(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월25일
(11) 등록번호 10-2722730
(24) 등록일자 2024년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7012421
(22) 출원일자(국제) 2016년09월30일
심사청구일자 2021년05월21일
(85) 번역문제출일자 2018년04월30일
(65) 공개번호 10-2018-0054868
(43) 공개일자 2018년05월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/073520
(87) 국제공개번호 WO 2017/055613
국제공개일자 2017년04월06일
(30) 우선권주장
1517531.8 2015년10월02일 영국(GB)
1607801.6 2016년04월29일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
WO2014049087 A1*
WO2015144855 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
율리우스-막시밀리안스 우니버지태트 뷔르츠부르크
독일 97070 뷔르츠부르크 잔더링 2
(72) 발명자
위츠휘센 요에르그
독일 97082 웰츠버그 류트프레써웨그 14에이
하케 마르쿠스
독일 97230 에스텐펠드 듀에럴스트라쎄 37
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

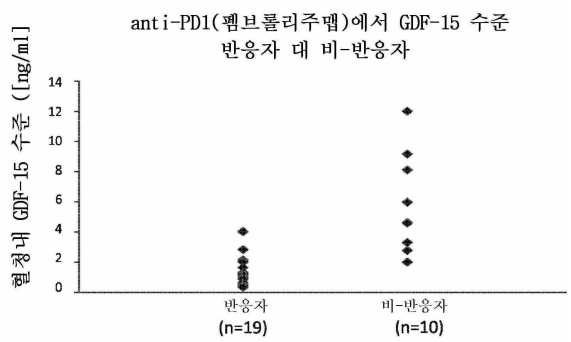
전체 청구항 수 : 총 20 항 심사관 : 정혜진

(54) 발명의 명칭 **인간 증식 및 분화 인자 15 (GDF-15)의 저해제와 면역 체크포인트 차단제를 이용한 병용 요법**

(57) 요 약

본 발명은, 고형 암의 치료에 있어서, 인간 증식 및 분화 인자 15 (GDF-15)의 저해제의 용도 및 상기 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/22 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
G01N 33/505 (2013.01)
G01N 33/5064 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/507 (2013.01)
A61K 2039/55 (2013.01)
(72) 발명자
듀머 라인하르트
스위스 8044 취리히 크라흐뷸스트라쎄 78
메링 마티아스
스위스 4052 바셀 쇼엔버거스트라쎄 14
셰퍼 티나
독일 97074 뷔르츠부르크 슈테렌슈트라세 10
셀레 마르티나
독일 97070 뷔르츠부르크 티에폴로스트라쎄 2비

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 환자에서 고형 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는 방법에 사용하기 위한, hGDF-15 저해제를 포함하는 약학적 조성물로서,

상기 방법이 암 면역요법에 의해 암을 치료하는 방법이고,

상기 hGDF-15 저해제가 인간 환자에게 투여되고,

상기 저해제가 hGDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이고,

상기 사용이 면역 체크포인트 차단제와의 조합에 의한 사용이고, 상기 면역 체크포인트 차단제가 하기 저해제로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는, 약학적 조성물:

i) 인간 PD-1의 저해제로서, 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역; 및

ii) 인간 PD-L1의 저해제로서, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.2 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이거나, 또는 상기 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.5 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이거나, 또는 상기 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.8 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이거나; 또는

상기 암이 흑색종, 결장직장암, 전립선암, 두경부암, 요로상피암, 위암 (stomach cancer), 췌장암, 간암, 고환암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 뇌암, 유방암, 위암 (gastric cancer), 신장암, 유잉 육종, 비-소 세포성 폐암 및 소 세포성 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

(i) 상기 결합이 hGDF-15의 입체형태적 또는 불연속 에피토프에의 결합이고, 상기 입체형태적 또는 불연속 에피토프가 서열번호 25 및 서열번호 26의 아미노산 서열로 구성되거나, 또는

(ii) 상기 항체 또는 항원-결합 영역이 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변성 도메인을 포함하고, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 영역이 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역, 아미노산 서열 ser-ala-ser을 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변성 도메인을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 방법이 암 전이의 치료 방법이거나, 또는

상기 hGDF-15 저해제가 내피 세포에의 $CD8^+$ T 세포의 부착을 증가시켜 혈류에서 암으로의 $CD8^+$ T 세포의 유입을 증가시킴으로써 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는, 약학적 조성물.

청구항 5

hGDF-15 저해제 및 면역 체크포인트 차단제를 포함하는, 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 약학적 조성

물로서,

상기 방법이 암 면역요법을 위한 방법이고,

상기 저해제가 hGDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이고, 및

상기 면역 체크포인트 차단제가 하기 저해제로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는, 약학적 조성물:

i) 인간 PD-1의 저해제로서, 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역; 및

ii) 인간 PD-L1의 저해제로서, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 hGDF-15 저해제가 제3항에 따라 정의되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 암이 제2항에 따라 정의되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

hGDF-15 저해제 및 하나 이상의 면역 체크포인트 차단제를 포함하는, 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 키트로서,

상기 방법이 암 면역요법을 위한 방법이고,

상기 저해제가 hGDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이고, 및

상기 면역 체크포인트 차단제가 하기 저해제로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는, 키트:

i) 인간 PD-1의 저해제로서, 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역; 및

ii) 인간 PD-L1의 저해제로서, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 hGDF-15 저해제가 제3항에 따라 정의되거나, 또는 상기 hGDF-15 저해제 및 하나 이상 또는 전체 상기 면역 체크포인트 차단제가 개별 용기에 또는 하나의 용기에 수용되어 있는, 키트.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 암이 제2항에 따라 정의되는 것인, 키트.

청구항 11

인간 환자에서 면역 체크포인트 차단제에 의해 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한, hGDF-15 저해제를 포함하는 약학적 조성물로서,

상기 방법이 암 면역요법을 위한 방법이고,

상기 hGDF-15 저해제가 인간 환자에게 투여되고,

상기 저해제가 hGDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이고,

상기 면역 체크포인트 차단제가 하기 저해제로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는, 약학적 조성물:

i) 인간 PD-1의 저해제로서, 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역; 및

ii) 인간 PD-L1의 저해제로서, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 환자가 제2항에 따라 정의되거나, 또는

상기 암이 제2항에 따라 정의되거나, 또는

상기 hGDF-15 저해제가 제3항에 따라 정의되거나, 또는

상기 hGDF-15 저해제가 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키되, 상기 hGDF-15 저해제가 내피 세포에의 $CD8^+$ T 세포의 부착 또는 내피 세포 상에서의 $CD8^+$ T 세포의 롤링 (rolling)을 증가시켜, 혈류에서 암으로의 $CD8^+$ T 세포의 유입을 증가시킴으로써 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는, 약학적 조성물.

청구항 13

인간 환자에서 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합물로서,

상기 저해제가 hGDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이고,

상기 면역 체크포인트 차단제가 하기 저해제로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는, 조합물:

i) 인간 PD-1의 저해제로서, 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역; 및

ii) 인간 PD-L1의 저해제로서, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 방법이 암 면역요법을 위한 방법이거나, 또는

상기 환자가 제2항에 따라 정의되는 환자이거나, 또는

상기 암이 제2항에 따라 정의되거나, 또는

상기 hGDF-15 저해제가 제3항에 따라 정의되거나, 또는

상기 면역 체크포인트 차단제가 제5항에 따라 정의되거나, 또는

상기 hGDF-15 저해제가 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키되, 상기 hGDF-15 저해제가 내피 세포에의 $CD8^+$ T 세포의 부착을 증가시켜, 혈류에서 고형 암으로의 $CD8^+$ T 세포의 유입을 증가시킴으로써 고형 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는 것이고, 내피 세포에의 $CD8^+$ T 세포의 부착 증가가 혈류에서 고형 암으로의 $CD8^+$ T 세포의 유입이 증가되도록 내피 세포 상의 $CD8^+$ T 세포의 롤링을 증가시키는 것인, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합물.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 사용이 폴리이노신산:폴리시티딜산과의 조합에 의한 사용인, 약학적 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서,상기 조합물이 폴리이노신산:폴리시티딜산과의 조합물인, 조합물.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 사용이 단일클론 항-인간 CD40 항체와의 조합에 의한 사용인, 약학적 조성물.

청구항 18

제13항에 있어서,

상기 조합물이 단일클론 항-인간 CD40 항체와의 조합물인, 조합물.

청구항 19

인간 환자에서 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 조합물로서,

상기 조합물이 hGDF-15 저해제와 하기 a) - c) 중 어느 하나와의 조합물이며:

a) 폴리이노신산:폴리시티딜산;

b) 단일클론 항-인간 CD40 항체; 또는

c) 폴리이노신산:폴리시티딜산 및 항 단일클론 항-인간 CD40 항체,

상기 저해제가 hGDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역인, 조합물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 조합물이 면역 체크포인트 차단제를 포함하는, 조합물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 고형 암의 치료에 있어서, 인간 증식 및 분화 인자 15 (GDF-15)의 저해제의 용도 및 상기 저해제와 면역 체크포인트 차단제를 조합하여 사용하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지금까지 수많은 암들이 여전히 의학적인 요구가 충족되지 않은 영역으로 남아있으며, 그에 따라 보다 효과적으로 암을 치료하기 위한 수단이 요구되고 있다.

[0003] 암의 다수 타입들이 VEGF, PDGF, TGF-β 및 GDF-15와 같은 인자 등의 성장 인자들을 발현하는 것으로 알려져 있다.

[0004] GDF-15, 즉 성장 및 분화 인자-15은 TGF-β 슈퍼패밀리의 또 다른 구성원이다. 이는 세포내에서 전구체로 발현되어 가공된 다음, 최종적으로 세포에서 주위 환경으로 방출되는 단백질이다. GDF-15의 활성형의 완전히 가공된 (성숙) 형태와 전구체 둘다 세포 외부에서 발견될 수 있다. 전구체는 자신의 COOH-말단 아미노산 서열을 통해 세포외 기질(matrix)에 공유 결합함으로써 (Bauskin AR et al., Cancer Research 2005), 세포 외부에 놓이게 된다. GDF-15의 활성형의 완전히 가공된 (성숙) 형태는 가용성이며, 혈액의 혈청에서 발견된다. 즉, GDF-15의 가공된 형태는, 잠재적인 타겟 세포가 가용성 GDF-15 리간드에 대한 수용체를 발현한다면, 혈액 순환과 연결된 체내 모든 타겟 세포에 잠재적으로 작용할 수 있다.

[0005] 임신 중에 GDF-15은 태반의 생리학적 환경에서 발견된다. 그러나, 다수 악성 암 (특히 공격적인 뇌암, 흑색종, 폐암, 위장 종양, 대장암, 췌장암, 전립선암 및 유방암 (Mimeault M and Batra SK, J. Cell Physiol 2010))에서, 종양 뿐만 아니라 혈액 혈청에서도 증가된 GDF-15 수준을 나타낸다. 마찬가지로, GDF-15의 높은 발현과 화학내성 간에 (Huang CY et al., Clin. Cancer Res. 2009), 그리고 GDF-15의 높은 발현과 예후 불량 (Brown DA et al., Clin. Cancer Res. 2009) 간에 각각 상관관계가 언급된 바 있다.

[0006] GDF-15은 면역조직화학에 의해 분석된 바와 같이 여러 WHO 등급의 신경교종들에서 발현된다 (Roth et al., Clin. Cancer Res. 2010). 아울러, Roth 등은 내인성 GDF-15을 타겟으로 하는 짧은 헤어핀 RNA-발현성 DNA 구조체 또는 대조군 구조체를 SMA56 신경교종 세포에서 안정적으로 발현시켰다. 이러한 사전-확립된 안정적인 세포주를 이용하였을 때, GDF-15 넉다운 SMA560 세포를 가진 마우스에서 종양 형성이 대조군 구조체를 가진 마우스와 비교해 지연되는 것으로 관찰되었다.

[0007] 국제 특허 출원 공개 WO 2005/099746 및 WO 2009/021293은 마우스에서 종양-유발성 체중 감소에 대한 인간 GDF-15 (hGDF-15)의 효과를 길항할 수 있는 항-인간-GDF-15 항체 (Mab26)에 관한 것이다. 마찬가지로, Johnen H 등 (Nature Medicine, 2007)은 암-유발성 식욕부진 및 체중 감소에 대한 항-인간-GDF-15 단일클론 항체의 효과를 발표하였지만, 암에 의해 형성된 종양 크기에 대해서는 항-인간-GDF-15 항체의 어떠한 효과도 관찰하지 못하였다.

[0008] WO 2014/049087 및 PCT/EP2015/056654는 hGDF-15에 대한 단일클론 항체 및 이의 의학적 용도에 관한 것이다.

[0009] 최근 개발되는 암 요법의 방식은 인간 PD-1의 저해제 및 인간 PD-L1의 저해제 등의 면역 체크포인트 차단제를 사용하는 것이다. 이들 면역 체크포인트 차단제의 사용을 뒷받침하는 근거는, 면역 시스템이 암 항원 및 해당

암 세포를 타겟으로 하여 작용하는 것을 막는 면역 체크포인트를 차단함으로써, 암에 대한 면역 반응이 보다 효과적으로 될 수 있다는 것이다. 면역 체크포인트 차단제 뿐만 아니라 면역 체크포인트 차단제들의 특정 조합이 흑색종 환자에서 환자의 생존을 개선하는 것으로 입증된 바 있지만 (Cully M, "Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy.", Nat Rev Drug Discov. 2015 Jun;14(6):374-5.), 흑색종 환자들이 모두 완전 반응 (complete response)을 나타낸 것은 아니며, 그외의 다수 암들에 대한 결과는 아직 공개된 바 없으며, 다른 징후에서의 결과도 좋지 않을 것임을 시사하는 근거들 (돌연변이 부하 (mutational burden) 등)도 여전히 존재한다.

[0010] 즉, 지금까지 암을 보다 효과적으로 치료하기 위한 수단이 당해 기술 분야에서는 여전히 요구되고 있다. 보다 상세하게는, 보다 효과적인 암 면역요법을 위해 사용될 수 있는 수단이 여전히 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) WO 2005/099746

(특허문헌 0002) WO 2009/021293

(특허문헌 0003) WO 2014/049087

(특허문헌 0004) PCT/EP2015/056654

(특허문헌 0005) WO 2014/100689

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) 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.

(비특허문헌 0002) Ausubel et al.: "Current Protocols in Molecular Biology." Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992.

(비특허문헌 0003) 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.

(비특허문헌 0004) 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.

(비특허문헌 0005) 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.

(비특허문헌 0006) Chothia C et al.: Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989 Dec 21-28;342(6252):877-83.

(비특허문헌 0007) Clackson T et al.: "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature. 1991 Aug 15;352(6336):624-8.

(비특허문헌 0008) 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/).

(비특허문헌 0009) Cully M: "Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy." Nat Rev Drug Discov. 2015 Jun;14(6):374-5.

(비특허문헌 0010) 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.

(비특허문헌 0011) 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.

(비특허문헌 0012) 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

(비특허문헌 0013) Harlow and Lane: "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988.

(비특허문헌 0014) 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.

(비특허문헌 0015) Holt LJ et al.: "Domain antibodies: proteins for therapy." Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90.

(비특허문헌 0016) 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.

(비특허문헌 0017) 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.

(비특허문헌 0018) 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.

(비특허문헌 0019) 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.

(비특허문헌 0020) 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.

(비특허문헌 0021) Kanasty R et al., "Delivery materials for siRNA therapeutics.", Nat Mater. 2013 Nov; 12(11):967-77.

(비특허문헌 0022) Knoepfel SA et al., "Selection of RNAi-based inhibitors for anti-HIV gene therapy." World J Virol. 2012 Jun 12;1(3):79-90.

(비특허문헌 0023) Kohler G and Milstein C: "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.

(비특허문헌 0024) Lasithiotakis, KG et al., Cancer / 107 / 1331-9. 2006.

(비특허문헌 0025) 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.

(비특허문헌 0026) 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.

(비특허문헌 0027) 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.

(비특허문헌 0028) Paul, W.E. (Ed.).: "Fundamental Immunology" 2nd Ed. Raven Press, Ltd., New York 1989.

(비특허문헌 0029) Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20th edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA.

(비특허문헌 0030) 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/.

(비특허문헌 0031) Riechmann L et al.: "Reshaping human antibodies for therapy." Nature. 1988 Mar 24;332(6162):323-7.

(비특허문헌 0032) C. Robert et al. N Engl J Med 2015; 372:2521-2532.

(비특허문헌 0033) 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.

(비특허문헌 0034) 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.

(비특허문헌 0035) Sambrook et al.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989.

(비특허문헌 0036) Siegel DL: "Recombinant monoclonal antibody technology." Transfus Clin Biol. 2002 Jan;9(1):15-22.

(비특허문헌 0037) Stefanescu R. et al., Eur.J.Mass Spectrom. 13, 69-75 (2007)

(비특허문헌 0038) Suckau et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 December; 87(24): 9848-9852.

(비특허문헌 0039) Tumeh et al., PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 2014 Nov. 27; 515(7528):568-71.

(비특허문헌 0040) 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.

(비특허문헌 0041) Weinberg R. et al.: The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006. 850p.

(비특허문헌 0042) Yadav M et al.: Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. Nature. 2014 Nov 27;515(7528):572-6.

(비특허문헌 0043) 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.

(비특허문헌 0044) 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.

발명의 내용

[0013] 본 발명은 후술한 구현예들을 제공함으로써 당해 기술 분야에서의 상기한 요구를 충족시키고, 전술한 문제들을 해결한다:

[0014] 구체적으로, 암을 효과적으로 치료하기 위한 수단을 동정하기 위한 시도 중에, 본 발명자들은, 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 반응 가능성이 환자 혈청내 hGDF-15 수준 증가에 따라 감소한다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 즉, 본 발명에서, hGDF-15의 저해제는, 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응에서 hGDF-15의 부정적인 효과를 저해하기 위해, 그리고 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0015] 예상치 못하게도, 또한 본 발명자들은, 암 전이에서 hGDF-15와 $CD8^+$ T 림프구의 % 간에 역의 상관관계가 존재한다는 것을 발견하였다. 이는, $CD8^+$ T 림프구의 존재가 anti-PD-1 항체를 이용한 면역 체크포인트 저해 후 종양 퇴화에 특별히 필요하기 때문에, 주목할만한 일이다. 이에, 본 발명에서, hGDF-15의 치료학적 저해를 이용해, 종양 전이 등의 고형 암에서 $CD8^+$ T 림프구의 %를 높일 수 있다. 고형 암에서의 $CD8^+$ T 림프구의 증가는 고형 암의 요법, 특히 면역요법에 유리하게 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 비-제한적인 측면에서, 특히 선호되는 치료학적 조합은 hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합이다. 이러한 조합의 유익한 효과는, 고형 암

에서 hGDF-15의 저해가 $CD8^+$ T 림프구의 %를 증가시키게 되고, 그래서 면역 체크포인트 저해와 상승적인 치료 효과를 발휘하게 된다는 것이다.

[0016] hGDF-15 저해제가 고형 암에서 $CD8^+$ T 림프구의 %를 높일 수 있는 기전을 추가로 해명하기 위해 시도하던 중에, 본 발명자들은, hGDF-15이 T 세포의 내피 세포에의 부착을 감소시킨다는 것을 발견하였다. 이에, 본 발명에서, hGDF-15 저해제를 이용한 치료를 이용해, $CD8^+$ T 세포 등의 T 세포의 내피 세포에의 부착을 증가시킬 수 있다. 이러한 본 발명에 따른 치료는, 혈류에서 고형 암으로의 $CD8^+$ T 세포의 유입을 증가시키게 될 것이다. hGDF-15 저해제를 이용한 치료로 인해 유발되는 고형 암내 $CD8^+$ T 세포의 증가된 %는 암 요법, 예를 들어 암 면역요법에 유리하며, 이를 위해 사용될 수 있다. $CD8^+$ T 세포의 고형 암내 유입 및 고형 암내 이들 $CD8^+$ T 세포의 존재가 특히 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료 방식에 유리하므로, 특히 본 발명에 따른 hGDF-15 저해제의 특히 유익한 사용은 면역 체크포인트 차단제와의 조합에 의한 사용이다.

[0017] 이에, 본 발명은 후술한 바람직한 구현예들을 제공함으로써 암 요법을 위한 개선된 수단을 제공한다:

[0018] 1. 인간 환자에서 고형 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는 방법에 사용하기 위한 hGDF-15 저해제로서, hGDF-15 저해제가 인간 환자에게 투여되는, hGDF-15 저해제.

[0019] 2. 항목 1에 있어서, 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.2 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 환자는 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.5 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 환자는 더 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.8 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자인, hGDF-15 저해제.

[0020] 3. 항목 1 또는 2에 있어서, 암이 흑색종, 결장직장암, 전립선암, 두경부암, 요로상피암, 위암 (stomach cancer), 췌장암, 간암, 고환암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 뇌암, 유방암, 위암 (gastric cancer), 신장암, 유잉 육종, 비-소 세포성 폐암 및 소 세포성 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 암이 바람직하게는로 이루어진 군으로부터 선택되는 흑색종, 결장직장암, 전립선암, 두경부암, 요로상피암, 위암 (stomach cancer), 췌장암, 간암, 고환암, 난소암, 자궁내막암 및 자궁경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 암이 더 바람직하게는 흑색종, 결장직장암, 전립선암, 두경부암, 요로상피암 및 위암 (stomach cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, hGDF-15 저해제.

[0021] 4. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 암이 흑색종, 구강 편평 세포암, 결장직장암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, hGDF-15 저해제.

[0022] 5. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 암이 흑색종인, hGDF-15 저해제.

[0023] 6. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 저해제가 hGDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역인, hGDF-15 저해제.

[0024] 7. 항목 6에 있어서, 결합이 hGDF-15의 입체형태적 또는 불연속 에피토프에의 결합이고, 입체형태적 또는 불연속 에피토프가 서열번호 25 및 서열번호 26의 아미노산 서열로 구성되는, hGDF-15 저해제.

[0025] 8. 항목 6 또는 7에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 영역이 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변성 도메인을 포함하며, 항체 또는 이의 항원-결합 영역이 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역, 아미노산 서열 ser-ala-ser을 포함하는 CDR2 영역 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변성 도메인을 포함하는, hGDF-15 저해제.

[0026] 9. 항목 1-5 중 어느 한 항목에 있어서, 저해제가 짧은 간섭 RNA 또는 siRNA 헤어핀 구조체인, hGDF-15 저해제.

[0027] 10. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 방법이 암 치료 방법인, hGDF-15 저해제.

[0028] 11. 항목 10에 있어서, 암 치료 방법이 암 면역요법에 의한 암 치료 방법인, hGDF-15 저해제.

[0029] 12. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 방법이 암 전이 치료 방법인, hGDF-15 저해제.

[0030] 13. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, hGDF-15 저해제가 내피 세포에의 $CD8^+$ T 세포의 부착을 증가

시켜 혈류에서 암으로의 $CD8^+$ T 세포의 유입을 증가시킴으로써 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는, hGDF-15 저해제.

[0031] 14. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 사용이 면역 체크포인트 차단제와의 조합에 의한 사용인, hGDF-15 저해제.

[0032] 15. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단제가 하기 저해제로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는, hGDF-15 저해제:

[0033] i) 인간 PD-1의 저해제로서, 바람직하게는 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역; 및

[0034] ii) 인간 PD-L1의 저해제로서, 바람직하게는 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역.

[0035] 16. 항목 15에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단제가 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역을 포함하는, hGDF-15 저해제.

[0036] 17. 항목 15 또는 16에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단제가 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역을 포함하는, hGDF-15 저해제.

[0037] 18. hGDF-15 저해제 및 면역 체크포인트 차단제를 포함하는 조성물.

[0038] 19. 항목 18에 있어서, 상기 hGDF-15 저해제가 항목 6-9 중 어느 하나에 의해 정의되는 것인, 조성물.

[0039] 20. 항목 18 또는 19에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단제가 항목 15-17 중 어느 하나에 의해 정의되는 것인, 조성물.

[0040] 21. 항목 18-20 중 어느 하나에 있어서, 의약제에 사용하기 위한, 조성물.

[0041] 22. hGDF-15 저해제 및 하나 이상의 면역 체크포인트 차단제를 포함하는 키트.

[0042] 23. 항목 22에 있어서, 상기 hGDF-15 저해제가 항목 6-9 중 어느 하나에 의해 정의되는 것인, 키트.

[0043] 24. 항목 22 또는 23에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단제가 항목 15-17 중 어느 하나에 의해 정의되는 것인, 키트.

[0044] 25. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 hGDF-15 저해제 및 하나 이상 또는 전체 상기 면역 체크포인트 차단제가 개별 용기에 또는 하나의 용기에 수용되어 있는, 키트.

[0045] 26. 항목 21-25 중 어느 한 항목에 있어서, 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 키트 또는 조성물.

[0046] 27. 항목 26에 있어서, 상기 방법이 암 면역요법을 위한 방법인, 키트 또는 조성물.

[0047] 28. 항목 27에 있어서, 상기 암이 항목 3-5에 따라 정의되는 것인, 키트 또는 조성물.

[0048] 29. 인간 환자에서 면역 체크포인트 차단제에 의해 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 hGDF-15 저해제로서, 상기 hGDF-15 저해제가 인간 환자에게 투여되는, hGDF-15 저해제.

[0049] 30. 항목 29에 있어서, 상기 방법이 암 면역요법을 위한 방법인, hGDF-15 저해제.

[0050] 31. 항목 29 또는 30에 있어서, 상기 환자가 항목 2에 따라 정의되는 것인, hGDF-15 저해제.

[0051] 32. 항목 29-31 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 암이 항목 3-5에 따라 정의되는 것인, hGDF-15 저해제.

[0052] 33. 항목 29-32 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 hGDF-15 저해제가 항목 6-9 중 어느 하나에 의해 정의되는 것인, hGDF-15 저해제.

[0053] 34. 항목 29-33 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단제가 항목 15-17 중 어느 하나에 의해 정의되는 것인, hGDF-15 저해제.

[0054] 35. 항목 29-34 중 어느 한 항목에 있어서, hGDF-15 저해제가 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는, hGDF-15 저해제.

[0055] 36. 항목 35에 있어서, 상기 hGDF-15 저해제가 내피 세포에의 $CD8^+$ T 세포의 부착 또는 $CD8^+$ T 세포의 내피 세포 상에서의 롤링 (rolling)을 증가시켜, 혈류에서 암으로의 $CD8^+$ T 세포의 유입을 증가시킴으로써 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는, hGDF-15 저해제.

[0056] 37. 인간 환자에서 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합으로서, 상기 hGDF-15 저해제 및 상기 면역 체크포인트 차단제가 인간 환자에게 투여되는, 조합.

[0057] 38. 항목 36에 있어서, 상기 방법이 암 면역요법을 위한 방법인, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0058] 39. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 환자가 항목 2에 따라 정의되는 것인, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0059] 40. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 암이 항목 3-5에 따라 정의되는 것인, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0060] 41. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 hGDF-15 저해제가 항목 6-9 중 어느 하나에 의해 정의되는 것인, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0061] 42. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 면역 체크포인트 차단제가 항목 15-17 중 어느 하나에 의해 정의되는 것인, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0062] 43. 전술한 항목들 중 어느 한 항목에 있어서, 상기 hGDF-15 저해제가 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키는, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0063] 44. 항목 43에 있어서, 상기 hGDF-15 저해제가 내피 세포에의 $CD8^+$ T 세포의 부착을 증가시켜 혈류에서 암으로의 $CD8^+$ T 세포의 유입을 증가시킴으로써 고형 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키고, 바람직하게는 내피 세포에의 $CD8^+$ T 세포의 부착 증가가 $CD8^+$ T 세포의 혈류에서 고형 암으로의 유입이 증가되도록 내피 세포 상의 $CD8^+$ T 세포의 롤링을 증가시키는, hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0064] 45. 대상 물질이 hGDF-15 저해제인지를 확인하기 위한 시험관내 방법으로서, 상기 방법이

[0065] a) 내피 세포를 활성화하는 단계;

[0066] b) T 세포를 포함하는 제1 샘플을 hGDF-15을 포함하는 용액과 상기 대상 물질의 존재 하에 인큐베이션하는 단계;

[0067] c) 상기 제1 샘플에서, 단계 a)에서 활성화된 내피 세포에의 상기 T 세포의 부착을 측정하여, 제1 부착 측정 결과를 수득하는 단계; 및

[0068] d) 단계 c)의 제1 부착 측정 결과를 기초로, 상기 대상 물질이 hGDF-15 저해제인지를 확인하는 단계를 포함하는, 방법.

[0069] 46. 항목 45에 있어서, 상기 내피 세포가 인간 제대혈 정맥 내피 세포인, 방법.

[0070] 47. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 내피 세포가 인간 내피 세포인, 방법.

[0071] 48. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 내피 세포가 TNF-α 및 IFN-γ에 의해 활성화되고, 상기 활성화 단계에서, TNF-α 및 IFN-γ는 바람직하게는 배지 중에 TNF-α 최종 농도 5-20 ng/ml 및 IFN-γ 최종 농도 5-20 ng/ml로 존재하며, 더 바람직하게는 배지 중에 TNF-α 최종 농도 10 ng/ml 및 IFN-γ 최종 농도 10 ng/ml로 존재하는, 방법.

[0072] 49. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상 물질이 hGDF-15에 결합할 수 있는 물질, 바람직하게는 hGDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 방법.

[0073] 50. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서, 상기 내피 세포 및 상기 T 세포가 1:2 내지 2:1, 바람직하게는 1:1의 수적 비율로 사용되는, 방법.

[0074] 51. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 단계 c) 동안에, 상기 내피 세포가 코팅된 세포 배양물 표면 상

에, 바람직하게는 파이브로넥틴-코팅된 세포 배양물 표면 상에 존재하는, 방법.

[0075] 52. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 단계 b) 동안에, hGDF-15이 50 내지 200 ng/ml, 바람직하게는 100 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

[0076] 53. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서, 부착은 롤링 T 세포의 수를 계수함으로써 측정하는, 방법.

[0077] 54. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서, 부착은 부착성 T 세포의 수를 계수함으로써 측정하는, 방법.

[0078] 55. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서, 부착은 T 세포의 롤링 속도를 측정함으로써 측정하는, 방법.

[0079] 56. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 단계 d)에서, 상기 대상 물질은, 상기 부착을 증가시키는 경우, hGDF-15 저해제로 결정되는, 방법.

[0080] 57. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 단계 d)에서, 상기 대상 물질은, 상기 부착을 증가시키지 않는 경우, hGDF-15 저해제가 아닌 것으로 결정되는, 방법.

[0081] 58. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서,

[0082] 단계 b)에서, hGDF-15을 포함하는 상기 용액의 존재 하, 상기 대상 물질의 부재 하에 제2 샘플을 인큐베이션하고, 상기 제2 샘플이 T 세포를 포함하며,

[0083] 단계 c)는 상기 제2 샘플에서, 단계 a)에서 활성화된 내피 세포에의 상기 T 세포의 부착을 측정하여, 제2 부착 측정 결과를 수득하는 단계를 더 포함하고,

[0084] 단계 d)에서, 상기 제1 부착 측정 결과가 상기 제2 부착 측정 결과와 비교해 증가되는 경우, 상기 대상 물질이 hGDF-15 저해제인 것으로 결정하는, 방법.

[0085] 59. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서,

[0086] 단계 b)에서, hGDF-15을 포함하는 상기 용액과 상기 대상 물질의 부재 하에 제3 샘플을 인큐베이션하고, 상기 제3 샘플은 T 세포를 포함하며,

[0087] 단계 c)는 상기 제3 샘플에서, 단계 a)에서 활성화된 내피 세포에의 상기 T 세포의 부착을 측정하여, 제3 부착 측정 결과를 수득하는 단계를 더 포함하고,

[0088] 단계 d)에서, 상기 제3 부착 측정 결과가 완전한 hGDF-15 저해를 나타내는 기준 부착 측정 결과로서 사용되는, 방법.

[0089] 60. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 $CD8^+$ T 세포인, 방법.

[0090] 61. 항목 45-59 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 pan T 세포인, 방법.

[0091] 62. 전술한 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포가 인간 T 세포인, 방법.

[0092] 63. 항목 1-17 또는 항목 37-44 중 어느 하나에 있어서, 상기 사용이 폴리이노신산:폴리시티딜산과의 조합에 의한 사용이거나, 또는 상기 조합이 폴리이노신산:폴리시티딜산의 조합인, hGDF-15 저해제 또는 hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0093] 64. 항목 1-17, 63 또는 37-44 또는 63 중 어느 하나에 있어서, 상기 사용이 anti-인간 CD40 항체, 바람직하게는 단일클론 anti-인간 CD40 항체와의 조합에 의한 사용이거나, 또는 조합이 anti-인간 CD40 항체, 바람직하게는 단일클론 anti-인간 CD40 항체와의 조합인, hGDF-15 저해제 또는 hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합.

[0094] 65. 인간 환자에서 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 조합으로서,

[0095] 상기 조합이

[0096] a) 폴리이노신산:폴리시티딜산;

[0097] b) anti-인간 CD40 항체, 바람직하게는 단일클론 anti-인간 CD40 항체; 또는

[0098] c) 폴리이노신산:폴리시티딜산 및 anti-인간 CD40 항체, 바람직하게는 단일클론 anti-인간 CD40 항체,

[0099] 상기 조합이 선택적으로 면역 체크포인트 차단제를 포함하는, 조합.

도면의 간단한 설명

[0100] 도 1: 치료 용법에 대한 반응자 및 비-반응자에서의 혈청내 GDF-15의 수준을 도시한다.

도 2: 혈청내 hGDF-15 수준이 각각 <1.8 ng/ml, 1.8-4.2 ng/ml 및 >4.2 ng/ml인 환자 그룹들에서 반응자 및 비-반응자의 수를 도시한다.

도 3: 연속형 예측인자로서 GDF-15을 이용한 일반화 선형 모델에 의해 예측된 치료에 대한 반응 확률 (반응자 1). 원 표시는 데이타이고, 곡선은 모델을 표시한다. 수직 선은 치료 반응 확률이 0.5일 때의 GDF-15 농도를 표시한다.

도 4: 혈청내 GDF-15 수준에 따른 3가지 그룹 (<1.8, 1.8-4.2, >4.2 ng/ml)에서의 카플란-마이어 생존 그래프.

