

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6762363号
(P6762363)

(45) 発行日 令和2年9月30日(2020.9.30)

(24) 登録日 令和2年9月10日(2020.9.10)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z N A Z
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 19 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-529539 (P2018-529539)	(73) 特許権者	516365507
(86) (22) 出願日	平成28年12月16日 (2016.12.16)		アンスティテュ・ギュスターヴ・ルシー
(65) 公表番号	特表2019-500870 (P2019-500870A)		フランス・F-94800・ヴィルジュイ
(43) 公表日	平成31年1月17日 (2019.1.17)		フ・リュ・カミーユ・デスマーラン・39
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/081485	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開番号	W02017/103147		弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開日	平成29年6月22日 (2017.6.22)	(74) 代理人	100110364
審査請求日	令和1年11月6日 (2019.11.6)		弁理士 実広 信哉
(31) 優先権主張番号	15307050.3	(74) 代理人	100133400
(32) 優先日	平成27年12月18日 (2015.12.18)		弁理士 阿部 達彦
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		
早期審査対象出願			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-1/PD-L1を標的とする薬物に対する応答を評価する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するための、又は腫瘍に冒された患者が、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療により恩恵を受けやすいかどうかを決定するための、in vitro又はex vivoによる方法であって、

(a)前記患者からの試料の細胞が、フォン・ヒッペル・リンドウ(VHL)遺伝子の機能の喪失を呈するか否かを見分ける工程であって、VHL遺伝子の機能の喪失が、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に対する前記患者の応答性を予測する、工程、及び

(b)VHL遺伝子の機能が喪失した患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に適するとして選択する工程を含む方法。

【請求項2】

試料が癌の試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

VHL遺伝子の機能の喪失を呈する患者における癌の治療に使用するためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤を含む医薬組成物。

【請求項4】

前記癌が、腎臓癌である、請求項1若しくは2に記載の方法、又は請求項3に記載の使用のための組成物。

【請求項5】

前記癌が、淡明細胞型腎細胞癌腫(ccRCC)である、請求項1若しくは2に記載の方法、又は請求項3に記載の使用のための組成物。

【請求項6】

VHL遺伝子の機能の喪失がVHLタンパク質の活性を測定することにより検出される、請求項1、2、4及び5のいずれか一項に記載の方法、又は請求項3から5のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項7】

VHL遺伝子の機能の喪失がVHLタンパク質の分子量を測定することにより検出される、請求項1、2、4及び5のいずれか一項に記載の方法又は請求項3から5のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

10

【請求項8】

VHL遺伝子の機能の喪失がVHL遺伝子の発現レベルを測定することにより検出される、請求項1、2、4及び5のいずれか一項に記載の方法又は請求項3から5のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項9】

VHL遺伝子の機能の喪失が、VHL遺伝子における変異の有無を検出することにより決定される、請求項1、2、4及び5のいずれか一項に記載の方法又は請求項3から5のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項10】

VHL遺伝子における変異が、生殖細胞系列の変異、体細胞の変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異及び/又はプロモーターの高メチル化から成る群から選択される、請求項1、2、4及び5のいずれか一項に記載の方法、又は、請求項3から5のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

20

【請求項11】

VHL遺伝子の機能の喪失が、請求項6から10のいずれか一項に記載の方法の少なくとも2つの組合せにより検出される、請求項1、2、4及び5のいずれか一項に記載の方法又は請求項3から5のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項12】

PD-1/PD-L1を標的とする薬剤が、PD-L1を標的とする分子、PD-1を標的とする分子又はPD-1/PD-L1複合体を標的とする分子である、請求項1、2、及び4から11のいずれか一項に記載の方法又は請求項3から11のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

30

【請求項13】

PD-1/PD-L1を標的とする薬剤がPD-1又はPD-1/PD-L1のアンタゴニストであり、及び/又は、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤が、PD-1、PD-L1若しくはPD-1/PD-L1複合体を標的とする抗体である、請求項12に記載の方法、又は、請求項12に記載の使用のための組成物。

【請求項14】

PD-1/PD-L1薬剤が、ニボルマブ(Opdivo、Bristol-Myers Squibb社)、ペンブロリズマブ(Keytruda、MK-3475、Merck社)、ピジリズマブ(CT-011、Cure Tech社)、AMP-224 (Amplimmune社/Glaxo SmithKline社)、AMP-514 (Amplimmune社/Glaxo SmithKline社)、BMS 936559 (Bristol-Myers Squibb社)、MPDL3280A (Atezolizumab、Roche社)、デュルバルマブ(MPDLI4736、MedImmune社/AstraZeneca社)、アベルマブ(MSB0010718C、Merck Serono社/Pfizer社)及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項13に記載の方法又は請求項13に記載の使用のための組成物。

40

【請求項15】

患者が哺乳動物である、請求項1、2、及び、4から14のいずれか一項に記載の方法又は請求項3から14のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項16】

患者がヒトである、請求項15に記載の方法、又は、請求項15に記載の使用のための組成物。

【請求項17】

50

患者が少なくとも1つの系列の治療をすでに受けたことがあり、並びに/又は、患者が転移癌及び/若しくは進行したステージにある癌に罹患している、請求項1、2、及び、4から16のいずれか一項に記載の方法、又は請求項3から16のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項18】

腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するためのバイオマーカーとしてのVHL遺伝子の機能の喪失の使用。

【請求項19】

腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するためのキットの使用であって、キットが、VHL遺伝子を標的とする1対のプライマー、VHL mRNAを標的とするプライマー、VHL cDNAを標的とする1対のプライマー、VHL cDNAを標的とするプローブ、VHL mRNAを標的とするプローブ、VHL DNAを標的とするプローブ、VHL基質、VHLタンパク質の特異的抗体、及びそれらの組合せからなる群から選択される、VHL遺伝子の機能の喪失を検出するための手段を含む、使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝学、免疫学及び医学の分野に関する。本発明は、より具体的には、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤により治療する癌を有する対象の感度を評価するin vitro又はex vivoによる方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

腫瘍細胞は、腫瘍の微小環境において免疫防御を逃れる数通りの方法で宿主免疫に作用する。この現象は、「癌免疫回避」と一般的に呼ばれている。このシステムにおける最も重要な成分の1つは、PD-1受容体及びそのリガンドPD-L1により媒介される免疫抑制共シグナル(免疫チェックポイント)である。PD-1は、活性化されたT細胞に主として発現し、それに対してPD-L1は、数種類の腫瘍細胞に発現する。前臨床試験は、PD-1とPD-L1との間の相互作用の障害が、T細胞応答を強化して抗腫瘍活性を媒介することを示した。PD-1/PD-L1シグナル遮断剤の数通りの臨床試験が、あるタイプの固体の又は血液の悪性腫瘍を有する患者で劇的な抗腫瘍効力を示した。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】US7521051

【特許文献2】US8008449

【特許文献3】US8354509

【特許文献4】W02008/156712

【特許文献5】W02013/019906

【特許文献6】W02010/077634A1

【特許文献7】US8383796

【特許文献8】W02010/027827

【特許文献9】W02011/066342

40

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】WHO Drug Information、27巻、2号、161～162頁(2013)

【非特許文献2】WHO Drug Information、27巻、1号、68～69頁(2013)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、固体腫瘍について臨床試験から蓄積されたデータにより、PD-1阻害剤の

50

抗腫瘍応答速度はそれほど高くないと思われることが明らかになった。それに加えて、PD-1阻害剤は非常に高価であり、しかも有害な反応が全くないわけではない。それ故、治療の効力を改善するために、適当な患者の選択を可能にすることを予測するバイオマーカーを同定することが必要である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、第1の態様において、腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するための、又は腫瘍に冒された患者が、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療から恩恵を受けやすいかどうかを決定するための、*in vitro*又は*ex vivo*による方法であって、

10

(a)前記患者からの試料の細胞が、フォン・ヒッペル・リンドウ(VHL)遺伝子の機能の喪失を呈するか否かを検出する工程であって、VHL遺伝子の機能の喪失が、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に対する前記患者の応答性を予測する、工程、及び

(b)VHL遺伝子の機能が喪失した患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に適するとして選択する工程を含む方法を提供する。

【0007】

好ましくは、方法は、前記患者からの試料を用意する工程を更に含む。

【0008】

好ましくは、試料は癌の試料である。

20

【0009】

好ましくは、方法は、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を、VHL遺伝子の機能が喪失した前記患者に投与する工程を更に含む。

【0010】

第2の態様において、本発明は、VHL遺伝子の機能の喪失を呈する患者における癌の治療に使用するためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤も提供する。

【0011】

好ましくは、癌は、腎臓癌、より好ましくは淡明細胞型腎細胞癌腫(ccRCC)である。

【0012】

VHL遺伝子の機能の喪失は、VHLタンパク質の活性を測定することにより検出することができる。

30

【0013】

VHL遺伝子の機能の喪失は、VHLタンパク質の分子量を測定することによっても検出することができる。

【0014】

VHL遺伝子の機能の喪失は、VHL遺伝子の発現レベルを測定することによっても検出することができる。

【0015】

VHL遺伝子の機能の喪失は、VHL遺伝子における変異、好ましくは生殖細胞系列の変異、体細胞の変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、プロモーターの高メチル化等のプロモーター抑制、及び任意のそれらの組合せの有無を検出することによっても決定することができる。

40

【0016】

VHL遺伝子の機能の喪失は、上に記載した1つの方法又は上に記載した方法の少なくとも2つの任意の組合せによっても検出することができる。

【0017】

好ましくは、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤は、PD-L1を標的とする分子、PD-1を標的とする分子又はPD-1/PD-L1複合体を標的とする分子であり、より好ましくは、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤は、PD-1又はPD-1/PD-L1アンタゴニストである。

【0018】

50

或いは、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤は、PD-1、PD-L1又はPD-1/PD-L1複合体を標的とする抗体である。

【0019】

PD-1/PD-L1薬剤は、好ましくは、ニボルマブ(Opdivo、Bristol-Myers Squibb社)、ペンブロリズマブ(Keytruda、MK-3475、Merck社)、ピジリズマブ(CT-011、Cure Tech社)、AMP-224 (Amplimmune社/Glaxo SmithKline社)、AMP-514 (Amplimmune社/Glaxo SmithKline社)、BMS 936559 (Bristol-Myers Squibb社)、MPDL3280A (Atezolizumab、Roche社)、デュルバルマブ(MPDLI4736、MedImmune社/AstraZeneca社)、アベルマブ(MSB0010718C、Merck Serono社/Pfizer社)及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【0020】

患者は、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト、及び更により好ましくは成人ヒトである。

【0021】

好ましくは、患者は、少なくとも1つの系列の治療をすでに受けたことがある。

【0022】

好ましくは、患者は、転移癌及び/又は進行したステージにある癌に罹患している。

【0023】

第3の態様において、本発明は、腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するためのキットも提供し、該キットは、好ましくは、VHL遺伝子を標的とする1対のプライマー、VHL mRNAを標的とするプライマー、VHL cDNAを標的とする1対のプライマー、VHL cDNAを標的とするプローブ、VHL mRNAを標的とするプローブ、VHL DNAを標的とするプローブ、VHL基質、VHLタンパク質の特異的抗体、及びそれらの組合せからなる群から選択される、VHL遺伝子の機能の喪失を検出するための手段を含む。VHL遺伝子により、野性型遺伝子又は変異遺伝子が意図される。プローブ、プライマー、基質又は抗体は、野性型VHL又は変異VHLに特異的であり得る。キットは、野性型及び変異VHLに対して特異的な検出手段の組合せを含むことができる。

【0024】

第4の態様において、本発明は、腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するためのバイオマーカーとしてのVHL遺伝子の機能の喪失の使用も提供する。

【0025】

第5の態様において、本発明は、腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するためのキットの使用も提供し、該キットは、好ましくは、VHL遺伝子を標的とする1対のプライマー、VHL mRNAを標的とするプライマー、VHL cDNAを標的とする1対のプライマー、VHL cDNAを標的とするプローブ、VHL mRNAを標的とするプローブ、VHL DNAを標的とするプローブ、VHL基質、VHLタンパク質の特異的抗体、及びそれらの組合せからなる群から選択される、VHL遺伝子の機能の喪失を検出するための手段を含む。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明者らは、VHLの2対立遺伝子の不活性化(即ち機能の喪失)を有するccRCC患者からの腫瘍が、PD-L1発現において、1つのVHL野生型対立遺伝子を担持するccRCC腫瘍と比較して、有意の増大を示すことを発見して、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療から恩恵を受けやすい患者の選択のための新しい道を開いた。

