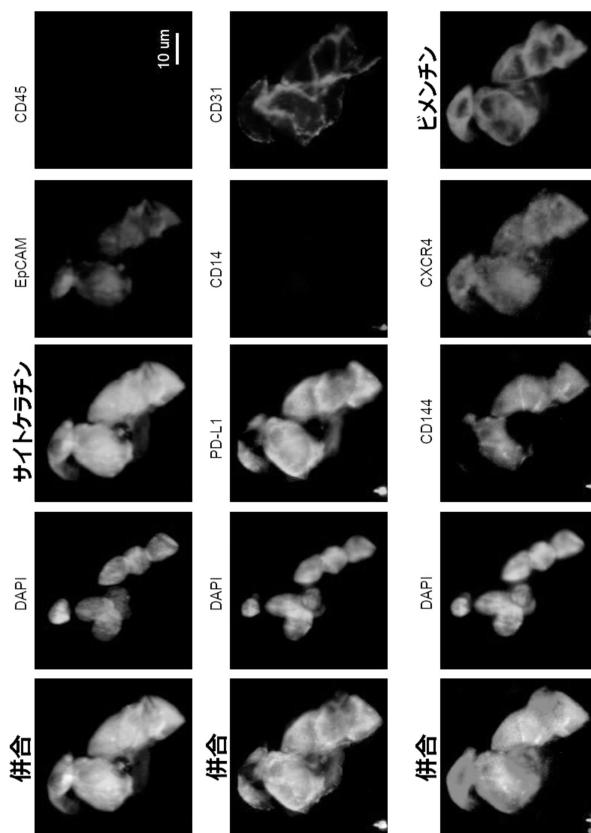


【図 1 2】

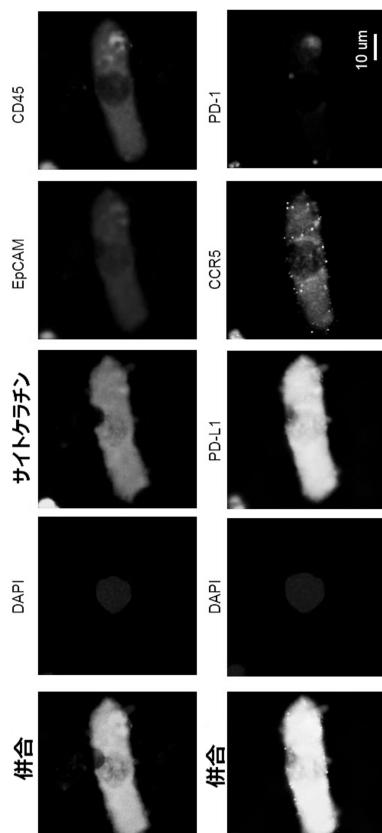


10

【図 1 3】



【図 1 4】



20

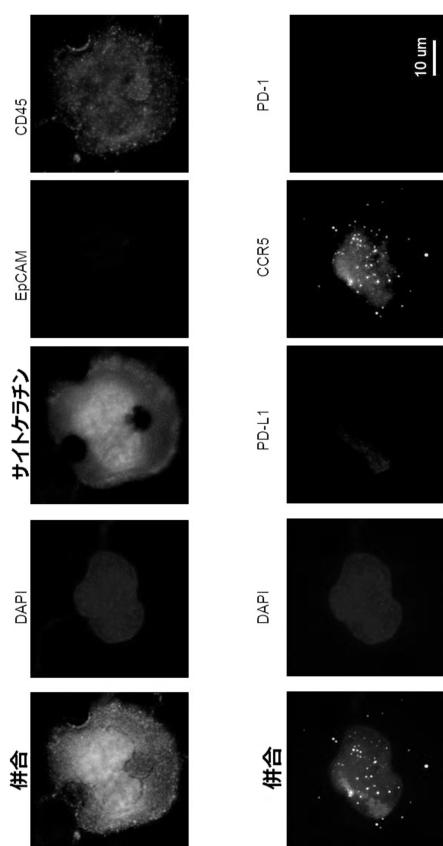
20

30

40

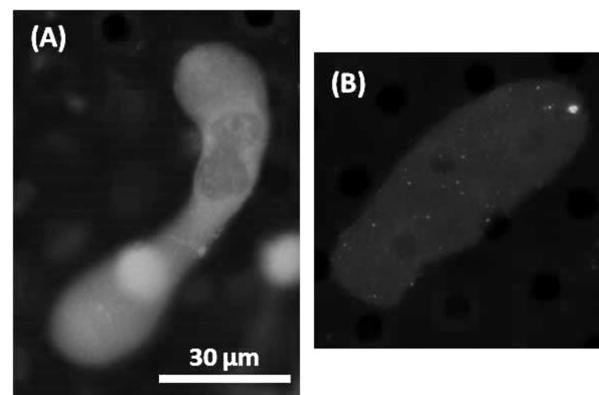
50

【図 1 5】



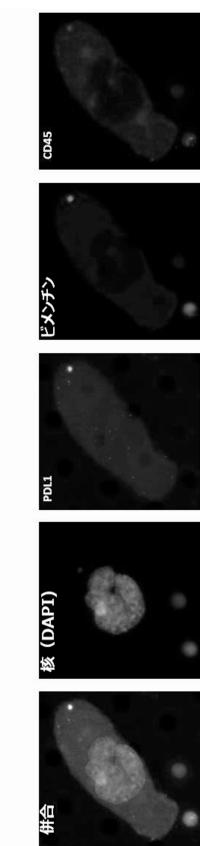
10

【図 1 6】



20

【図 1 7】



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	M
A 6 1 K 35/768(2015.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K 31/4709(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K 31/506(2006.01)	A 6 1 K	45/06	
A 6 1 K 31/565(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K	35/768	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K	31/4709	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 K	31/506	
	A 6 1 K	31/565	
	G 0 1 N	33/50	P
	G 0 1 N	33/53	Y
	C 1 2 Q	1/02	

アメリカ合衆国， 0 7 9 2 0 ニュージャージー， バスキング リッジ， サウス ショア ドライブ 1 0 1 0

(72)発明者 タン， チャ - メイ

アメリカ合衆国， 2 0 8 5 4 メリーランド， ポトマック， レイク ポトマック ドライブ 1 1 6 0 9

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献

国際公開第2 0 1 6 / 0 3 3 1 0 3 (WO , A 1)

国際公開第2 0 1 6 / 0 6 1 0 6 4 (WO , A 1)

国際公開第2 0 1 6 / 1 2 1 5 7 4 (WO , A 1)

Rachel Krupa et al. , Journal of Thoracic Oncology , 2016年02月 , Vol.11, No.2 Supplement , S52

Martine Mazela et al. , Molecular Oncology , 2015年 , Vol.9 , pp.1773-1782

Chiara Nicolazzo et al. , Scientific Reports , Vol.6:31726 , 2016年08月 , pp.1-7 , doi: 10.1038/srep31726

(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 / 0 2

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 4 5 / 0 6

A 6 1 K 3 5 / 7 6 8

A 6 1 K 3 1 / 4 7 0 9

A 6 1 K 3 1 / 5 0 6

A 6 1 K 3 1 / 5 6 5