도 5: 도 5A: 연속형 예측인자로서 LDH를 이용한 일반화 선형 모델에 의해 예측된 치료 반응 확률 (반응자 1). 원은 데이타를 나타내고, 곡선은 모델을 나타낸다. 수직 선은 치료 반응 확률이 0.5일 때의 LDH 농도를 표시한다. 환자 코호트는 동일하였다. 그러나, 환자 4명에서는 용혈 반응으로 인해 LDH 수치에 대한 신뢰성 있는 측정에 실패하였다. 도 5B: 반응자 및 비-반응자와 이들 각각의 hGDF-15 및 LDH 수준을 나타낸 그래프. 전체 반응자들을 커버하도록 컷-오프 값을 선정한 경우, GDF-15에 기반한 검사로 (9명 중) 6명의 비-반응자를 동정할 수 있지만, LDH 수준에 기반한 분석에서는 비-반응자 (9명 중) 4명만 식별할 수 있었다. LDH 검사에서, 용혈 샘플 4개를 제외하여야 하여, 데이타의 손실이 발생하였다.

도 6: 도에 나타낸 바와 같이 GDF-15 및 T 세포 마커 단백질인 CD3 및 CD8 각각을 면역조직화학법으로 염색한, GDF-15 면역반응성이 없거나 (상단 패널) 또는 높은 (하단 패널) 흑색종 뇌 전이에서 수득된 조직 단편의 예를 도시한 것이다. CD3 및 CD8-양성 세포는 GDF-15 수준이 높은 샘플에서 화살표로 표시된다. CD3 및 CD8 염색은 일련의 단편들에서 동일한 부위를 대상으로 수행되었다 (그러나, 동일한 섹션은 아님).

도 7: 여러가지 흑색종 뇌 전이에서 GDF-15 스코어에 따른 $CD3^+$ 세포의 %를 나타낸 그래프 (7A) 및 여러가지 흑색종 뇌 전이에서 GDF-15 스코어에 따른 $CD8^+$ 세포의 %를 나타낸 그래프 (7B)이다.

도 8: 여러가지 종양 (흑색종, CRC, RCC, NSCLC 및 SCLC)에서 기원한 뇌 전이에서 $CD8^+$ T 세포% 및 $CD3^+$ T 세포% 각각에 따른 GDF-15 스코어를 도시한 그래프이다.

도 9: 도 9A는 초당 시계 (field of view) 당 롤링 T 세포 (rolling T 세포)의 수를 나타낸 것이다. 데이타는 채널 # 3 ("GDF-15") 및 채널 #2 ("대조군")에서 입수하였다. 도 9B는 (픽셀 수/0.2초로 측정한) T 세포의 롤링 속도를 나타낸 것이다. 데이타는 채널 # 3 ("GDF-15") 및 채널 #2 ("대조군")에서 입수하였다. 도 9C는 시계 당 부착 세포의 수를 나타낸 것이다. 데이타는 채널 # 3 ("GDF-15") 및 채널 #2 ("대조군")에서 입수하였다. 도 9D는 시계 당 부착 세포의 수를 나타낸 것이다. 데이타는 채널 # 3 ("GDF-15") 및 채널 #2 ("대조군")에서 입수하였다.

도 10: 도 10A는 롤링 T 세포 수/시계/s를 도시한 것이다. 데이타는 채널 # 1 ("음성 대조군"으로서 무자극 HUVEC 상의 대조군 T 세포), 채널 # 2 ("양성 대조군"으로서 자극된 HUVEC 상의 대조군 T 세포), 채널 # 3 ("GDF-15"), 채널 # 4 ("UACC 257": 분비된 GDF-15을 함유한 UACC 257 흑색종 세포의 상층액 중에 배양한 T 세포) 및 채널 # 5 ("UACC257 + anti-hGDF-15": hGDF-15 저해제로서 항-hGDF-15 항체 B1-23를 사용해 분비된 GDF-15을 고갈시킨 UACC 257 흑색종 세포의 상층액 중에 배양한 T 세포). 도 10B: 실시예 3에 기술된 바와 같이 흐름/부착 분석을 수행하였다. T 세포를, 표시된 바와 같이, 1시간 동안 100 ng/ml GDF-15와 함께 미리 인큐베이션하거나, 또는 10 μg/ml 항체와 함께 1시간 미리 인큐베이션한 100 ng/ml GDF-15와 인큐베이션하였다. 다음과 같은 Anti-GDF-15 항체를 사용하였다: H1L5 (인간화된 B1-23), 01G06 및 03G05 (인간화된 Anti-GDF-15 항체, WO 2014/100689의 서열에 따라 조작됨). 결과는, 20초 당 시계 당 롤링 세포의 수를 표시한, 도로 나타낸다.

도 11: C57BL/6J 마우스에 $2x10^5$ 결장 $MC38^{tghGDF-15}$ 세포를 피하 접종하였다. 0일에 anti GDF-15 항체 (20 mg/체

중 kg)의 처리를 개시하였으며, 3, 7, 10, 14, 17 및 21일에 반복하였다. 13일에, 비슷한 크기 (100 - 150 mm^3)의 종양을 가진 동물들에 Poly-ICLC ("Poly-IC"로 약칭됨) 및 anti CD40 항체를 처리하거나 또는 처리하지 않았다. 사전-확립된 종양을 거부하는 마우스를 57일간 추적하였다. 종양-보유 마우스를 동물 복지 기준에 따라 희생시켰다.

도 12: GDF-15 수준이 각각 <1.5 ng/ml 및 ≥1.5 ng/ml인 환자 그룹에서의 누적 생존율.

도 13: GDF-15 수준이 높은 환자 그룹 (즉, GDF-15 수준이 가장 높은 환자 50명) 및 GDF-15 수준이 낮은 환자 그룹 (즉, GDF-15 수준이 가장 낮은 환자 49명) 각각에서의 누적 생존율 (전체 실험 코호트의 중앙값 분할 (median split)).

도 14: hGDF-15 혈청 수준은 종양의 돌연변이 부담과 유의한 상관관계를 나타내지 않는다. 암 환자의 샘플내 hGDF-15 mRNA 수준을 암에서 동정된 체세포 돌연변이의 수에 대해 그래프로 작성하였다. 체세포 돌연변이는 엑솜 서열분석을 이용해 확인하였다. 데이타는 취리히 대학 병원의 UZH 웹툴을 사용해 분석하였다 (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). 도 14A는 고 등급의 악성 흑색종 환자만을 고려한 암 게놈 아틀라스 (TGCA)로부터 입수한 암 환자 데이타 그래프를 도시한다 (암 게놈 아틀라스는 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 문헌에 기술됨). GDF-15 발현은 RSEM ("RNA Seq by expectation maximization") 소프트웨어 패키지를 이용한 정규화에 의해 분석하였다 (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). 도 14B는 각각 분석한 취리히 대학 병원에서 입수한 추가적인 전이 악성 흑색종 환자 40명의 암 환자 데이타를 그래프로 도시한다.

도 15: 야생형 종양 또는 형질전환 (tg) hGDF-15을 과발현하는 종양을 가진 마우스에서 CD8a에 대한 면역조직화학 사진을 도시한다. 조직 단편은 anti-CD8a (1:100 희석; 4SM15 항체, eBioscience)로 염색하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0101] 정의 및 일반 기법

[0102] 하기에서 달리 정의되지 않은 한, 본원에 사용되는 용어들은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 일반적인 의미로 이해될 것이다.

[0103] 본원에서, 용어 "항체"는 Paul, W.E. (Ed.).: Fundamental Immunology 2nd Ed. Raven Press, Ltd., New York 1989의 제7장에 전체적으로 기술된 바와 같이, 대상 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 기능성 항체를 지칭하며, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 용어 "항체"는, 특별히 제한되지 않으며, 닭 및 포유류 등의 임의의 적절한 공급 종들, 예를 들어 마우스, 염소, 인간을 제외한 영장류 및 인간 유래의 항체들을 망라한다. 바람직하게는, 항체는 인간화 항체이다. 항체는 바람직하게는 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있는 단일클론 항체이다. 용어 "항체"는 IgG-1, -2, -3, 또는 -4, IgE, IgA, IgM 또는 IgD 이소형 항체를 포괄한다. 용어 "항체"는 모노머 항체 (예, IgD, IgE, IgG) 또는 올리고머 항체 (예, IgA 또는 IgM)를 포함한다. 또한, 용어 "항체"는, 특별히 제한되지 않으며, 유전자 조작된 항체, 예를 들어, 키메라 항체 등의 변형 항체 및 단리된 항체를 포함한다.

[0104] 항체의 도메인에 대한 명명은 당해 기술 분야에 공지된 용어에 따른다. 항체의 각 단량체는 당해 기술 분야에 널리 공지된 바와 같이 2개의 중쇄와 2개의 경쇄를 포함한다. 이 중, 각 중쇄 및 경쇄는 항원 결합에 중요한 가변성 도메인 (중쇄의 경우 V_H로 지칭되고, 경쇄의 경우 V_L로 지칭됨)을 포함한다. 이들 중쇄 가변성 도메인과 경쇄 가변성 도메인은 (N-말단에서 C-말단 방향으로) 영역 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 (FR, 프래임워크 영역; CDR, 과가변성 영역이라고도 하는 상보성 결정부)를 포함한다. 항체 서열에서 전술한 항체 영역들의 동정 및 지정은 일반적으로 Kabat 등 (Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983) 또는 Chothia 등 (Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989 Dec 21-28;342(6252):877-83)에 따르거나, 또는 Giudicelli 등 (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)에 기술된 IMGT/V-QUEST 소프트웨어를 사용해 수행될 수 있으며, 이들 문헌은

원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 바람직하게는, 상기에 언급된 항체 영역들은 IMGT/V-QUEST 소프트웨어를 이용함으로써 동정 및 지정된다.

[0105] "단일클론 항체"는 서열 상 실질적으로 동일한 항체들로 된 기본적으로 균일한 집단으로부터 유래되는 항체이다 (즉, N-말단 및 C-말단에 아미노산 변형 등의 자연적으로 발생하는 서열 변형을 포함하는 최소 일부 항체를 제외하고는 동일함). 복수의 에피토프에 대한 다양한 항체들로 된 혼합물을 포함하는 다클론 항체와는 다르게, 단일클론 항체는 동일한 에피토프에 관한 것으로, 즉 특이성이 높다. 용어 "단일클론 항체"는, Kohler and Milstein (Nature, 1975 Aug 7;256(5517):495-7) 또는 Harlow and Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988)에 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조된 항체에서와 같이, (비-제한적으로) 하나의 세포 클론으로부터 파생되는 단일클론 세포 집단으로부터 수득되는 항체를 포함한다. 단일클론 항체는 또한 Clackson et al. (Nature. 1991 Aug 15;352(6336):624-8) 또는 Marks et al. (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97)에 기술된 방법과 같은 파지 디스플레이 기법 등의 다른 적절한 방법으로부터 수득할 수 있다. 단일클론 항체는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 통해 Kd 수치 감소, 최적화된 결합 및 해리 카이네틱스 등의 항원 결합성 측면에서 최적화된 항체일 수 있다. 예를 들어, Kd 수치는 친화성-성숙화된 단일클론 항체를 만드는, 파지 디스플레이 등의 디스플레이 방법을 통해 최적화될 수 있다. 용어 "단일클론 항체"가 오리진의 하나의 단일 종 또는 오리진의 특정 종으로부터 유래되는 항체 서열로 제한되는 것은 아니다. 즉, 용어 "단일클론 항체"의 의미는 인간화된 단일클론 항체 등의 키메라 단일클론 항체를 포함한다.

[0106] "인간화 항체"는 인간 서열과 대상 항원에 대한 결합 특이성을 부여하는 최소한의 비-인간성 서열 영역을 포함하는 항체이다 (예, 인간 GDF-15). 전형적으로, 인간화 항체는 인간 어셉터 항체로부터 유래된 과가변성 영역 서열을 대상 항원 (예, 인간 GDF-15)에 결합하는 비-인간성 도너 항체 (예, 마우스, 토끼, 랫 도너 항체)로부터 유래된 과가변성 영역 서열로 치환함으로써 제조된다. 일부 경우에, 어셉터 항체의 프래임워크 영역 서열 역시 도너 항체의 대응되는 서열로 치환될 수 있다. "인간화 항체"는, 도너 및 어셉터 항체로부터 유래되는 서열 외에도, 다른 (부가적인 또는 치환) 잔기 또는 서열을 포함하거나, 또는 포함하지 않을 수 있다. 이러한 다른 잔기 또는 서열은 결합성과 같은 항체 특성 (예, Kd 수치 감소) 및/또는 면역원성 (예, 인간에서 항원성 감소)을 추가로 개선하도록 제공될 수 있다. 인간화 항체를 제조하는 방법에 대한 비-제한적인 예들은 당해 기술 분야에, 예를 들어, Riechmann et al. (Nature. 1988 Mar 24; 332(6162):323-7) 또는 Jones et al. (Nature. 1986 May 29-Jun 4; 321(6069):522-5)에 공지되어 있다.

[0107] 용어 "인간 항체"는 인간 가변성 도메인 서열과 불변 도메인 서열을 포함하는 항체를 지칭한다. 이 정의는 결합성 (예, Kd 수치 감소) 및/또는 면역원성 (예, 인간에서 항원성 감소)와 같은 항체 특성을 추가로 개선시키기 위해 이용할 수 있는, 하나의 아미노산 치환 또는 변형을 보유한 인간 서열을 가진 항체를 포함한다. 용어 "인간 항체"는 비-인간 서열의 일부가 대상 항원에 대한 결합 특이성을 부여하는 인간화 항체를 배제한다.

[0108] 본원에서, 항체의 "항원-결합 영역"은 항원 (예 hGDF-15, PD-1 또는 PD-L1)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 능력을 보유한 항체의 영역을 의미한다. 이런 능력은, 예를 들어, 당해 기술 분야에 공지된 방법을 통해 항원에 대한 특이적인 결합에 대해 항체와 경쟁하는 항원-결합 영역의 능력을 측정함으로써, 결정할 수 있다. 항원-결합 영역은 항체의 하나 이상의 단편을 포함할 수 있다. 항원-결합 영역은, 특별히 제한되지 않으나, 재조합 DNA 방법 및 항체의 화학적 또는 효소적 단편화에 의한 제조 등의 당해 기술 분야에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 제조할 수 있다. 항원-결합 영역은 Fab 단편, F(ab') 단편, $F(ab')_2$ 단편, 단쇄 항체 (scFv), 단일-도메인 항체, 다이아바디 (diabody) 또는 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 능력을 보유한 항체의 임의의 다른 영역(들)일 수 있다.

[0109] "항체" (예, 단일클론 항체) 또는 "항원-결합 영역"은 유도체화될 수 있거나, 또는 다른 분자에 연결될 수 있다. 예를 들어, 항체에 연결될 수 있는 분자로는 다른 단백질 (예, 다른 항체), 분자 표지 (예, 형광 분자, 발광 분자, 착색 분자 또는 방사성 분자), 약제학적 물질 및/또는 독성 물질이 있다. 항체 또는 항원-결합 영역은 직접 연결되거나 (예, 2개의 단백질 간의 융합 형태) 또는 링커 분자 (예, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 적절한 화학적 링커 타입)를 통해 연결될 수 있다.

[0110] 본원에서, 용어 "결합" 또는 "결합한다"는 대상 항원 (예, 인간 GDF-15)에의 특이적인 결합을 의미한다. 바람직하게는, Kd 수치는 100 nM 미만, 더 바람직하게는 50 nM 미만, 보다 더 바람직하게는 10 nM 미만, 보다 더 바람직하게는 5 nM 미만, 가장 바람직하게는 2 nM 미만이다.

[0111] 본원에서, 항체, 또는 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 제2 항체와 "경쟁할 수 있는" 이의 항원-결합 영역은, 상

기 (제1) 항체 또는 "경쟁할 수 있는" 이의 항원-결합 영역이 제2 항체의 10 nM 기준 용액이 인간 또는 재조합 인간 GDF-15에 결합하는 것을 50% 줄일 수 있다는 것을 의미한다. 일반적으로, "경쟁할 수 있는"은, 제2 항체의 10 nM 기준 용액이 인간 또는 재조합 인간 GDF-15에 결합하는 것을 50% 줄이기 위해 필요한, (제1) 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 농도가, 1000 nM 미만, 바람직하게는 100 nM 미만, 더 바람직하게는 10 nM 미만이라는 것을 의미한다. 결합은 표면 플라스몬 공명 측정, 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA) 측정, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 측정에 의해 측정한다.

[0112] 본원에서, 용어 "에피토프"는 항체에 대한 결합부를 형성하는 항원의 작은 일부를 지칭한다.

[0113] 본원의 맥락에서, 대상 항원 (예, 인간 GDF-15)에 대한 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 결합 또는 경쟁적인 결합은 바람직하게는 후술한 바와 같이 참조 표준 방법으로서 표면 플라스몬 공명 측정을 이용해 측정한다.

[0114] 용어 "K_D" 또는 "K_D 수치"는 당해 기술 분야에 공지된 평형 해리 상수이다. 본원의 맥락에서, 이들 용어는 특정 대상 항원 (예, 인간 GDF-15)에 대한 항체의 평형 해리 상수를 지칭한다. 평형 해리 상수는 복합체 (예, 항원-항체 복합체)가 구성 요소들 (예, 항원 및 항체)로 가역적으로 해리되는 경향을 나타내는 척도이다. 본 발명에 따른 항체에서, K_D 수치 (예, 항원 인간 GDF-15에 대한 K_D 수치)는 바람직하게는 후술한 표면 플라스몬 공명 측정에 의해 측정된다.

[0115] 본원에서, "단리된 항체"는 공급 환경의 구성 요소들 대부분으로부터, 예를 들어 제조에 사용된 (예, 항체를 재조합으로 발현하는 생산 세포, 예를 들어 CHO 세포) 하이브리도마 세포 배양물 또는 다른 세포 배양물의 구성 요소들로부터 단리 및 분리된 항체이다. 분리는 바람직한 용도 (본 발명에 따른 anti-인간 GDF-15 항체의 치료학적 용도)에 대한 항체의 적합성을 방해할 수 있는 성분들을 충분히 제거하도록 수행된다. 단리된 항체의 제조 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 단백질 A 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 바이러스 체류 여과 및 한외여과 등이 있다. 바람직하게는, 단리된 항체 제제는 라우리 단백질 분석을 이용한 측정에 따르면 순도가 70 % (w/w) 이상, 더 바람직하게는 80 % (w/w) 이상, 보다 더 바람직하게는 90 % (w/w) 이상, 보다 더 바람직하게는 95 % (w/w) 이상, 가장 바람직하게는 99 % (w/w) 이상이다.

[0116] 본원에서, "다이아바디"는 동일 체인 상에서 2개의 도메인들 간에 쌍 형성을 허용하기에는 매우 짧은 펩타이드 링커에 의해 연결된 동일한 폴리펩타이드 체인 상에 중쇄 가변성 도메인과 이와 연결된 경쇄 가변성 도메인을 포함하는, 작은 2가 항원-결합성 항체 영역이다. 이로써, 다른 체인의 상보성 도메인들과의 쌍 형성과, 2개의 항원 결합부를 가진 이량체 분자의 조립이 이루어진다. 다이아바디는 2가의 단일 특이성 (예, 인간 GDF-15에 대해 2개의 항원 결합부를 가진 다이아바디)일 수 있거나, 또는 이가의 2중 특이성 (예, 하나는 인간 GDF-15에 대한 결합부이고 다른 하나는 다른 항원의 결합부인, 2개의 항원 결합부를 가진 다이아바디)일 수 있다. 다이아바디에 대한 상세한 설명은 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)에서 찾아 볼 수 있다.

[0117] "단일-도메인 항체" ("Nanobody™"로도 지칭됨)는 본원에서 단일한 모노머 형태의 가변적인 항체 도메인으로 구성되는 항체 단편이다. 단일-도메인 항체의 구조 및 제조 방법은 당해 기술 분야에, 예를 들어 Holt LJ et al. ("Domain antibodies: proteins for therapy." Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90.), 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.) 및 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)에 공지되어 있다.

[0118] 용어 "암" 및 "암 세포"는 본원에서 당해 기술 분야에서 통상적인 의미로 사용된다 (예, Weinberg R. et al.: The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006. 850p).

[0119] 본 발명에 따른 치료할 암은 고형 암이다. "고형 암"은 한가지 이상의 고형 종양을 형성하는 암이다. 고형 종양을 형성하는 이러한 고형 암은 일반적으로 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 용어 "고형 암"은 암에 의해 형성된 원발성 종양과 또한 전이라고도 하는 잠재적인 이차 종양을 둘다 포괄한다. 본 발명에 따라 치료할 바람직한 고형 암은 흑색종, 결장직장암, 전립선암, 두경부암, 요로상피암, 위암 (stomach cancer), 췌장암, 간암, 고환암, 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암, 뇌암, 유방암, 위암 (gastric cancer), 신장암, 유잉 육종, 비-소 세포성 폐암 및 소 세포성 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 흑색종, 결장직장암, 전립선암, 두경부암, 요로상피암, 위암 (stomach cancer), 췌장암, 간암, 고환암, 난소암, 자궁내막암 및 자궁경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더 바람직하게는 흑색종, 결장직장암, 전립선암, 두경부암, 요로상피암 및 위암

(stomach cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 흑색종, 결장직장암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0120] 본원에 언급되는 바와 같이, 용어 "뇌암"은 당해 기술 분야에 공지된 모든 뇌암을 지칭한다. 이는, 신경교종(WHO 등급 I-IV), 성상세포종, 수막종 및 수모세포종 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0121] 본원에서, "두경부암"은 당해 기술 분야에 공지된 모든 두경부암을 지칭한다. 이러한 것으로는, 식도암, 구강 편평 세포암 및 하인두암 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 치료할 특히 바람직한 두경부암은 구강 편평 세포암이다.

[0122] 본원에서, 용어 "암 증식"은 암의 어떠한 측정가능한 증식을 의미한다. 고형 종양을 형성하는 암의 경우, "암 증식"은 경시적으로 종양의 부피가 측정가능한 수준으로 증가하는 것이다. 만일, 암이 오직 한가지 종양만을 형성한다면, "암 증식"은 한가지 종양의 부피 증가만을 의미한다. 만일, 암이 전이와 같이 복수의 종양을 형성한다면, "암 증식"은 모든 측정가능한 종양들의 부피 증가를 의미한다. 고형 종양의 경우, 종양 부피는 자기 공명 영상 및 컴퓨터 단층촬영 (CT 스캔) 등의 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 측정가능할 수 있다.

[0123] 본 발명에 있어서, "암의 치료" 또는 "암을 치료하는" 등의 용어들은 치료학적 처치 (therapeutic treatment)를 의미한다. 치료학적 처치의 발휘 여부 평가는, 예를 들어, 치료가 치료받은 환자 또는 환자들에서 암 증식을 저해하는 지를 평가함으로써, 수행될 수 있다. 바람직하게는, 저해는 당해 기술 분야에 공지된 적절한 통계학적 검사에 의해 분석된 바에 따르면 통계학적으로 유의하다. 암 증식의 저해는 본 발명에 따라 치료받는 환자 군에서의 암 증식을 무처리 환자인 대조군과 비교하거나, 또는 최신 표준 암 치료 + 본 발명에 따른 치료를 제공받은 환자 군을 최신 표준 암 치료만 제공받은 대조군 환자와 비교함으로써, 평가할 수 있다. 이러한 암 증식의 저해를 평가하기 위한 실험들은 임상 실험에서 허용되는 표준에 따라, 예를 들어 충분한 통계적 검정력을 갖춘 이중 맹검의 무작위 실험으로 설계된다. 용어 "암 치료"는 암 증식이 부분적으로 저해되는 암 증식의 저해 (즉, 환자에서의 암 증식이 환자의 대조군과 비교해 지연됨), 암 증식이 완전히 저해되는 저해 (즉, 환자에서 암 증식이 중단됨), 및 암 증식이 퇴화 (즉, 암 축소)되는 저해를 포함한다. 바람직하게는, 치료학적 처치가 발휘될 수 있는 지에 대한 평가는 고형 종양, version 1.1 (RECIST v1.1) (Eisenhauer et al.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: Eur. J. Cancer. 45, No. 2, January 2009, pp. 228-47)에서 반응 평가 기준을 이용한 반응자와 비-반응자의 분류에 기초하여 행해질 수 있다. 다른 예로 또는 부가적으로, 치료학적 처치의 작동 여부에 대한 평가는 암 진행의 공지된 임상 지표를 기반으로 이루어질 수 있다.

[0124] 본 발명에 따른 암의 치료는 1차 요법 (first-line therapy), 2차 요법 또는 3차 요법이거나, 또는 3차 이후의 요법일 수 있다. 이들 용어의 의미는 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 미국 국립 암 기관에서 통상적으로 사용되는 용어 명명에 따른다.

[0125] 본 발명에 따른 암의 치료는 부가적인 또는 이차적인 치료학적 이점들이 환자들에서 나타나는 것 역시 배제하지 않는다. 예를 들어, 부가적인 또는 이차적인 이점은 암으로 인한 체중 감소에 영향을 미칠 수 있다. 그러나, 보호하고자 하는 일차 치료는 암 자체를 치료하기 위한 것이며, 임의의 이차적인 또는 부가적인 작용은 암 증식을 치료하는데 있어 선택적이고, 부가적인 이점을 반영하는 것으로 이해된다.

[0126] 용어 "암 면역요법"은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 일반적으로 환자의 면역 시스템을 이용해 암을 치료하는 암의 치료를 의미한다. 암 세포는 암 세포에 특이적이며 비-암성 세포의 항원과는 상이한 암 세포 항원을 만드는 게놈 돌연변이를 보유한다. 이에, 본 발명에 있어서, 암 면역요법의 바람직한 측면에서, 암 면역요법은 암 세포 항원이 면역 시스템에 의해 인지되고, 이들 항원을 발현하는 암 세포가 면역 시스템에 의해 사멸되는, 암 면역요법이다. 본 발명의 비-제한적인 측면에서, 이러한 암 세포 항원을 발현하는 암 세포는 면역계의 $CD8^+$ T 세포에 의해 사멸될 수 있다. 암 면역요법은 당해 기술 분야에 공지된 면역모니터링 방법에 의해, 예를 들어, 세포내 (예, $CD8^+$ T-세포 및/또는 NK 세포에서) IFN-γ 발현을 혈액 샘플에서 측정하여, 혈액 샘플에서 (예, $CD8^+$ T-세포 및/또는 NK 세포 상의) CD107a 세포 표면 발현을 측정하여, 혈액 샘플에서 (예, 백혈구 상의) 세포내 TNF-α 발현, 혈액 샘플에서 (예, $CD8^+$ T-세포 및/또는 $CD4^+$ T-세포에서) 세포내 인터루킨-2 발현, 혈액 샘플에서 (예, $CD8^+$ T-세포 및/또는 $CD4^+$ T-세포에서) CD154 세포 표면 발현, 혈액 샘플에서 종양 항원-특이적인 T 세포에 대한 테트라머 또는 덱스트라머 염색, 종양 특이 돌연변이로부터 유래되는 신생 항원 (neoantigen)에 대한 T 세포의 존재 또는 자가 종양 세포에 대한 CTL 활성을 측정함으로써, 평가할 수 있다. 암 면역요법을 평가

하기 위한 바람직한 방법은 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 471-486에 따른 방법; 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: 978-3-319-05103-1에 따른 방법이다.

[0127] 본원에서, "암 면역요법"은, 선택적으로, 암을 치료하기 위해 사용되는 면역 시스템 이외에, 암 치료의 부가적인 기전들이 사용되는 치료를 포괄한다. 예를 들어, 면역계가 심각하게 약화된 마우스 모델 시스템에서 암을 치료하기 위해 hGDF-15 저해제가 사용될 수 있다는 것이 기존에 밝혀졌다 (WO 2014/049087). 이에, 본 발명에서, 인간 환자에서 hGDF-15 저해제에 의한 암 면역요법은 면역계와는 독립적인 hGDF-15 저해제의 부가적인 치료 효과를 포괄할 수 있다. 부가적인 암 치료 기전이 사용될 수 있는 암 면역요법의 다른 예는, 공지된 화학치료제(들)과의 병용 요법이다. 공지된 화학치료제(들)와의 상기한 병용 요법은, 예를 들어, 면역 시스템을 이용해 암을 치료하는 암 치료 뿐만 아니라 암 세포를 직접 화학치료제(들)에 의해 사멸시키는 암 치료를 포함할 수 있다.

[0128] 본원에서, 용어 "고형 암내 $CD8^+$ T 세포의 % 증가"는 고형 암에 의해 형성된 종양 또는 종양들에서 $CD8^+$ T 세포의 % (즉, 모든 세포들에 대해 계산한 $CD8^+$ T 세포의 %)가 임의의 측정가능한 수준으로 증가하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 증가는 당해 기술 분야에 공지된 적절한 통계 검정에 의해 평가시 통계학적으로 유의한다. 고형 암에 의해 형성된 종양 또는 종양들에서 $CD8^+$ T 세포의 % 증가는 고형 종양에서 공지된 $CD8^+$ T 세포 분석 방법에 의해 측정할 수 있다. 이러한 방법으로는 종양 바이옵시에서 $CD8^+$ T 세포 분석, 예를 들어, CD8에 대한 항체와 세포 전체에 대한 염색을 이용한 면역조직화학에 의한 종양 바이옵시의 분석 등이 있다. 증가는 본 발명에 따라 치료된 환자 군의 종양내 $CD8^+$ T 세포의 %를 무처리 환자인 대조군과 비교하거나, 또는 최신 표준 암 치료 + 본 발명에 따른 치료를 제공받은 환자 군을 최신 표준 암 치료만 제공받은 대조군 환자와 비교함으로써, 평가할 수 있다.

[0129] 본원에서, "$CD8^+$ T 세포"는 바람직하게는 인간 환자에서 내인성으로 형성되는 세포이다.

[0130] hGDF-15 혈청 수준은 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법으로 측정할 수 있다. 예를 들어, hGDF-15 혈청 수준을 측정하는 바람직한 방법은 GDF-15에 대한 항체를 이용한 면역-연계된 면역흡착 분석 (ELISA)에 의한 hGDF-15 혈청 수준의 측정이다. 이러한 ELISA 방법은 실시예 1에 예시된다. 다른 예로, hGDF-15 혈청 수준은 GDF-15에 대한 항체를 이용한 공지된 전기화학발광 면역분석으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 상기한 전기화학발광 면역분석에 Roche Elecsys® 기법이 사용될 수 있다.

[0131] 본 발명에 따라 치료할 환자는 바람직하게는 상승된 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다. 용어 "상승된 hGDF-15 혈청 수준"은, 본원에서 인간 환자가 본 발명에 따른 hGDF-15 저해제를 투여하기 전의 혈청내 hGDF-15 수준이, 기준으로서 건강한 인간 대조군 개체의 혈청내 hGDF-15 수준 중앙값과 비교해 더 높게 가지는 것을 의미한다.

[0132] 건강한 인간 대조군 개체의 혈청내 hGDF-15 수준의 중앙값은 < 0.8 ng/ml이다. 예상 범위는 건강한 인간 대조군에서 0.2 ng/ml 내지 1.2 ng/ml이다 (참조: Tanno T et al.: "Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease." Curr Opin Hematol. 2010 May; 17(3): 184-190).

[0133] 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따라 치료할 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.2 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.5 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 더 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.8 ng/ml 이상의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다.

[0134] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따라 치료할 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.2 ng/ml - 12 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.5 ng/ml - 12 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 더 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.8 ng/ml - 12 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다.

[0135] 전술한 모든 구현예들에 따른 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명에 따라 치료할 환자는 hGDF-15 저해제의 투

여 개시 전에 1.2 ng/ml - 10 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.5 ng/ml - 10 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 더 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.8 ng/ml - 10 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다.

[0136] 전술한 모든 구현예들에 따른 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명에 따라 치료할 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.2 ng/ml - 8 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.5 ng/ml - 8 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이고, 더 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 1.8 ng/ml - 8 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다.

[0137] 다른 구현예에서, 본 발명에 따라 치료할 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 적어도 2 ng/ml, 적어도 2.2 ng/ml, 적어도 2.4 ng/ml, 적어도 2.6 ng/ml, 적어도 2.8 ng/ml, 적어도 3.0 ng/ml, 적어도 3.2 ng/ml, 적어도 3.4 ng/ml, 적어도 3.6 ng/ml, 적어도 3.8 ng/ml, 적어도 4.0 ng/ml 또는 적어도 4.2 ng/ml의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다. 이러한 구현예에서, 환자는 바람직하게는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 12 ng/ml 이하의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다. 더 바람직하게는, 이러한 구현예에서, 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 10 ng/ml 이하의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다. 가장 바람직하게는, 이러한 구현예에서, 환자는 hGDF-15 저해제의 투여 개시 전에 8 ng/ml 이하의 hGDF-15 혈청 수준을 가진 환자이다.

[0138] 본원에서, 용어 "투여 개시 전"은 본 발명에 따른 hGDF-15 저해제를 투여하기 직전의 시기를 의미한다. 바람직하게는, 용어 "투여 개시 전"은 투여 직전 30일간의 기간을 의미하며; 가장 바람직하게는 투여 직전 1주일의 기간을 의미한다.

[0139] 본원에서, 용어 "유의한", "유의하게" 등은 당해 기술 분야에 잘 알려진 적절한 방법에 의해 측정되는 바와 같이 값들 간의 통계학적으로 유의한 차이를 지칭한다.

[0140] 본 발명에 따라 사용되는 hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용해 투여할 수 있다. 이러한 방법은 해당 저해제의 화학적 특성 등의 널리 공지된 고려 사항을 기초로 (예, 저해제가 짧은 간섭 RNA 또는 항체인지에 따라서) 당업자가 선택할 것이다. 공지된 면역 체크포인트 차단제의 투여는 이들 면역 체크포인트 차단제의 공지된 투여 계획에 기초할 수 있다. 예를 들어, 면역 체크포인트 차단제의 투여는 KEYNOTE-006 실험 (C. Robert et al. N Engl J Med 2015; 372:2521-2532)에 사용된 투여 계획에 기초할 수 있다.

[0141] 본원에서, 용어 "포함하는"은 각각 선택적으로 용어 "구성되는"으로 치환될 수도 있다.

[0142] 본 발명에 따라 사용될 hGDF-15 저해제

[0143] 본 발명에 따른 "hGDF-15 저해제"는 인간 GDF-15 (hGDF-15)의 기능을 특이적으로 저해할 수 있는 임의의 분자일 수 있다.