【0027】

定義

本明細書において使用される用語「癌」又は「腫瘍」は、癌を引き起こす細胞に典型的な特性、例えば、制御されない増殖、及び/又は致死性、及び/又は転移の可能性、及び/又は急速な成長及び/又は増殖速度、及び/又はある特徴的な形態学的特徴等を有する細胞の存在を指す。この用語は、任意のタイプの対象における悪性(原発性又は転移性)の任意

10

20

30

40

50

の型を指す。特に、該用語は、進行の任意のステージにおける腎臓癌を包含する。

【0028】

本明細書において使用される用語「マーカー」及び「バイオマーカー」は互換的であり、特定の治療から恩恵を受けるとされる患者の選択に役立つ生物学的パラメータを指す。この用語は、特に「腫瘍のバイオマーカー」を指す。それは、特定の治療、特にPD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に対する患者の応答性を予測するために測定可能なインジケータである。バイオマーカーは、癌を有する一部の患者の血液、尿、糞便、腫瘍組織、又は他の組織若しくは体液に、特に腫瘍組織に見出すことができる。

【0029】

本明細書において使用される用語「癌の試料」は、患者に由来する腫瘍細胞を含有する任意の試料を指す。特に、腫瘍細胞は、体液試料、例えば、血液、プラズマ、尿及び精液の試料等、並びに生検、器官、組織又は細胞試料から得ることができる。好ましい実施形態では、腫瘍細胞は、患者からの腫瘍生検又は切除試料から得られる。好ましくは、試料は、腫瘍細胞のみを含有する。任意選択で、腫瘍細胞を含有する試料は、それらの使用に先立って処理されてもよい。例として、腫瘍細胞富化選別が実施されることもある。

10

【0030】

本明細書において使用される用語「治療(treatment)」、「治療する(treat)」又は「治療すること(treating)」は、患者の健康状態を緩和することが意図される任意の行為、例えば、疾患の療法、防止、予防及び遅延を指す。

【0031】

本明細書において使用される用語「有効量」とは、腎臓癌の有害な効果を防止、除去又は低下させる医薬組成物の量を指す。

20

【0032】

本明細書で使用される用語「機能の喪失」又は「遺伝子の機能の喪失」は互換的であり、細胞が、前記遺伝子によりコードされるタンパク質の低下した又は無効化した機能を呈する状況を指す。特に、機能の喪失は、遺伝子の発現の低下に至る遺伝子の変異又は他の機構に基づき得る。

【0033】

本明細書において使用される用語「対立遺伝子」は、同じ遺伝子又は同じ遺伝子の遺伝子座位の代替的表現形式の1つを指す。異なる対立遺伝子は、異なる機能を有するタンパク質を生じ得る。ヒト等の二倍体生物体は、相同性染色体と称される2組の染色体を有する。各染色体では、それらが各遺伝子の1つのコピー、それ故、1つの対立遺伝子を有する。両方の対立遺伝子が同じであれば、それらは、その遺伝子に関してホモ接合性である。対立遺伝子が異なれば、その遺伝子に関してヘテロ接合性である。

30

【0034】

本明細書において使用される用語「プローブ」は、標識され得る可変長さ(約20~1000塩基の長さ)のDNA又はRNAのストランドを意味する。プローブは、プローブの配列と相補性のヌクレオチド配列(DNA又はRNAの標的)の存在を検出するために、DNA又はRNA試料で使用される。

【0035】

本明細書において使用される用語「プライマー」は、DNA合成のための開始点としての役目を果たす短いDNA配列のストランドを意味する。ポリメラーゼが、プライマーの3'末端で重合を開始して、向かい合うストランドに相補性の配列を創る。「PCRプライマー」は、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドであり、長さは10~30塩基の間、好ましくは約20塩基の長さである。

40

【0036】

用語「量(quantity)」、「量(amount)」、及び「レベル」は、本明細書で互換的に使用され、試料中における分子の絶対定量、又は試料中における分子の相対定量、即ち、別の値と比較した、例えば、本明細書で教示された参照値と比較した、若しくはバイオマーカーについての値の範囲と比較した定量を指すことができる。これらの値又は範囲は、唯1

50

名の患者から又は患者の群から得ることができる。

【0037】

第1の態様において、本発明は、腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するための、又は腫瘍に冒された患者が、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療から恩恵を受けやすいかどうかを決定するための、*in vitro*又は*ex vivo*による方法に関し、該方法は：

(a)前記患者からの試料の細胞が、フォン・ヒッペル・リンドウ(VHL)遺伝子の機能の喪失を呈するか否かを見分ける工程であって、VHL遺伝子の機能の喪失が、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に対する前記患者の応答性を予測する、工程、及び

(b)VHL遺伝子の機能が喪失した患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に適するとして選択する工程を含む。

10

【0038】

第2の態様において、本発明は、VHL遺伝子の機能の喪失を呈する患者における癌の治療に使用するためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤にも関する。

【0039】

患者

本明細書において使用される用語「対象」、「個体」又は「患者」は互換的であり、動物、好ましくは哺乳動物、更により好ましくはヒトを指す。しかしながら、用語「患者」は、治療の必要がある非ヒト動物、特に哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ及びとりわけ非ヒト霊長類等を指すこともできる。

20

【0040】

上で述べた方法及び使用のためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤の好ましい実施形態では、対象はヒトであり、好ましくは成人ヒトである。特に、ヒトは、少なくとも50歳のヒト、好ましくは少なくとも60歳のヒトである。

【0041】

上で述べた方法及び使用のためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤の特定の実施形態では、対象は、癌、好ましくは淡明細胞型腎細胞癌腫(ccRCC)又は他のリスク因子の家族歴を有する。この場合には、対象は、少なくとも40歳のヒトであり得る。

【0042】

上で述べた方法及び使用のためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤の別の特定の実施形態では、対象は、以前の癌、好ましくは腎臓癌、より好ましくはccRCC癌の再発を有する。

30

【0043】

上で述べた方法及び使用のためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤の別の特定の実施形態では、患者は、少なくとも1つ系列の癌治療、好ましくは腎臓癌の治療、より好ましくはccRCC癌の治療をすでに受けたことがある。

【0044】

上で述べた方法及び使用のためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤の別の特定の実施形態では、患者は、転移癌及び/又は進行したステージにある癌、好ましくは腎臓癌、より好ましくはccRCC癌に罹患している。

40

【0045】

癌

上で述べた方法及び使用のためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤は、任意の適当な癌に対する治療を導くために使用することができる。種々の実施形態では、癌は、急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄腫白血病；副腎皮質癌腫；AIDS関連癌；AIDS関連リンパ腫；肛門癌；虫垂癌；星細胞腫；非定型奇形腫様/桿状腫瘍；基底細胞癌腫；膀胱癌；脳幹神経膠腫；脳腫瘍、脳幹神経膠腫、中枢神経系非定型性奇形腫様/桿状腫瘍、中枢神経系胚の腫瘍、星細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣芽細胞腫、上衣腫、髓芽腫、髓上皮腫、中間分化松果腺実質性腫瘍、小脳テント上初生神経外胚葉性腫瘍及び松果体芽細胞腫；乳癌；気管腫瘍；パーキットリンパ腫；未知の原発性部位の癌(CUP)；カルチノイド腫瘍；未知の原発性部位の癌腫；中枢神経系

50

非定型性の奇形腫様/桿状の腫瘍;中枢神経系胚の腫瘍;子宮頸癌;小児癌;脊索腫;慢性リンパ球性白血病;慢性骨髄性白血病;慢性骨髄増殖性障害;大腸癌;結直腸癌;頭蓋咽頭腫;皮膚のT細胞リンパ腫;内分泌膵島細胞腫瘍;子宮内膜癌;上皮芽細胞腫;上皮腫;食道癌;嗅神経芽腫;ユーイング肉腫;頭蓋外胚芽細胞腫瘍;外生殖巣の胚芽細胞腫瘍;肝外の胆管癌;膀胱癌;胃(stomach)癌;胃腸カルチノイド腫瘍;胃腸間質細胞腫瘍;胃腸間質腫瘍(GIST);妊娠栄養膜腫瘍;神経膠腫;毛様細胞白血病;頭頸部癌;心臓癌;ホジキンリンパ腫;下咽頭癌;眼内メラノーマ;島細胞腫瘍;カボジ肉腫;腎臓癌;ランゲルハンス細胞組織球症;喉頭癌;口唇癌;肝癌;悪性の線維性組織球腫骨癌;髄芽腫;髄上皮腫;メラノーマ;メルケル細胞癌腫;メルケル細胞皮膚癌腫;中皮腫;潜在原発性混在転移扁平上皮頸癌;口腔癌;多発性内分泌腺新生物症候群;多発性骨髄腫;多発性骨髄腫/プラズマ細胞新生物;菌状息肉症;骨髄異形成症候群;骨髄増殖性新生物;鼻腔癌;鼻咽頭癌;神経芽細胞腫;非ホジキンリンパ腫;非メラノーマ皮膚癌;非小細胞肺癌;口内癌;口腔癌;口咽頭癌;骨肉腫;他の脳及び脊髄腫瘍;卵巣癌;卵巣上皮癌;卵巣胚芽細胞腫瘍;卵巣の低悪性の潜在性腫瘍;膵癌;乳頭腫;副鼻腔癌;副甲状腺癌;骨盤癌;陰茎癌;咽頭癌;中分化の松果腺の実質性腫瘍;松果体芽細胞腫;下垂体腫瘍;プラズマ細胞新生物/多発性骨髄腫;胸膜肺芽細胞腫;原発性中枢神経系(CNS)リンパ腫;原発性肝細胞肝癌;前立腺癌;直腸癌;腎臓癌;腎細胞(腎臓)癌;腎細胞癌;気道癌;網膜芽細胞腫;横紋筋肉腫;唾液腺癌;セザリー症候群;小細胞肺癌;小腸癌;軟組織肉腫;扁平上皮細胞癌腫;扁平上皮頸癌;胃(gastric)癌;小脳テント上初生神経外胚葉性腫瘍;T細胞リンパ腫;精巣癌;咽頭癌;胸腺癌腫;胸腺腫;甲状腺癌;移行上皮細胞癌;腎臓骨盤及び尿管の移行上皮細胞癌;栄養膜腫瘍;尿管癌;尿道癌;子宮癌;子宮肉腫;腔内癌;外陰部癌;ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症;又はウィルムス腫瘍を含む。癌は、急性骨髄腫白血病(AML)、乳癌腫、胆管癌腫、結直腸の腺癌腫、肝外の胆管腺癌腫、女性の生殖管悪性腫瘍、胃腺癌腫、胃食道腺癌腫、胃腸間質腫瘍(GIST)、膠芽細胞腫、頭頸部扁平上皮癌腫、白血病、肝細胞癌腫、低悪性度神経膠腫、肺細気管支肺胞上皮癌腫(BAC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺小細胞癌(SCLC)、リンパ腫、男性の生殖管悪性腫瘍、胸膜の悪性孤立性線維状腫瘍(MSFT)、メラノーマ、多発性骨髄腫、神経内分泌腫瘍、結節性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、非上皮卵巣癌(非EOC)、卵巣表面上皮癌腫、膵腺癌腫、下垂体癌腫、乏突起膠腫、前立腺癌腫、後腹膜若しくは腹腔内癌腫、後腹膜若しくは腹腔内肉腫、小腸の悪性腫瘍、軟組織腫瘍、胸腺癌腫、甲状腺癌腫、又はブドウ膜メラノーマを含むことができるが、これらに限定されない。

