

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6840136号
(P6840136)

(45) 発行日 令和3年3月10日 (2021.3.10)

(24) 登録日 令和3年2月18日 (2021.2.18)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/574 (2006.01)

GO 1 N 33/574 Z N A A

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 7 5

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

GO 1 N 33/53 U

C O 7 K 16/22 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 F

請求項の数 17 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-516736 (P2018-516736)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月30日 (2016.9.30)
 (65) 公表番号 特表2018-535403 (P2018-535403A)
 (43) 公表日 平成30年11月29日 (2018.11.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/073521
 (87) 国際公開番号 W02017/055614
 (87) 国際公開日 平成29年4月6日 (2017.4.6)
 審査請求日 平成31年1月29日 (2019.1.29)
 (31) 優先権主張番号 1517528.4
 (32) 優先日 平成27年10月2日 (2015.10.2)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 黒色腫の診断マーカーとしてのGDF-15

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト黒色腫患者の生存の確率を予測するための方法であって、

a) 前記患者から得られたヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを決定する工程と、

b) 決定された前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルに基づいて、前記生存の確率を予測する工程とを含み、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減が、生存の確率の増大を示す、方法。

【請求項2】

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

【請求項3】

ヒト血液サンプルがヒト血清サンプルである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

hGDF-15閾値レベルが、1.1ng/mlから2.2ng/mlの間の範囲から選択されるレベルである、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

10

20

工程a)が、前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルを決定する工程を更に含み、

工程b)において、前記生存の確率がまた、決定された前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルに基づいても予測され、前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルの低減が生存の確率の増大を示し、

工程b)が、工程a)において決定された前記乳酸デヒドロゲナーゼのレベルを、乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルと比較する工程を含む又は含まず、前記確率がまた、工程a)において決定された前記乳酸デヒドロゲナーゼのレベルの、前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルとの比較に基づいても予測され、前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルと比較して低減されるか又は前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルである前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルは、生存の確率が、前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルでの生存の確率と比較して増大されるか又は前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルでの生存の確率を上回することを示し、

10

工程a)が、前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベルを決定する工程を更に含む又は含まず、工程b)において、前記生存の確率がまた、決定された前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベルに基づいても予測され、前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベルの低減が生存の確率の増大を示す、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

工程b)において、前記生存の確率がまた、前記患者の年齢に基づいても予測され、年齢の増大が生存の確率の低減を示す、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項7】

工程b)において、前記生存の確率がまた転移に基づいても予測され、肺以外の内臓器官における転移の存在は、生存の確率が肺以外の内臓器官からの転移がない場合の生存の確率と比較して低減されることを示す、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

ヒト黒色腫患者が、腫瘍のない黒色腫ステージIV患者ではない、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

ヒト黒色腫患者が、腫瘍のないステージIII黒色腫患者又は切除不能なステージIV黒色腫患者である、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項10】

ヒト黒色腫患者が、ステージIV黒色腫患者又はステージIII黒色腫患者である、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

工程a)が、hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分を使用することによってhGDF-15のレベルを決定する工程を含み、hGDF-15と結合可能な1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、hGDF-15と複合体を形成する、及び/又は、

1種又は複数の抗体が、少なくとも1種のポリクローナル抗体を含む、及び/又は、

1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、少なくとも1種のモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含み、

40

結合が、hGDF-15上のコンフォメーションアル又は不連続エピトープとの結合であり、コンフォメーションアル又は不連続エピトープが、配列番号25及び配列番号26のアミノ酸配列に含まれ、

抗体又はその抗原結合部分が、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分が、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域、及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

工程a)において、hGDF-15のレベルが、請求項11に定義されるモノクローナル抗体若し

50

くはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を捕捉することと、ポリクローナル抗体を用いてhGDF-15を検出すること、又はhGDF-15を捕捉する抗体とは異なるエピトープと結合するモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を検出することとによって決定される、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

in vitro方法である、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイによって決定される、及び/又は、

工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、電気化学発光アッセイによって決定される、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項15】

請求項1から14のいずれか一項に記載の方法を実行するように構成された装置。

【請求項16】

(i)ストレプトアビジンコーティングされたビーズ、

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

(iii)組換えhGDF-15、

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

(v)請求項1から14のいずれか一項に記載の方法における使用のための説明書、及び
(vi)前記組換えhGDF-15を包含する容器であって、組換えhGDF-15と接触する容器の表面が非接着材料でコーティングされている容器を含む検出キットであって、

20

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

【請求項17】

ヒト黒色腫患者の生存の確率の予測のためのin vitro方法における、請求項16に記載の検出キットの使用。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト黒色腫患者の生存の確率を予測するための方法、並びにこれらの方法において使用できる装置及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

乳酸デヒドロゲナーゼ(sLDH)の血清レベルは、黒色腫において最も広く使用されている予後バイオマーカーであり、2001年から遠隔転移を有する黒色腫患者のAJCCステージ分類システムに組み込まれている(Balch, CMら、J Clin Oncol / 19 / 3635～48頁 2001年)。

sLDHは、種々の研究グループによって切除不能な疾患を有する患者の独立予後マーカーとして同定されている(Sirott, MNら、Cancer / 72 / 3091～8頁 1993年;Eton, Oら、J Clin Oncol / 16 / 1103～11頁 1998年;Manola, Jら、J Clin Oncol / 18 / 3782～93頁 2000年)。

40

臨床研究の大きなプール(種々の固形腫瘍を有する31,857人の患者)に基づく包括的メタ解析からの結果から、すべての疾患サブグループ及びステージにわたって、OSに対するLDHの上昇の一貫した効果が確認され(HR=1.48、95%CI=1.43～1.53)、転移性腫瘍について特に関連していた。LDHによる腫瘍促進の根底にある正確な機序は不明のままであるが、低酸素及びワールブルグ効果による代謝のリプログラミングと関連する可能性があり、LDHはまた、高腫瘍負荷を反映する(Zhang, J., Yao, Y.-H., Li, B.-G., Yang, Q., Zhang, P.-Y.及びWang, H.-T.(2015年).Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and

50

meta-analysis. Scientific Reports 5、9800)。依然として、黒色腫患者の改善された予後バイオマーカーが必要である。

【0003】

S100Bの血清濃度(sS100B)は、再発を早期に検出するために疾患のエビデンスを有さない患者をスクリーニングするために主に欧州において広く使用されている(Pflugfelder, Aら、J Dtsch Dermatol Ges / 11 Suppl 6 / 1-116, 1~26頁 2013年)。Mocellinらによるメタ解析では、患者の生存を予測するためのsS100Bの適合性に関するエビデンスがまとめられている。すべてのステージを含む22シリーズの3393人の登録患者が、この解析に含まれていた。血清S100B陽性は、その他の予後因子とは独立して、すべてのステージの黒色腫患者において、特に、ステージIからIIIの患者のサブグループにおいて、より悪い生存と有意に関連していた(Mocellin, Sら、Int J Cancer / 123 / 2370~6頁 2008年)。先の研究において、sS100B及びsLDHは、遠隔転移を有する患者の予後に対して独立した影響を有していることが実証され、両マーカーの組み合わせられた解析を使用して、完全転移巣切除術のための患者を選択してもよい(Weide, Bら、PLoS One / 8 / e81624. 2013年; Weide, Bら、Br J Cancer / 107 / 422~8頁 2012年)。しかし、この大きなエビデンスにもかかわらず、黒色腫患者における日常的な臨床状況において、その実施に関する世界的な共通認識はない。

10

【0004】

マクロファージ阻害剤サイトカイン-1(MIC-1)、胎盤性TGF- β (PTGF β)、胎盤性骨形成タンパク質(PLAB)、非ステロイド性抗炎症薬活性化遺伝子(NAG1)又は前立腺由来因子(PDF)としても知られる成長分化因子15(GDF-15は、いくつかの種類の固形癌の腫瘍細胞において過剰発現される(Mimeault, Mら、Br J Cancer / 108 / 1079~91頁 2013年; Bock, AJら、Int J Gynecol Cancer / 20 / 1448~55頁2010年; Zhang, Lら、Oral Oncol / 45 / 627~32頁 2009年)。GDF-15は、p53、GSK-3 β 及びEGR-1を含むいくつかの腫瘍抑制因子経路によって誘導され(Wang, Xら、Biochem Pharmacol / 85 / 597~606頁 2013年)、ヌードマウス異種移植片モデルにおいて(Martinez, JMら、J Pharmacol Exp Ther / 318 / 899~906頁 2006年; Eling, TEら、J Biochem Mol Biol / 39 / 649~55頁 2006年)及びトランスジェニックマウス(Baek, SJら、Mol Pharmacol / 59 / 901~8頁 2001年)において示されるように、GDF-15自体が、腫瘍抑制効果を発揮できるというエビデンスもある。腫瘍細胞に関して、GDF-15について、アポトーシス促進効果及び抗アポトーシス効果の両方が記載されており(Mimeault, Mら、Br J Cancer / 108 / 1079~91頁 2013年; Baek, SJら、Mol Pharmacol / 59 / 901~8頁 2001年; Zimmers, TAら、J Cancer Res Clin Oncol / 136 / 571~6頁 2010年; Jones, MFら、Cell Death Differ / 2015年)、多数の可能性あるシグナル伝達経路が示唆されている(Mimeault, M及びBatra SK、J Cell Physiol / 224 / 626~35頁 2010年)。プロセッシングされていないプロタンパク質が核中に入り、そこで、TGF- β 依存性SMADシグナル伝達を、そしてそれによって転写パターンを変更することが示されたとき、更なる複雑性が最近付加された(Min, KWら、Oncogene / 2015年)。in vivoでは、構成的GDF-15過剰発現は腫瘍形成を低減したが、前立腺癌の動物モデルでは転移を増大した(Husaini, Yら、PLoS One / 7 / e43833. 2012年)。GDF-15は、癌悪液質を誘導すると更に示された(Johnen, Hら、Nat Med / 13 / 1333~40頁 2007年)。同様に、特許出願W02005/099746及びW02009/021293は、マウスにおいてin vivoで、腫瘍誘発性質量損失に対するヒトGDF-15(hGDF-15)の効果をアンタゴナイズ可能な抗ヒトGDF-15抗体(Mab26)に関する。W02014/049087及びPCT/EP2015/056654は、hGDF-15に対するモノクローナル抗体及びその医学的使用に関する。

20

30

40

【0005】

臨床的に、高いGDF-15血清レベル(sGDF-15)は、前立腺癌において骨転移の存在及び予後不良と相関することがわかった(Selander, KSら、Cancer Epidemiol Biomarkers Prev / 16 / 532~7頁 2007年)。結腸直腸癌では、高い血漿レベルを有する患者は、再発までのより短い時間及び全生存の低減を示した(Wallin, Uら、Br J Cancer / 104 / 1619~27頁 2011年)。GDF-15遺伝子における対立遺伝子H6D多型が、診断の時点での転移の独立予

50

測変数として更に同定された(Brown, DA, Clin Cancer Res / 9 / 2642～50頁 2003年)。高sGDF-15と悪いアウトカムの間関係は、甲状腺、膵臓、胃、卵巣及びその他の癌について更に示された(Mimeault, M及びBatra SK, J Cell Physiol / 224 / 626～35頁 2010年;Bauskin, ARら、Cancer Res / 66 / 4983～6頁 2006年;Brown, DAら、Clin Cancer Res / 15 / 6658～64頁 2009年;Blanco-Calvo, Mら、Future Oncol / 10 / 1187～202頁 2014年;Staff, ACら、Gynecol Oncol / 118 / 237～43頁 2010年)。同様の知見はまた、免疫組織化学によって評価されるようなGDF-15組織発現のレベルについても報告されている(Wallin, Uら、Br J Cancer / 104 / 1619～27頁 2011年)。黒色腫では、GDF-15発現は、良性母斑から原発黒色腫を越えて黒色腫転移まで増大することがわかった(Mauerer, Aら、Exp Dermatol / 20 / 502～7頁 2011年;Boyle, GMら、J Invest Dermatol / 129 / 383～91頁 2009年)。GDF-15の血清濃度は、ブドウ膜黒色腫を有する患者において転移について示し(Suesskind, Dら、Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol / 250 / 887～95頁 2012年)、皮膚黒色腫を有する患者においてステージと相関していた(Kluger, HMら、ClinCancer Res / 17 / 2417～25頁 2011年)。Rikerらは、黒色腫転移及び原発腫瘍における遺伝子発現を比較し、GDF-15を、転移と相関している上位5種の遺伝子の中で唯一の可溶性因子として同定した(Riker, AIら、BMC Med Genomics / 1 / 13頁 2008年)。Boyleら(Boyle, GMら、J Invest Dermatol / 129 / 383～91頁 2009年)は、免疫組織化学によって、22のうち15の原発性黒色腫が低レベルのGDF-15を発現したのに対し、16のうちの16の黒色腫転移は、強い発現を示したことを見出した。更に、3種の黒色腫細胞株におけるGDF-15のノックダウンは、同一の研究において腫瘍形成能の低減をもたらす。それ以前に、Talantovら(Talantov, Dら、Clin Cancer Res / 11 / 7234～42頁 2005年)は既に、黒色腫転移においてGDF-15を同定していたが、母斑及び正常なリンパ節では同定していない。GDF-15が転移性腫瘍において、及びいくつかの原発性黒色腫において優先的に発現されるが、色素性母斑においては発現されないことを見出したMauererらの研究において、同様の知見が報告された(Mauerer, Aら、Exp Dermatol / 20 / 502～7頁 2011年)。しかし、転移におけるGDF-15の直接的役割は年、前立腺癌においてのみ示されており、ここでは、GDF-15の構成的過剰発現は癌の発達を示したが、転移の増加は示さなかった(Husaini, Yら、PLoS One / 7 / e43833. 2012年)。黒色腫患者におけるGDF-15血清レベルの臨床的関連は、2つの研究において報告された。GDF-15血清濃度は、転移性(n=170)及び非転移性(n=18)ブドウ膜黒色腫を有する188人の患者のコホートにおいて転移と関連していた(Suesskind, Dら、Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol / 250 / 887～95頁 2012年)。最後に、Klugerらは、皮膚黒色腫を有する216人の患者において、GDF-15の血漿レベルとステージの間の相関を報告した(Kluger, HMら、ClinCancer Res / 17 / 2417～25頁 2011年)。しかし、これらの知見とは対照的に、いくつかの研究は、GDF-15の抗腫瘍性の役割を示唆した(例えば、Liu Tら:「Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells」Cancer Res., 第63巻、第16号、2003年8月1日、5034～5040頁を参照のこと)。

【0006】

したがって、上記の研究から、また、種々の癌におけるヒトGDF-15(hGDF-15)の複雑な機能的役割並びに前立腺癌における原発腫瘍及び転移に対するその異なる効果を考慮しても、hGDF-15が、黒色腫における患者生存についての予後臨床マーカーとして使用できるか否かは不明のままであった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】W02005/099746

【特許文献2】W02009/021293

【特許文献3】W02014/049087

【特許文献4】PCT/EP2015/056654

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【0008】

【非特許文献1】Balch, CMら、J Clin Oncol / 19 / 3635～48頁 2001年

【非特許文献2】Sirott, MNら、Cancer / 72 / 3091～8頁 1993年

【非特許文献3】Eton, Oら、J Clin Oncol / 16 / 1103～11頁 1998年

【非特許文献4】Manola, Jら、J Clin Oncol / 18 / 3782～93頁 2000年

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

【非特許文献6】Pflugfelder, Aら、J Dtsch Dermatol Ges / 11 Suppl 6 / 1-116, 1～26頁 2013年 10

【非特許文献7】Mocellin, Sら、Int J Cancer / 123 / 2370～6頁 2008年

【非特許文献8】Weide, Bら、PLoS One / 8 / e81624. 2013年

【非特許文献9】Weide, Bら、Br J Cancer / 107 / 422～8頁 2012年

【非特許文献10】Mimeault, Mら、Br J Cancer / 108 / 1079～91頁 2013年

【非特許文献11】Bock, AJら、Int J Gynecol Cancer / 20 / 1448～55頁2010年

【非特許文献12】Zhang, Lら、Oral Oncol / 45 / 627～32頁 2009年

【非特許文献13】Wang, Xら、Biochem Pharmacol / 85 / 597～606頁 2013年

【非特許文献14】Martinez, JMら、J Pharmacol Exp Ther / 318 / 899～906頁 2006年 20

【非特許文献15】Eling, TEら、J Biochem Mol Biol / 39 / 649～55頁 2006年

【非特許文献16】Baek, SJら、Mol Pharmacol / 59 / 901～8頁 2001年

【非特許文献17】Zimmers, TAら、J Cancer Res Clin Oncol / 136 / 571～6頁 2010年

【非特許文献18】Jones, MFら、Cell Death Differ / 2015年

【非特許文献19】Min, KWら、Oncogene / 2015年

【非特許文献20】Husaini, Yら、PLoS One / 7 / e43833. 2012年

【非特許文献21】Johnen, Hら、Nat Med / 13 / 1333～40頁 2007年

【非特許文献22】Selander, KSら、Cancer Epidemiol Biomarkers Prev / 16 / 532～7頁 2007年 30

【非特許文献23】Wallin, Uら、Br J Cancer / 104 / 1619～27頁 2011年

【非特許文献24】Brown, DA、Clin Cancer Res / 9 / 2642～50頁 2003年

【非特許文献25】Mimeault, M及びBatra SK、J Cell Physiol / 224 / 626～35頁 2010年

【非特許文献26】Bauskin, ARら、Cancer Res / 66 / 4983～6頁 2006年

【非特許文献27】Brown, DAら、Clin Cancer Res / 15 / 6658～64頁 2009年

【非特許文献28】Blanco-Calvo, Mら、Future Oncol / 10 / 1187～202頁 2014年

【非特許文献29】Staff, ACら、Gynecol Oncol / 118 / 237～43頁 2010年

【非特許文献30】Wallin, Uら、Br J Cancer / 104 / 1619～27頁 2011年

【非特許文献31】Mauerer, Aら、Exp Dermatol / 20 / 502～7頁 2011年 40

【非特許文献32】Boyle, GMら、J Invest Dermatol / 129 / 383～91頁 2009年

【非特許文献33】Suesskind, Dら、Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol / 250 / 887～95頁 2012年

【非特許文献34】Kluger, HMら、ClinCancer Res / 17 / 2417～25頁 2011

【非特許文献35】Riker, AIら、BMC Med Genomics / 1 / 13頁 2008年

【非特許文献36】Talentov, Dら、Clin Cancer Res / 11 / 7234～42頁 2005年

【非特許文献37】Liu Tら:「Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells.」Cancer Res.、第63巻、第16号、2003年8月1日、5034～5040頁

【非特許文献38】Paul, W.E.(編):Fundamental Immunology第2版Raven Press、Ltd.、N 50

ew York 1989年の第7章

【非特許文献 3 9】Kabatら(Sequences of proteins of immunological interest、U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health、Bethesda、Md. 1983年)

【非特許文献 4 0】Chothiaら(Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989年12月21～28日;342(6252):877～83頁)

【非特許文献 4 1】Giudicelliら(IMG/QUEST、an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res.2004年7月1日;32(Web Server issue):W435-40)

【非特許文献 4 2】Kohler及びMilstein(Nature、1975年8月7日;256(5517):495～7頁) 10

【非特許文献 4 3】Harlow及びLane(「Antibodies: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York 1988)

【非特許文献 4 4】Clacksonら(Nature. 1991年8月15日;352(6336):624～8頁)

【非特許文献 4 5】Marksら(J Mol Biol. 1991年12月5日;222(3):581～97頁)

【非特許文献 4 6】Riechmannら(Nature. 1988年3月24日;332(6162):323～7頁)

【非特許文献 4 7】Jonesら(Nature. 1986年5月29日～6月4日;321(6069):522～5頁)

【非特許文献 4 8】Holliger Pら(「Diabodies」:small bivalent and bispecific fragments」 Proc Natl Acad Sci U S A. 1993年7月15日;90(14):6444～8頁)

【非特許文献 4 9】Holt LJら(「Domain antibodies: proteins for therapy」 Trends Biotechnol. 2003年11月;21(11):484～90頁) 20

【非特許文献 5 0】Saerens Dら(「Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics」 Curr Opin Pharmacol. 2008年10月;8(5):600～8頁. Epub 2008年8月22日)

【非特許文献 5 1】Arbabi Ghahroudi Mら(「Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies」 FEBS Lett. 1997年9月15日;414(3):521～6頁)

【非特許文献 5 2】Weinberg R.ら: The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006年 850頁

【非特許文献 5 3】Tanno Tら:「Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease」 Curr Opin Hematol. 2010年5月;17(3):184～190頁 30

【非特許文献 5 4】Goncalvesら:「Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury.」 Clinical Biochemistry 41 (2008年) 755～763頁

【非特許文献 5 5】Sambrookら(「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York 1989)

【非特許文献 5 6】Ausubelら(「Current Protocols in Molecular Biology.」Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992年)

【非特許文献 5 7】Altschulら(1990年)「Basic local alignment search tool.」 Journal of Molecular Biology 215.403～410頁

【非特許文献 5 8】Altschulら:(1997年) Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389～3402頁 40

【非特許文献 5 9】Siegel DL(「Recombinant monoclonal antibody technology」 Transfus Clin Biol. 2002年1月;9(1):15～22頁)

【非特許文献 6 0】Suckauら Proc Natl Acad Sci U S A. 1990年12月;87(24):9848～9852頁

【非特許文献 6 1】Lasithiotakis,KGら、Cancer/107/1331～9頁 2006年

【非特許文献 6 2】Balch, CMら、J Clin Oncol / 27 / 6199～206頁 2009年

【非特許文献 6 3】Wevers, KPら、Ann Surg Oncol / 20 / 2772～9頁 2013年

【非特許文献 6 4】Camp, RLら、Clin Cancer Res / 10 / 7252～9頁 2004年

【非特許文献 6 5】Pflugfelder, Aら、J Dtsch Dermatol Ges / 11 / 563～602頁 2 50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、当技術分野で、黒色腫の予後バイオマーカー、特に、黒色腫における改善された予後バイオマーカー及び黒色腫において患者生存をより確実に予測することを可能にする方法が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

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

10

【0011】

特に、上記の問題を解決するために、本発明者らは、黒色腫患者の全生存(OS)に対する血清GDF-15レベルの影響を調べるように設定した。これらの研究の過程で、本発明者らは、驚くべきことに、黒色腫患者における生存の確率が、患者血清中のhGDF-15レベルが増大するにつれ有意に低減すること、逆もまた同様であることを見出した。例えば、本発明者らは、hGDF-15の高い血清レベルは、腫瘍のないステージIII及び切除不能なステージIV黒色腫患者における悪い全生存の強力なバイオマーカーであることを示した。

【0012】

したがって、本発明によれば、黒色腫患者における生存の確率は、hGDF-15レベルと逆

20

【0013】

更に、本発明者らの研究では、コックス回帰分析によって、hGDF-15血清レベルの知識は独立予後情報を付加し、例えば、Mカテゴリーと組み合わせて考慮した場合に、遠隔転移を有する患者における確率されたバイオマーカーLDHよりも優れていることが示された。

【0014】

したがって、本発明によれば、hGDF-15レベルを生存の予測のためのバイオマーカーとして使用できる。このバイオマーカーは、例えば、LDH等の既知バイオマーカーと独立している予後値を有するので有利である。これは、hGDF-15レベルを本発明に従う黒色腫患者生存の予測のために使用する場合には、本発明の好ましい態様では、それらを更なるバイオマーカーと組み合わせてもよいということを意味する。