[0144] 이러한 hGDF-15 저해제에 대한 비-제한적인 예는, hGDF-15의 발현을 특이적으로 하향 조절함으로써 hGDF-15 기능을 저해하는, 분자이다. 예를 들어, 짧은 간섭 RNA 또는 siRNA 헤어핀 구조체를 사용해, hGDF-15의 발현을 특이적으로 하향 조절하고, hGDF-15 기능을 저해할 수 있다. 짧은 간섭 RNA 및 siRNA 헤어핀 구조체 서열의 설계 및 선택 규칙은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, Jackson and Linsley, Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application, Nat Rev Drug Discov. 2010 Jan;9(1):57-67에 검토되어 있다. 짧은 간섭 RNA 및 siRNA 헤어핀 구조체는 바이러스 전달 방법 (예, Knoepfel SA et al., "Selection of RNAi-based inhibitors for anti-HIV gene therapy." World J Virol. 2012 Jun 12;1(3):79-90에서 검토됨) 및 기타 전달 방법, 예를 들어 세포내 전달을 용이하게 하는 컨쥬게이트 기를 이용하는 방법 (예, Kanasty R et al., "Delivery materials for siRNA therapeutics.", Nat Mater. 2013 Nov; 12(11):967-77에서 검토됨) 등의 임의의 적절한 방법에 의해 인간 환자에게 전달될 수 있다.

[0145] 대상 물질이 "hGDF-15 저해제"인 지의 여부는, 바람직한 구현예에 상세히 기술된 바와 같이, 본원에 기술된 방법을 이용해 확인할 수 있다. 바람직한 구현예에 있어서 바람직한 방법은 실시예 3에서 사용된 방법이다.

[0146] 인간 GDF-15 단백질은 단일클론 항체에 의해 유익하게 타겟팅될 수 있으며 (WO2014/049087), 이러한 항체는, 재조합 인간 GDF-15에서 평형 해리 상수 약 790pM (참조예 1)으로 확인된 바와 같이, 인간 GDF-15에 대한 높은 결합 친화성 등의 유익한 특성을 가진 것으로, 기존에 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 사용될 hGDF-15 저해제는 hGDF-15 또는 이의 항원-결합 영역에 결합할 수 있는 항체이다. 바람직하게는, 항체는 hGDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0147] 이에, 더 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 hGDF-15 저해제는, 중쇄 가변성 도메인이 서열번호 5의 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 영역을 포함하고; 경쇄 가변성 도메인이 서열번호 7의 아미노산 서열 또는 이와 85% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 영역을 포함하는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다. 이러한 구현예에서, 바람직하게는, 항체 또는 이의 항원-결합 영역은, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역과 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 영역을 포함하는, 중쇄 가변성 도메인을 포함하며, 항체 또는 이의 항원-결합 영역은, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역과 아미노산 서열 ser-ala-ser을 포함하는 CDR2 영역을 포함하는, 경쇄 가변성 도메인을 포함한다.

[0148] 이에, 보다 더 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 hGDF-15 저해제는 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이며, 여기서 항체 또는 이의 항원-결합 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 영역; 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변성 도메인을 포함하며, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 영역은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역; 아미노산 서열 ser-ala-ser을 포함하는 CDR2 영역; 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변성 도메인을 포함한다.

[0149] 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역에 대한 전술한 구현예들의 또 다른 구현예에서, 중쇄 가변성 도메인은 FR1, CDR1, FR2, CDR2 및 FR3 영역을 포함하고; 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 영역을 포함하며, 경쇄 가변성 도메인은 FR1, CDR1, FR2, CDR2 및 FR3 영역을 포함하고; 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이와 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 영역을 포함한다.

[0150] 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역에 대한 전술한 구현예들에 대한 또 다른 구현예에서, 항체는 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다. 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 중쇄의 불변 도메인은 서열번호 29의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 경쇄의 불변 도메인은 서열번호 32의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 더 바람직하게는, 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 중쇄의 불변 도메인은 서열번호 29의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 경쇄의 불변 도메인은 서열번호 32의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 98%, 바람직하게는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함함다. 보다 더 바람직하게는, 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 중쇄의 불변 도메인은 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하며, 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 경쇄의 불변 도메인은 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 중쇄 가변성 도메인은 서열번호 28의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98%, 보다 더 바람직하게는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 경쇄 가변성 도메인은 서열번호 31의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 98%, 보다 더 바람직하게는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는, 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 중쇄 가변성 도메인은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하고, 이러한 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 경쇄 가변성 도메인은 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함한다.

[0151] 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역에 대한 전술한 구현예들에 대한 또 다른 구현예에서, 중쇄 가변성 도메인은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역과 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 영역을 포함하며, 경쇄 가변성 도메인은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 영역과 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 영역을 포함한다. 이러한 구현예에 대한 바람직한 측면에서, 항체는 전술한 본 발명의 임의의 구현예들에 정의된 CDR3 서열을 가질 수 있다.

[0152] 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역에 대한 또 다른 구현예에서, 항원-결합 영역은 단일-도메인 항체 ("Nanobody™"라고도 함)이다. 이 구현예에 대한 일 측면에서, 단일-도메인 항체는 각각 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함한다. 이 구현예에 대한 다른 측면에서, 단일-도메인 항체는 각각 서열번호 6, ser-ala-ser 및 서열번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함한다. 이 구현예에 대한 바람직한 측면에서, 단일-도메인 항체는 인간화 항체 (humanized antibody)이다.

[0153] 바람직하게는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원-결합 영역은 100 nM 이하, 20 nM 이하, 바람직하게는 10 nM 이하, 더 바람직하게는 5 nM 이하, 가장 바람직하게는 0.1 nM - 2 nM의 인간 GDF-15에 대한 평형 해리 상수를 가진다.

[0154] 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역에 대한 상기 구현예들에 대한 또 다른 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원-결합 영역은 Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ)에 기탁번호 DSM ACC3142로 기탁된 세포주 B1-23에서 수득가능한 인간 GDF-15에 대한 항체와 동일한 인간 GDF-15 에피토프에 결합한다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명에 있어서 인간 GDF-15에 대한 항체 결합은 바람직하게는 참조예 1에 언급된 공정에 따라 기준 표준 방법으로서 표면 플라스몬 공명 측정법에 의해 측정한다. 인간 GDF-15 상의 동일 에피토프에 대한 결합은 세포주 B1-23으로부터 수득가능한 인간 GDF-15에 대한 항체 및 세포주 B1-23으로부터 수득가능한 인간 GDF-15에 대한 항체와 동일한 인간 GDF-15 에피토프에 결합할 것으로 예상되는 항체의 표면 플라스몬 공명 경쟁적인 결합 실험에 의해 마찬가지로 분석할 수 있다.

[0155] 다른 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은, 중쇄 가변성 도메인이 서열번호 39의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하고; 경쇄 가변성 도메인이 서열번호 40의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0156] 다른 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은, 중쇄 가변성 도메인이 서열번호 41의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하고; 경쇄 가변성 도메인이 서열번호 42의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0157] 다른 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은, 중쇄 가변성 도메인이 서열번호 43의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하고; 경쇄 가변성 도메인이 서열번호 44의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0158] 다른 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은, 중쇄 가변성 도메인이 서열번호 45의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하고; 경쇄 가변성 도메인이 서열번호 46의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0159] 다른 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은, 중쇄 가변성 도메인이 서열번호 47의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하고; 경쇄 가변성 도메인이 서열번호 48의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0160] 다른 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은, 중쇄 가변성 도메인이 서열번호 49의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하고; 경쇄 가변성 도메인이 서열번호 50의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포

함하는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0161] 다른 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은, 중쇄 가변성 도메인이 서열번호 51의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하고; 경쇄 가변성 도메인이 서열번호 52의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0162] 다른 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은, 인간 GDF-15에의 결합, 바람직하게는 재조합 인간 GDF-15에의 결합에 대해, 본원에서 지칭되는 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 임의의 한가지 항체와 경쟁할 수 있는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0163] 매우 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은 인간화된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 영역이다. 본 발명에 따른 임의의 주어진 비-인간 항체 (즉, 도너 항체 서열)에 대해, 본 발명의 인간화된 단일클론 anti-human-GDF-15 항체 또는 이의 항원 결합 영역을 전술한 바와 같이 당해 기술 분야에 공지된 기법에 따라 제조할 수 있다.

[0164] 매우 바람직한 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원-결합 영역은, 서열번호 25 및 서열번호 26의 아미노산 서열로 구성된 인간 GDF-15 상의 입체형태적 또는 불연속 에피토프에 대한 결합인, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다. 이 구현예에 대한 바람직한 측면에서, 항체 또는 이의 항원-결합 영역은 전술한 임의 구현예들 중 하나의 구현예에 따른 서열에 의해 정의되는 항체 또는 이의 항원-결합 영역이다.

[0165] 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은 약물과 연결될 수 있다. 이 구현예에 대한 비-제한적인 측면에서, 약물은 공지된 항암제 및/또는 면역-자극 분자일 수 있다. 공지된 항암제로는, 시스플라틴 (cisplatin), 카보플라틴 (carboplatin), 옥살리플라틴 (oxaliplatin), 메클로르에타민 (mechlorethamine), 사이클로포스파미드 (cyclophosphamide), 클로람부실 (chlorambucil) 및 이포스파미드 (ifosfamide)와 같은 알킬화제; 아자티오프린 (azathioprine) 및 머캅토푸린과 같은 항-대사산물제; 빈카 알카로이드 (예, 빈크리스틴 (vincristine), 빈블라스틴 (vinblastine), 비노렐빈 (vinorelbine) 및 빈데신 (vindesine)), 탁산 (예, 파클리탁셀, 도세탁셀 (docetaxel)), 에토포시드 (etoposide) 및 테니포시드 (teniposide)와 같은 알카로이드; 캄프토테신 (camptothecin) (예, 이리노테칸 (irinotecan) 및 토포테칸 (topotecan))과 같은 토포이소머라제 저해제; 액티노마이신 (actinomycin), 안트라사이클린 (anthracycline), 독소루비신, 다우노루비신 (daunorubicin), 발루비신 (valrubicin), 이다루비신 (idarubicin), 에피루비신 (epirubicin), 블레오마이신 (bleomycin), 플리카마이신 (plicamycin) 및 미토마이신 (mitomycin)과 같은 세포독성 항생제; 및 방사성동위원소 등이 있다.

[0166] 전술한 구현예에 대한 다른 구현예에서, 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 영역은 아미노산 테그에 의해 변형된다. 이러한 테그에 대한 비-제한적인 예로는 폴리히스티딘 (His-) 테그, FLAG-테그, 헴어글루티닌 (HA) 테그, 당단백질 D (gD) 테그 및 c-myc 테그 등이 있다. 테그는 다양한 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 테그는 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 정제를 보조하기 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기한 테그는 인간 GDF-15에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원-결합 영역의 C-말단 또는 N-말단에 존재한다.

[0167] 본 발명에 따라 사용되는 면역 체크포인트 차단제

[0168] 암 세포는, 암 세포에 특이적이며 비-암성 세포의 항원과 상이한, 암 세포 항원을 만드는, 게놈 돌연변이를 가진다. 따라서, 저해되지 않는 무손상 면역 시스템은, 이들 항원에 대한 면역 반응이 형성되도록, 이들 암 세포 항원을 인지하여야 한다. 그러나, 대부분의 암은 이들 항원에 대해 면역 허용 기전을 발생시킨다. 암 세포가 이러한 면역 허용을 달성하는 한가지 유형의 기전은 면역 체크포인트를 활용하는 것이다. 본원에서 "면역 체크포인트"는 일반적으로 면역 반응을 저해할 수 있는 면역 기전을 의미한다. 보다 구체적으로, 면역 체크포인트는 면역 시스템의 분자 (또는 면역 시스템의 분자 그룹)가 면역계 세포의 활성화를 저해함으로써 면역 반응을 저해하는 것을 특징으로 하는 기전이다. 면역계 세포의 활성화를 저해함으로써 면역 반응을 저해하는 면역계의 분자 (또는 분자 그룹) 역시 체크포인트 분자(들)로 알려져 있다.

[0169] 본원에서, "면역 체크포인트 차단제"는 면역 체크포인트를 차단할 수 있는 분자이다. 본 발명에 따라 사용되는

hGDF-15 저해제는 CD8+ T 세포에 대한 효과 등의 면역 시스템에 영향을 미치는 것으로 이해되지만, 본원에서, 용어 "면역 체크포인트 차단제"는 hGDF-15 저해제를 의미하는 것이 아니고, hGDF-15 저해제와는 다른 분자를 의미한다.

[0170] 지금까지 공지된 대부분의 공통적인 면역 체크포인트 차단제는 인간 PD-1의 저해제 및 인간 PD-L1의 저해제 등의 면역 체크포인트 분자의 저해제이다. 추가적인 면역 체크포인트 차단제는 anti-LAG-3, anti-B7H3, anti-TIM3, anti-VISTA, anti-TIGIT, anti-KIR, anti-CD27, anti-CD137 뿐만 아니라 IDO의 저해제이다. 따라서, 본 발명에 따라 사용되는 바와 같이, 면역 체크포인트 차단제의 바람직한 형태는 면역 체크포인트 분자의 저해제이다. 다른 구현예에서, 면역 체크포인트 차단제는 면역 체크포인트를 무시하는 공동-자극 신호의 활성인자일 수 있다.

[0171] 면역 체크포인트 차단제의 효능을 측정하기 위한 방법으로는 시험관내 결합 분석, 1차 T 세포성 사이토카인 방출 분석 및 생체내 모델 시스템 등이 있다. 또한, 프로메가에서는 현재, 예를 들어, 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/)에 언급된, PD-1/PD-L1에 대한 상업적으로 이용가능한 생발광 리포터 시스템을 개발하고 있다.

[0172] 바람직한 면역 체크포인트 차단제는 인간 PD-1의 저해제 및 인간 PD-L1의 저해제이다. 본 발명의 모든 구현예들에 대한 바람직한 일 구현예에서, 면역 체크포인트 차단제는 인간 CTLA4의 저해제가 아니다.

[0173] 본원에서, "인간 PD-1의 저해제"는 인간 PD-1의 기능을 특이적으로 저해할 수 있는 임의 분자일 수 있다. 이러한 분자에 대한 비-제한적인 예로는 인간 PD-1에 결합할 수 있는 항체 및 인간 PD-1에 결합할 수 있는 DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein)이 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 언급되는 PD-1의 저해제는 인간 PD-1에 결합할 수 있는 항체이며, 더 바람직하게는 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체이다. 가장 바람직하게는, 인간 PD-1에 결합할 수 있는 단일클론 항체는 니볼루맵 (nivolumab), 펨브롤리주맵 (pembrolizumab), 피딜리주맵 (pidilizumab) 및 AMP-224로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0174] 본원에서, "인간 PD-L1의 저해제"는 인간 PD-L1의 기능을 특이적으로 저해할 수 있는 임의 분자일 수 있다. 이러한 분자에 대한 비-제한적인 예는 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항체 및 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein)이 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따라 사용될 인간 PD-L1의 저해제는 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항체이며, 더 바람직하게는 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체이다. 가장 바람직하게는, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 단일클론 항체는 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 및 MSB0010718C로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0175] 방법 및 기법

[0176] 일반적으로, 본원에서 달리 정의되지 않은 한, 본 발명에서 사용되는 방법 (예, 클로닝 방법 또는 항체와 관련된 방법)은 당해 기술 분야에 공지된 공정에 따라, 예를 들어, Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989), Ausubel et al. ("Current Protocols in Molecular Biology." Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992), 및 Harlow and Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988)에 기재된 공정에 따라 수행되며, 이들 문헌 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0177] 해당 타겟 단백질에 항체의 결합은 당해 기술 분야에 공지된 방법으로 측정할 수 있다. 해당 타겟에 대한 단일클론 항체의 결합은 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 측정으로 측정한다. 이러한 측정은 바람직하게는 참조예 1에서 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23에 대해 예시된 바와 같이 Biorad ProteOn XPR36 시스템 및 Biorad GLC 센서칩을 이용해 수행된다.

[0178] 본 발명에 따른 서열의 서열 정렬은 BLAST 알고리즘 (Altschul et al.(1990) "Basic local alignment search tool." Journal of Molecular Biology 215. p. 403-410.; Altschul et al.: (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)을 이용해 수행된다. 바람직하게는, 다음과 같은 파라미터들이 사용된다: 최고 타겟 서열 10; 문자 크기 3; BLOSUM 62 매트릭스; 갭 코스트 (gap cost): 존재 (existence) 11, 연장 (extension) 1; 조건 구성 스코어 매트릭스 조정

(conditional compositional score matrix adjustment). 따라서, 서열과 관련하여 사용되는 경우, "동일성" 또는 "동일한" 등의 용어는 BLAST 알고리즘을 이용해 수득되는 동일성 값을 의미한다.

[0179] 본 발명에 따른 단일클론 항체는, 비-제한적인 예로 Siegel DL ("Recombinant monoclonal antibody technology." Transfus Clin Biol. 2002 Jan;9(1):15-22)에 언급된 방법 등의 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 항체는 Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ)에 기탁번호 DSM ACC3142로 기탁된 하이브리도마 세포주 B1-23에 의해 생산된다. 기탁은 2011년 9월 29일자에 행해졌다.

[0180] 세포 증식은 (비-제한적인 예로) 비주얼 현미경 (visual microscopy), 미토콘드리아 레독스 전위를 측정하는 분석 (예, MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드) 분석; Alamar Blue® 분석으로도 알려져 있는 레사주린 염색)과 같은 대사 분석, 공지된 내인성 증식 바이오마커 (예, Ki-67)의 염색 및 세포 DNA 합성을 측정하는 방법 (예, BrdU 및 [^{3}H]-티미딘 병합 분석) 등의, 당해 기술 분야에 공지된 적절한 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0181] 인간 GDF-15 (hGDF-15)의 수준은 (비-제한적인 예로) 인간 GDF-15로부터 유래된 단백질 또는 펩타이드에 대한 질량 분광측정, 인간 GDF-15에 특이적인 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅, 인간 GDF-15에 특이적인 항체를 이용한 유세포 측정, 인간 GDF-15에 특이적인 항체를 이용한 스트립 검사 또는 인간 GDF-15에 특이적인 항체를 이용한 면역세포화학법 등의 방법에 의한 hGDF-15 단백질의 수준 측정을 비롯하여, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 방법으로 측정할 수 있다. hGDF-15 혈청 수준을 측정하는 다른 방법은 GDF-15에 대한 항체를 이용한 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA)에 의한 hGDF-15 혈청 수준의 측정이다. 이러한 ELISA 방법은 실시예 1에서 예시된다. 다른 구현예로, hGDF-15 혈청 수준은 GDF-15에 대한 항체를 이용한 공지된 전기화학발광 면역분석에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, Roche Elecsys® 기법이 이러한 전기화학발광 면역분석에 사용될 수 있다.

[0182] 본 발명의 조성물 제조

[0183] 본 발명에 따른 조성물은 약학적 조성물의 공지된 제조 표준 방법에 따라 제조된다.

[0184] 예를 들어, 조성물은 예를 들어, 담체, 부형제 또는 안정화제 등의 약제학적으로 허용가능한 성분을 이용함으로써 이를 보관하고 적절하게 투여할 수 있는 방식으로 제조된다.

[0185] 이러한 약제학적으로 허용가능한 성분들은 환자에게 약학적 조성물을 투여하는 경우에 사용되는 함량에서는 유해하지 않다. 약학적 조성물에 첨가되는 약제학적으로 허용가능한 성분은 조성물에 존재하는 저해제의 화학적 특성 (예, 저해제가 항체, siRNA 헤어핀 구조체 또는 짧은 간섭 RNA인지에 따라), 약학적 조성물의 구체적인 의도된 용도 및 투여 경로에 따라 결정될 수 있다.

[0186] 일반적으로, 본 발명에 연계하여 사용되는 약제학적으로 허용가능한 성분은 당해 기술 분야에서 이용가능한 지식에 따라, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20th edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA에 따라 사용된다.

[0187] 이들 방법에 사용하기 위한 치료학적 방법 및 제품

[0188] 본 발명은 전술한 바와 같이 사용하기 위한 hGDF-15 저해제에 관한 것이다.

[0189] 또한, 이들 hGDF-15 저해제 및 이의 용도에 따라, 본 발명은 대응되는 치료학적 방법에 관한 것이다.

[0190] 이에, 일 구현예에서, 본 발명은 인간 환자에게 hGDF-15 저해제를 투여하는 단계를 포함하는 인간 환자에서 고형 암내 $CD8^{+}$ T 세포의 %를 높이는 방법에 관한 것이다.

[0191] 또 다른 구현예에서, 본 발명은, 인간 환자에 hGDF-15 저해제를 투여하는 단계 및 인간 환자에게 면역 체크포인트 차단제를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 환자에서 면역 체크포인트 차단제에 의한 고형 암의 치료 방법에 관한 것이다.

[0192] 이들 방법에 대한 바람직한 구현예들은 본 발명에 따라 사용하기 위한 hGDF-15 저해제들에 대해서 상기와 같이 정의된다.

[0193] 상기 방법, 사용하기 위한 hGDF-15 저해제, 키트, 조성물 또는 사용 조성물에 대한 다른 구현예에서, hGDF-15 저해제는 암에 대해 약제학적으로 활성인 단독 성분이다.

[0194] 상기 방법, 사용하기 위한 hGDF-15 저해제, 키트, 조성물 또는 사용 조성물에 대한 다른 구현예에서, hGDF-15 저해제 및 면역 체크포인트 차단제는 암에 대해 약제학적으로 활성인 단독 성분이다.

[0195] 상기 방법, 사용하기 위한 hGDF-15 저해제, 키트, 조합, 조성물 또는 사용 조성물에 대한 다른 구현예에서, hGDF-15 저해제는 암에 대해 약제학적으로 활성인 또 다른 하나 이상의 성분과 조합하여 사용된다. 이 구현예에 대한 일 측면에서, 암에 대해 약제학적으로 활성인 또 다른 하나 이상의 성분은 공지된 항암제 및/또는 면역-자극 분자이다. 공지된 항암제로는 시스플라틴 (cisplatin), 카보플라틴 (carboplatin), 옥살리플라틴 (oxaliplatin), 메클로르에타민 (mechlorethamine), 사이클로포스파미드 (cyclophosphamide), 클로람부실 (chlorambucil) 및 이포스파미드 (ifosfamide)와 같은 알킬화제; 아자티오프린 (azathioprine) 및 머캅토푸린과 같은 항-대사산물제; 빈카 알카로이드 (예, 빈크리스틴 (vincristine), 빈블라스틴 (vinblastine), 비노렐빈 (vinorelbine) 및 빈데신 (vindesine)), 탁산 (예, 파클리탁셀, 도세탁셀 (docetaxel)), 에토포시드 (etoposide) 및 테니포시드 (teniposide)와 같은 알카로이드; 캄프토테신 (camptothecin) (예, 이리노테칸 (irinotecan) 및 토포테칸 (topotecan))과 같은 토포이소머라제 저해제; 액티노마이신 (actinomycin), 안트라사이클린 (anthracycline), 독소루비신, 다우노루비신 (daunorubicin), 발루비신 (valrubicin), 이다루비신 (idarubicin), 에피루비신 (epirubicin), 블레오마이신 (bleomycin), 플리카마이신 (plicamycin) 및 미토마이신 (mitomycin)과 같은 세포독성 항생제; 및 방사성동위원소 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 암에 대해 약제학적으로 활성인 하기 성분들이 hGDF-15 저해제와 조합하여 사용되는 것이 특히 바람직하다: 면역자극 분자로는 anti-LAG-3, anti-B7H3, anti-TIM3, anti-VISTA, anti-TIGIT, anti-KIR, anti-CD27, anti-CD137, anti-Ox40, anti-4-1BB, anti-GITR, anti-CD28, anti-CD40 또는 IDO-저해제 등이 있다. 또한, anti-Her2, anti-EGFR, anti-Claudin 또는 이의 글리코-최적화된 석세서 (glyco-optimized successor)와 같은 다른 항체 치료제 역시, 예를 들어, hGDF-15 저해제에 의해 유발되는 고형 암에서 강화된 면역 세포 침윤으로 인해, hGDF-15 저해제와의 조합이 유익할 것이므로, 특히 바람직하다. 마찬가지로, 백신 접종법 (예, 펩타이드 또는 수지상 세포) 또는 입양 세포 요법, 종양-반응성 T 세포 또는 수지상 세포 역시, hGDF-15 저해제와의 조합이 유익할 것이므로, 특히 바람직하다. 또한, 다음과 같은 치료제들 역시 hGDF-15 저해제와 상승작용할 것이므로, 특히 바람직하다:

[0196] · 종양 및 면역 세포에 대해 하나 이상의 특이성을 가진 항체 또는 항체-유사 분자를 이용한 치료 (예, Bites, DARTS, DARPINS, Catumaxomab);

[0197] · 예를 들어, IMA901, ISA203와 같은 멀티-펩타이드 백신 또는 RNA-기반의 백신 (예,CV9104)을 이용한, 종양-조합된 펩타이드에 대한 백신-기반의 면역요법에 의한 치료, 및/또는

[0198] · 면역 세포-활성화 물질 (예, 대식세포를 활성화하기 위한 FAA 유도체 또는 Toll-유사 수용체에 대한 리간드, 예를 들어, SLP-AMPLIVANT 컨쥬게이트)을 이용한 치료.

[0199] 본 발명에 따라 사용하기 위한 조합

[0200] 본 발명은 인간 환자에서 고형 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합을 포함하며, 여기서 hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제는 인간 환자에게 투여된다. 이들 조합 및 이의 바람직한 구현예들은 상기에 정의된 바와 같이 정의된다.

[0201] hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합은 함께 또는 별도로 투여될 수 있다.

[0202] 예를 들어, 바람직한 일 구현예에서, hGDF-15 저해제의 투여는 면역 체크포인트 차단제의 투여 개시 전에 개시된다. 이러한 설정은 고형 암내 T 세포의 %, 특히 $CD8^+$ T 세포의 %를 높이는데 유리하여, 고형 암내 $CD8^+$ T 세포의 출발 % 증가로 인해, 면역 체크포인트 차단제를 이용한 후속적인 치료가 효과적일 수 있다.

[0203] 키트

[0204] 본 발명은 또한 전술한 바와 같이 정의되는 hGDF-15 저해제와 하나 이상의 면역 체크포인트 차단제를 포함하는 키트를 제공한다.

[0205] hGDF-15 저해제와 하나 이상 또는 전체 면역 체크포인트 차단제는 개별 용기에 또는 하나의 용기에 수용될 수 있다.

[0206] 사용되는 용기는 hGDF-15 저해제 및/또는 하나 이상의 면역 체크포인트 차단제를 보관하기에 적합한 임의 유형의 용기일 수 있다. 이러한 용기에 대한 비-제한적인 예는 바이얼과 사전 충전된 주사기이다.

[0207] 키트는, hGDF-15 저해제 및 하나 이상의 면역 체크포인트 차단제 외에도, 치료 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 암에 대한 약제학적으로 활성인 하나 이상의 다른 성분을 포함할 수 있다. 암에 대한 약제학적으로 활성인 하나 이상의 다른 성분은 상기에서와 같이 정의될 수 있다. 이러한 암에 대한 약제학적으로 활성인 다른 성분은 hGDF-15 저해제 및 하나 이상의 면역 체크포인트 차단제와 함께 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.

[0208] 바람직하게는, 본 발명에 따른 키트는 사용 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0209] 서열

[0210] 본 발명에서 언급되는 아미노산 서열은 다음과 같다 (N-말단에서 C-말단 방향; 단문자 아미노산 코드로 표시됨):

[0211] 서열번호 1 (단일클론 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 폴리펩타이드 서열로부터 유래되는 FR1, CDR1, FR2, CDR2 및 FR3 영역을 포함하는 중쇄 가변성 도메인 영역):

[0212] QVKLQQSGPGILQSSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYC

[0213] 서열번호 2 (단일클론 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 폴리펩타이드 서열로부터 유래되는 FR1, CDR1, FR2, CDR2 및 FR3 영역을 포함하는 경쇄 가변성 도메인 영역):

[0214] DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC

[0215] 서열번호 3 (단일클론 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 중쇄 CDR1 영역 펩타이드 서열):

[0216] GFSLSTSGMG

[0217] 서열번호 4 (단일클론 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 중쇄 CDR2 영역 펩타이드 서열):

[0218] IYWDDDK

[0219] 서열번호 5 (단일클론 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 중쇄 CDR3 영역 펩타이드 서열):

[0220] ARSSYGAMDY

[0221] 서열번호 6 (단일클론 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 경쇄 CDR1 영역 펩타이드 서열):

[0222] QNVGTN

[0223] 단일클론 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 경쇄 CDR2 영역 펩타이드 서열:

[0224] SAS

[0225] 서열번호 7 (단일클론 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 경쇄 CDR3 영역 펩타이드 서열):

[0226] QQYNNFPYT

[0227] 서열번호 8 (재조합 성숙 인간 GDF-15 단백질):

[0228] GSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

[0229] 서열번호 9 (인간 GDF-15 전구체 단백질):

[0230] MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

[0231] 서열번호 10 (인간 GDF-15 전구체 단백질 + N-말단 및 C-말단 GSGS 링커):

[0232] GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCIGSGSGSG

[0233] 서열번호 11 (Flag 펩타이드): DYKDDDDKGG

[0234] 서열번호 12 (HA 펩타이드): YPYDVPDYAG

[0235] 서열번호 13 (인간 GDF-15로부터 유래된 펩타이드): ELHLRPQAARGRR

[0236] 서열번호 14 (인간 GDF-15로부터 유래된 펩타이드): LHLRPQAARGRRR

[0237] 서열번호 15 (인간 GDF-15로부터 유래된 펩타이드): HLRPQAARGRRRA

[0238] 서열번호 16 (인간 GDF-15로부터 유래된 펩타이드): LRPQAARGRRRAR

[0239] 서열번호 17 (인간 GDF-15로부터 유래된 펩타이드): RPQAARGRRRARA

[0240] 서열번호 18 (인간 GDF-15로부터 유래된 펩타이드): PQAARGRRRARAR

[0241] 서열번호 19 (인간 GDF-15로부터 유래된 펩타이드): QAARGRRRARARN

[0242] 서열번호 20 (인간 GDF-15로부터 유래된 펩타이드): MHAQIKTSLHRLK

[0243] 서열번호 25 (B1-23에 결합하는 GDF-15 에피토프의 일부를 포함하는 GDF-15 펩타이드):

[0244] EVQVTMCIGACPSQFR

[0245] 서열번호 26 (B1-23에 결합하는 GDF-15 에피토프의 일부를 포함하는 GDF-15 펩타이드):

[0246] TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

[0247] 본 발명에 언급된 핵산 서열은 다음과 같다 (5'에서 3' 방향; 표준 핵산 코드에 따라 표시됨):

[0248] 서열번호 21 (서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 뉴클레오티드 서열):

[0249] CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGTACTTCTGGTATG
GGTGTGAGCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACCCAACCCTGAAGAGCCGG
CTCACAATCTCCAAGGATCCCTCCAGAAACCAGGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGT

[0250] 서열번호 22 (서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 뉴클레오티드 서열):

[0251] GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTGGCC
TGGTTTCTACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTTATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGT

[0252] 서열번호 23 (서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 뉴클레오티드 서열):

[0253] GCTCGAAGTTCCTACGGGGCAATGGACTAC

[0254] 서열번호 24 (서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 뉴클레오티드 서열):

[0255] CAGCAATATAACAACTTTCCGTACACG

[0256] 추가의 아미노산 서열들은 다음과 같다 (N-말단에서 C-말단 방향; 단문자 아미노산 코드로 표시됨):

[0257] 서열번호 27 (H1L5 인간화된 B1-23 anti-GDF-15 항체의 중쇄 아미노산 서열):

[0258] QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTITKDPSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARSSY
GAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0259] 서열번호 28 (H1L5 인간화된 B1-23 anti-GDF-15 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0260] QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTITKDPSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARSSY
GAMDYWGQGTLVTVSS

[0261] 서열번호 29 (H1L5 인간화된 B1-23 anti-GDF-15 항체의 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열):

[0262] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0263] 서열번호 30 (H1L5 인간화된 B1-23 anti-GDF-15 항체의 경쇄의 아미노산 서열):

[0264] DIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTEFTLTISSLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGT
KLEIKRAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

[0265] 서열번호 31 (H1L5 인간화된 B1-23 anti-GDF-15 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0266] DIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTEFTLTISSLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGT
KLEIKR

[0267] 서열번호 32 (H1L5 인간화된 B1-23 anti-GDF-15 항체의 경쇄 불변 도메인의 아미노산 서열):

[0268] APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

[0269] 서열번호 33 (키메라 B1-23 anti-GDF-15 항체의 중쇄의 아미노산 서열):

[0270] QVKLQQSGPGILQSSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSY
GAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0271] 서열번호 34 (키메라 B1-23 anti-GDF-15 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0272] QVKLQQSGPGILQSSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSY
GAMDYWGQGTSVTVSS

[0273] 서열번호 35 (키메라 B1-23 anti-GDF-15 항체의 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열):

[0274] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0275] 서열번호 36 (키메라 B1-23 anti-GDF-15 항체의 경쇄의 아미노산 서열):

[0276] DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0277] 서열번호 37 (키메라 B1-23 anti-GDF-15 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0278] DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGT
KLEIKRTVA

[0279] 서열번호 38 (키메라 B1-23 anti-GDF-15 항체의 경쇄 불변 도메인의 아미노산 서열):

[0280] APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

[0281] 서열번호 39 (01G06 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0282] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQAPGQSLEWMGQINPNNGLIFFNQKFQGRVTLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREAIT
TVGAMDYWGQGTLVTVSS

[0283] 서열번호 40 (01G06 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0284] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENLHNYLAWYQQKPGKSPKLLIYDAKTLADGVPSRFSGSGSGTDY

[0285] TLTISSLQPEDFATYYCQHFWSDPYTFGQGTKLEIK

[0286] 서열번호 41 (03G05 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0287] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVNQRPGQGLEWIGDINPSNGRSKYNEKFKNKATMT

[0288] ADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVLDGAMDYWGQGTSVTVSS

[0289] 서열번호 42 (03G05 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0290] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGS

[0291] GTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGSKLEIK

[0292] 서열번호 43 (04F08 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0293] QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTYGMGVTWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTI

[0294] SKDTSNNQVFLKITSVDTADTATYYCAQTGYSNLFAYWGQGTLVTVSA

[0295] 서열번호 44 (04F08 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0296] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKLGQSPKTLIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF

[0297] TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGTKLEIK

[0298] 서열번호 45 (06C11 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0299] QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLNTYGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTI

[0300] SKDASNNRVFLKITSVDTADTATYYCAQRGYDDYWGYWGQGTLVTISA

[0301] 서열번호 46 (06C11 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0302] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF

[0303] ILTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELK

[0304] 서열번호 47 (08G01 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0305] EVLLQQSGPEVVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGEINPNNGGTFYNQKFKGKATLT

[0306] VDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGTSVTVSS

[0307] 서열번호 48 (08G01 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0308] DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTQY

[0309] SLKINSLQPEDFGSYYCQHFWSSPYTFGGGTKLEIK

[0310] 서열번호 49 (14F11 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0311] QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWLADIWWDDDKYYNPSLKSRLTI

[0312] SKDTSSNEVFLKIAIVDTADTATYYCARRGHYSAMDYWGQGTSVTVSS

[0313] 서열번호 50 (14F11 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0314] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSPSYRYSGVPDRFTGSGSGTDF

[0315] TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPHTFGGGTKLEMK

[0316] 서열번호 51 (17B11 항체의 중쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0317] QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHNDWDDDKRYKSSLKSRLTI

[0318] SKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARRVGGLEGYFDYWGQGTTLTVSS

[0319] 서열번호 52 (17B11 항체의 경쇄 가변성 도메인의 아미노산 서열):

[0320] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSRFSYMHWFQQKPGQAPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGS

[0321] GTDFTLNIHPVEGEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

[0322] **실시예**

[0323] 참조예 1 - 3은 본 발명에 따른 조성물, 키트, 방법 및 용도에 사용될 수 있는 hGDF-15 저해제를 예시한다. 이 hGDF-15 저해제는 WO 2014/049087에 공지된 단일클론 항체이며, 문헌의 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0324] **참조예 1**: GDF-15 항체 B1-23 제조 및 특징 규명

[0325] 항체 B1-23를 GDF-15 넉아웃 마우스에서 구축하였다. 재조합 인간 GDF-15 (서열번호 8)을 면역원으로 사용하였다.

