(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6925326号
(P6925326)
(45)発行日　令和3年8月25日(2021.8.25)　(24)登録日　令和3年8月5日(2021.8.5)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	ZNAT
A61P 43/00	(2006.01)	A61K	39/395	U
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	43/00	121
A61P 35/04	(2006.01)	A61P	35/00	
A61K 39/39	(2006.01)	A61P	35/04	

請求項の数 17　(全 70 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-516739(P2018-516739)
(86)(22)出願日　平成28年9月30日(2016.9.30)
(65)公表番号　特表2018-534266(P2018-534266A)
(43)公表日　平成30年11月22日(2018.11.22)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/073520
(87)国際公開番号　WO2017/055613
(87)国際公開日　平成29年4月6日(2017.4.6)
審査請求日　平成31年1月29日(2019.1.29)
(31)優先権主張番号　1517531.8
(32)優先日　平成27年10月2日(2015.10.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　1607801.6
(32)優先日　平成28年4月29日(2016.4.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(73)特許権者　518098047
ユリウス－マクシミリアン－ウニヴェルシテート・ヴュルツブルク
ドイツ・９７０７０・ヴュルツブルク・ザンデルリング・２
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部　達彦
(72)発明者　イェルク・ヴィッシュフーゼン
ドイツ・９７０８２・ヴュルツブルク・ロイトフレサーヴェーク・１４アー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト成長分化因子１５（ＧＤＦ－１５）の阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーを使用する併用療法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒト患者において固形癌中のCD8$^+$T細胞のパーセンテージを増大させるための方法であって、癌免疫療法による癌の治療のための方法における使用のための、ヒト患者に投与されるものである、hGDF-15阻害剤を含む組成物であって、
阻害剤が、hGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、
(i)抗体又はその抗原結合部分が、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分が、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域、及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む、又は、
(ii)前記抗体又はその抗原結合部分が、ヒトGDF-15への結合について(i)に係る抗体と競合可能である抗体又はその抗原結合部分であり、
前記使用が、免疫チェックポイントブロッカーと組み合わせた使用であり、免疫チェックポイントブロッカーが、
i)ヒトPD-1と結合可能なモノクローナル抗体又はヒトPD-1と結合するその部分である、ヒトPD-1の阻害剤、及び
ii)ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体又はヒトPD-L1と結合するその部分である、ヒトPD-L1の阻害剤
からなる群の1種又は複数から選択される、組成物。

【請求項２】
患者が、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.2ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者であり、患者が、好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.5ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者であり、患者が、より好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.8ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者であり、並びに/又は、癌が、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、脳腫瘍、乳癌、胃癌、腎細胞癌、ユーイング肉腫、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌からなる群から選択され、癌が、好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌及び子宮頸癌からなる群から選択され、癌が、より好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌及び胃癌からなる群から選択され、並びに/又は、癌が、黒色腫、口腔扁平上皮癌、結腸直腸癌及び前立腺癌からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。
【請求項３】
方法が、癌転移の治療のための方法である、並びに/又は、hGDF-15阻害剤が、$CD8^+$T細胞の内皮細胞への接着を増大させ、それによって、血流から癌への$CD8^+$T細胞の侵入を増大させることによって、癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大させる、請求項1又は2に記載の組成物。
【請求項４】
請求項1に規定されるhGDF-15阻害剤及び請求項１に規定される免疫チェックポイントブロッカーを含む、固形癌を治療するための方法における医薬における使用のための組成物。
【請求項５】
請求項1に規定されるhGDF-15阻害剤及び請求項１に規定される少なくとも1種の免疫チェックポイントブロッカーを含む、固形癌を治療するための方法における医薬における使用のためのキット。
【請求項６】
hGDF-15阻害剤及び1種又は複数又はすべての免疫チェックポイントブロッカーが別個の容器中に、又は単一容器中に包含される、請求項5に記載のキット。
【請求項７】
請求項4に記載の医薬における使用のための組成物であって、方法が、癌免疫療法のための方法であり、癌が、請求項2に規定されるものである、組成物。
【請求項８】
請求項5に記載のキットであって、方法が、癌免疫療法のための方法であり、癌が、請求項2に規定されるものである、キット。
【請求項９】
ヒト患者において免疫チェックポイントブロッカーによって固形癌を治療する方法における使用のための請求項1に規定されるhGDF-15阻害剤を含む組成物であって、ヒト患者に投与されるものであり、免疫チェックポイントブロッカーが請求項１に規定されるものである、組成物。
【請求項１０】
方法が、癌免疫療法のための方法である、及び/又は、患者が、請求項2に規定されるものである、及び/又は、癌が、請求項2に規定されるものである、及び/又は、hGDF-15阻害剤が、$CD8^+$T細胞の内皮細胞への接着又は内皮細胞上での$CD8^+$T細胞のローリングを増大させ、それによって、血流から癌への$CD8^+$T細胞の侵入を増大させることによって、癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大させる、請求項9に記載の組成物。
【請求項１１】
ヒト患者において固形癌を治療する方法における使用のための、請求項1に規定されるhGDF-15阻害剤及び請求項１に規定される免疫チェックポイントブロッカーの組合せ製品であって、hGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーがヒト患者に投与されるも

のである、組合せ製品。
【請求項１２】
方法が、癌免疫療法のための方法である、及び/又は、患者が、請求項2に規定されるものである、及び/又は、癌が、請求項2に規定されるものである、及び/又は、hGDF-15阻害剤が、$CD8^+$T細胞の内皮細胞への接着を増大させ、それによって、血流から固形癌への$CD8^+$T細胞の侵入を増大させることによって、癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大させ、好ましくは、$CD8^+$T細胞の内皮細胞への接着の前記増大が、内皮細胞上での$CD8^+$T細胞のローリングを増大させ、その結果、血流から固形癌への$CD8^+$T細胞の前記侵入が増大される、請求項11に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せ製品。
【請求項１３】
使用が、ポリイノシン酸:ポリシチジル酸との組合せでの使用である、請求項1に記載の組成物。
【請求項１４】
使用が、抗ヒトCD40抗体、好ましくはモノクローナル抗ヒトCD40抗体との組合せでの使用である、請求項1又は13に記載の組成物。
【請求項１５】
組合せ製品が、ポリイノシン酸:ポリシチジル酸を更に含む、請求項11又は12に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せ製品。
【請求項１６】
組合せが製品、抗ヒトCD40抗体、好ましくはモノクローナル抗ヒトCD40抗体を更に含む、請求項11、12、又は15に記載の使用のための組合せ製品。
【請求項１７】
ヒト患者において固形癌を治療する方法における使用のための、請求項1に規定されるhGDF-15阻害剤及び
a)ポリイノシン酸:ポリシチジル酸、
b)抗ヒトCD40抗体、好ましくは、モノクローナル抗ヒトCD40抗体、又は
c)ポリイノシン酸:ポリシチジル酸及び抗ヒトCD40抗体、好ましくは、モノクローナル抗ヒトCD40抗体
のいずれか1種の組合せ製品であって、請求項１に規定される免疫チェックポイントブロッカーを含む、組合せ製品。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、固形癌の治療における、ヒト成長分化因子15(GDF-15)の阻害剤の使用、及びこのような阻害剤の免疫チェックポイントブロッカーと組み合わせた使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
今日まで、多数の癌が、依然として満たされていない医学的必要性の領域であり、したがって、癌を効果的に治療する手段が必要とされている。
【０００３】
多数の種類の癌が、VEGF、PDGF、TGF-β及びGDF-15等を含む増殖因子を発現することがわかっている。
【０００４】
GDF-15、成長分化因子-15は、TGF-βスーパーファミリーの多様なメンバーである。それは前駆体として細胞内で発現され、続いてプロセシングされ、最終的に細胞から環境中に分泌されるようになるタンパク質である。GDF-15の、活性で十分にプロセシングされた(成熟した)形態及び前駆体の両方とも、細胞の外側で見られることがある。前駆体は、COOH-末端アミノ酸配列を介して細胞外マトリックスと共有結合によって結合し(Bauskin ARら、Cancer Research 2005年)、そのようにして、細胞の外部にある。GDF-15の活性で十

分にプロセシングされた(成熟した)形態は可溶性であり、血液の血清中に見られる。したがって、GDF-15のプロセシングされた形態は、潜在的標的細胞が可溶性GDF-15リガンドの受容体を発現する限り、血液循環とつながっている身体内の任意の標的細胞に対して潜在的に作用し得る。

【０００５】

妊娠の際は、GDF-15は、生理学的条件下で胎盤中に見られる。しかし、多数の悪性癌(特に、高悪性度脳腫瘍、黒色腫、肺癌、胃腸腫瘍、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌及び乳癌(Mimeault M及びBatra SK、J. Cell Physiol 2010年))は、腫瘍において、並びに血液の血清においてGDF-15レベルの増大を示す。同様に、高いGDF-15発現と化学療法抵抗性の間(Huang CYら、Clin. Cancer Res. 2009年)及び高いGDF-15発現と予後不良の間(Brown DAら、Clin. Cancer Res. 2009年)それぞれに相関関係が記載されている。

【０００６】

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

【０００７】

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

【０００８】

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

【０００９】

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

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】WO2005/099746

【特許文献２】WO2009/021293

【特許文献３】WO2014/049087

【特許文献４】PCT/EP2015/056654

【特許文献５】WO2014/100689

【非特許文献】

【００１１】

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

【非特許文献２】Mimeault M及びBatra SK、J. Cell Physiol 2010年
【非特許文献３】Huang CYら、Clin. Cancer Res. 2009年
【非特許文献４】Brown DAら、Clin. Cancer Res. 2009年
【非特許文献５】Rothら、Clin. Cancer Res. 2010年
【非特許文献６】Johnen Hら(Nature Meicine、2007年)
【非特許文献７】Cully M、「Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy」、Nat Rev Drug Discov. 2015年6月14日(6):374-5頁
【非特許文献８】Cheng PFら: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly.2015年9月16日;145:w14183
【非特許文献９】Li B and Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics.2011年8月4日;12:323.doi:10.1186/1471-2105-12-323
【非特許文献１０】Paul, W.E.(編):Fundamental Immunology第2版Raven Press、Ltd.、New York 1989年の第7章
【非特許文献１１】Kabatら(Sequences of proteins of immunological interest、U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md. 1983年)
【非特許文献１２】Chothiaら(Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989年12月21～28日;342(6252):877～83頁)
【非特許文献１３】Giudicelliら(IMGT/V-QUEST、an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res.2004年7月1日;32(Web Server issue):W435-40)
【非特許文献１４】Kohler及びMilstein(Nature、1975年8月7日;256(5517):495～7頁)
【非特許文献１５】Harlow及びLane(「Antibodies: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York 1988)
【非特許文献１６】Clacksonら(Nature. 1991年8月15日;352(6336):624～8頁)
【非特許文献１７】Marksら(J Mol Biol. 1991年12月5日;222(3):581～97頁)
【非特許文献１８】Riechmannら(Nature. 1988年3月24日;332(6162):323～7頁)
【非特許文献１９】Jonesら(Nature. 1986年5月29日～6月4日;321(6069):522～5頁)
【非特許文献２０】Holliger Pら(「Diabodies」:small bivalent and bispecific fragments」 Proc Natl Acad Sci U S A. 1993年7月15日;90(14):6444～8頁)
【非特許文献２１】Holt LJら(「Domain antibodies: proteins for therapy」 Trends Biotechnol. 2003年11月;21(11):484～90頁)
【非特許文献２２】Saerens Dら(「Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics」 Curr Opin Pharmacol. 2008年10月;8(5):600～8頁. Epub 2008年8月22日)
【非特許文献２３】Arbabi Ghahroudi Mら(「Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies」FEBS Lett. 1997年9月15日;414(3):521～6頁)
【非特許文献２４】Weinberg R.ら: The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006年、850頁
【非特許文献２５】Eisenhauerら: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)、Eur. J. Cancer.第45巻、第2号、2009年1月、228～47頁
【非特許文献２６】Gouttefangeas Cら:「Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality Assurance and Future.」(2015年)、Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (N. Rezaei editor). Springer.第25章:471～486頁
【非特許文献２７】Van der Burg SHら:「Immunoguiding, the final frontier in the immunotherapy of cancer.」(2014年)、Cancer Immunotherapy meets oncology (CM Britt

en、S Kreiter、M. Diken & HG Rammensee編). Springer International Publishing Switzerland 37～51頁 ISBN: 978-3-319-05103-1
【非特許文献２８】Tanno Tら:「Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease」Curr Opin Hematol. 2010年5月;17(3):184～190頁
【非特許文献２９】C. Robertら N Engl J Med 2015年;372:2521～2532頁
【非特許文献３０】Jackson及びLinsley、Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application、Nat Rev Drug Discov. 2010年1月;9(1):57～67頁
【非特許文献３１】Knoepfel SAら、「Selection of RNAi-based inhibitors for antiHIV gene therapy」World J Virol. 2012年6月12日;1(3):79～90頁
【非特許文献３２】Kanasty Rら、「Delivery materials for siRNA therapeutics」、Nat Mater 2013年11月;12(11):967～77頁
【非特許文献３３】Mei Cong、Ph.D.ら:Advertorial: Novel Bioassay to Assess PD-1/PD-L1 Therapeutic Antibodies in Development for Immunotherapy Bioluminescent Reporter-Based PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay. (http://www.genengnews.com/gen-articles/advertorial-novel-bioassay-to-assess-pd-1-pd-l1-therapeutic-antibodies-in-development-for-immun/5511/)
【非特許文献３４】Sambrookら(「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York 1989)
【非特許文献３５】Ausubelら(「Current Protocols in Molecular Biology.」Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992年)
【非特許文献３６】Harlow及びLane(「Antibodies:A Laboratory Manual」 Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York 1988年)
【非特許文献３７】Altschulら(1990年)「Basic local alignment search tool.」Journal of Molecular Biology 215.403～410頁
【非特許文献３８】Altschulら:(1997年) Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389～3402頁
【非特許文献３９】Siegel DL(「Recombinant monoclonal antibody technology」Transfus Clin Biol. 2002年1月;9(1):15～22頁)
【非特許文献４０】Remington's Pharmaceutical Sciences、AR Gennaro編、第20版、2000年、Williams & Wilkins、PA、USA
【非特許文献４１】Suckauら Proc Natl Acad Sci U S A. 1990年12月;87(24):9848～9852頁
【非特許文献４２】R.Stefanescuら、Eur.J.Mass Spectrom. 13、69～75頁(2007年)
【非特許文献４３】Zhang, J.、Yao, Y.-H.、Li, B.-G.、Yang, Q.、Zhang, P.-Y.及びWang, H.-T.(2015年).Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. Scientific Reports 5、9800
【非特許文献４４】Tumehら、Nature. 2014年11月27日; 515(7528):568～71頁
【非特許文献４５】Yadav Mら、Nature. 2014年11月27日;515(7528):572～6頁
【非特許文献４６】Lasithiotakis,KGら、Cancer/107/1331～9. 2006年

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
したがって、今日まで、癌をより効率的に治療するための手段が当技術分野で依然として必要である。より詳しくは、より有効な癌免疫療法のために使用できる手段が依然として欠如している。
【課題を解決するための手段】
【００１３】
本発明は、以下に記載される実施形態を提供することによって、当技術分野において、

上記の必要性を満たし、上記の問題を解決する:

【００１４】

特に、癌を効果的に治療する手段を同定するための試みにおいて、本発明者らは驚くべきことに、患者血清中のhGDF-15レベルが増大するにつれ、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する奏効の見込みが大幅に低減することを見出した。したがって、本発明によれば、hGDF-15の阻害剤を使用して、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効に対するhGDF-15の負の効果を阻害でき、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効を改善できる。

【００１５】

予期せぬことに、本発明者らはまた、hGDF-15に、癌転移における$CD8^+$Tリンパ球のパーセンテージとの逆相関があることも見出した。$CD8^+$Tリンパ球の存在は、抗PD-1抗体を用いる免疫チェックポイント阻害後の腫瘍退縮にとって明確に必要であるので、これは特筆すべきことである。したがって、本発明によれば、hGDF-15の治療的阻害を使用して、腫瘍転移を含む固形癌中の$CD8^+$Tリンパ球のパーセンテージを増大できる。この固形癌中の$CD8^+$Tリンパ球の増大を、固形癌の療法、特に、免疫療法のために好適に使用できる。したがって、本発明の限定されない態様では、特に好適な治療的組合せは、hGDF-15阻害剤の免疫チェックポイントブロッカーとの組合せである。この組合せの有利な効果は、hGDF-15の阻害は、固形癌中の$CD8^+$Tリンパ球のパーセンテージを増大し、それによって免疫チェックポイント阻害との相乗的治療効果につながることである。

【００１６】

hGDF-15阻害剤が固形癌において$CD8^+$Tリンパ球のパーセンテージを増大できる方法を更に解明する試みにおいて、本発明者らは、hGDF-15がT細胞の内皮細胞への接着を低減することを見出した。したがって、本発明によれば、hGDF-15阻害剤を用いる治療を使用して、$CD8^+$T細胞を含むT細胞の内皮細胞への接着を増大できる。本発明のこのような治療は、血流から固形癌への$CD8^+$T細胞の侵入を増大するであろう。hGDF-15阻害剤を用いるこのような治療に起因する、固形癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージの増大は、癌療法、例えば、癌免疫療法にとって有利であり、それにおいて使用できる。$CD8^+$T細胞の固形癌への侵入及び固形癌中のこれらの$CD8^+$T細胞の存在は、免疫チェックポイントブロッカーを使用する治療的アプローチにとって特に有利であることから、本発明によるhGDF-15阻害剤の特に有利な使用は、免疫チェックポイントブロッカーと組み合わせたその使用である。

【００１７】

したがって、本発明は、以下に記載される好ましい実施形態を提供することによって、癌療法のための改善された手段を提供する:

【００１８】

1.ヒト患者において固形癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大するための方法における使用のためのhGDF-15阻害剤であって、ヒト患者に投与される予定である、hGDF-15阻害剤。

2.患者が、hGDF-15阻害剤の投与の開始に先立って少なくとも1.2ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者であり、患者が、好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始に先立って少なくとも1.5ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者であり、患者が、より好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始に先立って少なくとも1.8ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者である、項目1に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

3.癌が、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌(stomach cancer)、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、脳腫瘍、乳癌、胃癌(gastric cancer)、腎細胞癌、ユーイング肉腫、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌からなる群から選択され、癌が、好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌、胃癌(stomach cancer)、膵臓癌、肝臓癌、精巣癌、卵巣癌、子宮内膜癌及び子宮頸癌からなる群から選択され、癌が、より好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、尿路上皮癌及び胃癌(stomach cancer)からなる群から選択される、項目1から2のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

4.癌が、黒色腫、口腔扁平上皮癌、結腸直腸癌及び前立腺癌からなる群から選択される、項目1から3のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

5.癌が黒色腫である、項目1から4のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

6.hGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である、項目1から5のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

7.結合が、hGDF-15上のコンフォメーショナル又は不連続エピトープとの結合であり、コンフォメーショナル又は不連続エピトープが、配列番号25及び配列番号26のアミノ酸配列によって含まれる、項目6に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

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

9.短鎖干渉RNA又はsiRNAヘアピン構築物である、項目1から5のいずれかに記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

10.方法が、癌の治療のための方法である、項目1から9のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

11.癌の治療のための方法が、癌免疫療法による癌の治療のための方法である、項目10に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

12.方法が、癌転移の治療のための方法である、項目1から11のいずれかに記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

13.$CD8^+$T細胞の内皮細胞への接着を増大し、それによって、血流から癌への$CD8^+$T細胞の侵入を増大することによって、癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大する、項目1から12のいずれかに記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

14.使用が、免疫チェックポイントブロッカーと組み合わせた使用である、項目1から13のいずれかに記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

15.免疫チェックポイントブロッカーが、

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

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

からなる群のうち1種又は複数から選択される、項目1から14のいずれかに記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

16.免疫チェックポイントブロッカーが、ヒトPD-1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、項目15に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

17.免疫チェックポイントブロッカーが、ヒトPD-L1と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、項目15又は16に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