10

20

30

【0046】

幾つかの実施形態において、癌は、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、異形成乳癌(MpBC)、頭頸部扁平上皮細胞癌腫(HNSCC)、ヒトパピローマウイルス(HPV)-陽性HNSCC、HPV陰性/TP53変位HNSCC、転移HNSCC、口腔咽頭のHNSCC、非口腔咽頭のHNSCC、癌腫、肉腫、メラノーマ、管腔A乳癌、管腔B乳癌、HER2+乳癌、高マイクロサテライト不安定性(MSI-H)結直腸癌、マイクロサテライト安定な結直腸癌(MSS)、非小細胞肺癌(NSCLC)、脊索腫、又は副腎皮質癌腫を含む。癌腫は、乳房の癌腫、大腸、肺、膵、前立腺、メルケル細胞、卵巣、肝、子宮内膜、膀胱、腎臓又は未知の原発性(CUP)の癌であり得る。肉腫は、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨外性粘液様軟骨肉腫又は子宮肉腫であり得る。幾つかの実施形態において、肉腫は、胞巣状軟部肉腫肉腫(ASPS)、血管肉腫、乳房血管肉腫、軟骨肉腫、脊索腫、淡明細胞型肉腫、線維形成性小円形細胞腫瘍(DSRCT)、類上皮血管内皮腫(EHE)、上皮様肉腫、子宮内膜の間質肉腫(ESS)、ユーイング肉腫、線維腫症、線維肉腫、巨細胞腫瘍、平滑筋肉腫(LMS)、子宮LMS、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫(MFH/UPS)、悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)、骨肉腫、血管周囲上皮様細胞腫瘍(PEComa)、横紋筋肉腫、孤立性線維状腫瘍(SFT)、滑液肉腫、線維粘液様肉腫、幼児期の線維状過誤腫、遺伝性平滑筋腫、血管筋脂肪腫、血管粘液腫、非定型スピンドル細胞病変(線維組織球分化を伴う)、軟骨芽細胞腫、樹状細胞肉腫、粒状細胞腫瘍、高悪性粘液様肉腫、高悪性筋上皮癌腫、ヒアリン化線維芽細胞肉腫(hyalinizing fibroblastic sarcoma)、炎症性筋線維芽細胞肉腫、指状嵌入樹状細胞腫瘍、内膜肉腫、平滑筋腫、リンパ管炎肉腫症、悪性系球腫瘍、悪性の筋上皮腫、メラニン細胞性新生物、間葉系新生物、腸間膜血管球腫、転移組織球様新生物、筋上皮腫、粘液様肉

40

50

腫、粘液様間質、神経鞘腫、葉状、桿状、円形細胞、他の特定されない肉腫(not otherwise specified) (NOS)、肉腫性中皮腫、神経鞘腫、スピンドル及び円形細胞肉腫、スピンドル細胞又は有棘細胞間葉系腫瘍を含む。

【0047】

一実施形態において、癌は、メラノーマ、肺癌、卵巣癌、頭頸部癌、膀胱癌、胃癌、腎臓癌、大腸癌;食道癌、肝細胞癌、乳癌、造血性癌、例えば、リンパ腫又は白血病等からなる群から選択され得る。

【0048】

好ましい実施形態では、癌は、腎臓癌、肺癌、特に非小細胞肺癌、メラノーマ、リンパ腫、中皮腫、大腸癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、及び膠芽細胞腫からなる群から選択される。

10

【0049】

任意選択で、癌は、非小細胞肺癌、メラノーマ、及び腎細胞癌からなる群から選択され得る。

【0050】

好ましい実施形態では、癌は、腎細胞癌、及びより具体的には淡明細胞型腎細胞癌腫(ccRCC)、特にびまん性ccRCCである。

【0051】

試料

上で述べた方法は、前記患者からの試料におけるVHL遺伝子の機能の喪失の検出に関する。試料は、非癌性の試料又は癌の試料であり得る。

20

【0052】

非癌性試料は、VHL遺伝子の機能の喪失を検出して、特に癌、好ましくはccRCC癌の家族歴がある場合、それにより遺伝性の変異の仮説を支持するために使用することができる。遺伝性の変異は、患者の任意の細胞で検出することができる。

【0053】

好ましくは、VHL遺伝子の機能の喪失を検出するために使用される試料は、癌の試料、更により好ましくはccRCC癌の試料である。

【0054】

癌の試料は、癌細胞と正常細胞の混合物を含有していてもよい。そうである場合には、腫瘍細胞の富化選別を実施することができる。好ましくは、癌の試料は、癌細胞のみか又は少なくとも70%、好ましくは80%、90%、95%の癌細胞を含有する試料である。

30

【0055】

好ましい実施形態では、上で述べた方法を、前記患者からの癌の試料の癌細胞に対して実施する。

【0056】

上で述べた方法は、試料、好ましくは癌の試料との比較として、正常試料の使用も必要とし得る。好ましくは、正常試料は、腎細胞の正常試料である。正常試料は、同じ患者から又は別の患者からの試料であり得る。正常試料は、患者の癌が遺伝性の変異の結果生じたと推測する理由がない場合には、同じ患者からの試料であり得る。正常試料は、別の患者、好ましくは正常又は健常な患者、即ち癌、特にccRCC癌に罹患していない患者からであることもできる。

40

【0057】

上で述べた方法は、前記患者からの試料を得るか又は提供する工程を含むこともできる。

【0058】

VHL遺伝子

pVHL (HRCA1; RCA1; VHL1又はVHLとも称される)としても知られるフォン・ヒッペル・リンドウ腫瘍抑制遺伝子は、VHL遺伝子によりコードされている。それは、データベースでUniprot P40337; OMIM 608537として定義されている。参照配列は、mRNAについてNM_00

50

0551により、及びタンパク質についてNP_000542により提供される。

【 0 0 5 9 】

上で述べた方法及び使用のためのPD-1/PD-L1を標的とする薬剤は、VHL遺伝子の機能の喪失の検出に関係する。

【 0 0 6 0 】

VHL遺伝子の機能の喪失は、特に両方の対立遺伝子の変異によるか、一方の対立遺伝子の変異及びヘテロ接合性の喪失によるか、一方の対立遺伝子の変異及び、例えばプロモーターのサイレンシング、例えばプロモーターの高メチル化に基づく他方の抑制された発現によるか、又は2つの対立遺伝子の発現の抑制による2種の非機能性のVHL対立遺伝子の存在に基づき得る。

10

【 0 0 6 1 】

VHL遺伝子における変異は、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤による療法に対する患者の応答性の予測となる。そのような変異の例を下に列挙するが、これらに限定されない：

M1fs*20 M1I E10G E12K P25L S38F S38P G39S P40S E41V E51Q E52K M54fs A56fs*11 R58fs*9 P59fs*8 V62fs*5 V62fs*68 L63P R64P S65L S65A S65* S65W S65fs*2 V66_Q73del S68* S68P S68W E70* E70K S72P S72fs*87 Q73* V74D V74G I75del I75fs F76del F76I F76L F76S C77* C77fs N78S N78H N78fs N78I N78K N78T R79P S80N S80R S80I P81S P81fs*78 R82P R82_V84del V84L L85P P86H P86L P86S P86A P86R P86fs V87_W88del W88R W88C W88* W88S L89R L89H L89P N90I N90fs*69 N90fs D92-P97del G93C G93D G93S P95R Q96* Q96P Y98fs*61 Y98F Y98H Y98N Y98* P99fs*60 L101P L101G L101R G104fs*23 G104fs*55 T105P R107fs*52 R107P R108fs*51 R108fs I109N S111N S111G S111C S111R Y112H Y112N R113* G114R G114C G114S H115N H115Y H115Q H115R H115fs*44 L116V W117* W177R W117C L118P L118R F119L F119S L188-F119del D121G D121Y D121E A122E T124fs*35 D126G D126Y L128P L128R L128F L128fs*31 L129LE V130L N131fs*2 N131fs*28 N131fs*27 N131K N131T Q132* T133fs*26 E134* L135fs*24 F136V F136C F136S F136Y F136fs*23 V137fs*7 V137fs*22 P138R S139fs*20 N141fs*3 N141fs*18 V142fs*17 D143E G144* G144fs*14 G144fs*15 Q145H P146fs*13 F148fs*11 F148del A149fs*26 A149fs*25 A149R N150fs*9 I151T I151N I151S I151M L153fs*6 L153P P154L V155L V155M V155G V155fs*4 Y156fs*3 Y156C Y156D T157I T157TF T157fs*2 T157fs L158P L158Q L158V K159E E160* E160fs*10 E160fs E160K R161P R161G R161Q R161* C162R C162W C162Y C162F C162fs L163P L163fs*7 Q164* Q164P Q164H Q164R V166G V166D V166F R167W R167G R167Q R167fs*3 S168fs*2 L169P V170D V170F V170G K171N P172fs*30 N174fs*28 Y175D Y175fs*27 Y175* R176W R177* R177RLRVKPE L178P L178Q D179fs*23 I180N I180V I180fs*22 S183* L184P L184R Y185fs*17 Y185* E186K E186del D187fs*27 E186* D187_L188del L188Q L188P L188V E189K H191D P192S N193fs*22 Q195* K196fs*18 L198R R220W、エクソン2の欠失、エクソン2及び3の欠失

20

30

ここで、*は停止コドンによる置換を指し、fsは示された位置で生ずるフレームシフト及び現れる停止コドンを指し、fs*Xは示された位置で生ずるフレームシフト及びXというアミノ酸の後に現れる停止コドンを指し、並びにdelは欠失を指す。

【 0 0 6 2 】

M1fs*20 M1I E10G E12K S38F G39S P40S E41V E51Q A56fs*11 R58fs*9 P59fs*8 V62fs*5 V62fs*68 S65L S65* S65W S65fs*2 S68* S68P E70* S72fs*87 Q73* V74D F76del C77* N78S N78H N78I N78K S80N S80R P81S P81fs*78 R82P L85P P86H P86L P86S V87_W88del W88R W88C W88* L89R L89H L89P N90I N90fs*69 P95R Q96* Y98fs*61 Y98F Y98* P99fs*60 L101P G104fs*23 G104fs*55 R107fs*52 R108fs*51 I109N S111N S111G R113* G114R G114C G114S H115N H115Y H115fs*44 W117* W177R L118P F119L D121G D121Y D121E A122E T124fs*35 D126G L128P L128R L128fs*31 V130L N131fs*2 N131fs*28 N131fs*27 N131K Q132* T133fs*26 E134* L135fs*24 F136V F136fs*23 V137fs*7 V137fs*22 P138R S139fs*20 N141fs*3 N141fs*18 V142fs*17 G144* G144fs*14 G144fs*15 P146fs*13 F148fs*11 A149fs*26 A149fs*25 N150fs*9 I151T I151N I151S I151M L153fs*6 L153P P154L V155L V1

40

50

55M V155fs*4 Y156fs*3 T157I T157s*2 L158P L158Q L158V E160* E160fs*10 E160K R161
 P R161* C162R C162W C162Y C162F L163P L163fs*7 Q164* Q164P V166G V166D R167W R16
 7Q R167fs*3 S168fs*2 L169P K171N P172fs*30 N174fs*28 Y175D Y175fs*27 Y175* R177
 * D179fs*23 I180N I180fs*22 L184P Y185fs*17 Y185* D187fs*27 S183* E186* D187_L18
 8del L188Q L188P E189K N193fs*22 Q195* K196fs*18 R220W

ここで、*は停止コドンによる置換を指し、fs*Xは示された位置で生ずるフレームシフト
 及びXというアミノ酸の後に現れる停止コドンを指し、並びにdelは欠失を指す。

【 0 0 6 3 】

一実施形態において、VHL遺伝子の変異は、Table 3 (表4)で開示されたものから選択さ
 れる。特に、VHLの変異は、C77fs、N131K、L118-F119の欠失、S72P、P86fs、R108fs、Q96
 *、I75fs、S78fs、E160fs、T157fs、N90fs、C162fs、M54fs、R167Q、L89H、L85P、W117C
 、L89P、及びQ73*からなる群から、並びにより具体的にはN131K、R108fs、Q96*、E160fs
 、T157fs、N90fs、R167Q、L89H、L85P、W117C、L89P、及びQ73*からなる群から選択され
 得る。