[0326] mAb-B1-23를 생산하는 하이브리도마 세포주 B1-23는, 독일 97070 뷔츠부르크 산데링 2 율리우스-막시밀리안스-유니버시티트 뷔츠부르크에 의해, 부다페스트 조약 하에 Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ)에 기탁번호 DSM ACC3142로 기탁되었다.

[0327] 상업적으로 이용가능한 검사 스트립 시스템을 사용해, B1-23를 IgG2a (kappa 체인) 이소형으로서 동정하였다. 표면 플라스몬 공명 측정을 이용해, 해리 상수 (Kd)를 다음과 같이 측정하였다:

[0328] 본 발명에 따른 단일클론 anti-인간-GDF-15 항체 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 결합성을, Biorad ProteOn XPR36 시스템 및 Biorad GLC 센서 칩을 이용한 표면 플라스몬 공명 측정을 이용하여 측정하였다:

[0329] 바이오센서를 제조하기 위해, 재조합 성숙형 인간 GDF-15 단백질을 플로우 셀 1 및 2에 고정하였다. 하나의 플로우 셀에는, 베큘로바이러스-형질감염된 곤충 세포 (HighFive 곤충 세포)로부터 유래된 재조합 GDF-15을, 다른 셀에는 E. coli에서의 발현으로부터 유래된 재조합 단백질을 사용하였다. Sulfo-NHS (N-하이드록시설포숙신이미드) 및 EDC (1-에틸-3-[3-다이메틸아미노프로필]카르보디이미드하이드로클로라이드) (Biorad ProteOn Amine Coupling Kit)를 제조사의 권고에 따라 사용하여 GLC 센서 칩을 활성화한 다음 센서 표면에 약 600RU (1Ru = 1pg mm^{-2}) 이하의 밀도로 단백질을 로딩하였다. 1M 에탄올아민 pH8.5를 관류하여 반응하지 않은 커플링 기들을 퀀칭시키고, 칩에 런닝 완충제 (10M HEPES, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005% Tween-20, pH 7.4, HBS150로 지칭됨)를 관류시켜 바이오센서를 평형화하였다. 대조군으로서 2개의 플로우 셀을 사용하였으며, 하나는 단백질 커플링을 하지 않은 빈 것이며, 다른 하나는 동일한 커플링 화학 및 동일한 커플링 밀도를 이용해 고정시킨 비-생리학적 단백질 파트너 (인간 인터루킨-5)의 커플링이다. 상호작용을 측정하기 위해, anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23를 HBS150에 용해하고, 분석물로서 6가지 다른 농도로 사용하였다 (농도: 0.4, 0.8, 3, 12, 49 및 98 nM). 분석물을, 간헐적인 재생을 방지하기 위해 원-샷 카이네틱스 셋업을 이용해 바이오센서 상에 분석물을 관류시켰으며, 모든 측정은 25℃에서 유속 100㎕ min^{-1}에서 수행하였다. 프로세싱을 위해, 모든 다른 SPR 데이타에서 빈 플루오 셀 (플루오 셀 3)의 SPR 데이타를 제하여, 센서 매트릭스에 대한 벌크 페이스 효과 및 비-특이적인 결합을 제거하였다. 입수한 센소그램을 소프트웨어 ProteOn Manager version 3.0을 사용해 분석하였다. 결합 카이네틱스를 분석하기 위해, 1:1 Langmuir-타입의 상호작용을 추정하였다. 결합 속도 상수 값 $5.4\pm0.06x10^{5}$ $M^{-1}s^{-1}$ (k_{on}) 및 해리 속도 상수 값 $4.3\pm0.03x10^{-4}$ s^{-1} (k_{off})을 측정할 수 있었다 (이들 값들은 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23과 곤충 세포 발현으로부터 유래된 GDF-15와의 상호작용에 대한 것임). 평형 해리 상수를 등식 $K_D = k_{off}/k_{on}$으로 계산하여, 약 790pM 값을 산출하였다. E. coli 발현으로부터 유래된 GDF-15와 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 상호작용에 대한 친화성들은 2배 미만의 차이가 있으며, 곤충 세포 유래 GDF-15와 E.coli 유래 GDF-15 간의 속도 상수는 약 45% 차이를 보이며, 즉 SPR 측정의 정확도 범위내이며, 친화성에 실제 차이를 반영하지 않을 가능성이 있다. 사용 조건에서는, anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23는 인간 인터루킨-5에 결합하지 않는 것으로 보이며, 즉 상호작용 데이타와 anti-인간 GDF-15 mAb-B1-23의 특이도가 검증된다.

[0330] (베큘로바이러스-형질감염된 곤충 세포에서 발현된) 재조합 인간 GDF-15의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0331] GSARNGDHCP LGPGRCCRLH TVRASLEDLG WADWVLSPRE VQVTMCIGAC PSQFRAANMH AQIKTSLHRL KPDTVPAPCC VPASYNPMVL IQKTDTGVSL QTYDDLLAKD CHCI (서열번호 8)

[0332] 이에, 표면 플라스몬 공명 측정법을 이용하여, 해리 상수 (Kd) 790pM을 측정하였다. 비교로서: 치료학적으로 사

용되는 항체인 리툭시맵은 유의하게 낮은 친화도를 가진다 (Kd = 8 nM).

[0333] mAb B1-23가 암 세포의 증식을 시험관내에서 저해하고, mAb B1-23가 종양의 증식을 생체내에서 저해한다는 것은 종래에 입증되었다 (WO2014/049087).

[0334] **참조예 2:** mAb B1-23는 인간 GDF-15의 입체형태적 또는 불연속 에피토프를 인지한다.

[0335] 에피토프 맵핑: GDF-15로부터 유래된 13mer 선형 펩타이드에 대한 단일클론 마우스 항체 GDF-15

[0336] 항원: GDF-15:

[0337] **GSGSGSG**MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRL GSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARA RNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDD LLAKDCHCI**GSGSGSG** (링커를 가진 322개의 아미노산)(서열번호 10)

[0338] 단백질 서열을 아미노산 하나가 쉬프트된 13mer 펩타이드로 번역하였다. 절단형 펩타이드를 방지하기 위해 C-말단 및 N-말단을 중성 GSGS 링커를 사용해 연장하였다 (진한 글자).

[0339] 대조군 펩타이드:

[0340] Flag: DYKDDDDKGG (서열번호 13), 78 spots; HA: YPYDVPDYAG (서열번호 14), 78 spots (각 어레이 카피)

[0341] 펩타이드 칩 식별인자:

[0342] 000264_01 (10/90, Ala2Asp linker)

[0343] 염색 조건:

[0344] 표준 완충제: PBS, pH 7.4 + 0.05% Tween 20

[0345] 차단 완충제: 록클랜드 차단 완충제 MB-070

[0346] 인큐베이션 완충제: 표준 완충제 + 10% 록클랜드 차단 완충제 MB-070

[0347] 1차 샘플: 단일클론 마우스 항체 GDF-15 (1 ㎍/㎕): 인큐베이션 완충제내에서 1:100 희석율로 16시간 동안 4℃에서 500 rpm으로 약하게 교반하면서, 염색.

[0348] 2차 항체: 염소 anti-mouse IgG (H+L) IRDye680, 30분간 실온 (RT)에서 1:5000 희석하여 인큐베이션 완충제내에서 염색.

[0349] 대조군 항체: 단일클론 anti-HA (12CA5)-LL-Atto 680 (1:1000), 단일클론 anti-FLAG(M2)-FluoProbes752 (1:1000); 1시간 동안 RT에서 인큐베이션 완충제내에서 염색.

[0350] 스캐너:

[0351] Odyssey Imaging System, LI-COR Biosciences

[0352] 설정: 오프셋: 1mm; 해상도: 21 ㎛; 강도 녹색/적색: 7/7

[0353] 결과:

[0354] 표준 완충제내에서 30분간 및 차단 완충제내에서 30분간 사전-팽윤 후, 10, 12 및 15mer B7H3-유래된 선형 펩타이드가 탑재된 펩타이드 어레이를 실온에서 1시간 동안 1:5000 희석 비율로 2차 염소 anti-mouse IgG (H+L) IRDye680 항체 단독과 함께 인큐베이션하여, 2차 항체의 백그라운드 상호작용을 분석하였다. PEPperCHIP®을 표준 완충제로 2x1분 세척하고, 증류수로 헹군 다음 공기 중에 건조하였다. 리드-아웃은 Odyssey Imaging System을 해상도 21 ㎛ 및 청색/적색 강도 7/7의 조건에서 수행하였다: 탑재된 항체 염료와의 이온성 상호작용으로 인해, 일반적인 결합제 (frequent binder)로서 알려진 아르기닌-리치 펩타이드 (ELHLRPQAARGRR (서열번호 15), LHLRPQAARGRRR (서열번호 16), HLRPQAARGRRRA (서열번호 17), LRPQAARGRRRAR (서열번호 18), RPQAARGRRRARA (서열번호 19), PQAARGRRRARAR (서열번호 20) 및 QAARGRRRARARN (서열번호 21))와 베이직 펩타이드 MHAQIKTSLHRLK (서열번호 22)와의 약한 상호작용이 관찰되었다.

[0355] 표준 완충제내에서 10분간 사전-팽윤시킨 후, 펩타이드 마이크로어레이를 단일클론 마우스 항체 GDF-15와 1:100 비율로 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 표준 완충제에서 반복 세척 (2x1분)한 다음 2차 항체를 1:5000 비

율로 첨가하여 실온에서 30분간 인큐베이션하였다. 표준 완충제로 2x10초 세척하고, 증류수로 간단하게 헹군 후, PEPperCHIP®을 공기 중에 건조하였다. 대조군 펩타이드의 anti-HA 및 anti-FLAG(M2) 항체에 의한 염색 전과 염색 후, Odyssey Imaging System을 사용해 리드-아웃을 해상도 21 ㎛ 및 청색/적색 강도 7/7의 조건에서 수행하였다.

[0356] GDF-15에서 유래된 선형 13mer 펩타이드들 모두 과조절된 강도에서도 단일클론 마우스 항체 GDF-15와 상호작용하지 않는 것으로 확인되었다. 그러나, 어레이에 탑재된 Flag 및 HA 대조군 펩타이드의 염색에서는 양호하고, 균질한 스폿 세기가 나타났다.

[0357] 종합:

[0358] 항원으로부터 유래된 13mer 펩타이드들을 이용한 GDF-15에 대한 단일클론 마우스 GDF-15 항체의 에피토프 맵핑에서, 어떠한 선형 에피토프도 밝혀지지 않았다. 이 결과에 따르면, 단일클론 마우스 항체 GDF-15은 입체형태적 또는 불연속 에피토프를 인지하며 부분 에피토프에 대한 친화성이 낮을 가능성이 높다. 2차 항체 단독의 백그라운드 염색 보다 강한 임의의 GDF-15 신호가 명확하게 없어, PepSlide® 분석기를 이용한 스폿의 세기 정량과 후속적인 펩타이드 주석은 생략하였다.

[0359] **참조예 3**: 질량 분광측정 에피토프 적출 (epitope excision) 및 에피토프 추출 (epitope extraction)에 의한 펩타이드 리간드 에피토프의 구조적 동정

[0360] 항체 B1-23에 결합하는 재조합 인간 GDF-15의 에피토프를 에피토프 적출 방법 및 에피토프 추출 방법을 이용하여 동정하였다 (Suckau et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 December; 87(24): 9848-9852.; R.Stefanescu et al., Eur.J.Mass Spectrom. 13, 69-75 (2007)).

[0361] 항체 컬럼을 제조하기 위해, 항체 B1-23를 NHS-활성화된 6-아미노헥사노익산 커플링된 세파로스에 첨가하였다. 세파로스-커플링된 항체 B1-23를 이후 0.8 ml 마이크로컬럼에 로딩하고, 차단 완충제와 세척 완충제로 헹구었다.

[0362] 에피토프 추출 실험:

[0363] 재조합 인간 GDF-15을 (용액 중에) 37℃에서 2시간 동안 트립신 처리하여 절단하여, 단백질내 트립신 절단부에 따라 여러가지 펩타이드를 수득하였다. 절단 완료 후, 펩타이드를 항체 B1-23가 고정된 친화성 컬럼에 로딩하였다. GDF-15의 비-결합 펩타이드와 잠재적으로 결합 펩타이드를 질량 분광측정 분석으로 분석하였다. 질량 분광측정을 이용한 펩타이드 동정은 가능하지 않았다. 이는, 면역 복합체 B1-23에서 GDF-15의 결합부가 불연속 또는 입체형태적 에피토프를 포함한다는 또 다른 지표이었다. 연속적인 선형 에피토프일 경우, 에피토프 펩타이드에 트립신 절단부가 존재하지 않는다면 절단된 펩타이드는 이의 상호작용 파트너와 결합하여야 한다. 불연속 또는 입체형태적 에피토프는, 아래에 기술된 에피토프 적출 방법에 의해 검증할 수 있었다.

[0364] 에피토프 적출 실험:

[0365] 친화성 컬럼 상에 고정된 항체 B1-23를 2시간 동안 재조합 GDF-15와 인큐베이션하였다. 이후, 친화성 컬럼 상에서 형성된 면역 복합체를 트립신과 함께 2시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 절단 결과 재조합 GDF-15에서 파생된 여러가지 펩타이드가 생성되었다. 고정된 항체 자체는 단백질 분해에 안정적이다. 항체에 의해 차폐되어 단백질 분해로부터 보호된 절단된 GDF-15 단백질의 수득한 펩타이드를 산성 조건 (TFA, pH2)에서 용출시켜, 수집하고, 질량 분광측정에 의해 동정하였다.

[0366] MS/MS 동정을 이용한 에피토프 적출 방법으로 하기 펩타이드들을 수득하였다:

[0367] 펩타이드 서열내 위치 질량 이온/전하

[0368] EVQVTMCIGACPSQFR 40-55 1769.91 590.50(3+)

[0369] (서열번호 25)

[0370] TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI 94-114 2310,96 771:33(3+)

[0371] (서열번호 26)

[0372] 항체 B1-23에 결합하는 인간 GDF-15의 영역은 불연속 또는 입체형태적 에피토프를 포함한다. 질량 분광측정에서 GDF-15 단백질에서 면역 복합체 형성에 기여하는, 2개의 펩타이드가 동정되었다. 이 펩타이드는 GDF-15 아미노

산 서열에서 위치 40-55 (EVQVTMCIGACPSQFR) 및 94-114 (TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI)으로 한정된다. 즉, 이들 2종의 펩타이드는 항체 B1-23에 결합하는 GDF-15 단백질의 에피토프를 포함한다.

[0373] 본 발명은 비-제한적인 하기 실시예들에 의해 예시된다:

[0374] **실시예 1:** 이필리무맵 (단일클론 anti-CTLA4 항체)으로 기존에 치료를 받았지만 완전 관해엔 실패하고, 펨브롤리주맵 (단일클론 anti-PD-1 항체)으로 치료받은, 인간 흑색종 환자에서, hGDF-15 혈청 수준은 펨브롤리주맵을 이용한 치료 개시 후 4개월간 어느 시점의 치료 반응 불량과 연관되어 있다.

[0375] 본 발명자들은, 면역 체크포인트 차단제를 복용 중인 암 환자에게 hGDF-15의 저해가 유익할 수 있는지를 조사하기 위해 착수하였다. 그럴 가능성을 조사하기 위해, 이필리무맵 (단일클론 anti-CTLA4 항체)으로 기존에 치료받았었으며 임상 실험에서 펨브롤리주맵 (단일클론 anti-PD-1 항체)으로 치료받는 흑색종 환자의 혈청에서 hGDF-15 혈청 수준을 분석하였다. hGDF-15이 면역 체크포인트 차단제에 대한 환자의 반응에 영향을 미치는 지를 조사하기 위해, 수득한 hGDF-15 혈청 수준을 환자의 반응과 연관시켰다. 펨브롤리주맵을 이용한 치료 전에 환자에서 혈청을 취하였다.

[0376] 본 실험과 이후의 분석을 다음과 같이 수행하였다:

[0377] 임상 실험의 포함 기준:

[0378] 자격 요건이 되는 환자는 18세 이상으로, 국소 요법에 불응성의 적출불가한 III기 또는 IV기 흑색종으로 조직학적으로 또는 세포학적으로 검증되었으며; 마지막 이필리무맵 투약 (최소 2회 투약, 3주 당 1회 3 mg/kg) 24주 이내에 질병 진행이 검증되었으며; 기존에 BRAF 또는 MEK 저해제 요법 또는 둘다 (BRAFV600 돌연변이 양성인 경우)을 받았으며; 필립리무맵-관련 부작용의 해소 또는 등급 0-1로 개선 및 실험 약물의 1차 투여 전 적어도 2주간 프레드니손을 10 mg/일 미만으로 투여받았으며; ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 퍼포먼스 상태가 0 또는 1이고; RECIST v1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, version 1.1)에 따른 측정가능한 수준의 질병을 앓고 있으며; 절대 호중구 수치 (≥1500 세포/mL), 혈소판 (≥100,000 세포/mL), 헤모글로빈 (≥90 g/L), 혈청 크레아티닌 (≤1·5 정상 상한 [ULN]), 혈청 총 빌리루빈 (≤1·5 ULN 또는 총 빌리루빈 농도가 >1·5 ULN인 환자의 경우 다이렉트 빌리루빈 ≤ ULN), 아스파르테이트 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (≤2·5 ULN 또는 간 전이 환자의 경우 ≤5 ULN), 국제 표준 비율 또는 프로트롬빈 시간 (항응고제를 사용하지 않을 경우 ≤1·5 ULN), 및 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 (항응고제를 사용하지 않을 경우 ≤1·5 ULN)에 대해 사전에 명시된 범위내 수치를 가진다. 환자들은 가장 최근 요법의 마지막 투여 시기와 펨브롤리주맵 1차 투여 사이에 4주 이상의 워시아웃 기간 (washout period)을 가졌다. 공지된 활성 뇌 전이 또는 암종 수막염, 활성 자가면역 질환, 전신 요법이 필요한 활성 감염, 기존의 HIV 감염 병력, 활성형 B형 간염바이러스 또는 C형 간염바이러스 감염, 12주 보다 길게 지속되는 4등급 이필리무맵-관련 부작용 또는 3등급 이필리무맵-관련 부작용 병력, 또는 임의의 다른 anti-PD-1 또는 anti-PD-L1 요법을 이용한 이전 치료 병력이 있는 환자는 실험에서 제외시켰다.

[0379] 환자 치료:

[0380] 상기한 포함 기준을 충족시키는 인간 흑색종 환자들은 이미 (2가지 예외 사항을 가짐) 이필리무맵 (단일클론 anti-CTLA4 항체)으로 치료받은 적이 있으며, 완전 반응을 나타내는데 실패하였다. 펨브롤리주맵 (단일클론 anti-PD-1 항체)은 2 mg/(체중) 또는 10 mg/(체중)kg으로 제공되었다. 2가지 치료군들 간에 용량-의존적인 차이가 관찰되지 않아, 치료받은 환자들을 함께 평가하였다.

[0381] 반응 척도:

[0382] 치료에 대한 반응자 및 무-반응자 뿐만 아니라 진행성 반응 (ongoing response)을 RECIST v1.1 (response evaluation criteria in solid tumours, version 1.1)을 이용해 분류하였다 (Eisenhauer et al.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: Eur. J. Cancer. 45, No. 2, January 2009, pp 228-47).

[0383] 효소-연계된 면역흡착 분석에 의한 (ELISA) hGDF-15 혈청 수준 분석:

[0384] 인간 GDF-15 혈청 수준을 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA)에 의해 측정하였다.

[0385] 완충제 및 시약:

[0386] 완충화된 차단 용액: 1% BSA (fraction V pH 7.0, PAA)/PBS

[0387] 세척 용액: PBS-Tween (0.05%)

[0388] 표준: 인간 GDF-15 (원액 농도 120 ㎍/ml, R&D Systems)

[0389] 포획 항체: 인간 GDF-15 MAb (클론 147627), R&D Systems, Mouse IgG2B (catalog #MAB957, R&D Systems, 원액 농도 360 ㎍/ml)

[0390] 검출 항체: 인간 GDF-15 바이오틴화된 친화성 정제한 PAb, Goat IgG (catalog #BAF940, R&D Systems, 원액 농도 9 ㎕/ml)

[0391] 스트렙타비딘-HRP (Catalog #DY998, R&D Systems)

[0392] 기질 용액: 10 ml 0.1 M NaOAc pH6.0 + 100 ㎕ TMB + 2 ㎕ H_2O_2

[0393] 정지 용액: 1 M H_2SO_4

[0394] 분석 절차:

[0395] 1. 혈소판 준비:

[0396] a. 포획 항체를 PBS 중에 워킹 농도 2 ㎍/ml로 희석하였다. 96웰 마이크로플레이트 (Nunc maxisorp®)를 양쪽 끝 열 (A 및 H)을 제외하고는 희석한 포획 항체를 웰 당 50 ㎕로 첨가하여 즉각적으로 코팅하였다. A 및 H 열에는 완충제를 넣어 실험 중에 샘플이 증발되지 않게 하였다. 각 웰의 바닥부가 완전히 덮이도록 플레이트를 가볍게 두들겼다. 플레이트를 가습 챔버에 넣어, 실온 (RT)에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0397] b. 각 웰에서 흡입하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 헹구었다.

[0398] c. 차단 용액 150 ㎕을 각 웰에 첨가한 다음 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0399] d. 각 웰에서 흡입하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 헹구었다.

[0400] 2. 분석 절차:

[0401] a. 표준 물질을 준비하였다. GDF-15을 완충화된 차단 용액에 최종 농도 1 ng/ml (4.17 ㎕ GDF + 496 ㎕ 완충화된 차단 용액)로 희석하였다. 1:2 연속 희석물을 제조하였다.

[0402] b. 두플리케이트 샘플 1:20 (6 ㎕ + 114 ㎕ 완충화된 차단 용액)을 제조하였다.

[0403] c. 희석 샘플 또는 표준 물질 50 ㎕를 각 웰에 첨가한 다음, RT에서 1시간 인큐베이션하였다.

[0404]

	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	St	and	ard					dil	uti	on	s	
G					se	rial						
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0405] a. 각 웰에서 흡인하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 세척하였다.

[0406] b. 검출 항체를 최종 농도 50 ng/ml (56 ㎕ + 10 ml 차단 완충제)로 희석하였다. 각 웰에 검출 항체 희석액 50 ㎕을 첨가한 다음 RT에서 1시간 인큐베이션하였다.

[0407] c. 각 웰에서 흡인하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 세척하였다.

[0408] d. 스트렙타비딘-HRP를 1:200 (50 ㎕ + 10 ml 차단 완충제)으로 희석하였다. 스트렙타비딘-HRP 작업 희석액 50 ㎕를 각 웰에 첨가한 다음 RT에서 20분간 인큐베이션하였다.

[0409] e. 각 웰에서 흡인하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 세척하였다.

[0410] f. 기질 용액을 제조하였다. 기질 용액 50 ㎕를 각 웰에 첨가한 다음 RT에서 20분간 인큐베이션하였다.

[0411] g. 정지 용액 50 ㎕를 각 웰에 첨가하였다.

[0412] h. 450 nm로 설정된 마이크로플레이트 리더를 사용해 즉시 각 웰의 광학 밀도를 측정하였다.

[0413] 3. GDF-15 혈청 역가 계산:

[0414] a. 각 샘플/GDF-15 표준 희석액을 2세트로 사용하였다. GDF-15 역가를 측정하기 위해, 두플리케이트의 평균을 계산하고, 백그라운드 (GDF-15 무첨가 샘플)를 제하였다.

[0415] b. 표준 곡선을 작성하기 위해, 선형 범위의 값들을 X-Y-다이아그램에 피팅하고 (X 축: GDF-15 농도, Y 축: OD450), 선형 곡선 피트를 적용하였다. 농도를 알고있는 표준 희석액들의 OD450 값으로부터 보간함으로써 테스트 샘플의 GDF-15 혈청 역가를 계산하였다.

[0416] c. 샘플의 최종 GDF-15 농도를 계산하기 위해, 개별 희석 인수를 고려하였다. 표준 범위 보다 낮거나 또는 높은 OD 값을 나타낸 샘플들은 적절한 희석 비율에서 재분석하였다.

[0417] hGDF-15 혈청 수준과 환자 데이타의 비교:

[0418] 다음으로, 측정된 hGDF-15 혈청 수준을 실험에서 수득한 환자 반응 데이타와 비교하였다.

[0419] 도 1은 치료 용법에 대한 반응자 및 비-반응자에서의 GDF-15 혈청 수준을 도시한다. 도에서 알 수 있는 바와 같이, 대부분의 비-반응자들은 모든 반응자들에 비해 높은 GDF-15 혈청 수준을 가진다.

[0420] 이 결과는 또한 hGDF-15 혈청 수준이 각각 <1.8 ng/ml, 1.8-4.2 ng/ml 및 >4.2 ng/ml인 환자들에서 반응자와 비-반응자의 수를 도시한 도 2에도 반영된다.

[0421] 이러한 사실들은, 높은 GDF-15 수준이 치료 반응 불량과 관련 있음을 시사한다. 이에, 이들 결과의 통계학적 유의성을 검사하였다:

[0422] hGDF-15 혈청 수준과 환자 데이타의 통계학적 상관관계:

[0423] 데이타:

[0424] 데이타 분석은 컬럼 (변수) 샘플 명, GDF-15 (ng/ml), 반응자/비-반응자, 일수 (사망에 이르기까지의 소요 일 또는 검열시까지의 일수) 및 진행중 (지속되는 수명에 대한 색인 변수)을 포함하여 환자 35명에서 수득한 샘플의 데이타가 포함된 데이타 파일을 토대로 하였다. 이들 데이타의 반응자/비-반응자 분류는 펨브롤리주맵을 이용한 치료 개시 후 4달 중 어느 한 시점에 행하였다. 일부 혈청 샘플들은 분석 직전에서 수득하였기에, 환자 29명에서만 반응을 분석할 수 있었다. 부분 반응 (종양 크기 감소율 >30%)을 반응자로 분류하였다. LDH 측정의 경우, 샘플 4개는 용혈 반응로 인해 제외하여야 하였다.

[0425] 경과 변수 (엔드포인트):

[0426] a. 전체 생존율 (사망 소요 시간). 엔드포인트는 사망 파일에서 유래된 사망 이벤트 지표 (1=사망/0=생존) 및 변수 "일수"에 해당되는 사망 또는 검열시까지의 소요 시간 (환자가 생존한 것으로 인지된 마지막 시기)으로 구성된다.

[0427] b. 치료에 대한 반응, 예를 들어, 환자가 반응자인지 또는 아닌지 (1=반응자, 0=비-반응자로 코드화됨). 부분 반응자는 반응자로 간주하였다.

샘플명	GDF-15 (ng/ml)	LDH[U/l]	반응자/비-반응자	anti PD-1 치료 일수	사전 이필리무맵 치료 유무	진행 중인 반응
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	용혈성	R	176	x	
HG13.516	0.641	342	R	264	x	
HG13.578	2.841	1143	R	266	x	
HG13.596	1.085	용혈성	R	772	x	x
HG13.757	3.310	용혈성	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	용혈성	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	용혈성		23	x	x
HG15.560	2.389	768		21	x	x
HG15.59	8.122	588	NR	23	x	

[0428]

[0429] 데이타 분석:

[0430] 콕스 비례 위험 생존 모델로 전체 생존율을 분석하였다. 한 모델에는 연속형 예측인자로서 GDF-15 (ng/ml)를 피팅하고, 다른 모델에는 범주형 예측인자로서 GDF-15에 기초한 그룹핑 변수를 피팅하였다 (그룹: GDF-15 <1.8 ng/ml, 1.8-4.2 ng/ml, >4.2 ng/ml). 전체적으로, 환자 35명으로부터 생존 데이타를 입수할 수 있었다.

[0431] 이항 에러 분포 및 로짓 연결 함수 (로지스틱 회귀)를 이용한 일반화 선형 모델 (GLM)에 의해 치료 반응 (이항 변수)을 분석하였다. 4달 후 RECIST1.1 기준에 의해 평가된 치료 반응의 경우, 한 모델에는 연속형 예측인자로서 GDF-15 (ng/ml)를 피팅하였다. GDF-15 >4.2 ng/ml인 그룹에서는 환자들이 반응하지 않아, 이 그룹 대 GDF-15 <1.8 ng/ml인 그룹에서의 오즈비 추정은 차이가 매우 크고, 신뢰 구간이 매우 넓었다. 범주형 예측인자로서 GDF-15에 기초한 그룹핑 변수를 다른 모델에 피팅시키는 것 대신, 카이제곱 ($\chi 2$) 검정을 사용해 그룹들을 비교하였다 (반응자의 비율의 균등성 검정). 반응자/비-반응자의 수가 때때로 매우 작아 (< 5), 피셔의 정확도 검정을 이용한 민감도 분석을 또한 수행하였다. 최종 4달 이내에 anti PD-1을 투여받은 환자들은 아직까지 반응자 또는 비-반응자로서 분류할 수 없었다. 그래서, 환자 29명에서만 치료 반응을 평가할 수 있었다.

[0432] 통계학적 소프트웨어 패지키 R (R Core Team, 2014, version 3.1.0)을 사용해 데이타 분석을 수행하였다.

[0433] 결과:

[0434] 표 1-2는 연속형 예측인자로서 GDF-15을 이용하여 모델에서 수득한 결과를 보여준다. 사망 위험은 GDF-15의 농도가 높은 경우에 유의하게 증가 (HR > 1, 표 1)한 반면, 오즈비 (OR) (OR < 1, 표 2)로 표시된 바와 같이 치료 반응 확률은 유의하게 감소하였다. 도 3은 모델에 의해 예측된 치료 반응 확률 뿐만 아니라 반응자/비-반응자에

대한 해당 데이타를 도시한다.

[0435] 표 3은 범주형 예측인자로서 GDF-15에 기반한 그룹을 이용한 콕스 비례 위험 모델의 결과를 보여준다. GDF-15 <1.8 ng/ml인 그룹을 참조군으로 사용한다 (표에 도시 안됨). 표 3에서 2종의 위험비는 GDF-15이 1.8 - 4.2인 그룹과 GDF-15 >4.2인 그룹을 참조군과 비교한 것이다. 사망 위험도는 이들 그룹 둘다에서 (참조군 대비) 증가하지만, GDF-15 >4.2인 그룹에서는 그 정도가 더 크다. 도 4A는 3가지 그룹들의 카플란-마이어 생존 곡선을 보여준다.

[0436] 그룹들 간에 반응자 비율은 유의하게 차이가 있었다 (반응자 1: $\chi^2_{df=2}$= 16.04, P = 0.0003). 이 결과는 피셔의 정확 검정의 결과에 의해 검증되었다 (P=0.0003). 그룹에서 사망자 수와 반응자 수를 표 4에 나타낸다. 또한, 표 5는 각 그룹에서 GDF-15에 대한 기술 통계량 (descriptive statistic)을 나타낸다.

[0437] **표 1**:

[0438]

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

[0439] 표 1은 경과 변수로서 전체 생존율 (사망에 이르기까지의 소요 시간) 및 연속형 예측인자로서 GDF-15을 사용해 콕스 비례 위험 모델에서 수득된 위험비 (HR) 추정치를 나타낸다. 분석에는 환자 35명으로부터 수득한 샘플이 포함되었다.

[0440] **표 2**:

[0441]

	추정치 (OR)	95% CI	z	p
(인터셉트)	25.281	[4.219,364.950]	2.94	0.00324
GDF-15	0.389	[0.159,0.698]	-2.54	0.01120

[0442] 표 2는 경과 변수로서 치료 반응 (반응자 1) 및 연속형 예측인자로서 GDF-15을 이용한 일반화 선형 모델에서 수득된 오즈비 (OR) 추정치를 나타낸다. 분석에는 환자 29명으로부터 수득한 샘플이 포함되었다.

[0443] **표 3**:

[0444]

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

[0445] 표 3은 경과 변수로서 전체 생존율 (사망에 이르기까지의 소요 시간) 및 범주형 예측인자로서 GDF-15을 사용해 콕스 비례 위험 모델에서 수득한 위험비 (HR) 추정치를 나타낸다. 분석에는 환자 35명으로부터 수득한 샘플이 포함되었다.

[0446] **표 4**:

[0447]

변수	수준	$n_{[0,1.8]}$	$\%_{[0,1.8]}$	$n_{(1.8,4.2]}$	$\%_{(1.8,4.2]}$	$n_{(4.2,13]}$	$\%_{(4.2,13]}$	n_{all}	$\%_{all}$
사망	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
	all	18	100.0	11	100.0	6	100.0	35	100.0
반응자 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
	all	14	100.0	9	100.0	6	100.0	29	100.0

[0448] 표 4는 GDF-15에 의해 규정된 3가지 그룹들 (<1.8, 1.8-4.2, >4.2 ng/ml)에서 사망자 수와 반응자 수 ("반응자 1")를 나타낸다.