30

【0015】

本発明によれば、バイオマーカーとしてのhGDF-15レベルの、LDH又はS100B等の更なるバイオマーカーとの組合せは、改善された生存の予測を提供し、これは、hGDF-15レベル単独の使用と比較された場合でさえ改善される。

【0016】

更に、バイオマーカーとしてのhGDF-15レベルの使用はまた、S100Bが唯一の利用可能な予測及び診断マーカーに相当する巨視的に腫瘍のないステージIII患者等の黒色腫患者のサブグループを含む生存の予測を提供することを可能にするので、有利である。

【0017】

したがって、本発明は、以下に記載される好ましい実施形態を提供することによって、黒色腫患者の生存を予測するための改善された手段を提供する：

40

【0018】

1. ヒト黒色腫患者の生存の確率を予測するための方法であって、
a) 前記患者から得られたヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを決定する工程と、
b) 前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15の決定されたレベルに基づいて、前記生存の確率を予測する工程とを含み、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減が、生存の確率の増大を示す方法。

2. 工程b)が、工程a)において決定された前記hGDF-15のレベルを、hGDF-15閾値レベルと比較する工程を含み、工程a)において決定された前記hGDF-15のレベルの、前記hGDF-15閾

50

値レベルとの比較に基づいて前記確率が予測され、前記hGDF-15閾値レベルと比較して低減される前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルは、生存の確率が前記hGDF-15閾値レベルでの生存の確率又はそれを上回る生存の確率と比較して増大されることを示す、項目1に記載の方法。

3. ヒト血液サンプルがヒト血清サンプルである、項目1又は2に記載の方法。

4. hGDF-15閾値レベルが、1.1ng/mlから2.2ng/mlの間の範囲から選択されるレベルであり、hGDF-15閾値レベルが、好ましくは、1.2ng/mlから2.0ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであり、hGDF-15閾値レベルが、より好ましくは、1.3ng/mlから1.8ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルであり、hGDF-15閾値レベルが、更により好ましくは、1.4ng/mlから1.6ng/mlの間の範囲から選択されるhGDF-15レベルである、項目3に記載の方法。

10

5. hGDF-15閾値レベルが、1.5ng/mlである、項目4に記載の方法。

6. hGDF-15閾値レベルが、3.3ng/mlから4.3ng/mlの間の範囲から選択されるレベルであり、hGDF-15閾値レベルが、好ましくは、3.6ng/mlから4.0ng/mlの間の範囲から選択されるレベルであり、hGDF-15閾値レベルが、より好ましくは、3.8である、項目3に記載の方法。

7. 工程a)が、前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルを決定する工程を更に含み、

工程b)において、前記生存の確率がまた、前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼの決定されたレベルに基づいて予測され、前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルの低減が生存の確率の増大を示す、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

20

8. 工程b)が、工程a)において決定された前記乳酸デヒドロゲナーゼのレベルを、乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルと比較する工程を含み、前記確率がまた、工程a)において決定された前記乳酸デヒドロゲナーゼのレベルの、前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルとの比較に基づいて予測され、前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルと比較して低減されるか又は前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルである前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルは、生存の確率が前記乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルを上回る生存の確率と比較して増大されることを示す、項目7に記載の方法。

9. 工程a)が、前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベルを決定する工程を更に含み、

30

工程b)において、前記生存の確率がまた、前記ヒト血液サンプル中のS100Bの決定されたレベルに基づいて予測され、前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベルの低減が生存の確率の増大を示す、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

10. 工程b)が、工程a)において決定された前記S100Bのレベルを、100B閾値レベルと比較する工程を含み、前記確率が、工程a)において決定された前記S100Bのレベルの前記S100B閾値レベルとの比較に基づいて予測され、前記S100B閾値レベルと比較して低減されるか又は前記S100B閾値レベルである前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベルは、生存の確率が前記S100B閾値レベルを上回る生存の確率と比較して増大されることを示す、項目9に記載の方法。

11. 工程b)において、前記生存の確率がまた、前記患者の年齢に基づいて予測され、年齢の増大が生存の確率の低減を示す、項目1から10のいずれか一項に記載の方法。

40

12. 工程b)が、前記患者の前記年齢を閾値年齢と比較する工程を含み、前記確率が、前記患者の前記年齢の前記閾値年齢との比較に基づいて予測され、前記閾値年齢と比較して同等であるか又は増大される前記患者の年齢は、生存の確率が前記閾値年齢を下回る生存の確率と比較して低減されることを示す、項目11に記載の方法。

13. 前記閾値年齢が、60から65歳の範囲から選択される、項目12に記載の方法。

14. 前記閾値年齢が、63歳である、項目13に記載の方法。

15. 工程b)において、前記生存の確率がまた転移に基づいて予測され、肺以外の内臓器官における転移の存在は、生存の確率が肺以外の内臓器官からの転移がない場合の生存の確率と比較して低減されることを示す、項目1から14のいずれか一項に記載の方法。

50

16. ヒト黒色腫患者が、腫瘍のない黒色腫ステージIV患者ではない、項目1から15のいずれか一項に記載の方法。

17. ヒト黒色腫患者が、腫瘍のないステージIII黒色腫患者又は切除不能なステージIV黒色腫患者である、項目1から16のいずれか一項に記載の方法。

18. ヒト黒色腫患者が、ステージIV黒色腫患者である、項目1から16のいずれか一項に記載の方法。

19. ヒト黒色腫患者が、ステージIII黒色腫患者である、項目1から16のいずれか一項に記載の方法。

20. ヒト黒色腫患者が、腫瘍のないステージIII黒色腫患者である、項目17に記載の方法。

21. ヒト黒色腫患者が、切除不能なステージIV黒色腫患者である、項目17に記載の方法。

22. 工程a)が、hGDF-15又はその抗原結合部分と結合可能な1種又は複数の抗体を使用することによって、hGDF-15のレベルを決定する工程を含む、項目1から21のいずれか一項に記載の方法。

23. hGDF-15又はその抗原結合部分と結合可能な1種又は複数の抗体が、hGDF-15と複合体を形成する、項目22に記載の方法。

24. 1種又は複数の抗体が、少なくとも1種のポリクローナル抗体を含む、項目22又は23に記載の方法。

25. 1種又は複数の抗体又はその抗原結合部分が、少なくとも1種のモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を含む、項目22、23又は24に記載の方法。

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

27. 抗体又はその抗原結合部分が、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分が、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む、項目25又は26に記載の方法。

28. 工程a)において、hGDF-15のレベルが、請求項25から27のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を捕捉すること、及びポリクローナル抗体を用いてhGDF-15を検出すること、又はhGDF-15を捕捉する抗体とは異なるエピトープと結合するモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を用いてhGDF-15を検出することによって決定される、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

29. in vitro方法である、項目1から28のいずれか一項に記載の方法。

30. 工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイによって決定される、項目1から29のいずれか一項に記載の方法。

31. 工程a)において、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが、電気化学発光アッセイによって決定される、項目1から29のいずれか一項に記載の方法。

32. 電気化学発光アッセイが、

(A) ストレプトアビジンコーティングされたビーズ、

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

(C) サンプル由来のhGDF-15、及び

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

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

方法が、電気化学発光を測定することによって検出複合体を検出する工程を更に含み、

10

20

30

40

50

ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが電気化学発光測定に基づいて決定される、項目31に記載の方法。

33. 項目1から32のいずれか一項に記載の方法を実施するように構成された装置。

34. 項目31又は項目32に記載の方法を実施するように構成された電気化学発光分析器である、項目25に記載の装置。

35. (i) ストレプトアビジンコーティングされたビーズ、

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

(iii) 好ましくは、4~7の範囲のpHを有する、組換えhGDF-15を含む緩衝溶液の形態の組換えhGDF-15、

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

(v) 使用のための説明書、好ましくは、項目1から32に記載の方法における使用のための説明書、及び好ましくは、

(vi) 前記組換えhGDF-15が入っている容器であって、組換えhGDF-15と接触する容器の表面が非接着材料でコーティングされている容器を含む検出キットであって、

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

36. hGDF-15と結合可能な第1の抗体又はその抗原結合部分及びhGDF-15と結合可能な第2の抗体又はその抗原結合部分のうち一方が、項目26から28のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合部分である、項目35に記載の検出キット。

37. ヒト黒色腫患者の生存の確率の予測のためのin vitro方法における、項目35又は36に記載の検出キットの使用。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】 図1は、GDF-15血清レベルに従うそれぞれの黒色腫患者集団の全生存を示す図である。正常(<1.5ng/mL)又は高い(≥ 1.5 ng/mL)GDF-15レベルのいずれかを有する、468人の腫瘍のないステージIII(A)、206人の切除不能なステージIV(B)及び87人の腫瘍のないステージIV(C)患者の全生存のカプランマイヤー曲線が示されている。打ち切りは垂直線によって示されており、p値はログランク統計学によって算出した。図1A及び1Bでは、上部の曲線は、正常hGDF-15レベルのものであり、下部の曲線は、高いhGDF-15レベルのものである。

【図1B】 図1Bを示す。

【図1C】 図1Cを示す。

【図2】 図2は、S100B及びGDF-15血清レベルの組合せ並びにステージIII患者の全生存とのその相関を示す図である。コックス回帰モデルを使用して、S100B及びhGDF-15レベルは、腫瘍のないステージIII患者の予後を独立に予測することが示された。異なるバイオマーカーの組合せを用いる患者の全生存のカプランマイヤー曲線が、466人の患者について示されている。打ち切りは垂直線によって示されている。図2では、最も高い曲線は正常hGDF-15レベル及び正常S100Bレベルの曲線であり、2番目に高い曲線は高いhGDF-15レベルの曲線であり、2番目に低い曲線は高いS100Bレベルの曲線であり、最も低い曲線は高いhGDF-15レベル及び高いS100Bレベルのものである。

【図3A】 図3は、LDH及びGDF-15の血清レベルの組合せ、及び遠隔転移のパターンに従う切除不能なステージIV患者の全生存を示す図である。全生存に対するGDF-15血清レベルの独立した予後影響が、MカテゴリーM1a/b(A)並びにM1c患者(B)について例示されている。破線は所与のMカテゴリーの全患者を示す。連続線はそれぞれ、低い(青)又は高い(赤)GDF-15レベルを有するサブグループを表す。高い又は低いGDF-15レベルを有する患者間のOSの相違は、M1a/bについて、及びM1c患者について有意であった(それぞれ、ログランクp値0.047及び0.003)。(C)では、全生存は、コックス回帰分析のモデル1に従う3種の独立予後

因子すべてを考慮して、好適ではない値の数に従って示されている(LDHレベル、内臓転移のパターン及びGDF-15レベル)。図のパネル(A)～(C)中に含有される説明文中の曲線の順序(すなわち、最も上の曲線から最も下の曲線)は、それぞれのパネル中の曲線の順序を反映する。

【図3B】図3Bを示す。

【図3C】図3Bを示す。

【図4A】図4は、黒色腫患者において全生存が、GDF-15血清レベルと相関することを示す。762人の患者を2つのコホートに無作為に割り当てた。同定コホート(254人の患者)では、種々のカットオフ値をカプランマイヤー解析及びログランク検定によって試験して、高いGDF-15血清レベル及び低いGDF-15血清レベルを有する患者間の最良の可能性ある識別を得た。最適化されたカットオフ点に従う($<1.5\text{ng/mL}$ 対 $\geq 1.5\text{ng/mL}$)同定コホートの患者の全生存が(A)に示されている。全生存の相違は、検証コホート(B)の508人の患者において確認された。打ち切りは垂直線によって示されており、p値はログランク統計学によって算出した。図4A及び4Bでは、上の曲線は正常hGDF-15レベルのものであり、下の曲線は高いhGDF-15レベルのものである。

【図4B】図4Bを示す。

【図5A】図5は、S100B血清レベルに従う全生存を示す図である。466人の腫瘍のないステージIII(A)、193人の切除不能なステージIV(B)及び83人の腫瘍のないステージIV(C)の患者の全生存のカプランマイヤー曲線が示されている。患者を、S100B血清レベルに基づいてカテゴリー化した(正常対高い)。打ち切りは垂直線によって示されており、p値はログランク統計学によって算出した。図5A～5Cでは、上の曲線は正常S100Bレベルのものであり、下の曲線は高いS100Bレベルのものである。

【図5B】図5Bを示す。

【図5C】図5Cを示す。

【図6】図6は、GDF-15、S100Bの血清レベル、年齢及びサブステージを考慮して、好適ではない値の数に従う、ステージIII患者の全生存を示す図である。コックス回帰分析のモデル2(Table 2(表3))は、GDF-15レベル $>1.5\text{ng/mL}$ の、高いS100Bレベルの、年齢 <63 歳の、及びサブステージIIICの独立した負の予後影響を示した。ここで、患者をそれらの4種の因子の間の好適ではない値の数に従って層別化した。得られた全生存のカプランマイヤー曲線が示されており、打ち切りは垂直線によって示されている。最も高い曲線は、すべての因子が好適である曲線である。2番目に高い曲線は、1種の因子が好適ではない曲線である。3番目に高い曲線は、2つの因子が好適ではない曲線である。2番目に低い曲線は、3種の因子が好適ではない曲線である。最も低い曲線は、すべての因子が好適ではない曲線である。

【図7】図7は、GDF-15、S100Bの血清レベル、遠隔転移のパターン及び年齢を考慮して、好適ではない値の数に従う、切除不能なステージIV患者の全生存を示す図である。コックス回帰分析のモデル2(表3)は、GDF-15レベル $>1.5\text{ng/mL}$ の、高いS100Bレベルの、肺以外の内臓器官の転移関与の、及び63歳以上の年齢の、独立した負の予後影響を示した。したがって、患者を好適ではない因子の数に従って層別化した。得られた全生存のカプランマイヤー曲線が示されており、打ち切りは垂直線によって示されている。最も上の曲線は、すべての因子が好適である曲線である。2番目に高い曲線は、1種の因子が好適ではない曲線である。3番目に高い曲線は、2つの因子が好適ではない曲線である。2番目に低い曲線は、3種の因子が好適ではない曲線である。最も低い曲線は、すべての因子が好適ではない曲線である。

【図8】図8は、種々の因子の組合せに従う、ステージIII患者の血清サンプリング後の全生存を示す図である。多変量解析(sGDF-15、sS100B、局所領域転移のパターン)に従って単一の独立因子の相対的影響を考慮するRのノモグラム関数を使用して、腫瘍のないステージIII患者のノモグラム(a)を開発した。完全データを用いて466人のステージIII患者の0から266ポイントの間の範囲のリスクスコアを算出した。(b)では、異なるリスクスコアカテゴリーの、血清サンプリング後の全生存のカプランマイヤー曲線が示されている。打

ち切りは垂直線によって示されている。

【図9】図9は、種々の因子の組合せに従う、切除不能なステージIV患者の血清サンプリ
ング後の全生存を示す図である。GDF-15血清レベルは、Mカテゴリーに加えて切除不能な
ステージIV患者の全生存に対して独立した影響を有する。これは、M1a/b患者(a)及びM1c
患者(b)両方におけるsGDF-15に従うOSにおける有意差によって例示されている。多変量解
析(sGDF-15、sS100B、CNS関与及び関与する遠隔部位の数)に従って単一の独立因子の相対
的影響を考慮するRのノモグラム関数を使用して、切除不能なステージIV患者のノモグラ
ム(c)を開発した。完全データを用いて193人の切除不能なステージIV患者の0から334ポイ
ントの間の範囲のリスクスコアを算出した。(d)では、異なるリスクスコアカテゴリーの
、血清サンプリング後の全生存のカプランマイヤー曲線が示されている。打ち切りは垂直
線によって示されている。

10

【図10】図10は、sGDF-15の、ステージ/疾患状態及びsLDHとの相関を示す図である。腫
瘍のないステージIII(n=468)、腫瘍のないステージIV患者(n=87)及び切除不能なステージ
IV患者(n=206)の血清GDF-15レベルが示されている(a)。切除不能なステージIV患者では、
sGDF-15は、遠隔転移の数に従って示されている(b)、又はsLDHに従って層別化されている
(c)。赤色バーは、GDF-15の中央値レベルを示す;マン-ホイットニー検定を使用して、**
p<0.01;*** p<0.001。

【図11】図11は、黒色腫患者において、血清サンプリング後の全生存が、GDF-15血清レ
ベルと相関することを示す図である。761人の患者を2つのコホートに無作為に割り当てた
。同定コホート(254人の患者)では、種々のカットオフ値を、カプランマイヤー解析及び
ログランク試験によって試験して、高いGDF-15血清レベル及び低いGDF-15血清レベルを有
する患者間の最良の可能性ある識別を得た。最適化されたカットオフ点に従う(<1.5ng/mL
対 $\geq$ 1.5ng/mL)同定コホートの患者の血清サンプリング後の全生存が、(a)に示されている
。血清サンプリング後の全生存の相違は、検証コホート(B)の507人の患者において確認さ
れた(b)。打ち切りは垂直線によって示されている;p値はログランク統計学によって算出
した。

20

【図12-1】図12は、腫瘍のないステージIII患者における、sGDF-15、sS100B及びsLDH
の、血清サンプリングの時点に従うOSとの関連を示す図である。血清サンプリング前の最
後の再発の時点に従う、sGDF-15(左)、sS100B(中央)及びsLDH(右)に従う腫瘍のないステ
ージIII患者の全生存。患者を、最後の転移の検出から6カ月未満(a~c)、6カ月から2年の
間(d~f)又は2年を超えて(g~i)腫瘍がない、とカテゴリー化した。打ち切りは垂直線によ
って示されている;p値は、ログランク統計学によって算出した。

30

【図12-2】図12D~Fを示す。

【図12-3】図12G~Iを示す。

【図13-1】図13は、切除不能なステージIV患者における、sGDF-15、sS100B及びsLDH
の、血清サンプリングの時点に従うOSとの関連を示す図である。ステージIV疾患の診断か
らの期間に従う、sGDF-15(左)、S100B(中央)及びLDH(右)に従う切除不能なステージIV患
者の全生存。第1の遠隔転移は、血清サンプリングの前6カ月内(a~c)、6カ月から2年の間
(d~f)及び2年を超えて(g~i)検出された。打ち切りは垂直線によって示されている;p値
は、ログランク統計学によって算出した。

40

【図13-2】図13D~Fを示す。

【図13-3】図13G~Iを示す。

【図14】図14は、S100B血清レベルに従う血清サンプリング後の全生存を示す図である
。466人の腫瘍のないステージIII(a)、83人の腫瘍のないステージIV(b)及び193人の切除
不能なステージIV(c)患者の血清サンプリング後の全生存のカプランマイヤー曲線が示さ
れている。患者を、S100B血清レベル(正常対高い)に基づいてカテゴリー化した。打ち切
りは垂直線によって示されている;p値はログランク統計学によって算出した。

【発明を実施するための形態】

【0020】

定義及び一般的技術

50

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

【0021】

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

10

【0022】

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

20

30

【0023】

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

40

50

化モノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を包含する。

【0024】

「ヒト化抗体」は、ヒト配列、及び対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)に対する結合特異性を付与する非ヒト配列のわずかな部分を含有する抗体である。通常、ヒト化抗体は、ヒトアクセプター抗体由来の超可変領域配列を、対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)と結合する非ヒトドナー抗体(例えば、マウス、ウサギ、ラットドナー抗体)に由来する超可変領域配列によって置換することによって作製される。いくつかの場合には、アクセプター抗体のフレームワーク領域配列もまた、ドナー抗体の対応する配列によって置換され得る。「ヒト化抗体」は、ドナー及びアクセプター抗体に由来する配列に加えて、その他の(更なる又は代替)残基又は配列を含有する場合もあり、含有しない場合もある。このよ

10

うなその他の残基又は配列は、結合特性(例えば、Kd値を低減するように)及び/又は免疫原性特性(例えば、ヒトにおける抗原性を低減するように)等の抗体特性を更に改善するように役立ち得る。ヒト化抗体を作製するための方法の非限定例は当技術分野で公知であり、例えば、Riechmannら(Nature, 1988年3月24日;332(6162):323~7頁)又はJonesら(Nature, 1986年5月29日~6月4日;321(6069):522~5頁)に由来するものがある。

【0025】

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

20

【0026】

抗体の「抗原結合部分」とは、本明細書において、抗体の、抗原(例えば、hGDF-15、PD-1、PD-L1又はCTLA4)と特異的に結合する能力を保持する抗体の部分を目指す。この能力は、例えば、当技術分野で公知の方法によって、抗原との特異的結合について、抗体と競合する抗原結合部分の能力を決定することによって決定できる。抗原結合部分は、抗体の1つ又は複数の断片を含有し得る。特に制限なく、抗原結合部分は、組換えDNA法及び抗体の化学的又は酵素的断片化による調製を含む、当技術分野で公知の任意の適した方法によって製造できる。抗原結合部分は、Fab断片、F(ab')断片、F(ab')₂断片、一本鎖抗体(scFv)、単ドメイン抗体、ダイアボディー又は抗原と特異的に結合する抗体の能力を保持する抗体の任意のその他の部分であり得る。

30

【0027】

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

【0028】

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

40

【0029】

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

【0030】

本発明との関連で、抗体の結合特性を特徴付けする目的で、抗体又はその抗原結合部分の、対象となる抗原(例えば、ヒトGDF-15)との結合又は競合的結合は、好ましくは、以下

50

に記載されるように、参照標準アッセイとして表面プラズモン共鳴測定を使用して測定される。

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

本発明による用語「含む(comprising)」の各使用は任意選択で、用語「からなる(consi

10

20

30

40

50

sting of)」と置換されてもよい。

【0037】

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

【0038】

本発明に従って、臨床アウトカムの予測、特に、患者の生存の予測が提供される癌は、黒色腫である。本明細書において、用語「黒色腫」は、当技術分野で公知のその一般的な意味に従って使用される。黒色腫は、2001年から遠隔転移を有する黒色腫患者のAJCCステージ分類システムに従って分類される(Balch, CMら、J Clin Oncol / 19 /3635~48頁 2001年)。本明細書において言及される黒色腫ステージは、このステージ分類システムを指す。本発明の実施形態のすべてに従う本発明の好ましい態様では、黒色腫は、ブドウ膜黒色腫ではない。

10

【0039】

本発明に従って生存の予測が提供される黒色腫患者は、黒色腫の治療に付され得る。本明細書において、「癌の治療」又は「癌を治療すること」又は「黒色腫の治療」又は「黒色腫を治療すること」等の用語は、治療的処置を指す。本明細書において、このような処置は、黒色腫自体の治療を含むだけでなく、対症療法も含む。このような対症療法は当技術分野で公知であり、例えば、黒色腫疾患の症状の改善のみ行う治療を含む。

20

【0040】

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

【0041】

癌の治療は、患者において更なる又は二次的治療効果も起こることを排除しない。例えば、更なる又は二次的利益は、癌誘発性質量損失に対する影響であり得る。

【0042】

本明細書において、「腫瘍のない」黒色腫患者は、当技術分野で公知の臨床標準法に従って原発腫瘍及び転移を検出することができない患者である。しかしこれは、患者に検出限界未満である腫瘍(又は微小転移)が存在すること又は新規腫瘍を形成し得る腫瘍細胞が存在することを排除しない。

30

【0043】

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

【0044】

本発明に従う方法のために使用される血液サンプルは、hGDF-15を含有する任意の種類の血液サンプルであり得る。hGDF-15を含有する適した種類の血液サンプルは当技術分野で公知であり、血清及び血漿サンプルを含む。或いは、hGDF-15を含有する更なる種類の血液サンプルも、例えば、本明細書において開示される方法を使用することによって、これらのサンプル中にhGDF-15が含有されるか否か、及びこれらのサンプル中にどのレベルのhGDF-15が含有されるかを測定することによって、当業者によって容易に同定され得る。