10

【 0 0 6 4 】

好ましい実施形態では、VHL遺伝子の変異は、S183*及びL163Pからなる群から選択され
 得る。

【 0 0 6 5 】

VHL遺伝子の機能の喪失は、当業者には周知の数通りの方法によって決定され得る。特
 に、VHL遺伝子の機能の喪失は、VHLタンパク質の活性を測定することにより、VHLタンパ
 ク質の分子量を測定することにより、VHL遺伝子の発現レベルを測定することにより、及
 び/又はVHL遺伝子における変異の有無を検出することにより決定することができる。VHL
 遺伝子の機能の喪失は、上で列挙した方法の2つ以上の組合せによって決定することもで
 きる。

20

【 0 0 6 6 】

一実施形態において、VHL遺伝子の機能の喪失は、VHLタンパク質の活性を測定するこ
 とにより決定することができる。VHLタンパク質は、HIF(低酸素症を誘導し得る因子)の転写
 因子を基質として有するE3リガーゼである。試料からの細胞の抽出物から、VHLタンパ
 ク質のE3リガーゼ活性が、例えば、古典的な酵素試験、特に、蛍光性基質を使用する試験に
 より測定され得る。VHLタンパク質のリガーゼ活性の完全な無効化又は前記活性の低下は
 、VHL遺伝子の機能の喪失を示す。好ましくは、VHLタンパク質のリガーゼ活性の少なく
 とも10%の低下、より好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%の低下は、VHL遺伝子の機能
 の喪失を示す。VHLタンパク質のリガーゼ活性の低下の程度は、参照の活性値との比較に
 より決定することができる。特に、参照の活性値は、正常試料のVHLタンパク質のリガー
 ゼ活性であり得る。参照の活性値は、異なった対象からの異なった正常試料で得られた活
 性の平均であり得る。

30

【 0 0 6 7 】

別の実施形態において、VHL遺伝子の機能の喪失は、VHLタンパク質の分子量を測定する
 ことにより決定することができる。VHLタンパク質の正常な分子量は25.4kDaである。25.4
 kDaと異なる患者の試料におけるVHLタンパク質の分子量は、VHL遺伝子の機能の喪失を示
 す。25.4kDaの分子量を有する患者からの試料のVHLタンパク質の分率が低下している場合
 には、それもVHL遺伝子の機能の喪失を示す。例えば、25.4kDaの分子量を有するVHLタン
 パク質の分率が、合計VHLタンパク質の少なくとも90%未満、好ましくは、合計VHLタンパ
 ク質の80%、70%、60%、50%未満である場合には、それは、VHL遺伝子の機能の喪失を示す
 。VHLタンパク質の分子量は、ウェスタンブロットにより、又は当業者に周知の任意の他
 の古典的な方法により検出することができる。

40

【 0 0 6 8 】

更に別の実施形態では、VHL遺伝子の機能の喪失は、VHL遺伝子の発現レベルを測定する
 ことにより決定することもできる。VHL遺伝子の発現レベルは、前記患者からの試料中のV
 HL mRNA又はVHLタンパク質の量を測定することにより検出することができる。VHL遺伝子

50

の参照の発現レベル未満の発現レベルは、VHL遺伝子の機能の喪失を示す。好ましくは、VHL遺伝子の参照の発現レベルより少なくとも10%低い、より好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%低い発現レベルは、VHL遺伝子の機能の喪失を示す。VHL遺伝子の参照の発現レベルは、正常試料におけるVHL遺伝子の発現レベルである。VHL遺伝子の参照の発現レベルは、異なった対象からの異なった正常試料で得られた活性の平均であり得る。VHLのmRNAの量は、当業者に周知の種々の方法、例えば、定量的RT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）等により検出され得る。VHLタンパク質の量は、当業者に周知の数通りの方法、例えば、Elisa、ウェスタンブロット及び質量分析法等により検出することができる。

【0069】

更に別の実施形態では、VHL遺伝子の機能の喪失は、VHL遺伝子における変異の有無を検出することにより決定することができる。両方のVHLの対立遺伝子の変異又は一方のVHLの対立遺伝子の変異、及び例えばプロモーターの高メチル化に基づく他方の発現の抑制は、VHL遺伝子の機能の喪失を示す。異なるタイプの変異、好ましくは生殖細胞系列の変異、体細胞の変異、点変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、欠失、挿入、増幅、逆位は、VHL遺伝子の機能の喪失の原因となり得る。VHL遺伝子の変異は、配列を決定して非変位配列と比較することにより検出することができる。

【0070】

PD-1/PD-L1を標的とする薬剤

本発明は、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる癌の治療に関する。PD-1/PD-L1を標的とする薬剤は、PD-L1を標的とする分子、PD-1を標的とする分子又はPD-1/PD-L1複合体を標的とする分子であり得る。好ましくは、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤は、PD-1又はPD-1/PD-L1複合体を標的とする分子である。より好ましくは、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤は、PD-1アンタゴニスト又はPD-1/PD-L1アンタゴニストである。

【0071】

「PD-1アンタゴニスト」又は「PD-1/PDL-1アンタゴニスト」とは、癌細胞で発現されたPD-L1の免疫細胞(T細胞、B細胞又はNKT細胞)で発現されたPD-1に対する結合を遮断する、及び好ましくは、癌細胞で発現されたPD-L2の免疫細胞が発現したPD-1に対する結合も遮断する任意の化学化合物又は生物学的分子を意味する。PD-1(プログラム細胞死タンパク質1)及びそのリガンドに対する代替的名称又は同義語として:PD-1に対してPDCD1、PD1、CD279及びSLEB2; PD-L1(プログラム細胞死リガンド1)に対してPDCD1L1、PDL1、B7H1、B7-4、CD274及びB7-H;並びにPD-L2(プログラム細胞死リガンド2)に対してPDCD1L2、PDL2、B7-DC、Bt dc及びCD273が含まれる。ヒト個体が治療される本発明の種々の態様及び実施形態のいずれにおいても、PD-1アンタゴニストがヒトPD-1に対するヒトPD-L1の結合を遮断し、好ましくは、ヒトPD-1に対するヒトPD-L1及びPD-L2の両方の結合を遮断する。ヒトPD-1のアミノ酸配列は、NCBI遺伝子座位番号:NP_005009に見出すことができる。ヒトPD-L1及びPD-L2のアミノ酸配列は、それぞれ、NCBI遺伝子座位番号:NP054862及びNP_079515に見出すことができる。

【0072】

本発明の種々の態様及び実施形態のいずれにおいても有用なPD-1アンタゴニストは、PD-1又はPD-L1に特異的に結合する、及び好ましくは、ヒトPD-1又はヒトPD-L1に特異的に結合する、それらのモノクローナル抗体(mAb)、又は抗原結合フラグメントを含む。mAbは、ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体であってもよく、ヒト定常領域を含むこともできる。幾つかの実施形態において、ヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4の定常領域からなる群から選択され、好ましい実施形態では、ヒト定常領域は、IgG1又はIgG4の定常領域である。幾つかの実施形態において、抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'-SH、F(ab')₂、scFv及びFvフラグメントからなる群から選択される。

【0073】

ヒトPD-1に結合して、本発明の種々の態様及び実施形態において有用なmAbの例は、US7521051、US8008449、及びUS8354509に記載されている。本発明の種々の態様及び実施形態におけるPD-1アンタゴニストとして有用な特異的抗ヒトPD-1 mAbには:MK-3475、WHO Drug

10

20

30

40

50

Information、27巻、2号、161～162頁(2013)に記載された構造を有し、図6に示した重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を含むヒト化IgG4 mAb、ニボルマブ(BMS-936558)、WHO Drug Information、27巻、1号、68～69頁(2013)に記載された構造を有し、図7に示した重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を含むヒト化IgG4 mAb;ピジリズマブ(CT-011; hBAT又はliBAT-1としても知られている);及びWO2008/156712に記載されたヒト化抗体h409A11、h409A16及びh409A17が含まれる。

【0074】

ヒトPD-L1に結合して、本発明の種々の態様及び実施形態のいずれかで有用なmAbの例は、WO2013/019906、WO2010/077634A1及びUS8383796に記載されている。本発明の種々の態様及び実施形態におけるPD-L1アンタゴニストとして有用な特異的抗ヒトPD-L1 mAbには、MPDL3280A、BMS-936559、MEDI4736、MSB0010718C並びにWO2013/019906の配列番号24及び配列番号21の重鎖及び軽鎖可変領域を、それぞれ含む抗体が含まれる。

10

【0075】

本発明の種々の態様及び実施形態のいずれかで有用な他のPD-1アンタゴニストには、PD-1又はPD-L1に特異的に結合し、好ましくは、ヒトPD-1又はヒトPD-L1と特異的に結合するイムノアドヘシン、例えば、定常領域、例えば、免疫グロブリン分子のFc領域と融合したPD-L1又はPD-L2の細胞外又はPD-1結合部分を含有する融合タンパク質が含まれる。PD-1に特異的に結合するイムノアドヘシン分子の例は、WO2010/027827及びWO2011/066342に記載されている。本発明の治療方法、組成物及び使用においてPD-1アンタゴニストとして有用な特異的融合タンパク質には、AMP-224 (B7-DCIgとしても知られている)が含まれ、それはPD-L2-FC融合タンパク質であり、ヒトPD-1に結合する。

20

【0076】

PD-1アンタゴニストを、PD-1調整療法、PD-1阻害剤、抗PD-1免疫療法、抗PD-1モノクローナル抗体、PD-1リガンド可溶構造、及び/又はAMP-224 (Amplimmune社)の中から選択して; PD-L1についてタンパク質分析を実施し、PD-L1調整療法、PD-L1阻害剤、抗PD-L1免疫療法、抗PD-L1モノクローナル抗体、BMS-936559、MPDL3280A/RG7446、及び/又はMEDI4736 (MedImmune社)から恩恵を受けられそうか又は恩恵がないかを決定することができる。

【0077】

好ましい実施形態において、PD-1アンタゴニストは、ニボルマブ(Opdivo、Bristol-Myers Squibb社)、ペンプロリズマブ(Keytruda、MK-3475、Merck社)、ピジリズマブ(CT-011、Cure Tech社)、AMP-224 (Amplimmune社/GlaxoSmith Kline社)、AMP-514 (Amplimmune社/GlaxoSmith Kline社)、BMS936559 (Bristol Myers Squibb社)、MPDL3280A (Atezolizumab、Roche社)、デュルバルマブ(MPDLI4736、MedImmune社/AstraZeneca社)、アベルマブ(MS B0010718C、Merck Serono社/Pfizer社)及びそれらの組合せからなる群から、好ましくは、ニボルマブ(Opdivo、Bristol-Myers Squibb社)、ペンプロリズマブ(Keytruda、MK-3475、Merck社)、ピジリズマブ(CT-011、Cure Tech社)、BMS936559 (Bristol Myers Squibb社)、MPDL3280A (Roche社)、RG7446 (Genentech-Hoffmann-La Roche社)、MEDI4736 (AstraZeneca社)、AMP-514 (MedImmune社)及びAMP-224 (Glaxo SmithKline社)からなる群から選択される。

30

【0078】

最も好ましい実施形態では、PD-1アンタゴニストは、ニボルマブ(Opdivo、Bristol-Myers Squibb社)、ペンプロリズマブ(Keytruda、MK-3475、Merck社)、ピジリズマブ(CT-011、Cure Tech社)、BMS936559 (Bristol Myers Squibb社)、及びMPDL3280A (Roche社)からなる群から選択される。

40

【0079】

治療

更に別の態様では、本発明の方法は、VHL遺伝子の機能が喪失した患者を治療する工程を更に含む。

【0080】

VHL遺伝子の機能が喪失した患者の治療は、患者に対する有効量の治療剤、好ましくはP

50

D-1/PD-L1薬剤の投与を含むことができる。

【0081】

治療剤の投与される用量は、患者、病状、投与の様式等に合わせて、当業者により適合され得ると理解される。投薬量及び投与計画は、前立腺癌のステージ及び重症度、患者の体重及び一般的健康状態並びに処方する医師の判断に特に依存する。

【0082】

本発明は、PD-1シグナル伝達の遮断を含む免疫療法を用いる治療から恩恵を受けることができる患者を同定する方法であって、

(a)前記患者からの試料の細胞が、フォン・ヒッペル・リンドウ(VHL)遺伝子の機能の喪失を呈するか否かを見分ける工程であって、VHL遺伝子の機能の喪失が、患者がPD-1シグナル伝達の遮断を含む免疫療法を用いる治療から恩恵を受けるであろうということを示す、工程、及び