[0449] **표 5**:

[0450]

변수	수준	n	$\tilde{x}$	$\bar{x}$	s	최저	최대
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
	all	35	1.6	2.6	2.7	0.3	12.0

[0451] **표 5**: GDF-15에 의해 규정된 3가지 그룹들 (<1.8, 1.8-4.2, >4.2 ng/ml)에서 연속형 예측인자 변수 GDF-15 (ng/ml). 환자 수 (n), 중앙값 ($\tilde{x}$), 평균 ($\bar{x}$), 표준 편차 (s), 최저 (Min) 및 최대 (Max)가 열거된다.

[0452] 다음으로, GDF-15 수준에 대해 수득한 통계 결과들을 비교하기 위해, 환자 혈청에서 공지의 예후 예측 인자인 락테이트 데하이드로게나제 (LDH)의 수준에 대해 통계적인 분석을 수행하였다:

[0453] 락테이트 데하이드로게나제는 고형 종양의 예후를 예측하는 마커인 것으로 간주된다. 이는 최근 들어 대규모 임상 실험 풀에 기반한 포괄적인 메타-분석에 의해 검증된 바 있다 (환자 수 31,857명). OS에서 증가된 LDH의 일관된 효과가 모든 질병 서브그룹과 등급들 전체에서 발견되었다 (HR = 1.48, 95% CI = 1.43 - 1.53). 또한, 전이 질환에서 LDH의 예후 예측 가치가 비-전이성 질환에 비해 더 강력한 경향이 있었으며, 이는 보다 높은 종양 부담 (tumor burden)을 반영하는 것으로 생각되었다. 실제 기전은 아직 미정이며, 또한 워버그 효과를 통한 저산소증 및 대사 리프로그래밍과 관련있을 수 있으나, LDH는 높은 종양 부담 또는 종양 공격성을 반영하는 것으로 해석될 수도 있다 (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). 혈청내 LDH 수준이 흑색종의 등급 평가 체계에 통합되었기에, 이 파라미터는 대학 표준 실험실에서 임상 진단시 일반적으로 측정된다.

[0454] **표 6**:

[0455]

	GDF-15 (ng/ml)		LDH (U/l)	
	반응자 (n=19)	비-반응자 (n=10)	반응자 (n=9)	비-반응자 (n=16)
중앙값	1.2	4.6	371	591
평균	1,7	5.6	455	1312
표준 편차	1.2	3.6	218	1108
T 검정 (양측, 타입 3)	0.012		0.061	

[0456] **표 6**: 반응자 대 비-반응자에서 GDF-15 및 LDH.

[0457] 용혈 반응으로 인해 혈액 샘플 4개에서는 LDH 측정에 실패하였다.

[0458] 표 7은, 치료 반응 (반응자 1)의 연속형 예측 인자로서 GDF-15 대신 LDH를 사용한 것을 제외하고는, 표 2와 유사하다. 치료 반응 확률은 LDH 수치 증가에 따라 약간 유의하게 감소하였다 (OR < 1, p < 0.1). 도 5는 반응자/비-반응자에서 해당 데이타와 모델에 의해 예측된 치료 반응 확률을 보여준다.

[0459] GDF-15이 LDH 보다 더 좋은 치료 반응의 예측인자인지를 (반응자1) 확인하기 위해, 2종의 추가적인 모델들을 피팅하였다: 예측인자로서 양쪽 마커들을 포함하는 모델 (이는 자동적으로 양쪽 마커에 대한 측정값을 가진 환자만 포함함)과 예측인자로서 GDF-15을 이용하고 LDH 측정값을 가진 환자만 이용한 모델. 그런 후, 아카이케 정보 기준 (Akaike's information criterion, AIC)을 3가지 모델 모두에서 계산하였다 (표 8). AIC가 작을수록 효과적인 모델이라는 것을 의미한다. 실제, GDF-15을 이용한 모델의 AIC는 예측인자로서 LDH를 이용한 모델의 AIC 보다 낮았다. 심지어 GDF-15만 사용하는 모델은 이들 2종의 예측인자를 이용한 모델 보다 작은 AIC를 가지는데, 이는 부가적인 예측인자로서 LDH가 모델을 개선시키지 않는다는 것을 의미한다. 물론, 이들 2종의 예측인자를 이용한 모델은 불량한 치료 반응을 설명할 수 없지만, "모델 효율성 (model efficiency)"의 척도로서, AIC는 모델을 상당하게 개선시키지 않는 모델에 패널티를 부가하며, 단순한 모델을 선호한다. 편차 (deviance) 분석 (일반화 선형 모델이 아닌 경우 분산 분석과 유사)을 통해, 즉 이들 2종의 예측 인자를 이용한 보다 복잡한 모델과 (LDH 또는 GDF-15 중 어느 하나에 의한 모델의 축소에 해당되는) 오직 한가지 예측인자를 이용한 2가지의 단순 모델 간에 편차 차이를 비교함으로써, 대안적인 모델 비교 (alternative model comparison)를 행하였다. 복잡한 모델에서 GDF-15을 제거한 결과, 표시된 편차가 유의하게 감소 (P =0.02)된 반면, LDH를 제거한 경우에는 그렇

지 않았다 (P =0.41).

[0460] **표 7**:

[0461]

	추정치 (OR)	95% CI	z	p
(인터셉트)	9.741	[2.055,89.308]	2.44	0.0146
LDH	0.997	[0.994,0.999]	-1.79	0.0727

[0462] **표 7**: 경과 변수로서 치료 반응 (반응자 1, 파일 A에서 정의됨) 및 연속형 예측인자로서 LDH를 이용한 일반화 선형 모델에서의 오즈비 (OR) 추정치. 이 분석에는 환자 25명의 샘플이 포함되었다.

[0463] **표 8**:

[0464]

	df	AIC
LDH 및 GDF-15를 이용한 모델	3.00	25.10
LDH 단독 모델	2.00	28.55
GDF-15 단독 모델	2.00	23.77

[0465] **표 8**: 값이 낮을수록 보다 효과적인 모델임을 의미하는 아카이케 정보 기준 (AIC)에 기반한 모델 비교. df: 자유도. 모델 모두 환자 25명의 샘플을 포함하였다.

[0466] 도 5A는 연속 예측인자로서 LDH를 이용한 일반화 선형 모델에 의해 예측된 치료 반응 확률 (반응자 1)을 보여준다. 원형 마크는 데이타이고, 곡선을 모델을 나타낸다. 수직선은 치료 반응 확률이 0.5일 때의 LDH 농도를 표시한다. 환자 코호트는 동일하였다. 그러나, 환자 4명은 용혈 반응으로 인해 LDH 수준에 대한 신뢰성있는 측정에 실패하였다. 도 5B는 반응자 및 비-반응자와 이들 각각의 hGDF-15 수준과 LDH 수준을 표시한 그래프이다. 모든 반응자들을 커버하도록 컷-오프 값을 선정하였을 때, GDF-15에 기반한 검사에서 (9명 중) 6명의 비-반응자를 동정할 수 있는 반면, LDH 수준에 기반한 분석은 오직 (9명 중) 4명의 비-반응자만 식별할 수 있다. LDH 검사에서는, 용혈성 샘플 4종을 제외시켜야 하였으며, 그래서 데이타에 손실이 발생하였다.

[0467] 종합:

[0468] 요컨대, 상기 실시예 1의 통계학적 결과들은, 치료 반응 가능성이 환자 혈청에서 hGDF-15 수준이 증가할수록 유의하게 감소함을 보여주었다. 예를 들어, 표 2에 표시된 오즈비 0.389는, hGDF-15 혈청 수준이 1 ng/ml 증가한다면, 치료 반응 가능성이 오리지날 값에서 0.389배 감소, 즉 약 60% 감소한다는 것을 의미한다. 만일, hGDF-15 혈청 수준이 2 ng/ml 증가하면, 치료 반응 가능성은 오리지날 값의 0.389 x 0.389배 = 0.151배 값으로 감소하며, 즉, 약 85% 감소한다.

[0469] 실시예 1의 결과는, hGDF-15이 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응에 부정적으로 영향을 미치게 작용한다는 것을 시사해준다. 즉, 본 발명에서, hGDF-15의 저해제는 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응에 대해 hGDF-15의 부정적인 효과를 저해하고, 흑색종 뿐만 아니라 본원에 언급된 모든 고형 암에서 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응을 개선하는데 유용할 것이다.

[0470] **실시예 2**: GDF-15 수준은 여러가지 종양들의 전이에서 $CD8^+$ 종양 침윤성 림프구 (TIL)와 역 상관관계이다.

[0471] 환자의 반응에 대한 hGDF-15의 네거티브 효과에 기여하는 hGDF-15의 기전을 규명하기 위해, 여러가지 고형 종양에서 기인한 뇌 전이에서 hGDF-15의 발현과 면역계 세포의 존재에 대해 분석하였다:

[0472] 조직 생검 및 조직 가공 처리:

[0473] 포르말린-고정 및 파라핀-포매 (FFPE) 처리된 보관된 뇌 전이 조직을 분석하였으며, 이를 수집하여 조직 마이크로 어레이 (TMA)로서 가공 처리하였다. 모든 생검은 UCT 종양 은행 (독일 프랑크푸르트 암 마인 괴테 대학, 독일 암 컨소시엄의 멤버 (DKTK), 독일 하이델베르그 및 독일 암 연구 센터 (DKFZ), 독일 하이델베르그) 또는 암 등록 종양 은행 "Blut-und Gewebebank zur Erforschung des malignen Melanoms" (독일 튀빙겐 대학 병원 피부-암 분과)로부터 입수하였다. 본 실험에 대한 허가는 2곳의 독립적인 윤리 위원회 (UCT 프랑크푸르트 윤리 위원회 / 독일 프랑크푸르트 암 마인 괴테 대학: 프로젝트 번호: GS 4/09; SNO_01-12; 튀빙겐 대학 윤리 위원회 프로젝트 번호: 408/2013BO2)로부터 부여받았다. 뇌 전이 환자 총 190명을 조사하였다: 흑색종 (n=98), NSCLC (n=33), 유방암 (n=18), RCC (n=10), SCLC (n=7), 결장직장암 (n=7), 특정되지 않은 암 (암종 NOS n=11) 및 기

타로 요약되는 희귀 종양의 생검 (n=6). 환자 155명의 생존 데이타 (종양 절제 후 생존 시간)를 수집하였으며, 부가적으로 환자 169명에서는 뇌 전이 사례 수 및 55명의 흑색종 환자의 서브코호트에서는 뇌 전이 크기를 분석하였다.

[0474] 면역조직화학:

[0475] 모든 항체에 대한 면역조직화학은 3 ㎛ 두께의 슬라이드와 표준 프로토콜을 사용해 자동 IHC 염색 시스템 디스커버리 XT (Roche/Ventana, Tucson, Arizona, USA)에서 수행하였다. 다음과 같은 항체들이 사용되었다: anti GDF-15 (HPA011191, 희석율 1:50, Sigma/Atlas, protocol #730), CD3 (클론 A0452, 희석율 1:500, DAKO, Glostrup, Denmark), CD8 (클론 C8/144B, 희석율 1:100, DAKO, Glostrup, Denmark), PD-1 (클론 NAT105; 희석율 1:50; Abcam, Cambridge, United Kingdom), PD-L1 (E1L3N; 희석율 1:200; Cell Signaling, Boston, U.S.A.), FOXP3 (클론 236A/E7; 희석율 1:100; eBioscience, San Diego, U.S.A.). 슬라이드는 헤마톡실린으로 대조염색하여, 탑재하였다.

[0476] 통계학적 분석:

[0477] 모든 샘플은 전체 세포에 대한 양성 세포의 빈도 (%)에 따라 염색된 TMA 스코어로 점수를 매겼다. hGDF-15 발현의 경우, 기존에 구체적으로 기술된 [21, 22] 스코어를 사용하였다: 빈도 0-1% 스코어 0; 1-10% 스코어 1; 10-25% 스코어 2; 25-50% 스코어 3; >50% 스코어 4; 부가적으로, 빈도 스코어를 염색 강도로 곱하고 (1 염색 약, 2 염색 보통, 3 염색 강), 최종적으로 hGDF-15 스코어의 순서 척도를 구하였다 (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12). 순서 척도 변수를 비-모수적인 윌콕손/크루스칼-왈리스-검정 및 둔의 방법으로 비교하여 다중 검정 (multiple testing)을 교정하였다. 연속 변수의 경우, ANOVA와 후속적으로 터키-크레이머 HSD 사후 검정을 수행하여 여러 가지 뇌 전이들 간에 평균을 비교하였다. 뇌 전이 크기 및 마커 발현의 상관관계 분석을 위해, 선형 피트를 수행한 다음 ANOVA를 수행하였으며, 순서 척도 변수의 경우에는 스피어만의 rho 상관관계 분석 (Spearman's rho correlation analysis)을 사용하였다. 모든 통계 분석에서 $p<0.05$를 유의 수준으로 설정하였다.

[0478] 모든 통계 분석들은 JMP8 및 JMP11 (SAS, Cary, U.S.A.)를 사용하여 수행하였으며, 추가적인 그래프는 Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, U.S.A.)를 사용해 작성하였다.

[0479] 결과:

[0480] 도 6은, 도에 나타낸 바와 같이 GDF-15와 T-세포 마커 단백질 CD3 및 CD8 각각에 대해 면역조직화학으로 염색한, GDF-15 면역반응성이 높지 않거나 (상단 패널) 또는 높은 (하단 패널) 흑색종 뇌 전이 조직 단편의 예들을 보여준다. GDF-15이 발현되지 않은 단편에서, 다수의 침윤성 면역 세포들이 진한 점으로 관찰된다. GDF-15을 높은 수준으로 발현하는 전이 사진에서는, 극소수의 침윤성 면역 세포들이 화살 표시로 표시된다 (CD3 및 CD8-양성 세포들이 화살 표시로 표시됨). 도에서 알 수 있는 바와 같이, hGDF-15 면역반응성이 높은 조직 단편 (하단 패널)에서는, hGDF-15 면역반응성이 없는 조직 단편 (상단 패널)과 비교해 $CD3^+$ 및 $CD8^+$ 세포의 수가 크게 감소되었다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 특히, PD-L1, PD-1 등의 염색한 다른 마커들, 모두 종양-침윤성 $CD3^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 수와 양의 상관관계를 나타내었다.

[0481] 이에, 다음으로, 여러가지 흑색종 뇌 전이에서 hGDF-15 수준과 $CD3^+$ T 세포의 % 간에 역 상관관계가 존재하는지를 분석하였다. 도 7A는 ("통계학적 분석" 섹션에서 기술된 바와 같이 수득한) GDF-15 스코어에 따른 $CD3^+$ 세포의 %를 도시한 그래프를 보여준다. 도 7A에 나타낸 바와 같이, hGDF-15 수준과 $CD3^+$ T 세포의 % 간에 통계학적으로 유의한 역 상관관계가 존재하였다 ($p=0.0015$).

[0482] 마찬가지로, 여러가지 흑색종 뇌 전이에서 hGDF-15 수준과 $CD8^+$ T 세포의 % 간에 역 상관관계가 존재하는지를 분석하였다. 도 7B는 ("통계학적 분석" 섹션에서 기술된 바와 같이 수득한) GDF-15 스코어에 따른 $CD8^+$ 세포의 %를 도시한 그래프를 보여준다. 도 7B에 나타낸 바와 같이, hGDF-15 수준과 $CD8^+$ T 세포의 % 간에 통계학적으로 유의한 역 상관관계가 존재하였다 ($p=0.0038$).

[0483] 대조적으로, GDF-15와 FOXP3의 상관관계에서는, 스피어만의 순위 상관 계수 (rho) 검정에 따라 통계학적으로 유의한 결과를 수득할 수 없었다 (여러가지 종양들에 대한 경우 $p=0.8495$; 오직 흑색종 전이를 분석한 경우 $p=0.2455$).

[0484] 마지막으로, 여러가지 종양에서 유래된 뇌 전이에서 hGDF-15 수준과 $CD8^+$ 및 $CD3^+$ T 세포의 % 간에 역 상관관계가 존재하는지를 분석하였다. 도 8은 여러가지 종양 (흑색종, CRC, RCC, 유방암, NSCLC 및 SCLC)에서 기원한 뇌 전이 163건 (CD3) 또는 169건 (CD8) 각각에서 $CD8^+$ 및 $CD3^+$ T 세포의 %에 대한 GDF-15 스코어 그래프를 보여준다. 이 그래프는 "통계학적 분석" 섹션에 전술한 바와 같이 구하였다. 도 8에 나타낸 바와 같이, hGDF-15 스코어와 $CD8^+$ 세포의 % 간에 통계학적으로 유의한 역 상관관계가 존재하였으며 ($p=0.0311$), 또한 hGDF-15 스코어와 $CD3^+$ 세포의 % 간에 통계학적으로 유의한 역 상관관계가 존재하였다 ($p=0.0093$). 그외 마커들 (PD-L1, PD-1, FOXP3)은 CD3 및 CD8 T 세포 침윤과 양의 상관관계를 나타내었다.

[0485] 종합:

[0486] 상기한 결과들은, hGDF-15이, 전이에서 일반적인 T 세포 마커 단백질을 발현하는 T 세포의 %와 역 상관관계가 존재할 뿐만 아니라 전이에서 $CD8^+$ T 림프구의 %와도 역 상관관계가 존재한다는 것을 보여준다. $CD8^+$ T 림프구의 존재가 anti-PD-1 항체를 이용한 면역 체크포인트 저해 후 종양 퇴화 (tumor regression)에 특이적으로 필요한 것으로 입증되어 있어 (Tumeh et al., Nature. 2014 Nov. 27; 515(7528):568-71), 상기한 점은 주목할만하다.

[0487] 따라서, 본 발명에 따르면, hGDF-15의 치료학적 저해를 이용해 종양 전이 등의 고형 종양에서 $CD8^+$ T 림프구의 %를 높일 수 있다. 고형 종양내 $CD8^+$ T 림프구의 증가는 고형 종양 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 비-제한적인 측면에서, 특히 유익한 치료학적 조합은 hGDF-15 저해제와 면역 체크포인트 차단제의 조합이다. 이 조합의 유익한 효과는, hGDF-15의 저해가 고형 종양내 $CD8^+$ T 림프구의 %를 증가시켜, 면역 체크포인트 저해와 상승적인 치료학적 효과를 유발할 것이라는 것이다. 따라서, 본 발명은 바람직한 구현예에서 언급되는 바와 같이 모든 고형 종양에 적용될 수 있다.

[0488] **실시예 3**: GDF-15은 내피 세포에 T 세포의 부착을 감소시킨다.

[0489] 본 발명자들은 다음으로 고형 종양에서 hGDF-15이 T 세포의 %에 작용하는 방식을 확인하고자 착수하였다.

[0490] T 세포가 혈류에서 종양 조직으로 침범하는데 필요한 단계는, T 세포가 종양에 들어갈 수 있기 전에 내피 세포에 붙어야 한다는 것이다. 이 단계를 시뮬레이션하고, 이 단계가 hGDF-15에 의해 영향을 받을 수 있는지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 인간 제대혈 내피세포 (HUVEC)에의 T 세포 부착을 측정하는 모델 시스템을 이용하였다:

[0491] T 세포 흐름/부착 실험(HUVEC에서):

[0492] 1일:

[0493] a. μ-슬라이드 VI 0.4 (ibidi GmbH, Germany)를 파이브로넥틴 (100 ㎍/mL)으로 코팅하였다: 로딩 포트 당 30 ㎕. 이를 37℃에서 1시간 인큐베이션하였다 (또는 미리 코팅된 슬라이드를 사용함).

[0494] b. 파이브로넥틴을 흡입 제거한 다음 HUVEC 배지로 헹구었다.

[0495] c. HUVEC를 6웰 플레이트에서 트립신 처리하였다 (카운트: $2x10^5$/mL (총 2mL))

[0496] d. 이를 세척하고, $1x10^6$ 세포/mL로 희석하였다.

[0497] e. HUVEC 30 ㎕를 μ-슬라이드 VI의 로딩 포트에 적용하고, 현미경으로 체크하였다.

[0498] f. μ-슬라이드 VI에 뚜껑을 덮고, 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0499] 2일:

[0500] a. HUVEC를 TNFα (10 ng/mL) 및 IFNγ (10 ng/mL)를 사용해 채널 2-5 (하기 표 참조)에서 활성화하였다: 모든 배지는 채널에서 흡입 제거하고, 사이토카인이 함유된 미리-데운 배지로 교체하였다.

[0501] 3일:

[0502] a. T 세포를 분리하였다 (pan T 세포의 네거티브 분리).

[0503] b. T 세포를 웰 1 ($1x10^6$ 세포/mL)에서 GDF-15을 첨가하거나 또는 첨가하지 않고 (100 ng/mL) 1시간 동안 예비-인큐베이션하였다.

[0504] c. HUVEC를 채널 4 및 5에서 GDF-15 (100 ng/mL)와 함께 1시간 동안 예비-인큐베이션하였다: 로딩 포트내 모든 배지를 흡입 제거하고, 로딩 포트 둘다에 미리 데운 GDF-15함유 배지를 충진하였다.

[0505] d. 현미경 바로 옆 A 스테이지 탑 인큐베이터를 미리 데우고, 가스-믹스를 연결하였다 (5% CO_2, 16% O_2, 79% N_2).

[0506] e. 3x 50mL 시린지를 준비하였다:

[0507] i. T 세포 ($1x10^6$ 세포/mL): 1mL

[0508] ii. T 세포 GDF15 ($1x10^6$ 세포/mL): 1mL

[0509] iii. 배지

[0510] f. 시린지 1을 채널 1과 연결하고 (하기 표 참조), 흐름을 개시하였다 (0.5 dyn/cm^2: 0.38 mL/min = 22.8 mL/h).

[0511] g. T 세포를 3분간 흐르게 하고, 그 동안 현미경에서 10개의 시야각을 미리 설정하였다.

[0512] h. 각 시야각에서 5초간 비디오 이미지를 촬영하였다.

[0513] i. 나머지 채널도 하기 표에 나타낸 T 세포 샘플을 사용하여 채널 1 (f-h)과 유사한 방식으로 분석하였다.

[0514]

채널 #	내피 세포	T 세포 흐름	설명
1	자극되지 않은 HUVEC	T 세포	[음성 대조군]
2	자극 처리된 HUVEC	T 세포	[양성 대조군]
3	자극 처리된 HUVEC	T 세포 GDF-15	
4	자극 처리된 HUVEC GDF-15	T 세포	
5	자극 처리된 HUVEC GDF-15	T 세포 GDF-15	

[0515] 재조합 GDF-15은 독일 예나에 위치한 Invigate GmbH 사에서 입수하였다.

[0516] 통계학적 분석:

[0517] 모든 데이타는 비-정규 분포된 데이타를 검정하기 위한 만-휘트니 검정을 사용해 비교하였다. $p<0.05$인 결과는 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0518] 결과:

[0519] 실험 결과를 도 9에 나타낸다. 도는 몇가지 부착 파라미터의 분석 결과들을 도시한다, 즉,

[0520] a. 내피 세포에의 T 세포의 일반적인 부착 형태를 반영하는, 초 당 시계 당 롤링 T 세포의 수 (9A; 데이타는 채널 # 3 ("GDF-15") 및 채널 #2 ("대조군")로부터 수득됨),

[0521] b. T 세포와 내피 세포 간의 부착 감소에 따라 증가하는, T 세포의 롤링 속도 (0.2초당 픽셀 수로 측정) (9B; 데이타는 채널 # 3 ("GDF-15") 및 채널 #2 ("대조군")로부터 수득됨), 및

[0522] c. 시계 당 부착 세포의 수 (9C; 데이타는 채널 # 3 ("GDF-15") 및 채널 #2 ("대조군")로부터 수득됨; 및 9D).

[0523] 도 9C에서 알 수 있는 바와 같이, T 세포에 hGDF-15 처리는 시계 당 부착 세포의 수로 나타난 바와 같이, 내피 세포에의 부착을 유의하게 감소시키는 것으로 확인되었다. 유사한 결과는 롤링 T 세포의 수를 카운팅하여 부착을 분석하였을 때에도 수득되었다 (도 9A). 또한, 상기한 결과와 일관되게, T 세포에 hGDF-15의 처리는 롤링 속도를 유의하게 증가시키는 것으로 확인되었으며, 이는 T 세포와 내피 세포 간의 상호작용 시간의 감소를 의미하

며, 또한 T 세포와 내피 세포 간의 부착 감소를 의미한다 (도 9B).

[0524] 본 발명자들은, 다음으로, hGDF-15에 의해 타겟팅되는 세포를 분석하였다 (도 9D). HUVEC에만 hGDF-15을 처리한 샘플에서는, T 세포의 내피 세포 (HUVEC)에의 부착이 적당히 감소하는 것으로 관찰되었다. 이와는 대조적으로, T 세포에만 hGDF-15을 처리하거나 또는 T 세포와 내피 세포 (HUVEC) 둘다에 hGDF-15을 처리한 경우에는, T 세포의 내피 세포 (HUVEC)에의 부착이 크게 감소하는 것으로 관찰되었다. 이들 결과는, hGDF-15이 T 세포 및 내피 세포 둘다에 작용한다는 것을 의미하며, 또한 hGDF-15의 주된 부착 작용은 T 세포에 대한 작용이라는 것을 의미한다.

[0525] 다음으로, 본 발명자들은 종양 세포에 의해 분비되는 hGDF-15이 T 세포에 부착하는 작용이 hGDF-15 저해제에 의해 저해될 수 있는 지를 조사하였다. 이를 조사하기 위해, 본 발명자들은 hGDF-15을 분비하는 흑색종 세포주 UACC257을 사용하였다:

[0526] 종양 세포 상층액내 GDF-15의 존재 또는 부재 조건에서의 T 세포 흐름/부착 실험 (HUVEC에서):

[0527] 1일:

[0528] a. μ-슬라이드 VI 0.4 (ibidi GmbH, Germany; 이하 μ-슬라이드로 언급됨)를 파이브로넥틴 (100 ㎍/mL)으로 코팅하였다: 로딩 포트 당 30 ㎕. 이를 37℃에서 1시간 인큐베이션하였다 (또는 미리 코팅된 슬라이드를 사용함).

[0529] b. 파이브로넥틴을 흡입 제거한 다음 HUVEC 배지로 헹구었다.

[0530] c. HUVEC를 6웰 플레이트에서 트립신 처리하였다 (카운트: $2x10^5$/mL (총 2mL))

[0531] d. 이를 세척하고, $1x10^6$ 세포/mL로 희석하였다.

[0532] e. HUVEC 30 ㎕를 μ-슬라이드의 로딩 포트에 적용하고, 현미경으로 체크하였다.

[0533] f. μ-슬라이드에 뚜껑을 덮고, 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0534] 2일:

[0535] a. HUVEC를 TNFα (10 ng/mL) 및 IFNγ (10 ng/mL)를 사용해 μ-슬라이드의 채널 2-5 (하기 표 참조)에서 활성화하였다: 모든 배지는 채널에서 흡입 제거하고, 사이토카인이 함유된 미리-데운 배지로 교체하였다.

[0536] Day 3:

[0537] a. T 세포를 분리하였다 (pan T 세포의 네거티브 분리).

[0538] b. 병행하여, 96웰 ELISA 플레이트 (Nunc maxisorb)의 24개의 웰을 anti-GDF-15 (PBS 중에 10 ㎍/mL로 희석됨) 200 ㎕로 코팅하고, 45분간 인큐베이션한 다음 PBS로 헹구었다.

[0539] c. GDF-15을 분비하는 (데이타 도시 안함) 흑색종 세포주 UACC257의 상층액으로부터 GDF-15을 고갈시키기 위해, 상층액을 anti-GDF-15로 사전 코팅된 ELISA 플레이트 (상기 b 참조)의 웰에서 인큐베이션하였다.

[0540] d. 대조군으로서 흑색종 세포주 UACC257의 상층액을 anti-GDF-15로 사전 코팅하지 않은 ELISA 플레이트 (상기 b 참조)의 웰에서 인큐베이션하였다.

[0541] e. T 세포를 12웰 세포 배양 플레이트 1 ($1x10^6$ 세포/mL)에서 GDF-15을 첨가하거나 (100 ng/mL) 또는 첨가하지 않고, GDF-15이 고갈된 흑색종 세포주 UACC257의 상층액 (c. 참조) 중에 또는 GDF-15을 함유한 흑색종 세포주 UACC257의 상층액 (d. 참조) 중에서 1시간 동안 예비-인큐베이션하였다.

[0542] f. 현미경 바로 옆 A 스테이지 탑 인큐베이터를 미리 데우고, 가스-믹스를 연결하였다 (5% CO_2, 16% O_2, 79% N_2).

[0543] g. 미세유체 흐름 시스템의 4x 2mL 튜브들을 준비하였다:

[0544] i. T 세포 ($1x10^6$ 세포/mL): 1mL

[0545] ii. T 세포 GDF15 ($1x10^6$ 세포/mL): 1mL

[0546] iii. T 세포 UACC 257 (GDF-15 함유)

[0547] iv. GDF-15 고갈된 T 세포 UACC 257

[0548] h. 튜브 1을 채널 1과 연결하고 (하기 표 참조), 흐름을 개시하였다 (0.4 mL/min = 24 mL/h).

[0549] i. T 세포를 3분간 흘려주면서, 시야각 5개를 현미경에서 미리 정하였다.

[0550] j. 각 시야각에서 5초간 비디오로 영상을 촬영하였다.

[0551] k. 나머지 채널도 하기 표에 나타낸 T 세포 샘플을 사용하여 채널 1 (f-h)과 유사한 방식으로 분석하였다.

[0552]

채널 #	내피세포	T 세포 흐름	설명
1	자극되지 않은 HUVEC	T 세포	[음성 대조군]
2	자극 처리된 HUVEC	T 세포	[양성 대조군]
3	자극 처리된 HUVEC	T 세포 GDF-15	
4	자극 처리된 HUVEC	T 세포 UACC 257	
5	자극 처리된 HUVEC	T 세포 anti-GDF를 이용해 GDF-15 고갈된 UACC 257	

[0553] 재조합 GDF-15은 독일 예나에 위치한 Invigate GmbH 사에서 입수하였다.

[0554] 결과:

[0555] 실험 결과는 도 10A에 나타낸다. 도는 초당 시계 당 롤링 T 세포의 수에 대한 분석 결과를 보여준다. 데이타는 채널 # 1 (대조군, 비-자극 HUVEC 상의 T 세포, "음성 대조군"), 채널 # 2 (대조군, 자극된 HUVEC 상의 T 세포, "양성 대조군"), 채널 # 3 ("GDF-15"), 채널 # 4 ("UACC 257": 분비된 GDF-15을 함유한 UACC 257 흑색종 세포주의 상층액에서 배양된 T 세포) 및 채널 # 5 ("UACC257 + anti-hGDF-15": anti GDF-15 B1-23를 사용해 분비된 GDF-15을 고갈시킨 UACC 257 흑색종 세포주의 상층액에서 배양된 T 세포)에서 입수하였다.

[0556] 비-자극된 HUVEC 상에서의 T 세포 흐름 ("음성 대조군"; 중앙값 = 초 당 시계 당 롤링 세포 수 28)과 비교하여, 자극된 HUVEC 상에서의 T 세포 흐름 ("양성 대조군")시 초 당 시계 당 롤링 세포의 수가 증가하였다 (중앙값 = 46). T 세포에 hGDF-15을 처리하면 초 당 시계 당 롤링 세포의 수가 실질적으로 감소한다 (중앙값 = 29). 또한, T 세포를 GDF-15을 분비하는 흑색종 세포주 UACC257의 상층액과 함께 예비-인큐베이션하면, 자극된 HUVEC 상에서의 T 세포 흐름 ("양성 대조군")의 경우와 비교해, 초 당 시계 당 롤링 세포의 수가 실질적으로 감소한다 (중앙값 = 36). 이와는 대조적으로, T 세포를 anti GDF-15 B1-23를 사용해 분비된 GDF-15을 고갈시킨 흑색종 세포주 UACC257의 상층액과 예비-인큐베이션하면, 초 당 시계 당 롤링 세포의 수가 자극된 HUVEC 상에서의 T 세포 흐름 ("양성 대조군")과 비슷한 수준으로 관찰된다 (중앙값 = 45).

[0557] 이에, 본 발명에 따르면, hGDF-15 저해제는 예를 들어 고형 암의 치료시 CD8+ 세포 등의 T 세포의 내피 세포에의 부착을 증가시키기 위해 사용할 수 있다.

[0558] 또한, 상기한 분석은 대상 물질이 hGDF-15 저해제인지를 결정하기 위해 사용될 수 있는 간단한 시험관내 시스템을 제공해준다.

[0559] 종합:

[0560] 본 실시예는, 종양 세포에 의해 분비되는 GDF-15을 비롯한 GDF-15이 T 세포의 내피 세포에의 부착을 감소시킨다는 것을, 입증해준다. 이에, 본 발명에 따르면, hGDF-15 저해제를 이용한 치료를 이용해 $CD8^+$ T 세포 등의 T 세포의 내피 세포에의 부착을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 이러한 치료가 $CD8^+$ T 세포를 비롯한 T 세포의 혈류에서 고형 암으로의 유입을 증가시킬 것이다. hGDF-15 저해제를 이용한 이러한 치료로 발생하게 될, 고형 암에서 증가된 $CD8^+$ T 세포의 %는 암 요법, 예를 들어 암 면역요법에 유익하며, 이를 위해 사용될 수 있다. $CD8^+$ T 세포의 고형 암내 유입과 고형 암내 이들 $CD8^+$ T 세포의 존재가 특히 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료학적 접근에 유익하기 때문에, 본 발명에 따른 hGDF-15 저해제의 특히 유익한 사용은 면역 체크포인트 차단제와 조합

하여 사용하는 것이다.

[0561] 항체 H1L5 (인간화된 B1-23)와 01G06 및 03G05 (WO 2014/100689에 따른 서열에 따라 조작된 인간화된 Anti-GDF-15 항체)에 의한 항체 중화를 포함하는 흐름-부착 분석

[0562] 본 실험은, hGDF-15 저해제를 사용해 T 세포의 내피 세포에의 부착 또는 T 세포의 롤링을 증가시킬 수 있다는 결과 등의, 전술한 효과를 추가로 검증하기 위해, 수행하였다.