40

【0045】

臨床アウトカム: 本発明によれば、ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルを使用して、ヒト黒色腫患者の生存の確率を予測できる。

【0046】

患者グループの生存は、当技術分野で公知の方法によって、例えば、カプランマイヤー

50

曲線によって解析できる。

【0047】

生存の評価のための適当な期間は当技術分野で公知であり、黒色腫のそれぞれのステージ等の因子を正当に考慮して当業者によって選択される。

【0048】

例えば、生存、好ましくは、短期生存は、例えば、予測が行われた時点後6カ月、12カ月及び/又は18カ月の時点について予測され得る。或いは、生存、好ましくは、長期生存は、例えば、予測が行われた時点後2年、3年、5年及び/又は10年の時点で評価され得る。

【0049】

本発明に従う正の臨床アウトカムの確率の予測 例えば、hGDF-15レベルに基づいて、本発明に従って正の臨床アウトカム(例えば、生存)の確率を予測するために、好ましい実施形態において上記で定義される予測するための方法が使用されることが好ましい。

10

【0050】

本発明の方法を実施するために、当技術分野で公知の統計的手法を使用できる。

【0051】

例えば、全生存は、コックス回帰解析によって解析できる。

【0052】

臨床研究由来の患者データの統計モデルを作製するために本発明に従って使用できる好ましい統計的手法が、実施例1に開示されている。実施例1に開示される統計的手法は、黒色腫ステージ、選択される特定の閾値レベル及び実施例において得られる特定の統計値等の実施例1の特定の特徴に制限されないことは理解される。むしろ、実施例1において開示されるこれらの方法は、一般に、本発明の任意の実施形態に関連して使用できる。

20

【0053】

hGDF-15レベル 本発明の有利な態様では、ヒト黒色腫患者における、hGDF-15レベルと、正の臨床アウトカムの確率、特に、生存の確率との間に逆相間がある。したがって、本発明によれば、hGDF-15のレベルの低減は、ヒト黒色腫患者における生存の確率の増大を示す。

【0054】

したがって、本明細書において、「ここで前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルの低減は生存の確率の増大を示す」等の用語は、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベル及び生存の確率が、逆相間をたどることを意味する。したがって、前記ヒト血液サンプル中のhGDF-15のレベルが高いほど、生存の確率は低い。

30

【0055】

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

【0056】

本発明によれば、hGDF-15レベルと生存の確率の間の逆相間は、任意の閾値の値に当てはまり、したがって、本発明は特定の閾値の値に制限されない。

【0057】

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

40

【0058】

或いは、上記の統計的手法、例えば、実施例1の方法を使用することによって、本発明によるhGDF-15閾値レベルを得る、及び/又は更に調整することができる。

【0059】

hGDF-15閾値レベルは、単一hGDF-15閾値レベルであり得る。本発明はまた、2以上のhGDF-15閾値レベル、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のhGDF-15閾値レベルの使用も包含する。

【0060】

1つ又は複数のhGDF-15閾値レベルのうち各単一のhGDF-15閾値レベルについて、対応す

50

る生存の確率を所与の時点で予測できる。

【0061】

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

10

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

20

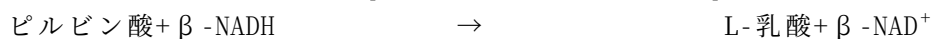
これらのhGDF-15血清レベルについて、本明細書において提供される本発明の開示に基づいて、その他の血液サンプル中の対応するhGDF-15レベルは、当業者によって(例えば、その他の血液サンプル中のそれぞれのレベルと、血清中のhGDF-15の相対レベルと比較することによって)日常的に得ることができることは理解される。したがって、本発明はまた、好ましいhGDF-15血清レベル及び上記で示される範囲の各々に対応する、血漿、全血及びその他の血液サンプル中の好ましいhGDF-15レベルを包含する。

【0065】

乳酸デヒドロゲナーゼレベル 血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼレベルは、当技術分野で公知の任意の方法によって測定できる。乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)レベルは、通常、酵素ユニット(U)で測定される。1ユニットは37°C、pH7.5で1分あたり1.0 μ moleのピルビン酸をL-乳酸に還元する。

30

[L-乳酸デヒドロゲナーゼ]



【0066】

乳酸及びNAD⁺は、LDHの作用によってピルビン酸及びNADHに変換される。NADHは、340nmの光を強力に吸収するが、NAD⁺は吸収しない。340nmでの吸光度の増大率は、サンプル中のLDH活性と直接的に正比例する。したがって、LDHユニットは、好ましくは、340nmでの吸光度を測定することによって決定される。

【0067】

LDHレベルの測定のために、種々の臨床的に許容される診断検査が利用可能である。本発明に従って黒色腫に適用できる検査は、公知の臨床標準に基づいて選択される。LDHのイソ型特異的検査を、当技術分野で公知の方法に従って実施できる。

40

【0068】

本発明の更なる有利な態様では、ヒト黒色腫患者において、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)レベル及び正の臨床アウトカム(生存の確率)の間の逆相間もある。したがって、本発明による実施形態では、黒色腫患者において、乳酸デヒドロゲナーゼのレベルの低減は、生存の確率の増大を示す。

【0069】

したがって、本明細書において、「ここで前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルの低減は生存の確率の増大を示す」等の用語は、前記ヒト血液サンプル中の

50

乳酸デヒドロゲナーゼのレベル及び生存の確率が、逆相間をたどることを意味する。したがって、前記ヒト血液サンプル中の乳酸デヒドロゲナーゼのレベルが高いほど、生存の確率は低い。

【0070】

例えば、本明細書において定義される本発明に従って予測するための方法に関連して、乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルを使用できる。

【0071】

本発明によれば、乳酸デヒドロゲナーゼレベルと生存の確率の間の逆相間は、任意の閾値の値に当てはまり、したがって、本発明は、特定の閾値の値に制限されない。

【0072】

或いは、上記の統計的手法、例えば、実施例1の方法を使用することによって、本発明による乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルを得る、及び/又は更に調整することができる。

【0073】

乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルは、単一乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルであり得る。本発明はまた、2以上の乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベル、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上の乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルの使用も包含する。

【0074】

1つ又は複数の乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルのうち各単一乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルについて、対応する生存の確率を予測できる。

【0075】

本発明によれば、好ましい乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルは、好ましい実施形態において上記で定義されたような乳酸デヒドロゲナーゼ血清レベルである。

【0076】

極めて好ましい実施形態では、乳酸デヒドロゲナーゼ閾値レベルは、患者において正常及び上昇したLDHレベル間を区別する、臨床的に許容される閾値レベルである。このような極めて好ましい臨床的に許容される閾値レベルは当技術分野で公知であり、LDH検査の特別の規格に関して当業者によって選択される。

【0077】

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

【0078】

S100Bレベル 本発明の更なる有利な態様では、ヒト黒色腫患者における、S100Bレベルと、正の臨床アウトカムの確率、特に、生存の確率との間にも逆相間がある。したがって、本発明による実施形態では、S100Bのレベルの低減は、黒色腫患者における生存の確率の増大を示す。

【0079】

したがって、本明細書において、「ここで前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベルの低減は生存の確率の増大を示す」等の用語は、前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベル及び生存の確率が、逆相間をたどることを意味する。したがって、前記ヒト血液サンプル中のS100Bのレベルが高いほど、生存の確率は低い。

【0080】

例えば、本明細書において定義される本発明に従って予測するための方法に関連して、S100B閾値レベルを使用できる。

【0081】

本発明によれば、S100Bレベルと生存の確率の間の逆相間は、任意の閾値の値に当ては

10

20

30

40

50

まり、したがって、本発明は、特定の閾値の値に制限されない。

【0082】

上記の統計的手法、例えば、実施例1の方法を使用することによって、本発明によるS100B閾値レベルを得る、及び/又は更に調整することができる。

【0083】

S100B閾値レベルは、単一S100B閾値レベルであり得る。本発明はまた、2以上のS100B閾値レベル、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のS100B閾値レベルの使用も包含する。

【0084】

極めて好ましい実施形態では、S100B閾値レベルは、患者において正常なS100Bレベルと上昇したS100Bレベルを区別する、臨床的に許容される閾値レベルである。このような極めて好ましい臨床的に許容される閾値レベルは当技術分野で公知であり、S100B検査の特別の規格に関して当業者によって選択される。

【0085】

1つ又は複数のS100B閾値レベルのうち各単一S100B閾値レベルについて、対応する生存の確率を予測できる。

【0086】

血液サンプル中のS100Bレベルは、当技術分野で公知の任意の方法によって測定できる。このような方法として、抗体ベースのアッセイが挙げられる。血液サンプル中のS100Bレベルを測定する好ましい方法、電気化学発光アッセイによる、例えば、Elecsys S100電気化学発光免疫アッセイを使用することによる、S100B血清レベルの測定。S100Bレベルを測定する方法の更なる非限定例は、Goncalvesら:「Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury」Clinical Biochemistry 41 (2008年) 755~763頁)中に示されている。

【0087】

本発明に従って使用できるhGDF-15と結合可能な抗体 本発明の方法、装置及びキットは、上記で定義されたような、hGDF-15又はその抗原結合部分と結合可能な1種又は複数の抗体を使用し得る。

【0088】

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

【0089】

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

【0090】

したがって、更により好ましい実施形態では、本発明によるhGDF-15と結合可能な抗体又はその抗原結合部分は、ヒトGDF-15と結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合部分であり、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1領域及

び配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変ドメインを含み、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1領域、アミノ酸配列ser-ala-serを含むCDR2領域及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0091】

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

10

【0092】

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

【0093】

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

20

【0094】

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

30

【0095】

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

40

【0096】

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

【0097】

上記の実施形態に従う更なる実施形態では、ヒトGDF-15又はその抗原結合部分と結合可

50

能な抗体を含む抗体を、例えば、タグ又は標識によって修飾できる。

【0098】

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

【0099】

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

【0100】

方法及び技術

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

【0101】

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

【0102】

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

【0103】

本発明のモノクローナル抗体は、これに限らないが、Siegel DL(参照により本明細書に組み込まれる、「Recombinant monoclonal antibody technology」Transfus Clin Biol. 2002年1月;9(1):15~22頁)において言及される方法を含む当技術分野で公知の任意の方法によって作製できる。一実施形態では、本発明の抗体は、ブダペスト条約の下、Deutsche

10

20

30

40

50

Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ)に受託番号DSM ACC3142の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株B1-23によって作製される。寄託は、2011年9月29日に提出された。

【0104】

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

10

【0105】

発明の装置 本発明はまた、上記で定義される装置に関する。

【0106】

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

【0107】

本明細書において、用語「実施するように構成される」とは、装置が、列挙された方法工程のために特別に構成されることを意味する。例えば、特定の閾値レベルを使用する方法を実施するように構成された装置は、その特定の閾値を使用するように特別に構成される。

20

【0108】

好ましい実施形態では、装置は、Cobas(登録商標)分析器等の電気化学発光分析器である。この実施形態では、LDHが測定される場合には、これは、例えば、電気化学発光分析器ではない、酵素的検査等のLDH測定を実施するように構成される更なる装置で測定され得る。したがって、この実施形態の好ましい態様では、本発明の電気化学発光分析器は、LDHレベルの測定を除いて本発明の方法を実施するように構成される。

30

【0109】

本発明のキット 本発明はまた、上記で定義されるキットに関する。

【0110】

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

【0111】

配列

40

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

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

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

50

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

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

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

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

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

10

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

配列番号8 (組換え成熟ヒトGDF-15タンパク質):
GSARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCC
VPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI

配列番号9 (ヒトGDF-15前駆体タンパク質):
MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGLSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDL
VPAPAVRIILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRLALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLS
PPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
IGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI

20

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

配列番号11 (Flagペプチド):DYKDDDDKGG

配列番号12 (HAペプチド):YPYDVPDYAG

配列番号13 (ヒトGDF-15由来ペプチド):ELHLPQAARGRR

配列番号14 (ヒトGDF-15由来ペプチド):LHLPQAARGRRR

30

配列番号15 (ヒトGDF-15由来ペプチド):HLRPQAARGRRRA

配列番号16 (ヒトGDF-15由来ペプチド):LRPQAARGRRRAR

配列番号17 (ヒトGDF-15由来ペプチド):RPQAARGRRRARA

配列番号18 (ヒトGDF-15由来ペプチド):PQAARGRRRARAR

配列番号19 (ヒトGDF-15由来ペプチド):QAARGRRRARARN

配列番号20 (ヒトGDF-15由来ペプチド):MHAQIKTSLHRLK

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

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

40

【0112】

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

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

CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTT
TTCAGTGAAGTACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCTGCAGCCTTCAGGAAAGGCTCTGGAGTGGCTGGCACACATTT
ACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACCAACCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATCCCTCCAGAAACCAGGTA
TTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGT

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

50

配列):

GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCA
GAATGTGGGTACTAATGTGGCCTGGTTTCTACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTTATTTACTCGGCATCCTACC
GGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACGTGCAGTCT
GAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGT

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

GCTCGAAGTTCCTACGGGGCAATGGACTAC

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

CAGCAATATAACAACCTTTCCGTACACG

【実施例】

【0113】

参照実施例1~3は、本発明による方法、キット、及び装置において使用できるhGDF-15に対する抗体を例示する。このhGDF-15抗体は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれるW02014/049087から知られているモノクローナル抗体である:

【0114】

参照実施例1:GDF-15抗体B1-23の作製及び特徴付け

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

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

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

【0118】

バイオセンサーを調製するために、組換え成熟ヒトGDF-15タンパク質をフローセル1及び2上に固定化した。一方のフローセル上の、バキュロウイルス(Baculovirus)によってトランスフェクトされた昆虫細胞(HighFive昆虫細胞)に由来する組換えGDF-15及び大腸菌(E.coli)における発現に由来するもう一方の組換えタンパク質を使用した。GLCセンサーチップを、スルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)及びEDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド)(Biorad ProteOnアミンカップリングキット)を製造業者の推奨に従って使用して活性化し、続いて、センサー表面にタンパク質を、最大約600RU(1Ru=1pg mm⁻²)の密度でロードした。次いで未反応のカップリング基を、1MエタノールアミンpH8.5を用いて灌流することによってクエンチし、チップにランニングバッファーを灌流することによってバイオセンサーを平衡化させた(HBS150と呼ばれる10M HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005% Tween-20、pH7.4)。対照として、2つのフローセルを使用し、1つはタンパク質がカップリングされていない空のフローセルであり、1つは同一カップリング化学及び同一カップリング密度を使用して固定された非生理学的タンパク質パートナー(ヒトインターロイキン-5)とカップリングされたフローセルであった。相互作用測定のために、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23をHBS150に溶解し、分析物として6種の異なる濃度(濃度:0.4、0.8、3、12、49及び98nM)で使用した。断続的な再生を避けるためにワンショット動力学(one-shot kinetics)設定を使用して分析物をバイオセ

10

20

30

40

50

ンサー中に灌流し、すべての測定を25℃で、100 $\mu\text{l分}^{-1}$ の流速を使用して実施した。処理のために、すべてのその他のSPRデータから空のフローセル(フローセル3)のSPRデータを差し引くことによって、バルクフェイス効果(bulk face effect)及びセンサーマトリックスとの非特異的結合を除去した。ソフトウェアProteOn Managerバージョン3.0を使用して得られたセンサーグラムを解析した。結合動力学的解析のために、1:1 ラングミュア型相互作用を仮定した。会合速度定数については、 $5.4 \pm 0.06 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} (k_{\text{on}})$ の値、解離速度定数については、 $4.3 \pm 0.03 \times 10^{-4} \text{s}^{-1} (k_{\text{off}})$ の値を決定できた(値は、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の、昆虫細胞発現に由来するGDF-15tとの相互作用についてである)。方程式 $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ を使用して平衡解離定数を算出し、約790pMの値を得た。大腸菌(E.coli)発現由来のGDF-15と、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の相互作用の親和性値は2倍未満異なり、昆虫細胞及び大腸菌(E.coli)由来のGDF-15の速度定数は約45%逸脱し、したがって、SPR測定の正確性内にあり、親和性の真の相違を反映しない可能性が高い。使用される条件下で、抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23はヒトインターロイキン-5との結合を示さず、したがって、相互作用データ及び抗ヒトGDF-15 mAb-B1-23の特異性が確認される。

10

【0119】

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

GSARNGDHCP LGPGRCRLH TVRASLEDLG WADWVLSPRE VQVTMCIGAC PSQFRAANMH AQIKTSLHRL KPD
TVPAPCC VPASYNPMVL IQKTDGTGVS LQTYDDLLAKD CHCI

である。

20

(配列番号8)

【0120】

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

【0121】

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

【0122】

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

30

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

【0123】

抗原:GDF-15:

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELKRKYEDLLTRLRANQSW
EDSNTDLVPAPAVRIILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRLFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAP
ALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLEHLRLPQAARGRRRARARNGDHCP LGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR
EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVL IQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCIGSGSG
SG(リンカー付きの322アミノ酸)(配列番号10)

【0124】

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

40

【0125】

対照ペプチド:

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

【0126】

ペプチドチップ識別子:

000264_01(10/90、Ala2Aspリンカー)

50

【0127】

染色条件:

標準バッファー: PBS、pH7.4+0.05% Tween 20

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

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

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

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

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

【0128】

スキャナー:

Odysseyイメージングシステム、LI-COR Biosciences

設定: オフセット: 1mm; 解像度: 21 µm; 輝度 緑/赤: 7/7

【0129】

結果:

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

【0130】

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

【0131】

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

【0132】

まとめ:

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

を省略した。

【0133】

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

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

【0134】

抗体カラムの調製のために、抗体B1-23をNHS活性化6-アミノヘキサン酸がカップリングされたセファロースに添加した。次いで、セファロースがカップリングされた抗体B1-23

10

【0135】

エピトープ抽出実験:

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

20

【0136】

エピトープ切り出し実験:

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

30

【0137】

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

【0138】

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

40

【0139】

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

【0140】

本発明は、以下の非限定例によって例示される:

【0141】

(実施例1)

50

患者、材料及び方法患者 組織学的に確認された黒色腫を有する、Department of Dermatology、University of Tübingen、Germanyからの患者を、ドイツ中の60を超える皮膚科学センターからの患者を将来を見越して記録する中央悪性黒色腫レジストリー(Central Malignant Melanoma Registry)(CMMR)データベースにおいて同定した。(a)2008年1月から2012年2月の間に採取された記録保存された血清サンプルを有する、(b)フォローアップデータを入手可能な、(c)採血の時点での局所領域又は遠隔転移の病歴又は存在を有する761人の患者を選択した。CMMRによるデータ収集の目的及び方法は、これまでに詳細に公開されている(Lasithiotakis,KGら、Cancer/107/1331~9頁 2006年)。各患者について得られたデータは、年齢、性別、最後のフォローアップの日付及び該当する場合には死亡の日付及び原因を含んでいた。すべての患者は、CMMRレジストリーによって記録される臨床データを有するための所与の書面でのインフォームドコンセントを行っていた。施設内倫理委員会Tübingenは研究を承認した(倫理的表明125/2015B02)。血清サンプリングの時点で、年齢、遠隔転移のパターン(ステージIV患者のみ)、AJCC分類(Balch, CMら、J Clin Oncol / 27 / 6199~206頁 2009年)に従うサブステージ(IIIA対IIIB対IIIC;ステージIII患者のみ)、血清LDH及び血清S100B(Elecsys S100電気化学発光イムノアッセイ;Roche Diagnostics AG社, Rotkreuz, Switzerland)を評価した。hGDF-15血清濃度は、市販のELISAキットを製造業者の使用説明書に従って使用して2連で定量化した(R&D systems社, Wiesbaden, Germany):

【0142】

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

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

【0143】

バッファー及び試薬:

ブロッキング溶液:PBS中1% BSA(画分V pH7.0、PAA社)

洗浄溶液:PBS-Tween(0.05%)

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

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

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

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

基質溶液:10ml 0.1M NaOAc pH6.0+100 µl TMB+2 µl H₂O₂ 停止溶液:1M H₂SO₄

【0144】

解析手順:

1. プレート調製:

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

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

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

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

【0145】

2. アッセイ手順:

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

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

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

【0146】

【表A】

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

10

【0147】

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

20

30

【0148】

3. GDF-15血清力価の算出:

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

40

【0149】

統計解析

生存解析のためのフォローアップ時間は、血液サンプリングの日付から最後のフォローアップ又は死亡までと定義した。カプラン・マイヤーに従う累積生存確率を、95%の信頼区間(CI)と一緒に算出し、両側ログ・ランク検定統計学を使用して比較した。OSの解析のために、最後のフォローアップで生存していた患者を打ち切り、死亡していた患者を「イベント」と考えた。OSに対するsGDF-15の影響を解析するために、患者を、1:2の比を使用して2つのコホートに無作為に割り当てた(それぞれ同定及び検証コホート)。同定コホートでは、種々のカットオフ点を適用してsGDF-15に従って患者を、各々患者の $\geq 25\%$ を含む2つのバランスのとれたグループにカテゴリー化した。各カットオフ点について、高い対

50

低いsGDF-15を有する患者間のOSの相違を解析し、以前に公開された最適化アルゴリズム(Camp, RLら、Clin Cancer Res / 10 /7252~9頁 2004年)と同様に、最低のログランクp値をもたらすものを選択した。その後、同定コホートにおいて定義されたような最適カットオフ点を、507人の患者の検証コホートにおいて解析した。

【0150】

コックス比例ハザード回帰分析を使用して、全患者コホートにおいて更なる予後因子を考慮して相対効果を算出した。患者の中央値年齢に従って、年齢を二分した。血清S100Bレベル及びsLDHを、臨床ルーチンにおいて使用されるようなカットオフ値に従って、上昇対正常としてカテゴリー化した(それぞれ正常の上限 $0.10 \mu\text{g/l}$ 及び 250U/l)。回帰解析から欠測値を有する患者を排除した。モデルの結果は、ハザード比の平均に記載され、p値は、ワルド検定に基づいていた。すべての統計解析は、SPSSバージョン22(IBM SPSS社, Chicago, Illinois, USA)を使用して実施した。

10

【0151】

結果患者 患者の特徴は、Table 1(表2)に示されている。合計761人の黒色腫患者(52.0%男性)を解析した。中央値年齢は、63歳であった。死亡した患者の中央値フォローアップは、10.3カ月であり、打ち切られた患者については、45.3カ月であった。

【0152】

ステージIV患者(n=293)を、遠隔転移の部位及び血清LDH(sLDH)に基づいてMカテゴリーM1c(n=206;70.3%)、M1b(n=51;17.4%)又はM1a(n=36;12.3%)に割り当てた(Balch, CMら、J Clin Oncol / 27 /6199~206頁 2009)。カプランマイヤーに従う中央値生存推定値は、10.7カ月であった。生存の確率は、1年で46.4%、2年で33.3%、及び3年で29.3%であった。

20

【0153】

合計468人のステージIII患者が含まれていた。サブステージは、分類の完全データを有する422人の患者のうち15.6%がIIIA、37.2%がIIIB、及び47.2%がIIICであった。生存の確率は、それぞれ、1年で94.9%、2年で85.0%、及び5年で72.8%であった。

【0154】

中央値hGDF-15血清濃度は、761人の患者すべてを考慮して 1.0ng/mL であった(ステージII患者の 0.9ng/mL 対ステージIV患者の 1.5ng/mL)。平均sGDF-15は、2.6であった(ステージIII患者の 1.1ng/mL 対ステージIV患者の 4.8ng/mL ; $p<0.001$)。