(b)VHL遺伝子の機能が喪失した患者を、PD-1シグナル伝達の遮断を含む免疫療法で治療するために適するとして選択する工程を含む方法にも関する。

【0083】

この方法は、VHL遺伝子の機能が喪失した患者を治療する工程を更に含むことができる。

【0084】

本発明の別の態様では、本発明は、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療を行わない、腫瘍に冒された患者を選択する *in vitro* 又は *ex vivo* による方法であって、

(a)前記患者からの試料の細胞がフォン・ヒッペル・リンドウ(VHL)遺伝子の機能の喪失を呈するか否かを見分ける工程であって、VHL遺伝子の機能の喪失の不在が、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に対する前記患者の非応答性を予測する、工程、及び

(b)VHL遺伝子の機能の喪失がない患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療に適しないとして選択する工程を含む方法に関する。

【0085】

更に別の態様では、本発明は、腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するためのバイオマーカーとしてのVHL遺伝子の機能の喪失の使用に関する。

【0086】

キット及びキットの使用

本発明の更に別の態様では、本発明は、腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するためのキットに関し、キットは、VHL遺伝子を標的とする1対のプライマー、VHL mRNAを標的とするプライマー、VHL cDNAを標的とする1対のプライマー、VHL cDNAを標的とするプローブ、VHL mRNAを標的とするプローブ、VHL DNAを標的とするプローブ、VHL基質、VHLタンパク質の特異的抗体、及びそれらの組合せからなる群から選択される、VHL遺伝子の機能の喪失を検出するための手段を含む。

【0087】

上で述べたキットの好ましい実施形態では、キットは、VHLタンパク質の活性検出のための手段、例えば酵素試験に適切なVHL基質、より好ましくはVHLの蛍光性基質、更により好ましくはVHLタンパク質により処理された後蛍光を発する基質、又は蛍光がVHLタンパク質の活性により改変される基質を含むことができる。特定の実施形態において、基質はHIFタンパク質に関係する。

【0088】

上で述べたキットの別の好ましい実施形態では、キットは、VHLタンパク質の分子量検出のための手段、例えば、ウェスタンブロット法のために適切なVHLに特異的な抗体を含んでいてもよい。

【0089】

10

20

30

40

50

上で述べたキットの更に別の好ましい実施形態では、キットは、VHL遺伝子の発現レベルを検出するための手段、好ましくはVHL mRNAの量を測定するための手段、及び/又はVHLタンパク質の量を測定するための手段を含むこともできる。特に、キットは、VHL mRNAの量を測定するための手段、例えば、cDNAにおけるVHL mRNAの逆転写のために適当なVHL mRNAを標的とするプライマー、及び定量的PCRのために適当なVHL cDNAを標的とする1対のプライマー、及び/又は定量的PCRのために適当なVHL cDNAプローブ等を含むことができる。或いは、キットは、VHLタンパク質の量を測定するための手段、例えば、ウェスタンブロット又はElisaの方法に適当なVHLタンパク質の特異的抗体等も含むことができる。

【0090】

上で述べたキットの更に別の好ましい実施形態では、キットは、VHL遺伝子の変異の存在の検出のための手段、例えば、VHL遺伝子の配列決定のために適当なVHL遺伝子を標的とする1対のプライマー、又はVHL遺伝子の既知の変異を同定するために適当なVHL DNAを標的とするプローブ等を含むことができる。

【0091】

任意選択で、上で述べたキットは、そのようなキットを使用するための指針を提供する小冊子を更に含む。

【0092】

本発明の別の態様では、本発明は、腫瘍に冒された患者を、PD-1/PD-L1を標的とする薬剤を用いる治療のために選択するためのキットの使用に関し、該キットは、VHL遺伝子を標的とするプライマー、VHL mRNAを標的とする1対のプライマー、VHL cDNAを標的とする1対のプライマー、VHL cDNAを標的とするプローブ、VHL mRNAを標的とするプローブ、VHL DNAを標的とするプローブ、VHL基質、VHLタンパク質の特異的抗体、及びそれらの組合せからなる群から選択される、VHL遺伝子の機能の喪失を検出するための手段を含む。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】VHL変異の状態はccRCCにおけるPD-L1の発現と関連する。ボックスプロットは、異なる分類についてVHL変異の状態によるPD-L1 mRNAの発現の分布(平均倍率変化)を表す:(A)ヘテロ接合性の喪失(LOH) (LOHの存在=1、LOHの不在=0)、(B)変化した対立遺伝子の数(1は、0個及び1個の変化した対立遺伝子に対応する)、(C)機能の喪失(LOFの存在=1、LOFの不在=0)。(n=32)。

【図2】異なるVHL変異体をトランスフェクトされた786-0細胞における差次的なPD-L1の発現。(A)PD-L1、CA-IX及びVEGFの発現をSYBR-GREEN qRT-PCRにより評価した。(B)ウェスタンブロットを実施してHIF-2、及びPD-L1タンパク質レベルを示した。ローディング対照としてアクチンを使用した。(C)786-0細胞をインターフェロン(IFN-)と24時間インキュベートした。ウェスタンブロットを実施してPD-L1タンパク質レベルを示した。ローディング対照としてアクチンを使用した。(D及びE)PD-L1及びPD-L2の表面発現レベルをフローサイトメトリーにより決定した。データは、3回の独立の実験を標準偏差(SD)と共に表す。WT細胞と異なるVHL変異体間の統計的な有意差(星印により示した)を示す(*=P<0.05、**=P<0.005及び***=P<0.0005)。

【図3-1】図3AからC。HIF-2のサイレンシングは、786-0細胞及びA498細胞におけるPD-L1の発現を減少させた。786-0細胞及びA498細胞に、HIF-2又はスクランブルコントロール(CT)を標的とする2種の異なるsiRNAをトランスフェクトした。(A)HIF-2、CA-IX、VEGF及びPD-L1の発現レベルをSYBR-GREEN qRT-PCRにより評価した。(B及びC)ウェスタンブロットを実施して786-0(B)細胞及びA498(C)細胞におけるHIF-2及びPD-L1タンパク質レベルを示した。ローディング対照としてアクチンを使用した。(D及びE)786-0(D)細胞及びA498(E)細胞におけるPD-L1の表面発現レベルを、フローサイトメトリーにより決定した。データは、3回の独立の実験をSDと共に表す。スクランブルコントロール又はHIF-2を標的とするsiRNAをトランスフェクトした細胞間における統計的な有意差(星印により示した)を示す(*=P<0.05、**=P<0.005及び***=P<0.0005)。

【図3-2】図3DからE。HIF-2のサイレンシングは、786-0細胞及びA498細胞にお

10

20

30

40

50

るPD-L1の発現を減少させた。786-0細胞及びA498細胞に、HIF-2又はスクランブルコントロール(CT)を標的とする2種の異なるsiRNAをトランスフェクトした。(A)HIF-2、CA-IX、VEGF及びPD-L1の発現レベルをSYBR-GREEN qRT-PCRにより評価した。(B及びC)ウェスタンブロットを実施して786-0(B)細胞及びA498(C)細胞におけるHIF-2及びPD-L1タンパク質レベルを示した。ローディング対照としてアクチンを使用した。(D及びE)786-0(D)細胞及びA498(E)細胞におけるPD-L1の表面発現レベルを、フローサイトメトリーにより決定した。データは、3回の独立の実験をSDと共に表す。スクランブルコントロール又はHIF-2を標的とするsiRNAをトランスフェクトした細胞間における統計的な有意差(星印により示した)を示す(*=P<0.05、**=P<0.005及び***=P<0.0005)。

【図4-1】図4AからC。HIF-2は、786-0細胞中のPD-L1に隣接するプロモーター中のHRE-4に直接結合することによりPD-L1の発現を調節する。(A)HIF-2又はスクランブルコントロール(CT)のいずれかに対するsiRNAをトランスフェクトされた786-0細胞及びWT細胞に対して、抗HIF-2抗体の使用に続いてVEGFA及びPD-L1 HRE部位を使用するSYBR-GREEN RT-qPCRにより、ChIPアッセイを実施した。(B)ヒトPD-L1プロモーター中の異なる低酸素症応答構成要素(HRE)を示す。(C)786-0及びWT細胞に、pGL4-hRluc/SV40ベクター及びpGL3空ベクター(pGL3EV)、pGL3 HRE-4又はpGL3 HRE-4 MUTベクターを共トランスフェクトした。48時間後に、ホタル及びウミシイタケのルシフェラーゼ活性を、Dual-Luciferase Reporterアッセイ(Promega社)を使用して測定し、ホタル:ウミシイタケルシフェラーゼの比を決定した。データは、3回の独立の実験をSDと共に表す。統計的な有意差(星印により示した)を示す(*=P<0.05、**=P<0.005及び***=P<0.0005)。

【図4-2】図4DからE。HIF-2は、786-0細胞中のPD-L1に隣接するプロモーター中のHRE-4に直接結合することによりPD-L1の発現を調節する。(D)WT(野生型VHL)細胞にpcDNA3 EV又はpcDNA3-HIF-2(3µg及び5µg)をトランスフェクトした。HIF-2の発現をウェスタンブロットにより検出した。ローディング対照としてアクチンを使用した。(E)PD-L1の表面発現レベルをフローサイトメトリーにより決定した。データは、3回の独立の実験をSDと共に表す。pcDNA3 EV、pcDNA3-HIF-2をトランスフェクトされた細胞間の統計的な有意差(星印により示した)を示す(*=P<0.05、**=P<0.005及び***=P<0.0005)。

【図4-3】図4FからH。HIF-2は、786-0細胞中のPD-L1に隣接するプロモーター中のHRE-4に直接結合することによりPD-L1の発現を調節する。(F~H)HIF-1及びHIF-2はRCC4細胞株におけるPD-L1発現を調節する。RCC4細胞に、HIF-1、HIF-2、HIF-1及びHIF-2の両方又はスクランブルコントロール(CT)を標的とするsiRNAをトランスフェクトした。(F)VEGF及びPD-L1の発現レベルをSYBR-GREEN qRT-PCRにより評価した。(G)ウェスタンブロットを実施して、RCC4におけるHIF-1、HIF-2及びPD-L1タンパク質レベルを示した。ローディング対照としてアクチンを使用した。(H)RCC4中におけるPD-L1の表面発現レベルをフローサイトメトリーにより決定した。グラフは、陽性細胞のパーセンテージを表す。データは2回の独立実験をSDと共に表す。スクランブルコントロール又はHIF-1、HIF-2及びHIF-1+HIF-2を標的とするsiRNAをトランスフェクトされた細胞間の統計的な有意差(星印により示した)を示す(*=P<0.05、**=P<0.005及び***=P<0.0005)。

【図5】786.0におけるPD-L1の過剰発現及びサイレンシング。786.0細胞に、HIF-2、スクランブルコントロールを標的とするsiRNAをトランスフェクトするか、又は786.0細胞をIFN-とインキュベートした(24時間)。ウェスタンブロットを実施して786.0細胞におけるPD-L1タンパク質レベルを示した。ローディング対照としてアクチンを使用した。

【実施例】

【0094】

導入

淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)は成人癌の約3%を占める[1]。フォン・ヒッペル・リンドウ(VHL)腫瘍抑制遺伝子の機能の喪失が、VHL疾患で起こる[2]。VHLは、ヘテロ接合性の喪失(LOH)又はプロモーター高メチル化を伴って、生殖細胞系列又は体細胞の変異によって変化し得る[3]。有害なVHL変異には、機能の結果が、短縮されたVHLタンパク質(pVHL)(ナンセンス、フレームシフト変異又はスプライス部位のある不履行により引き起こされた)又

10

20

30

40

50

は部分的野生型VHLの機能(ミスセンス変異及びフレーム内欠失により引き起こされた)であるものが含まれる[4,5]。したがって、VHL遺伝子の2対立遺伝子の不活性化(野生型のコピーが残らない)は、pVHLの完全な機能の喪失(LOF)をもたらす有害な変異(生殖細胞系列又は体細胞の)がLOH又はプロモーター高メチル化のいずれかを伴うこととして定義される。