18.hGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーを含む組成物。

19.hGDF-15阻害剤が、項目6から9のいずれか一項に規定の通りである、項目18に記載の組成物。

20.免疫チェックポイントブロッカーが、項目15から17のいずれか一項に規定の通りである、項目18又は19に記載の組成物。

21.医療における使用のための、項目18から20のいずれか一項に記載の組成物。

22.hGDF-15阻害剤及び少なくとも1種の免疫チェックポイントブロッカーを含むキット。

23.hGDF-15阻害剤が、項目6から9のいずれか一項に規定の通りである、項目22に記載のキット。

24.免疫チェックポイントブロッカーが、項目15から17のいずれか一項に規定の通りである、項目22又は23に記載のキット。

25.hGDF-15阻害剤及び1種又は複数又はすべての免疫チェックポイントブロッカーが別個の容器中に、又は単一容器中に入っている、項目1から24のいずれかに記載のキット。

26.固形癌を治療するための方法における使用のための、項目21から25のいずれか一項に記載の医療における使用のためのキット又は組成物。

27.方法が、癌免疫療法のための方法である、項目26に記載の医療における使用のためのキット又は組成物。

28.癌が、項目3、4又は5に規定の通りである、項目27に記載の医療における使用のためのキット又は組成物。

29.ヒト患者において免疫チェックポイントブロッカーによって固形癌を治療する方法における使用のためのhGDF-15阻害剤であって、ヒト患者に投与される予定である、hGDF-15阻害剤。

30.方法が、癌免疫療法のための方法である、項目29に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

31.患者が、項目2に規定の通りである、項目29又は30に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

32.癌が、項目3、4又は5に規定の通りである、項目29から31のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

33.項目6から9のいずれか一項に規定の通りである、項目29から32のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

34.免疫チェックポイントブロッカーが、項目15から17のいずれか一項に規定の通りである、項目29から33のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

35.癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大する、項目29から34のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

36.$CD8^+$T細胞の内皮細胞への接着又は内皮細胞上での$CD8^+$T細胞のローリングを増大し、それによって、血流から癌への$CD8^+$T細胞の侵入を増大することによって、癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大する、項目35に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。

37.ヒト患者において固形癌を治療する方法における使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せであって、hGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーがヒト患者に投与される予定である、組合せ。

38.方法が、癌免疫療法のための方法である、項目36に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せ。

39.患者が、項目2に規定の通りである、項目1から38のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せ。

40.癌が、項目3、4又は5に規定の通りである、項目1から39のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せ。

41.hGDF-15阻害剤が、項目6から9のいずれか一項に規定の通りである、項目1から40のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せ。

42.免疫チェックポイントブロッカーが、項目15から17のいずれか一項に規定の通りである、項目1から41のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せ。

43.hGDF-15阻害剤が、癌における$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大する、項目1から42のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せ。

44.hGDF-15阻害剤が、$CD8^+$T細胞の内皮細胞への接着を増大し、それによって、血流から固形癌への$CD8^+$T細胞の侵入を増大することによって、固形癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大し、

好ましくは、$CD8^+$T細胞の内皮細胞への接着の前記増大が、内皮細胞上での$CD8^+$T細胞のローリングを増大し、その結果、血流から固形癌への$CD8^+$T細胞の前記侵入が増大される、項目43に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組

合せ。

45.対象となる物質がhGDF-15阻害剤であるか否かを決定するためのin vitro方法であって、

a)内皮細胞を活性化する工程と、

b)hGDF-15を含む溶液の存在下及び対象となる物質の存在下で、T細胞を含む第1のサンプルをインキュベートする工程と、

c)工程a)において活性化された内皮細胞の、前記第1のサンプル由来の前記T細胞への接着を測定して、第1の接着測定結果を得る工程と、

d)工程c)の第1の接着測定結果に基づいて、対象となる物質がhGDF-15阻害剤であるか否かを決定する工程と

を含む方法。

46.内皮細胞が、ヒト臍帯静脈内皮細胞である、項目45に記載の方法。

47.内皮細胞が、ヒト内皮細胞である、項目1から46のいずれか一項に記載の方法。

48.内皮細胞がTNF-α及びIFN-γによって活性化され、活性化工程において、TNF-α及びIFN-γが、好ましくは、培地中で5～20ng/mlのTNF-α及び5～20ng/mlのIFN-γの最終濃度で、より好ましくは、培地中で10ng/mlのTNF-α及び10ng/mlのIFN-γの最終濃度で存在する、項目1から47のいずれか一項に記載の方法。

49.対象となる物質が、hGDF-15と結合可能な物質、好ましくは、hGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合断片である、項目1から48のいずれか一項に記載の方法。

50.工程c)において、前記内皮細胞及び前記T細胞が、1:2～2:1の数値的比率で、好ましくは、1:1の数値的比率で使用される、項目1から49のいずれか一項に記載の方法。

51.工程c)の間、内皮細胞が、コーティングされた細胞培養表面上に、好ましくは、フィブロネクチンでコーティングされた細胞培養表面上に存在する、項目1から50のいずれか一項に記載の方法。

52.工程b)の間、hGDF-15が、50～200ng/mlの濃度、好ましくは、100ng/mlの濃度で存在する、項目1から51のいずれか一項に記載の方法。

53.工程c)において、接着が、ローリングT細胞の数を数えることによって測定される、項目1から52のいずれか一項に記載の方法。

54.工程c)において、接着が、接着T細胞の数を数えることによって測定される、項目1から53のいずれか一項に記載の方法。

55.工程c)において、接着が、T細胞のローリング速度を測定することによって測定される、項目1から54のいずれか一項に記載の方法。

56.工程d)において、対象となる物質が、前記接着を増大する場合にhGDF-15阻害剤であると決定される、項目1から55のいずれか一項に記載の方法。

57.工程d)において、対象となる物質が、前記接着を増大しない場合にhGDF-15阻害剤ではないと決定される、項目1から56のいずれか一項に記載の方法。

58.工程b)において、第2のサンプルが、hGDF-15を含む前記溶液の存在下で、前記対象となる物質の不在下でインキュベートされ、第2のサンプルがT細胞を含み、

工程c)が、工程a)において活性化された内皮細胞の、前記第2のサンプル由来の前記T細胞への接着を測定して、第2の接着測定結果を得ることを更に含み、

工程d)において、前記第1の接着測定結果が、前記第2の接着測定結果と比較して増大される場合に、対象となる物質がhGDF-15阻害剤であると決定される、項目1から57のいずれか一項に記載の方法。

59.工程b)において、第3のサンプルが、hGDF-15を含む前記溶液の不在下で、前記対象となる物質の不在下でインキュベートされ、第3のサンプルがT細胞を含み、

工程c)が、工程a)において活性化された内皮細胞の、第3の第2のサンプル由来の前記T細胞への接着を測定して、第3の接着測定結果を得ることを更に含み、

工程d)において、第3の接着測定結果が、完全なhGDF-15阻害を示す参照接着測定結果として使用される、項目1から58のいずれか一項に記載の方法。

60.T細胞が、$CD8^+$T細胞である、項目1から59のいずれか一項に記載の方法。

61.T細胞が汎T細胞である、項目45から59のいずれか一項に記載の方法。
62.T細胞がヒトT細胞である、項目1から61のいずれか一項に記載の方法。
63.使用が、ポリイノシン酸:ポリシチジル酸との組合せ、又は項目37から44のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せでの使用であり、組合せが、ポリイノシン酸:ポリシチジル酸との組合せである、項目1から17のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。
64.使用が、抗ヒトCD40抗体、好ましくは、モノクローナル抗ヒトCD40抗体との組合せ、又は項目37から44及び63のいずれか一項に記載の使用のための組合せでの使用であり、組合せが、抗ヒトCD40抗体、好ましくは、モノクローナル抗ヒトCD40抗体との組合せである、項目1から17及び63のいずれか一項に記載の使用のためのhGDF-15阻害剤。
65.ヒト患者において固形癌を治療する方法における使用のための、hGDF-15阻害剤及び
a)ポリイノシン酸:ポリシチジル酸、
b)抗ヒトCD40抗体、好ましくは、モノクローナル抗ヒトCD40抗体、又は
c)ポリイノシン酸:ポリシチジル酸及び抗ヒトCD40抗体、好ましくは、モノクローナル抗ヒトCD40抗体
のうちいずれか1種の組合せであって、任意選択で、免疫チェックポイントブロッカーを含む、組合せ。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】図1は、治療レジメンに対するレスポンダー及びノンレスポンダーのGDF-15血清レベルを示す図である。
【図２】図2は、それぞれ、<1.8ng/ml、1.8～4.2ng/ml及び>4.2ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者グループ中のレスポンダー及びノンレスポンダーの数を示す図である。
【図３】図3は、連続予測変数としてGDF-15を使用する一般化された線形モデルによって予測されるような、治療に対する奏効(レスポンダー1)の確率を示す図である。丸はデータを示し、曲線はモデルを示す。垂直線は、治療奏効の確率が0.5である場合のGDF-15濃度を示す。
【図４】図4は、GDF-15血清レベル(<1.8、1.8～4.2、>4.2ng/ml)によって規定される3種のグループにおける生存のカプラン・マイヤー曲線を示す図である。
【図５Ａ】図5Aは、連続予測変数としてLDHを使用する一般化された線形モデルによって予測された、治療に対する奏効の確率(レスポンダー1)を示す図である。丸はデータを示し、曲線はモデルを示す。垂直線は、治療奏効の確率が0.5である場合のLDF濃度を示す。患者コホートは同一であった。しかし、4人の患者では、溶血によりLDHレベルの信頼のおける決定ができなかった。
【図５Ｂ】図5Bは、レスポンダー及びノンレスポンダー並びにそのそれぞれのhGDF-15及びLDHレベルのグラフである。すべてのレスポンダーを対象とするようにカットオフ値が選択される場合には、GDF-15に基づく試験では、6人(9人のうち)のノンレスポンダーの同定が可能となるが、LDHレベルに基づく解析は、4人(9人のうち)のノンレスポンダーしか識別できない。LDH試験については、データの喪失を引き起こす4つの溶血サンプルは排除しなければならなかった。
【図６】図6は、図中に示されるように、それぞれ、GDF-15について並びにT細胞マーカータンパク質CD3及びCD8について免疫組織化学によって染色された、GDF-15免疫反応性のない(上のパネル)又は高いGDF-15免疫反応性を有する(下のパネル)黒色腫脳転移から得た例示的組織切片を示す図である。CD3及びCD8陽性細胞は、高GDF-15サンプル中で矢印によって示されている。CD3及びCD8染色は、連続切片の同一領域から作製した(ただし同一切片からではない)。
【図７Ａ】図7Aは、種々の黒色腫脳転移にわたる、GDF-15スコアに対する$CD3^+$細胞のパーセンテージのプロットを示す図である(7A)。
【図７Ｂ】図7Bは、種々の黒色腫脳転移にわたる、GDF-15スコアに対する$CD8^+$細胞のパーセンテージのプロットを示す図である(7B)。

【図８】図8は、種々の腫瘍実体(黒色腫、CRC、RCC、NSCLC及びSCLC)からの脳転移における、$CD8^+$及び$CD3^+$T細胞それぞれのパーセンテージに対するGDF-15スコアのプロットを示す図である。
【図９－１】図9Aは、1秒あたりの視野あたりのローリングT細胞数を示す図である。データは、チャネル番号3(「GDF-15」)及びチャネル番号2(「対照」)から得た。
【図９－２】図9Bは、T細胞のローリング速度を示す図である(0.2秒あたりのピクセルで測定された)。データは、チャネル番号3(「GDF-15」)及びチャネル番号2(「対照」)から得た。図9Cは、視野あたりの接着細胞数を示す図である。データは、チャネル番号3(「GDF-15」)及びチャネル番号2(「対照」)から得た。
【図９－３】図9Dは、視野あたりの接着細胞数を示す図である。データは、チャネル番号3(「GDF-15」)及びチャネル番号2(「対照」)から得た。
【図１０Ａ】図10Aは、1秒あたりの視野あたりのローリングT細胞数を示す図である。データは、チャネル番号1(「陰性対照」としての刺激されていないHUVECでの対照T細胞)、チャネル番号2(「陽性対照」としての刺激されたHUVECでの対照T細胞)、チャネル番号3(「GDF-15」)、チャネル番号4(「UACC257」:分泌されたGDF-15を含有するUACC257黒色腫細胞の上清中で培養されたT細胞)及びチャネル番号5(「UACC257+抗hGDF-15」:hGDF-15阻害剤として抗hGDF-15抗体B1-23で分泌されたGDF-15を枯渇させたUACC257黒色腫細胞の上清中で培養されたT細胞)から得た。
【図１０Ｂ】図10Bは、実施例3に記載されるようにフロー/接着アッセイを実施した。T細胞を、示されるように100ng/mlのGDF-15とともに1時間、又は10μg/mlの抗体とともに1時間プレインキュベートした100ng/mlのGDF-15とともにプレインキュベートした。以下の抗GDF-15抗体を使用した:H1L5(ヒト化B1-23)、01G06及び03G05(WO2014/100689からのシークエンスに従って遺伝子操作したヒト化抗GDF-15抗体)。結果が図に示されており、20秒あたりの視野あたりのローリング細胞数を示す。
【図１１】図11は、C57BL/6Jマウスに、2×10^5個結腸$MC38^{tghGDF-15}$細胞を用いて皮下に接種した。0日目に抗GDF-15抗体(20mg/体重1kg)を用いる治療を開始し、3、7、10、14、17及び21日目に反復した。13日目に、同様の大きさの腫瘍(100～150mm^3)を有する動物を、ポリ-ICLC(「ポリ-IC」とも略される)及び抗CD40抗体を用いて処置した、又は処置しなかった。予め確立された腫瘍を拒絶するマウスを57日間追跡した。動物の安寧のための判定基準に従って腫瘍を有するマウスを屠殺した。
【図１２】図12は、それぞれ、<1.5ng/ml及び≧1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者グループにおける累積生存率を示す図である。
【図１３】図13は、それぞれ、高GDF-15レベルを有する患者グループ(すなわち、最高GDF-15レベルを有する50人の患者)及び低GDF-15レベルを有する患者グループ(すなわち、最低GDF-15レベルを有する49人の患者)における累積生存率を示す図である(全研究コホートの中央値折半)。
【図１４Ａ】図14Aは、hGDF-15血清レベルが腫瘍の遺伝子変異量と有意に相関しないことを示す図である。癌患者から得たサンプル中のhGDF-15 mRNAレベルを、癌において同定された体細胞変異の数に対してプロットした。体細胞変異は、エキソームシーケンシングの使用によって決定した。データは、University Hospital Zurich(Cheng PFら: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly.2015年9月16日;145:w14183)から得たUZHウェブツールを使用することによって解析した。図14Aは、高悪性度悪性黒色腫を有する患者のみを考慮するthe Cancer Genome Atlas(TGCA)から得た癌患者データのプロットを示す図である(Cancer Genome Atlasは、Cheng PFら:Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly.2015年9月16日;145:w14183の参考文献中に記載されている)。GDF-15発現は、RSEM(「期待値最大化によるRNA Seq」)ソフトウェアパッケージを使用する正規化によって評価した(Li B and Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics.2011年8月4日;12:323.doi:10.1186/1471-2105-12-323)。

【図１４Ｂ】図14Bは、hGDF-15血清レベルが腫瘍の遺伝子変異量と有意に相関しないことを示す図である。癌患者から得たサンプル中のhGDF-15 mRNAレベルを、癌において同定された体細胞変異の数に対してプロットした。体細胞変異は、エキソームシーケンシングの使用によって決定した。データは、University Hospital Zurich(Cheng PFら: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly.2015年9月16日;145:w14183.)から得たUZHウェブツールを使用することによって解析した。図14Bは、個別に解析された、University Hospital Zurichから得た40人の更なる転移性悪性黒色腫患者から得た癌患者データのプロットを示す図である。

【図１５】図15は、野生型腫瘍又はトランスジェニック(tg)hGDF15を過剰発現する腫瘍を有するマウスにおけるCD8aの免疫細胞化学写真を示す図である。組織切片を、抗CD8a(eBioscience社から購入した1:100希釈;4SM15抗体)を用いて染色した。

【発明を実施するための形態】

【００２０】

定義及び一般的技術

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

【００２１】

用語「抗体」とは、本明細書において、参照により本明細書に組み込まれるPaul, W.E.(編):Fundamental Immunology第2版Raven Press、Ltd.、New York 1989年の第7章に一般的に概説されるように、対象となる抗原と特異的に結合可能である任意の機能的抗体を指す。特定の制限なく、用語「抗体」は、ニワトリ並びにマウス、ヤギ、非ヒト霊長類及びヒト等の哺乳動物を含む任意の適当な供給源種に由来する抗体を包含する。好ましくは、抗体はヒト化抗体である。抗体は、好ましくは、当技術分野で周知の方法によって調製できるモノクローナル抗体である。用語「抗体」は、IgG-1、-2、-3又は4、IgE、IgA、IgM又はIgDアイソタイプ抗体を包含する。用語「抗体」は、モノマー抗体(IgD、IgE、IgG等)又はオリゴマー抗体(IgA又はIgM等)を包含する。用語「抗体」はまた、特定の制限なく、単離された抗体及び遺伝子操作された抗体、例えばキメラ抗体等の修飾された抗体も包含する。

【００２２】

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

【００２３】

「モノクローナル抗体」は、抗体の本質的に同種の集団に由来する抗体であり、抗体は、配列が実質的に同一である(すなわち、N末端及びC末端のアミノ酸修飾等の天然に存在する配列修飾を含有する抗体のわずかな割合を除いて同一である)。多数のエピトープに向けられる種々の抗体の混合物を含有するポリクローナル抗体とは異なり、モノクローナ

ル抗体は同一エピトープに向けられ、したがって、高度に特異的である。用語「モノクローナル抗体」は、(これらに限らないが)例えば、Kohler及びMilstein(Nature、1975年8月7日;256(5517):495～7頁)又はHarlow及びLane(「Antibodies: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York 1988年)に記載されるハイブリドーマ法によって作製された抗体のような、単細胞クローンに由来するモノクローナル細胞集団から得られる抗体を含む。モノクローナル抗体はまた、Clacksonら(Nature. 1991年8月15日;352(6336):624～8頁)又はMarksら(J Mol Biol. 1991年12月5日;222(3):581～97頁)に記載されるもの等のファージディスプレイ技術を含むその他の適した方法から得ることができる。モノクローナル抗体は、当技術分野で公知の方法によって、低減されたKd値、最適化された会合及び解離動態学等の抗原-結合特性について最適化されている抗体であり得る。例えば、Kd値は、親和性成熟モノクローナル抗体をもたらす、ファージディスプレイを含むディスプレイ法によって最適化できる。用語「モノクローナル抗体」は、起源の特定の種又は起源の1つの単一種に由来する抗体配列に制限されない。したがって、用語「モノクローナル抗体」の意味は、ヒト化モノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を包含する。

【００２４】

「ヒト化抗体」は、ヒト配列、及び対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)に対する結合特異性を付与する非ヒト配列のわずかな部分を含有する抗体である。通常、ヒト化抗体は、ヒトアクセプター抗体由来の超可変領域配列を、対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)と結合する非ヒトドナー抗体(例えば、マウス、ウサギ、ラットドナー抗体)に由来する超可変領域配列によって置換することによって作製される。いくつかの場合には、アクセプター抗体のフレームワーク領域配列もまた、ドナー抗体の対応する配列によって置換され得る。「ヒト化抗体」は、ドナー及びアクセプター抗体に由来する配列に加えて、その他の(更なる又は代替)残基又は配列を含有する場合もあり、含有しない場合もある。このようなその他の残基又は配列は、結合特性(例えば、Kd値を低減するように)及び/又は免疫原性特性(例えば、ヒトにおける抗原性を低減するように)等の抗体特性を更に改善するように役立ち得る。ヒト化抗体を作製するための方法の非限定例は当技術分野で公知であり、例えば、Riechmannら(Nature. 1988年3月24日;332(6162):323～7頁)又はJonesら(Nature. 1986年5月29日～6月4日;321(6069):522～5頁)に由来するものがある。