【0155】

hGDF-15レベルに従う全生存 0.1ng/mL の増分で 0.7ng/mL ~ 1.9ng/mL の範囲の13の異なるカットオフ点は、sGDF-15に従って同定コホートの患者(n=254)を、2つのバランスのとれたグループにカテゴリー化することがわかった(小さい方のグループは、患者の少なくとも25%を含まなくてはならなかった)。hGDF-15レベル $\geq 1.5\text{ng/mL}$ 及び悪いOSを有する86人の患者(33.9%)を、より低いレベル及び好適なOSを有する168人(66.1%)の患者と比較して、予後の相違は最大であった($p<0.001$; 図4A)。その後、sGDF-15のこのカットオフ点を適用するOSの相違を、検証コホートにおいて確認した(n=508; $p<0.001$; 図4B)。

30

【0156】

すべての患者を考慮して(組み合わせられた両コホート)、このsGDF-15及びOSの間の逆相関は、腫瘍のないステージIII患者において、及び切除不能なステージIV患者において観察された(図1A;1B)が、腫瘍のないステージIV患者では観察されなかった(図1C)。

40

【0157】

両コホートのステージIII患者を考慮して、 1.5ng/mL 未満のsGDF-15を有するもの(n=369、すべてのステージIII患者の78.8%)の1年、2年及び5年生存確率は、96.1%、87.8%及び75.7%であったが、より高いsGDF-15を有する患者(n=99、21.2%)については、90.4%、74.2%及び61.5%しかなかった(Table 2(表3))。

【0158】

切除不能な遠隔転移及び高hGDF-15レベルを有する両コホートの患者について、解析の1年後の生存の確率は、14.3%しかなかったが、低いsGDF-15を有する患者については、45.0%であった。同様に、2年及び5年生存は、それぞれ、19.9%及び5.2%と比較して6.3%及び2.0%であった。

50

6%であった。中央値生存は、それぞれ、高いsGDF-15及び低いsGDF-15を有する切除不能なステージIV患者について、5.7カ月対11.0カ月であった(Table 3(表4))。

【0159】

【表1】

Table 1:患者の特徴

因子	カテゴリー	ステージIII (n=468)		ステージIV 腫瘍のない (n=87)		ステージIV 切除不能な (n=206)		合計 (n=761)	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
性別	男性	228	48.7	47	54.0	121	58.7	396	52.0
	女性	240	51.3	40	46.0	85	41.3	365	48.0
年齢	≤50歳	120	25.6	16	18.4	57	27.7	193	25.4
	51~60歳	82	17.5	16	18.4	56	27.2	154	20.2
	61~70歳	117	25.0	28	32.2	38	18.4	183	24.0
	≥71歳	149	31.8	27	31.0	55	26.7	231	30.4
	中央値年齢	64歳		66歳		59歳		63歳	
ステージ (AJCC 2009)	IIIA	66	15.6					66	9.2
	IIIB	157	37.2					157	22.0
	IIIC	199	47.2					199	27.8
	ステージIII-サブ ステージ不明	46						46	
	IV, M1a			23	26.4	13	6.3	36	5.0
	IV, M1b			21	24.1	30	14.6	51	7.1
	IV, M1c			43	49.4	163	79.1	206	28.8
S100B	正常	409	87.8	74	89.2	65	33.7	548	73.9
	上昇	57	12.2	9	10.8	128	66.3	194	26.1
	不明	2		4		13		19	
LDH	正常	439	94.2	81	97.6	116	57.1	636	84.6
	上昇	27	5.8	2	2.4	87	42.9	116	15.4
	不明	2		4		3		9	
内臓関与	軟部組織のみ			23	26.4	22	10.7	45	5.9
	肺			21	24.1	36	17.5	57	7.5
	その他の臓器			43	49.4	148	71.8	191	25.1
	なし(ステージIII)	468						468	61.5

AJCC:米国対癌合同委員会(American Joint Committee on Cancer);LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ

【0160】

10

20

30

40

Table 2: 腫瘍のないステージIII患者における全生存

因子	合計	カテゴリー	単変量解析						多変量解析			
			n	%	1年生存率 [95% CI] (%)	2年生存率 [95% CI] (%)	5年生存率 [95% CI] (%)	ログ ランク p値	モデル1(n=415) ハザード比	モデル1(n=415) ワルド検定p値	モデル2 (n=415) ハザード比	モデル2 (n=415) ワルド検定p値
sLDH	466	正常	439	94.2	95.3 [93:97]	85.2 [82:89]	73.4 [68:78]	0.391	1		1	
		上昇	27	5.8	91.7 [81:103]	82.7 [67:98]	63.6 [41:87]		0.9	0.892	1.2	0.634
sS100B	466	正常	409	87.8	96.9 [95:99]	88.1 [85:91]	76.1 [71:81]	<0.001	1		1	
		上昇	57	12.2	81.7 [71:92]	63.5 [50:77]	48.9 [32:65]		3.2	<0.001	3.5	<0.001
性別	468	男性	228	48.7	95.0 [92:98]	85.8 [81:91]	72.1 [65:79]	0.894	考慮せず		1	
		女性	240	51.3	94.8 [92:98]	84.1 [79:89]	73.6 [67:80]				1.0	0.893
ステージ	422	IIIA	66	15.6	96.9 [93:101]	95.2 [90:101]	79.7 [68:91]	0.176	1		1	
		IIIB	157	37.2	96.0 [93:99]	86.4 [81:92]	71.9 [63:81]					
		IIIC	199	47.2	92.2 [88:96]	79.8 [74:86]	69.0 [61:77]		1.3	0.156	1.6	0.030
年齢	468	<63歳	222	47.4	94.8 [92:98]	85.3 [80:90]	68.0 [60:76]	0.196	考慮せず		1.6	0.030
		≥63歳	246	52.6	94.9 [92:98]	84.7 [80:89]	77.3 [71:83]				1	
sGDF-15	468	<1.5ng/mL	369	78.8	96.1 [94:98]	87.8 [84:91]	75.7 [70:81]	0.001	1		1	
		≥1.5ng/mL	99	21.2	90.4 [84:96]	74.2 [65:83]	61.5 [51:72]		2.3	<0.001	3.7	<0.001

CI:信頼区間

Table 3: 切除不能なステージIV患者における全生存

因子	合計	カテゴリー	単変量解析						多変量解析				
			n	%	中央値 生存 (月)	1年生存率 [95% CI] (%)	2年生存率 [95% CI] (%)	5年生存率 [95% CI] (%)	ログ ランク p値	モデル1(n=203)		モデル2 (n=193)	
										ハザード 比	ワルド 検定p値	ハザード 比	ワルド 検定p値
sLDH	203	正常	116	57.1	9.2	36.2 [27;45]	16.3 [10;23]	0.0 [00;00]	<0.001	1		1	
		上昇	87	42.9	4.0	12.6 [06;20]	5.7 [01;11]	4.6 [00;09]		1.6	0.002	1.1	0.442
sS100 B	193	正常	65	33.7	10.2	46.2 [34;58]	26.1 [15;37]	4.8 [00;13]	<0.001	考慮せず		1	
		上昇	128	66.3	5.2	12.5 [07;18]	3.1 [00;06]	1.6 [00;04]				1.8	0.003
性別	206	男性	121	58.7	7.4	27.3 [19;35]	10.7 [05;16]	3.7 [00;09]	0.961	考慮せず		1	
		女性	85	41.3	7.6	24.7 [16;34]	12.9 [06;20]	3.5 [00;08]				1.0	0.954
遠隔転 移のバ ターン	206	軟部組 織/肺	58	28.2	10.0	43.1 [30;56]	24.0 [13;35]	10.6 [02;19]	<0.001	1		1	
		その他の 内臓	148	71.8	6.1	19.6 [13;26]	6.8 [03;11]	1.8 [00;05]		1.8	<0.001	1.7	0.005
年齢	206	<63歳	118	57.3	7.7	32.2 [24;41]	16.9 [10;24]	4.3 [00;11]	0.006	考慮せず		0.7	0.044
		≥63歳	88	42.7	6.6	18.2 [10;26]	4.5 [00;09]	2.3 [00;05]				1	
sGDF- 15	206	<1.5ng/ mL	80	38.8	11	45.0 [34;56]	19.9 [11;29]	5.2 [00;13]	<0.001	1		1	
		≥1.5ng /mL	126	61.2	5.7	14.3 [08;20]	6.3 [02;11]	2.6 [00;06]		1.7	<0.001	1.7	<0.002

CI:信頼区間;n.r.:到達せず

【表 4】

Table 4: 腫瘍のないステージIV患者の全生存(組み合わされた両コホート)

変数	合計	カテゴリー	n	%	中央値生存 時間(ヵ月)	1年生存率 [95% CI] (%)	2年生存率 [95% CI] (%)	5年生存率 [95% CI] (%)	ログ ランク p値
LDH	83	正常	81	97.6	n.d.	95.1	86.4	68.6	0.471
		上昇	2	2.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
S100B	83	正常	74	89.2	n.r.	95.9	89.2	73.2	0.008
		上昇	9	10.8	43.9	88.9	66.7	53.3	
性別	87	男性	47	54.0	n.r.	97.7	85.1	68.2	0.749
		女性	40	46.0	n.r.	92.5	87.5	71.2	
内臓転移 のパターン	87	軟部組織/肺	44	50.6	n.r.	97.7	86.4	72.5	0.822
		その他の内臓	43	49.4	n.r.	93.0	85.9	67.2	
年齢	87	<63歳	36	41.4	n.r.	94.4	80.4	61.7	0.066
		≥63歳	51	58.6	n.r.	96.1	90.2	75.8	
GDF-15	87	<1.5ng/mL	64	73.6	n.r.	93.8	85.9	72.1	0.651
		≥1.5ng/mL	23	26.4	n.r.	100	87.0	62.5	

LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ;CI:信頼区間;n.r.:到達せず;n.d.:決定できない

【0163】

ステージIII患者におけるsGDF-15の相対的予後影響

ステージIII患者の全コホートのコックス回帰解析を実施して、その他の予後因子と比較したsGDF-15の相対的影響を決定した(Table 3(表4))。第1のモデルでは、直接比較を可能にするために3種のバイオマーカーsGDF-15、sS100B及びsLDHを含めた。単変量解析が、サブステージIIICに対してIIIA/Bのより良好なOSへの傾向を示したので、結果をサブステ

10

20

30

40

50

ージについて調整した($p=0.088$)。多変量解析では、上昇したsGDF-15に加えて($HR2.3$; $p<0.001$)、上昇したsS100Bが、悪いOSと強力に関連しており(図5A)、予後に対して独立した負の影響を有していた($HR3.2$; $p<0.001$)。両マーカーが上昇していた1年生存率の56.2%とは強く対照的に、両バイオマーカーにおいて好適な結果を有する患者については、1年生存率は最高であり、97.4%であった。上昇したsS100B又は高いsGDF-15のいずれかを有する患者の1年後の生存の確率は、それぞれ、88.4%又は95.1%であった。第2のモデルでは、年齢及び性別を更に考慮した。ここで、sGDF15及びsS100Bに加えて、ステージIIIC及び年齢 >63 歳が、予後に対して独立した負の影響を有していた。それら4種の因子を考慮して好適ではない値の数は、生存と強く関連していた(図5)。ステージIII黒色腫について予測されるように、sLDHは、いずれのモデルでもアウトカムとの相関を示さなかった。

10

【0164】

ステージIV患者におけるhGDF-15レベルの相対的影響 血液サンプリングの時点で疾患のエビデンスがないステージIV患者($n=87$)では、sGDF-15について予後関連性が観察されなかった。遠隔転移のパターンもsLDHも、OSと関連がなかった(Table 4(表5))。代わりに、この患者集団では、sS100Bが唯一の予後因子であった(図5C)。203人の徹底的に特徴付けされた切除不能な腫瘍負荷を有するステージIV黒色腫患者から判断して、本発明者らは、コックス回帰分析を適用して、その他の因子と比較したsGDF-15の相対的予後影響を調べた。第1のモデルでは、sGDF-15を、両方ともAJCC分類において予後因子として考慮される遠隔転移のパターン及びsLDHと比較した(Table 3(表4))。ステージIII黒色腫におけるように、sGDF-15は、遠隔転移のパターン($HR1.8$; $p<0.001$)及びsLDH($HR1.6$; $p=0.002$)とともに、OSに対して強い独立した影響を有していた($HR1.7$; $p<0.001$)。sGDF-15レベルの独立した影響は、M1a/b(図3A)において、及びM1c患者において両方で明らかであった(図3B)。3種の独立した因子sLDH、sGDF-15及び遠隔転移のパターンを考慮して、好適ではない値の数は、OSと強力に関連していた(図3C)。それによって、患者の47%は、1年生存する極めて悪い確率(3.3%)を有する新規に同定されたサブグループに入った。多変量モデル2は、すべての解析された変数を考慮した(Table 3(表4))。ここで、sS100Bは、有意な予後パラメータとしてsLDHに取って代わり、年齢が、更なる独立した影響を有していた。sS100B、Mカテゴリー、hGDF-15及び年齢を考慮して好適ではない因子の数に従って層別化することによって、好適な予後及び81.3%の1年OSを有する患者の8%のサブグループの同定が可能となった。対照的に、4種の独立因子のすべてにおいて好適ではない値を示す患者の16%は、最も悪い予後を有しており、3.2%の1年OSであった(図7)。

20

30

【0165】

(実施例2)

実施例1に記載される患者サンプルの代替評価 本発明に従う代替実施例として、既に実施例1に記載された同一患者サンプルを、以下に記載されるような代替法で評価した。

【0166】

患者、材料及び方法:患者 組織学的に確認された黒色腫を有する、Department of Dermatology, Tübingen, Germanyからの患者を、中央悪性黒色腫レジストリー(Central Malignant Melanoma Registry)(CMMR)データベースにおいて同定した(Lasithiotakisら、2006年)。(a)2008年1月から2012年2月の間に採取された記録保存された血清サンプルを有する、(b)フォローアップデータを入手可能な、(c)採血の時点での局所領域転移の病歴を有するか、又は(d)遠隔転移の病歴若しくは存在を有する761人の患者を選択した。sGDF-15の解析に使用した血清は、日常的な採血の際にサンプリングし、sS100Bの解析のために、ステージをAJCC分類に従って定義し(Balchら、2009年)、血清LDH及び血清S100B(Elecsys S100電気化学発光免疫アッセイ; Roche Diagnostics社, Rotkreuz, Switzerland)を、臨床ルーチンにおいて使用されるカットオフ値に従って、上昇対正常としてカテゴリー化した(それぞれ正常の上限 $0.10\mu\text{g/l}$ 及び 250U/l)。関与した遠隔部位の数の算出のために、遠隔軟部組織/リンパ節、肺、脳、肝臓、骨及びその他の内臓器官を考慮した。したがって、数は、各ステージIV患者について1から6の間であり得る。GDF-15血清濃度は、市販のELISAキットを製造業者の使用説明書に従って使用して2連で定量化した(R&D systems社, Wies

40

50

baden, Germany)。

【0167】

すべての患者は、CMMRレジストリーによって記録される臨床データを有するための所与の書面でのインフォームドコンセントを行っていた。施設内倫理委員会Tubingenは研究を承認した(倫理的表明125/2015B02)。

【0168】

統計解析 フォローアップ時間は、血液サンプリングの日付から最後のフォローアップ又は死亡までと定義した。カプランマイヤーに従う生存の確率を、95%の信頼区間と一緒に算出し、両側ログランク検定を使用して比較した。最後のフォローアップで生存していた、又は黒色腫以外の理由から死亡していた患者を打ち切った。患者を、1:2の比を使用して2つのコホートに無作為に割り当てた。同定コホートでは、各々患者の $\geq 25\%$ を含む2つのバランスのとれたグループをもたらすカットオフ点について、高い対低いsGDF-15を有する患者間のOSの相違を解析した。次いで、以前に公開された最適化アルゴリズム(Campら、2004)と同様の、最低のログランクp値をもたらすカットオフ点を選択し、その後、検証コホートにおいて解析した。

10

【0169】

欠測値を有する患者を排除して、コックス回帰分析を使用した。多変量モデルの結果は、HRによって記載され、p値は、ワルド検定に基づいていた。Rの生存パッケージ中のノモグラム関数を使用して組合せモデルを開発した。以前の全身治療によるsGDF-15の相違を、マンホイットニーU検定によって解析した。すべての統計解析は、SPSSバージョン22(IBM SPSS社, Chicago, Illinois, USA)及びR 3.2.1(R Foundation for Statistical Computing, Vienna Austria)を使用して実施した。

20

【0170】

結果:患者 患者の特徴は、Table 5(表6))示されている。合計761人の黒色腫患者を解析した。死亡した患者の中央値フォローアップは10.3カ月であり、最後のフォローアップの時点で生存していた患者については45.3カ月であった。

【0171】

ステージIV患者(n=293)を、Mカテゴリ-M1c(n=206;70.3%)、M1b(n=51;17.4%)又はM1a(n=36;12.3%)に割り当てた。カプランマイヤーに従う中央値生存推定値は、10.7カ月であった。生存の確率は、1年で46.4%、2年で33.3%、及び3年で29.3%であった。ステージIV患者の評価は、84人(28.7%)で12週間内のもの、又は96人(32.7%)において遠隔転移の最初の出現後12カ月内のもの、又は113人の患者(38.6%)において後の時点のものであった。それぞれの時点で、87人の患者(29.7%)は、疾患のエビデンスがなかったが、206人(70.3%)は切除不能な腫瘍を有していた。

30

【0172】

合計468人のステージIII患者が含まれていた。サブステージは、分類の完全データを有する422人の患者のうち15.6%がIIIA、37.2%がIIIB、及び47.2%がIIICであった。生存の確率は、それぞれ、1年で94.9%、2年で85.0%及び5年で72.8%であった。評価の時点は、55人の患者(11.8%)について12週間内のもの、100人(21.4%)について局所領域転移の最初の出現後12カ月内のもの、又は313人の患者(66.9%)についてもっと後のものであった。ステージIII患者のうち、それぞれの時点で疾患のエビデンスを有していたものはなかった。

40

【0173】

ステージ、腫瘍負荷及び以前の治療に従うGDF-15血清レベル 中央値sGDF-15は、761人の患者すべてを考慮して1.0ng/mLであった(ステージIII患者の0.9ng/mL対ステージIV患者の1.5ng/mL)。腫瘍の臨床又は放射線学的エビデンスを有するステージIV患者は、腫瘍のないステージIV又は腫瘍のないステージIII患者(両方とも0.9ng/mL;図10A)よりも高い中央値sGDF-15(2.1ng/mL)を有していた。腫瘍のないステージIV患者の中では、中央値sGDF-15は、全身治療後に進行中の完全奏効を有していた13人の患者と遠隔転移の転移巣切除術後に腫瘍のなかった74人との患者の間に違いはなかった(両方とも0.9ng/mL)。sGDF-15は、切除不能なステージIV患者において、sLDH及び関与する遠隔部位の数と相関していた(図1

50

0B及び10C)。一般に、中央値sGDF-15は、全身治療を受けていた患者において血液サンプリングの前の最後の4週間内又は任意の時間で違いはなかった(Table 8(表9))。化学療法、イピリマブ、その他の免疫療法、BRAF/MEK阻害剤を用いる前治療又はその他の全身治療の影響についての別個の解析によって、切除不能なステージIV患者において、BRAF/MEK阻害剤後により低いsGDF-15が、及びイピリマブ後により高いレベルへの傾向が示された。腫瘍のないステージIV患者において、以前の全身治療の有意な影響は観察されなかった。以前のインターフェロン- α を用いるアジュバント治療を有していた腫瘍のないステージIII患者を、用いないものと比較して、sGDF-15の小さいが有意な相違が観察された(0.8ng/mL対0.9ng/mL; Table 8(表9))。

【0174】

GDF-15レベルに従う全生存 同定コホート(n=254)において0.7ng/mL~1.9ng/mLの範囲のsGDF-15の13の異なるカットオフ点を試験した。sGDF-15 $\geq$ 1.5ng/mL及び悪いOSを有する86人の患者(33.9%)を、より低いレベル及び好適なOSを有する168人(66.1%)の患者と比較した場合に、予後の最も有意な相違が観察された($p<0.001$; 図11A)。このカットオフ点を使用するOSの相違は、その後、検証コホートにおいて確認された(n=507; $p<0.001$; 図11B)。同定と検証コホートとの患者の特徴の比較は、Table 9(表10))に提供されている。

【0175】

sGDF-15と及びOSとの間のこの逆相関は、両コホートの患者を考慮して、腫瘍のないステージIII患者において、及び切除不能なステージIV患者において観察されたが(図1A; 1B)、腫瘍のないステージIV患者(図1C)においては観察されなかった。

【0176】

ステージIII患者の中では、1年、2年及び5年OS確率は、sGDF-15<1.5ng/mLを有するものについては、96.1%、87.8%及び75.7%であったが、より高いsGDF-15を有する患者については、90.4%、74.2%及び61.5%しかなかった(Table 6(表7))及びTable 10(表11))。OSとの関連は、血清サンプリングの前最大6カ月間又は6~24カ月間腫瘍のなかった患者については有意であった。24カ月を越えて腫瘍のなかった患者については、OSの相違は観察されなかった(図12)。

【0177】

切除不能な遠隔転移及びsGDF-15 $\geq$ 1.5ng/mLを有する患者については、1年OS確率は14.3%しかなかったが、低いsGDF-15を有するものについては45.0%であった。同様に、2年及び5年生存は、それぞれ、19.9%及び5.2%と比較して6.3%及び2.6%であった(Table 8(表8))及びTable 11(表12))。OSとの関連は、その評価が、遠隔転移の最初の診断後6カ月内及び6から24カ月の間であった患者については有意であったが、ステージIVに24カ月超であったものについては、有意ではなかった(図13)。

【0178】

ステージIII患者におけるsGDF-15の相対的予後影響 すべての腫瘍のないステージIII患者のcox回帰分析を実施して、その他の予後因子と比較してsGDF-15の相対的影響を決定した。米国対癌合同委員会(American Joint Committee on Cancer)に従ってサブステージについて調整された場合に、sGDF15 $\geq$ 1.5ng/mLを有する患者について、ハザード比(HR)は2.2($p<0.001$)であった(Table 6(表7); モデル1)。広範囲の因子を考慮するモデル2では、上昇したsGDF-15(HR2.7; $p<0.001$)及び局所領域転移のパターン(組み合わせたリンパ節及びイントランジット/サテライト関与についてHR=4.1; $p<0.001$ 、リンパ節関与のみについてHR=2.4; $p=0.002$; 表6)に加えて、上昇したsS100Bが悪いOSと強力に関連しており(図14A)、OSに対して独立した負の影響を有していた(HR4.0; $p<0.001$)。個別のリスクスコアを得るために、これら3種の因子の相対的影響を説明するノモグラムを開発した(図8A)。リンパ節関与のない、正常sS100B及びsGDF-15<1.5ng/mL(リスクスコア0)の患者について、2年OSは96.1%であったが、リスクスコア>175を有するものについては、40.2%しかなかった(図8B)。年齢、性別、sLDH、サブステージ、潰瘍形成又は腫瘍厚については、OSとの有意な関連は観察されなかった。以前のアジュバント全身治療を受けていない患者と比較して、受けた患者の間で、OSには違いはなかった(Table 6(表7))。解析が検証コホートの

