

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6005051号
(P6005051)

(45) 発行日 平成28年10月12日 (2016. 10. 12)

(24) 登録日 平成28年9月16日 (2016. 9. 16)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	W
GO 1 N 33/72 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	K
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	GO 1 N 33/72	Z N A
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00	H
請求項の数 12 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-540324 (P2013-540324)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月22日 (2011. 11. 22)
 (65) 公表番号 特表2014-500493 (P2014-500493A)
 (43) 公表日 平成26年1月9日 (2014. 1. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/070661
 (87) 国際公開番号 W02012/069462
 (87) 国際公開日 平成24年5月31日 (2012. 5. 31)
 審査請求日 平成26年10月23日 (2014. 10. 23)
 (31) 優先権主張番号 61/416, 981
 (32) 優先日 平成22年11月24日 (2010. 11. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 1021289. 2
 (32) 優先日 平成22年12月15日 (2010. 12. 15)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 506258073
 イマティクス バイオテクノロジーズ ゲー
 ーエムペーハー
 ドイツ, 72076 テュービンゲン, パ
 ウルーエンリヒェンシュトラッセ 15
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100152319
 弁理士 曾我 亜紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫療法の転帰を予測する新規バイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がん患者における免疫療法の有益な効果を予測する検査方法であって、
 前記がん患者から得られるサンプル中のアポリポタンパク質A1 (ApoA1) からなるグルー
 プから選択された1つ以上のマーカーレベルを測定する工程、

ここで特定がん患者集団中の前記マーカーの中央値に比べて前記マーカーのレベルが少
 なくとも10%以上高いことが、前記患者の免疫療法の有益な効果を示し、

ここで前記がん患者が、腎細胞癌 (RCC)、大腸癌 (CRC)、胃癌 (GC)、神経膠芽細胞
 腫および前立腺癌からなるグループから選択されるがんを患っており、

ここで前記サンプルは、全血、末梢血、またはそれらの分画、血清、パuffyコート
 、腫瘍細胞、リンパ液、尿、骨髄、EDTA 血漿、ヘパリン血漿、クエン酸血漿、ヘパリン
 全血、および、凍結ヘパリン全血を含む凍結サンプルから選択されるものであって、

ここで前記測定は、免疫アッセイ、ビーズに基づく免疫アッセイ、マルチプレックス免
 疫測定、ELISA、マイクロアレイに基づくアッセイ、非遺伝子アッセイ、発現解析、FACS
 解析、確立された血液学的方法、プロテオミクス、および質量分析からなるグループから
 選択される1つ以上の方法を含むものであって、

ここで前記免疫療法は、抗がんワクチンによるワクチン接種を含むものであって、ここ
 で前記ワクチン接種は、配列 ID 番号1~37のペプチドからなるグループから選択される
 1つ以上の免疫原性ペプチドを含む1つ以上のワクチンであって、および

ここで前記有益な効果は、全生存期間の延長、免疫療法により誘発される単一および/

10

20

または複数の T 細胞応答の発生、腫瘍増殖の抑制、腫瘍の縮小、および無増悪生存期間の延長から選択されるものであること

を含む、がん患者における免疫療法の有益な効果を予測する検査方法。

【請求項 2】

さらに、前記がん患者のサンプル中の B 細胞誘引性キモカイン (CXCL13/BCA-1)、好中球、インターロイキン-6 (IL-6)、および短鎖アシルカルニチンからなるグループから選択される 1 つ以上のマーカーのレベルを測定する工程を含み、ここで特定がん患者集団中の前記マーカーの中央値に比べて前記マーカーのレベルが少なくとも 10% 以上低いことが、前記患者の免疫療法の有益な効果を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ワクチンは、GM-CSFを含むアジュバントを含むものである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

さらに、前記患者から得た前記サンプル中のアルブミンと直接ビリルビンからなるグループから選択された 1 つ以上のマーカーのレベルを測定する工程を含み、ここで特定がん患者集団中の前記マーカーの中央値と比べて前記マーカーのレベルが少なくとも 10% 以上高いことが、前記患者への免疫療法の有益作用を示す、請求項 1 ~ 3 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 5】

さらに、前記がん患者から得た前記サンプル中のインターロイキン-33 (IL-33)を含むマーカーのレベルを測定する工程を含み、ここで特定がん患者集団中の前記マーカーの中央値と比べて前記マーカーのレベルが少なくとも 10% 以上低いことが、前記患者への免疫療法の有益作用を示す、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記患者は手術、放射線療法および/または化学療法により治療されているか該治療をすでに受けているものである方法、又は、前記患者がサイトカインから選択された抗がん剤、ソラフェニブとスニチニブを含むチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI)、及び/もしくはシクロホスファミドにより治療されているか該治療をすでに受けているものである、請求項 1 ~ 5 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 7】

さらに、前記方法に基づく前記患者で前記免疫療法の作用の予測手段を有するものである、請求項 1 ~ 6 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 8】

さらに、前記方法に基づく前記患者で前記効果をモニタリングする工程を有し、1 回以上前記測定ステップを繰り返す工程を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 つ以上のペプチドは、配列 ID 番号 1 ~ 10 からなるグループから選ばれるものである、請求項 1 ~ 8 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 10】

前記 1 つ以上のペプチドは、配列 ID 番号 1、5、8、9、および 11 ~ 19 からなるグループから選ばれるものである、請求項 1 ~ 8 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 11】

前記 1 つ以上のペプチドは、配列 ID 番号 20 ~ 29 からなるグループから選ばれるものである、請求項 1 ~ 8 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 つ以上のペプチドは、配列 ID 番号 30 ~ 37 からなるグループから選ばれるものである、請求項 1 ~ 8 のいずれかーに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明はがん患者の免疫療法の効果を、新たなバイオマーカーに基づき予測する方法に関する。本発明はさらに前記バイオマーカーに基づく転帰の予後に関する。本発明はさらに上記方法で使用するバイオマーカーのパネルに関する。

したがって、出願は 2010 年 12 月 15 日に提出された英国特許 1021289.6、2010 年 11 月 24 日に提出された米国特許 61/416,981、2010 年 12 月 16 日に提出された米国特許 61/423,652 の優先権を請求する。本出願は 50 種の配列を含む配列リストを含む。本発明の目的のため、本明細書で引用されている全ての参考文献が、その全体の参照として組み込まれている。

【背景技術】

【0002】

免疫応答の刺激は、宿主の免疫システムにより異物であると認識された抗原が存在するかに依存する。腫瘍関連および腫瘍特異抗原が存在することが発見され、腫瘍成長に介入するため、宿主の免疫系を利用する可能性が浮上した。体液性免疫応答と細胞性免疫応答の両方を利用する様々なメカニズムが、現在、がんの免疫療法において研究されつつある。

【0003】

細胞性免疫応答のある種の要素は、腫瘍細胞を特異的に認識し破壊することができる。腫瘍浸潤細胞群または末梢血から単離した細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、これらの細胞ががんに対する自然の免疫防御で重要な役割を果たしていることを示唆している (Cheever et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1993 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; *J Immunol.* 1999, 162(2):989-94)。特に、CD 8 陽性 T 細胞 (TCD8+) は、主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子と、細胞質タンパク質または不完全なリボソーム産物 (DRIPS) に由来する、通常 8~10 個のアミノ酸残基のペプチドの複合体を認識し (Schubert U, Ant?n LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink J R. *Nature* 2000; 404(6779):770-774)、この応答に重要な役割を果たしている。ヒトの MHC 分子はヒト白血球抗原 (HLA) とも呼ばれる。

【0004】

MHC 分子には 2 つのクラスがあり、MHC クラス I 分子は、核を有する殆どの細胞にみられ、内因性タンパク質、DRiP、およびより大きなペプチドのタンパク質分解的切断によって生じたペプチドを提示する。MHC クラス II 分子は、主にプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC) に認められ、APC により取り込まれた後プロセッシングされる、外因性タンパク質のペプチドを提示する (Cresswell P. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:259-93)。ペプチドと MHC クラス I 分子の複合体は、適切な TCR (T 細胞受容体) を持つ CD8+ CTL により認識され、ペプチドと MHC クラス II 分子の複合体は、適切な TCR を持つ CD4+ ヘルパー T 細胞により認識される。従って、TCR とペプチドと MHC 分子は 1:1:1 の化学量論量で存在することが良く知られている。

【0005】

ペプチドが細胞性免疫応答を引き起こすには、MHC 分子へ結合が必要である。この過程は MHC 分子の対立遺伝子およびペプチドのアミノ酸配列によって決定される。MHC クラス I 結合ペプチドは通常 8、9、または 10 個のアミノ酸残基長であり、MHC 分子の対応する結合溝と相互作用するペプチドの配列内に保存された残基 (「アンカー」) を持つ。このように、それぞれの MHC 対立遺伝子には、どのペプチドが結合溝と特異的に結合するかを決定する「結合モチーフ」がある (Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S; *MHC Ligands and Peptide Motifs*, Chapman & Hall 1998)。免疫反応を引き出すために、ペプチドはある種の MHC 分子への結合能力が必要なだけでなく、特異な TCR を有する T 細胞によって認識されなければならない。さらに効率のよい免疫反応に必要な条件は抗原に対する免疫耐性がないことである。

【0006】

CTL によって認識されるエピロープが由来する腫瘍関連抗原 (TAA) として、各腫瘍の細胞でアップレギュレートされる、酵素、受容体、転写因子など全クラスのタンパク質の分

10

20

30

40

50

子が可能である。さらに、抗原は、例えば、変異遺伝子の生成物、または代替オープンリーディングフレーム (ORF) から、またはタンパク質スプライシングからの生成物として、腫瘍特異的すなわち、腫瘍細胞に固有となることができる (Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ. *Science* 2004 Apr 23; 304 (5670):587-90.)。もう 1 つ重要なクラスの抗原は、様々な種類の腫瘍および健全な精巣組織に発現される「cancer testis (癌・精巣)」(CT) 抗原など、組織特異的抗原である。