【００２５】

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

【００２６】

抗体の「抗原結合部分」とは、本明細書において、抗体の、抗原(例えば、hGDF-15、PD-1又はPD-L1)と特異的に結合する能力を保持する抗体の部分を指す。この能力は、例えば、当技術分野で公知の方法によって、抗原との特異的結合について、抗体と競合する抗原結合部分の能力を決定することによって決定できる。抗原結合部分は、抗体の1つ又は複数の断片を含有し得る。特に制限なく、抗原結合部分は、組換えDNA法及び抗体の化学的又は酵素的断片化による調製を含む、当技術分野で公知の任意の適した方法によって製造できる。抗原結合部分は、Fab断片、F(ab')断片、$F(ab')_2$断片、一本鎖抗体(scFv)、単一ドメイン抗体、ダイアボディー又は抗原と特異的に結合する抗体の能力を保持する抗体の任意のその他の部分であり得る。

【００２７】

「抗体」(例えば、モノクローナル抗体)又は「抗原結合部分」は、誘導体化されていても、又は異なる分子と連結されていてもよい。例えば、抗体と連結できる分子は、その他のタンパク質(例えば、その他の抗体)、分子標識(例えば、蛍光、発光、着色又は放射活

性分子)、医薬品及び/又は毒物である。抗体又は抗原結合部分は、直接(例えば、2種のタンパク質間の融合の形態で)連結してもよく、リンカー(例えば、当技術分野で公知の任意の適した種類の化学的リンカー)分子を介して連結してもよい。

【００２８】

本明細書において、用語「結合」又は「結合する」とは、対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)との特異的結合を指す。好ましくはKd値は100nM未満、より好ましくは50nM未満、更により好ましくは10nM未満、一層より好ましくは5nM未満、最も好ましくは2nM未満である。

【００２９】

本明細書において、ヒトGDF-15と結合可能な第2の抗体と「競合可能」である抗体又はその抗原結合部分とは、「競合可能である」前記(第1の)抗体又はその抗原結合部分が、第2の抗体の10nM参照溶液の、ヒト又は組換えヒトGDF-15との結合を50%低減可能であることを意味する。一般に、「競合可能である」とは、第2の抗体の10nM参照溶液の、ヒト又は組換えヒトGDF-15との結合を50%低減するために必要である(第1の)抗体又はその抗原結合部分の濃度が、1000nM未満、好ましくは100nM未満、及びより好ましくは10nM未満であることを意味する。結合は、表面プラズモン共鳴測定によって、又は酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)測定によって、好ましくは表面プラズモン共鳴測定によって測定される。

【００３０】

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

【００３１】

本発明との関連で、抗体又はその抗原結合部分の、対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)との結合又は競合的結合は、好ましくは、以下に記載されるように、参照標準アッセイとして表面プラズモン共鳴測定を使用して測定される。

【００３２】

用語「K_D」又は「K_D値」とは、当技術分野で公知の平衡解離定数に関する。本発明との関連で、これらの用語は、特定の対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)に関する抗体の平衡解離定数に関する。平衡解離定数は、複合体(例えば、抗原-抗体複合体)の、その構成成分(例えば、抗原及び抗体)に可逆的に解離する傾向の尺度である。本発明の抗体については、K_D値(抗原ヒトGDF-15に対するもの等)は、好ましくは、以下に記載されるように、表面プラズモン共鳴測定を使用することによって決定される。

【００３３】

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

【００３４】

「ダイアボディー」とは、本明細書において、同一鎖上で2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるペプチドリンカーによって連結された、同一ポリペプチド鎖上の軽鎖可変ドメインに連結された重鎖可変ドメインを含む、小さい二価の抗原結合性抗体部分である。これは、別の鎖の相補的ドメインとの対合及び2つの抗原結合部位を有するダイマー分子の組み立てをもたらす。ダイアボディーは、二価で単一特異的である(ヒトGDF-15

5に対する2つの抗原結合部位を有するダイアボディー等)場合もあり、又は二価で二重特性である(例えば、一方はヒトGDF-15に対する結合部位であり、もう一方は異なる抗原に対する結合部位である、2つの抗原結合部位を有するダイアボディー)場合もある。ダイアボディーの詳細な説明は、Holliger Pら(「「Diabodies」:small bivalent and bispecific fragments」 Proc Natl Acad Sci U S A. 1993年7月15日;90(14):6444～8頁)に見出すことができる。

【００３５】

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

【００３６】

用語「癌」及び「癌細胞」は、本明細書において、当技術分野におけるその一般的な意味に従って使用される(例えば、Weinberg R.ら: The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006年、850頁を参照のこと)。

【００３７】

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

【００３８】

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

【００３９】

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

【００４０】

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

【００４１】
「癌の治療」又は「癌を治療すること」等の用語は、本発明によれば、治療的処置を指す。治療的処置が奏効するか否かの評価は、例えば治療が、治療された患者において癌成長を阻害するか否かを評価することによって行うことができる。好ましくは、阻害は、当技術分野で公知の適当な統計検定によって評価されるように統計的に有意である。癌成長の阻害は、未治療患者の対照グループに対して、本発明によって治療された患者のグループにおける癌成長を比較することによって、又は当技術分野の標準癌治療及び本発明による治療を施される患者のグループを、当技術分野の標準癌治療のみを施される患者の対照グループと比較することによって評価できる。癌成長の阻害を評価するためのこのような研究は、臨床研究のために承認された標準、例えば、十分な検出力を有する二重盲検無作為化研究に従って設計される。用語「癌を治療すること」は、癌成長が部分的に阻害される(すなわち、患者における癌成長が患者の対照グループ群と比較して遅延される)癌成長の阻害、癌成長が完全に阻害される(すなわち、患者における癌成長が停止される)阻害及び癌成長が逆転される(すなわち、癌が収縮する)阻害を含む。好ましくは、治療的処置が奏効するか否かの評価は、固形腫瘍における効果判定基準、バージョン1.1(RECIST v1.1)(Eisenhauerら: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)、Eur. J. Cancer.第45巻、第2号、2009年1月、228～47頁)を使用することによって、レスポンダー及びノンレスポンダーの分類に基づいて行うことができる。或いは、又は更に、治療的処置が奏効するか否かの評価は、癌進行の公知の臨床指標に基づいて行うことができる。

【００４２】
本発明による癌の治療は、第一選択療法、第二選択療法又は第三選択療法又は第三選択療法を超える療法であり得る。これらの用語の意味は当技術分野で公知であり、米国国立癌研究所(US National Cancer Institute)によって一般に使用される技術用語に従う。

【００４３】
本発明による癌の治療は、患者において更なる又は二次的治療効果も起こることを排除しない。例えば、更なる又は二次的利益は、癌誘発性質量損失に対する影響であり得る。しかし、保護が求められる一次治療は、癌自体を治療するためのものであり、任意の二次的又は更なる効果は、癌成長の治療の任意選択の更なる利点のみを反映するということは理解される。

【００４４】
用語「癌免疫療法」は当技術分野で公知であり、一般に、患者の免疫系が癌を治療するために使用される癌の治療に関する。癌細胞は、癌細胞に対して特異的であり、非癌性細胞の抗原とは異なる癌細胞抗原を生じさせるゲノム変異を有する。したがって、本発明による癌免疫療法の好ましい態様では、癌免疫療法は、このような癌細胞抗原が免疫系によって認識され、これらの抗原を発現する癌細胞が免疫系によって死滅させられる癌免疫療法である。本発明の限定されない態様では、これらの癌細胞抗原を発現するこのような癌細胞は、免疫系の$CD8^+$T細胞によって死滅させられ得る。癌免疫療法は、当技術分野で公知の免疫モニタリング法によって、例えば、血液サンプル中の(例えば、$CD8^+$T細胞及び/又はNK細胞中の)細胞内IFN-γ発現を測定すること、血液サンプル中のCD107a細胞表面発現(例えば、$CD8^+$T細胞及び/又はNK細胞上の)を測定すること、血液サンプル中の細胞内TNF-α発現(例えば、白血球上の)、血液サンプル中の細胞内インターロイキン-2発現(例えば、$CD8^+$T細胞中及び/又は$CD4^+$T細胞中の)、血液サンプル中のCD154細胞表面発現(例えば、$CD8^+$T細胞中及び/又は$CD4^+$T細胞中の)、血液サンプル中の腫瘍抗原特異的T細胞についてのテトラマー又はデキストラマー(dextramer)染色、自己腫瘍細胞に対するCTL活性又は腫瘍特異的変異に由来するネオ抗原に対するT細胞の存在を測定することによって評価され得る。癌免疫療法を評価するための好ましい方法として、Gouttefangeas Cら:「Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality Assurance and Future.」(2015年)、Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (N. Rezaei editor). Springer.第25章:471～486頁の方法及びVan der Burg SHら:「Immunoguidi

ng, the final frontier in the immunotherapy of cancer.」(2014年)、Cancer Immunotherapy meets oncology (CM Britten、S Kreiter、M. Diken & HG Rammensee編). Springer International Publishing Switzerland 37～51頁　ISBN: 978-3-319-05103-1の方法がある。

【００４５】

本明細書において、「癌免疫療法」は任意選択で、癌を治療するために使用される免疫系に加えて、癌治療の更なる機序が使用される治療を包含する。例えば、免疫系が激しく損なわれたマウスモデル系における癌治療のために、hGDF-15阻害剤を使用できることがこれまでに示された(WO2014/049087)。したがって、本発明によれば、ヒト患者におけるhGDF-15阻害剤による癌免疫療法はまた、免疫系から独立しているhGDF-15阻害剤の更なる治療効果も包含し得る。癌治療の更なる機序が使用され得る癌免疫療法の別の例として、公知の化学療法薬を用いる併用療法がある。公知の化学療法薬を用いるこのような併用療法は、例えば、癌を治療するために免疫系が使用される癌の治療だけでなく、癌細胞が前記化学療法薬によって直接的に死滅させられる癌の治療も含み得る。

【００４６】

本明細書において、用語「固形癌中の$CD8^+$Tリンパ球のパーセンテージを増大すること」は、固形癌によって形成される腫瘍中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージ(すなわち、すべての細胞に関して算出される$CD8^+$T細胞のパーセンテージ)の任意の測定可能な増大に関する。好ましくは、この増大は、当技術分野で公知である適当な統計的検定によって評価されるように統計的に有意である。固形癌によって形成される腫瘍中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージの増大は、固形腫瘍中の$CD8^+$T細胞の解析のための公知の方法によって決定できる。このような方法は、$CD8^+$T細胞についての腫瘍生検の解析、例えば、CD8に対する抗体を使用する、及び細胞の総数についての染色を使用する免疫組織化学によるこのような腫瘍生検の解析を含む。この増大は、本発明によって治療された患者のグループの腫瘍中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを、治療されていない患者の対照グループと比較することによって、又は当技術分野の標準癌治療及び本発明の治療を施された患者のグループを、当技術分野の標準癌治療のみを施された患者の対照グループと比較することによって評価できる。

【００４７】

本明細書において、「$CD8^+$T細胞」は、好ましくはヒト患者において内因性に生じる細胞である。

【００４８】

hGDF-15血清レベルは、当技術分野で公知の任意の方法によって測定できる。例えば、hGDF-15血清レベルを測定する好ましい方法は、GDF-15に対する抗体を使用することによる酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によるhGDF-15血清レベルの測定である。このようなELISA法は実施例1に例示されている。或いは、hGDF-15血清レベルは、GDF-15に対する抗体を使用する公知の電気化学発光イムノアッセイによって決定できる。例えば、このような電気化学発光イムノアッセイのために、Roche Elecsys(登録商標)技術を使用できる。

【００４９】

本発明によって治療されるべき患者は、好ましくは、hGDF-15血清レベルが上昇した患者である。用語「上昇したhGDF-15血清レベル」は、本明細書において、本発明のhGDF-15阻害剤の投与に先立って、参照としての健常なヒト対照個体の血液血清における中程度のhGDF-15レベルと比較した場合に、血液血清において、ヒト患者がより高いhGDF-15レベルを有することを意味する。

【００５０】

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

【００５１】

したがって、本発明の好ましい実施形態では、本発明によって治療されるべき患者は、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.2ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者、好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.5ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者、より好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.8ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者である。

【００５２】

本発明の更に好ましい実施形態では、本発明によって治療されるべき患者は、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.2ng/ml及び12ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者、好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.5ng/ml及び12ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者、より好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.8ng/ml及び12ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者である。

【００５３】

上記の実施形態のすべてに従う本発明の更なる実施形態では、本発明によって治療されるべき患者は、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.2ng/ml及び10ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者、好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.5ng/ml及び10ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者、より好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.8ng/ml及び10ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者である。

【００５４】

上記の実施形態のすべてに従う本発明の更なる実施形態では、本発明によって治療されるべき患者は、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.2ng/ml及び8ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者、好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.5ng/ml及び8ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者、より好ましくは、好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも1.8ng/ml及び8ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者である。

【００５５】

別の実施形態では、本発明によって治療されるべき患者は、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に少なくとも2ng/ml、少なくとも2.2ng/ml、少なくとも2.4ng/ml、少なくとも2.6ng/ml、少なくとも2.8ng/ml、少なくとも3.0ng/ml、少なくとも3.2ng/ml、少なくとも3.4ng/ml、少なくとも3.6ng/ml、少なくとも3.8ng/ml、少なくとも4.0ng/ml又は少なくとも4.2ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者である。この実施形態では、患者は、好ましくは、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に12ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者である。より好ましくは、この実施形態では、患者は、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に10ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者である。最も好ましくは、この実施形態では、患者は、hGDF-15阻害剤の投与の開始前に8ng/ml以下のhGDF-15血清レベルを有する患者である。

【００５６】

用語「投与の開始前に」とは、本明細書において、本発明のhGDF-15阻害剤の投与の直前の時間期間を意味する。好ましくは、用語「投与の開始前に」とは、投与の直前の30日の期間、投与の直前の1週間の期間を意味する。

【００５７】

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

【００５８】

本発明によって使用されるhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーは、当技術分野で公知の方法を使用することによって投与できる。このような方法は、それぞれの阻害剤の化学的性質(例えば、阻害剤が短鎖干渉RNAであるか、又は抗体であるか否かに応じて変わる)を含む周知の検討事項に基づいて当業者によって選択される。公知の免疫チェックポイントブロッカーの投与は、これらの免疫チェックポイントブロッカーの公知の投与スキームに基づいてもよい。例えば、免疫チェックポイントブロッカーの投与は、

KEYNOTE-006試験(C. Robertら N Engl J Med 2015年;372:2521～2532頁)において使用される投与スキームに基づいてもよい。

【００５９】

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

【００６０】

本発明による使用されるべきhGDF-15阻害剤

本発明の「hGDF-15阻害剤」は、ヒトGDF-15(hGDF-15)の機能を特異的に阻害可能である任意の分子であり得る。

【００６１】

このようなhGDF-15阻害剤の非限定例として、hGDF-15の発現を特異的に下方制御し、それによって、hGDF-15機能を阻害する分子がある。例えば、hGDF-15の発現を特異的に下方制御し、hGDF-15機能を阻害するために、短鎖干渉RNA又はsiRNAヘアピン構築物を使用できる。短鎖干渉RNA及びsiRNAヘアピン構築物配列の設計及び選択のルールは当技術分野で公知であり、例えば、Jackson及びLinsley、Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application、Nat Rev Drug Discov. 2010年1月;9(1):57～67頁に概説されている。ウイルス送達法(例えば、Knoepfel SAら、「Selection of RNAi-based inhibitors for antiHIV gene therapy」World J Virol. 2012年6月12日;1(3):79～90頁に概説されるように)、細胞への送達を促進するコンジュゲート基を使用する方法等のその他の送達方法(例えば、Kanasty Rら、「Delivery materials for siRNA therapeutics」、Nat Mater. 2013年11月;12(11):967～77頁に概説されるような)を含む任意の適した方法によって、短鎖干渉RNA及びsiRNAヘアピン構築物をヒト患者に送達できる。

【００６２】

対象となる物質が「hGDF-15阻害剤」であるか否かは、好ましい実施形態において詳述されるような本明細書において開示される方法を使用することによって決定できる。好ましい実施形態に従う好ましい方法として、実施例3において使用される方法がある。

【００６３】

ヒトGDF-15タンパク質は、有利なことにモノクローナル抗体(WO2014/049087)によってターゲッティングされ得ること、及びこのような抗体は組換えヒトGDF-15の約790pMの平衡解離定数によって実証されるような、ヒトGDF-15に対する高結合親和性を含む有利な特性を有することがこれまでに示された(参照実施例1を参照のこと)。したがって、本発明による好ましい実施形態では、使用されるべきhGDF-15阻害剤は、hGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分である。好ましくは、抗体はhGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である。

【００６４】

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

【００６５】

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

抗体又はその抗原結合部分は、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【００６６】

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

【００６７】

ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の上記の実施形態に従う好ましい実施形態では、抗体は、ヒト化抗体又はその抗原結合断片である。このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の重鎖の定常ドメインは、配列番号29のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み得、このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の軽鎖の定常ドメインは、配列番号32のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含み得る。より好ましくは、このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の重鎖の定常ドメインは、配列番号29のアミノ酸配列又はそれと少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の軽鎖の定常ドメインは、配列番号32のアミノ酸配列又はそれと少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む。更により好ましくは、このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の重鎖の定常ドメインは、配列番号29のアミノ酸配列を含み、このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の軽鎖の定常ドメインは、配列番号32のアミノ酸配列を含む。このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の重鎖可変ドメインは、配列番号28のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、更により好ましくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み得、このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の軽鎖可変ドメインは、配列番号31のアミノ酸配列又はそれと少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、更により好ましくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み得る。最も好ましくは、このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の重鎖可変ドメインは、配列番号28のアミノ酸配列を含み、このモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の軽鎖可変ドメインは、配列番号31のアミノ酸配列を含む。

【００６８】

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

【００６９】

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

【００７０】

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

【００７１】

ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分の上記の実施形態に従う別の実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ)に受託番号DSM ACC3142の下で寄託された細胞株B1-23から得ることができるヒトGDF-15に対する抗体と同一のヒトGDF-15エピトープと結合する。本明細書において記載されるように、本発明によるヒトGDF-15との抗体結合は、参照実施例1に記載される手順に従った、参照標準法として表面プラズモン共鳴測定によって評価されることが好ましい。ヒトGDF-15上の同一エピトープとの結合を、細胞株B1-23から得ることができるヒトGDF-15に対する抗体の、及び細胞株B1-23から得ることができるヒトGDF-15に対する抗体と同一のヒトGDF-15エピトープと結合すると予測される抗体の、表面プラズモン共鳴競合結合試験によって同様に評価できる。

【００７２】

別の好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、重鎖可変ドメインは、配列番号39のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号40のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含む。

【００７３】

別の好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、重鎖可変ドメインは、配列番号41のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号42のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含む。

【００７４】

別の好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、重鎖可変ドメインは、配列番号43のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号44のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含む。

【００７５】

別の好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、重鎖可変ドメインは、配列番号45のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号46のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含む。

【００７６】
別の好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、重鎖可変ドメインは、配列番号47のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号48のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含む。
【００７７】
別の好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、重鎖可変ドメインは、配列番号49のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号50のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含む。
【００７８】
別の好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、重鎖可変ドメインは、配列番号51のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号52のアミノ酸配列又はそれと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%若しくは少なくとも99%同一である配列を含む。
【００７９】
別の好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15との結合について、好ましくは組換えヒトGDF-15との結合について、本明細書において言及されるヒトGDF-15と結合可能な抗体の任意の1種と競合可能であるモノクローナル抗体又はその抗原結合部分である。
【００８０】
極めて好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒト化モノクローナル抗体又はその抗原結合部分である。本発明による任意の所与の非ヒト抗体配列(すなわち、ドナー抗体配列)のために、本発明のヒト化モノクローナル抗ヒトGDF-15抗体又はその抗原結合部分を、上記のように、当技術分野で公知の技術に従って作製できる。
【００８１】
極めて好ましい実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、結合は、配列番号25及び配列番号26のアミノ酸配列からなるヒトGDF-15上のコンフォメーショナル又は不連続エピトープとの結合である。この実施形態の好ましい態様では、抗体又はその抗原結合部分は、上記の実施形態のいずれか1つの配列によって規定されるような抗体又はその抗原結合部分である。
【００８２】
ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、薬物と連結してもよい。この実施形態の限定されない態様では、薬物は、公知の抗癌剤及び/又は免疫賦活性分子であり得る。公知の抗癌剤として、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル及びイホスファミド等のアルキル化剤類