10

20

30

40

50

ステージIII患者に制限された場合には、OSに対するsGDF-15の同様の影響が観察された(Table 12(表13))。

【0179】

ステージIV患者におけるGDF-15レベルの相対的影響 sGDF-15は、ステージIV患者の全コホート(n=293)の間でOSに対して独立した影響を有していた。予測されるように、血清サンプリングの時点での疾患状態の顕著な影響が観察された(切除不能な疾患HR=8.6;p<0.001対腫瘍のない疾患;Table 13(表14))。したがって、切除不能なステージIV患者及び転移巣切除術後又は以前の全身治療の際の完全奏効後に腫瘍のないものを別個に解析した。

【0180】

腫瘍のないステージIV患者(n=87)では、sGDF-15についてOSに対する影響は観察されなかった(Table 14(表15))。代わりに、増大したsS100B(図14B)、 ≥ 2 の関与する遠隔部位及び以前の全身治療がないことは、単変量及び多変量解析において悪いOSと関連していた。全身治療後の進行中の完全奏効を有していた13人の患者のうち、フォローアップの間に死亡したものはなかった。解析が、完全転移巣切除術後に腫瘍のない患者のサブグループに限定された場合には、依然として同一因子が、OSと独立に関連していた(Table 15(表16))。

10

【0181】

206人の切除不能なステージIV患者から判断して(Table 7(表8))、Mカテゴリー(M1cについて、HR1.6;p<0.001)に加えて、上昇したsGDF-15が、OSに対して強力な独立した負の影響を有していた(HR1.9;p<0.001)。OSとのsGDF-15の関連は、M1a/b(図9A)患者、及びM1c患者両方において(図9B)明らかであった。より詳細な多変量モデル2では、上昇したsGDF-15、上昇したsS100B(図14C)、CNS関与及び ≥ 4 の関与する遠隔部位は、より悪いOSと独立に関連していた(Table 7(表8))。これら4種の因子の相対的影響を説明するノモグラムベースのリスクスコアに従って、OSの強い相違が観察された。リスクスコア<100を有する患者の31.1%が、48.3%の1年OSを有していた。対照的に、21.2%の、リスクスコア ≥ 250 を有していた患者のうち、血清サンプリング後最初の1年を生き延びたものはなかった(図9C、9D)。単変量解析においてOSと関連しているにもかかわらず、sLDH及び遠隔転移のパターンは、その他の因子と一緒に考慮した場合にOSに対して更なる影響を有していなかった。以前の全身治療を受けていなかったものと比較して、受けていた患者のOSに違いはなく(Table 7(表8))、解析が、治療を受けていなかった切除不能な患者に(Table 16(表17))、又は検証コホートのもののみに(Table 17(表18))制限された場合に、OSに対するsGDF-15の同様の独立した影響が観察された。CNS関与を有する患者では、GDF-15、sLDH及びsS100Bは、単変量解析においてOSと関連していたが、組合せで解析された場合には独立因子ではなかった(Table 18(表19))。

20

30

【0182】

【表 5 - 1】

Table 5: 患者の特徴

因子	カテゴリー	ステージIII (n=468)		ステージIV 腫瘍のない (n=87)		ステージIV 切除不能な (n=206)		合計 (n=761)	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
性別	男性	228	48.7	47	54.0	121	58.7	396	52.0
	女性	240	51.3	40	46.0	85	41.3	365	48.0
年齢	≤50歳	120	25.6	16	18.4	57	27.7	193	25.4
	51~60歳	82	17.5	16	18.4	56	27.2	154	20.2
	61~70歳	117	25.0	28	32.2	38	18.4	183	24.0
	≥71歳	149	31.8	27	31.0	55	26.7	231	30.4
	中央値年齢	64歳		66歳		59歳		63歳	
ステージ (AJCC 2009)	IIIA	66	15.6					66	9.2
	IIIB	157	37.2					157	22.0
	IIIC	199	47.2					199	27.8
	ステージIII・サブステージ不明	46						46	
	IV, M1a			23	26.4	13	6.3	36	5.0
	IV, M1b			21	24.1	30	14.6	51	7.1
	IV, M1c			43	49.4	163	79.1	206	28.8
sS100B	正常	409	87.8	74	89.2	65	33.7	548	73.9
	上昇	57	12.2	9	10.8	128	66.3	194	26.1
	不明	2		4		13		19	
sLDH	正常	439	94.2	81	97.6	116	57.1	636	84.6
	上昇	27	5.8	2	2.4	87	42.9	116	15.4
	不明	2		4		3		9	
内臓関与	軟部組織のみ			23	26.4	22	10.7	45	5.9
	肺			21	24.1	36	17.5	57	7.5
	その他の臓器			43	49.4	148	71.8	191	25.1
	なし(ステージIII)	468						468	61.5
以前の全身治療	インターフェロン-α(アジュバント)	228	48.7	35	32.4	67	32.5	330	37.6
	化学療法	6	1.3	18	16.7	119	57.8	141	16.1
	イピリムマブ			5	4.6	11	5.3	16	1.8
	BRAF/MEK阻害剤					16	7.8	16	1.8
	イピリムマブ以外の免疫療法	5	1.1	17	15.7	34	16.5	56	6.4
	その他	1	0.2	2	1.9	6	2.9	9	1.0
	なし	232	49.6	31	28.7	47	22.8	310	35.3
潰瘍形成	あり	156	38.8	22	36.1	54	44.3	232	39.7
	なし	246	61.2	39	63.9	68	55.7	353	60.3
	不明	66		26		84		176	

【表 5 - 2】

局所領域 転移のパ ターン	サテライト/イント ランジットのみ	131	28.5	8	13.6	28	20.1	167	23.0
	リンパ節のみ	252	54.8	30	50.8	64	46.0	346	47.7
	両方	77	16.7	21	35.6	47	33.8	145	20.0
	遠隔転移のみ			19		49		68	9.4
	不明	8		9		18		35	
ブレスロ ーの腫瘍 厚	≤1.00mm	48	12.5	7	12.7	20	17.2	75	13.5
	1.01～2.00mm	123	32.0	18	32.7	25	21.6	166	29.9
	2.01～4.00mm	136	35.4	16	29.1	41	35.3	193	34.8
	>4.00mm	77	20.1	14	25.5	30	25.9	121	21.8
	不明	84		32		90		206	
CNS関与	あり			14	16.1	77	37.4	91	12.0
	なし			73	83.9	129	62.6	202	26.5
関与する 遠隔部位 の数	1			50	57.5	50	24.3	100	13.1
	2			24	27.6	53	25.7	77	10.1
	3			8	9.2	51	24.8	59	7.8
	≥4			5	5.7	52	25.2	57	7.5

略語:AJCC、米国対癌合同委員会(American Joint Committee on Cancer);CNS、中枢神経系;LDH、乳酸デヒドロゲナーゼ;sLDH、乳酸デヒドロゲナーゼの血清レベル;sS100B、血清中のS100B

【 0 1 8 3 】

【表 6 - 1】

Table 6: 腫瘍のないステージIII患者における血清サンプリング後の全生存

因子	合計 (n=468)	カテゴリー	単変量解析				ログランク p値	多変量解析			
			n	%	1年生存率 (%)*	2年生存率 (%)*	5年生存率 (%)*	モデル1(n=417) ハザード 比	モデル1(n=417) ワルド 検定p値	モデル2 (n=374) ハザード 比	モデル2 (n=374) ワルド検 定p値
sLDH	466	正常	439	94.2	95.3	85.2	73.4	考慮せず	考慮せず	1	
		上昇	27	5.8	91.7	82.7	63.6			1.2	0.698
sS100B	466	正常	409	87.8	96.9	88.1	76.1	考慮せず	考慮せず	1	
		上昇	57	12.2	81.7	63.5	48.9			4.0	<0.001
性別	468	男性	228	48.7	95.0	85.8	72.1	考慮せず	考慮せず	1	
		女性	240	51.3	94.8	84.1	73.6			1.2	0.468
ステージ	422	IIIA	66	15.6	96.9	95.2	79.7	1		考慮せず	
		IIIB	157	37.2	96.0	86.4	71.9	1.3	0.460		
		IIIC	199	47.2	92.2	79.8	69.0	1.6	0.152		
年齢	468	≤50歳	120	25.6	96.4	87.8	71.2	考慮せず	考慮せず	1	
		51~60歳	82	17.5	95.1	84.5	66.1			1.3	0.487
		61~70歳	117	25.0	96.5	88.0	81.8			1.2	0.557
		≥71歳	149	31.8	92.4	80.6	70.7			1.3	0.490
sGDF-15	468	<1.5ng/mL	369	78.8	96.1	87.8	75.7	1		1	
		≥1.5ng/mL	99	21.2	90.4	74.2	61.5	2.2	<0.001	3.3	<0.001

10

20

30

40

【表 6 - 2】

潰瘍形成	402	なし あり	246 156	61.2 38.8	94.0 94.1	87.6 81.3	75.1 68.6	考慮せず	1 1.2	1 0.471
局所領域転移の パターン	460	サテライト ライントラ ンジットの み	131	28.5	96.8	90.8	80.1	考慮せず	1	
		リンパ節の み	252	54.8	95.1	87.8	76.9			
		両方	77	16.7	91.8	72.3	53.1			
ブレスローの腫 瘍厚	384	≤1.00mm	48	12.5	93.7	86.7	71.3	考慮せず	1	<0.001
		1.01~2.00 mm	123	32.0	94.1	89.4	77.5			
		2.1~4.00 mm	136	35.4	93.1	83.8	73.4			
		>4.00mm	77	20.1	95.9	78.1	66.7			
以前のアジュバ ント全身治療	468	あり	236	50.4	95.6	85.4	73.6	考慮せず	1	
		なし	232	49.6	93.1	84.6	72.1			

略語:sGDF-15、成長分化因子15の血清レベル;sLDH、乳酸デヒドロゲナーゼの血清レベル;sS100B、血清中のS100B。*Table 10(表11)に95%信頼区間
が示されている。

【表 7 - 1】

Table 7: 切除不能なステージIV患者における血清サンプリング後の全生存

因子	合計 (n=206)	カテゴリー	単変量解析					多変量解析			
			n	%	1年生存率 (%)*	2年生存率 (%)*	5年生存率 (%)*	ログランク p値	モデル1(n=203) ハザード 比	モデル2 (n=193) ハザード 比	モデル2 ワルド検 定p値
sLDH	203	正常	116	57.1	36.2	16.3	0.0	<0.001	考慮せず	1	
		上昇	87	42.9	12.6	5.7	4.6			1.3	0.202
sS100B	193	正常	65	33.7	46.2	26.1	4.8	<0.001	考慮せず	1	
		上昇	128	66.3	12.5	3.1	1.6			1.9	0.003
性別	206	男性	121	58.7	27.3	10.7	3.7	0.961	考慮せず	1	
		女性	85	41.3	24.7	12.9	3.5			1.0	0.846
遠隔転移の パターン	206	軟部組織/肺	58	28.2	43.1	24.0	10.6	<0.001	考慮せず	1	
		その他の内臓	148	71.8	19.6	6.8	1.8			1.0	0.915
年齢	206	≤50歳	57	27.7	31.6	21.1	0.0	0.010	考慮せず	1	
		51～60歳	56	27.2	33.9	4.5	10.2			1.2	0.392
		61～70歳	38	18.4	10.5	0.0	0.0			1.5	0.103
		≥71歳	55	26.7	23.6	7.3	3.6			1.3	0.232
sGDF-15	206	<1.5ng/mL	80	38.8	45.0	19.9	5.2	<0.001	1	1	
		≥1.5ng/mL	126	61.2	14.3	6.3	2.6		1.9	1.5	0.036

10

20

30

40

【表 7 - 2】

Mカテゴリ	206	M1a/b	43	20.9	46.5	25.4	9.1	0.001		1		考慮せず	
CNS関与	206	M1c	163	79.1	20.9	8.0	2.9	<0.001		1.6		<0.001	
		なし	129	62.6	31.0	15.5	4.9						
関与した遠隔部位の数	206	あり	77	37.4	18.2	5.2	2.6	<0.001		考慮せず		1	
		1	50	24.3	44.0	20.0	4.6						
		2	53	25.7	34.0	17.0	10.6						
		3	51	24.8	21.6	7.8	2.0						
		≥4	52	25.2	5.8	1.9	1.9						
以前の全身治療	206	あり	134	65.0	25.4	12.6	6.3	0.703		考慮せず		1	
		なし	72	35.0	27.8	9.7	0.0						

略語:CNS、中枢神経系;sGDF-15、成長分化因子15の血清レベル;sLDH、乳酸デヒドロゲナーゼの血清レベル;sSI00B、血清中のSI00B。*Table 11(表12)に95%信頼区間が示されている。

【表 8 - 1】

Table 8: 適用された全身治療に従う GDF・15 血清レベル

	採血前の4週間内					採血前の任意の時間				
		n	患者の%	中央値 sGDF-15	p値		n	患者の%	中央値 sGDF-15	p値
ステージIV 切除不能な (n=206)	任意の全身治療	あり	98	47.6	1.6	あり	134	65.0	1.8	0.336
		なし	108	52.4	1.7	なし	72	35.0	1.4	
	化学療法	あり ¹	76	36.9	1.8	あり	119	57.8	1.9	0.104
		なし	129	62.6	1.5	なし	87	42.2	1.3	
	イピリムマブ	あり	5	2.4	7.4	あり	11	5.3	4.9	0.122
		なし	201	97.6	1.6	なし	195	94.7	1.6	
	BRAF/MEK阻害剤	あり	15	7.3	0.7	あり	16	7.8	1.0	0.035
		なし	191	92.7	1.8	なし	190	92.2	1.8	
	イピリムマブ以外の免疫療法	あり ²	13	6.3	1.5	あり	35	17.0	1.7	0.677
		なし	191	92.7	1.7	なし	171	83.0	1.6	
その他	あり	2	1.0	1.6	あり	6	2.9	3.1	0.300	
	なし	204	99.0	1.7	なし	200	97.1	1.6		

10

20

30

40

【表 8 - 2】

ステージIV 腫瘍のない (n=87)	任意の全身治療	あり	3	3.4	2.1	0.418	あり	33	37.9	1.3	0.075
		なし	84	96.6	0.9		なし	54	62.1	0.8	
	化学療法	あり	2	2.3	1.8	0.820	あり	18	20.7	1.1	0.297
		なし	85	97.7	0.9		なし	69	79.3	0.9	
	イピリムマブ	あり	0	0			あり	5	5.7	1.3	0.693
		なし	87	100	0.9		なし	82	94.3	0.9	
	BRAF/MEK阻害剤	あり	0	0			あり	0	0		
		なし	87	100	0.9		なし	87	100	0.9	
	イピリムマブ以外の免疫療法	あり	2	2.3	2.6	0.069	あり	17	19.5	1.3	0.151
		なし	85	97.7	0.9		なし	70	80.5	0.8	
ステージIII (n=468)	その他	あり	0	0			あり	2	2.3	1.0	0.947
		なし	87	100	0.9		なし	85	97.7	0.9	
	任意の全身アジュバント治療	あり	65	13.9	0.9	0.998	あり	236	50.4	0.8	0.029
	なし	403	86.1	0.9	なし		232	49.6	0.9		
	インターフェロン-α (アジュバント)	あり ³	61	13.2	0.9	0.387	あり	228	48.7	0.8	0.023
	なし	402	86.8	0.9	なし		240	51.3	0.9		

【0186】

10

20

30

40

【表 9 - 1】

Table 9: 患者の特徴

因子	カテゴリー	同定コホート (n=254)		検証コホート (n=507)		合計 (n=761)	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
性別	男性	133	52.4	263	51.9	396	52.0
	女性	121	47.6	244	48.1	365	48.0
年齢	≤50歳	67	26.4	126	24.9	193	25.4
	51～60歳	57	22.4	97	19.1	154	20.2
	61～70歳	52	20.5	131	25.8	183	24.0
	≥71歳	78	30.7	153	30.2	231	30.4
	中央値年齢	61歳		64歳		63歳	
ステージ (AJCC 2009)	IIIA	23	9.8	43	8.9	66	9.2
	IIIB	47	20.1	110	22.9	157	22.0
	IIIC	58	24.8	141	29.3	199	27.8
	ステージIII-サブステージ不明	20		26		46	
	IV, M1a	15	6.4	21	4.4	36	5.0
	IV, M1b	24	10.3	27	5.6	51	7.1
	IV, M1c	67	28.6	139	28.9	206	28.8
sS100B	正常	196	79.7	352	71.0	548	73.9
	上昇	50	20.3	144	29.0	194	26.1
	不明	8		11		19	
sLDH	正常	209	83.3	427	85.2	636	84.6
	上昇	42	16.7	74	14.8	116	15.4
	不明	3		6		9	
内臓関与	軟部組織のみ	16	15.1	29	15.5	45	5.9
	肺	26	24.5	31	16.6	57	7.5
	その他の臓器	64	60.4	127	67.9	191	25.1
	なし(ステージIII)	148		320		468	61.5
以前の全身 治療	インターフェロン-α(アジュバント)	104	34.9	226	38.8	330	37.5
	化学療法	47	15.8	96	16.5	143	16.2
	イピリムマブ	6	2.0	10	1.7	16	1.8
	BRAF/MEK阻害剤	7	2.3	9	1.5	16	1.8
	イピリムマブ以外の免疫療法	25	8.4	32	5.5	57	6.5
	その他	3	1.0	6	1.0	9	1.0
	なし	106	35.6	204	35.0	310	35.2
臨床状態	ステージIII腫瘍のない	148	58.3	320	63.1	468	61.5
	ステージIV腫瘍のない	34	13.4	53	10.5	87	11.4
	ステージIV切除不能な	72	28.3	134	26.4	206	27.1
潰瘍形成	あり	87	45.3	145	36.9	232	39.7
	なし	105	54.7	248	63.1	353	60.3
	不明	62		114		176	

10

20

30

40

【表 9 - 2】

局所領域転移 のパターン	サテライト/イントランジッ トのみ	56	22.0	111	21.9	167	21.9
	リンパ節のみ	114	44.9	232	45.8	346	45.5
	両方	48	18.9	97	19.1	145	19.1
	遠隔転移のみ	24	9.4	44	8.7	68	8.9
	不明	12	4.7	23	4.5	35	4.6
ブレスローの 腫瘍厚	≤1.00mm	21	11.5	54	14.5	75	13.5
	1.01～2.00mm	52	28.6	114	30.6	166	29.9
	2.01～4.00mm	65	35.7	128	34.3	193	34.8
	>4.00mm	44	24.2	77	20.6	121	21.8
	不明	72		134		206	
CNS関与 (ステージIVの み)	あり	34	32.1	57	30.5	91	31.1
	なし	72	67.9	130	69.5	202	68.9
関与する遠隔 部位の数 (ステージIVの み)	1	41	38.7	59	31.6	100	34.1
	2	24	22.6	53	28.3	77	26.3
	3	19	17.9	40	21.4	59	20.1
	≥4	22	20.8	35	18.7	57	19.5

10

20

【 0 1 8 7 】

【表 10 - 1】

Table 10: 腫瘍のないステージIII患者における血清サングリンゲ後の全生存

因子	合計 (n=468)	カテゴリー	単変量解析						ロジスティック p値
			n	%	中央値 生存(月)	1年生存率 [95% CI](%)	2年生存率 [95% CI](%)	5年生存率 [95% CI](%)	
sLDH	466	正常	439	94.2	n.r.	95.3 [93:97]	85.2 [82:89]	73.4 [68:78]	0.391
		上昇	27	5.8	n.r.	91.7 [81:100]	82.7 [67:98]	63.6 [41:87]	
sS100B	466	正常	409	87.8	n.r.	96.9 [95:99]	88.1 [85:91]	76.1 [71:81]	<0.001
		上昇	57	12.2	n.r.	81.7 [71:92]	63.5 [50:77]	48.9 [32:65]	
性別	468	男性	228	48.7	n.r.	95.0 [92:98]	85.8 [81:91]	72.1 [65:79]	0.894
		女性	240	51.3	n.r.	94.8 [92:98]	84.1 [79:89]	73.6 [67:80]	
ステージ	422	IIIA	66	15.6	n.r.	96.9 [93:100]	95.2 [90:100]	79.7 [68:91]	0.176
		IIIB	157	37.2	n.r.	96.0 [93:99]	86.4 [81:92]	71.9 [63:81]	
		IIIC	199	47.2	n.r.	92.2 [88:96]	79.8 [74:86]	69.0 [61:77]	
年齢	468	≤50歳	120	25.6	n.r.	96.4 [93:100]	87.8 [82:94]	71.2 [61:81]	0.093
		51~60歳	82	17.5	n.r.	95.1 [90:100]	84.5 [76:93]	66.1 [53:79]	
		61~70歳	117	25.0	n.r.	96.5 [93:100]	88.0 [82:94]	81.8 [74:90]	
		≥71歳	149	31.8	n.r.	92.4 [88:97]	80.6 [74:87]	70.7 [62:79]	
sGDF-15	468	<1.5ng/mL	369	78.8	n.r.	96.1 [94:98]	87.8 [84:91]	75.7 [70:81]	0.001
		≥1.5ng/mL	99	21.2	n.r.	90.4 [84:96]	74.2 [65:83]	61.5 [51:72]	
潰瘍形成	402	なし	246	61.2	n.r.	94.0 [91:97]	87.6 [83:92]	75.1 [60:78]	0.221
		あり	156	38.8	n.r.	94.1 [90:98]	81.3 [75:88]	68.6 [69:812]	
局所領域転移の パターン	460	サテライト/イント ランジットのみ	131	28.5	n.r.	96.8 [94:100]	90.8 [86:96]	80.1 [72:88]	<0.001
		リンパ節のみ	252	54.8	n.r.	95.1 [92:98]	87.8 [84:92]	76.9 [71:83]	
		両方	77	16.7	65.2	91.8 [86:98]	72.3 [62:83]	53.1 [38:68]	

10

20

30

40

【表 10-2】

ブレスローの 腫瘍厚	384	≤1.00mm	48	12.5	n.r.	93.7	[87:100]	86.7	[77:97]	71.3	[56:86]	0.396
		1.01~2.00mm	123	32.0	n.r.	94.1	[90:98]	89.4	[84:95]	77.5	[69:87]	
		2.01~4.00mm	136	35.4	n.r.	93.1	[89:98]	83.8	[77:90]	73.4	[65:82]	
		>4.00mm	77	20.1	n.r.	95.9	[91:100]	78.1	[68:88]	66.7	[55:79]	
以前のアジュバン ト全身治療	468	あり	236	50.4	n.r.	95.6	[94:99]	85.4	[81:90]	73.6	[67:80]	0.821
		なし	232	49.6	n.r.	93.1	[90:96]	84.6	[80:90]	72.1	[65:79]	