【0007】

そのため、TAA は腫瘍ワクチンの開発における出発点である。TAA の同定 / 特徴付け方法は、患者または健全被験者から単離される CTL の使用に基づくか、または腫瘍と正常組織との転写プロフィールおよびペプチド発現の差の発生に基づいている (Lemmel C., Weik S., Eberle U., Dengjel J., Kratt T., Becker H. D., Rammensee H. G., Stevanovic S. *Nat. Biotechnol.* 2004 Apr.; 22(4):450-4, T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. *Cancer Res*62 (20):5818-5827, 2002.)。

10

【0008】

しかし、過剰発現したまたは腫瘍組織あるいはヒト腫瘍細胞株で選択的に発現した遺伝子を同定しても、対応する抗原が T 細胞に基づく免疫療法に対し有用な標的であると、十分な情報を提供しない。これは、これらの抗原エピトープの個々のサブ集団のみが、対応する TCR を持つ T 細胞により、a) 提示および b) 認識されるためである。さらに、この特定のエピトープに対する免疫耐性が存在しないか無視できることが必要である。それゆえ、MHC 分子と結合した状態で提示され、機能的 T 細胞の標的である、過剰発現または選択的に発現しているタンパクからこれらのペプチドのみを選択することが重要となる。そのような機能的 T 細胞は、特異抗原の刺激によってクローンを増やし、エフェクター機能を行使できる T 細胞として定義される (「エフェクター T 細胞」)。

20

【0009】

ヘルパー T 細胞は、抗腫瘍免疫性において、CTL のエフェクター機能を統合する際に重要な役割を果たす。タイプのヘルパー T 細胞応答を始動させるヘルパー T 細胞エピトープは、腫瘍関連ペプチド / MHC 複合体を細胞表面に発現している腫瘍細胞に対する傷害機能など、CD8+ CTL のエフェクター機能をサポートしている。このようにして、腫瘍関連ヘルパー T 細胞のエピトープは、単独で、または他の腫瘍関連ペプチドと共に、抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の有効薬剤成分とすることができる。

30

【0010】

CD8 と CD4 に依存する両タイプの応答が、抗腫瘍作用に協力して相乗的に貢献するので、CD8+ CTL (リガンド: MHC クラス I 分子 + ペプチドエピトープ) によって認識される TAA および CD4+ T ヘルパー細胞 (リガンド: MHC クラス II 分子 + ペプチドエピトープ) によって認識される TAA の同定と特徴付けの両方が、効果的な腫瘍ワクチンとこれらのワクチンに基づく有効な治療に重要である。

【0011】

ヨーロッパでは、腎細胞癌 (RCC) は男性で 7 番目に多い悪性腫瘍であり、毎年 29,600 症例が新たに発生している (全がん症例の 3.5% を占める)。RCC は女性では 12 番目に多く、毎年 16,700 症例が発生している (全がん症例の 2.3% を占める)。RCC は 40 歳前では希であり、40 歳以上では男性の発生は女性の 2 倍である。年齢ごとの発生率は、40 歳未満では 1 年で 10 万人中 2 人未満でその後急激に上昇し、65~69 歳では 1 年で 10 万人中 38 人となる。その後 75 歳を超えると 1 年で 10 万人中 46 人まで上昇する。

40

【0012】

RCC 患者の合計 25~30% が最初の発現で顕性転移を示す。RCC 患者の約 1/3 は時間経過により転移する。そのため、RCC の全患者の 50~60% 近くが最終的に転移を示す。転移

50

患者間で、約 75% が肺に、36% がリンパ節および/または軟組織に、20% が骨に、18% が肝臓に転移する。

【 0 0 1 3 】

RCC は泌尿生殖腫瘍の最も致死度が高い上皮性悪性腫瘍であり、5 年生存率は 65% で、これに比べ膀胱癌と前立腺癌の 5 年生存率はそれぞれ 82% および 100% である(米国 1972 ~ 2001 年のデータ)。RCC の診断(1990 ~ 1994年)後の 5 年間(最大1999年まで)平均生存率はヨーロッパで約 58% であり、RCC は、数人の著者らにより予後が中等度にしかならないがんとして分類された。

全体で、RCC 患者の 80% 近くが死に至る。この数値は、再発に対する効果的で早期な臨床フォローアップと治療の強い医療的ニーズを示している。

10

【 0 0 1 4 】

生存率は腫瘍と診断された病期に強く依存する。5 年生存率は、遠隔転移の病変を有する患者ではたったの 12% だが、局所癌の患者では 80% である。

【 0 0 1 5 】

大腸(結腸直腸)癌(CRC)は、世界で第 3 番目に一般的ながんである。大腸癌は年間新たに約 100 万症例発生し、他の殆どの腫瘍とは異なり、男性と女性の割合に差があまりない(男女比 1.2:1)。ヨーロッパでは、大腸癌は 2 番目に一般的ながんであり、男女合わせてがん関連死第 2 位であり、毎年約 380,000 症例が新たに発病し、がん関連死は約 200,000 例となっている。2002 年の粗発生率は、男女それぞれ 88.3 および 84.0/100,000 であり、そのうち粗死亡率は 34.8 および 35.2/100,000 であった。これらのデータは、個人的および社会的負担の大きな源として大腸癌の重要性を明かに反映している。

20

【 0 0 1 6 】

大腸癌は疾病発現時の平均年齢が男女それぞれ 69 および 75 歳なので、高齢集団のがんである。食事や生活スタイルの要因に加え(例、肥満、運動不足、喫煙、常習飲酒)、他のリスク要因には、大腸癌の家族性発症、遺伝性大腸癌(家族性腺腫性ポリポーシス [FAP]、弱毒FAP [弱毒大腸腺腫性ポリポーシス; AAPC]、遺伝性非ポリポーシス大腸癌 [HNPCC]、過誤腫性ポリポーシス症候群)および潰瘍性大腸炎またはクローン病などの炎症性腸疾患などがある。

【 0 0 1 7 】

大腸癌は殆ど、直腸、S 形結腸、横行/下行結腸、および上行結腸/盲腸の粘膜の腺腫として発生する。初期の大腸癌は最初の手術で治療する可能性がある。しかし、遠隔転移すると、局所リンパ節、また肝臓、肺、および他の器官(中枢神経系など)に広がる。症状は詳細不明なため、大腸癌は比較的遅い段階で診断されることが多く、大腸癌患者の約 25% が最初に医師の診察を受ける時点で転移している(mCRC)。切除可能な限局性大腸癌と新たに診断された患者のさらに 30% が後に転移性再発を呈する。

30

【 0 0 1 8 】

EP2105740 では、アポリポタンパク質 AI (APOA1) を含む一部のタンパク質は、がんに関与しているまたは罹りやすい被験者において c-myc の過剰発現によって調節されることを報告している。それ故、EP2105740 では、がんの免疫療法はもちろんのこと、治療の有効性の予測ではなく、がん、特に肺癌の診断、予後、および/または治療のモニタリングにおけるバイオマーカー APOA1 の利用について述べている。

40

【 0 0 1 9 】

WO2010/076322は、(i) 腫瘍を 2 つ以上のクラスに分類し、(ii) 腫瘍サンプル中で、各クラスの腫瘍に対する化学療法への奏功を示す 2 つ以上のマーカー遺伝子の発現を決定し、(iii) 前記遺伝子発現に依存して前記奏功および/または利点を予測し、ここで 1 つのマーカー遺伝子は CXCL13 であることを含む、がんに関与した患者の化学療法への奏功および/または化学療法の利点を予測する方法について説明している。WO2010/076322 ではまた、免疫療法はもちろん、治療の有効性の予測については述べていない。

【 0 0 2 0 】

50

同様に、W02010/003773 は、がんに罹った患者におけるがんの転帰の予測方法について記述しており、前記患者はリンパ節転移陽性と以前に診断され、細胞障害性化学療法を受けており、ここで1つのマーカー遺伝子は CXCL13 である。W02010/003773 は、免疫治療の有効性の予測については述べていない。

【0021】

EP 1 777 523 A1 は、患者のがん転帰の予後に関し、この予後は、前記がんに対する前記患者の適応性免疫応答の存在または代わりに応答レベルを示す、1つまた数個の生物学的マーカーの定量化に基づいている。全体としては、非常に多くのマーカーが開示されている。さらに、EP 1 777 523 A1 は、腫瘍部位で前記がんに対する前記患者の適応性免疫応答の存在または代わりに応答レベルを示す、1つまた数個の生物学的マーカーの検出および/または定量化に基づく、患者のがん転帰の予後（予測ではない）に関する。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0022】

【特許文献1】EP2105740

【特許文献2】W02010/076322

【特許文献3】W02010/003773

【特許文献4】EP 1 777 523 A1

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0023】

上述した多くのがん、例えば腎細胞癌および大腸癌のようながんの診断および管理に対する最近の進展にも関わらず、さらに生存率を改善し、必要としている人々の治療をうまく調節するため、診断の改善、特に免疫療法の有益な効果が期待できるか否かの予測達成に使用できる、生物学的マーカーがいまなお必要とされる。さらに、そのマーカーは、がんの前記治療の転帰の予測も可能となる。そのため、本発明の目的は、それぞれの生物学的マーカー、さらに診断、予測、および予後方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0024】

本発明の最初の態様において、前記目的は、a) 前記がん患者のサンプルにおいて、アポリポタンパク質 A1 (ApoA1)、CCL17/TARC、好酸球（絶対数または%）、単球（絶対数または%）、CD95/Fas、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ/血清グルタミン酸オキザル酢酸トランスアミナーゼ (ASAT/SGOT)、がん抗原19-9 (CA19-9)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、トレオニン、免疫グロブリン E (IgE)、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP-3) からなるグループから選択された1つ以上のマーカーのレベルを決定し、ここで、特定のがん患者集団の中央値に比したマーカーレベルの上昇は、前記患者の免疫療法の有益作用を示す工程、または、b) 前記がん患者のサンプルにおいて、CXCL13/BCA-1、好中球(%)、インターロイキン6 (IL-6) および短鎖アシルカルニチンからなるグループから選択された1つ以上のマーカーレベルを決定し、ここで特定がん患者集団の中央値 (+/-10%) に比した概マーカーレベルの低下は、前記患者の免疫療法の有益作用を示す工程を含む、がん患者の免疫療法の効果を予測する方法を提供することにより、解決される。