[0563] 실험 절차:

[0564] 흐름/부착 분석을 본 실시예에서 전술한 바와 같이 수행하였다. T 세포를 1시간 동안 100 ng/ml GDF-15와 함께 예비-배양하거나, 또는 1시간 동안 10 ㎍/ml 항체와 예비-배양한 100 ng/ml GDF-15와 배양하였다. 다음과 같은 Anti-GDF-15 항체를 사용하였다: H1L5 (인간화된 B1-23), 01G06 및 03G05 (WO 2014/100689의 서열에 따라 조작된 인간화된 Anti-GDF-15 항체).

[0565] 결과:

[0566] 본 결과를 도 10B에 도시한다. 자극되지 않은 HUVEC (음성 대조군) 상에서 흐르는 T 세포와 비교해, 자극된 HUVEC (양성 대조군) 상에서 흐르는 T 세포는 20초 당 시계 당 롤링 세포의 수를 증가시켰다. T 세포에 hGDF-15을 처리하면, 20초 당 시계 당 롤링 세포의 수가 실질적으로 감소하였다. 이와는 대조적으로, T 세포를, anti GDF-15 항체 H1L5 (인간화된 B1-23), 01G06 또는 03G05와 미리 인큐베이션한 hGDF-15와 인큐베이션하면, 20초 당 시계 당 롤링 세포의 수가 anti-GDF-15 항체를 첨가하지 않은 샘플과 비교해 실질적으로 증가하였다. 이러한 효과는 검사한 모든 anti-GDF-15 항체들에서 나타났으며, H1L5 (인간화된 B1-23) 항체에서 가장 강력하였는데 T 세포의 롤링에 대한 hGDF-15의 효과를 거의 완벽하게 되돌렸다.

[0567] 결론

[0568] 이에, 본 발명에 따르면, hGDF-15 저해제를 사용해, CD8+ 세포 등의 T 세포의 내피 세포에의 부착 또는 CD8+ 세포 등의 T 세포의 롤링을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 따르면, hGDF-15 저해제는 고형 암내 CD8+ 세포의 %를 높여, 이들 암의 치료에 이용할 수 있다. 이러한 hGDF-15 저해제는, 비-제한적으로, 항체 H1L5 (인간화된 B1-23), 01G06 및 03G05와 같은 임의의 공지된 anti-GDF-15 항체일 수 있다.

[0569] **실시예 4: 동계 MC38$^{tg\ hGDF-15+}$ 종양을 가진 마우스에서 보강제 면역화와 조합하여 테스트 항체의 항종양 효능 평가.**

[0570] 인간 증식 & 분화 인자 (GDF)-15의 저해가 면역요법에 대한 반응, 특히 종양에서 $CD8^+$ T 세포를 필요로 하는 면역요법에 대한 반응을 개선시킬 수 있는 지를 조사하기 위해, 뮤라인 MC38 대장암 암 세포를 인간 암 세포주에서 확인되는 수준과 비슷한 수준으로 인간 GDF-15을 발현하도록 형질감염시켰다. 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA, R&D Systems, Mouse GDF-15 DuoSet ELISA)에 의해 분석된 바에 따르면, MC38 세포는 뮤라인 GDF-15을 검출가능한 수준으로 발현하지 않았다 (검출 한계: 7.81 pg/ml).

[0571] 0일에, 9주령의 암컷 C57BL/6J 마우스 (Charles River Laboratories, BP 0109, F 69592 L´Arbresle, Cedex)를 마취시키고, $2x10^5$ 대장 MC38$^{tg\ hGDF-15}$ 세포를 피하 접종하였다. anti GDF-15 항체 (20 mg/체중 kg, 즉 약 400 ㎍/마우스, 100 포스페이트-완충화된 염수 + 0.5% 소 혈청 알부민)를 이용한 치료를 0일 (종양 세포 접종 후 약 6시간째)에 개시하고, 3, 7, 10, 14, 17 및 21일에 반복 실시하였다. 13일에, 종양이 100 - 150 mm^3 크기에 도달하였을 때, 동물을 여러가지 처리군으로 랜덤 분류하고, 해당 동물에 보강제 (100 ㎍ 폴리이노신산:폴리시티딜산 (Poly-ICLC (Hiltonol®, Oncovir, Washington D.C., USA)) 및 50 ㎍의 InVivoMAb anti-murine(m)CD40 항체 (clone FGK4.5/FGK45))를 총 부피 50㎕ 포스페이트-완충화된 염수 중에 복막내 주사하였다.

[0572] 일부 바이러스에 존재하여 TLR3를 자극하는 이중 가닥 RNA와의 구조 유사성으로 인해, Poly-ICLC는 감염을 시뮬레이션하였다. 작용제 anti-CD40 항체는 항원-제시 세포에 부가적인 신호를 제공한다. CD40의 자극을 통한 수지상 세포의 "라이센싱 (licensing)"은 항원-특이적인 $CD8^+$ T 세포의 활성화를 뒷받침한다. 따라서, 보강제 처리는 특수 무균성 조건에서 유지되는 마우스에 종양-특이적인 면역 세포를 유도하기 위해 사용된다 (Yadav M et al., Nature. 2014 Nov 27;515(7528):572-6).

[0573] 따라서, 이러한 보강제 처리는 종양에서 면역 세포, 특히 종양에서 $CD8^+$ T 세포를 필요로 하는 암 면역요법에

대한 모델 시스템을 재현해준다. 이에, 이는 anti-hGDF-15 항체와 같은 hGDF-15 저해제를 이용한 치료가 종양에서 $CD8^+$ T 세포를 필요로 하는 암 면역요법을 비롯한 암 면역요법과 상승작용함을 추가로 검증하는데 적합한 모델 시스템이다.

[0574] 요컨대, 하기 동물 그룹 (마우스 10마리/그룹)을 조사하였다:

[0575] - 보강제 면역화하지 않는 비히클 군

[0576] - 보강제 사용없이 anti hGDF-15 항체 B1-23 처리군

[0577] - 보강제 면역화한 비히클 군

[0578] - anti hGDF-15 항체 B1-23 및 보강제 처리군

[0579] 종양 크기는 종양의 길이와 폭을 캘리퍼로 측정함으로써 주당 3회 측정하였다.

[0580] 마우스는 종양의 크기가 식 V = 길이 x $폭^2$/2으로 계산하였을 때 2,000 mm^3를 초과하면 안락사시켰다. 마찬가지로, 마우스가 동물 복지에서 일반적으로 허용되는 한계를 벗어나 상태가 좋지 않은 것 (체중 감소 ≥ 15%, 움직임 둔화, 엎드려 있는 행위, 나쁜 모질 상태)으로 확인되면 안락사시켰다.

[0581] 생존 마우스의 경우, 종양의 존재를 종양 접종 후 57일까지 신체 검사를 통해 확인하였다. 그 결과를 도 11에 나타낸다.

[0582] 본 발명자들에 의해 수행된 이전 실험에서, anti-GDF-15 항체 단독 처리가 암을 치료하는데 유익하게 사용될 수 있지만, 종양을 완전히 제거, 즉 암을 완치하진 못하였다. 마찬가지로, 도 11에서, 비히클-처리 마우스 또는 anti-hGDF-15 단독 처리 마우스도 완치되지 않았다. 보강제 처리군 (즉, poly ICLC 및 anti-CD40 항체)은 마우스 10마리 중 3마리가 완치되었다. 특히, 보강제 처리를 anti-hGDF-15 항체의 처리와 조합할 경우, 마우스 10마리 중 8마리가 완치되었다. 즉, anti-hGDF-15 항체를 이용한 처리가 보강제 처리와 강력한 상승 작용을 발휘하였다.

[0583] 결론:

[0584] 이 모델에서 수득한 결과들은, hGDF-15 저해제가 암 요법, 특히 $CD8^+$ T 세포와 같은 면역 세포를 활성화하여 종양 조직에서 세포독성 활성을 발휘하는 것이 필요한 암 면역요법과 상승작용한다는 것을, 추가로 검증해준다. 이 결과는 또한 암에서 본 발명에 따른 hGDF-15 저해제의 사용으로 인해 유발되는 $CD8^+$ T 세포의 % 증가가 암 요법에 유익하게 사용될 수 있다는 것을, 추가로 검증해준다.

[0585] 뮤라인 면역 모델 시스템은, 선택된 실험 조건에서는, 빠르게 증식하는 암에 대한 항원-특이적인 $CD8^+$ T 세포 반응을 구축하기에 시간이 매우 짧다. 그래서, 이 뮤라인 시스템에서 자발적인 면역 반응을 추가로 뒷받침하기 위해 보강제를 사용하였다. 반면, 인간 환자의 경우, 암이 장기간 (예, 수년)에 걸쳐 발생하므로, 암 항원에 대한 항원-특이적인 T 세포는 전형적으로는 진단시 이미 존재하며, 즉 심지어 암이 진단되기 전에 통상적으로 면역 반응의 프라이밍이 발생한다. 이러한 암 항원-특이적인 $CD8^+$ T 세포는 이미 인간에 존재하지만, 뮤라인 모델 시스템에서는 그 수준이 훨씬 낮다. 따라서, 본 발명에 따르면, 본 발명에 따른 hGDF-15 저해제의 사용은 본 뮤라인 모델 시스템 보다는 인간에서 보다 더 효과적일 것이다. 이에, hGDF-15 저해제는 본 발명에 따른 인간 암 환자를 치료하는데, 예를 들어 고형 암내 $CD8^+$ T 세포의 %를 증가시키기 위해 효과적으로 사용될 수 있으며, 이는 인간에서 다른 암 면역요법, 특히 anti-PD-1 및 anti-PD-L1 항체와 같은 면역 체크포인트 차단제를 이용한 암 면역요법을 비롯하여 암에서 $CD8^+$ T 세포를 필요로 하는 암 면역요법과 상승적으로 작용할 것이다.

[0586] **실시예 5: GDF-15 혈청 수준이 anti PD-1로 치료받은 흑색종 환자의 생존성을 규정한다.**

[0587] 본 실시예의 실험은 실시예 1의 실험에서 수득한 결과, 예를 들어, 환자의 면역 체크포인트 차단제에 대한 반응에 hGDF-15이 영향을 미친다는 사실을 추가로 검증하기 위해, 부가적인 독립 실험을 통해 수행하였다.

[0588] 본 실험과 관련하여 하기 용어들이 사용되었다:

[0589] "검열됨" = 추가적인 추적 데이타를 이용할 수 없을 때에는 그 환자는 실험에서 제외시켰다.

[0590] "이벤트" = 환자가 사망함.

[0591] "생존" = 환자가 추적시 살아있음.

[0592] 조직학적으로 흑색종이 검증된 독일 튀빙겐 대학의 피부과 환자들은 독일 피부과 센터 60곳 이상에서의 환자들을 선행적으로 기록한 CMMR (Central Malignant Melanoma Registry)에서 동정되었다. (a) 보관된 혈청 샘플이 있고, (b) 이용가능한 추적 데이타가 있으며, (c) 채혈 시점에 국소 영역 또는 원거리 전이 병력이 존재하며, (d) anti PD-1 항체를 이용한 실험 치료를 받은 환자 99명을 선별하였다. CMMR에 의한 데이타 수집 목적 및 방법은 기존에 구체적으로 발표된 바 있다 (Lasithiotakis, KG et al., Cancer / 107 / 1331-9. 2006). 각 환자에서 수득한 데이타는 이용가능할 경우 연령, 성별, 최종 추적일 및 사망일과 사망 요인이다. 환자들 모두에서 CMMT 레지스트리의 임상 데이타 기록에 대해 서면으로 사전 동의를 구하였다. 튀빙겐 윤리 위원회는 본 실험을 허가하였다 (ethic vote 125/2015BO2). 자격 요건이 되는 환자는 18세 이상으로, 국소 요법에 불응성의 적출불가한 III기 또는 IV기 흑색종으로 조직학적으로 또는 세포학적으로 검증되었으며; 현행 가이드라인에 따라 종래에 요법을 수행하였음에도 불구하고 질병 진행을 나타내는 환자이다. BRAFV600 돌연변이 종양을 가진 환자는 BRAF 또는 MEK 저해제 요법 또는 둘다를 비롯한 실험 치료 또는 권고되는 제1선 요법을 실시받은 바 있다. 이필리무맵을 이용한 종래의 치료는, 적용가능할 경우, 환자가 최소 2회 투여, 3주에 1회로 3 mg/kg을 투여받았지만 마지막 이필리무맵 투여 후 24주 이내에 질병의 진행이 검증된 경우에는 실패한 것으로 간주되었다. anti PD-1의 투여 전, 이필리무맵-관련 부작용 해소 또는 등급 0-1로의 개선 및 프레드니손 투여량 10 mg/day 이하가 실험 약물의 1차 투여 전 적어도 2주간 요구되었다. 자격 요건이 되는 환자는 ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 퍼포먼스 상태가 0 또는 1이고; RECIST v1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, version 1.1)에 따른 측정가능한 질병을 앓고 있으며; 절대 호중구 수치 (≥1500 세포/mL), 혈소판 (≥100,000 세포/mL), 헤모글로빈 (≥90 g/L), 혈청 크레아티닌 (≤1·5 정상 상한 [ULN]), 혈청 총 빌리루빈 (≤1·5 ULN 또는 총 빌리루빈 농도가 >1·5 ULN인 환자 경우 다이렉트 빌리루빈 ≤ ULN), 아스파르테이트 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (≤2·5 ULN 또는 간 전이 환자의 경우 ≤5 ULN), 국제 표준 비율 또는 프로트롬빈 시간 (항응고제를 사용하지 않을 경우 ≤1·5 ULN), 및 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간 (항응고제를 사용하지 않을 경우 ≤1·5 ULN)을 나타내었다. 환자들은 가장 최근 용법의 마지막 투여 시기와 펨브롤리주맵 또는 니볼루맵의 1차 투여 사이에 4주 이상의 워시아웃 기간 (washout period)을 가졌다.

[0593] 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA)을 통한 hGDF-15 혈청 수준 분석:

[0594] 인간 GDF-15 혈청 수준을 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA)으로 측정하였다.

[0595] 완충제 및 시약:

[0596] 완충화된 차단 용액: 1% BSA (fraction V pH 7.0, PAA, Pasching, Austria)/PBS

[0597] 세척 용액: PBS-Tween (0.05%)

[0598] 표준: 인간 GDF-15 (원액 농도 120 ㎍/ml, R&D Systems)

[0599] 포획 항체: 인간 GDF-15 MAb (클론 147627), R&D Systems, Mouse IgG2B (catalog #MAB957, R&D Systems, 원액 농도 360 ㎍/ml)

[0600] 검출 항체: 인간 GDF-15 바이오틴화된 친화성 정제한 PAb, Goat IgG (catalog #BAF940, R&D Systems, 원액 농도 9 ㎕/ml)

[0601] 스트렙타비딘-HRP (Catalog #DY998, R&D Systems)

[0602] 기질 용액: 10 ml 0.1 M NaOAc pH6.0 + 100 ㎕ TMB + 2 ㎕ H_2O_2

[0603] 정지 용액: 1 M H_2SO_4

[0604] 분석 절차:

[0605] 1. 혈소판 준비:

[0606] e. 포획 항체를 PBS 중에 워킹 농도 2 ㎍/ml로 희석하였다. 96웰 마이크로플레이트 (Nunc maxisorp®)를 양쪽 끝 열 (A 및 H)을 제외하고는 희석한 포획 항체를 웰 당 50 ㎕로 첨가하여 즉각적으로 코팅하였다. A 및 H 열에는 완충제를 넣어 실험 중에 샘플이 증발되지 않게 하였다. 각 웰의 바닥부가 완전히 덮이도록 플레이

트를 가볍게 두들겼다. 플레이트를 가습 챔버에 넣어, 실온 (RT)에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0607] f. 각 웰에서 흡입하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 헹구었다.

[0608] g. 차단 용액 150 ㎕을 각 웰에 첨가한 다음 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0609] h. 각 웰에서 흡입하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 헹구었다.

[0610] 2. 분석 절차:

[0611] d. 표준 물질을 준비하였다. GDF-15을 완충화된 차단 용액에 최종 농도 1 ng/ml (4.17 ㎕ GDF + 496 ㎕ 완충화된 차단 용액)로 희석하였다. 1:2 연속 희석물을 제조하였다.

[0612] e. 두플리케이트 샘플 1:20 (6 ㎕ + 114 ㎕ 완충화된 차단 용액)을 제조하였다.

[0613] f. 희석 샘플 또는 표준 물질 50 ㎕를 각 웰에 첨가한 다음, RT에서 1시간 인큐베이션하였다.

[0614]

	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	St	and	ard					dil	uti	on	s	
G					se	rial						
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0615] i. 각 웰에서 흡인하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 세척하였다.

[0616] j. 검출 항체를 최종 농도 50 ng/ml (56 ㎕ + 10 ml 차단 완충제)로 희석하였다. 각 웰에 검출 항체 희석액 50 ㎕을 첨가한 다음 RT에서 1시간 인큐베이션하였다.

[0617] k. 각 웰에서 흡인하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 세척하였다.

[0618] l. 스트렙타비딘-HRP를 1:200 (50 ㎕ + 10 ml 차단 완충제)으로 희석하였다. 스트렙타비딘-HRP 작업 희석액 50 ㎕를 각 웰에 첨가한 다음 RT에서 20분간 인큐베이션하였다.

[0619] m. 각 웰에서 흡인하고, PBS-Tween (0.05%)으로 3번 세척하였다.

[0620] n. 기질 용액을 제조하였다. 기질 용액 50 ㎕를 각 웰에 첨가한 다음 RT에서 20분간 인큐베이션하였다.

[0621] o. 정지 용액 50 ㎕를 각 웰에 첨가하였다.

[0622] p. 450 nm로 설정된 마이크로플레이트 리더를 사용해 즉시 각 웰의 광학 밀도를 측정하였다.

[0623] 3. GDF-15 혈청 역가 계산:

[0624] d. 각 샘플/GDF-15 표준 희석액을 2세트로 사용하였다. GDF-15 역가를 측정하기 위해, 두플리케이트의 평균을 계산하고, 백그라운드 (GDF-15 무첨가 샘플)를 제하였다.

[0625] e. 표준 곡선을 작성하기 위해, 선형 범위의 값들을 X-Y-다이아그램에 피팅하고 (X 축: GDF-15 농도, Y 축: OD450), 선형 곡선 피트를 적용하였다. 농도를 알고있는 표준 희석액들의 OD450 값으로부터 보간함으로써 테스트 샘플의 GDF-15 혈청 역가를 계산하였다.

[0626] f. 샘플의 최종 GDF-15 농도를 계산하기 위해, 개별 희석 인수를 고려하였다. 표준 범위 보다 낮거나 또는 높은 OD 값을 나타낸 샘플들은 적절한 희석 비율에서 재분석하였다.

[0627] hGDF-15 혈청 수준과 환자 데이타의 비교:

[0628] 다음으로, 측정된 hGDF-15 혈청 수준을 실험에서 수득한 환자 반응 데이타와 비교하였다.

[0629] hGDF-15 혈청 수준과 환자 데이타의 통계학적 상관관계:

[0630] 데이타:

[0631] 데이타 분석은 컬럼 (변수) 샘플 명, GDF-15 (ng/ml), 일수 (사망에 이르기까지의 소요 일 또는 배제될 때까지의 일수) 및 진행중 (지속되는 수명에 대한 색인 변수)을 포함하여 환자 99명에서 수득한 샘플의 데이타가 저장된 데이타 파일을 토대로 하였다.

[0632] 경과 변수 (엔드포인트):

[0633] a. 전체 생존율 (사망 소요 시간). 엔드포인트는 데이타 파일에서 유래된 사망에 대한 이벤트 지표 (1=사망/0=생존) 및 변수 "일수"에 해당되는 사망 또는 검열까지의 소요 시간 (환자가 생존한 것으로 인지된 마지막 시기)으로 구성된다.

[0634] 치료에 대한 반응, 예를 들어, 환자가 반응자인지 또는 아닌지 (1=반응자, 0=비-반응자로 코드화됨).

[0635] 데이타 분석:

[0636] 생존을 분석하기 위한 추적 기간은 채혈일부터 마지막 추적 (즉, 환자로부터 마지막 정보를 수득한 시점) 또는 사망까지로 정해졌다. 모든 혈액 샘플을 anti-PD1 항체를 처리하기 전 수일내에 취하였다. OS를 분석하기 위해, 마지막 추적시까지 살아있는 환자를 검열하였으며, 사망한 환자는 "이벤트"로 간주하였다. 카플란-마이어에 따른 누적 생존 확률을 95% 신뢰 구간 (CI)으로 계산하였으며, 양측 로그-순위 검정 통계 방법을 사용해 비교하였다. 전체 생존에 대한 p-값은 양측 로그 순위 통계 방법으로 계산하였다. 한가지 모델은 범주형 예측인자로서 GDF-15에 기초하여 그룹핑 변수를 피팅하였다 (그룹은 다음과 같다: <1.5 ng/ml (n=62), ≥1.5 ng/ml (n=37) 또는 $GDF\text{-}15^{low}$ (n=49), $GDF\text{-}15^{high}$ (n=50), 중앙값 스플릿 (median split)에 기초함). 수득한 카플란-마이어 곡선을 도 12 및 13에 나타내며, 여기서 검열은 수직선으로 표시된다. 부가적으로, 아래 표들은 사례 요약 (표 9), GDF-15 수준이 각각 <1.5 ng/ml 및 ≥1.5 ng/ml인 환자 그룹들에서의 환자 생존 데이타 (표 10 및 11), 그리고 GDF-15 수준이 각각 <1.5 ng/ml 및 ≥1.5 ng/ml인 환자 그룹들의 전체 통계 비교 (표 12)를 포함한다.

[0637] **표 9:** 사례들의 요약

[0638]

	수	이벤트 수	검열	
			H*	생존율%
GDF-15 <1.5ng/ml	62	11	51	82.3%
GDF-15 ≥ 1.5ng/ml	37	18	19	51.4%
총	99	29	70	70.7%

[0639] *H = 이벤트 없음

[0640] **표 10:** 생존율 (생존 일수)의 평균 및 중앙값

[0641]

	평균[a]				중앙값	
			95%-신뢰 구간			
	추정치	표준 오차	하한	상한	추정치	표준 오차
<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
총	569.056	44.477	481.882	656.231	n/d.	n/d.

[0642] a. 검열 후, 추정치는 가장 긴 생존 기간으로 제한됨.

[0643] n/d: 그룹에서 생존자가 >50%이므로, 생존 중앙값 데이타를 계산할 수 없음.

[0644] **표 11:** 생존 기간 (생존 일수)의 평균 및 중앙값

[0645]

	중앙값[a]	
	95%-신뢰 구간	
	하한	상한
<1.5ng/ml	n/d.	n/d.
≥1.5ng/ml	58.963	559.037
총	n/d.	n/d.

[0646] a. 검열 후, 추정치는 가장 긴 생존 기간으로 제한됨.

[0647] n/d: 그룹에서 생존자가 >50%이므로, 생존 중앙값 데이타를 계산할 수 없음.

[0648] **표 12:** 전체적인 비교

[0649]

	Chi-square	df*	유의성
로그 순위 (Mantel-Cox)	8.129	1	.004

[0650] *df = 자유도

[0651] GDF-15의 수준 차이 (<1.5 ng/ml, ≥1.5 ng/ml)에 따른 생존율의 균등 분포 검정

[0652] 결과 및 결론:

[0653] 본 실시예의 상기한 통계 결과들은 실시예 1의 결과를 추가로 검증해주었다. 예를 들어, 환자의 생존으로 나타난 바와 같이, 치료에 대한 반응 가능성이, 환자 혈청내 hGDF-15 수준이 증가함에 따라 유의하게 감소되는 것으로 검증되었다. 예를 들어, 표 12는, GDF-15 수준이 <1.5 ng/ml인 환자 그룹과 ≥1.5 ng/ml인 환자 그룹 간의 생존율이, 유의 수준 0.004로 입증된 바와 같이, 유의한 차이가 있다는 것을 보여준다. 마찬가지로, 표 9는 GDF-15 수준이 <1.5 ng/ml인 그룹에서 환자 생존율 (82.3%)이 더 높다는 것을 입증해주며, 표 10 및 11과 도 12 및 13은, GDF-15 수준이 <1.5 ng/ml인 환자들이 생존 기간이 GDF-15 수준이 ≥1.5 ng/ml인 환자에 비해 현저하게 더 길다는 것을 입증해준다.

[0654] 즉, 본 실시예의 결과들은, hGDF-15이 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응에 부정적으로 작용한다는 것을 추가로 검증해준다. 따라서, 본 발명에 따르면, hGDF-15의 저해제는 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응에 작용하는 hGDF-15의 부정적인 효과를 저해하고, 흑색종 뿐만 아니라 본원에 언급된 모든 고형 암에서 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응을 개선하는데 유용할 것이다.

[0655] **실시예 6: anti-PD1 항체로 치료받은 인간 비-소 세포성 폐암 (NSCLC) 환자에서, 진행성 질환을 앓고 있는 환자에서의 hGDF-15 혈청 수준 중앙값이 부분 반응을 보이는 환자에서 보다 더 높다.**

[0656] 본 실시예는 실시예 1의 실험에서 수득한 결과, 예를 들어, 환자의 면역 체크포인트 차단제에 대한 반응에 hGDF-15이 영향을 미친다는 사실을 추가로 검증하기 위해, 다른 고형 암을 대상으로 부가적인 독립 실험을 통해 수행하였다.

[0657] 환자:

[0658] NSCLC 환자들은 anti-PD1 항체의 허가된 약물 표지에 따라 anti-PD1 항체로 치료받았다. 이들 환자에는 다른 암 요법으로 사전-치료받았던 환자들도 포함된다. 완전 반응은 NSCLC 환자들에서 관찰하기 어렵기 때문에, 환자 그룹에 진행성 질환을 나타내는 환자와 PD-1 치료시 부분 반응을 보이는 환자를 포함시켰지만, PD-1 치료시 완전 반응을 나타낸 환자는 포함시키지 않았다.

[0659] 혈청 샘플:

[0660] 혈청 샘플은 anti-PD1 항체를 이용한 치료 전에 환자들로부터 취하였다.

[0661] 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA)에 의한 hGDF-15 혈청 수준 분석:

[0662] 혈청 샘플내 hGDF-15 혈청 수준은 실시예 1에 기술된 바와 같이 효소-연계된 면역흡착 분석 (ELISA)을 통해 분

석하였다.

[0663] 결과:

[0664] anti-PD-1으로 치료시 부분 반응을 보인 환자 5명과, anti-PD-1으로 치료시 진행성 질환을 나타낸 환자 5명에서 hGDF-15 혈청 수준을 수득하였다. 놀랍게도, 부분 반응을 나타낸 환자에서 hGDF-15 혈청 수준의 중앙값이 0.55 ng/ml인데 반해, 진행성 질환을 나타낸 환자에서의 hGDF-15 혈청 수준의 중앙값은 1.56 ng/ml이었다. 즉, 진행성 질환을 나타낸 환자에서 hGDF-15 혈청 수준의 중앙값이 부분 반응을 나타낸 환자의 약 2.8배였다.

[0665] 결론:

[0666] 본 실시예의 결과는, hGDF-15의 수준이 환자의 면역 체크포인트 차단제에 대한 반응과 음의 상관관계이라는 것을 추가로 검증해준다. 본 실시예의 결과는, 또한, hGDF-15이 PD-1과 같은 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응에 부정적으로 작용한다는 것을 추가로 검증해준다. 따라서, 본 발명에 따르면, hGDF-15의 저해제는 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응에 작용하는 hGDF-15의 부정적인 효과를 저해하고, 흑색종 뿐만 아니라 NSCLC와 같은 폐암 및 본원에 언급된 모든 고형 암에서 면역 체크포인트 차단제를 이용한 치료에 대한 환자의 반응을 개선하는데 유용할 것이다.

[0667] **실시예 7: hGDF-15 혈청 수준은 종양의 돌연변이 부담과 유의한 상관관계를 나타내지 않는다.**

[0668] 돌연변이 부담 (mutational burden)은 암 환자의 면역 체크포인트 차단제에 대한 반응을 예측하는 공지된 긍정적인 예후 인자이다. 일반적으로, 암 세포는 암 세포에 특이적이며 비-암성 세포의 항원과는 다른 암 세포 항원을 발생시키는 게놈 돌연변이를 가지고 있다. 높은 돌연변이 부담은 이러한 암 세포-특이적인 항원의 많은 수로 이어진다. 이러한 다수의 암 세포-특이 항원을 가진 암의 경우, 면역 체크포인트 차단제에 의한 면역 반응의 자극이 특히 효과적인 것으로 간주되는데, 그 이유는 더 많은 암 세포-특이적인 항원을 면역 반응을 위한 타겟 항원으로서 이용가능하기 때문이다.

[0669] hGDF-15이 단지 종양의 돌연변이 부담에 대한 대리 마커 (surrogate marker)가 아니라는 것을 추가로 검증하고, hGDF-15 저해제를 이용한 치료가 종양의 돌연변이 부담과는 독립적으로 기전을 통해 작용한다는 것을 또한 검증하기 위해, 암 환자의 암 샘플내 hGDF-15 mRNA 수준을 암에서 동종된 체세포 돌연변이의 수에 대한 그래프로 작성하였다. 체세포 돌연변이는 엑솜 서열분석을 사용해 확인되었다. 데이타는 취리히 대학 병원의 UZH 웹툴을 사용해 분석하였다 (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). 결과는 도 14에 나타낸다. 도 14A는 높은 등급의 악성 흑색종 환자만을 고려한 암 게놈 아틀라스 (TGCA)로부터 입수한 암 환자 데이타 그래프를 도시한다 (암 게놈 아틀라스는 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 문헌에 기술됨). GDF-15 발현은 RSEM ("RNA Seq by expectation maximization") 소프트웨어 패키지를 이용한 정규화에 의해 분석하였다 (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). 도 14B는 개별적으로 분석된 취리히 대학 병원으로부터 입수한 추가적인 전이 악성 흑색종 환자 40명의 암 환자 데이타 그래프를 도시한다.

[0670] 특히, 도 14A 및 14B 둘다 p-값이 0.5로, 이는 암의 돌연변이 부담과 hGDF-15 수준 간에 유의한 상관관계가 없다는 것을 의미한다. 이러한 결과는, hGDF-15이 단지 종양의 돌연변이 부담을 표시하는 대리 마커가 아니며, hGDF-15 저해제를 이용한 치료가 종양의 돌연변이 부담과는 독립적인 기전을 통해 작용한다는 것을, 추가로 검증해준다.

[0671] **실시예 8: 야생형 종양 또는 인간 GDF-15 (과)발현성 종양에서의 $CD8^+$ T-세포 침윤**

[0672] 면역적격성 동계 마우스 C57BL/6의 우측 옆구리에 이식된 야생형 종양 또는 인간 GDF-15 (과)발현성 MC38 대장암 세포를 이용한 파일롯 실험에서, GDF-15 과발현은 면역 세포의 침윤 감소와 관련 있었다. 야생형 종양 또는 hGDF-15을 과다발현하는 형질전환 (tg) 종양을 보유한 지 29일 이후에 희생시킨 마우스에서 CD8a의 면역세포화학 사진을 도 15에 도시한다. 도에서 알 수 있는 바와 같이, 야생형 종양이 hGDF-15을 과다발현하는 형질전환 (tg) 종양에 비해 CD8a-양성 세포를 더 많이 함유하였다.

[0673] 이들 결과는, 본 발명에 따르면, hGDF-15이 고형 암에서 $CD8^+$ T 세포의 %를 감소시키며, 반대로 anti-GDF-15 항체와 같은 hGDF-15 저해제가 인간 환자의 고형 암에서 $CD8^+$ T-세포의 %를 높이기 위해 사용할 수 있다는 발견

사실을 추가로 뒷받침해준다.

산업상 이용가능성

[0674] 본 발명에 따른 저해제들의 조합, 조성물 및 키트는, 약제학적 제품의 제조를 위한 공지의 표준에 따라, 청구된 방법 및 용도 (예, 본원에 정의된 바와 같이 암 치료)를 위한 제품으로서 산업적으로 제조 및 판매될 수 있다. 즉, 본 발명은 산업상 이용가능하다.