CI:信頼区間;n.r.:到達されていない

【表 1 1 - 1】

Table 11: 切除不能なステージIV患者における血清サンプリング後の全生存

因子	合計 (n=206)	カテゴリー	単変量解析						ログランク p値
			n	%	中央値 生存(月)	1年生存率 [95% CI](%)	2年生存率 [95% CI](%)	5年生存率 [95% CI](%)	
sLDH	203	正常	116	57.1	9.2	36.2 [27;45]	16.3 [10;23]	0.0 [0;0]	<0.001
		上昇	87	42.9	4.0	12.6 [6;20]	5.7 [1;11]	4.6 [0;9]	
sS100B	193	正常	65	33.7	10.2	46.2 [34;58]	26.1 [15;37]	4.8 [0;13]	<0.001
		上昇	128	66.3	5.2	12.5 [7;18]	3.1 [0;6]	1.6 [0;4]	
性別	206	男性	121	58.7	7.4	27.3 [19;35]	10.7 [5;16]	3.7 [0;9]	0.961
		女性	85	41.3	7.6	24.7 [16;34]	12.9 [6;20]	3.5 [0;8]	
遠隔転移のパターン	206	軟部組織/肺	58	28.2	10.0	43.1 [30;56]	24.0 [13;35]	10.6 [2;19]	<0.001
		その他の内臓	148	71.8	6.1	19.6 [13;26]	6.8 [3;11]	1.8 [0;5]	
年齢	206	≤50歳	57	27.7	7.6	31.6 [20;44]	21.1 [11;32]	0.0 [0;0]	0.010
		51~60歳	56	27.2	8.5	33.9 [22;46]	4.5 [2;24]	10.2 [2;18]	
		61~70歳	38	18.4	6.6	10.5 [1;20]	0.0 [0;0]	0.0 [0;0]	
		≥71歳	55	26.7	7.0	23.6 [12;35]	7.3 [0;14]	3.6 [0;9]	
sGDF-15	206	<1.5ng/mL	80	38.8	11	45.0 [34;56]	19.9 [11;29]	5.2 [0;13]	<0.001
		≥1.5ng/mL	126	61.2	5.7	14.3 [8;20]	6.3 [2;11]	2.6 [0;6]	
Mカテゴリー	206	M1a/b	43	20.9	11.6	46.5 [32;61]	25.4 [12;38]	9.1 [0;18]	0.001
		M1c	163	79.1	6.6	20.9 [15;27]	8.0 [4;12]	2.9 [0;6]	
CNS関与	206	なし	129	62.6	8.5	31.0 [23;39]	15.5 [9;22]	4.9 [0;10]	<0.001
		あり	77	37.4	4.7	18.2 [10;27]	5.2 [0;10]	2.6 [0;6]	

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

関与する遠隔部位の数	206	1	50	24.3	9.2	44.0	[30:58]	20.0	[9:31]	4.6	[0:12]	<0.001
		2	53	25.7	7.8	34.0	[21:47]	17.0	[7:27]	10.6	[2:19]	
		3	51	24.8	6.4	21.6	[10:33]	7.8	[1:15]	2.0	[0:6]	
		≥ 4	52	25.2	4.0	5.8	[0:12]	1.9	[0:6]	1.9	[0:6]	
		あり	134	65.0	6.8	25.4	[18:33]	12.6	[7:18]	6.3	[2:11]	
以前の全身治療	206	なし	72	35.0	8.6	27.8	[17:38]	9.7	[3:17]	0.0	[0:0]	0.703

CI:信頼区間

【0 1 8 9】

10

20

30

40

【表 1 2 - 1】

Table 12: 検証コホートにおける腫瘍のないステージIII患者の全生存

因子	合計 (n=320)	カテゴリー	単変量解析				ロジス ティックp値	多変量解析			
			n	%	1年生存率 [95% CI](%)	5年生存率 [95% CI](%)		モデル1(n=294) ハザード 比	モデル1(n=294) ワルド 検定p値	モデル2(n=263) ハザード 比	モデル2(n=263) ワルド 検定p値
sLDH	318	正常	300	94.3	95.5	[93;98]	73.6	考慮せず	考慮せず	1	
		上昇	18	5.7	94.1	[83;100]	56.8			1.0	0.980
sS100B	318	正常	274	86.2	97.7	[96;100]	76.7	考慮せず	考慮せず	1	
		上昇	44	13.8	80.7	[69;93]	47.2			4.3	<0.001
性別	320	男性	160	50.0	94.8	[92;98]	71.4	考慮せず	考慮せず	1	
		女性	160	50.0	95.4	[92;99]	74.2			1.5	0.218
ステージ	294	IIIA	43	14.6	97.7	[93;100]	88.8	1	考慮せず	考慮せず	
		IIIB	110	37.4	96.2	[93;100]	67.2	2.8			
		IIIC	141	48.0	92.6	[88;97]	70.0	2.9			
年齢	320	≤50歳	77	24.1	97.2	[93;100]	77.0	考慮せず	考慮せず	1	
		51~60歳	52	16.3	96.2	[91;100]	63.6			1.3	0.544
		61~70歳	85	26.6	95.1	[90;100]	78.2			1.2	0.665
		≥71歳	106	33.1	93.2	[88;98]	69.0			1.3	0.615
sGDF-15	320	<1.5ng/mL	252	78.8	95.9	[93;98]	76.2	1	考慮せず	1	
		≥1.5ng/mL	68	21.3	92.1	[86;99]	59.9	2.1		2.8	0.005
潰瘍形成	282	なし	182	64.5	94.3	[91;98]	74.1	考慮せず	考慮せず	1	
		あり	100	35.5	94.8	[91;99]	69.8			1.4	0.295

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

局所領域転移 のパターン	318	サデライト/イント ランジットのみ	90	28.3	97.7	[95:100]	80.0	[70:90]	<0.001	考慮せず	1	
			172	54.1	95.2	[92:98]	75.1	[67:83]			2.0	0.091
			56	17.6	90.5	[83:98]	53.2	[38:69]			5.3	<0.001
ブレスローの 腫瘍厚	269	両方 ≤1.00mm	38	14.1	94.7	[88:100]	63.6	[44:83]	0.532	考慮せず	1	
			87	32.3	94.0	[89:99]	79.1	[68:90]			2.2	0.078
			93	34.6	92.2	[87:98]	72.1	[61:93]			1.9	0.173
			51	19.0	97.9	[94:100]	71.7	[58:68]			1.7	0.299
以前のアジュ バント全身治 療	320	あり	161	50.3	96.9	[94:100]	74.7	[67:82]	0.777	考慮せず	1	
			159	49.7	93.3	[90:97]	71.2	[63:80]			1.1	0.640

LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ、CI:信頼区間。

【表 1 3 - 1】

Table 13: すべてのステージIV患者における血清サンプルリンダ後の全生存

因子	合計 (n=293)	カテゴリー	単変量解析				多変量解析			
			n	%	1年生存率 [95% CI](%)	2年生存率 [95% CI](%)	ログラ ンクp値	モデル1(n=293) ハザード 比	モデル2(n=276) ハザード 比	ワルド 検定p値
sLDH	286	正常	197	68.9	60.4 [54:67]	45.1 [38:52]	<0.001	考慮せず	1	1
		上昇	89	31.1	14.6 [7:22]	7.5 [2:13]			1.3	0.195
sS100B	276	正常	139	50.4	72.7 [65:80]	60.4 [52:69]	<0.001	考慮せず	1	1
		上昇	137	49.6	17.5 [11:24]	7.0 [3:11]			2.0	0.001
性別	293	男性	168	57.3	47.0 [40:55]	31.3 [24:38]	0.525	考慮せず	1	1
		女性	125	42.7	46.4 [38:55]	36.7 [28:45]			1.0	0.993
疾患状態	293	腫瘍のない	87	29.7	95.4 [91:100]	86.2 [79:93]	<0.001	考慮せず	1	1
		切除不能な	206	70.3	26.2 [20:32]	11.6 [7:16]			8.6	<0.001
遠隔転移の パターン	293	軟部組織/肺	102	34.8	66.7 [58:76]	51.9 [42:62]	<0.001	考慮せず	1	1
		その他の内臓	191	65.2	36.1 [30:43]	24.4 [18:31]			1.1	0.692
年齢	293	≤50歳	73	24.9	46.6 [35:58]	36.9 [26:48]	0.684	考慮せず	1	1
		51~60歳	72	24.6	45.8 [34:57]	26.2 [16:36]			1.2	0.481
		61~70歳	66	22.5	48.5 [36:61]	37.8 [26:50]			1.4	0.143
		≥71歳	82	28.0	46.3 [36:57]	34.0 [24:44]			1.2	0.334
sGDF-15	293	<1.5ng/mL	144	49.1	69.4 [62:77]	49.2 [41:57]	<0.001	1	1	1
		≥1.5ng/mL	149	50.9	27.5 [20:35]	18.6 [12:25]		2.3	<0.001	1.5
Mカテゴリー	293	M1a/b	87	29.7	72.4 [63:82]	56.2 [46:67]	<0.001	1	考慮せず	
		M1c	206	70.3	35.9 [29:43]	24.1 [18:30]		2.1		

10

20

30

40

【表 1 3 - 2】

CNS関与	293	なし あり	202 91	68.9 31.1	54.5 29.7	[48:61] [20:39]	41.4 16.5	[35:48] [9:24]	<0.001	考慮せず	1 1.7	0.003
関与する遠隔部位の数	293	1	100	34.1	70.0	[61:79]	54.8	[45:65]	<0.001	考慮せず	1	
		2	77	26.3	53.2	[42:64]	36.4	[26:47]			1.5	0.053
		3	59	20.1	30.5	[19:42]	16.6	[7:26]			1.9	0.018
		≥4	57	19.5	14.0	[5:23]	10.5	[3:19]			2.2	0.005
以前の全身治療	293	なし	126	43.0	55.6	[47:64]	39.4	[34:48]	0.042	考慮せず	1	
		あり	167	57.0	40.1	[33:48]	29.9	[23:37]			1.3	0.059

LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ、CI:信頼区間。

【表 1 4 - 1】

Table 14: 腫瘍のないステージIV患者の血清サンプリング後の全生存

因子	合計 (n=87)	カテゴリー	単変量解析				多変量解析			
			n	%	1年生存率 [95% CI](%)	2年生存率 [95% CI](%)	ログ ランク p値	モデル1(n=294) ハザード 比	モデル2(n=263) ハザード 比	検定p値
sLDH	83	正常	81	97.6	95.1	[90:100]	86.4	[79:94]	考慮せず	
		上昇	2	2.4	n.d.	n.d.	n.d.			
sS100B	83	正常	74	89.2	95.9	[91:100]	89.2	[82:96]	考慮せず	
		上昇	9	10.8	88.9	[68:100]	66.7	[36:97]		
性別	87	男性	47	54.0	97.7	[94:100]	85.1	[75:95]	考慮せず	
		女性	40	46.0	92.5	[84:100]	87.5	[77:98]		
遠隔転移のパターン	87	軟部組織/肺	44	50.6	97.7	[93:100]	86.4	[76:97]	考慮せず	
		その他の内臓	43	49.4	93.0	[85:100]	85.9	[75:96]		
年齢	87	≤50歳	16	18.4	100.0		93.8	[82:100]	考慮せず	
		51~60歳	16	18.4	87.5	[71:100]	68.8	[46:92]		
		61~70歳	28	32.2	100.0		89.3	[78:100]		
		≥71歳	27	31.0	92.6	[83:100]	88.9	[77:100]		
		<1.5ng/mL	64	73.6	93.8	[88:100]	85.9	[77:94]		
sGDF-15	87	≥1.5ng/mL	23	26.4	100	[100:100]	87.0	[73:100]	1	1
		M1a/b	44	50.6	97.7	[93:100]	86.4	[76:97]	1.2	0.651
Mカテゴリー	87	M1c	43	49.4	93.0	[85:100]	85.9	[76:96]	1	1.0
		なし	73	83.9	95.9	[91:100]	87.6	[80:95]	1.1	0.821
CNS関与	87	あり	14	16.1	92.9	[79:100]	78.6	[57:100]	考慮せず	

10

20

30

40

【表 1 4 - 2】

関与する遠隔部位の 数	87	1	50	57.5	96.0	[91;100]	90.0	[82;98]	0.013	考慮せず	1	0.004
以前の全身治療	87	≥2	37	42.5	94.6	[87;100]	81.0	[68;94]	0.003	考慮せず	4.6	0.001
		あり	33	37.9	97.0	[91;100]	97.0	[91;100]			1	
		なし	54	62.1	92.6	[86;100]	79.5	[69;90]			8.9	

LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ、CI:信頼区間;n.d.:行わず。

【表 15 - 1】

Table 15: 完全転移巣切除術後に腫瘍のないステージIV患者の全生存

因子	合計 (n=74)	カテゴリー	単変量解析				ログ ランク p値	多変量解析			
			n	%	1年生存率 [95% CI](%)	2年生存率 [95% CI](%)		モデル1(n=74) ハザード 比	モデル1(n=74) ワルド検 定p値	モデル2(n=71) ハザード 比	モデル2(n=71) ワルド検 定p値
sLDH	71	正常	70	98.6	94.3	[89;100]	84.2	[76;93]	考慮せず	考慮せず	考慮せず
		上昇	1	1.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
sSI00B	71	正常	63	88.7	95.2	[90;100]	87.3	[79;96]	考慮せず	1	0.023
		上昇	8	11.3	87.5	[65;100]	62.5	[29;96]			
性別	74	男性	39	52.7	97.4	[93;100]	82.0	[70;94]	考慮せず	1	0.893
		女性	35	47.3	91.4	[82;100]	85.7	[74;97]			
遠隔転移の パターン	74	軟部組織/肺	39	52.7	97.4	[93;100]	84.6	[73;96]	考慮せず	1	0.809
		その他の内臓	35	47.3	91.4	[82;100]	82.7	[70;95]			
年齢	74	≤50歳	15	20.3	100		93.3	[81;100]	考慮せず	1	0.405
		51~60歳	15	20.3	86.7	[70;100]	66.7	[43;91]			
		61~70歳	23	31.1	100		87.0	[73;100]			
		≥71歳	21	28.4	90.5	[78;100]	85.7	[71;100]			
sGDF-15	74	<1.5ng/mL	56	75.7	92.9	[86;100]	83.9	[74;94]	1	1	1.0
		≥1.5ng/mL	18	24.3	100		83.3	[66;100]			
Mカテゴリー	74	M1a/b	39	52.7	97.4	[93;100]	84.6	[73;96]	1	1.0	考慮せず
		M1c	35	47.3	91.4	[82;100]	82.7	[70;95]			
CNS関与	74	なし	60	81.1	95.0	[90;100]	84.9	[76;94]	考慮せず	1	0.849
		あり	14	18.9	92.9	[79;100]	78.6	[57;100]			

10

20

30

40

【表 1 5 - 2】

関与する遠隔 部位の数	74	1	45	60.8	95.6	[90:100]	88.9	[80:98]	0.003	考慮せず	1	0.16
		≥ 2	29	39.2	93.1	[94:100]	75.7	[60:91]			3.4	

LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ、CI:信頼区間;n.d.:行わず

10

20

30

40

【表 16 - 1】

Table 16: 治療を受けていない切除不能なステージIV患者の全生存

因子	合計 (n=72)	カテゴリー	単変量解析				多変量解析			
			n	%	1年生存率 [95% CI](%)	2年生存率 [95% CI](%)	ログ ランク p値	モデル1(n=72) ハザード 比	モデル2(n=66) ハザード 比	ワルド 検定p値
sLDH	69	正常	44	63.8	31.8 [18:46]	11.4 [2:21]	0.135	考慮せず	1	0.160
		上昇	25	36.2 [4:36]	8.0 [0:19]					
sS100B	66	正常	26	39.4	38.5 [20:57]	19.2 [4:365]	0.055	考慮せず	1	0.658
		上昇	40	60.6 [6:29]	5.0 [0:12]					
性別	72	男性	43	59.7	27.9 [15:47]	11.6 [2:21]	0.407	考慮せず	1	0.010
		女性	29	40.3 [11:44]	6.9 [0:16]					
遠隔転移の パターン	72	軟部組織/肺	26	36.1	26.9 [10:44]	11.5 [0:24]	0.715	考慮せず	1	0.179
		その他の内臓	46	63.9 [15:41]	8.7 [1:17]					
		≤50歳	20	27.8 [19:62]	25.0 [6:44]					
		51~60歳	16	22.2 [14:61]	6.3 [0:18]					
年齢	72	61~70歳	11	15.3 [0:26]	0.0 [0:0]	0.059	考慮せず	1.3	0.512	
		≥71歳	25	34.7 [4:36]	4.0 [0:12]					
sGDF-15	72	<1.5ng/mL	33	45.8 [29:63]	15.2 [3:27]	0.006	1	1	0.015	
		≥1.5ng/mL	39	54.2 [2:23]	5.1 [0:12]					
Mカテゴリー	72	M1a/b	18	25.0 [12:55]	11.1 [0:26]	0.348	1	考慮せず		
		M1c	54	75.0 [14:38]	9.3 [2:17]					
CNS関与	72	なし	51	70.8 [15:40]	11.8 [3:21]	0.047	考慮せず	1		
		あり	21	29.2 [9:48]	4.8 [0:14]					

10

20

30

40

【表 1 6 - 2】

関与する遠隔 部位の数	72	1	31	43.1	41.9	[25:60]	19.4	[5:33]	考慮せず	0.008	1
		2	16	22.2	31.3	[9:54]	0.0	[0:0]			2.3
		3	12	16.7	16.7	[0:38]	8.3	[0:24]			2.7
		≥4	13	18.1	0.0	[0:0]	0.0	[0:0]			3.5
		LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ、CI:信頼区間									

LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ、CI:信頼区間

【表 17-1】

Table 17: 検証コホートにおける切除不能なステージIV患者の全生存

因子	合計 (n=134)	カテゴリー	単変量解析				多変量解析			
			n	%	1年生存率 [95% CI](%)	2年生存率 [95% CI](%)	ログ ランク p値	モデル1(n=134) ハザード比	モデル2(n=128) ハザード比	ワルド検 定p値
sLDH	133	正常	79	59.4	32.9 [23:43]	12.7 [5:20]	0.001	考慮せず	1	0.180
		上昇	54	40.6	11.1 [3:20]	5.6 [0:12]				
sSI00B	128	正常	34	26.6	47.1 [30:64]	23.5 [9:38]	<0.001	考慮せず	1	0.003
		上昇	94	73.4	12.8 [6:20]	3.2 [0:7]				
性別	134	男性	72	53.7	22.2 [13:32]	8.3 [2:15]	0.756	考慮せず	1	0.912
		女性	62	46.3	25.8 [15:37]	11.3 [3:19]				
遠隔転移のパターン	134	軟部組織/肺	33	24.6	36.4 [20:53]	18.2 [5:31]	0.014	考慮せず	1	0.377
		その他の内臓	101	75.4	19.8 [12:28]	6.9 [2:12]				
年齢	134	≤50歳	37	27.6	27.0 [13:41]	21.6 [8:35]	0.022	考慮せず	1	0.156
		51~60歳	34	25.4	35.3 [19:51]	8.8 [0:18]				
		61~70歳	30	22.4	10.0 [0:21]	0.0 [0:0]				
		≥71歳	33	24.6	21.2 [7:35]	6.1 [0:14]				
sGDF-15	134	<1.5ng/mL	51	38.1	41.2 [28:55]	13.7 [4:23]	0.001	1	1	0.018
		≥1.5ng/mL	83	61.9	13.3 [6:21]	7.2 [2:13]				
Mカテゴリー	134	M1a/b	21	15.7	42.9 [22:64]	19.0 [2:36]	0.034	1	1	考慮せず
		M1c	113	84.3	20.4 [13:28]	8.0 [3:13]				
CNS関与	134	なし	88	65.7	26.1 [17:35]	11.4 [5:18]	0.023	考慮せず	1	0.038
		あり	46	34.3	19.6 [8:31]	6.5 [0:14]				

10

20

30

40

【表 17-2】

関与する遠隔部位の数	134	1	28	20.9	42.9	[25:61]	17.9	[4:32]	考慮せず	1	
		2	38	28.4	26.3	[12:40]	10.5	[1:20]		1.3	0.451
		3	34	25.4	20.6	[7:34]	8.8	[0:18]		1.3	0.543
		≥4	34	25.4	8.8	[0:18]	2.9	[0:9]		1.9	0.110
以前の全身治療	134	あり	88	65.7	27.3	[18:37]	12.5	[6:19]	考慮せず	1	
		なし	46	34.3	21.7	[10:34]	4.3	[0:10]		1.1	0.516

LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ、CI:信頼区間

【0195】

10

20

30

40

【表 18 - 1】

Table 18: CNS関与を有する切除不能なステージIV患者の全生存

因子	合計 (n=77)	カテゴリー	単変量解析					多変量解析							
			n	%	1年生存率 [95% CI](%)	2年生存率 [95% CI](%)	ログ ランク p値	モデル1(n=73)		モデル2(n=73)		モデル3(n=76)		モデル4(n=73)	
								ハザード ド比	ワルド 検定p値	ハザード ド比	ワルド 検定p値	ハザード ド比	ワルド 検定p値	ハザード ド比	ワルド 検定p値
sLDH	76	正常	37	48.7	32.4 [17.48]	10.8 [1.21]	<0.001	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず
		上昇	39	51.3	2.6 [0.8]	0.0 [0.0]		1.8	0.062	3.1	<0.001	3.1	<0.001	3.1	<0.001
sS100B	73	正常	18	24.7	38.9 [16.61]	16.7 [0.34]	0.001	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず
		上昇	55	75.3	5.5 [0.12]	0.0 [0.0]		1.9	0.187	1.9	0.187	1.9	0.187	1.9	0.187
性別	77	男性	47	61.0	21.3 [10.33]	6.4 [0.124]	0.893	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず
		女性	30	39.0	13.3 [1.26]	3.3 [0.10]		1.2	0.517	1.1	0.726	1.0	0.966	1.3	0.310
年齢	77	≤50歳	23	29.9	26.1 [8.44]	13.0 [0.27]	0.711	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず
		51~60歳	24	31.2	12.5 [0.26]	4.2 [0.12]		1.0	0.953	1.1	0.778	1.2	0.654	1.1	0.869
		61~70歳	16	20.8	12.5 [0.29]	0.0 [0.0]		1.2	0.581	1.2	0.525	1.1	0.692	1.3	0.422
		≥71歳	14	18.2	21.4 [0.43]	0.0 [0.0]		1.2	0.599	1.3	0.519	1.1	0.812	1.5	0.317
sGDF-15	77	<1.5ng/ mL	27	35.1	37.0 [19.55]	11.1 [0.23]	0.001	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず
		≥1.5ng/ mL	50	64.9	8.0 [1.16]	2.0 [0.6]		1.5	0.365	2.3	0.006	2.3	0.006	2.3	0.006
関与する 遠隔部位 の数	77	1	5	6.5	40.0 [0.83]	0.0 [0.0]	0.265	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず	1	考慮せず
		2	15	19.5	33.3 [9.57]	13.3 [0.31]		2.1	0.326	1.2	0.799	2.2	0.208	2.9	0.116
		3	25	32.5	16.0 [2.30]	4.0 [0.12]		1.3	0.683	1.6	0.385	1.6	0.634	1.5	0.528
		≥4	32	41.6	9.4 [0.20]	3.1 [0.9]		1.5	0.663	1.4	0.525	1.3	0.700	1.7	0.438

10

20

30

40

【表 18-2】

以前の 全身治 療	77	あり	56	72.7	14.3	[5:24]	5.4	[0:11]	0.929	1	0.480	1	0.306	1	0.331	1	0.940
		なし	21	27.3	28.6	[9:48]	4.8	[0:14]		1.3	0.480	1.3	0.306	1.3	0.331	1.0	0.940