【0095】

VHLは、びまん性のccRCCの70~90%で変化していると報告されている[6,7]。ccRCCにおけるVHL機能の喪失は、低酸素症誘導性因子(HIF)、特にHIF-2の構成性安定化をもたらす[8]、これらの極度に血管が新生して化学放射線耐性のあるccRCCにおいて高度に血管形成性の環境を生ずる[9]。

10

【0096】

最近の前臨床及び臨床データは、免疫チェックポイントの抗体による遮断が抗腫瘍免疫を強化し得ることを示す[10]。この関連で、異常なプログラム細胞死リガンド1(PD-L1)の発現が、RCCを含む数種のヒト癌で報告された[11]。本発明者らは、HIF-1による低酸素症が、種々の腫瘍細胞(メラノーマ、肺癌及び乳癌)並びにマクロファージ、樹状細胞(DC)及び骨髄腫由来の抑制細胞(MDSC)において、PD-L1の発現を直接上方制御し得ることを最近示した[12]。

【0097】

幾つかの研究が、ccRCCにおけるPD-L1の発現、転移、及び不幸な転帰の間の正の相関を記載している[13]。最近、抗体媒介のPD-1[14]及びPD-L1[15]の遮断がRCCを含む癌が進行した患者で永続性の腫瘍退縮及び疾患の長期の安定化をもたらすことが示された[16]。

20

【0098】

頻繁なVHL機能の喪失(LOF)は、RCCの進行において決定的に重要な要因であるが、VHL変異状態と免疫チェックポイントPD-L1の発現の間の関連は、未知のままである。本発明者らの主要な目的は、VHL変異とPD-L1発現の間の推定上の関係を解明することであった。本発明の研究において、本発明者らは、VHL変異の状態がccRCCの患者におけるPD-L1発現と有意に相関していることを示した。本発明者らはVHLの変異が誘導したHIF-2の安定化がPD-L1の発現を上方に調節することも示した。

【0099】

結果

30

VHL遺伝子の機能の喪失は、ccRCCにおけるPD-L1の発現と関連する。

ccRCCの患者は両方の対立遺伝子のVHL変異状態について、体細胞の点変異、LOH、及びVHLプロモーターの高メチル化についての探求を含めて特徴づけられた(Table 3 (表4))。このシリーズの中で、59.4%が男性、65.6%がびまん性の(spo) ccRCCを有し、(6.3%/46.9%)がステージ1~2で悪性度1~2及び(28.1%/21.9%)であった(Table 1 (表1))。

【0100】

腫瘍は、最初に、VHL変化のタイプ、即ち、3p25におけるLOHの存在(C1)及び遺伝子コピーの計数に基づく変化した対立遺伝子の数(C2) (即ち0、1又は2)に従って分類した。次に、LOFのアセスメントを、VHL変異の正確なタイプ(多分有害:両方の対立遺伝子の完全な喪失;良性:両方の対立遺伝子が野生型である;可能性として有害:他の場合、Table 3 (表4))に対応する有害な状態及びLOH又はプロモーターの高メチル化の存在(C3)に基づいて行った。これらの基準を使用して、腫瘍の71.9%がLOHを呈し、65.6%が2つのVHL変化した対立遺伝子を有し、及び43.8%がVHLについてLOFを有した(Table 1 (表1))。

40

【0101】

次に、PD-L1の発現を、これらの32症例のccRCCについてqRT-PCRにより評価した(Table S1及び図1A)。本発明者らは、VHL状態とPD-L1発現との間の統計的に優位な関連を、VHL分類についての本発明者らの基準を無視して観察した。実際、LOHを呈する腫瘍について、PD-L1発現の中央値(5.1[4.8~6.3])は、LOHが不在のccRCC (2.7[2.1~4.3];図1A;p=0.0001)と比較して有意に高かった。更に、2つの対立遺伝子が増加した腫瘍におけるPD-L1発現の中央値(5.2;95% CI=[4.8~6.3])は、0又は1つの対立遺伝子が増加した腫瘍における中

50

央値(図1B;2.9[2.6~4.5]; $p<0.0001$)よりも有意に高かった。同様な結果は、VHL LOFがある腫瘍(5.4[4.8~6.3])対LOFのない腫瘍(4.4[2.7~4.8];図1C; $p=0.025$)について得られた。

【0102】

HIF-2 の傾斜した発現レベルはPD-L1と発現と正に相関した。

次に、本発明者らは、HIF-2 のみを過発現するVHLを欠損する786-0細胞株に6種の異なるVHLトランスフェクトを再導入することにより得られた異なるVHL変異体を使用した。これらのVHL変異細胞において、漸進的なpVHL LOFは、HIF-2 発現の漸進的な調節異常を誘導する[5]。本発明者らは、これら6種のccRCCのVHL変異体細胞株(空、1、2B、2A、2C)及びWT細胞(野生型VHLをトランスフェクトされた)で、PD-L1の発現レベルを比較した。結果は、HIF-2 の異なる傾斜の発現レベルを有するVHL変異細胞は、mRNA及びタンパク質レベルの両方で、PD-L1発現と正に相関することを明らかにした(図2A及び図2B)。図2Cに示したように、IFN- γ で処理された786-0細胞を、陽性対照として使用して、786-0細胞におけるPD-L1のsiRNA媒介サイレンシング(及び図5)を、ウェスタンブロットによるPD-L1(33kDa)の検出のための陰性対照として使用した。同様に、図2D及び図2Eに示したように、PD-L1の表面発現は、空のベクターをトランスフェクトされた細胞(786-0細胞)と比較して、VHL変異体(1、2B、2A、2C)において有意に減少した。より重要なこととして、PD-L1は、空の(786-0)細胞と比較して、WT細胞(野生型VHLをトランスフェクトされた)で有意に減少した(図2A~図2E)。これらのデータは、786-0細胞株におけるVHL変異とPD-L1発現の間の相関の存在を指摘して、ccRCC腫瘍について本発明者らのデータの確証となる(図1)。

【0103】

HIF-2 を標的とする、ccRCC細胞におけるPD-L1発現の減少が生じた。

VHL変異状態とPD-L1発現の間の相関がHIF-2 を必要とするか否かを決定するために、本発明者らは、pVHLを欠損する786-0及びA498ccRCC細胞株でsiRNAを使用して、HIF-2 をノックダウンした。顕著に、HIF-2 のsiRNA-媒介ノックダウンは、786-0(図3A及び図3B)及びA498(図3A及び図3C)細胞の両方で、PD-L1 mRNA及びタンパク質の発現レベルを有意に減少させた。同様に、PD-L1の表面発現は、HIF-2 を標的とするsiRNAをトランスフェクトされた786-0(図3D)及びA498(図3E)細胞の両方で有意に減少した。

【0104】

HIF-2は、786-0細胞中のPD-L1に隣接するプロモーターにおけるHREに直接結合することにより、PD-L1の発現を調節する。

HIF-2 がPDL1発現を調節する機構に対する洞察を得るために、本発明者らは、最初に、fuzznuc (EMBOSS explorer)ソフトウェアを使用して、ヒトPD-L1遺伝子の隣接プロモーターにおいて可能性のあるHIF-2 結合部位を探索した。図4A及び図4Bに描いたように、本発明者らは、ヒトPD-L1遺伝子内でコンセンサス配列(A/G)CGTGを含有する推定上の低酸素応答構成要素(HRE)を見出した。染色質免疫沈降(ChIP)を使用して、本発明者らは、HIF-2 が786-0細胞中のPD-L1プロモーターにあるHRE-4にのみ特異的に結合して、siRNA HIF-2 をトランスフェクトされた786-0又はVHL修正WT細胞株では結合しないことを示した(図4A)。786-0細胞におけるChIP複合体は、VEGF遺伝子中の確立されたHREに対するそれらの結合に匹敵する、HRE-4におけるHIF-2 の有意な結合(>4倍)を示した。

【0105】

このHIF-2 の部位(HRE-4)が転写活性のHREであるか否かを決定するために、786-0細胞に、pGL4-hRluc/SV40ベクター及びpGL3 HRE-4又はpGL3 HRE-4 MUTベクターを共トランスフェクトした。ホタル及びウミシイタケルシフェラーゼの活性を測定した。図4Cに示したように、786-0細胞は、HRE-4レポーターのルシフェラーゼ活性を、VHL修正WT細胞株と比較して3倍超増大させた。より興味深いことに、HRE-4 MUTのルシフェラーゼ活性は、786-0細胞中のHRE-4と比較して有意に減少した。その上、WT細胞(野生型VHLをトランスフェクトされた)におけるHIF-2 の過剰発現は、ウェスタンブロット(図4D)及びフローサイトメトリー(図4E)により検出されるPD-L1の発現レベルにおいて有意の増大を生じた。

【0106】

10

20

30

40

50

HIF-1 がccRCC細胞中でもPD-L1を調節するか否かを決定するために、本発明者らは、HIF-1及びHIF-2の両方を発現するVHLが変異したRCC4細胞株を使用した。図4F～図4Hで示したように、HIF-1、HIF-2又はHIF-1及びHIF-2の両方のノックダウンは、PD-L1 mRNA (4F) 及びタンパク質の両方の発現(4G及び4H)で、有意の減少を引き起こした。

【0107】

図4で提示された結果は、PD-L1が786-0細胞における新規な直接のHIF-2 の標的遺伝子であり、HIF-1 及びHIF-2 の両方がRCC4細胞におけるPD-L1発現を調節することを示す。したがって、本発明者らは、HIF-2 がmRNA及びタンパク質の両方のレベルでPD-L1の決定的に重要な制御因子であること、並びにHIF-2 がPD-L1に隣接するプロモーター中のHRE-4に直接結合することにより、PD-L1の発現を調節することの証拠をここで提供する。

10

【0108】

考察

本発明者らは、最初に、VHL遺伝子の機能の喪失は、ccRCCの患者におけるPD-L1発現と関連することを示した。VHL変異型に依存して、pVHLの一部の機能が維持されることが報告された[4、5]。本発明者らの仕事は、第1に、VHL遺伝子のLOFが、ccRCC腫瘍におけるPD-L1発現の有意の増大と関連することを示すことである。2対立遺伝子の不活性化及び変異のタイプに基づくVHL状態の分類(即ち、多分、又は比較的低い有害)は、標準的手法ではないが、全ての保持された基準は、VHL機能の喪失を呈するccRCC患者においてPD-L1の統計的に有意な高い発現を示した。他の因子(性、悪性度、ステージ)の関与は除外される(データ掲載せず)。

20

【0109】

VHL変異は、ccRCCの発生に大きな役割を演ずると報告されているが[19、20]、免疫応答の調整におけるそれらの役割は大部分未知のままである。最近、本発明者らは、VHL変異がHIF-2 の安定化により、NKによって媒介される細胞溶解に対するRCC細胞の感受性を減少させることを示した[17]。ここで、本発明者らは、大部分のccRCC腫瘍で変化したVHL遺伝子と免疫チェックポイントPD-L1の発現の間に新たな関連性が存在する証拠を提供する。

【0110】

RCCにおけるPD-L1発現の調節の根底にある分子の機構の確立は完全でない。最近、c-Met及びPD-L1の両方がヒト腎臓癌組織で過発現して共局在化していること;並びにc-Metに上方制御されたPD-L1発現の薬理的誘導があり、それがRCC細胞におけるc-Metの薬理的阻害剤を用いる治療により防止されることが示された[21]。実際、蓄積する証拠は、HIF-2 がccRCC発生及び進行にとって重要であることを示す[22、23]。この研究で使用されたccRCC細胞株(786-0及びA498細胞)では、VHL変異が、HIF-2 の安定化(HIF-1 ではない)を選択的に誘導し、したがって、PD-L1の発現におけるHIF-2 の特異的役割を特異的に調べるための理想的モデルであることを示す。これらのモデル(786-0及びA498細胞)を使用して、本発明者らは、HIF-2 を標的とすることがPD-L1の発現を減少させること、及びPD-L1は786-0細胞における新規な直接のHIF-2 標的遺伝子であることを示した。