;アザチオプリン及びメルカププリン等の代謝拮抗剤類;ビンカアルカロイド類(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン及びビンデシン)、タキサン類(例えば、パクリタキセル、ドセタキセル)エトポシド及びテニポシド等のアルカロイド類;カンプトテシン類(例えば、イリノテカン及びトポテカン)等のトポイソメラーゼ阻害剤類;アクチノマイシン、アントラサイクリン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、バルルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン及びマイトマイシン等の細胞傷害性抗生物質類;並びに放射性同位元素類が挙げられる。

【００８３】

上記の実施形態に従う更なる実施形態では、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、アミノ酸タグによって修飾される。このようなタグの非限定例として、ポリヒスチジン(His-)タグ、FLAG-タグ、血球凝集素(HA)タグ、糖タンパク質D(gD)タグ及びc-mycタグが挙げられる。タグは種々の目的のために使用できる。例えば、それらをヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分の精製を補助するために使用できる。好ましくは、このようなタグは、ヒトGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分のC末端又はN末端に存在する。

【００８４】

本発明による使用されるべき免疫チェックポイントブロッカー

癌細胞は、癌細胞に対して特異的であり、非癌性細胞の抗原とは異なる癌細胞抗原を生じさせるゲノム変異を有する。したがって、阻害されない無傷の免疫系はこれらの癌細胞抗原を認識し、その結果、これらの抗原に対する免疫応答が誘発されるはずである。しかし、ほとんどの癌は、これらの抗原に対する免疫寛容機序を発達させている。癌細胞がこのような免疫寛容に達する機序の1つのクラスが、免疫チェックポイントの利用である。「免疫チェックポイント」とは、本明細書において、一般に、免疫応答が阻害され得る免疫学的機序を意味する。より詳しくは、免疫チェックポイントは、免疫系の分子(又は免疫系の分子の群)が、免疫系の細胞の活性化を阻害することによって免疫応答を阻害することを特徴とする機序である。免疫系の細胞の活性化を阻害することによって免疫応答を阻害する免疫系のこのような分子(又は分子の群)はまた、チェックポイント分子としても知られる。

【００８５】

本明細書において、「免疫チェックポイントブロッカー」は、免疫チェックポイントをブロックすることができる分子である。本発明によって使用されるようなhGDF-15阻害剤が、CD8+T細胞に対する効果を含む免疫系に対する効果を有することは理解されているが、用語「免疫チェックポイントブロッカー」は、本明細書において、hGDF-15阻害剤を指さず、hGDF-15阻害剤とは異なる分子を意味する。

【００８６】

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

【００８７】

免疫チェックポイントブロッカーの効力を測定する方法として、in vitro結合アッセイ、一次T細胞ベースのサイトカイン放出アッセイ及びin vivoモデルシステムが挙げられる。更に、Promegaは今や、例えば、Mei Cong、Ph.D.ら:Advertorial: Novel Bioassay to Assess PD-1/PD-L1 Therapeutic Antibodies in Development for Immunotherapy Bioluminescent Reporter-Based PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay. (http://www.genengnews.com/gen-articles/advertorial-novel-bioassay-to-assess-pd-1-pd-l1-therapeutic-antibodies-in-development-for-immun/5511/)において言及される、PD-1/PD-L1についての市販

の生物発光リポーターシステムを開発した。

【００８８】

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

【００８９】

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

【００９０】

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

【００９１】

方法及び技術

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

【００９２】

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

【００９３】

本発明の配列の配列アラインメントは、BLASTアルゴリズム(Altschulら(1990)「Basic local alignment search tool」Journal of Molecular Biology 215.403～410頁;Altschulら:(1997年) Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389～3402頁を参照のこと)を使用することによって実施される。好ましくは、以下のパラメータを使用する:最大標的配列10;ワードサイズ3;BLOSUM 62マトリックス;ギャップコスト:存在11、伸長1;条件付き組成スコアマトリックス補正(conditional compositional score matrix adjustment)。したがって、配列に関連して使用される場合、「同一性」又は「同一の」等の用語は、BLASTアルゴリズムを使用することによって得られた同一性の値を指す。

【００９４】

本発明のモノクローナル抗体は、これに限らないが、Siegel DL(「Recombinant monoclonal antibody technology」Transfus Clin Biol. 2002年1月;9(1):15～22頁)において言

及される方法を含む当技術分野で公知の任意の方法によって作製できる。一実施形態では、本発明の抗体は、ブダペスト条約の下、Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ)に受託番号DSM ACC3142の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株B1-23によって作製される。寄託は、2011年9月29日に提出された。

【００９５】

細胞増殖は、(これらに限らないが)可視顕微鏡、ミトコンドリア酸化還元力を測定するもの(例えば、MTT(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド)アッセイ;Alamar Blue(登録商標)アッセイとしても知られるレザズリン染色)等の代謝アッセイ、既知内因性増殖バイオマーカー(例えば、Ki-67)の染色及び細胞性DNA合成を測定する方法(例えば、BrdU及び[^{3}H]-チミジン組込みアッセイ)を含む当技術分野で公知の適した方法によって測定できる。

【００９６】

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

【００９７】

本発明の組成物の調製

本発明による組成物は、医薬組成物の調製のための公知の標準に従って調製される。

【００９８】

例えば、組成物は、例えば、担体、賦形剤又は安定剤等の医薬上許容される構成成分を使用することによって、適宜保存及び投与することができる方法で調製される。

【００９９】

このような医薬上許容される構成成分は、医薬組成物を患者に投与する場合に使用される量で毒性ではない。医薬組成物に添加される医薬上許容される構成成分は、組成物中に存在する阻害剤の化学的性質(例えば、阻害剤が抗体、siRNAヘアピン構築物又は短鎖干渉RNAであるか否かに応じて変わる)、医薬組成物の特定の意図される使用及び投与経路に応じて変わり得る。

【０１００】

一般に、本発明に関連して使用される医薬上許容される構成成分は、当技術分野で、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、AR Gennaro編、第20版、2000年、Williams & Wilkins、PA、USAから入手可能な知識に従って使用される。

【０１０１】

治療的方法及びこれらの方法において使用するための製品

本発明は、上記で定義されるような使用のためのhGDF-15阻害剤に関する。

【０１０２】

更に、これらのhGDF-15阻害剤及びその使用に従って、本発明はまた、対応する治療的方法に関する。

【０１０３】

したがって、一実施形態では、本発明は、ヒト患者において固形癌中のCD8^{+}Tリンパ球のパーセンテージを増大する方法であって、hGDF-15阻害剤をヒト患者に投与するステップを含む方法に関する。

【０１０４】

別の実施形態では、本発明は、ヒト患者において免疫チェックポイントブロッカーによって固形癌を治療する方法であって、hGDF-15阻害剤をヒト患者に投与するステップ及び免疫チェックポイントブロッカーをヒト患者に投与するステップを含む方法に関する。

【０１０５】

これらの方法の好ましい実施形態は、本発明による使用のためにhGDF-15阻害剤について上記で定義される通りである。

【０１０６】

上記の方法、使用するためのhGDF-15阻害剤、使用するためのキット、組成物の別の実施形態では、hGDF-15阻害剤が、癌に対して医薬上活性である唯一の成分である。

【０１０７】

上記の方法、使用するためのhGDF-15阻害剤、使用するためのキット、組成物の代替実施形態では、hGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーが、癌に対して医薬上活性である唯一の成分である。

【０１０８】

上記の方法、使用するためのhGDF-15阻害剤、使用するためのキット、組成物の代替実施形態では、hGDF-15阻害剤は、癌に対して医薬上活性な1種又は複数の更なる成分と組み合わせて使用される。この実施形態の一態様では、癌に対して医薬上活性な1種又は複数の更なる成分は、公知の抗癌剤及び/又は免疫賦活性分子である。公知の抗癌剤として、これらに限らないが、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル及びイホスファミド等のアルキル化剤;アザチオプリン及びメルカププリン等の代謝拮抗剤;ビンカアルカロイド類(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン及びビンデシン)、タキサン類(例えば、パクリタキセル、ドセタキセル)エトポシド及びテニポシド等のアルカロイド類;カンプトテシン類(例えば、イリノテカン及びトポテカン)等のトポイソメラーゼ阻害剤類;アクチノマイシン、アントラサイクリン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、バルルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン及びマイトマイシン等の細胞傷害性抗生物質類;並びに放射性同位元素類が挙げられる。癌に対して医薬上活性な以下の成分は、hGDF-15阻害剤と組み合わせて使用されることが特に好ましく、免疫賦活性分子として、抗LAG-3、抗B7H3、抗TIM3、抗VISTA、抗TIGIT、抗KIR、抗CD27、抗CD137、抗Ox40、抗4-1BB、抗GITR、抗CD28、抗CD40又はIDO-阻害剤がある。更に、抗Her2、抗EGFR、抗クローディン又はそのグリコ最適化された後継物のようなその他の抗体治療も、それらが例えばhGDF-15阻害剤によって引き起こされる固形癌における免疫細胞浸潤の増強によってhGDF-15阻害剤との組合せから恩恵を受けるので、特に好ましい。同様に、ワクチン接種アプローチ(例えば、ペプチド又は樹状細胞を用いる)又は養子細胞療法、腫瘍応答性T細胞又は樹状細胞も、それらがhGDF-15阻害剤との組合せから恩恵を受けるので、特に好ましい。更に以下の治療も、それらがhGDF-15阻害剤と協力するので、特に好ましい:

・腫瘍及び免疫細胞に対して1つ又は複数の特異性を有する抗体又は抗体様分子(例えば、Bites、DARTS、DARPINS、カツマキソマブ)を用いる治療;

・例えば、IMA901、ISA203等のマルチペプチドワクチンを用いる、若しくはRNAベースのワクチン(例えば、CV9104)を用いる、腫瘍関連ペプチドに対するワクチンベースの免疫療法による治療及び/又は

・免疫細胞活性化物質(例えば、マクロファージを活性化するFAA誘導体又はSLP-AMPLIVANTコンジュゲート等のtoll様受容体のリガンド)を用いる治療。

【０１０９】

本発明による使用のための組合せ

本発明は、hGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーがヒト患者に投与される予定である、ヒト患者において固形癌を治療する方法における使用のためのhGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せを包含する。これらの組合せ及びその好ましい実施形態は、上記で定義される通りである。

【０１１０】

hGDF-15阻害剤及び免疫チェックポイントブロッカーの組合せは、一緒に投与されても別個に投与されてもよい。

【０１１１】

例えば、1つの好ましい実施形態では、hGDF-15阻害剤の投与は、免疫チェックポイントブロッカーの投与の開始の前に開始される予定である。この設定は、有利なことに、固形癌中のT細胞のパーセンテージ、特に、$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大させ、その結果、固形癌中の$CD8^+$T細胞の出発パーセンテージの増大により、免疫チェックポイントブロッカーを用いるその後の治療がより有効なものとなり得る。

【０１１２】

キット

本発明はまた、上記で定義されるような、hGDF-15阻害剤及び少なくとも1種の免疫チェックポイントブロッカーを含むキットを提供する。

【０１１３】

hGDF-15阻害剤及び1種又は複数の又はすべての免疫チェックポイントブロッカーは、別個の容器中に入っていても、又は単一の容器中に入っていてもよい。

【０１１４】

使用されるような容器は、hGDF-15阻害剤及び/又は少なくとも1種の免疫チェックポイントブロッカーを保存するのに適した任意の種類の容器であり得る。このような容器の非限定例として、バイアル及びプレフィルドシリンジがある。

【０１１５】

キットは、hGDF-15阻害剤及び少なくとも1種の免疫チェックポイントブロッカーに加えて、更なる治療薬を含有し得る。例えば、キットは、癌に対して医薬上活性な1種又は複数の更なる成分を含有し得る。癌に対して医薬上活性な1種又は複数の更なる成分は、上記で定義される通りであり得る。癌に対して医薬上活性なこのような更なる成分は、本発明の方法において、hGDF-15阻害剤及び少なくとも1種の免疫チェックポイントブロッカーと一緒に使用できる。

【０１１６】

好ましくは、本発明のキットは、使用のための説明書を更に含む。

【０１１７】

配列

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

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

QVKLQQSGPGILQSSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYC

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

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC

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

GFSLSTSGMG

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

IYWDDDK

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

ARSSYGAMDY

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

QNVGTN

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

SAS

配列番号7（モノクローナル抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の軽鎖CDR3領域ペプチド配列）:
QQYNNFPYT
配列番号8（組換え成熟ヒトGDF-15タンパク質）:
GSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCC
VPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
配列番号9（ヒトGDF-15前駆体タンパク質）:
MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDL
VPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLS
PPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
配列番号10（ヒトGDF-15前駆体タンパク質+N末端及びC末端GSGSリンカー）:
GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSW
EDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAP
ALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR
EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCIGSGSG
SG
配列番号11（Flagペプチド）:DYKDDDDKGG
配列番号12（HAペプチド）:YPYDVPDYAG
配列番号13（ヒトGDF-15由来ペプチド）:ELHLRPQAARGRR
配列番号14（ヒトGDF-15由来ペプチド）:LHLRPQAARGRRR
配列番号15（ヒトGDF-15由来ペプチド）:HLRPQAARGRRRA
配列番号16（ヒトGDF-15由来ペプチド）:LRPQAARGRRRAR
配列番号17（ヒトGDF-15由来ペプチド）:RPQAARGRRRARA
配列番号18（ヒトGDF-15由来ペプチド）:PQAARGRRRARAR
配列番号19（ヒトGDF-15由来ペプチド）:QAARGRRRARARN
配列番号20（ヒトGDF-15由来ペプチド）:MHAQIKTSLHRLK
配列番号25（B1-23と結合するGDF-15エピトープの一部を含むGDF-15ペプチド）:
EVQVTMCIGACPSQFR
配列番号26（B1-23と結合するGDF-15エピトープの一部を含むGDF-15ペプチド）:
TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

【０１１８】

本出願において言及される核酸配列は以下の通りである(5'から3'の順に;標準核酸コードに従って表される):
配列番号21（配列番号1において定義されるアミノ酸配列をコードするDNAヌクレオチド配列）:
CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTT
TTCACTGAGTACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTT
ACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACCCAACCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATCCCTCCAGAAACCAGGTA
TTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGT
配列番号22（配列番号2において定義されるアミノ酸配列をコードするDNAヌクレオチド配列）:
GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCA
GAATGTGGGTACTAATGTGGCCTGGTTTCTACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTTATTTACTCGGCATCCTACC
GGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACGTGCAGTCT
GAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGT
配列番号23（配列番号5において定義されるアミノ酸配列をコードするDNAヌクレオチド配列）:
GCTCGAAGTTCCTACGGGGCAATGGACTAC
配列番号24（配列番号7において定義されるアミノ酸配列をコードするDNAヌクレオチド配列）:

CAGCAATATAACAACTTTCCGTACACG

【０１１９】

更なるアミノ酸配列は以下の通りである(N末端からC末端の順序で;一文字アミノ酸コードで表される):

配列番号27 (H1L5ヒト化B1-23抗GDF-15抗体の重鎖のアミノ酸配列):
QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTITKDPSKNQV
VLTMTNMDPVDTATYYCARSSYGAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号28 (H1L5ヒト化B1-23抗GDF-15抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列):
QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTITKDPSKNQV
VLTMTNMDPVDTATYYCARSSYGAMDYWGQGTLVTVSS

配列番号29 (H1L5ヒト化B1-23抗GDF-15抗体の重鎖定常ドメインのアミノ酸配列):
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

配列番号30 (H1L5ヒト化B1-23抗GDF-15抗体の軽鎖のアミノ酸配列):
DIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTEFTLTISSLQP
EDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGTKLEIKRAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号31 (H1L5ヒト化B1-23抗GDF-15抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列):
DIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTEFTLTISSLQP
EDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGTKLEIKR

配列番号32 (H1L5ヒト化B1-23抗GDF-15抗体の軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列):
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号33 (キメラB1-23抗GDF-15抗体の重鎖のアミノ酸配列):
QVKLQQSGPGILQSSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISKDPSRNQV
FLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号34 (キメラB1-23抗GDF-15抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列):
QVKLQQSGPGILQSSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISKDPSRNQV
FLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMDYWGQGTSVTVSS

配列番号35 (キメラB1-23抗GDF-15抗体の重鎖定常ドメインのアミノ酸配列):
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

配列番号36 (キメラB1-23抗GDF-15抗体の軽鎖のアミノ酸配列):
DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQS
EDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号37（キメラB1-23抗GDF-15抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQS
EDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGTKLEIKRTVA

配列番号38（キメラB1-23抗GDF-15抗体の軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列）:
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号39（01G06抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQAPGQSLEWMGQINPNNGLIFFNQKFQGRVTLTTDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGTLVTVSS

配列番号40（01G06抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENLHNYLAWYQQKPGKSPKLLIYDAKTLADGVPSRFSGSGSGTDY
TLTISSLQPEDFATYYCQHFWSDPYTFGQGTKLEIK

配列番号41（03G05抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVNQRPGQGLEWIGDINPSNGRSKYNEKFKNKATMT
ADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVLDGAMDYWGQGTSVTVSS

配列番号42（03G05抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGS
GTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGSKLEIK

配列番号43（04F08抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTYGMGVTWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTI
SKDTSNNQVFLKITSVDTADTATYYCAQTGYSNLFAYWGQGTLVTVSA

配列番号44（04F08抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKLGQSPKTLIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGTKLEIK

配列番号45（06C11抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLNTYGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTI
SKDASNNRVFLKITSVDTADTATYYCAQRGYDDYWGYWGQGTLVTISA

配列番号46（06C11抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF
ILTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELK

配列番号47（08G01抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
EVLLQQSGPEVVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGEINPNNGGTFYNQKFKGKATLT
VDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGTSVTVSS

配列番号48（08G01抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTQY
SLKINSLQPEDFGSYYCQHFWSSPYTFGGGTKLEIK

配列番号49（14F11抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWLADIWWDDDKYYNPSLKSRLTI
SKDTSSNEVFLKIAIVDTADTATYYCARRGHYSAMDYWGQGTSVTVSS

配列番号50（14F11抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSPSYRYSGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPHTFGGGTKLEMK

配列番号51（17B11抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHNDWDDDKRYKSSLKSRLTI
SKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARRVGGLEGYFDYWGQGTTLTVSS

配列番号52（17B11抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列）:
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSRFSYMHWFQQKPGQAPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGS
GTDFTLNIHPVEGEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

【実施例】

【０１２０】

参照実施例1～3は、本発明による組成物、キット、方法及び使用において使用できるhGDF-15阻害剤を例示する。このhGDF-15阻害剤は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれるWO2014/049087から知られているモノクローナル抗体である:

【０１２１】

参照実施例1:GDF-15抗体B1-23の作製及び特徴付け

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

【０１２２】

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

【０１２３】

市販の試験ストリップシステムによって、B1-23を、IgG2a(κ鎖)アイソタイプとして同定した。表面プラズモン共鳴測定を使用して、解離定数(Kd)を以下の通りに決定した:

【０１２４】

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

【０１２５】

バイオセンサーを調製するために、組換え成熟ヒトGDF-15タンパク質をフローセル1及び2上に固定化した。一方のフローセル上の、バキュロウイルス(Baculvirus)によってトランスフェクトされた昆虫細胞(HighFive昆虫細胞)に由来する組換えGDF-15及び大腸菌(E.coli)における発現に由来するもう一方の組換えタンパク質を使用した。GLCセンサーチップを、スルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)及びEDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド)(Biorad ProteOnアミンカップリングキット)を製造業者の推奨に従って使用して活性化し、続いて、センサー表面にタンパク質を、最大約600RU(1Ru=1pg mm^{-2})の密度でロードした。次いで未反応のカップリング基を、1MエタノールアミンpH8.5を用いて灌流することによってクエンチし、チップにランニングバッファーを灌流することによってバイオセンサーを平衡化させた(HBS150と呼ばれる10M HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005% Tween-20、pH7.4)。対照として、2つのフローセルを使用し、1つはタンパク質がカップリングされていない空のフローセルであり、1つは同一カップリング化学及び同一カップリング密度を使用して固定された非生理学的タンパク質パートナー(ヒトインターロイキン-5)とカップリングされたフローセルであった。相互作用測定のために、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23をHBS150に溶解し、分析物として6種の異なる濃度(濃度:0.4、0.8、3、12、49及び98nM)で使用した。断続的な再生を避けるためにワンショット動力学(one-shot kinetics)設定を使用して分析物をバイオセンサー中に灌流し、すべての測定を25℃で、100μl$分^{-1}$の流速を使用して実施した。処理のために、すべてのその他のSPRデータから空のフローセル(フローセル3)のSPRデータを差し引くことによって、バルクフェイス効果(bulk face effect)及びセンサーマトリックスとの非特異的結合を除去した。ソフトウェアProteOn Managerバージョン3.0を使用して得られたセンサーグラムを解析した。結合動力学の解析のために、1:1　ラングミュア型相互作用を仮定した。会合速度定数については、$5.4\pm0.06\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$($k_{on}$)の値、解離速度定数については、$4.3\pm0.03\times10^{-4}s^{-1}$($k_{off}$)の値を決定できた(値は、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の、昆虫細胞発現に由来するGDF-15tとの相互作用についてである)。方程式$K_D=k_{off}/k_{on}$を使用して平衡解離定数を算出し、約790pMの値を得た。大腸菌(E.coli)発現由来のGDF-15と、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の相互作用の親和性値は2倍未満異なり、昆虫細胞及び大腸菌(E.coli)由来のGDF-15の速度定数は約45%逸脱し、したがって、SPR測定の正確性内にあり、親和性の真の相違を反映しない可能性が高い。使用される条件下で、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23はヒトインターロイキン-5との結合を示さず、したがって、相互作用

データ及び抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の特異性が確認される。

【０１２６】

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

GSARNGDHCP LGPGRCCRLH TVRASLEDLG WADWVLSPRE VQVTMCIGAC PSQFRAANMH AQIKTSLHRL KPD TVPAPCC VPASYNPMVL IQKTDTGVSL QTYDDLLAKD CHCI

である。

(配列番号8)

【０１２７】

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

【０１２８】

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

【０１２９】

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

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

【０１３０】

抗原:GDF-15:

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSW EDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAP ALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCIGSGSG SG(リンカー付きの322アミノ酸)(配列番号10)

【０１３１】

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

【０１３２】

対照ペプチド:

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

【０１３３】

ペプチドチップ識別子:

000264_01(10/90、Ala2Aspリンカー)

【０１３４】

染色条件:

標準バッファー:PBS、pH7.4+0.05% Tween 20

ブロッキングバッファー:Rocklandブロッキングバッファー MB-070

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

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

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

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

【０１３５】

スキャナー:
Odysseyイメージングシステム、LI-COR Biosciences
設定:オフセット:1mm;解像度:21μm;輝度　緑/赤: 7/7

【０１３６】

結果:
標準バッファー中での30分及びブロッキングバッファー中での30分の予備膨潤後、10、12及び15 merのB7H3由来直鎖状ペプチドを有するペプチドアレイを、二次ヤギ抗マウスIgG(H+L)IRDye680抗体とともに1:5000の希釈でのみ、室温で1時間インキュベートして、二次抗体のバックグラウンド相互作用を解析した。PEPperCHIP(登録商標)を標準バッファーを用いて2×1分洗浄し、蒸留水ですすぎ、空気流中で乾燥させた。21μmの解像度及び7/7の緑/赤輝度でOdysseyイメージングシステムを用いて読み取りを行った:本発明者らは、高頻度結合剤として知られるアルギニンリッチペプチド(ELHLRPQAARGRR(配列番号15)、LHLRPQAARGRRR(配列番号16)、HLRPQAARGRRRA(配列番号17)、LRPQAARGRRRAR(配列番号18)、RPQAARGRRRARA(配列番号19)、PQAARGRRRARAR(配列番号20)及びQAARGRRRARARN(配列番号21))の弱い相互作用を観察し、荷電抗体色素とのイオン性相互作用により塩基性ペプチドMHAQIKTSLHRLK(配列番号22)を用いた。

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

【０１４０】

参照実施例3:質量分析的エピトープ切り出し及びエピトープ抽出によるペプチドリガンドエピトープの構造的同定
抗体B1-23と結合する組換えヒトGDF-15のエピトープは、エピトープ切り出し法及びエピトープ抽出法によって同定された(Suckauら　Proc Natl Acad Sci U S A. 1990年12月;87(24):9848～9852頁;R.Stefanescuら、Eur.J.Mass Spectrom. 13、69～75頁(2007年))。

【０１４１】

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

【０１４２】

エピトープ抽出実験:

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

【０１４３】

エピトープ切り出し実験:

次いで、親和性カラム上に固定された抗体B1-23を、組換えGDF-15とともに2時間インキュベートした。次いで、親和性カラム上に形成された免疫複合体を、トリプシンとともに37℃で2時間インキュベートした。切断は、組換えGDF-15に由来する種々のペプチドをもたらした。固定された抗体自体は、タンパク質分解的に安定である。抗体によって遮蔽され、このように、タンパク質分解による切断から保護された消化されたGDF-15タンパク質の得られたペプチドを酸性条件下(TFA、pH2)で溶出し、集め、質量分析によって同定した。

【０１４４】

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

【０１４５】

【表Ａ】

ペプチド	配列中の位置	質量	イオン/電荷
EVQVTMCIGACPSQFR (配列番号25)	40～55	1769.91	590.50(3+)
TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (配列番号26)	94～114	2310.96	771:33(3+)

【０１４６】

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

【０１４７】

本発明は、以下の非限定例によって例示される:

【０１４８】

(実施例1)

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

【０１４９】

本発明者らは、免疫チェックポイントブロッカーを投与されている癌患者が、hGDF-15

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

【０１５０】

研究及びその後の解析は以下の通りに実施した:

【０１５１】

臨床研究の組み入れ基準:

適格な患者は18歳以上であり、組織学的又は細胞学的に確認された切除不能なステージIII又はステージIVの黒色腫を有しており、局所療法に適しておらず、最後のイピリムマブ用量(最小2用量、3週間ごとに3mg/kg 1回)の24週以内に疾患進行が確認され、以前のBRAF又はMEK阻害剤療法又は両方(BRAFV600変異体陽性の場合)、イピリムマブ関連有害事象のグレード0～1への解決又は改善及び研究薬物の第1の用量の前の少なくとも2週間のプレドニゾン用量10mg/日以下、米国東海岸癌臨床試験グループ(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG)実施状態0又は1、固形癌の効果判定基準(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)バージョン1.1(RECIST v1.1)で測定可能な疾患、並びに絶対好中球カウント(mLあたり≧1500個細胞)、血小板(mLあたり≧100000個細胞)、ヘモグロビン(≧90g/L)、血清クレアチニン(≦1・5正常の上限[ULN])、血清総ビリルビン(≦1・5ULN又は総ビリルビン濃度>1・5ULNを有する患者について直接ビリルビン≦ULN)、アスパラギン酸及びアラニンアミノトランスフェラーゼ(≦2・5ULN又は肝臓転移を有する患者について≦5ULN)、国際標準比又はプロトロンビン時間(抗凝固薬を使用しない場合≦1・5ULN)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(抗凝固薬を使用しない場合≦1・5ULN)、について事前に特定した範囲内の値とした。患者は、直近の療法の最後の用量とペムブロリズマブの第1の用量の間に少なくとも4週間のウォッシュアウト期間を有していた。既知活動性脳転移又は癌性髄膜炎、活動性自己免疫疾患、全身療法を必要とする活動性感染、HIV感染の既知病歴、活動性B型肝炎ウイルス又はC型肝炎ウイルス感染、12週間よりも長く持続するグレード4イピリムマブ関連有害事象又はグレード3イピリムマブ関連有害事象の病歴、又は任意のその他の抗PD-1若しくは抗PD-L1療法を用いる以前の治療を有する患者は、研究から排除された。

【０１５２】

患者の治療:

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

【０１５３】

奏効の判定基準:

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

【０１５４】

酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によるhGDF-15血清レベルの解析:

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

【０１５５】

バッファー及び試薬:
緩衝ブロッキング溶液:PBS中1% BSA(画分V pH7.0、PAA社)
洗浄溶液:PBS-Tween(0.05%)
標準:ヒトGDF-15(ストック濃度120μg/ml、R&D Systems社製)
捕獲抗体:ヒトGDF-15 MAb(クローン147627)R&D Systems社製、マウスIgG2B(カタログ番号MAB957、R&D Systems社製、ストック濃度360μg/ml)
検出抗体:ヒトGDF-15ビオチン化された親和性精製されたPAb、ヤギIgG(カタログ番号BAF940、R&D Systems社製、ストック濃度9μl/ml)
ストレプトアビジン-HRP(カタログ番号DY998、R&D Systems社製)
基質溶液:10ml 0.1M NaOAc pH6.0+100μl TMB+2μl H_2O_2
停止溶液:1M H_2SO_4

【０１５６】

解析手順:
1.プレート調製:
a.捕獲抗体を、PBSで2μg/mlの作業濃度に希釈した。96ウェルマイクロプレート(Nunc maxisorp(登録商標))を、外側の列(A及びH)を除いて、ウェルあたり50μlの希釈捕獲抗体を用いて直ちにコーティングした。列A及びHを、実験の間のサンプルの蒸発を防ぐためにバッファーで満たした。プレートを穏やかに軽くたたいて、各ウェルの底が完全に覆われることを確実にした。プレートを湿潤チャンバー中に入れ、室温(RT)で一晩インキュベートした。
b.各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。
c.各ウェルに150μlのブロッキング溶液を添加し、続いて、RTで1時間インキュベートした。
d.各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。

【０１５７】

2.アッセイ手順:
a.標準を調製した。GDF-15を、緩衝ブロッキング溶液で1ng/mlの最終濃度に希釈した(4.17μl GDF+496μl緩衝ブロッキング溶液)。1:2段階希釈を作製した。
b.二連のサンプル1:20(6μl+114μl緩衝ブロッキング溶液)を調製した。
c.ウェルあたり50μlの希釈サンプル又は標準を添加し、続いて、RTで1時間インキュベートした。

【０１５８】

【表Ｂ】

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

【０１５９】

a.各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。
b.検出抗体を、50ng/mlの最終濃度に希釈した(56μl+10mlブロッキングバッファー)。各ウェルに50μlの希釈検出抗体を添加し、続いて、RTで1時間インキュベートした。

c.各ウェルを吸引し、PBS-Tween（0.05%)を用いて3回洗浄した。
d.ストレプトアビジン-HRPを、1:200希釈した(50μl+10mlブロッキングバッファー)。各ウェルに50μLのストレプトアビジン-HRPの作業希釈を添加し、続いて、RTで20分間インキュベートした。
e.各ウェルを吸引し、PBS-Tween(0.05%)を用いて3回洗浄した。
f.基質溶液を調製した。各ウェルに50μLの基質溶液を添加し、続いて、RTで20分間インキュベートした。
g.各ウェルに50μLの停止溶液を添加した。
h.450nmに設定したマイクロプレートリーダーを使用して、各ウェルの光学濃度を直ちに調べた。

【０１６０】
3.GDF-15血清力価の算出:
a.各サンプル/GDF-15標準希釈を二連で適用した。GDF-15力価を調べるために、2連の平均を算出し、バックグラウンド(GDF-15を含まないサンプル)を差し引いた。
b.標準曲線を作製するために、線形範囲から得た値をX-Y-図(X軸:GDF-15濃度、Y軸:OD450)にプロットし、線形曲線フィットを適用した。既知濃度を有する標準希釈のOD450値から補間することによって、試験サンプルのGDF-15血清力価を算出した。
c.サンプルの最終GDF-15濃度を算出するために、それぞれの希釈係数を考慮した。標準範囲を下回る又は上回るOD値をもたらすサンプルを、適当な希釈で再解析した。

【０１６１】
hGDF-15血清レベルの患者データとの比較:
次いで、測定されたhGDF-15血清レベルを、研究から得られた患者奏効データと比較した。

【０１６２】
図1は、治療レジメンに対するレスポンダー及びノンレスポンダーのGDF-15血清レベルを示す。図からわかるように、ノンレスポンダーのほとんどは、すべてのレスポンダーよりも高いGDF-15血清レベルを有する。

【０１６３】
この結果はまた、それぞれ、<1.8ng/ml、1.8～4.2ng/ml及び>4.2ng/mlのhGDF-15血清レベルを有する患者中のレスポンダー及びノンレスポンダーの数を示す図2に反映されている。

【０１６４】
これらの知見は、高いGDF-15レベルが不十分な治療奏効と関連していることを示唆した。したがって、これらの知見をその統計的有意性について試験した:

【０１６５】
hGDF-15血清レベルの患者データとの統計的相関:
データ:
データ解析は、列(変数)サンプル表示、GDF-15(ng/ml)、レスポンダー/ノンレスポンダー、日数(死亡又は打ち切りまでの)及び進行中(進行中の生命の指数変数)を含有する35人の患者から得たサンプルから得たデータを含有するデータファイルに基づいていた。ペムブロリズマブを用いる治療の開始後4ヶ月の時点で、これらのデータのレスポンダー/ノンレスポンダー分類を行った。一部の血清サンプルは、解析のわずか前にしか得られなかったので、奏効は29人においてしか評価できなかった。1人の部分レスポンダー(腫瘍の大きさの>30%低減)は、レスポンダーとして評価した。LDH決定のために、4サンプルは溶血により排除されなければならなかった。

【０１６６】
アウトカム変数(エンドポイント):
a.全生存(死亡までの時間)。このエンドポイントは、データファイルに由来する死亡についてのイベント指標(1=死亡/0=生存)、変数「日数」に対応する、死亡又は打ち切りまでの時間(患者が生存しているとわかっていた最後の時間)から構成される。

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

【０１６７】

【表Ｃ】

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

【０１６８】

データ解析:

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

【０１６９】
治療に対する奏効(2値変数)を、二項誤差分布及びロジットリンク関数(ロジスティック回帰)を用いて一般化線形モデル(GLM)によって解析した。4ヶ月後にRECIST1.1基準によって評価されるような治療に対する奏効について、連続予測変数としてGDF-15(ng/ml)を用いてモデルをフィッティングした。GDF-15>4.2ng/mlを有するグループにおいて奏効した患者がなかったので、このグループ対GDF-15<1.8ng/mlのグループについてのオッズ比推定値は極めて大きくなり、極めて広い信頼区間を有する。カテゴリー予測変数としてGDF-15に基づくグループ化変数を用いて別のモデルをフィッティングする代わりに、カイ二乗(χ^2)検定を使用して、グループを比較した(レスポンダーの割合の同等性を試験する)。レスポンダー/ノンレスポンダーの数は極めて小さい(<5)ことがあるので、フィッシャーの正確確率検定を使用する感度解析を更に行った。最後の4ヶ月内に抗PD-1のみを投与されていた患者は、レスポンダー又はノンレスポンダーとしてまだ分類できなかった。したがって、29人の患者のみを療法に対する奏効について評価できた。

【０１７０】
データ解析は、統計ソフトウェアパッケージR(R Core Team、2014、バージョン3.1.0)を使用して実施した。

【０１７１】
結果:
表1～2は、連続予測変数としてGDF-15を用いたモデルから得た結果を示す。死亡のハザードは、高濃度のGDF-15について有意に増大した(HR>1、表1)が、治療に対する奏効の確率は、オッズ比(OR)によって示されるように有意に低下した(OR<1、表2)。図3は、レスポンダー/ノンレスポンダーでの対応するデータ並びにモデルによって予測される治療に対する奏効の確率を示す。

【０１７２】
表3は、カテゴリー予測変数としてGDF-15に基づくグループを用いたコックス比例ハザードモデルから得た結果を示す。GDF-15<1.8ng/mlを有するグループは、参照グループとして使用されている(表中に示されていない)。表3中の2つのハザード比は、1.8から4.2の間のGDF-15を有するグループ及びGDF-15>4.2を有するグループの参照グループとの比較を表す。これらのグループの両方において、死亡のハザードは増大されるが(参照グループと比較して)、GDF-15>4.2を有するグループより大きな程度までである。図4は、3つのグループにおける生存についてのカプラン・マイヤー曲線を示す。

【０１７３】
レスポンダーの割合は、グループ間で有意に異なっていた(レスポンダー1: $\chi^2_{df=2}$=16.04、P=0.0003)。この結果は、フィッシャーの正確確率検定の結果によって確認された(P=0.0003)。グループあたりの死亡及びレスポンダーの数は、Table 1(表1)に示されている。更に、Table 2(表2)は、各グループのGDF-15のいくつかの記述統計学を示す。

【０１７４】
【表１】

Table 1:

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

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

【０１７５】

【表２】

Table 2:

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

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

【０１７６】

【表３】

Table 3:

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

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

【０１７７】

【表４】

Table 4:

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

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

【０１７８】

【表５】

Table 5:

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

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

【０１７９】

次いで、GDF-15レベルについて得られた統計結果を比較するために、患者血清中の既知予後因子乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)のレベルについての統計分析も実施した。

【０１８０】

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

【０１８１】

【表６】

Table 6:

	GDF-15 (ng/ml)		LDH (U/l)	
	レスポンダー(n=19)	ノンレスポンダー(n=10)	レスポンダー(n=9)	ノンレスポンダー(n=16)
中央値	1.2	4.6	371	591
平均	1,7	5.6	455	1312
標準偏差	1.2	3.6	218	1108
t検定(両側、タイプ3)	0.012		0.061	

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

【０１８２】

4つの血液サンプルでは、溶血によりLDH決定は失敗した。

【０１８３】

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

【０１８４】

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

【０１８５】

【表７】

Table 7:

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

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

【０１８６】

【表８】

Table 8:

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

Table 8:小さい値ほどより効率的なモデルを示す赤池情報量基準(AIC)に基づくモデル比較。
df:自由度。すべてのモデルは、25人の患者から得たサンプルを含んでいた。