30

40

【発明を実施するための形態】

【0025】

本実施形態において、本発明は、作用、特に本明細書に記載のがん患者における免疫療法の有益作用、すなわち全生存期間の延長、免疫療法により誘発される単一および/または複数 T 細胞応答の発生、腫瘍増殖の抑制、腫瘍の縮小、または無増悪生存期間の延長などを予測する単変量（「単一」または「個別」）マーカーに関する。

【0026】

本発明の状況下で、用語「マーカー」、「バイオマーカー」、「分析物」、または「パラ

50

マーカ」は同じ意味で使用され、すべて本発明に従う方法の状況下で分析されるマーカーに関する。

【0027】

本発明の状況下において、「予測」または「予測マーカー」は、がんの免疫療法、例えば、本明細書に記載したようなワクチンによる、有効性についての情報を与える、本発明に従うマーカーに基づいていなければならない。

【0028】

CXCL13/BCA-1、ApoA1、好中球、好酸球、単球、CD95/Fas、ASAT/SGOT、CCL17/TARC、短鎖アシルカルニチンおよび CA19-9 は、単変量解析を使用することにより、全生存率、および一部の症例では T 細胞の応答が予測可能であることが確認された。

10

【0029】

本発明の方法が好ましいのは、前記マーカーが ApoA1 および/または CCL17/TARC から選択される場合である。各試験集団の中央値を超える CCL17/TARC レベルおよび各アッセイ提供者によって示されるような中央値を超える ApoA1 レベルは(例、Rules Based Medicine (RBM)では、0.288 mg/ml)、陽性である。

【0030】

本発明の方法が好ましいのは、前記マーカーが CXCL13/BCA-1 および/または単球から選択される場合である。それでもなお、該マーカーの組み合わせは、例えば、ApoA1 および CCL17/TARC、ApoA1 および CXCL13/BCA-1、ApoA1、CXCL13/BCA-1、および単球、ApoA1、CCL17/TARC、CXCL13/BCA-1、および単球、CCL17/TARC および CXCL13/BCA-1、CCL17/TARC、CXCL13/BCA-1、および単球、CCL17/TARC、ApoA1、および単球、CCL17/TARC、ApoA1、および CXCL13/BCA-1、CCL17/TARC および単球、CXCL13/BCA-1 および単球、ApoA1 および単球から選択されるものなど、本発明の範囲に含まれる。これらのマーカーの組み合わせすべてが特に好ましい。

20

【0031】

さらに好ましいマーカーの組み合わせは、CXCL13/BCA-1、好中球 %、ApoA1、好酸球 %、好酸球 ABS (絶対数)、単球 %、FAS、TARCの組み合わせ、LDH、トレオニン、IL-6、アルブミン、IgE、MMP-3、CA19-9の組み合わせ、単球 ABS、ASAT、ビリルビン、アシルカルニチン (scAC)の組み合わせ、および IL-33から選択される。これらのマーカーの組み合わせすべてが特に好ましい。

30

【0032】

ApoA1 は高密度リポタンパク質 (HDL) の主なタンパク質であり、臨床分析において HDL に代わって測定できる。正常の状態では、HDL は抗アテローム性動脈硬化、抗酸化、抗血栓、および抗炎症特性を示す。しかし、慢性の炎症/酸化状態(例、慢性感染症、自己免疫疾患、メタボリックシンドロームおよびがん)では、HDLはこれらの特性を失い、炎症反応を促進する特性を招く。炎症促進生 HDL (piHDL)では、陰性急性期タンパク質である ApoA1 が減少し、陽性急性期タンパク質である血清アミロイド A (SAA) のようなその他のタンパク質が豊富になっている。そのため、ApoA1 レベルが低いと、慢性炎症または酸化状態を示し、次いでがんの発症にを助けることが知られているような状態を促進する可能性がある。ApoA1 レベルの低下は、多くのがんで報告されており、IMA901-202 (第II相)試験コホートの腎細胞癌患者においても観察された。とりわけ、関連タンパク質 ApoA2 は、転移性腎細胞癌の陽性予後因子として説明されており、マウスモデルでは、がん進展の抑制における ApoA1 の機能的関与を示した。それらのがん促進作用に加え、慢性急性期反応と酸化状態は適応性免疫応答を嫌うことも知られている (Haeryfar and Berczi, 2001; Muller et al., 2008; Vallejo et al., 2004)。

40

【0033】

CCL17/TARC はもとは、TH2 細胞を引きつけるケモカインとして分類されていたケモカインであるが、TH1- および TH2-型エフェクタ/メモリ T 細胞、特に皮膚に存在する細胞、CD8+ T細胞、TH17 メモリ T 細胞、NK と NKT 細胞、樹状細胞などのサブセットのような、他の細胞標的も有している。マウスの試験では、腫瘍内 CCL17/TARC 発現は免疫学的

50

拒絶反応を助けることを示した。血清レベルは、このケモカインの主な供給源である、骨髄樹状細胞、マクロファージおよび単球の活性を示す可能性がある。定常状態での樹状細胞による CCL17 の生成は、T 細胞の抗原非依存性応答を始動させるためのユニークな機能の必要条件であることが示された。CCL17/TARC が病理学的に増加し、TH2 活性の増大を示すと考えられる、アトピー性皮膚炎のような状態および一部のその他のアレルギーまたは自己免疫状態に比べ、IMA901-202 試験集団では、CCL17/TARC のレベルは正常範囲内であり、IL-12 および IFN のような TH1 サイトカインで均衡がとられていた。

【0034】

本発明の状況下では、ApoA1 および CCL17/TARC レベルが進行性腎細胞癌患者で認められる中央値よりも高いと、治療の成功に好ましいと考えられる。表示されたカットオフ値（統計学的におよそ75%）を超える因子を1つ以上有する患者は、両因子がカットオフ値未満であることを示す患者に比べ、がんワクチン IMA901（immatics Biotechnologies、ドイツ、チュービンゲン）によるワクチン接種後に臨床転帰の改善が得られると予測される。両因子が表示されたカットオフ値を超える患者（統計学的におよそ25%）は、治療により最も利点が得られることが予測される。ApoA1 に対する LLN（正常下限値）は分析に使用するアッセイに依存する。Luminex 社のビーズを利用したマルチプレックステクノロジー（RBM）を使用すると LLN は 0.288 mg/ml である。異なるアッセイを行い、アッセイ提供者により示される情報から、アッセイを確立されたものと比較して実験を埋めることにより、または健常ドナーサンプルの統計学的に関連する量を測定することにより、LLN は補正されなければならない。特定患者集団における CCL17/TARC および/または ApoA1 レベルの中央値は、定量に使用する集団とアッセイに依存する。

【0035】

該マーカー、特に ApoA1 と CCL17/TARC の好ましい測定法は、ELISA、ビーズ、チップまたはプレートを利用したマルチプレックス免疫測定、プロテオミクスのような免疫学的アッセイから、または質量分析、生物学的アッセイ、電気泳動、免疫比濁法、免疫比濁法、酵素アッセイ、例えば測光法により評価可能な比色法または蛍光分析、および蛍光活性化細胞選別（FACS）に基づく分析法から、選択される。好中球、好酸球、および単球は FACS または他の臨床的に確立された血液学的アッセイによって測定可能である。ApoA1 は、HDL コレステロールによって高く相関しており、そのため HDL コレステロールの測定に使用されるすべての方法によって測定可能である。

【0036】

さらに、B 細胞誘引性ケモカイン 1（CXCL13/BCA-1）が、マーカーとして同定された。CXCL13/BCA-1 は、リンパ系器官でのリンパ球の構築を整理するのに必要のように思われる。レベルの上昇は、一部の腫瘍実体での転移および予後悪化に関連し、おそらく抗腫瘍免疫応答の低下にも関連している。

【0037】

マーカーとしてそのレベルがパーセントおよび絶対数で同定される好酸球は、その作用について矛盾するレポートも出されているが、がんにおいていくつかの対立する役割を果たしている可能性がある。腫瘍への好酸球の動員は、いくつかの症例では明らかに陽性である。GM-CSF 注入部位への好酸球の動員はメラノーマ症例で認められた。

【0038】

単球は、マーカーとして、そのレベルがパーセントおよび絶対数で同定され、炎症部位または GM-CSF 投与部位に動員される。それらは、マクロファージまたは樹状細胞に分化することができ、それ自身が APC として機能することができる。ランゲルハンス細胞のような遊出した組織樹状細胞と交換可能である。一方、単球が多いことは、おそらく活性酸素種（ROS）が生成し、NK と T 細胞が抑制されるという理由から、がんおよび腎細胞癌の IL-2 療法においては負の因子として説明された。

【0039】

可溶性 CD95/Fas は、選択的スプライシングによって生成され、膜に結合した CD95 と競合して CD95L/FasL に結合する。そのため、可溶性 CD95/Fas は、例えば腫瘍部位など

10

20

30

40

50

で、T細胞のアポトーシスを阻害する可能性がある（腫瘍の反撃）。がん細胞の運動性および侵襲性を促進する、CD95シグナリングの非アポトーシス機能を相殺する可能性もある。CD95は、好酸球に関連して、そのアポトーシスを阻害することもある。また一方、CD95は、T細胞によるCD95Lを介した腫瘍の死滅を阻害する。そして、一部の腫瘍実体では、CD95は高い腫瘍負荷と予後悪化に関連する。

【0040】

好中球は、がんにおける既知の陰性予後マーカーである。特に、好中球のリンパ球に対する比率が高いことは、数種のがんにおいて予後不良を示す。ここで、がんの免疫療法での別な負の予測的影響が示唆される。好中球はT細胞とNK細胞を阻害することで、免疫反応を相殺する可能性がある。

10

【0041】

短鎖アシルカルニチンは、糸球体濾過率（GFR）の低下した症例で増加し、血球の腫瘍への移行が減少する可能性がある腎損傷が大きいことを示している（Wanner 1988）。一方、酸可溶性（遊離および短鎖）アシルカルニチンは、対照群に比べがん患者において低下していることが報告された（Sachean 1987）。