30

【0111】

数種の腫瘍の微小環境の因子、例えば、インターフェロン (IFN-) [24]、IL-10及びVEGF [25]等は、PD-L1の発現を誘導/上方制御することが示されている[26]。最近、本発明者らは、HIF-1 がPD-L1のmRNA及びタンパク質発現の主要な制御因子であること、並びにHIF-1 が、マウスのPD-L1に隣接するプロモーターにおいて、HRE-4に直接結合することによりPD-L1の発現を調節することの証拠を提供した[12]。スニチニブを含む種々の抗血管形成療法に対する耐性は、増大したPD-L1発現及び免疫を抑制する腫瘍の微小環境と関連することが見出された[27]。本発明者らは、HIF-1 及びHIF-2 の両方が、VHLが変異したccRCC細胞においてPD-L1の発現を調節することを示したが、本発明者らは、追加の機構がccRCC腫瘍におけるPD-L1発現に寄与するという仮定を排除することができない。

40

【0112】

免疫チェックポイントに基づく免疫療法は、ccRCCにおいて強力で長く続く臨床的応答

50

を示した[14~16]。最近、免疫チェックポイントの発現及び腫瘍微小環境におけるDCの局在化が、ccRCCにおいてCD8+Tリンパ球の臨床的影響を調整することが示された[28]。VHLの変異状態がRCCの抗PD-L1/PD-1免疫療法のための予測マーカーの潜在的候補であり得ると想定することは魅力的である。PD-1/PD-L1遮断、将来の実験がこの好奇心をそそる疑問に答えるはずである。腫瘍の成長に対する抗PD-1治療の効果及びVHL変位の腫瘍免疫浸潤及びVHL野生型Renca RCCの異種移植を研究することは興味深い。それに加えて、RCCにおける血管新生とPD-1軸の間の相互作用をより深く理解することが、転移RCC患者において、二重阻害の臨床試験を進展させるか又はPD-1/PD-L1阻害を目標としてVEGF/VEGFRのために最適の配列を定める可能性を有する。

【0113】

10

結論

本発明のデータは、VHL変異、HIF-2 関連経路、及びPD-L1発現の間の関連に対する洞察をもたらし、抗PD-L1応答の制御におけるVHL/HIF-2 軸の重要な役割を指摘する。

【0114】

材料及び方法

腫瘍組織試料

11症例のVHL腫瘍に関連するRCC、及び淡明細胞型腎細胞癌であると立証された腫瘍細胞含有率が少なくとも60%の21症例のびまん性RCCで構成される32例の腎臓腫瘍のシリーズを、French Kidney Cancer Consortium (Table 1 (表1))の好意で得た。21件のびまん性の症例のうち13症例について、対応する正常腎臓組織が利用可能であった。この研究は、Le 20
remlin-Bicetre University病院(フランス)の倫理委員会により承認された。全ての患者が、更なる調査のためにそれらの腫瘍を使用することについて手術前にインフォームドコンセントを提供した。

【0115】

VHL変異とPD-L1発現の間の関連を、VHL変異についてフィッシャーの正確検定を使用して、及びPD-L1発現についてクラスカル・ウォリス検定を使用して試験した。共変量がVHLとPD-L1の関連を説明しない場合、クラスカル・ウォリス検定を使用した。他の場合には、本発明者らは、コ克蘭-マンテル-ヘンツェル検定を使用した。変異型全般にわたるPD-L1マーカーの分布を、ヒストグラム、ボックスプロット及び中央値[Q1~Q3]、並びに分布によらない信頼区間により記載した。本発明者らは、分布が異なる分散を有する場合に 30
、2つの中央値を比較するために使用されるFligner-Policello検定も使用した。

【0116】

腫瘍DNAについてのVHL変異状態、LOH及びプロモーターのメチル化分析

腫瘍試料から抽出したDNAについて、VHL遺伝子の3つのエクソン及びエクソン-イントロン接合部を以前記載された[5]ようにして、配列決定した。LOHについての探求を、Multiplex PCR (Qiagen Master Mix社)により、3p25-26中のVHL遺伝子周囲の4.6Mb領域にわたって広がる6つのマイクロサテライトマーカーのためにデザインされた蛍光色素と結合されたプライマーを前方に使用して実施した。蛍光性データをGeneMapperソフトウェアにより分析して、ピークの強度比を、生殖細胞系列又は対応する腎臓の正常DNAのいずれかを使用して腫瘍DNAと比較して、MicrosoftのExcelにより計算した。VHLプロモーターのメチル 40
化状態は、NotIによる消化とそれに続く蛍光性プライマーを使用するエクソン1の半定量的PCRにより研究した。分析はLOHの研究として実施した。

【0117】

細胞株

786-0及びA498細胞株は、Dr. William Kaelin, Jr. (Dana Farber Institute, Harvard Medical School, Boston, マサチューセッツ州)から得た。786-0及びA498細胞は両方共、LOHを伴う、VHL遺伝子のフレームシフト変異を有する。786-0細胞に異なるタグなしのVHL誘導性レンチウイルス構造を形質導入して、前に記載されたように[5]選択培地中で維持した。

【0118】

50

SYBR GREENリアルタイム定量的PCR (qRT-PCR)

SYBR GREEN RT-qPCRを、前に記載されたように[12]実施した。18Sをハウスキーピング遺伝子として使用した。プライマー配列をTable 2 (表2)(表3)に詳細に示す。

【 0 1 1 9 】

ウェスタンブロット

ウェスタンブロットを、以前報告したように[17]実施した。抗HIF-2 抗体及び抗PD-L1抗体は、Novus Biotechnology社(NB-100-122)及びAbcam社(ab-58810)からそれぞれ購入した。HIF-2 及びスクランブルコントロールに対して予めデザインされたsiRNAを、Ambion社から得て、以前記載されたように[17]電気穿孔法によりトランスフェクトした。

【 0 1 2 0 】

フローサイトメトリー分析

フローサイトメトリーは、FACS LSR-II (BD)を使用して実施した。データを、FACS DIV A 7.0(BD)又はFlow Jo 7.6.5ソフトウェア(Tree Star社)により更に分析した。抗PD-L1-APC及び対照抗体(Isotype-APC)は、Biolegend社から購入した。パーセンテージは、生きている陽性細胞のパーセンテージを指す。

【 0 1 2 1 】

ChIP(染色質免疫沈降)アッセイ

ChIPアッセイを、記載されたように[18]実施した。プライマー配列をTable 2 (表2)(表3)に詳細に示す。

【 0 1 2 2 】

統計分析

データは、GraphPad Prismを用いて分析した。単純比較のためにスチューデントのt-検定を使用した。

【 0 1 2 3 】

(参考文献)

[1] Gupta K, et al. *Cancer treatment reviews*. 2008;34:193-205.

[2] Latif F, et al. *Science*. 1993;260:1317-20.

[3] Gnarr JR, et al. *Nature genetics*. 1994;7:85-90.

[4] Rechsteiner MP, et al. *Cancer research*. 2011;71:5500-11.

[5] Couve S, et al. *Cancer research*. 2014;74:6554-64.

[6] Young AC, et al. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15:7582-92.

[7] Sato Y, et al. *Nature genetics*. 2013;45:860-7.

[8] Kaelin WG, et al. *Nature reviews Cancer*. 2008;8:865-73.

10

20

30

- [9] Escudier B, et al. *Clinical genitourinary cancer*. 2014;12:1-12.
- [10] Pardoll DM. *Nature reviews Cancer*. 2012;12:252-64.
- [11] Wu P, et al. *PloS one*. 2015;10:e0131403.
- [12] Noman MZ, et al. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211:781-90.
- [13] Thompson RH, et al. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13:709s-15s.
- [14] Topalian SL, et al. *The New England journal of medicine*. 2012;366:2443-54. 10
- [15] Brahmer JR, et al. *The New England journal of medicine*. 2012;366:2455-65.
- [16] Motzer RJ, et al. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33:1430-7.
- [17] Messai Y, et al. *Cancer research*. 2014;74:6820-32.
- [18] Jacque E, et al. *Oncogene*. 2013;32:2661-9.
- [19] Richard S, et al. *Seminars in cancer biology*. 2013;23:26-37.
- [20] Maher ER, et al. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011;19:617-23.
- [21] Balan M, et al. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290:8110-20. 20
- [22] Kondo K, et al. *PLoS biology*. 2003;1:E83.
- [23] Gordan JD, et al. *Cancer cell*. 2008;14:435-46.
- [24] duPre SA, et al. *Experimental and molecular pathology*. 2008;85:174-88.
- [25] Curiel TJ, et al. *Nature medicine*. 2003;9:562-7.
- [26] Topalian SL, et al. *Cancer cell*. 2015;27:450-61.
- [27] Liu XD, et al. *Cancer immunology research*. 2015.
- [28] Giraldo NA, et al. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21:3031-40. 30

【表 1】

Table 1. 淡明細胞型腎細胞癌腫(ccRCC)及び VHL 変異に冒された 32 名の患者の臨

床的特性

臨床的特性		% (n)	
性	女性	40.6 (13)	
	男性	59.4 (19)	
病理学	VHL ccRCC	34.4 (11)	
	びまん性 ccRCC	65.6 (21)	
悪性度	1	6.3 (2)	10
	2	46.9 (15)	
	3	34.4 (11)	
	4	12.5 (4)	
ステージ	1	28.1 (9)	
	2	21.9 (7)	
	3	43.8 (14)	
	4	6.3 (2)	
VHL 変化‡			
C1.LOH の存在£	0	28.1 (9)	20
	1	71.9 (23)	
C2.変化した対立遺伝子の数¶	0	3.1 (1)	
	1	31.3 (10)	
	2	65.6 (21)	
C3.LOF の存在§	0	56.3 (18)	
	1	43.8 (14)	

‡:3通りの分類(C1~C3)を使用した。各 ccRCC の VHL 変化を Table 3 で報告する。

£:LOH=ヘテロ接合性の喪失。存在=1、不在=0。

¶:第 1 のクラスにおける腫瘍の数(n=1)に関して、本発明者らは、統計分析のために、第 1 のクラス及び第 2 のクラスを一緒にした。

§:LOF=機能の喪失、即ち、遺伝子の 2 対立遺伝子の不活性化。クラス 1 は、Table 3 で「恐らく損傷している」とした変異の分類に対応し、それに対してクラス 0 では、「損傷している可能性がある」及び「良性」(n=1)変異を一緒にした。存在=1、不在=0。

【 0 1 2 5 】

【表 2】

Table 2.ChIP アッセイから免疫沈降された DNA 試料の増幅のために使用されたゲノムのオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー	配列	配列番号
VEGF-FWD	TCAGTTCCTGGCAACAT	1
VEGF-REV	ACCAAGTTTGTGGAGCTGAG	2
HRE-1-PDL1-H-FWD	GGAGGAGACGTAATCCAGCA	3
HRE-1-PDL1-H-REV	ATTCTCCTCCTCTGCTTTCG	4
HRE-2-PDL1-H-FWD	TCCTCATGGGTTATGTGTAGTTTG	5
HRE-2-PDL1-H-REV	TCCCTCTTAGTGCCTCTCCA	6
HRE-3-PDL1-H-FWD	TGCACTGAGTCTGTTTCTCA	7
HRE-3-PDL1-H-REV	CCATCTTTGACTACCCAGGTG	8
HRE-4-PDL1-H-FWD	GATTCACCGAAGGTCAGGA	9
HRE-4-PDL1-H-REV	CTACCTGCAGGCGGACAG	10

10

【 0 1 2 6 】

20

【表 3】

SYBR 緑色 RT-qPCR のためのプライマー配列

プライマー	配列	配列番号
18S-H-FWD	CGGACAGGATTGACAGATTG	11
18S-H-REV	CAAATCGCTCCACCAACTAA	12
HIF-2 α -H-FWD	GCGCTAGACTCCGAGAACAT	13
HIF-2 α -H-REV	TGGCCACTTACTACCTGACCCTT	14
VEGFA-H-FWD	GCACCCATGGCAGAAGG	15
VEGFA-H-REV	CTCGATTGGATGGCAGTAGCT	16
CAIX-H-FWD	CTGAAGACAGGATGGAGAAG	17
CAIX-H-REV	GCAGAGTGCGGCAGAATG	18
PDL1-H-FWD	TGTACCGCTGCATGATCAG	19
PDL1-H-REV	AGTTCATGTTTCAGAGGTGACTG	20