LDH:乳酸デヒドロゲナーゼ、CI:信頼区間

【0196】

まとめ： 現在の研究において、本発明者らは、驚くべきことに、hGDF-15の血清濃度が、転移性黒色腫を有する患者の強力な予後バイオマーカーであることを見出した。

【0197】

例えば、本発明者らは、転移性黒色腫を有する761人の患者のコホートにおいて、1.5ng

10

20

30

40

50

/mLを上回るhGDF-15血清濃度が、悪い全生存を最も強く予測することを見い出した。

【0198】

腫瘍のないステージIII患者では、日常的な臨床ルーチンにおいて、世界的な許容される予後バイオマーカーは使用されていない。個々の予後の推定は、主に、それぞれサブステージIIIA、IIIB又はIIICの定義のために考慮される臨床的及び病理組織学的特徴に基づいている(Balch, CMら、J Clin Oncol / 27 / 6199~206頁 2009年)。血清LDHは、局所領域転移の手術後に腫瘍のない患者において予後情報を有さない(Wevers, KPら、Ann Surg Oncol / 20 / 2772~9頁 2013年)。欧州では、黒色腫患者におけるその予後影響の大量のエビデンスにもかかわらず(Mocellin, Sら、Int J Cancer / 123 / 2370~6頁 2008年)、主に再発の早期検出のためにS100Bの血清レベルしか解析されない(Pflugfelder, A 10
ら、J Dtsch Dermatol Ges / 11 / 563~602頁 2013年)。現在の研究において、本発明者らは、驚くべきことに、sGDF15及びsS100Bは、両方ともこれらの患者の独立した予後マーカーであり、疾患で死亡する可能性の高い患者の同定のための臨床サブステージよりも大幅に優れていることを見い出した。

【0199】

sGDF-15単独の解析によって、高い血清濃度を有する、低いレベルを有する患者と比較して採血後3年以内に死亡する2倍増大されたリスクを有する(それぞれ33%対16%)すべての腫瘍のないステージIII患者の21%を同定することが可能となった。sGDF-15及びsS100Bの組み合わせられた考慮は、リスクのある患者の割合を21%(sS100Bに関わらずsGDF-15が上昇した)から31%(バイオマーカーのいずれか一方又は両方が上昇した)に増大し、バイオマ 20
ーカーカテゴリー間のOSの相違を更に増大した。詳細には、正常なsS100B及び低いsGDF-15を有する場合、3年以内に死亡するリスクは、少なくとも一方のバイオマーカーが上昇した患者の33%と比較してわずか14%であった。採血は、これらの患者において疾患の臨床的又は放射線学エビデンスを伴わない時点で行い、それによって、特に、両バイオマーカーの組み合わせた解析が、より集中的な調査又はアジュバント療法から利益を受け得る患者を同定することを可能にし得る。

【0200】

したがって、本発明によれば、例えば、更なるバイオマーカーとしてのS100Bと組み合わせた、生存の予測のためのバイオマーカーとしてのhGDF-15の使用は、生存の信頼のおける予後がまだ利用可能ではなかった黒色腫患者のサブグループにおいてさえ高度に有利 30
である。

【0201】

切除不能なステージIV黒色腫患者では、内臓転移のパターン及びsLDHが、患者を予後的に異なるMカテゴリーM1a、M1b又はM1cに分類するために規則的に使用されている(Balch, CMら、J Clin Oncol / 27 / 6199~206頁 2009年)。本研究では、これら2種の確率された予後因子と組み合わせたsGDF-15の考慮は、個々の患者の予後の推定を有意に改善し(HR 1.7;p<0.001;内臓転移のパターン:HR1.8;p<0.001;sLDH:HR1.6;p=0.002)、1年生存する極めて悪い確率(3.3%)を有する関連サブグループ(切除不能な遠隔転移を有するすべての患者の30%を含む)の同定を可能にした。対照的に、sGDF-15の考慮を伴わない最も悪いバイオ 40
マーカーカテゴリー(肺以外の内臓転移及び上昇したsLDH;すべての切除不能なステージIV患者の35%)は、8.3%の1年生存推定値を示した。sGDF-15の更なる考慮は、M1a/b並びにM1c患者に予後情報を付加した。sGDF-15の考慮に基づく予後情報の獲得は、患者カウンセリング及び臨床試験内の層別化にとって価値があり、治療決定のための個々のリスク/ベネフィット評価に影響を及ぼし得る。進行黒色腫のための種々の治療選択肢のアベイラビリティ(及び出現)並びに有効性と副作用との間の避けることのできないトレードオフを考慮して、増強された予後予測が、個別化療法の更なるガイダンスのために役立つものとなる可能性が最も高い。

【0202】

結論として、本発明によれば、sGDF-15は、転移性黒色腫等の黒色腫を有する患者における強力な予後バイオマーカーである。 50

【0203】

腫瘍のないステージIII患者では、単独又はsS100Bと組み合わせたsGDF-15の考慮によって、より集中的な患者調査又はアジュバント治療から利益を受け得る、疾患で死亡するリスクの増大した個体を同定することが可能となる。切除不能なステージIV黒色腫を有する患者では、sGDF-15、sLDH及び内臓転移のパターンは、独立した予後因子である。これら3種の因子の組み合わせられた考慮によって、個々の予後の推定がMカテゴリー単独と比較して改善され、個別化治療決定に影響を及ぼし得る。

【産業上の利用可能性】

【0204】

本発明による装置及びキットは、診断用製剤の製造のための公知の標準に従って、工業的に製造し、項目化された予測方法のための製品として販売してもよい。したがって、本発明は、産業上利用可能である。

【0205】

【表 19 - 1】

参考文献

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

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

Baek, SJ; Okazaki, R; Lee, SH; Martinez, J; Kim, JS; Yamaguchi, K; Mishina, Y; Martin, DW; Shoieb, A; McEntee, MF; Eling, TE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology* / 131 / 1553-60. 2006

Baek, SJ; Kim, KS; Nixon, JB; Wilson, LC; Eling, TE. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* / 59 / 901-8. 2001

Balch, CM; Gershenwald, JE; Soong, SJ; Thompson, JF; Atkins, MB; Byrd, DR; Buzaid, AC; Cochran, AJ; Coit, DG; Ding, S; Eggermont, AM; Flaherty, KT; Gimotty, PA; Kirkwood, JM; McMasters, KM; Mihm, MC, Jr.; Morton, DL; Ross, MI; Sober, AJ; Sondak, VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* / 27 / 6199-206. 2009

Balch, CM; Buzaid, AC; Soong, SJ; Atkins, MB; Cascinelli, N; Coit, DG; Fleming, ID; Gershenwald, JE; Houghton, A, Jr.; Kirkwood, JM; McMasters, KM; Mihm, MF; Morton, DL; Reintgen, DS; Ross, MI; Sober, A; Thompson, JA; Thompson, JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* / 19 / 3635-48. 2001

Bauskin, AR; Brown, DA; Kuffner, T; Johnen, H; Luo, XW; Hunter, M; Breit, SN. Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res* / 66 / 4983-6. 2006

Blanco-Calvo, M; Tarrio, N; Reboredo, M; Haz-Conde, M; Garcia, J; Quindos, M; Figueroa, A; Anton-Aparicio, L; Calvo, L; Valladares-Ayerbes, M. Circulating levels of GDF15, MMP7 and miR-200c as a poor prognostic signature in gastric cancer. *Future Oncol* / 10 / 1187-202. 2014

Bock, AJ; Stavnes, HT; Kempf, T; Trope, CG; Berner, A; Davidson, B; Staff, AC. Expression and clinical role of growth differentiation factor-15 in ovarian carcinoma effusions. *Int J Gynecol Cancer* / 20 / 1448-55. 2010

10

20

30

40

【表 19-2】

Boyle, GM; Pedley, J; Martyn, AC; Banducci, KJ; Strutton, GM; Brown, DA; Breit, SN; Parsons, PG. Macrophage inhibitory cytokine-1 is overexpressed in malignant melanoma and is associated with tumorigenicity. *J Invest Dermatol* / 129 / 383-91. 2009

Brown, DA; Lindmark, F; Stattin, P; Balter, K; Adami, HO; Zheng, SL; Xu, J; Isaacs, WB; Gronberg, H; Breit, SN; Wiklund, FE. Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer. *Clin Cancer Res* / 15 / 6658-64. 2009

10

Brown, DA; Ward, RL; Buckhaults, P; Liu, T; Romans, KE; Hawkins, NJ; Bauskin, AR; Kinzler, KW; Vogelstein, B; Breit, SN. MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* / 9 / 2642-50. 2003

Camp, RL; Dolled-Filhart, M; Rimm, DL. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. *Clin Cancer Res* / 10 / 7252-9. 2004

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

20

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

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.

Eling, TE; Baek, SJ; Shim, M; Lee, CH. NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. *J Biochem Mol Biol* / 39 / 649-55. 2006

30

Eton, O; Legha, SS; Moon, TE; Buzaid, AC; Papadopoulos, NE; Plager, C; Burgess, AM; Bedikian, AY; Ring, S; Dong, Q; Glassman, AB; Balch, CM; Benjamin, RS. Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *J Clin Oncol* / 16 / 1103-11. 1998

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

40

Gonçalves et al.: "Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury." *Clinical Biochemistry* 41 (2008) 755-763).

【表 1 9 - 3】

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

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

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

10

Huh, SJ; Chung, CY; Sharma, A; Robertson, GP. Macrophage inhibitory cytokine-1 regulates melanoma vascular development. Am J Pathol / 176 / 2948-57. 2010

Husaini, Y; Qiu, MR; Lockwood, GP; Luo, XW; Shang, P; Kuffner, T; Tsai, VW; Jiang, L; Russell, PJ; Brown, DA; Breit, SN. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) slows cancer development but increases metastases in TRAMP prostate cancer prone mice. PLoS One / 7 / e43833. 2012

Johnen, H; Lin, S; Kuffner, T; Brown, DA; Tsai, VW; Bauskin, AR; Wu, L; Pankhurst, G; Jiang, L; Junankar, S; Hunter, M; Fairlie, WD; Lee, NJ; Enriquez, RF; Baldock, PA; Corey, E; Apple, FS; Murakami, MM; Lin, EJ; Wang, C; During, MJ; Sainsbury, A; Herzog, H; Breit, SN. Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1. Nat Med / 13 / 1333-40. 2007

20

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.

Jones, MF; Ling Li, X; Subramanian, M; Shabalina, SA; Hara, T; Zhu, Y; Huang, J; Yang, Y; Wakefield, LM; Prasanth, KV; Lal, A. Growth differentiation factor-15 encodes a novel microRNA 3189 that functions as a potent regulator of cell death. Cell Death Differ // 2015

30

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.

Kluger, HM; Hoyt, K; Bacchiocchi, A; Mayer, T; Kirsch, J; Kluger, Y; Sznol, M; Ariyan, S; Molinaro, A; Halaban, R. Plasma markers for identifying patients with metastatic melanoma. ClinCancer Res / 17 / 2417-25. 2011

40

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

【表 19 - 4】

Lasithiotakis, KG; Leiter, U; Gorkiewicz, R; Eigentler, T; Breuninger, H; Metzler, G; Strobel, W; Garbe, C. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer* / 107 / 1331-9. 2006.

Liu T et al: "Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells." *Cancer Res.*, vol. 63, no. 16, 1 August 2003, pp.5034-5040.

10

Ma J, Tang X, Sun WW, Liu Y, Tan YR, Ma HL, et al. (2016) Mutant GDF15 presents a poor prognostic outcome for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7:2113-22.

Manola, J; Atkins, M; Ibrahim, J; Kirkwood, J. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol* / 18 / 3782-93. 2000

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.

20

Martinez, JM; Sali, T; Okazaki, R; Anna, C; Hollingshead, M; Hose, C; Monks, A; Walker, NJ; Baek, SJ; Eling, TE. Drug-induced expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene/macrophage inhibitory cytokine-1/prostate-derived factor, a putative tumor suppressor, inhibits tumor growth. *J Pharmacol Exp Ther* / 318 / 899-906. 2006

Mauerer, A; Roesch, A; Hafner, C; Stempf, T; Wild, P; Meyer, S; Landthaler, M; Vogt, T. Identification of new genes associated with melanoma. *Exp Dermatol* / 20 / 502-7. 2011

30

Mimeault, M; Johansson, SL; Batra, SK. Marked improvement of cytotoxic effects induced by docetaxel on highly metastatic and androgen-independent prostate cancer cells by downregulating macrophage inhibitory cytokine-1. *Br J Cancer* / 108 / 1079-91. 2013

Mimeault, M; Batra, SK. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. *J Cell Physiol* / 224 / 626-35. 2010

Min, KW; Liggett, JL; Silva, G; Wu, WW; Wang, R; Shen, RF; Eling, TE; Baek, SJ. NAG-1/GDF15 accumulates in the nucleus and modulates transcriptional regulation of the Smad pathway. *Oncogene* // 2015

40

Mocellin, S; Zavagno, G; Nitti, D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Int J Cancer* / 123 / 2370-6. 2008

【表 19 - 5】

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

Pflugfelder, A; Kochs, C; Blum, A; Capellaro, M; Czeschik, C; Dettenborn, T; Dill, D; Dippel, E; Eigentler, T; Feyer, P; Follmann, M; Frerich, B; Ganten, MK; Gartner, J; Gutzmer, R; Hassel, J; Hauschild, A; Hohenberger, P; Hubner, J; Kaatz, M; Kleeberg, UR; Kolbl, O; Kortmann, RD; Krause-Bergmann, A; Kurschat, P; Leiter, U; Link, H; Loquai, C; Loser, C; Mackensen, A; Meier, F; Mohr, P; Mohrle, M; Nashan, D; Reske, S; Rose, C; Sander, C; Satzger, I; Schiller, M; Schlemmer, HP; Strittmatter, G; Sunderkotter, C; Swoboda, L; Trefzer, U; Voltz, R; Vordermark, D; Weichenthal, M; Werner, A; Wesselmann, S; Weyergraf, AJ; Wick, W; Garbe, C; Schadendorf, D. Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". J Dtsch Dermatol Ges / 11 Suppl 6 / 1-116, 1-26. 2013

10

Pflugfelder, A; Kochs, C; Blum, A; Capellaro, M; Czeschik, C; Dettenborn, T; Dill, D; Dippel, E; Eigentler, T; Feyer, P; Follmann, M; Frerich, B; Ganten, MK; Gartner, J; Gutzmer, R; Hassel, J; Hauschild, A; Hohenberger, P; Hubner, J; Kaatz, M; Kleeberg, UR; Kolbl, O; Kortmann, RD; Krause-Bergmann, A; Kurschat, P; Leiter, U; Link, H; Loquai, C; Loser, C; Mackensen, A; Meier, F; Mohr, P; Mohrle, M; Nashan, D; Reske, S; Rose, C; Sander, C; Satzger, I; Schiller, M; Schlemmer, HP; Strittmatter, G; Sunderkotter, C; Swoboda, L; Trefzer, U; Voltz, R; Vordermark, D; Weichenthal, M; Werner, A; Wesselmann, S; Weyergraf, AJ; Wick, W; Garbe, C; Schadendorf, D. S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma" – short version. J Dtsch Dermatol Ges / 11 / 563-602. 2013

20

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

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

30

Riker, AI; Enkemann, SA; Fodstad, O; Liu, S; Ren, S; Morris, C; Xi, Y; Howell, P; Metge, B; Samant, RS; Shevde, LA; Li, W; Eschrich, S; Daud, A; Ju, J; Matta, J. The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. BMC Med Genomics / 1 / 13. 2008

Roth, P; Junker, M; Tritschler, I; Mittelbronn, M; Dombrowski, Y; Breit, SN; Tabatabai, G; Wick, W; Weller, M; Wischhusen, J. GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. Clin Cancer Res / 16 / 3851-9. 2010

40

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.

【表 1 9 - 6】

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

Selander, KS; Brown, DA; Sequeiros, GB; Hunter, M; Desmond, R; Parpala, T; Risteli, J; Breit, SN; Jukkola-Vuorinen, A. Serum macrophage inhibitory cytokine-1 concentrations correlate with the presence of prostate cancer bone metastases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* / 16 / 532-7. 2007

10

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

Sirott, MN; Bajorin, DF; Wong, GY; Tao, Y; Chapman, PB; Templeton, MA; Houghton, AN. Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. A multivariate analysis. *Cancer* / 72 / 3091-8. 1993

Staff, AC; Bock, AJ; Becker, C; Kempf, T; Wollert, KC; Davidson, B. Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* / 118 / 237-43. 2010

20

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

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

Suesskind, D; Schatz, A; Schnichels, S; Coupland, SE; Lake, SL; Wissinger, B; Bartz-Schmidt, KU; Henke-Fahle, S. GDF-15: a novel serum marker for metastases in uveal melanoma patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* / 250 / 887-95. 2012

30

Talantov, D; Mazumder, A; Yu, JX; Briggs, T; Jiang, Y; Backus, J; Atkins, D; Wang, Y. Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. *Clin Cancer Res* / 11 / 7234-42. 2005

Wallin, U; Glimelius, B; Jirstrom, K; Darmanis, S; Nong, RY; Ponten, F; Johansson, C; Pahlman, L; Birgisson, H. Growth differentiation factor 15: a prognostic marker for recurrence in colorectal cancer. *Br J Cancer* / 104 / 1619-27. 2011

Wang, X; Baek, SJ; Eling, TE. The diverse roles of nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1/GDF15) in cancer. *Biochem Pharmacol* / 85 / 597-606. 2013

40

【表 19-7】

Weide, B; Richter, S; Buttner, P; Leiter, U; Forschner, A; Bauer, J; Held, L; Eigentler, TK; Meier, F; Garbe, C. Serum S100B, lactate dehydrogenase and brain metastasis are prognostic factors in patients with distant melanoma metastasis and systemic therapy. *PLoS One* / 8 / e81624. 2013

Weide, B; Elsasser, M; Buttner, P; Pflugfelder, A; Leiter, U; Eigentler, TK; Bauer, J; Witte, M; Meier, F; Garbe, C. Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis. *Br J Cancer* / 107 / 422-8. 2012

10

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

Wevers, KP; Kruijff, S; Speijers, MJ; Bastiaannet, E; Muller Kobold, AC; Hoekstra, HJ. S-100B: a stronger prognostic biomarker than LDH in stage IIIB-C melanoma. *Ann Surg Oncol* / 20 / 2772-9. 2013

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.

20

Zhang, L; Yang, X; Pan, HY; Zhou, XJ; Li, J; Chen, WT; Zhong, LP; Zhang, ZY. Expression of growth differentiation factor 15 is positively correlated with histopathological malignant grade and in vitro cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* / 45 / 627-32. 2009

Zhou, Z; Li, W; Song, Y; Wang, L; Zhang, K; Yang, J; Zhang, W; Su, H; Zhang, Y. Growth differentiation factor-15 suppresses maturation and function of dendritic cells and inhibits tumor-specific immune response. *PLoS One* / 8 / e78618. 2013

30

Zimmers, TA; Gutierrez, JC; Koniaris, LG. Loss of GDF-15 abolishes sulindac chemoprevention in the *ApcMin/+* mouse model of intestinal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* / 136 / 571-6. 2010

WO 2005/099746

WO 2009/021293

WO 2014/049087

40

PCT/EP2015/056654

【0206】

【表 20】

0-1	Form PCT/RO/134 Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.250e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	192308aa/sis

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	30
1-2	line	11-13
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
1-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Date of deposit	29 September 2011 (29.09.2011)
1-3-4	Accession Number	DSMZ ACC3142
1-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	yes
0-4-1	Authorized officer	Kuiper-Cristina, Nathalie

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

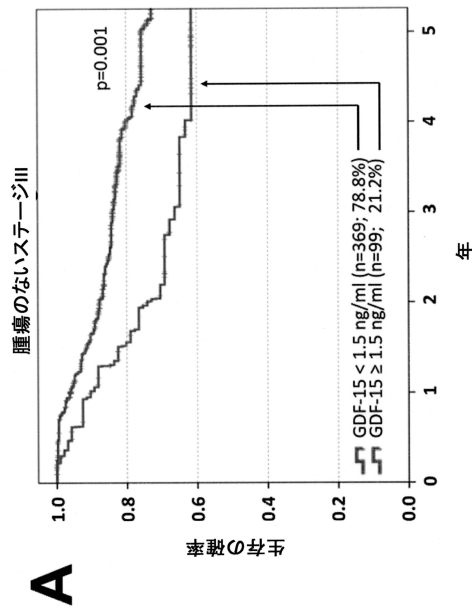
0-5	This form was received by the International Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