【0042】

CA19-9は、シアル化ルイスA構造上のエピトープ、つまりMUC1のようなムチンの糖質抗原である。血清中のCA19-9の有無は腫瘍中のMUC1発現と相関する可能性があり、それ故、ワクチン抗原の1つの存在と相関する可能性がある。これに対し、血清腫瘍マーカーは通常陰性予後マーカーである。

20

【0043】

ASAT/SGOTはアミノ酸代謝に関与する酵素である。LDHの場合のように、血清中での増加は、細胞代謝回転の亢進のインジケータとして働き、これはがん同様、肝臓や他の器官の障害の場合も起こる。我々の結果は、ASAT/SGOTおよびLDHの高値はがんの不良予後因子であることを明かにしているが、予想外にも、免疫療法の転帰に対する正の予測因子であるようにみえることも示している。その理由はまだ不明である。腫瘍内の細胞死滅は、特に壊死状態では、腫瘍部位での免疫反応を助けると推測されることもある。

【0044】

本発明の別の態様では、本発明に従う方法は、さらにc)前記がん患者から得た前記サンプル中のアルブミンと直接ビリルビンからなるグループから選択された1つ以上のマーカーにおいて、特定がん患者集団の中央値（ $\pm 10\%$ ）と比べたレベル増加が前記患者の免疫療法に有益に影響を示すマーカーを測定すること、またはd)前記がん患者から得た前記サンプル中のマーカーインターロイキン-33（IL-33）レベルにおいて、特定がん患者集団の中央値（ $\pm 10\%$ ）と比べたレベルの低下が前記患者の免疫療法に有益な影響を示すレベルを測定することを含む。

30

【0045】

本発明のこの態様において、明示されたマーカーは、本発明の第一の態様において、上述の単変量マーカーをさらに支持するために使用される。そのため、該マーカーは「多変量」マーカーセットまたは診断用パネルを作るために使用される。

【0046】

特に、本発明に従う方法が好ましく、ここで、前記多変量マーカーセットまたはパネルは、マーカーCXCL13/BCA-1、ApoA1、好中球、好酸球（パーセントおよび絶対数）、単球（パーセントおよび絶対数）、CD95/FAS、ASAT/SGOT、CCL17/TARC、LDH、Thr、IL-6、短鎖アシルカルニチン、アルブミン、ビリルビン、IgE、IL-33、MMP-3、およびCA19-9で構成される。

40

【0047】

本発明の目的では、マーカーの基準値は、患者が免疫療法から有益性を得るか否かを定義する各マーカーの閾値である。マーカーは陰性マーカーであるか陽性マーカーであるかによって、基準値に比べた患者のレベルの増加または低下は、有益な免疫療法を示す。基準値は、1つの実施形態で、特定のがん患者集団で観察された濃度の中央値の $\pm 10\%$ であ

50

る。より好ましくは、基準値は、陰性値または陽性値であるかによって、特定がん患者集団の上位 1/4 または下限 1/4、上位 1/5 または下位 1/5、または上位 1/10 または下位 1/10 である。より好ましくは、患者が治療から利点を得ると考えられるまでの陰性マーカーの基準値は、70 パーセントイル、80 パーセントイル、最も好ましくは 90 パーセントイルである。陽性マーカーでは、基準値は、患者が治療から利点を得られる点から開始し、30 パーセントイル、20 パーセントイル、最も好ましくは 10 パーセントイルであることが最も好ましい。

【0048】

本発明の別の重要な態様は、本発明に従う方法に関するものであり、ここで、前記免疫療法は、抗がんワクチンによるワクチン接種、選択的に、例えば GM-CSF のようなアジュバントの併用を有する。

10

【0049】

免疫療法およびそれぞれのワクチンは最新技術として説明され、がん患者の免疫療法は、腫瘍細胞に対抗し、免疫系の細胞、特にいわゆる細胞傷害性 T 細胞 (CTL、「キラー細胞」、CD8+ T 細胞としても知られる) を特異的に活性化することを目的としているが、正常組織は標的としない。腫瘍細胞は腫瘍関連および腫瘍特異性タンパク質が発現しているという点で、正常細胞とは異なる。細胞表面の HLA 分子は外側に向かって細胞内容物の一部を提示するため、CTL は正常細胞と腫瘍細胞を区別することができる。この事実は、細胞内の全てのタンパク質を短いペプチドに分解したことで理解され、この短いペプチドは、その後 HLA 分子に接着し、細胞表面に提示される。腫瘍細胞に提示されるが、正常な体細胞には提示されないか、提示されたとしてもはるかに少ないペプチドは、腫瘍関連ペプチド (TUMAP) と呼ばれる。腫瘍特異的 T 細胞に認識されるエピトープに由来する抗原は、酵素、受容体、転写因子など、あらゆるタンパク質クラスに由来する分子である可能性がある。

20

【0050】

しかし、1 種類の CTL をプライミングしても、通常は全ての腫瘍細胞を除去するには不十分である。腫瘍は非常に変異原性が高いため、タンパク質パターンを変化させ、CTL による認識を逃れることで、CTL の攻撃に急速に反応することができる。腫瘍の回避メカニズムに反撃するため、様々な特異的ペプチドがワクチンに使用されている。このようにして、いくつかの CTL クローンを同時に用い、腫瘍に対して広範囲に同時攻撃を開始することができる。これにより、腫瘍が免疫応答を逃れる可能性を低下させることができる。この仮説は、最近、末期メラノーマ患者を治療した臨床試験で確認された。わずかに例外はあるものの、少なくとも 3 回明確な T 細胞応答が示された患者は、客観的な臨床的奏功または病態安定を示し、生存期間が長くなるが、T 細胞応答が 3 回未満の患者は、大部分が進行性疾患と診断された (Banchereau et al., 2001)。

30

【0051】

本発明法の状況で使用される好ましい治療/薬剤組成物は、ペプチド系腫瘍ワクチンである。他の好ましい薬剤は、例えば Weideらが述べたような DNA または RNA 系ワクチン (Weide B, Garbe C, Rammensee HG, Pascolo S. Immunol Lett. 2008 Jan 15;115(1):33-42. Epub 2007 Oct 26)、樹状細胞系ワクチン、原発性腫瘍細胞または細胞株の溶解物を使ったワクチン、または全タンパク質または熱ショックタンパク質を含む腫瘍細胞の選択的成分などである。薬剤は直接患者、つまり患部の器官、または全身に i.d.、i.m.、s.c.、i.p.、p.o. および i.v. 投与するか、または、その後患者に投与される患者またはヒト細胞株に由来の細胞に ex vivo で適用するか、あるいは in vitro で使用して、その後患者に再投与される患者由来の免疫細胞の亜集団を選択する。ワクチン抗原、例えばペプチドは本質的に純粋であるか、免疫刺激アジュバントと併用されるか、または免疫刺激的サイトカインと併用される、あるいはリポソームなど適当な送達システムにより投与される。ペプチドはまた、キーホールリンペットヘモシアニン (HLH) またはマンナンなどの適切なキャリアに結合させることもできる (WO 95/18145 および Longenecker et al (1993) 参照)。ペプチドはまた標識化され、あるいは融合タンパク質とするか、ハイブリ

40

50

ッド分子とすることもできる。その配列が本発明で与えられるペプチドは、CD4+ または CD8+ T 細胞を刺激することが期待される。しかしながら、CD4+ T ヘルパー細胞が提供する補助があると、CD+ 8 CTL の刺激はより効率的になる。したがって、CD8CTL を刺激する MHC クラス I エピトープに対し、融合パートナーまたはハイブリッド分子のセクションは、CD4+ T 細胞を刺激するエピトープを適切に提供する。CD4+ 刺激エピトープは、該分野でよく知られており、破傷風トキソイドで確認されたものを含む。さらに好ましい実施形態では、ペプチドは融合タンパク質であり、特に HLA-DR 抗原関連不変鎖 (Ii) の N-末端アミノ酸からなる。1 つの実施形態では、本発明のペプチドは、欠失型ヒトタンパク質またはタンパク質フラグメントの融合タンパク質であり、ヒトの一部に 1 つ以上の本発明のアミノ酸配列を含むならば、別のポリペプチドの一部である。

10

【 0 0 5 2 】

使用に当たって該ワクチンは、1 個または複数のアジュバントを含む。好ましいアジュバントはイミキモド、レシキモド、GM-CSF、シクロホスファミド、スニチニブ、ペバシズマブ、インターフェロン、CpG オリゴヌクレオチドと誘導体、poly-(I:C) および誘導体、RNA、シルデナフィル、および PLG またはビロソームの粒子製剤である。述べたように、この薬剤は、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内などの非経口投与、または経口投与に用いられる。このため、ペプチドおよび任意選択の他の分子は、薬剤的に認容可能な、好ましくは水性担体に溶解または懸濁される。更に、前記組成物は緩衝剤、結合剤、爆破剤、希釈剤、香料、潤滑剤などの賦形剤を含むこともできる。前記ペプチドは、サイトカインなどの免疫刺激物質と併用投与することもできる。そのような組成物に使用できる賦形剤の広範なリストは、例えば A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed. 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press などから引用することができる。前記組成物は、例えば腎細胞癌や大腸癌のような、がん疾患の予防、阻止および/または治療に利用することができる。本発明の状況下で使用されるワクチンの典型的なペプチドの組み合わせを、下表 1A から 1D にリストし、それぞれ IMA901、IMA910、IMA941、IMA950 として示す。

20

【 0 0 5 3 】

表 1A IMA901 (例、腎細胞癌に使用)

【表 1 A】

配列 ID 番号:	略号	タンパク質	配列
1	MMP-001	マトリックスメタロプロテアーゼ 7	SQDDIKGIQKLYGKRS
2	ADF-002	アジポフィリン	VMAGDIYSV
3	ADF-001	アジポフィリン	SVASTITGV
4	APO-001	アポリポプロテイン L1	ALADGVQKV
5	CCN-001	サイクリン D1	LLGATCMFV
6	GUC-001	GUCY1A3	SVFAGVVG
7	K67-001	KLAA0367	ALFDGDPHL
8	MET-001	c-met がん原遺伝子	YVDPVITSI
9	MUC-001	MUC1	STAPPVHNV
10	RGS-001	RGS 5	LAALPHSCL