수탁번호

[0675]

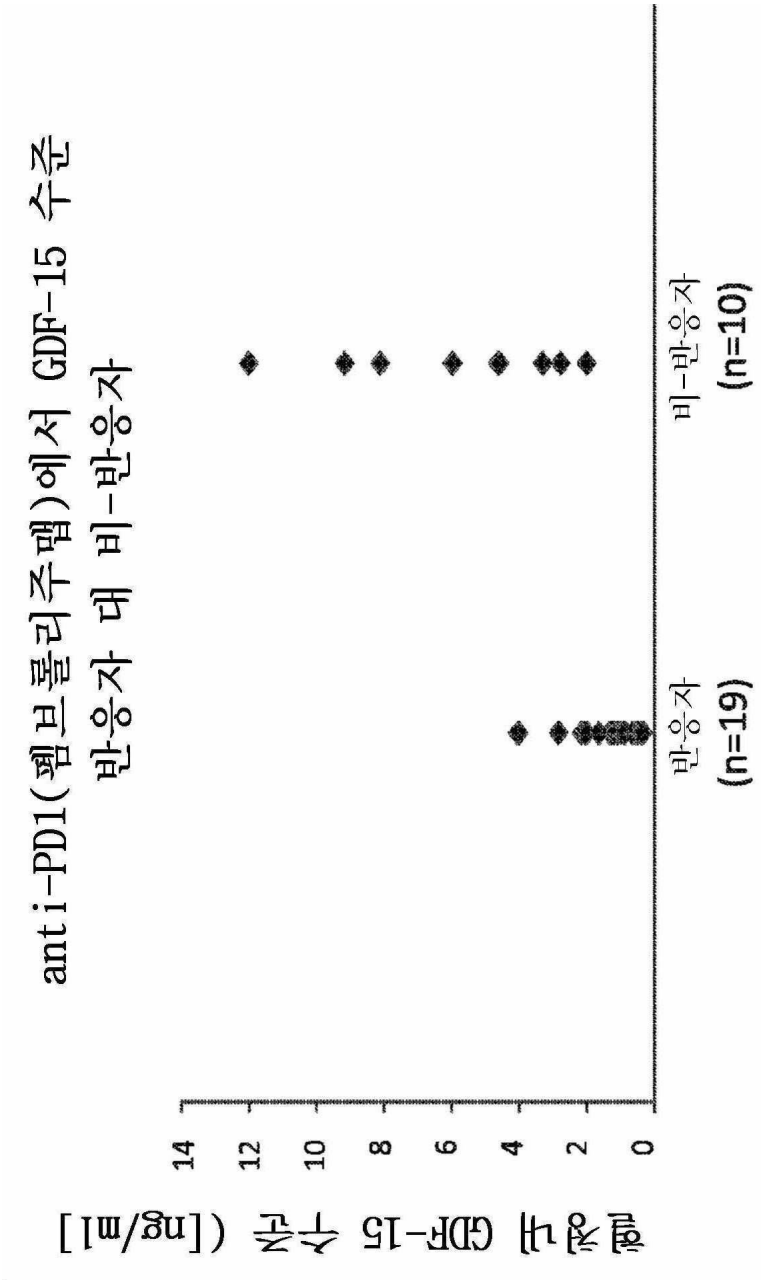
기탁기관명 : DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

수탁번호 : DSMACC3142

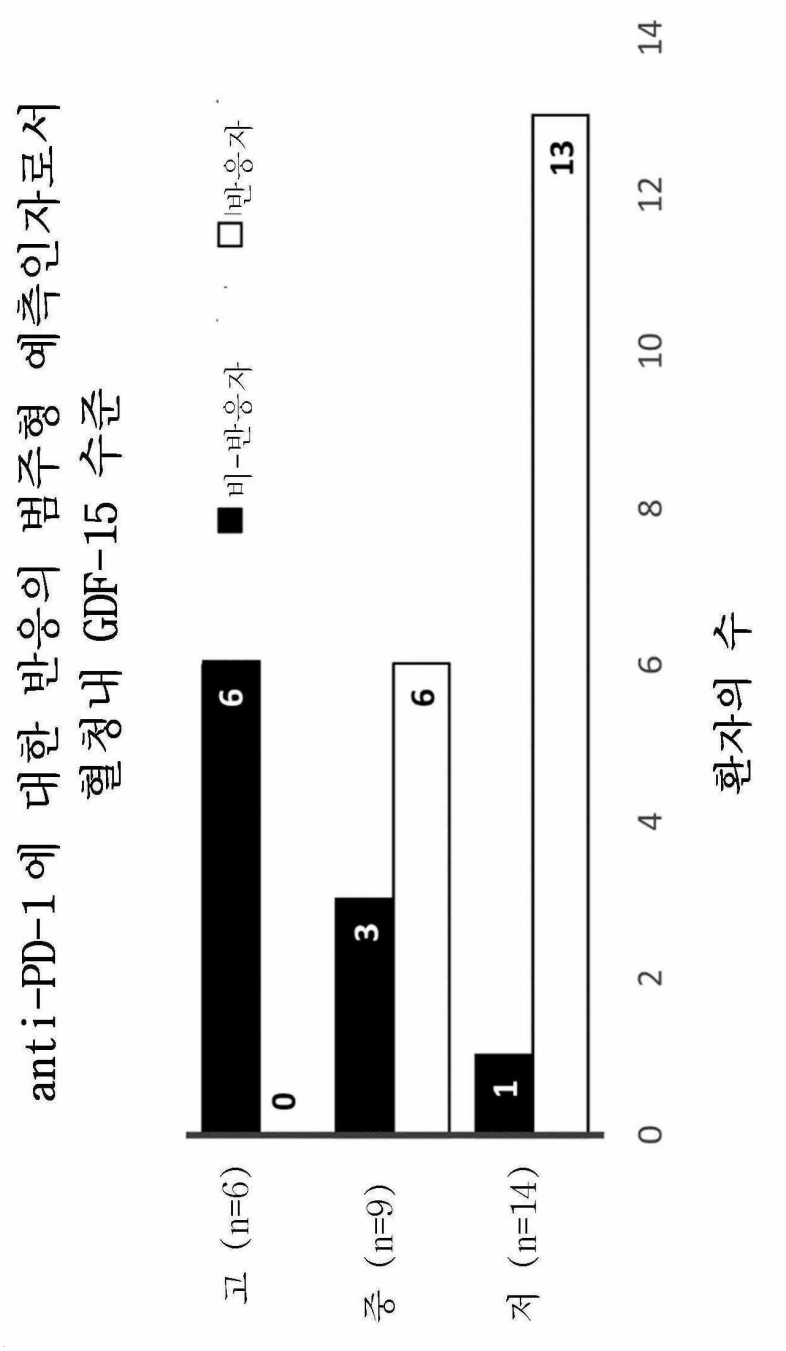
수탁일자 : 20110929

도면

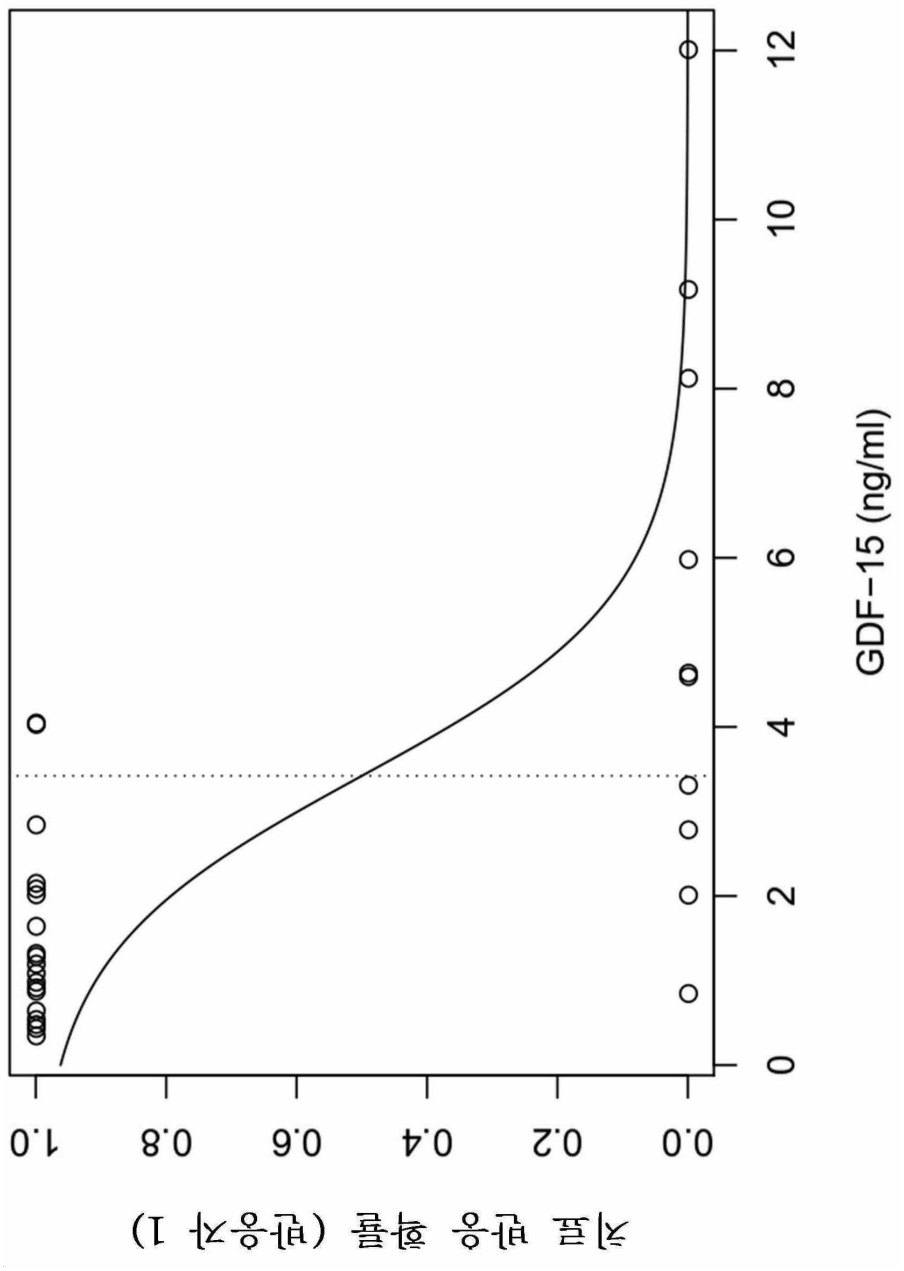
도면1


anti-PD1(펨브롤리주맵)에서 GDF-15 수준
반응자 대 비-반응자
혈청내 GDF-15 수준 ([ng/ml])
14
12
10
8
6
4
2
0
반응자
(n=19)
비-반응자
(n=10)

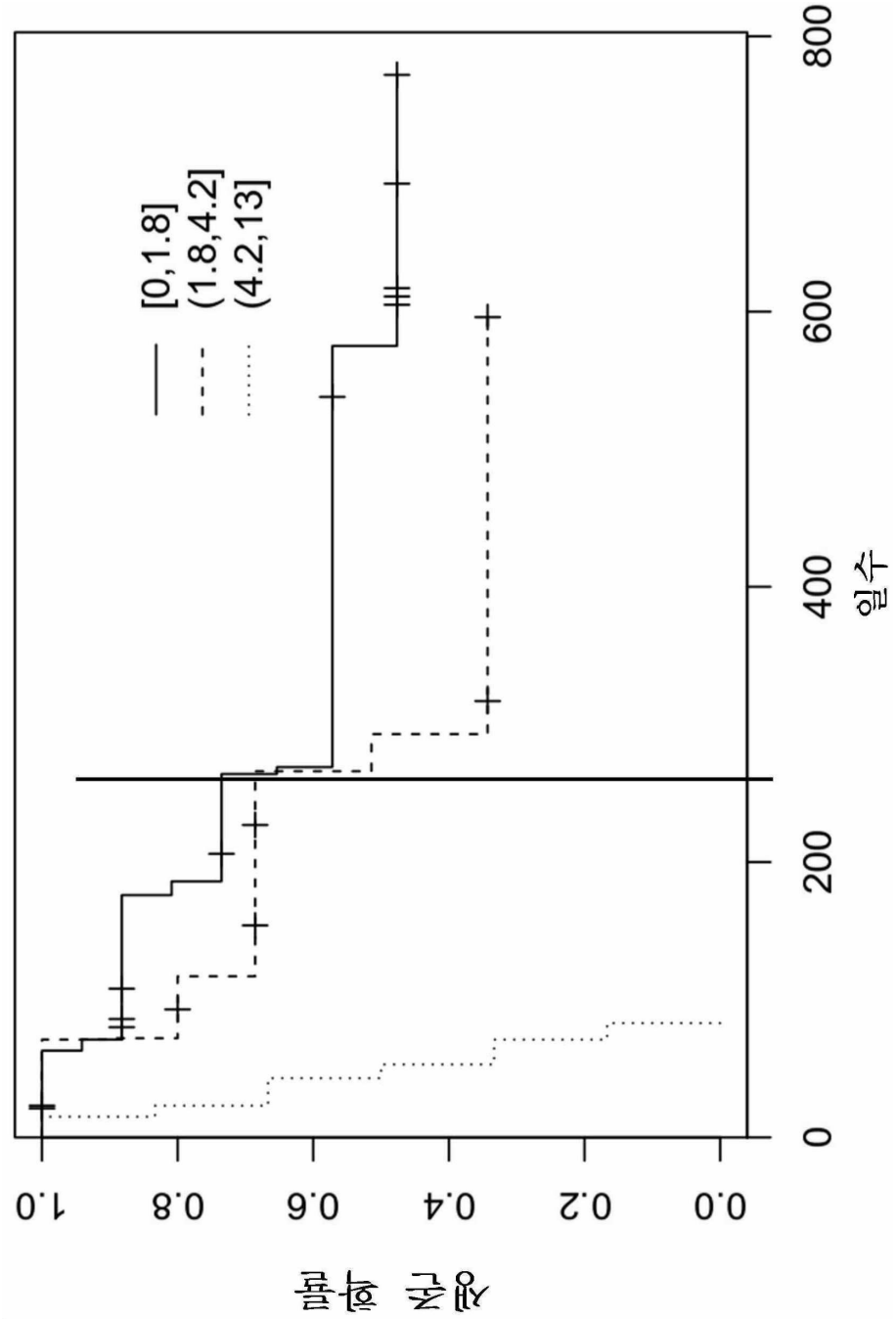
도면2


anti-PD-1에 대한 반응의 범주형 예측인자로서
혈청내 GDF-15 수준
■ 비-반응자
□ 반응자
고 (n=6)
중 (n=9)
저 (n=14)
6
0
3
6
1
13
0
2
4
6
8
10
12
14
환자의 수

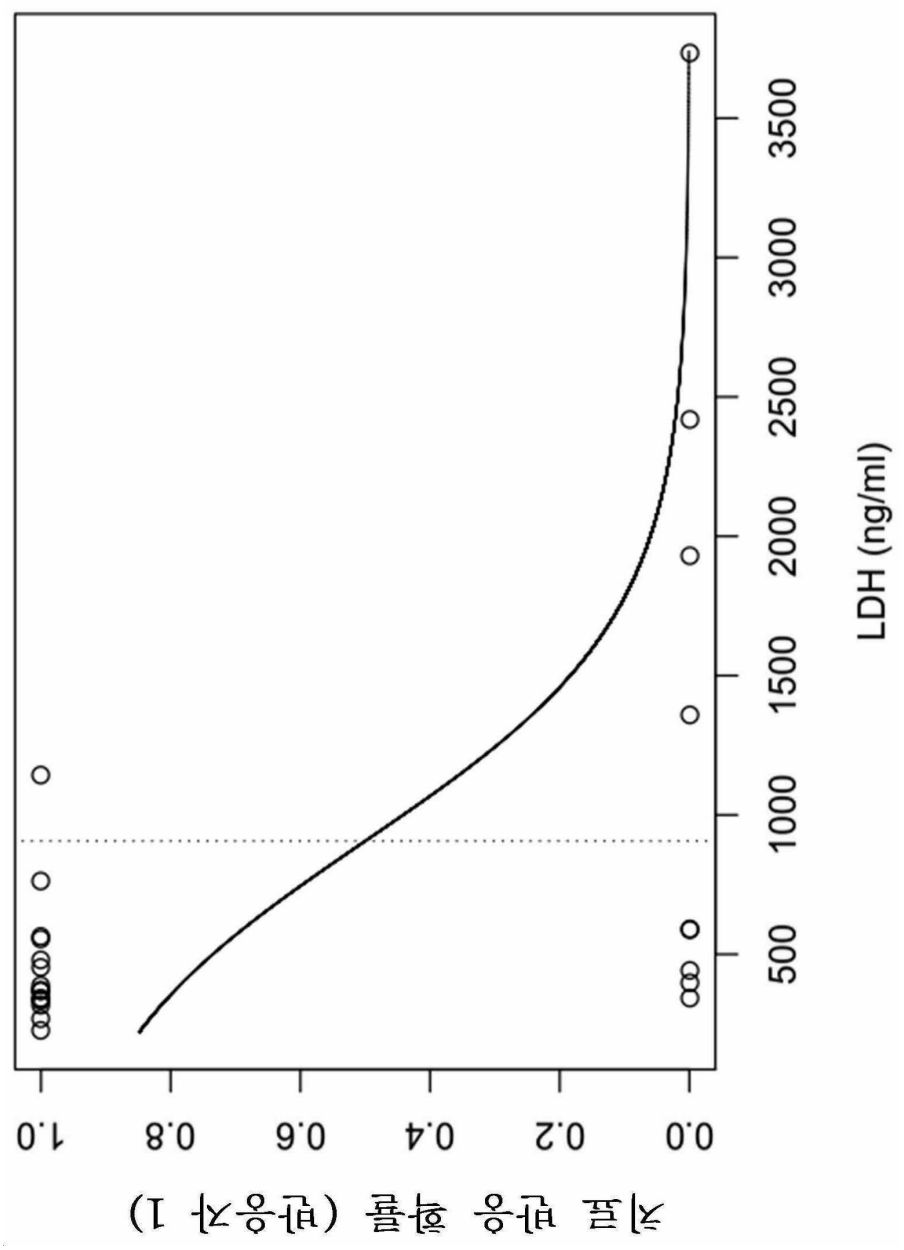
도면3



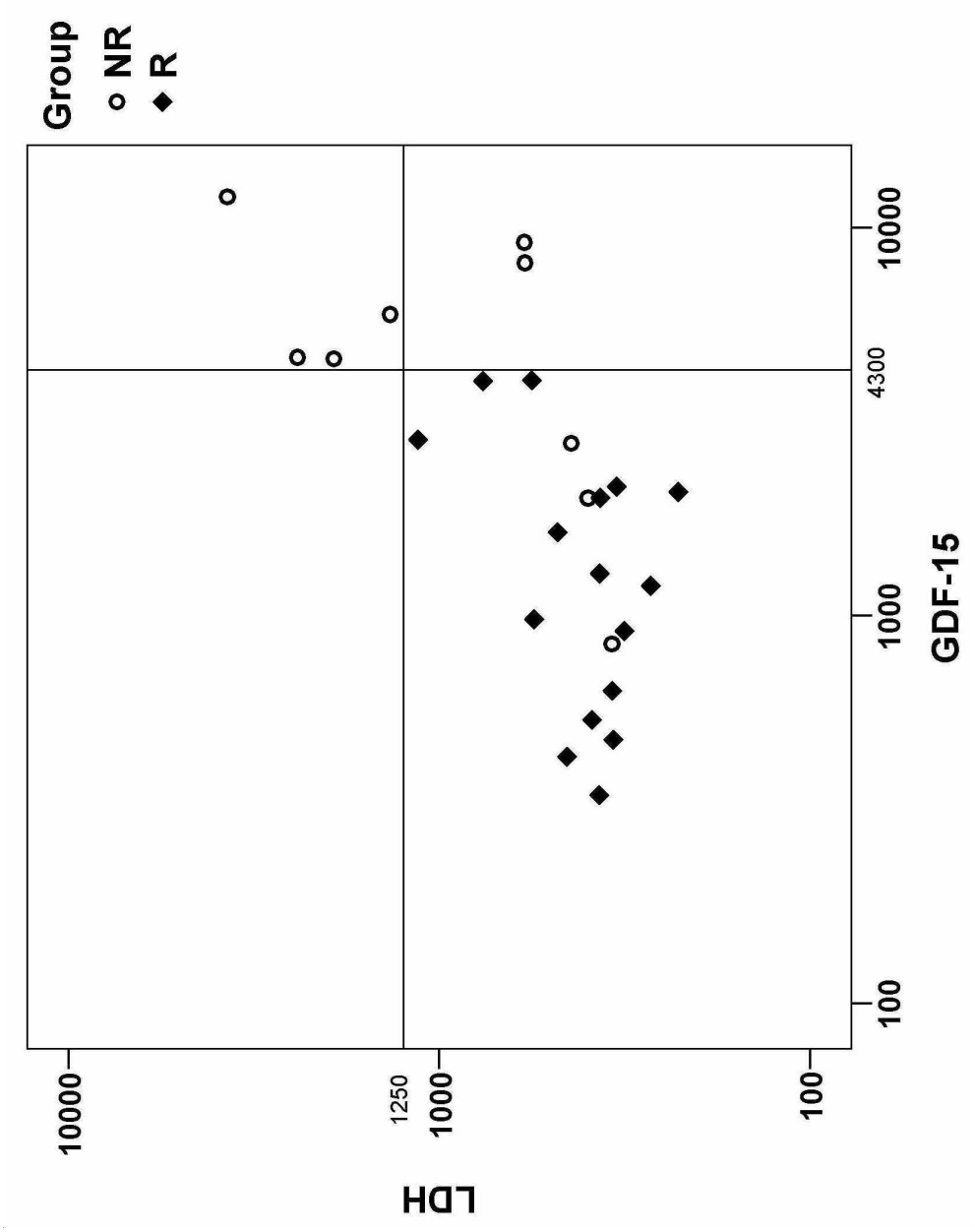
도면4



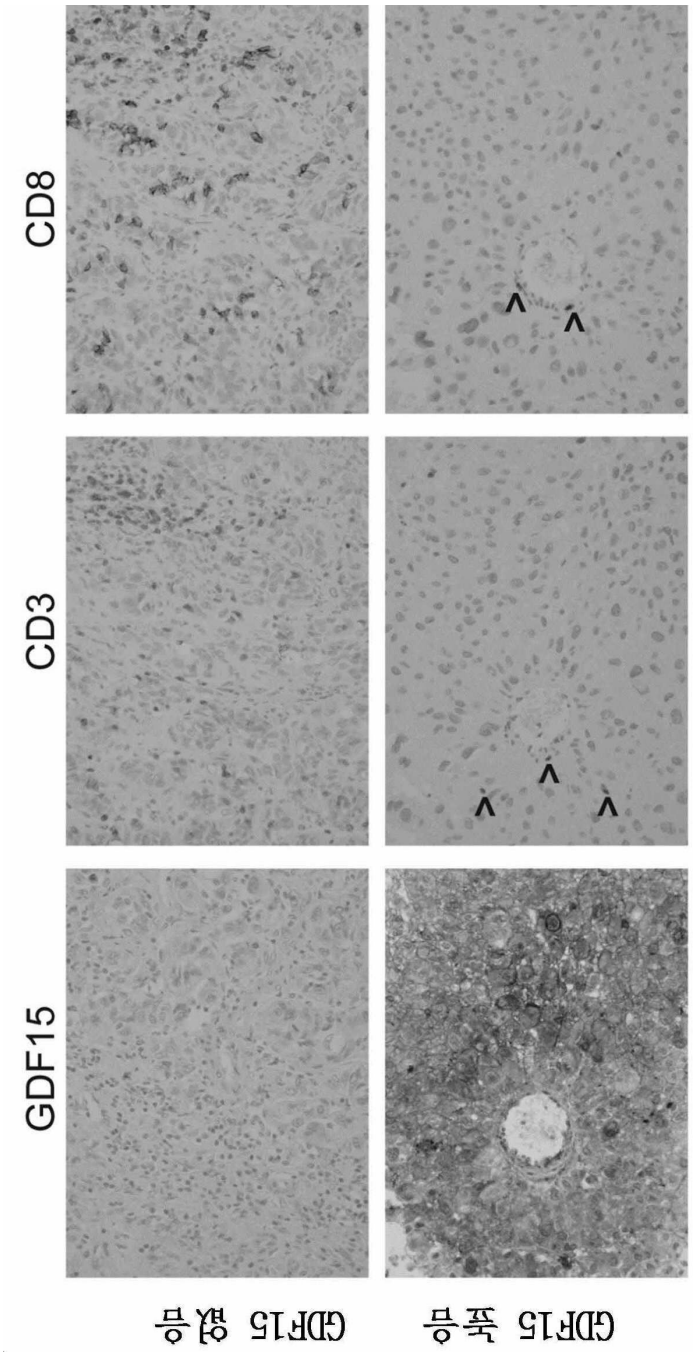
도면5a


치료 반응 확률 (반응자 1)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
LDH (ng/ml)

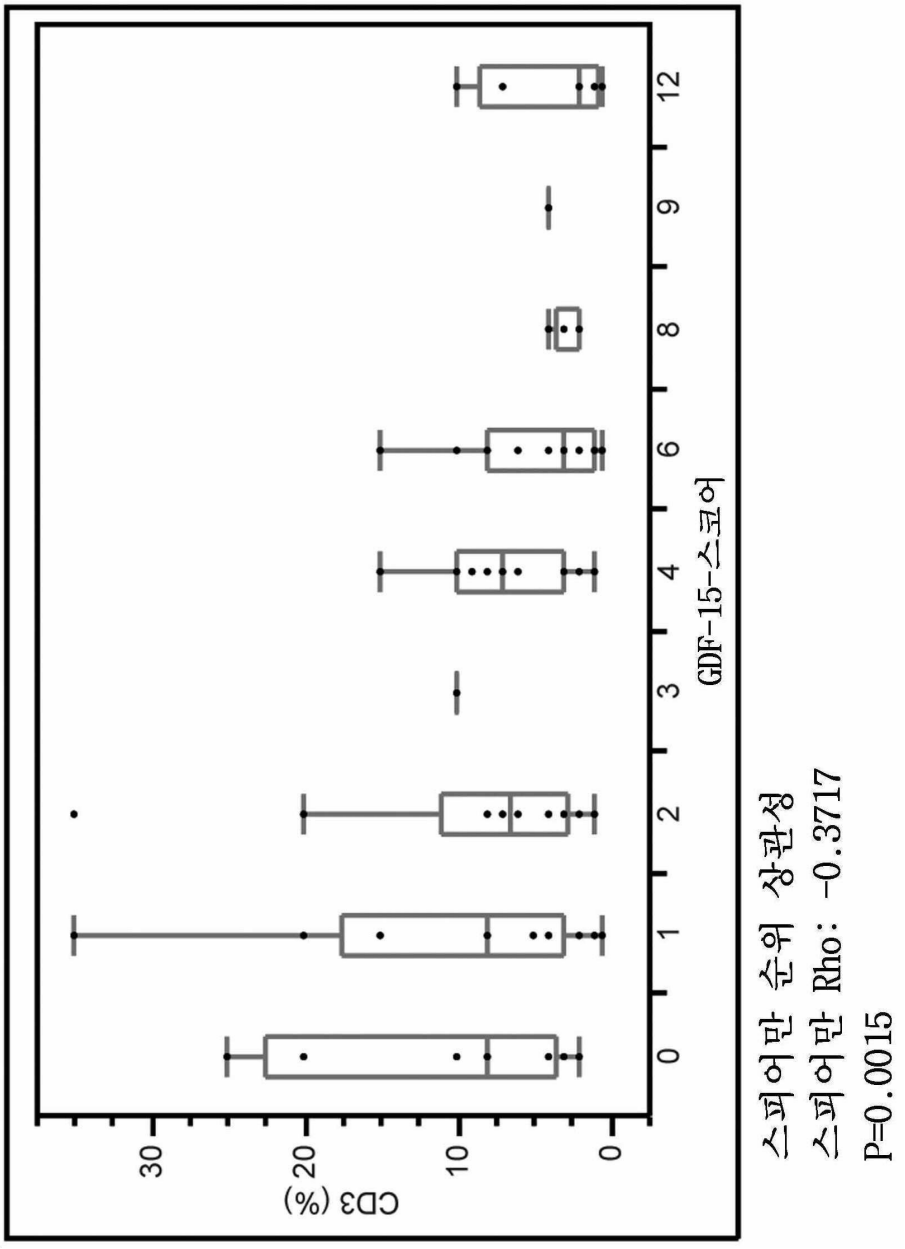
도면5b



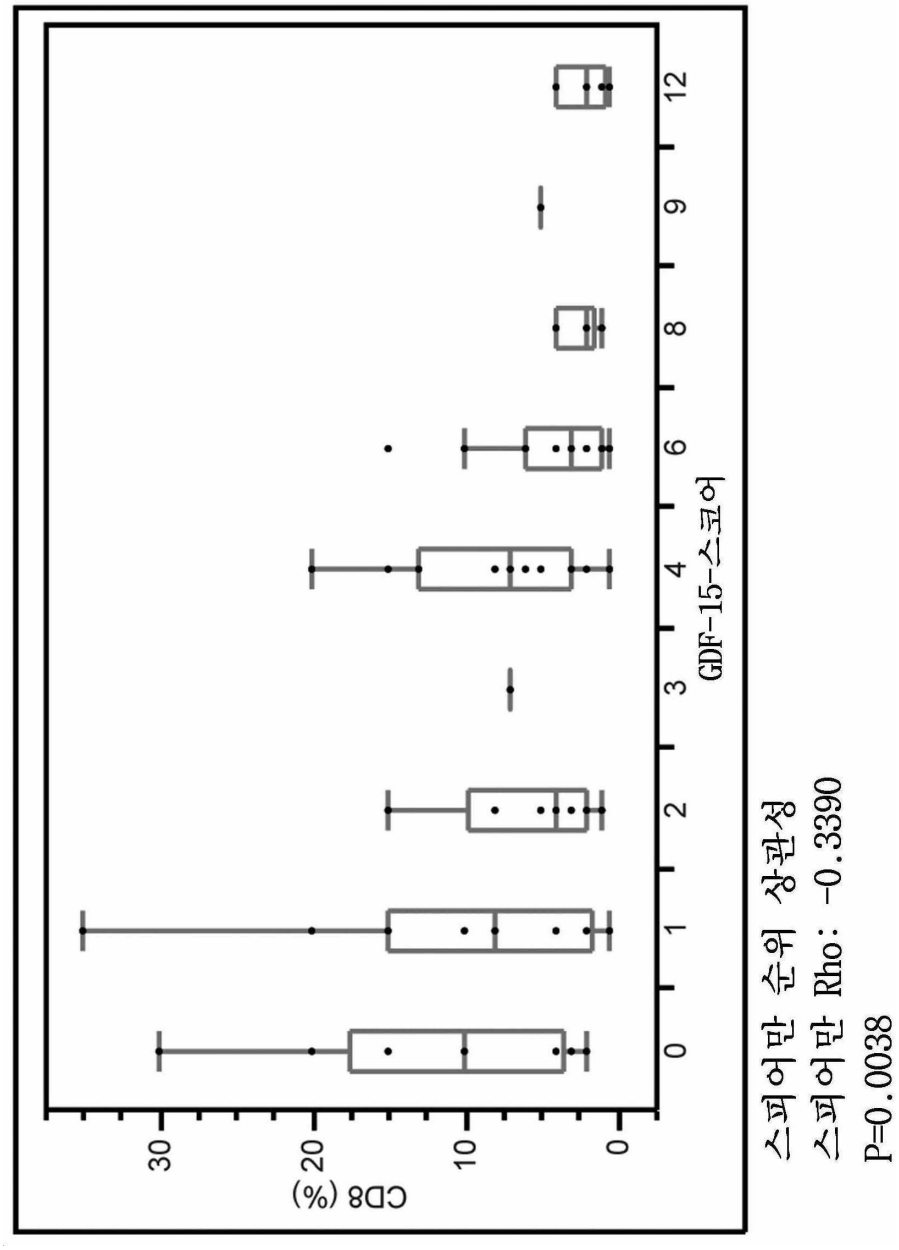
도면6



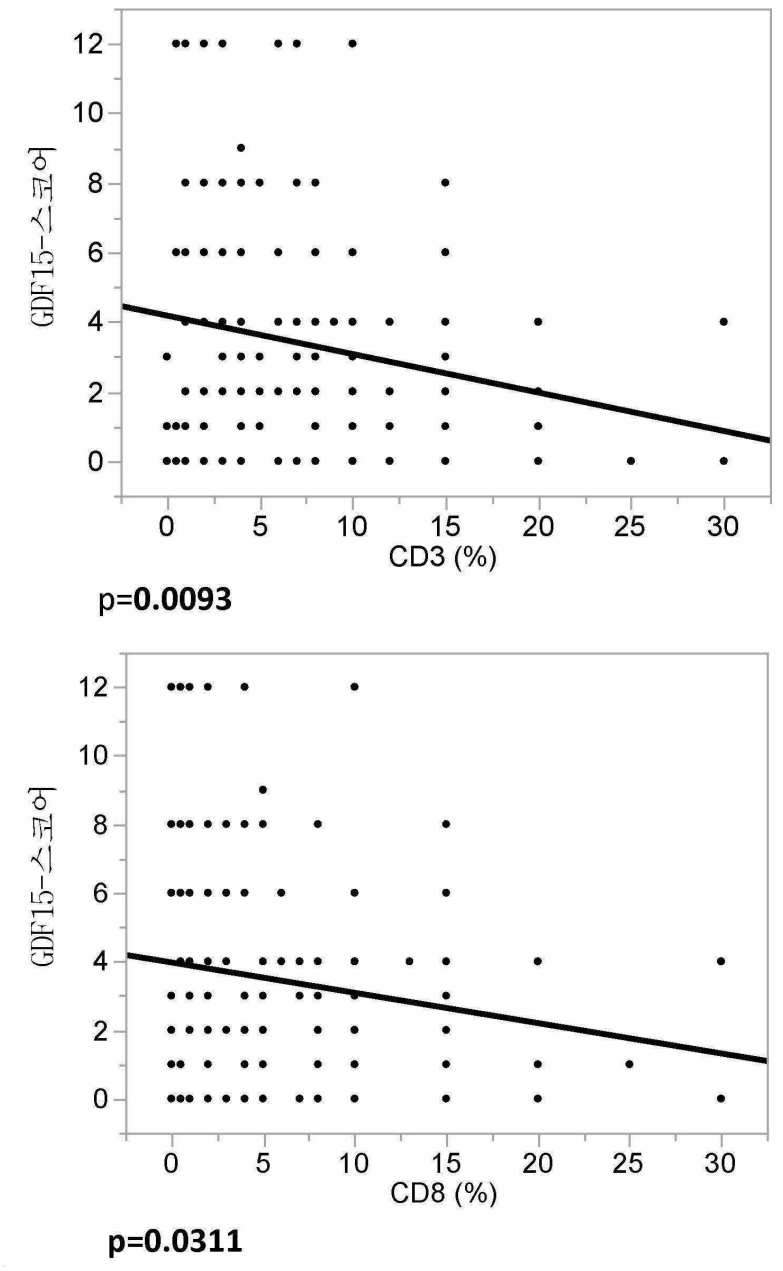
도면7a


CD3 (%)
30
20
10
0
0
1
2
3
4
6
8
9
12
GDF-15-스코어
스피어만 순위 상관성
스피어만 Rho: -0.3717
P=0.0015

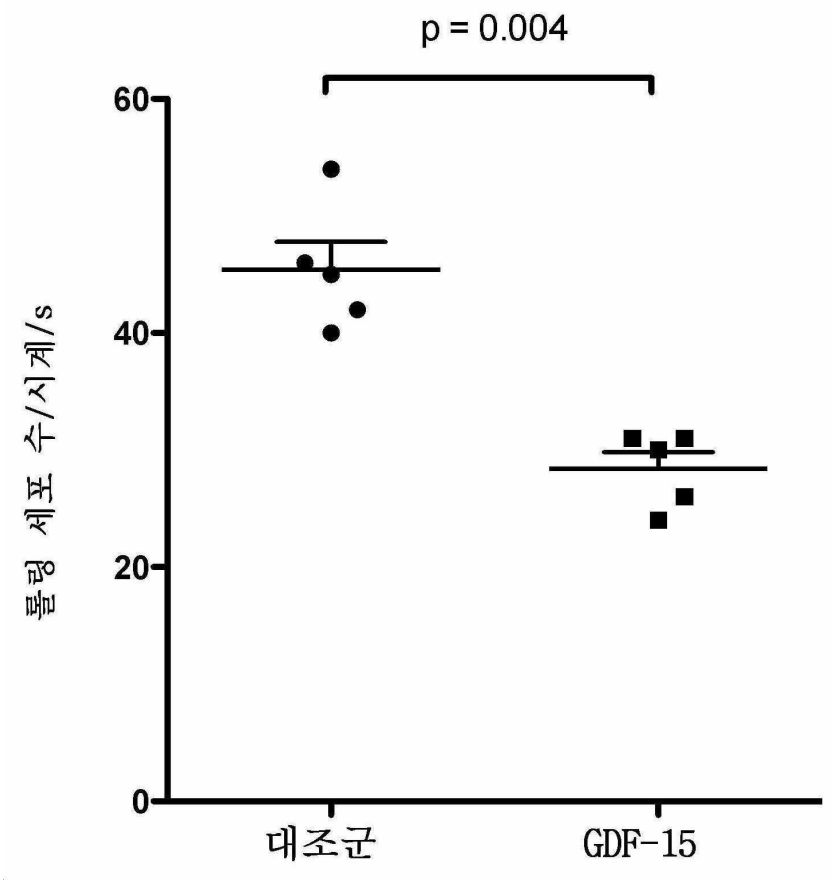
도면7b


CD8 (%)
0
10
20
30
0
1
2
3
4
6
8
9
12
GDF-15-스코어
스피어만 순위 상관성
스피어만 Rho: -0.3390
P=0.0038