【０１８７】
図5Aは、連続予測変数としてLDHを使用する一般化線形モデルによって予測されるような治療に対する奏効(レスポンダー1)の確率を示す。丸はデータを示し、曲線はモデルを示す。垂直線は、治療奏効の確率が0.5であるLDH濃度を示す。患者コホートは、同一であった。しかし、4人の患者では、LDHレベルの信頼のおける決定は溶血のために失敗した。図5Bは、レスポンダー及びノンレスポンダー並びにそれぞれのhGDF-15及びLDHレベルのグラフを示す。カットオフ値がすべてのレスポンダーを網羅するように選択される場合には、GDF-15に基づく試験によって、6人(9人のうち)のノンレスポンダーの同定が可能となるが、LDHレベルに基づく解析は、4人(9人のうち)のノンレスポンダーしか識別できない。LDH試験については、データの喪失を引き起こす4つの溶血サンプルが排除されなければならなかった。
【０１８８】
まとめ:
総合すると、上記の実施例1の統計結果は、治療に対する奏効の見込みが、患者血清中のhGDF-15レベルが増大するにつれ有意に低減することを示した。例えば、Table 2(表2)中に示される0.389のオッズ比は、hGDF-15血清レベルが1ng/mlだけ増大すると、治療に対する奏効の見込みが元の値の0.389倍の値に低減する、すなわち、約60%低減することを示す。hGDF-15血清レベルが2ng/mlだけ増大すると、治療に対する奏効の見込みが元の値の0.389×0.389倍=0.151倍の値に低減する、すなわち、約85%低減する。
【０１８９】
実施例1の結果は、hGDF-15が、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効に負に影響を及ぼすように作用することを示唆する。したがって、本発明によれば、hGDF-15の阻害剤は、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効に対するhGDF-15の負の効果を阻害するのに、黒色腫においてだけでなく、本明細書において言及される固形癌のすべてにおいて、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効を改善するのに有用となる。
【０１９０】
(実施例2)
GDF-15レベルは、種々の腫瘍実体の転移中の$CD8^+$腫瘍浸潤リンパ球(TIL)と逆相関する。
患者の奏効に対するhGDF-15の負の効果の一因となるhGDF-15の機序を同定するために、種々の固形腫瘍からの脳転移をhGDF-15の発現について、及び免疫系の細胞の存在について解析した:
【０１９１】
組織検体及び組織処理:
記録保存された脳転移から得た、ホルマリン固定されパラフィン包埋された(FFPE)組織を解析し、それらは組織マイクロアレイ(TMA)として集められ処理された。すべての検体は、UCT腫瘍バンク(Goethe-University、Frankfurt am Main、Germany、member of the G

erman Cancer Consortium (DKTK)、Heidelberg、Germany and German Cancer Research Center (DKFZ)、Heidelberg、Germany)から、又は癌レジストリー腫瘍バンク「Blut-und Gewebebank zur Erforschung des malignen Melanoms」(Department of Dermato-oncolgy、University Hospital Tubingen、Germany)から入手した。この研究の承認は、2つの独立倫理委員会(倫理委員会UCT Frankfurt /Goethe University Frankfurt am Main、Germany:プロジェクト番号:GS 4/09;SNO_01-12;倫理委員会University of Tubingenプロジェクト番号:408/2013BO2)によって付与された。黒色腫(n=98)、NSCLC(n=33)、乳癌(n=18)、RCC(n=10)、SCLC(n=7)、結腸直腸癌(n=7)、特定不能であった癌(癌NOS n=11)及びその他としてまとめられた稀な腫瘍の検体(n=6)を含む、脳転移を有する合計190人の患者を調べた。155人の患者の生存データ(腫瘍切除後の生存時間)を集め、更に、169人の患者における脳転移の数及び55人の黒色腫患者のサブコホートにおける脳転移の大きさを解析した。

【０１９２】

免疫組織化学:

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

【０１９３】

統計解析:

すべてのサンプルを、染色されたTMAコア上のすべての細胞と関連する陽性細胞の頻度(パーセンテージとして)に従ってスコア化した。hGDF-15発現については、これまでに詳細に記載されたような[21,22]スコアを使用した:頻度0～1%　スコア0;1～10%　スコア1;10～25%　スコア2;25～50%　スコア3;>50%　スコア4;更に、頻度スコアに染色の強度を乗じ(1弱い染色、2中程度の染色、3強い染色)、最後に順序尺度化hGDF-15スコア(0、1、2、3、4、6、8、9、12)を得た。順序尺度化変数を、ノンパラメトリックウィルコクソン/クラスカル-ウォリス検定及びダンの方法と比較して、複数の試験について補正した。連続変数については、ANOVAと、それに続くテューキー-クレーマーHSDポスト-ホック試験を使用して種々の脳転移実体間で平均を比較した。脳転移の大きさとマーカー発現の相関解析のために、線形フィットとそれに続くANOVAを実施し、順序尺度化変数の場合には、スピアマンのロー相関解析を使用した。すべての統計解析について、$p<0.05$の有意レベルを設定した。

【０１９４】

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

【０１９５】

結果:

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

【０１９６】
したがって、次に種々の黒色腫脳転移にわたって、hGDF-15レベルとCD3$^+$T細胞のパーセンテージの間に逆相関が存在するか否かを解析した。図7Aは、GDF-15スコア(「統計解析」の節において上記で記載されたように得られた)に対するCD3$^+$細胞のパーセンテージのプロットを示す。図7Aに示されるように、CD3$^+$細胞のパーセンテージとGDF-15スコアの間に統計的に有意な逆相間があった(p=0.0015)。
【０１９７】
同様に、種々の黒色腫脳転移にわたって、hGDF-15レベルとCD8$^+$T細胞のパーセンテージの間に逆相関が存在するか否かも解析した。図7Bは、GDF-15スコア(「統計解析」の節において上記のように得られた)に対するCD8$^+$細胞のパーセンテージのプロットを示す。図7Bに示されるように、CD8$^+$細胞のパーセンテージとGDF-15スコアの間に統計的に有意な逆相間があった(p=0.0038)。
【０１９８】
対照的に、スピアマンの順位相関係数(ロー)検定によれば、GDF-15をFOXP3と相関させることは、統計的に有意な結果をもたらさなかった(種々の腫瘍実体にわたって、p=0.8495;黒色腫転移のみを評価した場合、p=0.2455)。
【０１９９】
最後に、種々の腫瘍実体からの脳転移にわたって、hGDF-15レベルと、CD8$^+$及びCD3$^+$T細胞のパーセンテージの間に逆相関が存在するか否かも解析した。図8は、種々の腫瘍実体(黒色腫、CRC、RCC、乳癌、NSCLC及びSCLC)からの、それぞれ168の(CD3について)又はそれぞれ169の(CD8について)脳転移におけるCD8$^+$及びCD3$^+$T細胞のパーセンテージに対するGDF-15スコアのプロットを示す。プロットは、「統計解析」の節において上記で記載されたように得た。図8に示されるように、CD8$^+$細胞のパーセンテージとGDF-15スコアの間の統計的に有意な逆相関(p=0.0311)並びにCD3$^+$細胞のパーセンテージとGDF-15スコアの間の統計的に有意な逆相間(p=0.0093)があった。その他のマーカー(PD-L1、PD-1、FOXP3)もやはり、CD3及びCD8T細胞浸潤との正の相関関係を示した。
【０２００】
まとめ:
上記の結果は、転移におけるhGDF-15の、一般的なT細胞マーカータンパク質CD3を発現するT細胞のパーセンテージとの逆相関だけでなく、転移におけるCD8$^+$Tリンパ球のパーセンテージとの逆相関もあることを示す。CD8$^+$Tリンパ球の存在は、抗PD-1抗体を用いる免疫チェックポイント阻害後の腫瘍退縮にとって特別に必要であるとこれまでに示されたので、これは特筆すべきことである(Tumehら、Nature. 2014年11月27日; 515(7528):568～71頁)。
【０２０１】
したがって、本発明によれば、hGDF-15の治療的阻害を使用して、腫瘍転移を含む固形腫瘍中のCD8$^+$Tリンパ球のパーセンテージを増大できる。固形腫瘍中のCD8$^+$Tリンパ球のこの増大を、固形腫瘍の療法のために使用できる。本発明の限定されない態様では、特に好適な治療的組合せは、hGDF-15阻害剤の免疫チェックポイントブロッカーとの組合せである。この組合せの有利な効果は、hGDF-15の阻害が固形腫瘍中のCD8$^+$Tリンパ球のパーセンテージを増大し、それによって、免疫チェックポイント阻害との相乗的治療的効果につながるということである。したがって、本発明を、好ましい実施形態において言及されるような固形腫瘍のすべてに適用できる。
【０２０２】
(実施例3)
GDF-15は、T細胞の内皮細胞との接着を低減する。
本発明者らは次いで、hGDF-15が固形腫瘍中のT細胞のパーセンテージに影響を及ぼす方法を決定しようと試みた。
【０２０３】
血流から腫瘍組織へのT細胞の浸潤にとって必要であるステップは、T細胞が内皮と最初

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

【０２０４】

T細胞フロー/接着実験(HUVECでの):

1日目:

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

b.フィブロネクチンを吸引し、続いて、HUVEC培地を用いて洗浄した。

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

d.それらを洗浄し、1×10^6個細胞/mLに希釈した。

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

f.μ-スライドVIを蓋で覆い、37℃、5%CO_2iでインキュベートした。

【０２０５】

2日目:

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

【０２０６】

3日目:

a.T細胞を単離した(汎T細胞の陰性単離)。

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

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

d.顕微鏡に隣接したステージトップインキュベーターを予温し、ガス-ミックスを接続した(5% CO_2、16% O_2、79% N_2)。

e.3×50mLシリンジを調製した:

i.T細胞(1×10^6個細胞/mL):1mL

ii.T細胞GDF15(1×10^6個細胞/mL):1mL

iii.培地

f.シリンジ1をチャネル1に接続し(以下の表を参照のこと)、フローを開始した(0.5dyn/cm^2:0.38mL/分=22.8mL/h)。

g.T細胞を3分間流し、その間に顕微鏡上で10視野を予め定義した。

h.各視野を5秒間ビデオ録画した。

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

【０２０７】

【表Ｄ】

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

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

【０２０８】
統計解析:
非正規分布データの試験のためのマン-ホイットニー検定を使用して、すべてのデータを比較した。p<0.05の値を統計的に有意であると考えた。
【０２０９】
結果:
実験の結果は図9に示されている。この図は、いくつかの接着パラメータ、すなわち
a.T細胞の内皮細胞との中程度の接着の形態を反映する、秒あたりの視野あたりのローリングT細胞数(9A;データはチャネル番号3(「GDF-15」)及びチャネル番号2(「対照」)から入手した)
b.T細胞と内皮細胞間の接着の制限を増大する、T細胞のローリング速度(0.2秒あたりのピクセルで測定された)(9B;データはチャネル番号3(「GDF-15」)及びチャネル番号2(「対照」)から入手した)、及び
c.視野あたりの接着細胞数(9C;データはチャネル番号3(「GDF-15」)及びチャネル番号2(「対照」)から入手した;及び9D)
の解析を示す。
【０２１０】
図9Cからわかるように、視野あたりの接着細胞数において反映されるように、hGDF-15を用いるT細胞の処置は、内皮細胞との接着を有意に低減することがわかった。同様の結果が、ローリングT細胞数を数えることによって接着を解析する場合に得られた(図9A)。更に、上記の結果に従って、hGDF-15を用いるT細胞の処置は、ローリング速度を有意に増大することがわかり、これは、T細胞と内皮細胞の間の相互作用時間の低減を示し、また、T細胞と内皮細胞の間の接着の低減を示す(図9B)。
【０２１１】
本発明者らは次に、hGDF-15によってどの細胞が標的とされるかを解析した(図9D)。hGDF-15を用いてHUVECのみが処理されたサンプルでは、T細胞の内皮細胞(HUVEC)との接着の中程度の低減が観察された。対照的に、hGDF-15を用いてT細胞のみが処理された場合又はhGDF-15を用いてT細胞及び内皮細胞(HUVEC)の両方が処置された場合のいずれかでは、T細胞の内皮細胞(HUVEC)との接着の強い低減が観察された。これらの結果は、hGDF-15がT細胞及び内皮細胞の両方に作用することを示すが、それらはまた、hGDF-15の主な接着効果はT細胞に対する効果であることも示す。
【０２１２】
次に本発明者らは、T細胞接着に対する腫瘍細胞によって分泌されるhGDF-15の効果がhG

DF-15阻害剤を用いて阻害され得るか否かを試験した。これを試験するために、本発明者らは、hGDF-15を分泌する黒色腫細胞株、UACC257を使用した:

【０２１３】

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

1日目:

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

b.フィブロネクチンを吸引し、続いてHUVEC培地を用いて洗浄した。

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

d.それらを洗浄し、1×10^6個細胞/mLに希釈した。

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

f.μ-スライドVIを蓋で覆い、37℃、5%CO_2でインキュベートした。

【０２１４】

2日目:

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

【０２１５】

3日目:

a.T細胞を単離した(汎T細胞の陰性単離)。

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

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

d.対照として、黒色腫細胞株UACC257の上清を、抗GDF-15を用いてプレコーティングしていないELISAプレート(b.を参照のこと)のウェル中でインキュベートした。

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

f.顕微鏡に隣接したステージトップインキュベーターを予温し、ガス-ミックスを接続した(5% CO_2、16% O_2、79% N_2)。

g.マイクロ流体フローシステムの4×2mLのチューブを調製した:

i.T細胞(1×10^6個細胞/mL):1mL

ii.T細胞GDF15(1×10^6個細胞/mL):1mL

iii.T細胞UACC257(GDF-15を含有する)

iv.GDF-15を枯渇させたT細胞UACC257

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

i.T細胞を3分間流し、その間に顕微鏡上で5視野を予め定義した。

j.各視野を5秒間ビデオ録画した。

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

【０２１６】

【表Ｅ】

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

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

【０２１７】
結果:
実験の結果は図10Aに示されている。この図は、秒あたりの視野あたりのローリングT細胞数の解析を示す。データは、チャネル番号1(「陰性対照」として刺激されていないHUVEC上の対照T細胞)、チャネル番号2(「陽性対照」として刺激されたHUVEC上の対照T細胞)、チャネル番号3(「GDF-15」)、チャネル番号4(「UACC257」:分泌されたGDF-15を含有するUACC257黒色腫細胞の上清中で培養されたT細胞)及びチャネル番号5(「UACC257+抗hGDF-15」:抗GDF-15 B1-23を用いて、分泌されたGDF-15を枯渇させたUACC257黒色腫細胞の上清中で培養されたT細胞)から得た。
【０２１８】
刺激されていないHUVEC上を流されたT細胞と比較して(「陰性対照」;中央値=秒あたり視野あたり28個のローリング細胞)、刺激されたHUVEC上にT細胞を流すこと(「陽性対照」)は、秒あたり視野あたりのローリング細胞の数を増大した(中央値=46)。hGDF-15を用いるT細胞の処置は、秒あたり視野あたりのローリング細胞の数を実質的に低減する(中央値=29)。また、GDF-15を分泌する黒色腫細胞株UACC257の上清とのT細胞のプレインキュベーションは、刺激されたHUVEC上を流れるT細胞(「陽性対照」)と比較して、秒あたり視野あたりのローリング細胞の数を実質的に低減する(中央値=36)。これとは対照的に、抗GDF-15 B1-23を用いて、分泌されたGDF-15を枯渇させた黒色腫細胞株UACC257の上清とのT細胞のプレインキュベーションは、刺激されたHUVEC上を流れるT細胞(陽性対照)に匹敵する、秒あたり視野あたりのローリング細胞の数(中央値=45)をもたらした。
【０２１９】
したがって、本発明によれば、hGDF-15阻害剤を使用して、例えば、固形癌の治療において、CD8+細胞を含むT細胞の内皮細胞との接着を増大できる。
【０２２０】
更に、上記のアッセイは、対象となる物質がhGDF-15阻害剤であるか否かを決定するのに使用する簡単なin vitroシステムを提供する。
【０２２１】
まとめ:
この実施例は、腫瘍細胞によって分泌されたGDF-15を含むGDF-15が、T細胞の内皮細胞との接着を低減することを示す。したがって、本発明によれば、hGDF-15阻害剤を用いる

処置を使用して、$CD8^+$T細胞を含むT細胞の内皮細胞への接着を増大できる。このような処置は、$CD8^+$T細胞を含むT細胞の、血流から固形癌への侵入を増大するであろう。hGDF-15阻害剤を用いるこのような処置に起因する固形癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージの増大は癌療法、例えば癌免疫療法にとって有利であり、それにおいて使用できる。$CD8^+$T細胞の固形癌への侵入及び固形癌中のこれらの$CD8^+$T細胞の存在は、免疫チェックポイントブロッカーを使用する治療的アプローチにとって特に有利であるので、本発明のhGDF-15阻害剤の特に有利な使用は、免疫チェックポイントブロッカーと組み合わせたその使用である。

【０２２２】

抗体H1L5(ヒト化B1-23)並びに01G06及び03G05(WO2014/100689の配列に従って遺伝子改変されたヒト化抗GDF-15抗体)による抗体中和を含むフロー-接着アッセイ

hGDF-15阻害剤を使用して、内皮細胞へのT細胞接着又はT細胞のローリングを増大できるという知見を含む、上記で観察された効果を更に確認するために、この実験を実施した。

【０２２３】

実験手順:

フロー/接着アッセイを、本実施例において上記で記載したように実施した。T細胞を、100ng/mlのGDF-15とともに1時間又は10μg/mlの抗体とともにプレインキュベートした100ng/mlのGDF-15とともに1時間プレインキュベートした。以下の抗GDF-15抗体を使用した:H1L5(ヒト化B1-23)、01G06及び03G05(WO2014/100689から得た配列に従って遺伝子改変されたヒト化抗GDF-15抗体)。

【０２２４】

結果:

結果は、図10Bに示されている。刺激されていないHUVEC上に流されたT細胞(陰性対照)と比較して、刺激されたHUVEC上にT細胞を流すこと(「陽性対照」)は、20秒あたり視野あたりのローリング細胞数を増大した。hGDF-15を用いるT細胞の処置は、20秒あたり視野あたりのローリング細胞数を実質的に低減した。これと対照的に、抗GDF-15抗体H1L5(ヒト化B1-23)、01G06又は03G05とともにプレインキュベートされたhGDF-15を用いるT細胞のプレインキュベーションは、抗GDF-15抗体が添加されなかったサンプルと比較して実質的に増大された20秒あたり視野あたりのローリング細胞数をもたらした。この効果は、試験された抗GDF-15抗体のすべてについて存在し、H1L5(ヒト化B1-23)抗体について明白であり、これは、T細胞のローリングに対するhGDF-15の効果をほとんど完全に逆転させた。

【０２２５】

結論

したがって、本発明によれば、hGDF-15阻害剤を使用して、CD8+細胞を含むT細胞の内皮細胞への接着、又はCD8+細胞を含む前記T細胞のローリングを増大できる。本発明によって、hGDF-15阻害剤は、固形癌中のCD8+細胞のパーセンテージを増大し、これらの癌の治療のために使用できる。これらのhGDF-15阻害剤は、これらに限らないが、抗体H1L5(ヒト化B1-23)、01G06及び03G05等の任意の既知抗GDF-15抗体であり得る。

【０２２６】

(実施例4)

同系$MC38^{tg\ hGDF-15+}$腫瘍保有マウスにおける、アジュバントと組み合わせた試験抗体免疫処置の抗腫瘍効力の評価

ヒト成長&分化因子(GDF)-15の阻害が免疫療法に対する奏効、特に腫瘍中の$CD8^+$T細胞を必要とする免疫療法に対する奏効を改善できるか否かを評価するために、マウスMC38結腸癌細胞を、ヒトGDF-15をヒト癌細胞株において見られるものと同様のレベルで発現するようにトランスフェクトした。酵素結合免疫吸着測定法(ELISA、R&D Systems、マウスGDF-15 DuoSet ELISA)によって評価されるように、MC38細胞は、検出可能なレベルのマウスGDF-15を発現しなかった(検出限界:7.81pg/ml)。

【０２２７】

0日目に、9週齢の雌のC57BL/6Jマウス(Charles River Laboratories社、BP 0109、F 69592 L'Arbresle、Cedexによって提供された)に麻酔し、2×10^5個の結腸MC38$^{tg\ hGDF-15}$細胞を用いて皮下に接種した。0日目に、抗GDF-15抗体(0.5%ウシ血清アルブミンを有する100μlのリン酸緩衝生理食塩水中、20mg/体重1kg、すなわち、マウスあたり約400μg)を用いる治療を開始し(腫瘍細胞接種後約6時間)、3、7、10、14、17及び21日目に反復した。13日目に、腫瘍が100から150mm^{3}の間の体積に達した時点で、動物を種々の治療グループにわたって無作為化し、それぞれの動物に50μlのリン酸緩衝生理食塩水の総容積中のアジュバント(100μg ポリイノシン酸:ポリシチジル酸(ポリ-ICLC (Hiltonol(登録商標)、Oncovir、Washington D.C.、USA))及び50μgのInVivoMAb 抗マウス(m)CD40抗体(クローンFGK4.5/FGK45))を用いて腹膜内に注射した。

【０２２８】

ポリ-ICLCは、一部のウイルス中に存在しTLR3を刺激する二本鎖RNAに対するその構造的類似性により、感染を刺激する。アゴニスト抗CD40抗体は、抗原提示細胞に対して更なるシグナルを提供する。CD40の刺激による樹状細胞の「ライセンス化」は、抗原特異的CD8$^+$T細胞の活性化を支持する。したがって、アジュバント治療は、特定の病原体を含まない条件下で維持されたマウスにおいて腫瘍特異的免疫細胞を誘導するように働く(Yadav Mら、Nature. 2014年11月27日;515(7528):572～6頁)。