30

40

【 0 0 5 4 】

表 1B IMA910 (例、大腸癌に使用)

【表 1 B】

配列 ID 番号:	略号	配列
11	C20-001	ALSNLEVTL
12	NOX-001	ILAPVILYI
13	ODC-001	ILDQKINEV
14	PCN-001	KLMDLDVEQL
15	TGFBI-001	ALFVRLLALA
16	TOP-001	KIFDEILVNA
17	TGFBI-004	TPPIDAHTRNLLRNH
18	CEA-006	SPQYSWRINGIPQQHT
5	CCN-001	LLGATCMFV
9	MUC-001	STAPPVHNV
1	MMP-001	SQDDIKGIQKLYGKRS
19	CEA-004	YLSGANLNL
8	MET-001	YVDPVITSI

10

【 0 0 5 5 】

表 1C IMA941 (例、胃癌に使用)

【表 1 C】

配列 ID 番号	ペプチド ID	配列
20	CDC2-001	LYQILQGIVF
21	ASPM-002	SYNPLWLRI
22	UCHL5-001	NYLPFIMEL
23	MET-006	SYIDVLPEF
24	PROM1-001	SYIIDPLNL
25	UQCRB-001	YYNAAGFNKL
26	MST1R-001	NYLLYVSNF
27	PPAP2C-001	AYLVYTDRL
28	SMC4-001	HYKPTPLYF
29	MMP11-001	VWSDVTPLTF

20

30

【 0 0 5 6 】

表 1D IMA950 (例、神経膠芽細胞腫に使用)

【表 1 D】

配列 ID 番号	ペプチド ID	配列
30	CSP-001	TMLARLASA
31	FABP7-001	LTFGDVVAV
32	NLGN4X-001	NLDTLMTYV
33	TNC-001	AMTQLLAGV
34	NRCAM-001	GLWHHQTEV
35	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
36	BCA-002	ALWAWPSEL
37	MET-005	TFSYVDPVITSISPKYG

40

【 0 0 5 7 】

表 1E IMA990a (例、前立腺癌に使用)

【表 1 E】

配列 ID 番号	ペプチド ID	配列
38	PSA-001	FLTPKKLQCV
39	PSA-002	KLQCVDLHV
40	PSA-003	VISNDVCAQV*
41	PSCA-001	ALQPGTALL*
42	PSCA-002	AILALLPAL
43	PSMA-001	LLHETDSAV*
44	PSMA-002	ALFDIESKV
45	サービピン-004	ELTLGEFLKL
46	サービピン-005	TLPPAWQPFL
47	TRP-P8-001	GLMKYIGEV
48	PROSTEIN-001	CLAAGITYV
49	PSMA-001	NYTLRVDCPLMYSL
50	サービピン-001	TLGEFLKDRERAKN

* 選択的に除外

10

20

【 0 0 5 8 】

そのため、本発明に従う方法の好ましい別の態様において、前記抗がんワクチンは、例えば、配列 ID 番号 1~10、配列 ID 番号 11~19 と 1、5、8、および 9、配列 ID 番号 20~29、さらに配列 ID 番号 30~37 を有する配列 ID 番号 1~37のグループから選択される 1 つ以上の免疫原性ペプチドからなる抗がんワクチンから選ばれる。

【 0 0 5 9 】

本発明に従う方法の別の態様において、前記患者は治療を受けるか、前治療を受けている。そのような前治療には、例えば、治癒的手術、放射線療法および/または化学療法を含んでもよい。好ましい前治療は、サイトカインから選択された抗がん剤、およびソラフェニブとスニチニブおよびシクロホスファミドのようなチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) による治療である。本態様では、前記がん治療は、上述の療法から選択でき、好ましくは免疫療法であり、好ましくは抗がんワクチンの使用、選択的に GM-CSF の併用も可能である。

30

【 0 0 6 0 】

治療するがんは、免疫療法に応答するすべてのがんが可能であり、好ましくは、腎細胞癌、大腸癌、胃癌 (GC)、メラノーマ、非小細胞肺癌 (NSCLC)、神経膠芽細胞腫および一般的にすべてのタイプの腺癌である。

【 0 0 6 1 】

本発明の状況で分析されるサンプルは、全血、末梢血、またはその分画、血清、buffy coat、腫瘍細胞、リンパ液、尿、骨髄、EDTA 血漿、ヘパリン添加血漿、クエン酸血漿、ヘパリン添加全血、および凍結ヘパリン添加全血から選択可能である。分析されるサンプルの選択肢も、分析しようとしているマーカーに依存し、従って当業者は適切なサンプルを選択できる。

40

【 0 0 6 2 】

本発明の好ましい実施形態において、本発明に従う方法はさらに、患者のがん免疫療法作用の予後を含み、ここで、前記患者は好ましくはシクロホスファミドですでに (上述のように) 前治療されている。本発明の状況では、「予後」または「予後マーカー」は、例えばタキソール、プラチナ化合物、およびがん化学療法で使用される他の一般的な薬剤のような、日常的または一般的な化学療法的がん治療に基づく作用について情報を与える、本明細書で述べたようなマーカーに基づくべきである。予後作用は全生存率、免疫療法に対

50

する単一および/または複数の T 細胞応答の発現、腫瘍増殖の抑制、または無増悪生存率から選択可能である。従って、本発明のマーカ-は、予測的および予後的使用の「混合」シナリオとして使用できる。

【0063】

本発明の別の態様において、本発明に従う方法はさらに、1 回以上本明細書で開示したような、測定ステップ a) および/または b) および選択的に c) および/または d) を繰り返すことからなる、前記がん治療法の前記がん患者への作用をモニタリングすることを含む。通常、モニタリングは治療中、毎週、隔週、またはさらに毎月など定期的間隔で実施される。

【0064】

好ましくは本発明に従う方法であって、ここで前記測定は、免疫アッセイ、ビーズに基づく免疫アッセイ、マルチプレックス免疫測定、ELISA、マイクロアレイに基づくアッセイ、非遺伝子アッセイ、発現解析、FACS 解析、質量分析、臨床血液学的方法、および電気泳動、免役比ろう法、免疫比濁法、酵素アッセイ、比色法または蛍光アッセイのような他の日常的臨床分析法から選択される 1 つ以上の方法を含む。これらのすべての方法は当業者によく知られており、文献に記載されている。

【0065】

本発明のさらに別の好ましい態様は、1 つまたは別々の容器内で、本明細書で記載の本発明に従う方法を実施するための材料からなり、好ましくは、(i) ApoA1、CCL17/TARC、Fas、ASAT/SGOT、CA19-9、LDH、IgE、マトリックスメタロプロテイナーゼ 3 (MMP-3)、CXCL 13/BCA-1、好中球、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-33 (IL-33)、アルブミン、およびビリルビンに特異的な 1 つ以上のマーカ-特異抗体からなり、選択的に (i) 前記方法の実施方法も有する、診断キットに関する。

【0066】

キットはさらに、(i) 緩衝液、(ii) 希釈剤、(iii) フィルタ、(iv) 針もしくは(v) 注射器を 1 つまたは複数を含んでもよい。容器は好ましくはボトル、バイアル、シリンジ、または試験管、さらに多目的容器であってもよい。容器はガラスもしくはプラスチックのような様々な材料から形成される。好ましくは、前記キットおよび/または容器は、再溶解および/または使用の方法を示す、容器あるいはその容器に関連する説明書を含む。例えば、凍結乾燥調製物が、ELISA のような上記方法に最適な、ある種の抗体濃度に再溶解されていることを、ラベルで示してもよい。

【0067】

本発明のさらに別の好ましい態様は、a) 上述のような本発明に従う方法の実施、および b) ステップ a) で得た結果に基づく前記がん患者への最適な抗がん免疫治療薬の投与、c) 選択的にステップ a) と b) の繰り返しからなる、必要としているがん患者でがんを治療する改善方法に関する。

【0068】

本発明のこれらの治療法の態様において、本発明に従う方法は、がんの治療法、特にがんの免疫療法の改善された治療オプションを提供するために使用される。本発明に従う方法は、がんの免疫学的治療法の必要性和効果に関する、予測的または予測的で予後的な追加の早期情報を提供し、よって前記がんのさらなる治療に関するより詳細な決定を可能にする。従って、好ましくは上述に従う方法であり、さらに前記患者の前記がん治療の効果をモニターし、1 回以上前記測定ステップを繰り返すことを含む。

【0069】

上述したように、上述の免疫療法ワクチンに加え、好ましい治療または前治療は、サイトカイン、ソラフェニブ、スニチニブ、シクロホスファミド、およびチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) から選択される抗がん剤から選ばれる。治療されるがんは、免疫療法に奏功するすべてのがんであり、好ましくは、腎細胞癌 (RCC)、大腸癌 (CRC)、胃癌 (GC)、メラノーマ、非小細胞肺癌 (NSCLC)、神経膠芽細胞腫および腺癌から選ばれる。

【0070】

本明細書で公表および報告された本発明の特徴は、明示された各々の組み合わせで使用されるだけでなく、本発明で意図する範囲から逸脱せずに、単一の方法で使用することもできる。

【0071】

本発明では、配列リストに関してはここに示す例でより詳細に説明している。以下の例は説明の目的のみで提供され、本発明を限定する意図はない。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1-1】図1は、全患者とサブグループの全生存率に対する (A) ApoA1、(B) CXCL13/BCA-1、(C) 単球 および (D) CCL17/TARCの影響についての Kaplan-Meier 法による解析を示す。各パラメータで、上図は全患者の生存率の高値（赤線）と低値（緑線）パラメータを示す。下図は、高値パラメータを示す患者（赤線と青線）と低値パラメータを示す患者（緑線と黄線）のサブグループ解析（+CYと-CY）を示す。