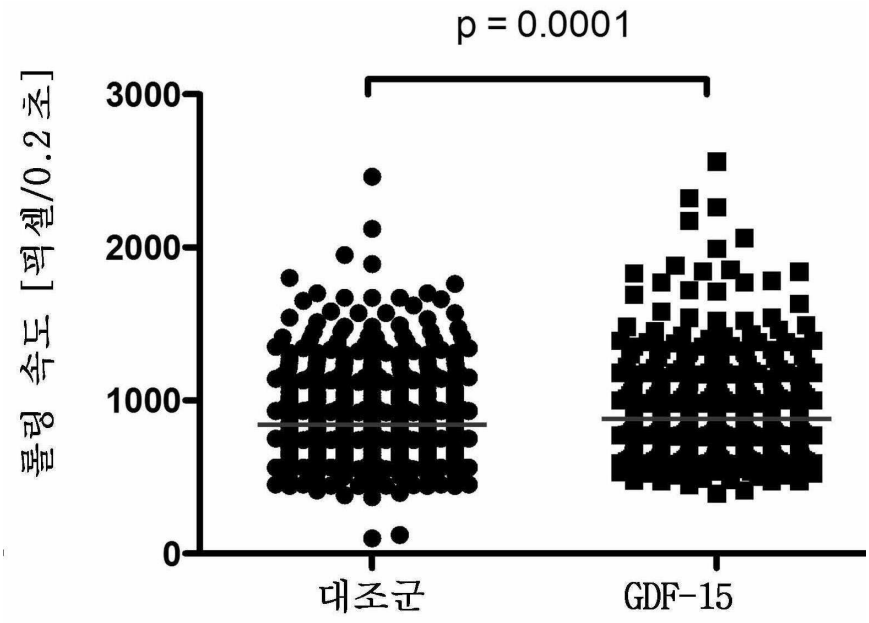
도면8



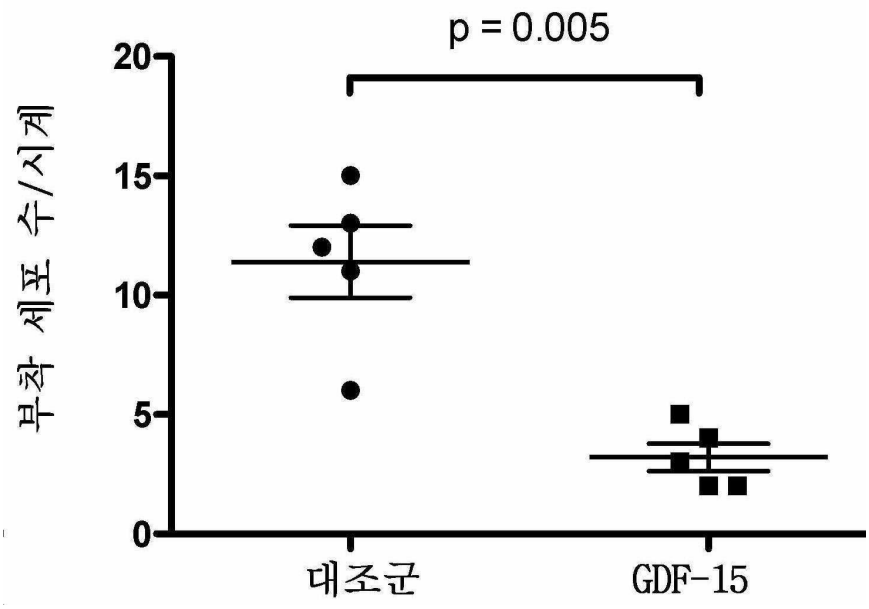
도면9a


p = 0.004
60
40
20
0
롤링 세포 수/시계/s
대조군
GDF-15

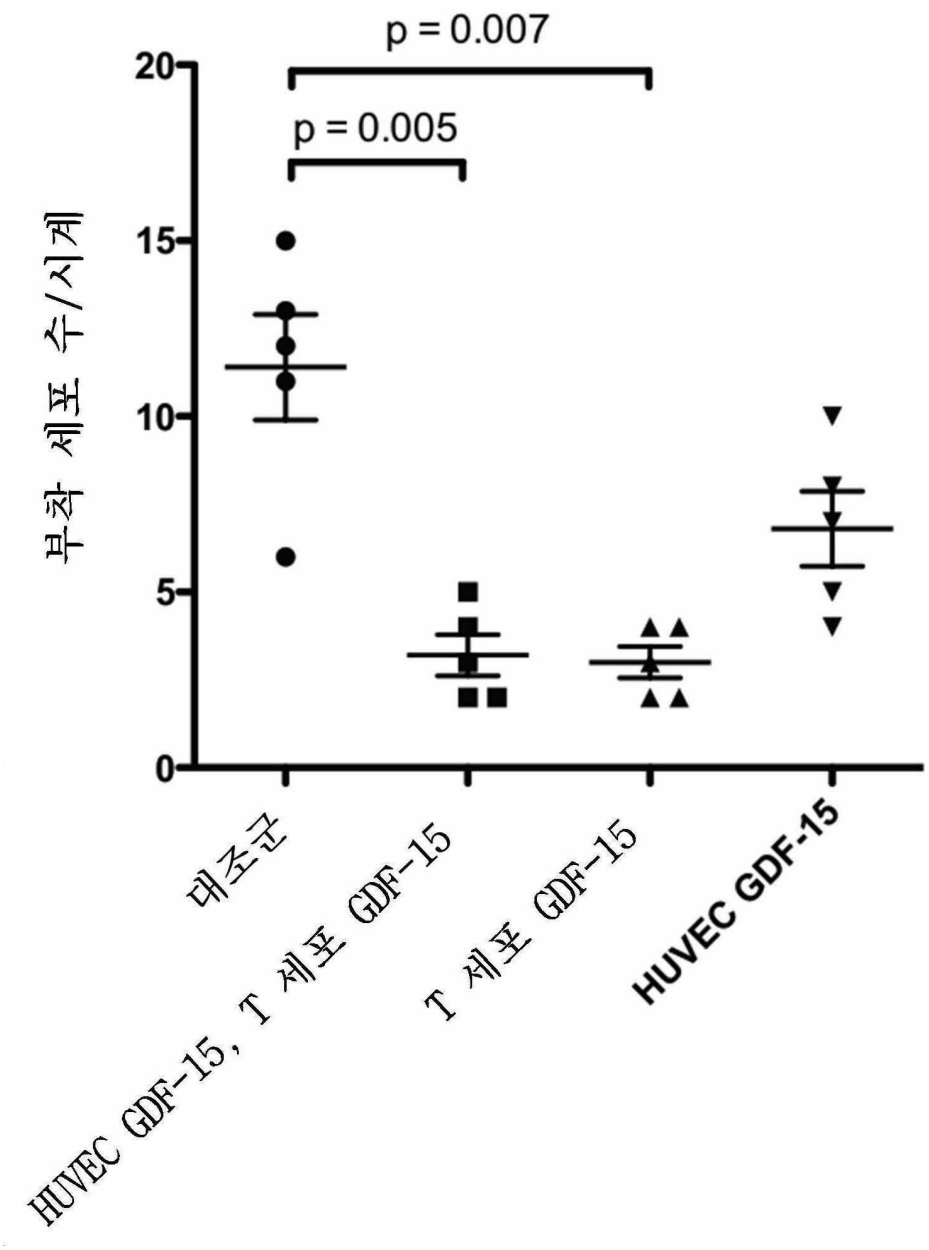
도면9b


p = 0.0001
3000
2000
1000
0
롤링 속도 [픽셀/0.2초]
대조군
GDF-15

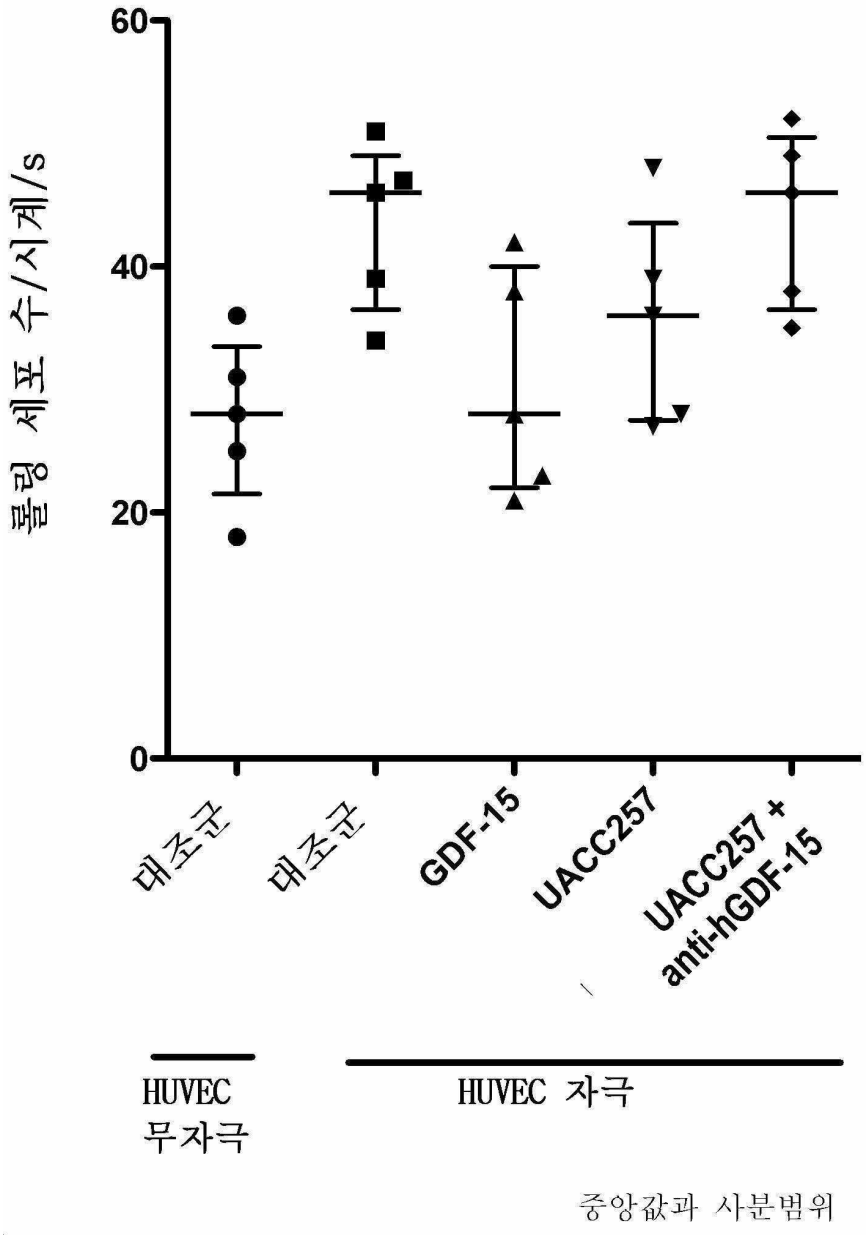
도면9c



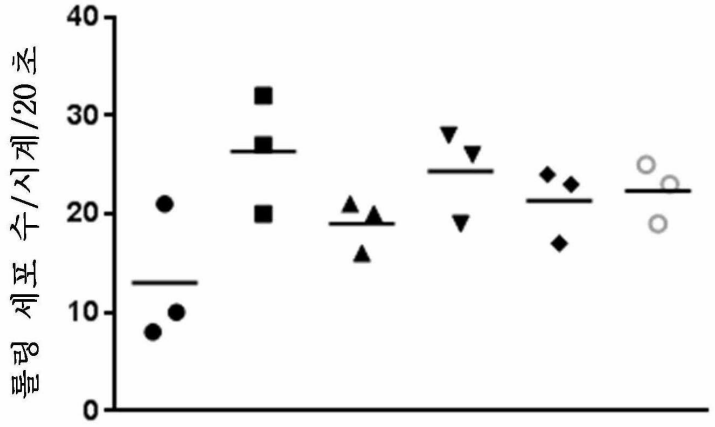
도면9d


p = 0.007
p = 0.005
부착 세포 수/시계
20
15
10
5
0
대조군
HUVEC GDF-15, T 세포 GDF-15
T 세포 GDF-15
HUVEC GDF-15

도면10a

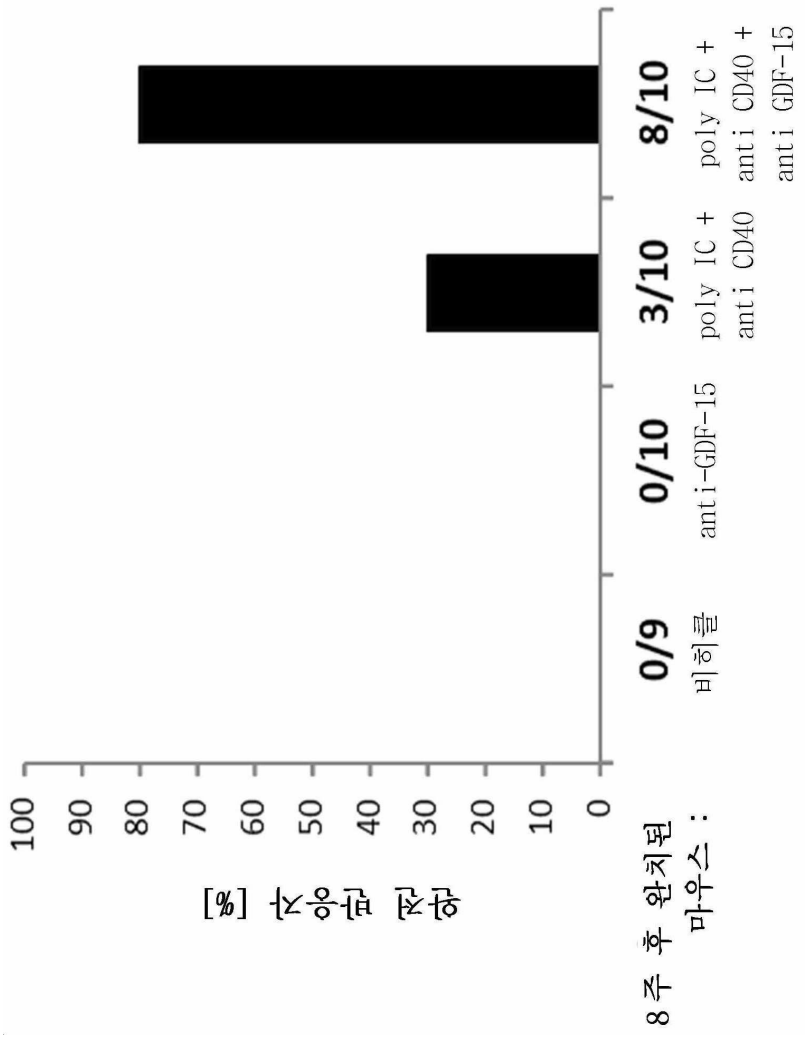

60
40
20
0
폴링 세포 수/시계/s
대조군
대조군
GDF-15
UACC257
UACC257 + anti-hGDF-15
HUVEC 무자극
HUVEC 자극
중앙값과 사분범위

도면10b

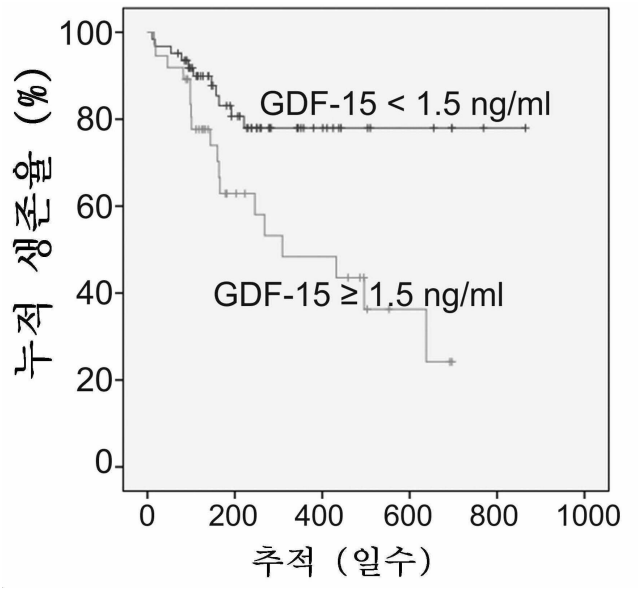


HUVEC 의 TNF-α 자극	w/o	+	+	+	+	+
T 세포와 GDF-15 의 예비-배양	w/o	w/o	+	+	+	+
GDF-15 와 항체의 예비-배양	w/o	w/o	w/o	+	+	+
항체:				H1 L5	01 G06	03 G05

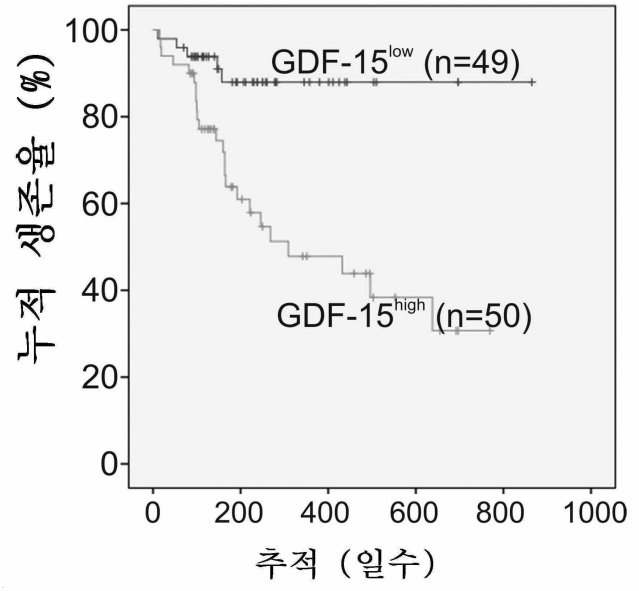
도면11


완전 반응자 [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
8주 후 완치된 마우스 :
0/9
비히클
0/10
anti-GDF-15
3/10
poly IC + anti CD40
8/10
poly IC + anti CD40 + anti GDF-15

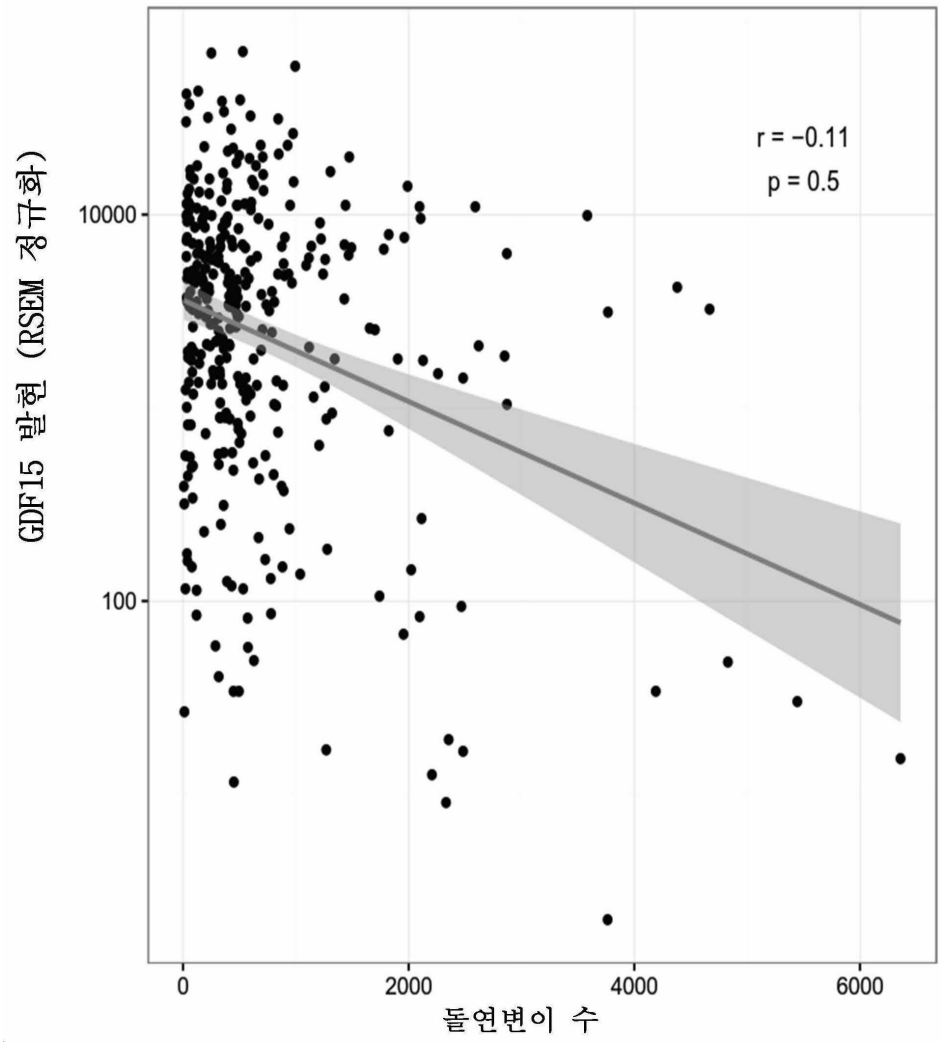
도면12


누적 생존율 (%)
100
80
60
40
20
0
GDF-15 < 1.5 ng/ml
GDF-15 ≥ 1.5 ng/ml
0
200
400
600
800
1000
추적 (일수)

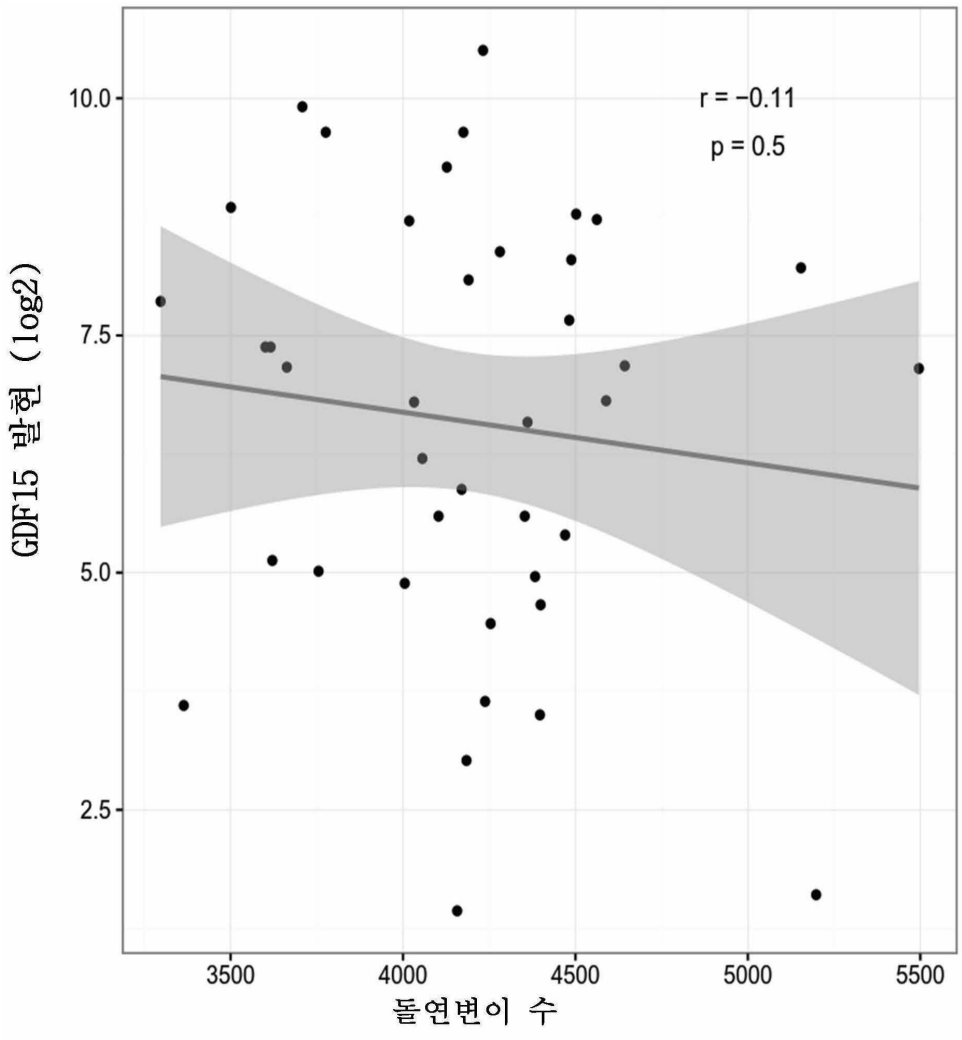
도면13


100
80
60
40
20
0
누적 생존율 (%)
GDF-15low (n=49)
GDF-15high (n=50)
0
200
400
600
800
1000
추적 (일수)

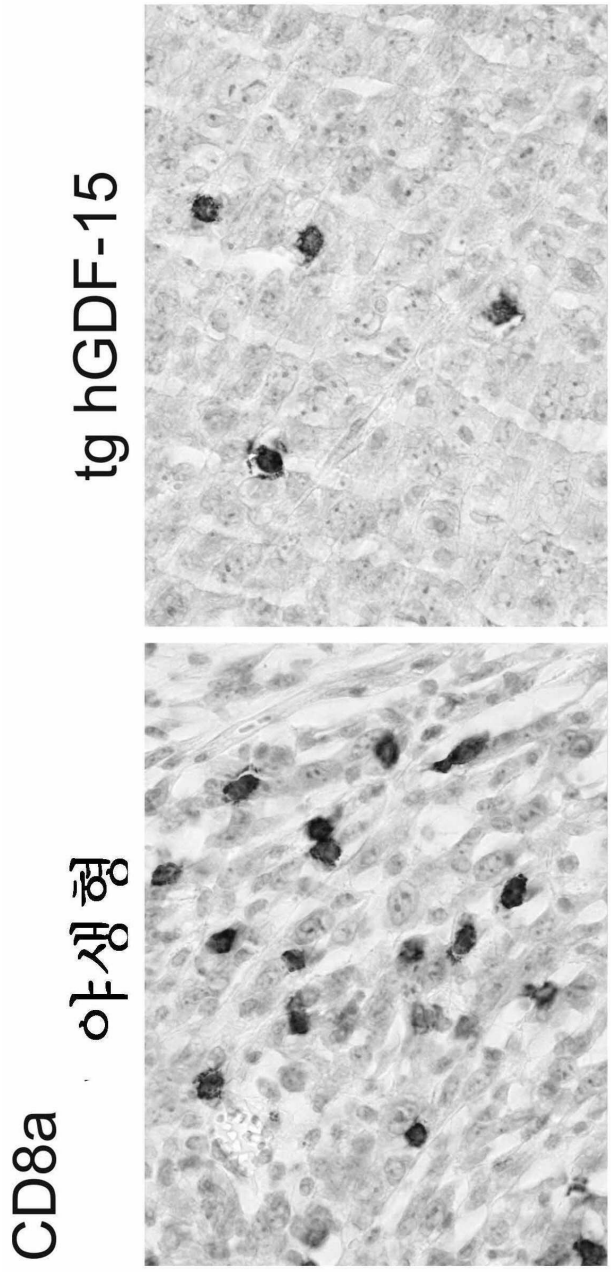
도면14a


r = −0.11
p = 0.5
10000
100
GDF15 발현 (RSEM 정규화)
0
2000
4000
6000
돌연변이 수

도면14b


r = −0.11
p = 0.5
GDF15 발현 (log2)
10.0
7.5
5.0
2.5
3500
4000
4500
5000
5500
돌연변이 수

도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Julius-Maximilians-Universitaet Wurzburg

<120> Combination therapy using inhibitors of human Growth and Differentiation Factor 15 (GDF-15) and immune checkpoint blockers

<130> 192306

<150> GB 1517531.8

<151> 2015-10-02

<150> GB 1607801.6

<151> 2016-04-29

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Thr
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Pro Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys

<210> 2

<211> 88

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys

85

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly

1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Asn Val Gly Thr Asn

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant mature human GDF-15 protein

<400> 8

Gly Ser Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys

1 5 10 15

Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala

20 25 30

Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly

35 40 45

Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys

50 55 60

Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys

65 70 75 80

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr

85 90 95

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His

100 105 110

Cys Ile

<210> 9

<211> 308

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Pro Gly Gln Glu Leu Arg Thr Val Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu
1 5 10 15

Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro His Gly Gly Ala Leu Ser Leu
20 25 30

Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro Gly Pro Ser Glu Leu His Ser
35 40 45

Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu
50 55 60

Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu
65 70 75 80

Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly
85 90 95

Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu
100 105 110

Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser
115 120 125

Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln
130 135 140

Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro Ala Leu His Leu Arg Leu Ser
145 150 155 160

Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala
165 170 175

Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg
180 185 190

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly
195 200 205

Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly
210 215 220

Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys

225 230 235 240

Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln
245 250 255
Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro
260 265 270
Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr
275 280 285
Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp
290 295 300

Cys His Cys Ile
305

<210> 10
<211> 322
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> human GDF-15 precursor protein + N-terminal and C-terminal GSGS linker
<400> 10

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Met Pro Gly Gln Glu Leu Arg Thr Val
1 5 10 15
Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro
20 25 30
His Gly Gly Ala Leu Ser Leu Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro

35 40 45
Gly Pro Ser Glu Leu His Ser Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg
50 55 60
Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp
65 70 75 80
Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu
85 90 95
Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile

100 105 110

Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His

115 120 125

Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val

130 135 140

Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro

145 150 155 160

Ala Leu His Leu Arg Leu Ser Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu

165 170 175

Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg

180 185 190

Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp

195 200 205

His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg

210 215 220

Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg

225 230 235 240

Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg

245 250 255

Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys

260 265 270

Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro

275 280 285

Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr

290 295 300

Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile Gly Ser Gly Ser Gly

305 310 315 320

Ser Gly

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flag peptide

<400> 11

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA peptide

<400> 12

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly

1 5 10

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide derived from human GDF-15

<400> 13

Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg

1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide derived from human GDF-15

<400> 14

Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide derived from human GDF-15

<400> 15

His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide derived from human GDF-15

<400> 16

Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide derived from human GDF-15

<400> 17

Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide derived from human GDF-15

<400> 18

Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg Ala Arg

1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide derived from human GDF-15

<400> 19

Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide derived from human GDF-15

<400> 20

Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys

1 5 10

<210> 21

<211> 291

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

caagtgaagc tgcagcagtc aggccctggg atattgcagt cctcccagac cctcagtctg 60

acttgttctt tctctgggtt ttcactgagt acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120

cagccttcag gaaagggtct ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180

tataacccaa ccctgaagag ccggctcaca atctccaagg atccctccag aaaccaggta 240

ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg t 291

<210> 22

<211> 264

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

gacattgtgc tcacccagtc tccaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtgg cctggtttct acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaagcact tatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa cgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgt 264

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 23

gctcgaagtt cctacggggc aatggactac 30

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

cagcaatata acaactttcc gtacacg 27

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 25

Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg

1 5 10 15

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys

1 5 10 15

Asp Cys His Cys Ile

20

<210> 27

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain of the H1L5 humanized

B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 27

```
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1               5                  10                  15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
            20                  25                  30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Thr

    50                  55                  60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Pro Ser Lys Asn Gln Val
65                  70                  75                  80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95
Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

        115                 120                 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

            180                 185                 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
```

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the H1L5 humanized B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 28

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Thr
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Pro Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of the heavy chain constant domain of the H1L5 humanized B1-23 anti-GDF-15 antibody
<400> 29
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 30

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain of the H1L5 humanized B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 30

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Pro Ser Val
100 105 110

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
115 120 125

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
130 135 140

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
145 150 155 160

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
165 170 175

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu

180 185 190

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg

195 200 205

Gly Glu Cys

210

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the H1L5 humanized B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 31

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 32

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain constant domain of the H1L5 humanized B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 32

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

1 5 10 15

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

20 25 30

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

35 40 45

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

50 55 60

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

65 70 75 80

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

85 90 95

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

<210> 33

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain of the chimeric B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 33

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Thr

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Pro Ser Arg Asn Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 34

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the

chimeric B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 34

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Thr

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Pro Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of the heavy chain constant domain of the chimeric B1-23 anti-GDF-15 antibody
<400> 35
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain of the chimeric B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 36

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 37

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the chimeric B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 37

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

<210> 38

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain constant domain of the chimeric B1-23 anti-GDF-15 antibody

<400> 38

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

20 25 30

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
35 40 45

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

50 55 60

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

65 70 75 80

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

85 90 95

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the 01G06 antibody

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gln Ile Asn Pro Asn Asn Gly Leu Ile Phe Phe Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Ala Ile Thr Thr Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the 01G06 antibody

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Leu His Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Asp Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the 03G05 antibody

<400> 41

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Val Leu Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the

03G05 antibody

<400> 42

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the

04F08 antibody

<400> 43

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Met Gly Val Thr Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Gln Thr Gly Tyr Ser Asn Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the

04F08 antibody

<400> 44

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the

06C11 antibody

<400> 45

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr

20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Asn Asn Arg Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Gln Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Trp Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ala

115

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the

06C11 antibody

<400> 46

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the

08G01 antibody

<400> 47

Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Ala Ile Thr Thr Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the 08G01 antibody

<400> 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the

14F11 antibody

<400> 49

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Glu Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ile Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Arg Gly His Tyr Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the

14F11 antibody

<400> 50

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro His
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
100 105

<210> 51

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the heavy chain variable domain of the

17B11 antibody

<400> 51

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Asn Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Lys Ser Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Arg Val Gly Gly Leu Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of the light chain variable domain of the 17B11 antibody

<400> 52

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Arg Phe Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Gly Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95
Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110