【０２２９】

したがって、このアジュバント治療は、腫瘍中に免疫細胞を、特に腫瘍中にCD8$^+$T細胞を必要とする癌免疫療法のモデル系を表す。したがって、抗hGDF-15抗体等のhGDF-15阻害剤を用いる治療が、腫瘍中にCD8$^+$T細胞を必要とする癌免疫療法を含む癌免疫療法と協同することを更に確認するのに適しているモデル系である。

【０２３０】

まとめるために、以下の動物グループ(グループあたり10匹のマウス)を調査した:

・アジュバント免疫処置を用いないビヒクルグループ
・アジュバント免疫処置を用いない抗hGDF-15抗体B1-23を用いて処置されたグループ
・アジュバント免疫処置を用いるビヒクルグループ
・アジュバント免疫処置を用いる抗hGDF-15抗体B1-23を用いて処置されたグループ

【０２３１】

腫瘍の大きさを、ノギスに基づく腫瘍の長さ及び幅の測定によって週に3回測定した。

【０２３２】

その腫瘍体積が、式V=長さ×幅^2/2によって算出されるように2,000mm^{3}を超えた時点でマウスを屠殺した。同様に、その状態が、動物の安寧について一般に許容される限界を超えて悪化させる(質量損失≧15%、移動性の喪失、疲弊した挙動、毛皮の悪い状態)とわかった時点でマウスを屠殺した。

【０２３３】

生存しているマウスについて、腫瘍接種を過ぎて57日目まで理学的検査によって腫瘍の存在を決定した。結果は、図11に示されている。

【０２３４】

本発明者らによって実施されたこれまでの研究において、抗GDF-15抗体単独を用いる治療を有利に使用して癌を治療できるが、腫瘍を完全に根絶しなかった、すなわち、癌を治癒しなかったことがわかっている。同様に、図11では、ビヒクル処置されたマウスも、抗hGDF-15単独を用いて処置されたマウスも治癒されなかった。アジュバントを用いる(すなわち、ポリICLC及び抗CD40抗体を用いる)処置は、10匹のマウスのうち3匹を治癒した。特に、アジュバントを用いる処置を抗hGDF-15抗体を用いる処置と組み合わせた場合に、10匹のマウスのうち8匹が治癒された。したがって、抗hGDF-15抗体を用いる処置は、アジュバントを用いる処置と強く協同した。

【０２３５】

結論:

このモデル系から得た結果から、hGDF-15阻害剤が癌免疫療法と、特に腫瘍組織におい

て細胞傷害性活性を発揮するCD8$^+$T細胞等の免疫細胞の活性化を必要とする癌免疫療法と協同することが更に確認される。結果からまた、本発明のhGDF-15阻害剤の使用によって引き起こされる、癌中のCD8$^+$T細胞のパーセンテージの増大を、癌療法において有利に使用できることが更に確認される。

【０２３６】

選択された実験条件下で、マウス免疫モデル系は、迅速に成長する癌に対する抗原特異的CD8$^+$T細胞応答を積み重ねるには極めてわずかな時間しか有さない。したがって、アジュバントを使用して、マウス系における自発的免疫応答を更に支持した。対照的に、癌が長期間(例えば、数年)かけて発達するヒト患者では、癌抗原に向けられた抗原特異的T細胞は通常、診断で既に存在する、すなわち、免疫応答の誘導は通常、癌が診断される前でさえも起こる。ヒトでは、これらの癌抗原特異的CD8$^+$T細胞は既に存在するが、マウスモデル系では、ヒトよりかなり少ない程度までしか存在しない。したがって、本発明によれば、本発明のhGDF-15阻害剤の使用は、ヒトでは、本マウスモデル系と比較して一層より有効となるであろう。したがって、hGDF-15阻害剤を本発明によるヒト癌患者の治療のために効果的に使用でき、例えば、固形癌中のCD8$^+$T細胞のパーセンテージを増大でき、それらは、ヒトにおけるその他の癌免疫療法と、特に抗PD-1及び抗PD-L1抗体等の免疫チェックポイントブロッカーを用いる癌免疫療法を含む、癌中のCD8$^+$T細胞を必要とする癌免疫療法と協同する。

【０２３７】

(実施例5)

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

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

【０２３８】

この研究に関連して、以下の用語を使用した:

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

「イベント」=患者が死亡した。

「生存」=患者がフォローアップで生存していた。

【０２３９】

将来を見越して、ドイツ中の60を超える皮膚科学センターからの患者を記録する中央悪性黒色腫レジストリー(Central Malignant Melanoma Registry)(CMMR)データベースにおいて、組織学的に確認された黒色腫を有する、Department of Dematology、University of Tubingen、Germanyからの患者を同定した。(a)記録保存された血清サンプルを有する、(b)フォローアップデータを入手可能な、(c)採血の時点での局所領域又は遠位転移の病歴又は存在及び(d)抗PD-1抗体を用いる実験的治療を有する99人の患者を選択した。CMMRによるデータ収集の目的及び方法は、これまでに詳細に公開されている(Lasithiotakis,KGら、Cancer/107/1331～9．2006年)。各患者について得られたデータは、年齢、性別、最後のフォローアップの日付及び該当する場合には死亡の日付及び原因を含んでいた。すべての患者は、CMMRレジストリーによって記録される臨床データを有するための所与の書面でのインフォームドコンセントを行っていた。施設内倫理委員会Tubingenは研究を承認した(倫理的表明125/2015BO2)。適格な患者は年齢18歳以上であり、組織学的又は細胞学的に確認された切除不能なステージIII又はステージIVの黒色腫を有しており、局所療法に適しておらず、現在のガイドラインに従う先行療法を受けているにもかかわらず疾患進行を示した。BRAFV600変異体腫瘍を有する患者は、推奨される第一選択又はBRAF若しくはMEK阻害剤療法を含む実験的治療又は両方を受けていた。該当する場合には、患者が、最小の2用量、3週間ごとに3mg/kg 1回を投与されていたが、最後のイピリムマブ用量の24週間以内に確認された疾患進行を示した場合に、イピリムマブを用いる先行治療が失敗したと考えられた。抗PD-1の投与の前に、イピリムマブ関連有害事象のグレード0～1への解決又

は改善、及び研究薬物の第1の用量の少なくとも2週間前のプレドニゾン用量10mg/日以下が求められた。適格な患者は、米国東海岸癌臨床試験グループ(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG)実施状態0又は1、固形癌の効果判定基準(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)バージョン1.1(RECIST v1.1)で測定可能な疾患、並びに絶対好中球カウント(mLあたり≧1500個細胞)、血小板(mLあたり≧100000個細胞)、ヘモグロビン(≧90g/L)、血清クレアチニン(≦1・5正常の上限[ULN])、血清総ビリルビン(≦1・5ULN又は総ビリルビン濃度>1・5ULNを有する患者について直接ビリルビン≦ULN)、アスパラギン酸及びアラニンアミノトランスフェラーゼ(≦2・5ULN又は肝臓転移を有する患者について≦5ULN)、国際標準比又はプロトロンビン時間(抗凝固薬を使用しない場合≦1・5ULN)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(抗凝固薬を使用しない場合≦1・5ULN)を有していた。患者は、直近の療法の最後の用量とペムブロリズマブ又はニボルマブの第1の用量の間に少なくとも4週間のウォッシュアウト期間を有していた。

【０２４０】

酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によるhGDF-15血清レベルの解析:

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

【０２４１】

バッファー及び試薬:

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

洗浄溶液:PBS-Tween(0.05%)

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

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

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

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

基質溶液:10ml 0.1M NaOAc pH6.0+100μl TMB+2μl H_2O_2

停止溶液:1M H_2SO_4

【０２４２】

解析手順:

1.プレート調製:

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

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

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

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

【０２４３】

2.アッセイ手順:

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

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

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

【０２４４】

【表Ｆ】

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

【０２４５】

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

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

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

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

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

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

ｏ.各ウェルに50μLの停止溶液を添加した。

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

【０２４６】

3.GDF-15血清力価の算出:

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

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

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

【０２４７】

hGDF-15血清レベルの患者データとの比較:

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

【０２４８】

hGDF-15血清レベルの患者データとの統計的相関:

データ:

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

【０２４９】

アウトカム変数(エンドポイント):

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

【０２５０】

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

【０２５１】

データ解析:

生存解析のためのフォローアップ時間は、血液サンプリングの日付から最後のフォローアップ(すなわち、患者から得られた最後の情報)又は死亡までと定義した。すべての血液サンプルは、抗PD1抗体を用いる治療の前の日付内に採取された。OSの解析のために、最後のフォローアップで生存していた患者を打ち切り、死亡していた患者を「イベント」と考えた。カプラン・マイヤーに従う累積生存確率を、95%の信頼区間(CI)と一緒に算出し、両側ログ・ランク検定統計学を使用して比較した。全生存のp値を、両側ログ・ランク統計学によって算出した。カテゴリー予測変数としてGDF-15に基づくグループ化変数を用いて、1つのモデルをフィッティングした(グループは、中央値分割に基づいて<1.5ng/ml(n=62)、≧1.5ng/ml(n=37)又は$GDF\text{-}15^{low}$(n=49)、$GDF\text{-}15^{high}$(n=50)とした)。得られたカプラン・マイヤー曲線は図12及び13に示されており、ここでは、打ち切りは垂直線によって示されている。更に、以下の表は、症例のまとめTable 9(表9)、<1.5ng/ml及び≧1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者グループの患者生存データ(Table 10(表10)及び11(表11))並びに<1.5ng/ml及び≧1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者グループの全体的な統計的比較(Table 12(表12))を含有する。

【０２５２】

【表９】

Table 9:症例のまとめ

	数	イベントの数	打ち切られた	
			H*	生存%
GDF-15 <1.5ng/ml	62	11	51	82.3%
GDF-15≧1..5ng/ml	37	18	19	51.4%
合計	99	29	70	70.7%

*H =イベントがない

【０２５３】

【表１０】

Table 10:生存の平均及び中央値(生存の日数)

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

a.打ち切り後、推定値は最長既知生存に制限される。

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

【０２５４】

【表１１】

Table 11:生存期間の平均及び中央値(生存の日数)

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

a.打ち切り後、推定値は最長既知生存に制限される。

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

【０２５５】

【表１２】

Table 12:総合比較

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

*df=自由度

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

【０２５６】

結果及び結論:

この実施例の上記の統計結果によって、実施例1の結果が更に確認された。例えば、患者の生存によって示されるような治療に対する奏効の見込みは、患者血清中のhGDF-15レベルが増大するにつれ有意に低減することが確認された。例えば、Table 12(表12)は、0.004の有意性レベルによって証明されるように、それぞれ<1.5ng/ml及び≧1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する2つの患者グループ間の生存が有意に異なっていたことを示す。同様に

、Table 9(表9)は、<1.5ng/mlのGDF-15レベルを有するグループでは、より高いパーセンテージの患者(82.3%)が生存したことを実証し、Table 10(表10)及び11(表11)及び図12及び13は、<1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者について、生存時間が≧1.5ng/mlのGDF-15レベルを有する患者と比較して著しく長かったことを実証する。

【０２５７】

したがって、この実施例の結果から、hGDF-15が、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効に負に影響を及ぼすように作用することが更に確認される。したがって、本発明によれば、hGDF-15の阻害剤は、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効においてhGDF-15の負の効果を阻害するのに、また黒色腫においてだけでなく、本明細書において言及されるその他の固形癌のすべてにおいて免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効を改善するのに有用であろう。

【０２５８】

(実施例6)

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

この実施例は、実施例1の研究において得られた結果、例えば、hGDF-15が免疫チェックポイントブロッカーに対する患者の奏効に影響を及ぼすという知見を、種々の固形癌における更なる独立研究において更に検証するために実施した。

【０２５９】

患者:

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

【０２６０】

血清サンプル:

血清サンプルは、抗PD1抗体を用いる治療の前に患者から採取した。

【０２６１】

酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によるhGDF-15血清レベルの解析:

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

【０２６２】

結果:

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

【０２６３】

結論:

この実施例の結果から、hGDF-15レベルが、免疫チェックポイントブロッカーに対する患者の奏効と負に相関することが更に確認される。この実施例の結果からまた、hGDF-15が、PD-1等の免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効に負に影響を及ぼすように作用することが更に確認される。したがって、本発明によれば、hGDF-15の阻害剤は、免疫チェックポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効に対するhGDF-15の負の効果を阻害するのに、また黒色腫においてだけでなく、NSCLC等の肺癌において、及び本明細書において言及されるその他の固形癌のすべてにおいて免疫チェック

ポイントブロッカーを用いる治療に対する患者の奏効を改善するのに有用であろう。

【０２６４】

(実施例7)

hGDF-15血清レベルは、腫瘍の遺伝子変異量と有意に相関しない

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

【０２６５】

hGDF-15が単に腫瘍の遺伝子変異量の代替マーカーではないということを更に確認するために、またhGDF-15阻害剤を用いる治療が、腫瘍の遺伝子変異量と独立している機序によって作用することを更に確認するために、癌患者から得た癌サンプル中のhGDF-15 mRNAレベルを、癌において同定された体細胞変異の数に対してプロットした。体細胞変異は、エキソームシーケンシングの使用によって決定した。University Hospital Zurich製のUZHウェブツールを使用することによってデータを解析した(Cheng PFら:Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 2015年9月16日;145:w14183)。結果は図14に示されている。図14Aは、高悪性度悪性黒色腫を有する患者のみを考慮するthe Cancer Genome Atlas(TGCA)から入手した癌患者データのプロットを示す(the Cancer Genome Atlasは、Cheng PFら: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 2015年9月16日;145:w14183の参考文献に記載されている)。GDF-15発現を、RSEM(「期待値最大化によるRNA Seq(RNA Seq by expectation maximization)」)ソフトウェアパッケージ(Li B及びDewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011年8月4日;12:323. doi:10.1186/1471-2105-12-323)を使用する正規化によって評価した。図14Bは、個別に解析されたUniversity Hospital Zurichからの40人の更なる転移性悪性黒色腫患者から得た癌患者データのプロットを示す。

【０２６６】

とりわけ、図14A及び14Bの両方とも、0.5のp値を示し、これは、癌における遺伝子変異量とhGDF-15のレベルの間に有意な相関がないことを示す。これらの結果から、hGDF-15が単に腫瘍の遺伝子変異量の代替マーカーではないこと、及びhGDF-15阻害剤を用いる治療が、腫瘍の遺伝子変異量と独立している機序によって作用することが更に確認される。

【０２６７】

(実施例8)

野生型腫瘍又はヒトGDF-15(過剰)発現腫瘍における$CD8^+$T細胞浸潤

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

【０２６８】

これらの結果は、本発明によれば、hGDF-15が固形癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを低減する、また逆に、抗GDF-15抗体等のhGDF-15阻害剤を使用して、ヒト患者において固形癌中の$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増大できるという知見を更に支持する。

【産業上の利用可能性】

【０２６９】

本発明の阻害剤の組合せ、組成物及びキットは、医薬製剤の製造のための公知の標準に

従って、工業的に製造し、特許請求される方法及び使用のための(例えば、本明細書において定義されるような癌を治療するための)製品として販売してもよい。したがって、本発明は産業上利用可能である。

【０２７０】

【表１３】

参考文献

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

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

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

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

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

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

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

Mei Cong, Ph.D. et al.: Advertorial: “Novel Bioassay to Assess PD-1/PD-L1 Therapeutic Antibodies in Development for Immunotherapy Bioluminescent Reporter-Based PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay.” (http://www.genengnews.com/gen-articles/advertorial-novel-bioassay-to-assess-pd-1-pd-l1-therapeutic-antibodies-in-development-for-immun/5511/).

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

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

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

【表１４】

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

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

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

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

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

Jackson and Linsley: "Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application." Nat Rev Drug Discov. 2010 Jan; 9(1):57-67.

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

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

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

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

Knoepfel SA et al., "Selection of RNAi-based inhibitors for anti-HIV gene therapy." World J Virol. 2012 Jun 12;1(3):79-90.

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

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

【表１５】

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

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

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

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

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

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

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

C. Robert et al. N Engl J Med 2015; 372:2521-2532.

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

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

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

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

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

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

【表１６】

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

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

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

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

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

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

WO 2005/099746

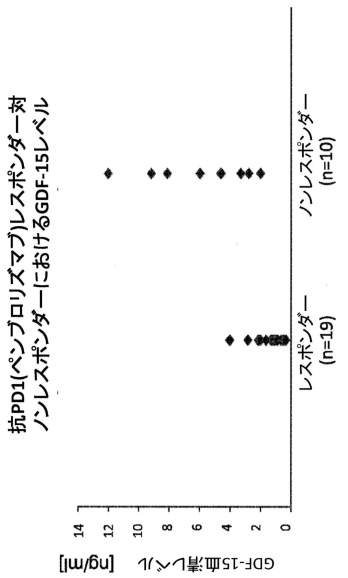
WO 2009/021293

WO 2014/049087

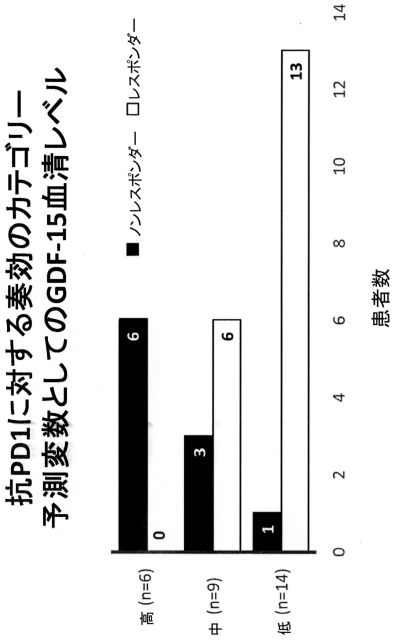
PCT/EP2015/056654

WO 2014/100689

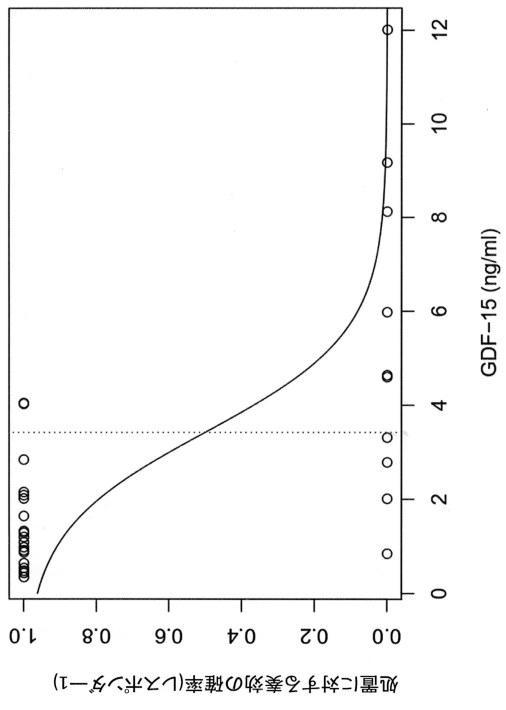
【図１】


抗PD1(ペンブロリズマブ)レスポンダー対
ノンレスポンダーにおけるGDF-15レベル
GDF-15血清レベル [ng/ml]
0
2
4
6
8
10
12
14
レスポンダー
(n=19)
ノンレスポンダー
(n=10)

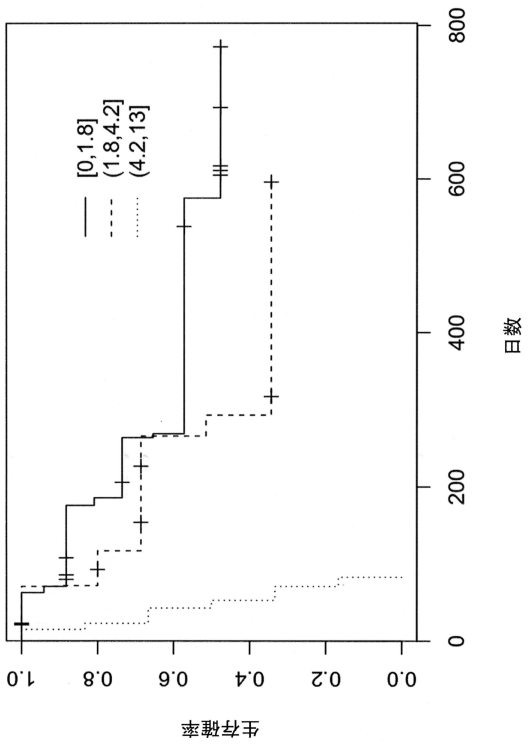
【図２】


抗PD1に対する奏効のカテゴリー
予測変数としてのGDF-15血清レベル
■ノンレスポンダー □レスポンダー
患者数
0
2
4
6
8
10
12
14
6
0
3
6
1
13
高 (n=6)
中 (n=9)
低 (n=14)