10

【図1-2】同上

【図2-1】図2Aは、-CY（灰色）と+CY（黒色）グループについて図に示すように、単変量バイオマーカー ApoA1、CXCL13/BCA-1、単球 および CCL17/TARC の値の分布を示しており、T細胞応答（なし）、単一ペプチド応答（1回）、または複数ペプチド応答（>1回）はいずれも示していない。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。図2Bは、-CY（灰色）と+CY（黒色）グループの患者における多変量バイオマーカー値の分布を別の方法で描いた図で、T細胞応答なし（なし）、単一ペプチド応答（1回）、または複数ペプチド応答（>1回）のいずれかを示している。点は単一値を、線は平均値を表す。

20

【図2-2】同上

【図2-3】同上

【図3】図3は、全患者とサブグループにおける ApoA1 と CCL17/TARC の組み合わせの全生存率に対する影響の Kaplan-Meier 法による解析を示す。A) では、バイオマーカー陽性集団は2つのパラメータの少なくとも1つが正の範囲に入る（スコア=1または2）患者からなると定義され、一方バイオマーカー陰性患者は正の範囲内にパラメータは見られない（スコア=0）。B) では、バイオマーカー陽性集団は、両パラメータが正の範囲内（スコア=2）にある患者のみからなると定義され、一方、少なくとも1つのパラメータが負の範囲（スコア=0または1）にある患者はバイオマーカー陰性と考えられた。上図はバイオマーカー陽性の全患者（緑線）とバイオマーカー陰性の全患者（赤線）の生存率の比較を示す。下図はバイオマーカー陽性患者（緑線と黄線）とバイオマーカー陰性患者（赤線と青線）のサブグループ解析（+CYと-CY）を示す。

30

【図4】図4Aは、-CY（灰色）と+CY（黒色）グループの患者における ApoA1 と CCL17/TARC の組み合わせからなるマーカーの平均値を示し、T細胞応答なし（なし）、単一ペプチド応答（1回）、または複数ペプチド応答（>1回）のいずれかを示している。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。図4Bは、-CY（灰色）と+CY（黒色）グループの患者における2成分バイオマーカー値の分布を別の方法で描いた図で、T細胞応答なし（なし）、単一ペプチド応答（1回）、または複数ペプチド応答（>1回）のいずれかを示している。点は単一値を、線は平均値を表す。

40

【図5】図5は、全生存率に対する多変量バイオマーカーの影響の Kaplan-Meier 法による解析を示す。上図は全患者の生存率の高値（赤線）と低値（緑線）パラメータを示す。下図は、高値パラメータを示す患者（赤線と青線）と低値パラメータを示す患者（緑線と黄線）のサブグループ解析（+CYと-CY）を示す。0.019076043 ポイントの値がバイオマーカーの高値と低値を分けるカットオフ値として使用された。

【図6】図6Aは、-CY（灰色）と+CY（黒色）グループの患者における多変量バイオマーカー値の平均値を示し、T細胞応答なし（なし）、単一ペプチド応答（1回）、または複数ペプチド応答（>1回）のいずれかを示している。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。図6Bは、-CY（灰色）と+CY（黒色）グループの患者における多変量バイオマーカー値の分布を別の方法で描いた図で、T細胞応答なし（なし）、単一ペプチド応答（1

50

回)、または複数ペプチド応答 (>1回) のいずれかを示している。点は単一値を、線は平均値を表す。

【 0 0 7 3 】

配列 ID 番号 1~50 は、上述の表 1A~1E でリストしたペプチドのアミノ酸配列を示す。

【表 2】

多変量バイオマーカー	HR およびログランク p 値			
	ApoA1	CXCL13/B CA-1	単球	CCL17/TARC
バイオマーカー陽性と陰性				
+CY グループ、 バイオマーカー陽性と陰性	0.3 (0.017)	0.25 (0.004)	0.24 (0.001)	0.18 (0.003)
-CY グループ、 バイオマーカー陽性と陰性	0.6 (0.253)	0.7 (0.448)	0.93 (0.874)	0.67 (0.392)
バイオマーカー陽性グループ、 +CY 群と -CY 群	0.36 (0.061)	0.35 (0.051)	0.29 (0.014)	0.22 (0.017)
バイオマーカー陰性グループ、 +CY 群と -CY 群	0.84 (0.696)	1.07 (0.876)	1.31 (0.538)	0.85 (0.715)
相互作用	0.43 (0.24)	0.3271 (0.13)	0.22 (0.03)	0.26 (0.094)
値が高/低ければパラメータは 好ましい	高い	低い	高い	高い
カットオフ	0.264 mg/ml (中央値)	64.21 pg/ml (中央値)	7.7% (中央値)	161.99 pg/ml (中央値)

10

20

【 0 0 7 4 】

表 2 は、全患者および +/-CY サブグループにおける単変量バイオマーカーによる全生存期間予測のハザード比 (HR) およびログランク p 値 (Cox 比例ハザード比)、バイオマーカー陽性および陰性患者内のシクロホスファミド前治療の効果の HR およびログランク p 値、さらにシクロホスファミド前治療によるバイオマーカーの相互作用を示す。

30

【表 3】

p 値 (ウェルチ検定)	ApoA1	CXCL13/BCA- 1	単球	CCL17/TARC
全患者、応答者	0.016	0.28	0.24	0.032
全患者、複数ペプチド応答者	0.000074	0.031	0.34	0.0028
+CY グループ、応答者	0.014	0.064	0.0021	0.013
+CY グループ、複数ペプチド応答者	0.42	0.29	0.37	0.53
-CY グループ、応答者	0.034	0.15	0.065	0.017
-CY グループ、複数ペプチド応答者	0.00014	0.13	0.73	0.068
値が高/低ければパラメータは好ましい	高い	低い	高い	高い

40

【 0 0 7 5 】

表 3 は、全患者および +/-CY サブグループにおいて選択したパラメータによる T 細

50

胞応答および複数ペプチド T 細胞応答の予測に対する統計学的単変量解析(ウェルチ検定)

により計算された p 値を示す。

【表 4】

多変量バイオマーカー(OSCY_CHEAP_UNIF_20)	HR (95% CI) およびログランク p 値
全患者、 バイオマーカー陽性と陰性	0.47; P=0.041
+CY グループ、 バイオマーカー陽性と陰性	0.07; P=0.000008
-CY グループ、 バイオマーカー陽性と陰性	1.58; P=0.203
バイオマーカー陽性グループ、 +CY 群と -CY 群	0.08 (0.02-0.38); P=0.000135
バイオマーカー陰性グループ、 +CY 群と -CY 群	2.5 (0.95-6.58); P=0.055
相互作用	0.032 (0.0055-0.1863); P=0.000128
値が高/低ければパラメータは好ましい	高い
カットオフ	0.019076043 ポイント

10

20

【 0 0 7 6 】

表 4 は、全患者および +/-CY サブグループにおける多変量バイオマーカーによる全生存期間の予測に対するハザード比 (HR) およびログランク p 値、バイオマーカー陽性および陰性患者内のシクロホスファミド前治療の効果に対する HR およびログランク p 値、さらにシクロホスファミド前治療によるバイオマーカーの相互作用を示す。

【実施例】

【 0 0 7 7 】

1. はじめに

IMA901 は、腎細胞癌で認められるペプチド MHC 複合体に対する特異的 T 細胞反応を誘導するためにデザインされたペプチド系ワクチンである。IMA901-202 (第 II 相) 試験は、単変量および多変量解析を使用して、転移性腎細胞癌患者への IMA901 投与による、免疫応答誘導および全生存期間の延長を成功させるための予測バイオマーカーとして、単独または組み合わせて機能するパラメータを同定した。

30

【 0 0 7 8 】

これを達成するために、IMA901-202 (第 II 相) 試験集団の前治療サンプルを使って、約 450 種のパラメータ (患者または腫瘍関連パラメータ、血清および尿中で測定した分析物および細胞パラメータ) を解析した。数個のパラメータセットを選択した多変量解析では、末梢血単球 (PBMC) の調製を必要としたこれらのパラメータは、今後の臨床試験の測定費用を制限するために含まれなかった。全生存率と T 細胞応答の関係についてパラメータが解析された。

40

【 0 0 7 9 】

IMA901 投与はシクロホスファミド前治療後の全生存率に非常によい効果を示し、また +CY 群でのみ免疫応答の提示が全生存率の改善に関連したので、+CY 群は試験の実薬群として考え、対照としての -Cy 群と比較した。従って、シクロホスファミド前治療と相互作用を示し、および/または -CY 群より +CY 群で全生存率の改善を予測したパラメータを選択した。そのため、当然ながら、両群で全生存率との関連を示すと思われる、純粋な予後マーカーの選択は避けた。

【 0 0 8 0 】

50

2. 試験患者および年齢のマッチした健常ドナーの比較

治療前レベルの健常ドナーとの比較では、70歳未満の intention-to-treat (ITT) 患者のみを選択し最年長健常対照ドナーとマッチさせた。得られた患者 (N=52) と健常ドナー (N=22) 群を年齢、性別、および CMV (サイトメガロウイルス) 血清反応陽性から補正した。

【0081】

3. 材料と方法

サンプルの採取

すべてのサンプルは、+CY 群ではワクチン接種 3 日前でシクロホスファミド投与直前、またはワクチン接種の直前で、いずれかの治療試験介入前に採取した。血清サンプルは血清/ゲルVACUTAINER (Becton Dickinson、5 ml) を使用して採取し、逆さまにして最低 30 分間インキュベートした。サンプルチューブを 1200 x g 以上で 15 分間遠心分離し、血清 (約 2 ml) を NUNC クライオチューブ (3.6 ml) に移した。クライオチューブは、直ちに -20°C とし測定まで保存した血液学的パラメータ分析用の EDTA 血液は、3 ml EDTA-VACUTAINER に採取され、遠心分離せずに、分析まで室温で保存した。尿は、ワクチン接種前直前に採取した。試験紙による検査は、新鮮な尿だけに実施した。凝固分析用クエン酸血漿は、ワクチン接種約 2 週間前に採取した。サンプルはクエン酸 VACUTAINER を使って採取し、室温で 1200 x g 以上 30 分以内で遠心分離した。上澄み血漿はマイクロチューブへ移した。