30

【 0 1 2 7 】

【表 4 A】

Table 3

性	病理学	Fuhrman の悪性度	ス テ ー ジ	VHL の 状 態	変 異 し た エ ク ソ ン	変 異 の 記 述	変 化 の タ イ プ	LOH の 存 在 (C1)	変 化 し た 対 立 遺 伝 子 の 数 (C2)	LOF の 存 在 (C3)
M	びまん性 ccRCC	3	3a	野生型	/	/	/	0	0	0
M	びまん性 ccRCC	3	2a	変異型	1	c.230_231insTGC, p.Cys77fs	フレームシフト	0	1	0
M	びまん性 ccRCC	2	3b	変異型	2	c.391C>G, p.Asn131Lys	ミスセンス	0	1	0
M	びまん性 ccRCC	4	4	変異型	2	c.354delCTTCinsT, p.Leu118_119del	フレーム中	0	1	0
M	びまん性 ccRCC	3	3b	野生型	/	/	LOH	1	1	0
F	びまん性 ccRCC	4	3b	変異型	1	c.214T>C, p.Ser72Pro	ミスセンス+LOH	1	2	0
F	びまん性 ccRCC	4	3b	変異型	1	c.340+2delT, fs site splice	スプライス+LOH	1	2	0
M	びまん性 ccRCC	3	2	変異型	1	c.258insC, p.Pro86fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
F	びまん性 ccRCC	3	3b	変異型	1	c.323ins20, p.Arg108fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
F	びまん性 ccRCC	3	3b	変異型	1	c.287C>T, p.Gln96X	停止+LOH	1	2	1
F	びまん性 ccRCC	2	1b	変異型	1	c.223ins38, p.Ile75fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
M	びまん性 ccRCC	2	1a	変異型	1	c.214del29, p.Ser78fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
M	びまん性 ccRCC	2	3b	変異型	3	c.480delG, p.Glu160fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
M	びまん性 ccRCC	2	3a	変異型	3	c.469del14, p.Thr157fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
F	びまん性 ccRCC	2	1b	変異型	1	c.269delA, p.Asn90fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
F	びまん性 ccRCC	2	3b	変異型	3	c.485delG, p.Cys162fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
F	びまん性 ccRCC	1	1b	変異型	1	c.160del35, p.Met54fs	フレームシフト +LOH	1	2	1
F	びまん性 ccRCC	3	2	野生型	/	/	プロモーター 高メチル化	0	1	0

10

20

30

40

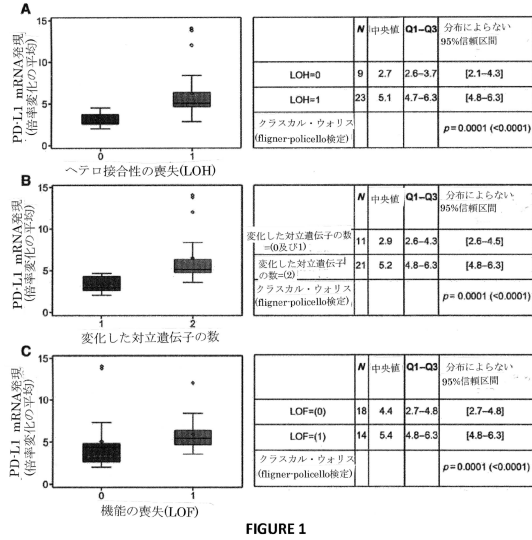
【表 4 B】

M	びまん性 ccRCC	4	3b	野生型	/	/	LOH	1	1	0
M	びまん性 ccRCC	3	2	野生型	/	/	プロモーター 高メチル化	0	1	0
F	びまん性 ccRCC	2	3b	野生型	/	/	プロモーター 高メチル化+LOH	1	2	1
M	VHL-ccRCC	2	1	変異型	3	c.500G>A, p.Arg167Gln	ミスセンス	0	1	0
M	VHL-ccRCC	3	2	変異型	1	c.266T>A, p.Leu89His	ミスセンス	0	1	0
F	VHL-ccRCC	2	1	変異型	1	c.254T>C, p.Leu85Pro	ミスセンス	0	1	0
M	VHL-ccRCC	2	2	変異型	1	c.340+1G>T	スプライス+LOH	1	2	0
F	VHL-ccRCC	2	3b	変異型	2	c.351G>T, p.Trp117Cys	ミスセンス+LOH	1	2	0
F	VHL-ccRCC	2	1	変異型	1	c.266T>C, p.Leu89Pro	ミスセンス+LOH	1	2	0
M	VHL-ccRCC	2	2	変異型	1	c.340+1G>T	スプライス+LOH	1	2	0
M	VHL-ccRCC	3	3a	変異型	1	c.340+1G>T	スプライス+LOH	1	2	0
M	VHL-ccRCC	1	1	変異型	2	del ex2+3	フレームシフト +LOH	1	2	1
M	VHL-ccRCC	3	4	変異型	2	del ex2	フレームシフト +LOH	1	2	1
M	VHL-ccRCC	2	1	変異型	1	c.217C>T, p.Gln73X	停止+LOH	1	2	1

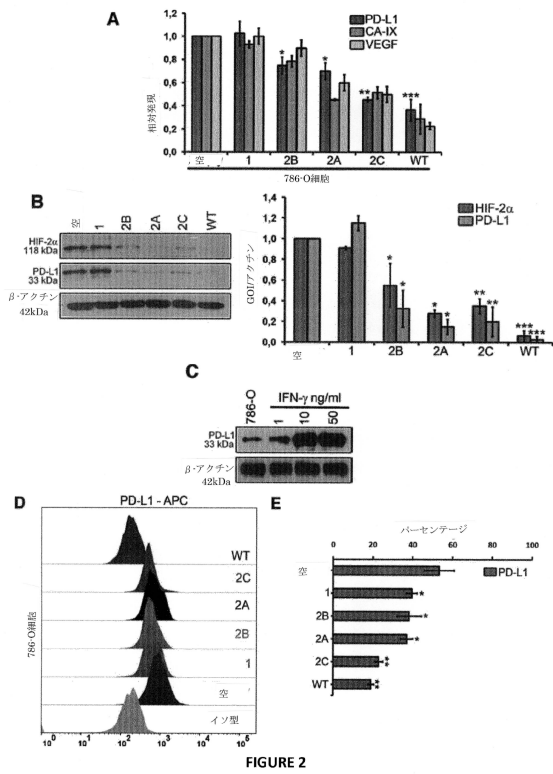
10

20

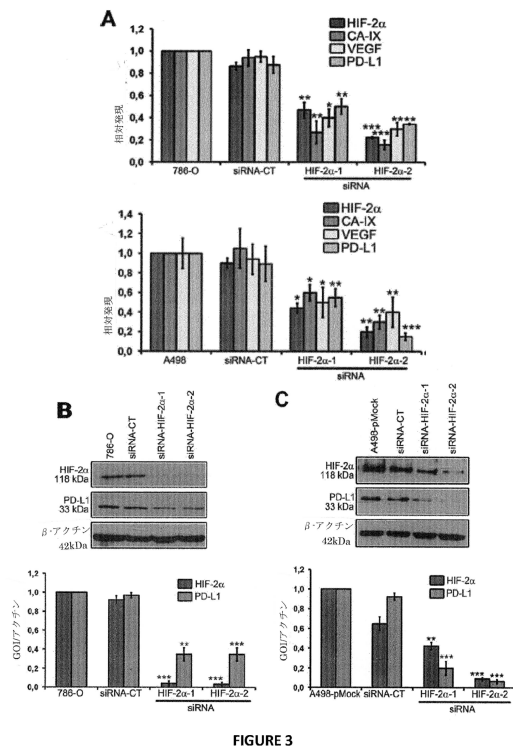
【 図 1 】



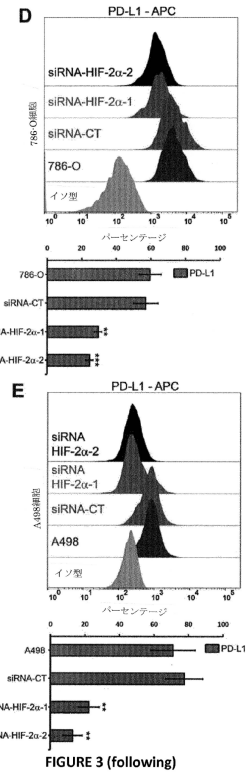
【 図 2 】



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】



【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】

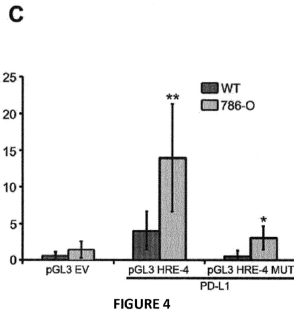
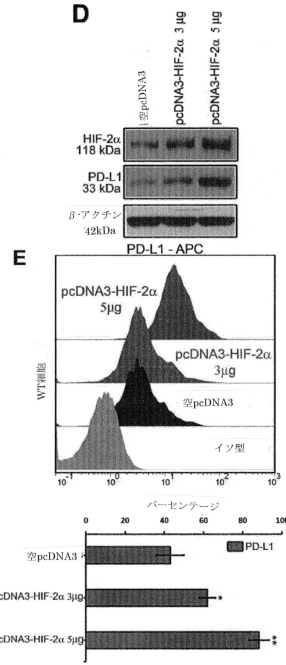
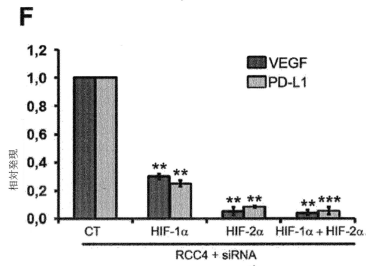


FIGURE 4 (following)

【 図 4 - 3 】



【 図 5 】

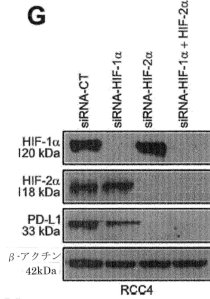
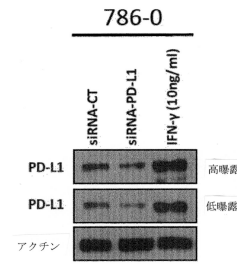


FIGURE 5

FIGURE 4 (following)

【配列表】

0006762363000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 P 35/04	
		C 1 2 N 15/09	Z

(72)発明者 セーラム・シュアイブ
フランス・94805・ビルジュイフ・セデックス・リュ・カミーユ・デスマーラン・39・アン
スティテュ・ギュスターヴ・ルシー・パヴィヨン・ドウ・ルシエルシュ・1

(72)発明者 ユスラ・メサイ
フランス・94805・ビルジュイフ・セデックス・リュ・カミーユ・デスマーラン・39・アン
スティテュ・ギュスターヴ・ルシー・パヴィヨン・ドウ・ルシエルシュ・1

(72)発明者 ムハンマド・ザイーム・ノマン
フランス・94805・ビルジュイフ・セデックス・リュ・カミーユ・デスマーラン・39・アン
スティテュ・ギュスターヴ・ルシー・パヴィヨン・ドウ・ルシエルシュ・1

審査官 中野 あい

- (56)参考文献 特表2015-518826(JP,A)
Noman M. Z., et al., "PD-L1 is a novel direct target of HIF-1, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation.", J Exp Med., 2014 May 5 (Epub 2014 Apr 28.), vol. 211, no. 5, pp. 781-790
Kaelin W. G. Jr, "Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome.", Nat Rev Cancer. 2002 Sep, vol. 2, no. 9, pp. 673-682
Crouzet L., et al., "Wild type VHL clear cell renal cell carcinomas: A distinct morphological and clinical entity with PD-L1 expression.", Journal of Clinical Oncology, 2015 May 20, vol. 33, no. 15_suppl, abstr. no 11053
佐藤悠佑, 「腎がんゲノム解析と治療への展開」, 医学のあゆみ, 2014. 06. 07, vol. 249, no. 10, pp. 1029-1036

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
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 / W P I D S (S T N)