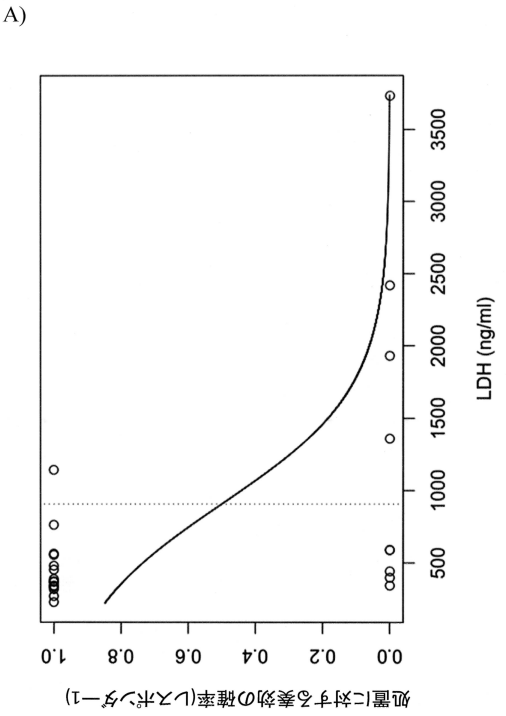
【図３】


処置に対する奏効の確率(レスポンダー1)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
2
4
6
8
10
12
GDF−15 (ng/ml)

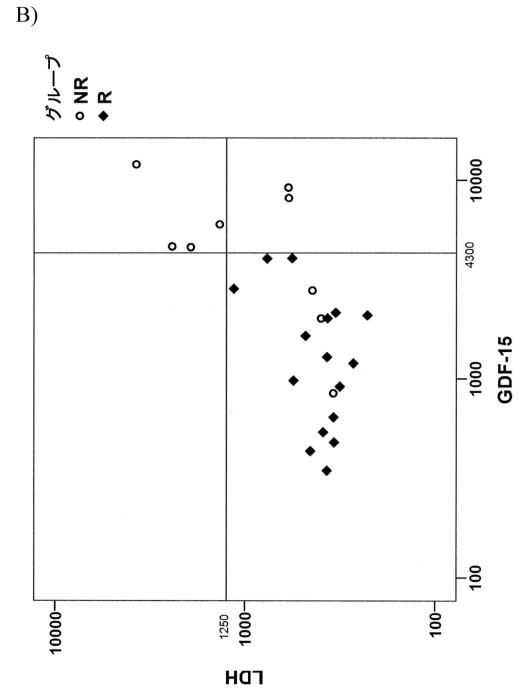
【図４】


生存確率
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
[0,1.8]
(1.8,4.2]
(4.2,13]
0
200
400
600
800
日数

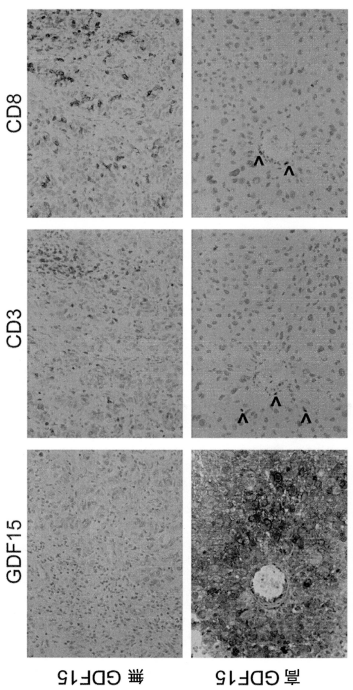
【図５Ａ】



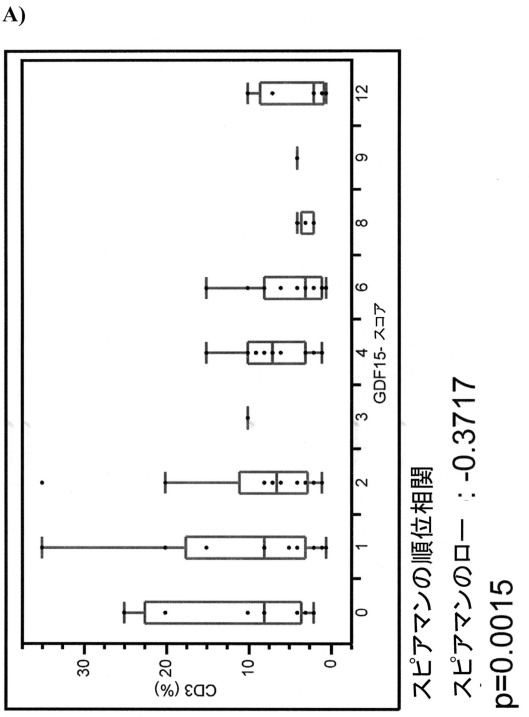
【図５Ｂ】



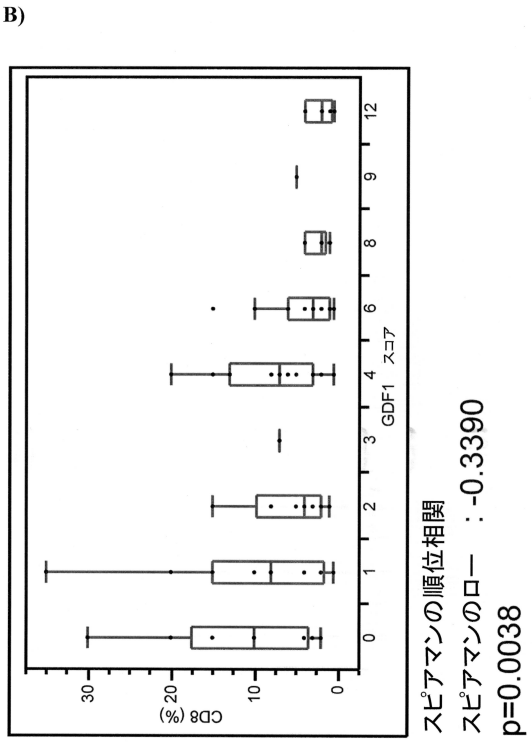
【図６】



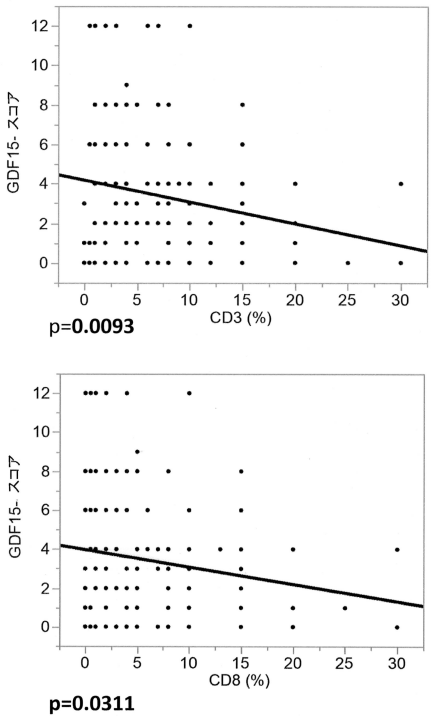
【図７Ａ】



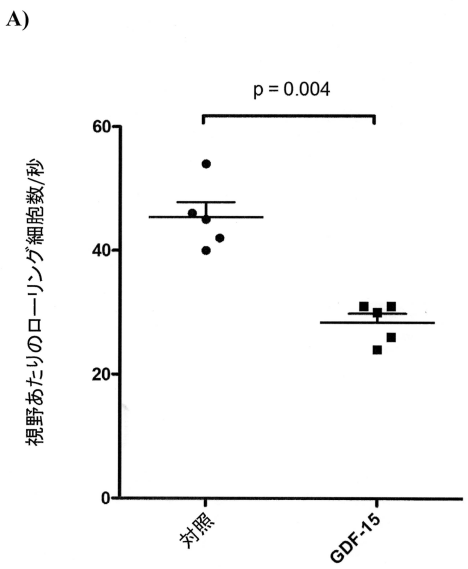
【図７Ｂ】



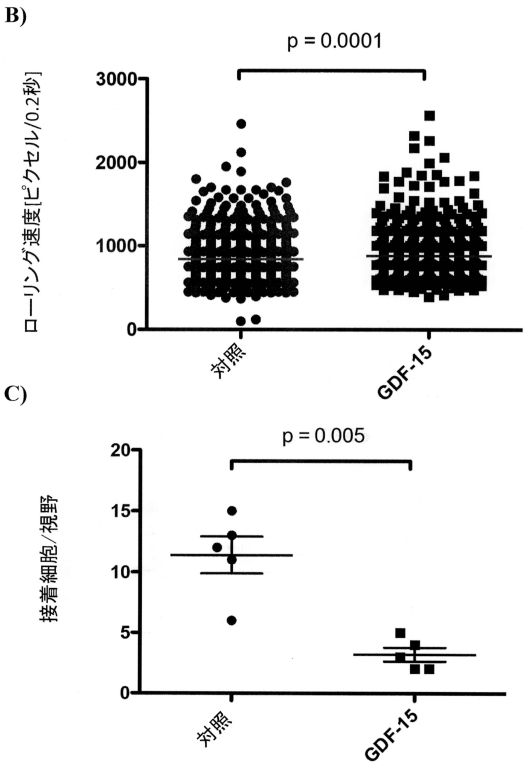
【図８】



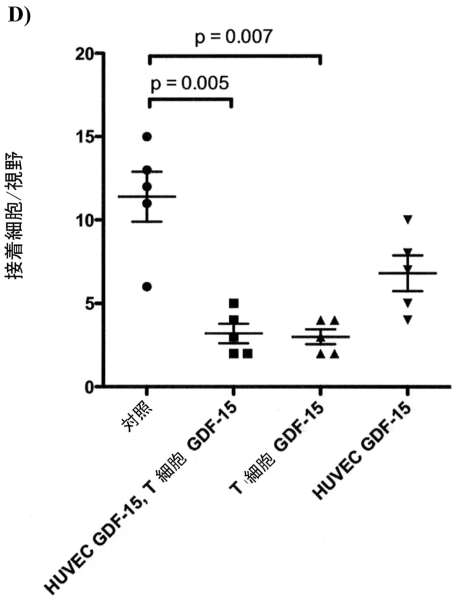
【図９－１】



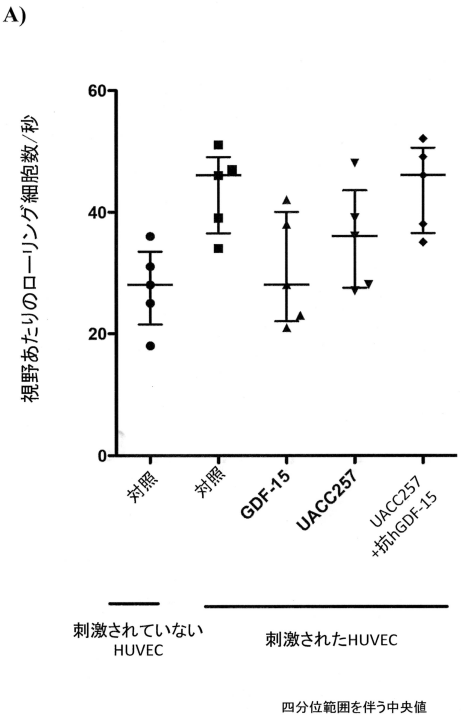
【図９－２】



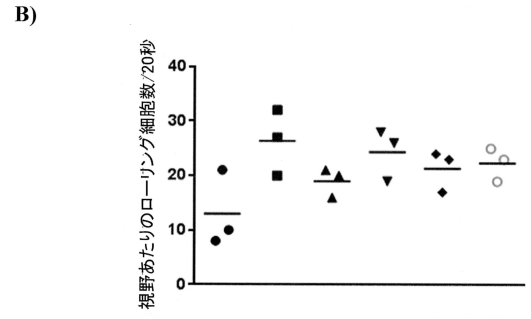
【図９－３】



【図１０Ａ】

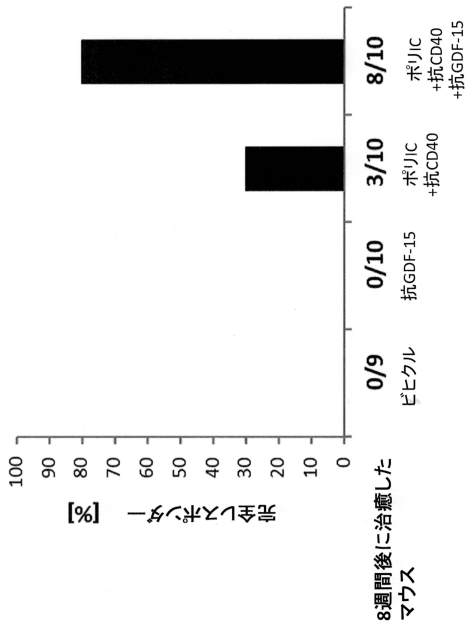


【図１０Ｂ】

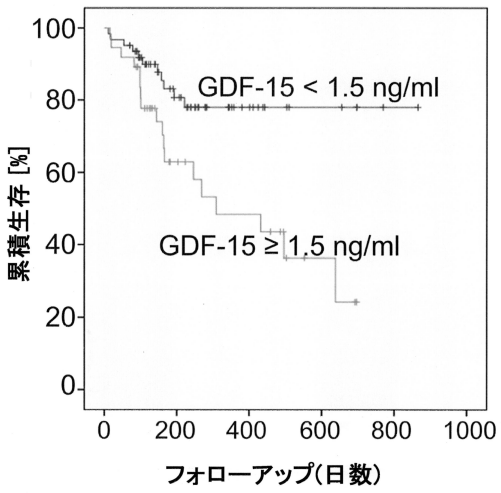


HUVECのTNF-α刺激	w/o	+	+	+	+	+
GDF-15とのT細胞のプレインキュベーション	w/o	w/o	+	+	+	+
抗体とのGDF-15のプレインキュベーション	w/o	w/o	w/o	+	+	+
			抗体	H1 L5	01 G06	03 G05

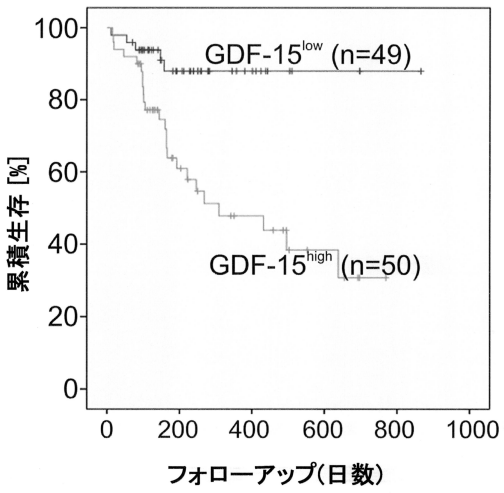
【図１１】



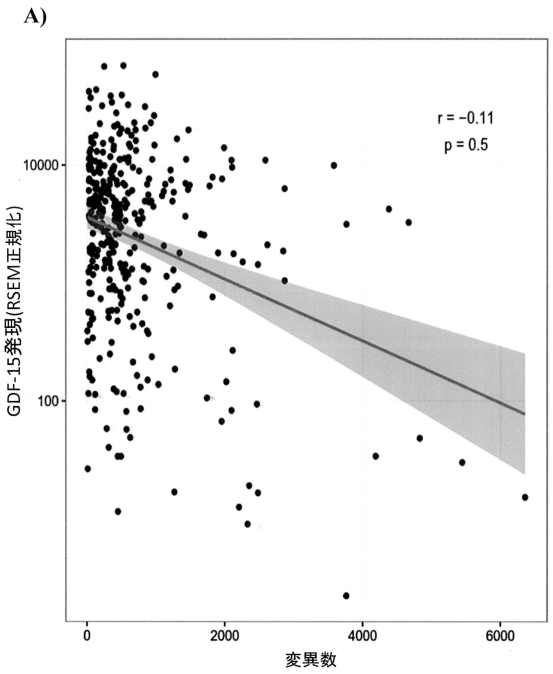
【図１２】



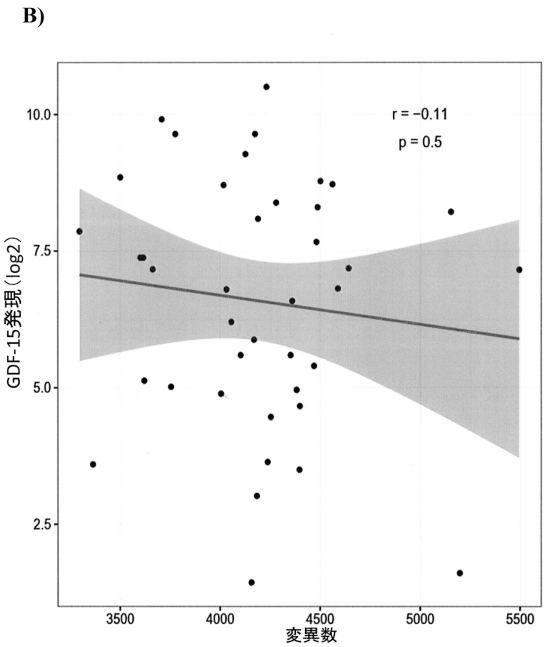
【図１３】



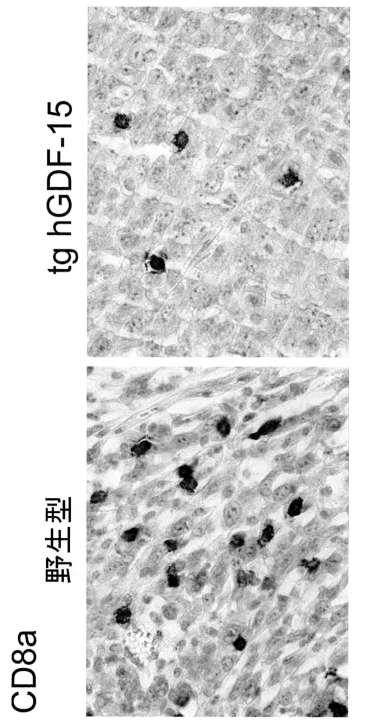
【図１４Ａ】



【図１４Ｂ】



【図１５】



【配列表】
0006925326000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.　　F I
　　Ａ６１Ｋ　39/39

(72)発明者　マルクス・ハーケ
　　ドイツ・９７２３０・エステンフェルト・デューラーシュトラーセ・３７
(72)発明者　ラインハルト・ドゥマー
　　スイス・８０４４・チューリッヒ・クレービュールシュトラーセ・７８
(72)発明者　マティアス・メーリング
　　スイス・４０５２・バーゼル・シャウエンブルガーシュトラーセ・１４
(72)発明者　ティナ・シェーファー
　　ドイツ・９７０７４・ヴュルツブルク・シュテレンシュトラーセ・１０
(72)発明者　マルティナ・ゼレ
　　ドイツ・９７０７０・ヴュルツブルク・ティーポロシュトラーセ・２ベー

審査官　柴原　直司

(56)参考文献　国際公開第２０１４／０４９０８７（WO，Ａ１）
　　日薬理誌，(2015.08)，146，[2]，p.106-114(doi:10.1254/fpj.146.106)
　　J．Immuno.，(2015.06)，195，[3]，p.1015-1024(doi:10.4049/jimmunol.1500078)

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
　　Ａ６１Ｋ　３９／３９５
　　ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
　　ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
　　ＰｕｂＭｅｄ