【0082】

測定

バイオマーカーの測定法には、ELISA、マルチプレックス免疫測定、非遺伝子アッセイ、質量分析、FACS 分析、ルーティンな血液臨床検査、臨床化学分析および尿分析、および他の方法が含まれた。最終的に選択したパラメータを、RBM (ApoA1、CD95/FAS、IL-6、I gE、MMP-3、CA19-9)、Millipore (CXCL13/BCA-1、CCL17/TARC、IL-33) の提供によるマルチプレックス測定、および Biocrates (トレオニン、短鎖アシルカルニチン) により提供された質量分析により測定した。さらにパラメータは、中央研究室により提供され、ルーティンな血液検査方法 (好中球、好酸球、単球) および臨床化学分析 (ASAT/SGOT、LDH、アルブミン、ビリルビン) によって測定された。

【0083】

T 細胞応答の評価

全生存率に加え、1 つまたは複数の T 細胞応答の発現とバイオマーカーとの関連を試験する必要があったので、ELISPOT アッセイおよび各ペプチド MHC 複合体によるテトラマー染色により、特異的 T 細胞応答をワクチン接種前後に数回測定した。

【0084】

統計学的単変量解析:

パラメータの T 細胞応答との関連性はウェルチ検定を使って評価した。全患者および/または +CY 群内の T 細胞応答に対する予測的パラメータは $p < 0.05$ で有意と考えられた。

【0085】

パラメータと CY 前治療との相互作用は、Cox 比例ハザードモデルによって評価した。分布の末端ではない (すなわち、約 5% を超える患者を選択または非選択)、いずれかのカットオフ値における p 値 < 0.05 の相互作用を示す対象者は興味深いと考えられた。

【0086】

好ましくないバイオマーカーグループで、シクロホスファミド前治療と全生存率が逆相関することから、有意な相互作用を有するパラメータを除外する目的で、別の基準がバイオマーカー陽性グループにおいて全生存率と有意な相関 ($p < 0.05$) を示した。-CY 群ではなく、+CY 群で、全生存率との有意な ($p < 0.05$) 相関は、パラメータの予後的な質に代わり、予測的な質に関する別のヒントになると考えられた。

【0087】

10

20

30

40

50

さらに、パラメータの選択基準は、その生物学、およびシクロホスファミド前治療との相互作用パターンの維持、およびTKI 前治療を行った患者やサイトカイン前治療を行った患者のような患者のサブグループで、 -CY 群ではなく +CY群における全生存率との相関に基づいていた。

【 0 0 8 8 】

パラメータ間の相関が計算された。残るセットで他の要因と高く相関したパラメータ (p 値 < 0.005 で補正) は除外した。

【 0 0 8 9 】

これらのステップを使って単一パラメータを同定した後、これらのパラメータの組み合わせが、全生存率と T 細胞応答の予測に関して、および上述の患者サブグループの安定性 10
に対してベストな結果を示すか否か、およびどのパラメータの組合せがベストの結果を示すかを試験した。

【 0 0 9 0 】

統計学的多変量解析：

多変量バイオマーカーは、Cox 比例ハザードモデルに従って決定され、その特性と拡張は以下に説明されている。

【 0 0 9 1 】

すべてのパラメータは一般化された線形モデルの共変量として考慮されたが、小単位で表示されるパラメータへの過度の影響を避けるために、ゼロ平均と単位の分散 (「標準化された」パラメータ) に直線的に変換された。PBMC 単離を必要としなかったパラメータの 20
みを含め、このセットの測定費用を制限した。相当する最大部分尤度の問題が未決定であったため、すなわちパラメータ数が患者数を超えたため、最適バイオマーカーにおける各パラメータの相対的影響を制限するガウス分布を事前に使って、モデルを拡大した。相当する最大事後確率 (MAP) の最適化も、最大尤度法を超えて結果の予測的实施 (「規則化」) を改善することが知られている。モデルは、考慮したパラメータのサブセットのみ使用するように最適化を導く、ラプラス分布を事前に使ってさらに拡大した。この方法により、バイオマーカーに含まれるパラメータ数は 20 個に限定した。

さらに多変量バイオマーカーが -CY 群で予測されないか、またはこれらの患者に対する予測が少なくとも +CY 群よりも低いことが望ましかった。これを達成するために、予測 30
モデルは -CY 群で繰り返して最適化され、さらに、本質的に予測不可能な方向のみが残るまで、得られる方向はパラメータスペースから予想した。次いで、バイオマーカー自体は、+CY 群のパラメータの残りのサブスペースで決定した。バイオマーカーの予測度の正確性を評価するため、全体の最適化プロセスは、leave-one-out 法 (標本群から1つの事例だけを抜き出す方法) を適用した。全患者の予測は、収集し次いで既知生存時間と比較した方法で算出した。

【 0 0 9 2 】

結果：多変量解析

パラメータの選択

試験した約 450 個のパラメータのうち、59 個は全患者および/または +CY 群患者で T 40
細胞応答の発現を有意に予測した。118 個のパラメータは、最適なカットオフ値でシクロホスファミド前治療と有意な相互反応を示した。T 細胞応答予測に関する上述の基準、シクロホスファミド前治療との相互作用、-CY 群より +CY 群において全生存率と相関が良いこと、他のパラメータとの冗長性はないこと、および妥当な生物学的論理性の存在を利用し、4 つのパラメータ (ApoA1、CXCL13/BCA-1、単球および CCL17/TARC) を好ましい単変量バイオマーカーの候補として同定することができる。

【 0 0 9 3 】

カットオフ値の定義

上述のように同定した 4 つの各パラメータについて、 IMA901 投与により有意に異なる転帰を示した 2 つのグループ (バイオマーカー陽性または陰性) に患者を分け、個別の 50

カットオフ値が定義された。パラメータとして、カットオフ値の選択が必要であったが、個別ではなく連続的な全生存率および T 細胞応答との相関を、治療を行うか行わないかの決定に使用すべきである。この理由により、適切なカットオフ値は a) 十分な患者数および b) 客観性が必要である。

【 0 0 9 4 】

50% を超える IMA901-202 投与患者が病理学的なレベル低下を示した ApoA1 の場合、カットオフ値は、アッセイ提供者 (RBM, 0.288 mg/ml) が示すように健常ドナーにおいて測定された LLN となるように選択され、正常範囲内の ApoA1 レベルを有する患者をバイオマーカー陽性グループとして同定した。このカットオフ値は IMA901-202 試験患者の中央値 (0.264 mg/ml) に近かった。従って、このカットオフ値の客観性は最大であり、ApoA1 の生物学的論理性に関連している。代わって、ApoA1 についてもこの中央値が使用された。その他のパラメータの大部分は、IMA901-202 患者における正常範囲内であった。これらのパラメータでは、試験集団の中央値が、客観的であり十分な患者数 (50%) を含んでいるので、カットオフ値として選択された。

10

【 0 0 9 5 】

1 つの単変量バイオマーカーによる全生存率と T 細胞応答の予測

Cox 比例ハザード解析は、全患者およびシクロホスファミドで前治療した患者サブグループにおいて、単変量解析により選択された 4 つすべてのパラメータが全生存率を有意に予測することを示したが、シクロホスファミド前治療を受けなかったサブグループでは全生存率を予測しなかった (表 2、図 1)。バイオマーカー陽性グループでは、バイオマーカー値の各カットオフ値によって定義されたように、シクロホスファミド前治療は全生存率への良好な効果を有意に示し ($p < 0.05$) (CCL17/TARC、単球)、または全生存率に良好な効果を持つ傾向を有意に ($p < 0.1$) (ApoA1, CXCL13/BCA-1) 示した。相互作用解析は、シクロホスファミド前治療の効果が、正または負の単球レベルと分類された患者において有意に異なる ($p < 0.05$) ことを示した。CCL17/TARC は、シクロホスファミド前治療と相互作用する傾向を示した。ApoA1 および CXCL13/BCA-1 は、選択したカットオフ値において有意には到達しなかった。

20

【 0 0 9 6 】

とりわけ、+CY 群では、患者を CCL17/TARC レベルで分類すると、最良のハザード比 (表 2、HR=0.18、 $p=0.003$) が得られる可能性がある。反対に、CCL17/TARC 陽性患者はシクロホスファミド前治療の恩恵を最も受けた (表 2、HR=0.22、 $p=0.017$)。

30

【 0 0 9 7 】

CCL17/TARC は、75% の CCL17/TARC 陽性シクロホスファミド前治療患者が、試験の最後まで生存していたという事実を考慮に入れると例外的でもあった。

【 0 0 9 8 】

全生存率の予測について観察されたパターンは、TKI またはサイトカインで前治療した患者のサブ集団で安定性を保った (データは示されていない)。

【 0 0 9 9 】

T 細胞応答予測に関連して、CCL17/TARC と ApoA1 は最良な結果を与え、両方とも全患者および +CY と -CY サブグループにおける応答者を有意に予測し、さらに全患者における複数ペプチド応答者を予測した。これに反して、CXCL13/BCA-1 と単球は弱い応答の予測因子であった (表 3)。

40

【 0 1 0 0 】

5. 結果：多変量解析

パラメータの選択

IMA901 治療で -CY 群よりも +CY 群でうまく全生存率を予測する 20 個のパラメータを有するバイオマーカーセットが、全患者集団について計算された。それらは、サイトカイン、ケモカインおよび他の血清で測定可能なタンパク質、標準的血液学的アッセイで測定可能な細胞パラメータ、および質量分析で測定可能な代謝パラメータを含む。全患者の最適化 (トレーニング用) の他に、バイオマーカーセットは、leave-one-out 交差検証 (検

50

定用)によって計算された。後半の解析は、フォローアップ試験の結果のロバスト性を与えているので、より関連性がある。これらの実験結果が示すデータは検定結果を提示している。