10

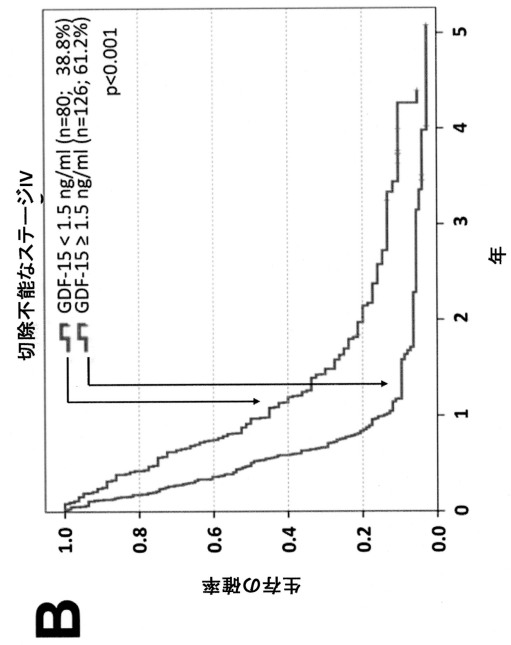
20

30

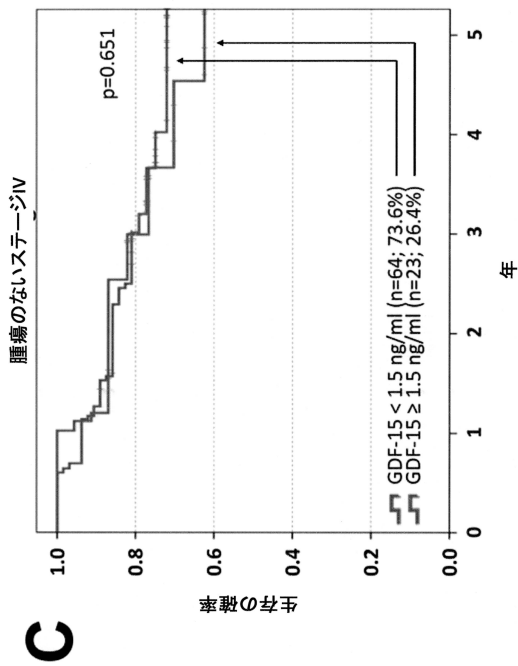
【図 1 A】



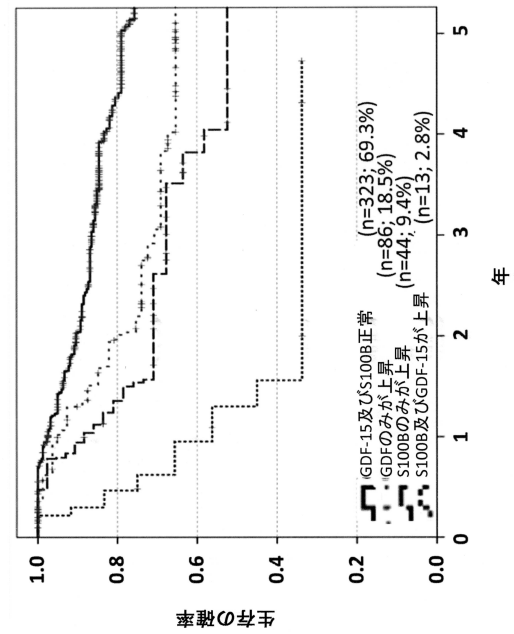
【図 1 B】



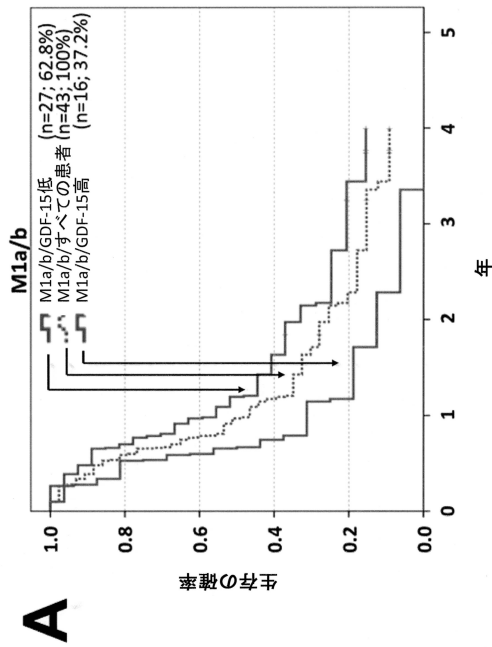
【図 1 C】



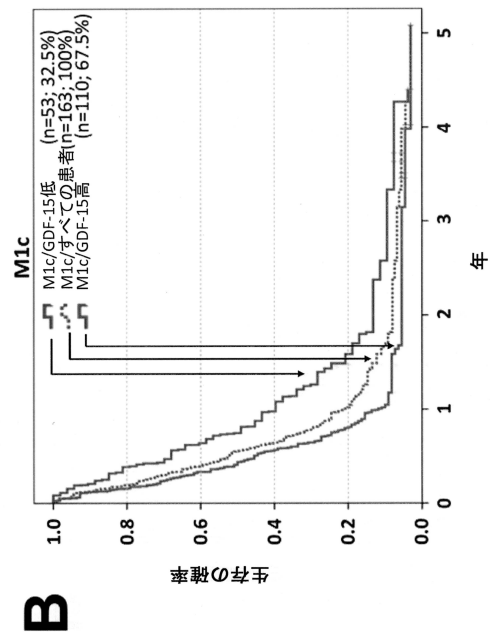
【図 2】



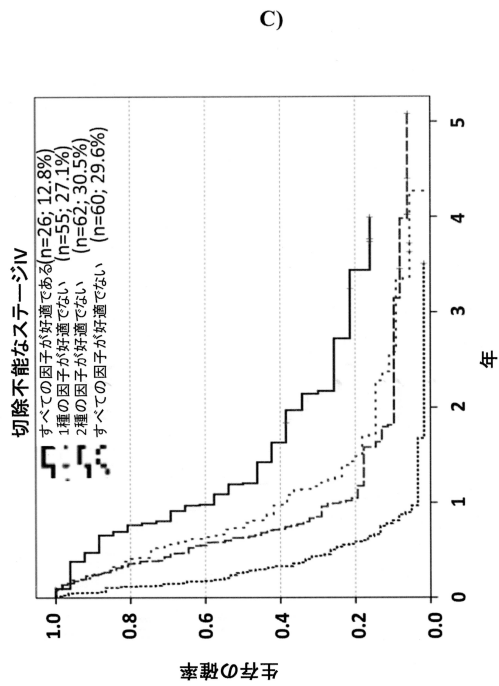
【図 3 A】



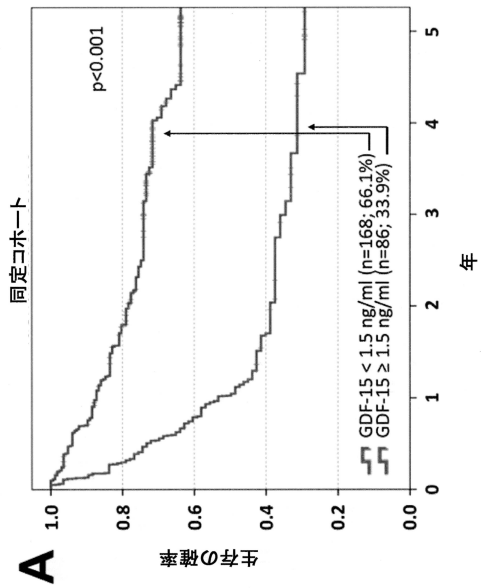
【図 3 B】



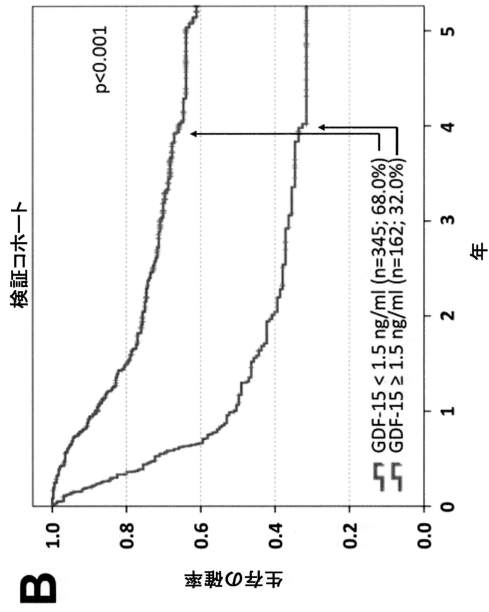
【図 3 C】



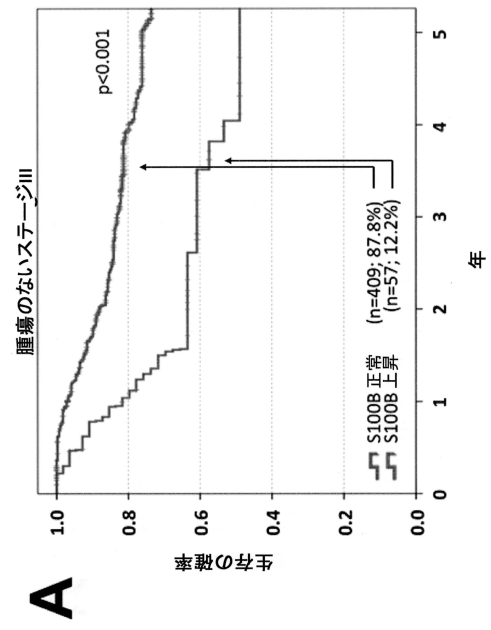
【図 4 A】



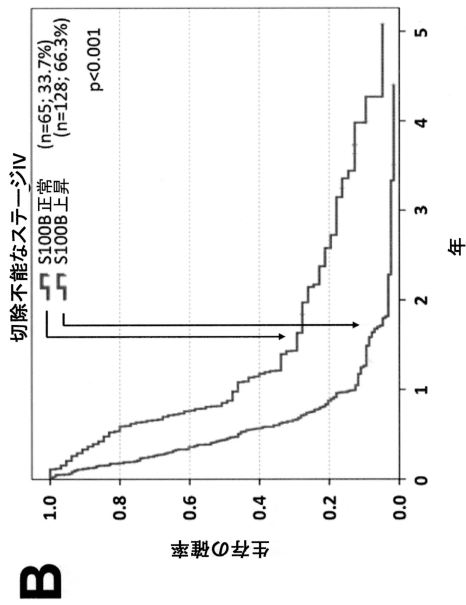
【図 4 B】



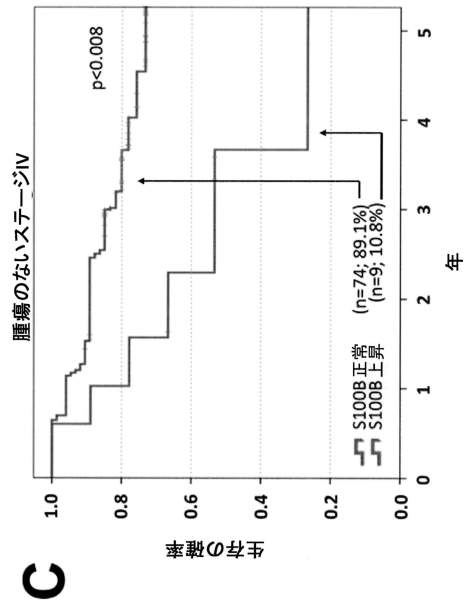
【図 5 A】



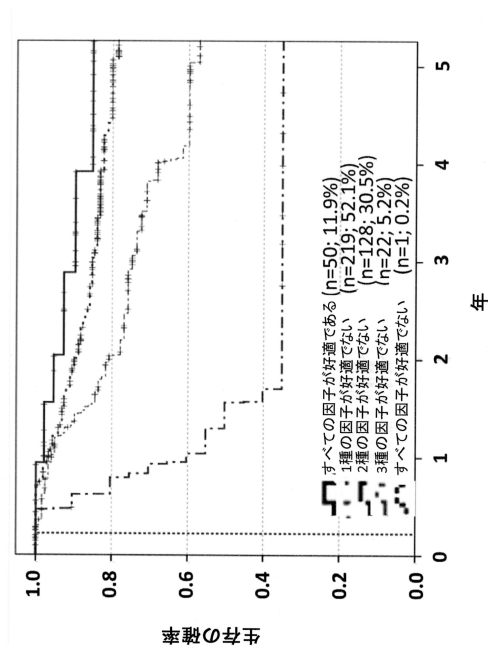
【図 5 B】



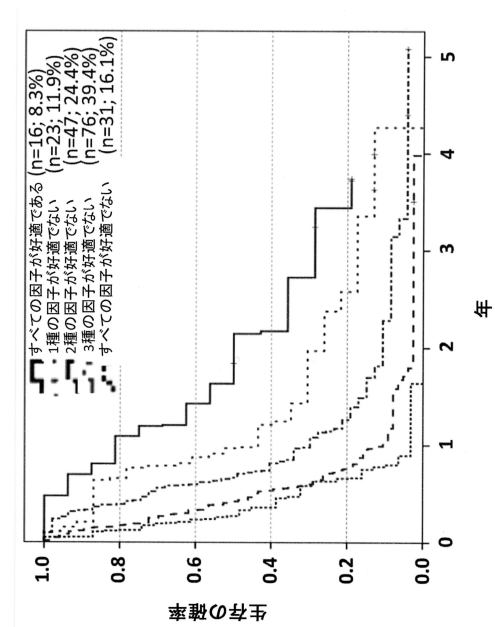
【図 5 C】



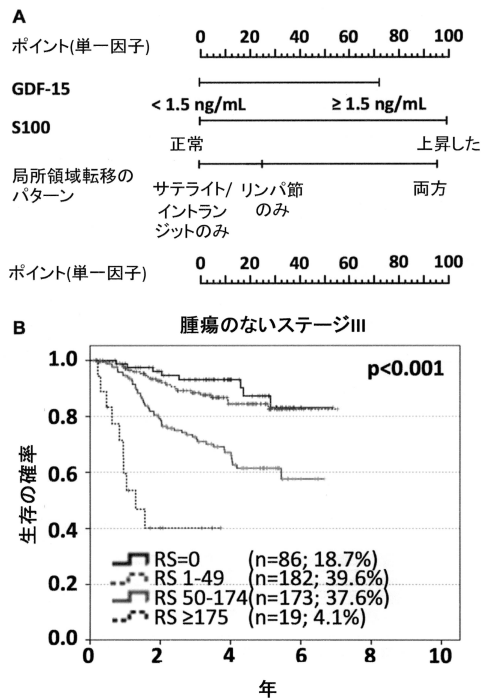
【図 6】



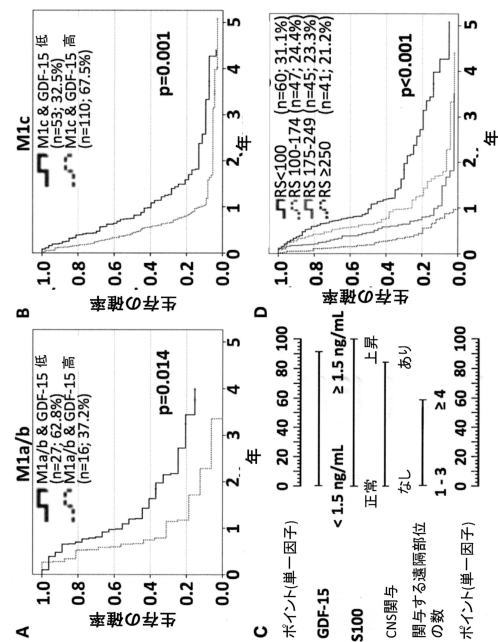
【図 7】



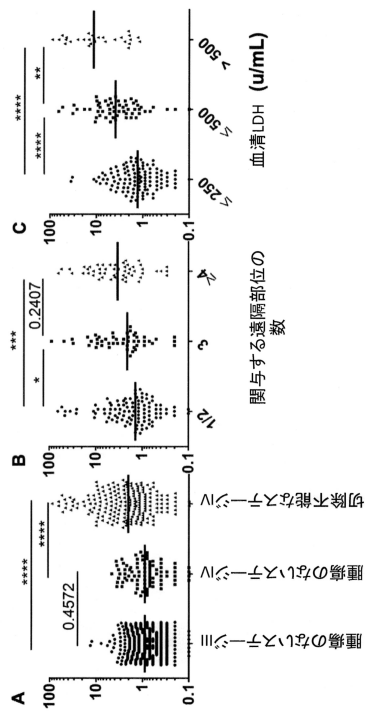
【図 8】



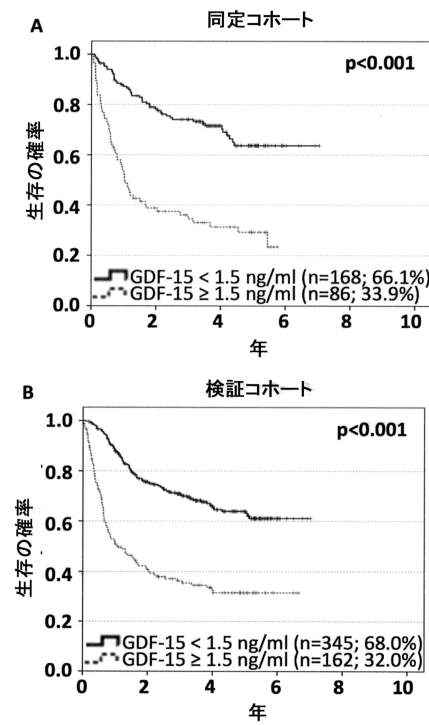
【図 9】



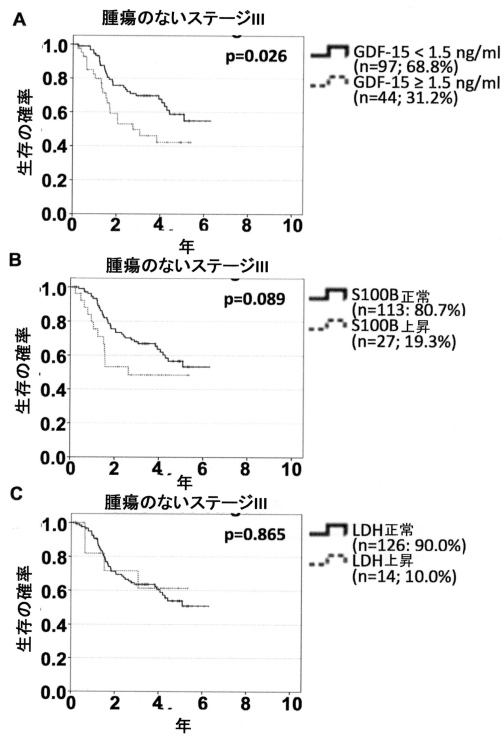
【図 10】



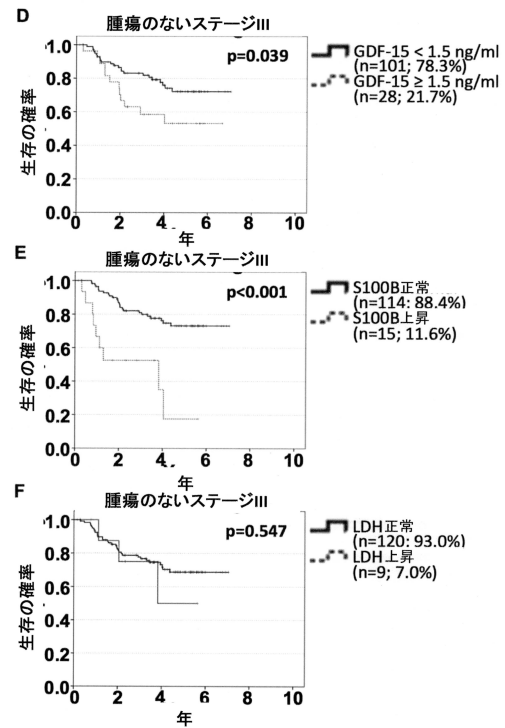
【図 1 1】



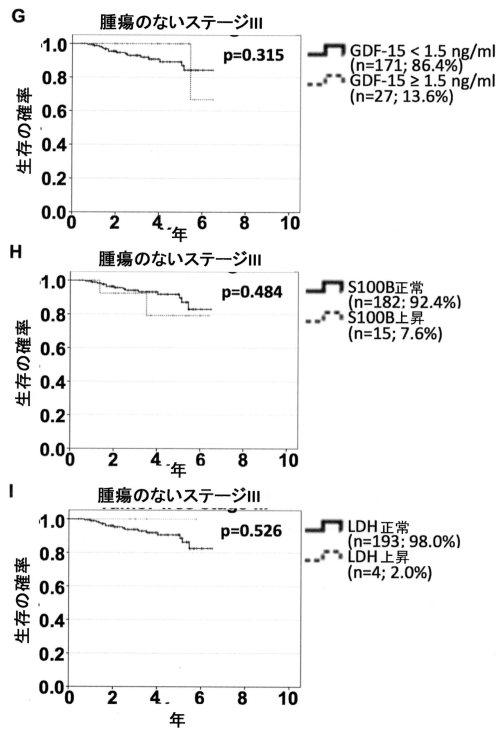
【図 12-1】



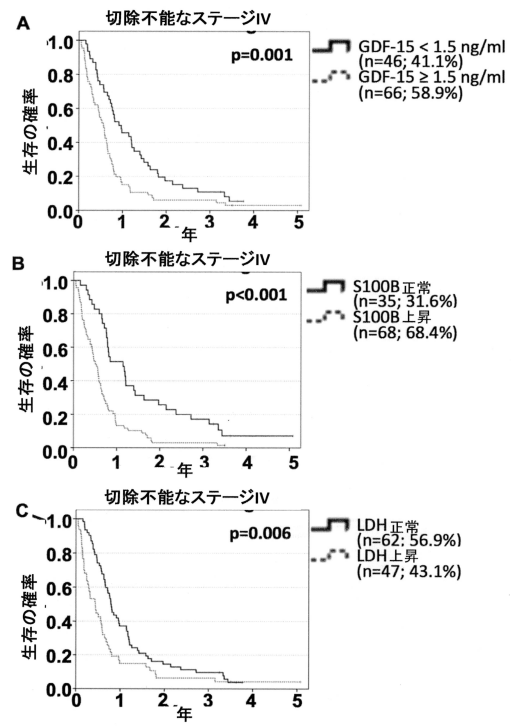
【图 12-2】



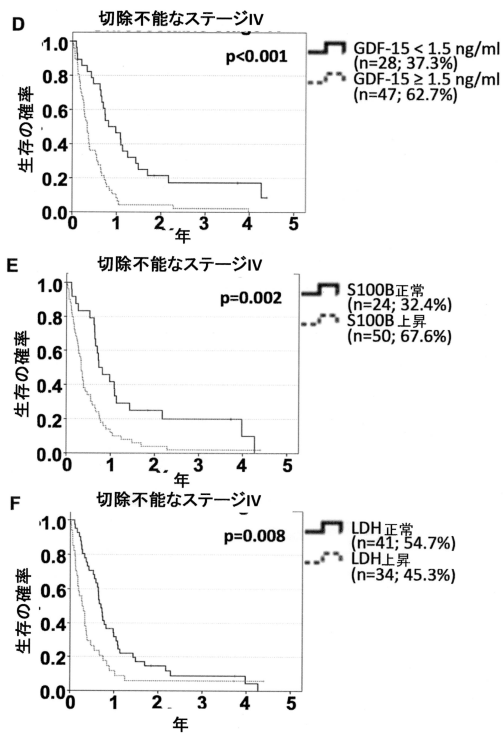
【図 1 2 - 3】



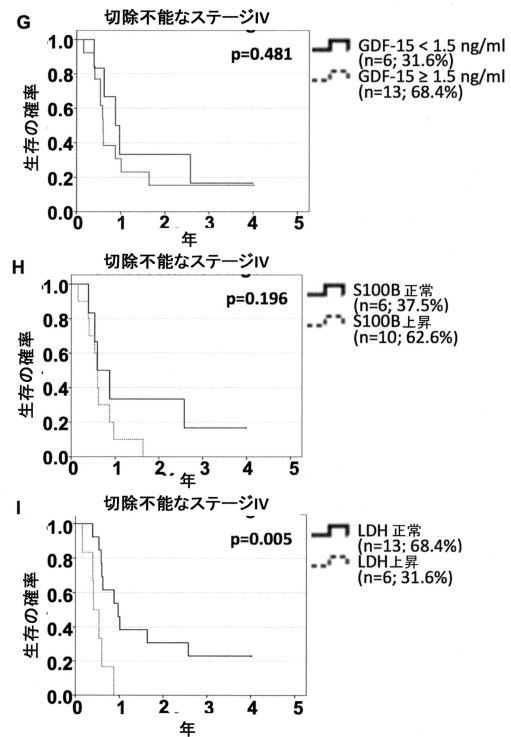
【図 1 3 - 1】



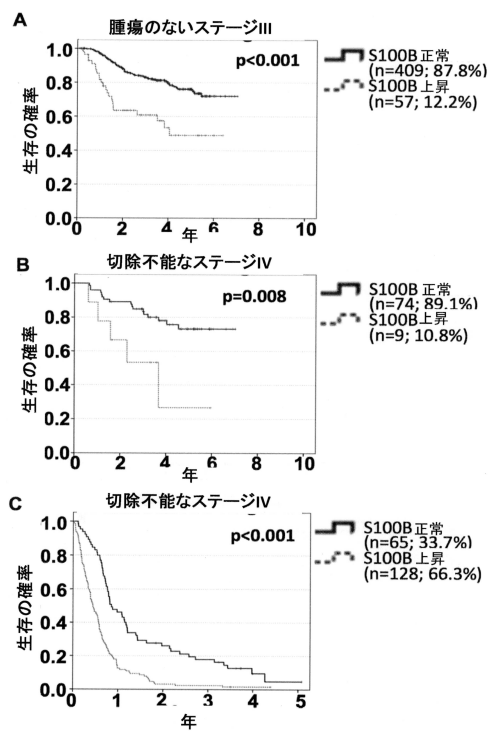
【図 1 3 - 2】



【図 1 3 - 3】



【図 1 4】



【配列表】

[0006840136000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/22

(72)発明者 ティナ・シェーファー
ドイツ・97074・ヴュルツブルク・シュテレンシュトラッセ・10

(72)発明者 ベンジャミン・ヴァイデ
ドイツ・72074・チュービンゲン・モールシュトラッセ・11

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2014/049087 (WO, A1)

特表2012-505659 (JP, A)

H. M. Kluger, et al, Plasma Markers for Identifying Patients with Metastatic Melanoma , Clinical Cancer Research, 2011年, vol. 17, no. 8, pp. 2417-2425

D. Suesskind, et al, GDF-15: a novel Serum marker for metastases in uveal melanoma patients , Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2012年, vol. 250, no. 6, pp. 887-895

K. G. Lasithiotakis, et al, The incidence and mortality of cutaneous melanoma in southern germany , Cancer, 2006年, vol. 107, no. 6, pp. 1331-1339

B. Weide, et al, Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis, British Journal of Cancer , 2012年, vol 107, pp. 422-428

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 33/48-33/98

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)