【表 5】

体重	順位	パラメータ名	
-47.3867	1	CXCL13/BCA-1	
38.38821	2	ApoA1	
-38.1861	3	好中球(%)	
34.36199	4	好酸球(%)	
34.10915	5	単球(%)	10
33.89069	6	CD95/FAS	
32.72272	7	ASAT/SGOT	
32.01683	8	CCL17/TARC	
31.7325	9	LDH	
31.47377	10	トレオニン	
-31.3839	11	IL-6	
-31.2785	12	短鎖アシルカルニチン	
30.83843	13	アルブミン	
30.78772	14	好酸球(絶対数)	20
29.57142	15	単球(絶対数)	
28.89882	16	ビリルビン(直接型)	
28.63935	17	IgE	
-27.8701	18	IL-33	
27.72058	19	MMP-3	
27.204	20	CA19-9	

【0101】

表 5 は、20 個のパラメータを含む多変量バイオマーカーに含まれるパラメータ、およびセットで相対的重要性を示す体重と順位を示す。

【0102】

各患者のバイオマーカー値は、含まれる 20 個のパラメータに対する測定値の一次結合である。この式で定因数は、バイオマーカー分布の中央値がゼロに近くなるような方法で選択された。この方法で計算されたバイオマーカー値は、IMA901-202 患者集団でほぼ正規分布し、さらにこれらの値は +CY 群と -CY 群の患者間で均等に分布した。

【0103】

多変量パラメータセットによる全生存率と T 細胞応答の予測

バイオマーカーの予測力を証明するために、バイオマーカーの値に従って 2 グループの患者をさらに分割して生存解析を実施した。全患者集団に対するバイオマーカーの密度分布の中央値がカットオフとして選択され、このカットオフ値を超える値を有する患者の 50% はバイオマーカー陽性グループに含まれる。+CY 群の患者において、バイオマーカー陽性患者はワクチン接種から非常に有意な恩恵を受けたが、-CY 群では該バイオマーカーは効果を示さなかった。その逆も同じで、バイオマーカー陽性グループで、シクロホスファミドの前治療は有意に高い生存率を与え、一方、バイオマーカー陰性グループではその効果は有意ではないか、(傾向として)逆の効果でさえあった(表 4、図 5)。それに応じて、多変量バイオマーカーとシクロホスファミド前治療の間に非常に有意な相互作用があった。

【0104】

バイオマーカーは免疫応答を予測するように最適化されていなかったが、発明者はバイオマーカーの分布が同様に T 細胞応答の有無に関連しているか否かを試験した。事実、応

答者および複数ペプチド応答者グループ、特に +CY 群の患者でバイオマーカー値が高い傾向があった(図 6)。

【 0 1 0 5 】

パラメータの組み合わせによる全生存率と T 細胞応答の予測

単一パラメータは、その組み合わせに含まれる全パラメータの値に依存して、患者がバイオマーカースコアに割り当てられる方法によって組み合わせることができる。2 つのパラメータを組み合わせる場合、各パラメータはそのカットオフ値に従って正または負になる可能性があり、患者は結びつけられたマーカーについて 2 (両パラメータが正)、1(1 つのパラメータが正)または 0 (正のパラメータなし) のバイオマーカースコアを有する可能性がある。

10

【 0 1 0 6 】

バイオマーカースコアを計算するためにいくつかのパラメータを組み合わせることは、いくつかの理由から好ましいことがある。第一にその組み合わせは、a) パラメータが転帰と連続的に相関するにも関わらず、カットオフ値が一定である問題が幾分か克服される、b) 外れた測定値の影響が軽減される、および c) より多数のパラメータにより、抗がん免疫力に関連する可能性のある多数の生物学的プロセスの洞察が可能になるので、より大きいロバスト性が得られる。第二に、スコアモデルにより、患者選択に関する柔軟性を高くすることができる。目的のカットオフとして中央値を持つ単一パラメータでは、治療に選択される患者は必然的にたった 50% になるであろう一方、2 つのパラメータスコア(分布の中央値で単一パラメータのカットオフで)では患者は 3 つのグループに分けられる。陽性マーカーのない(例、バイオマーカースコアがゼロ)患者のみ除外すれば、約 75% の患者が治療グループに含まれることになるうしかし、このグループで有意に達しない場合、治療グループのバイオマーカースコアが 2 を示す約 25% の患者を残し、スコアが 0 および 1 の患者を除外できる。

20

【 0 1 0 7 】

これらの理由から、上述の同定した単一パラメータの組み合わせが、全生存率と T 細胞応答の予測についてより良い結果を導くか否かを試験した。さらに、上に示した患者サブ集団の作用の安定性を評価した。マーカーのいくつかの組み合わせは、これらの点について単一パラメータを使用した場合を上回り、そのベストは、ApoA1 と CCL17/TARC の組み合わせであった(図 3、図 4)。

30

【 0 1 0 8 】

6. マーカーレベル :

6.1 ApoA1 の血清レベル

【表 6】

条件	出典	ApoA1 [mg/ml]; 範囲または平均 +/-STD
健常対照	(Riesen. 2008)	1.0-1.5
	製造者(RBM)	0.288-1.17
IMA901-202 試験	範囲(中央値)	0.0808-0.514 (0.264)
	平均 +/-STD	0.27 +/- 0.09

40

【 0 1 0 9 】

6.2 CCL17/TARC の血清レベル

【表 7】

条件	出典	TARC [pg/ml]; 範囲または平均 +/-STD	
健常対照	(Shimada et al., 2004)	200	+/- 100
	(Fujii et al., 2004)	101	+/- 81
	(Sugawara et al., 2002)	31.9	+/- 14.8
	(Sekiya et al., 2002)	88.8	+/- 58.2
	(Echigo et al., 2006)	93.3	+/- 25.3
	(Saeki and Tamaki, 2006)	215.34	+/-26.79
アトピー性皮膚炎	(Leung et al., 2003)	1125-3070	(1469)
	(Shimada et al., 2004)	96400	+/- 38100
	(Sugawara et al., 2002)	325	+/-287
	(Saeki and Tamaki, 2006)	2338.7	+/-301.83
喘息	(Sugawara et al., 2002)	271	+/- 264
	(Sekiya et al., 2002)	192.0	+/- 143.6
アレルギー性鼻炎	(Sugawara et al., 2002)	147	+/- 101
全身性硬化症	(Fujii et al., 2004)	313	+/- 294
皮膚筋炎		262	+/- 291
SLE		254	+/- 326
IMA901-202 試験		範囲(中央値)	25.5-623
	平均 +/-STD	174	+/- 118

10

20

【0110】

6.3 BCA-1 の血清レベル

【表 8】

条件	出典	BCA-1 [pg/ml]; 範囲または平均 +/-STD	
健常対照	(Panse et al., 2008)	~40	
	(Sansomno et al., 2008)	48.2	+/-11.0
疾患	(Panse et al., 2008)、乳癌	~80	
	(Sansomno et al., 2008)、混合凍結グロブリン血の有無に関わらない HCV 感染患者	273.6 113.9	+/-98; +/-40.2
	IMA901-202 試験	範囲(中央値)	13.09-1429.6 (64.21)
	平均 +/-STD	114.23	+/- 196.98

30

【0111】

6.4 好中球レベル(% および絶対数)

40

【表 9】

条件	出典	好中球 ; 範囲または平均 +/-STD
健常対照	LKF Kiel 研究所、ドイツ	34-71 %: 1.5-6.2 x 10 ⁹ /L
疾患	(Rashid et al., 2010)、食道癌	58-71 %
	(Donskov et al., 2006)、腎細胞癌	2.6-15.9 x 10 ⁹ /L
IMA901-202 試験	範囲 (中央値)	47-86.9 (67.3) %: 2.18-10.39 (4.44) x 10 ⁹ /L
	平均 +/-STD	68.05 +/-8.2 %: 4.88 +/-1.86 x 10 ⁹ /L

10

【 0 1 1 2 】

6.5 好酸球レベル (% および絶対数)

【表 1 0】

条件	出典	好酸球 ; 範囲または平均 +/-STD
健常対照	LKF Kiel 研究所、ドイツ	0-7 %: 0.04-0.6 x 10 ⁹ /L
	(Simon and Simon, 2007)	0-0.4 x 10 ⁹ /L
疾患	(Moroni et al., 2000)、腎細胞癌	0.15 +/-0.1 x 10 ⁹ /L
IMA901-202 試験	範囲 (中央値)	0.2-6.5 (2) %: 0.02-0.55 (0.12) x 10 ⁹ /L
	平均 +/-STD	2.35 +/-1.62 %: 0.16 +/-0.13 x 10 ⁹ /L

20

【 0 1 1 3 】

6.6 単球レベル (% および絶対数)

【表 1 1】

条件	出典	単球 ; 範囲または平均 +/-STD
健常対照	LKF Kiel 研究所、ドイツ	4-13 %: 0.2-0.9 x 10 ⁹ /L
疾患	(Sasaki et al., 2006)、肝細胞癌	0.03-1.04 x 10 ⁹ /L
	(Donskov et al., 2006)、腎細胞癌	0.69-0.74 x 10 ⁹ /L
IMA901-202 試験	範囲 (中央値)	3.1-17.7 (7.6) %: 0.2-1.31 (0.48) x 10 ⁹ /L
	平均 +/-STD	8.19 +/-3.15 %: 0.57 +/-0.25 x 10 ⁹ /L

30

【 0 1 1 4 】

6.7 可溶性 CD95/FAS の血清レベル

【表 1 2】

条件	出典	CD95/FAS [ng/ml]; 範囲または平均 +/-STD
IMA901-202 試験	範囲 (中央値)	4.09-20.4 (9.89)
	平均 +/-STD	9.76 +/-3.06

40

【 0 1 1 5 】

6.8 ASAT/SGOT の血清レベル

50

【表 1 3】

条件	出典	ASAT/SGOT [U/L]; 範囲または平均 +/-STD	
健常対照	LKF Kiel	12-35.4	
IMA901-202 試験	範囲 (中央値)	14-109	(23.5)
	平均 +/-STD	27.9	+/-17.3

【 0 1 1 6 】

6.9 LDH の血清レベル

10

【表 1 4】

条件	出典	LDH [U/L]; 範囲または平均 +/-STD	
健常対照	LKF Kiel	129-230	
IMA901-202 試験	範囲 (中央値)	94-734	(161.5)
	平均 +/-STD	190.63	+/-98.97

【 0 1 1 7 】

6.10 トレオニンの血清レベル

20

【表 1 5】

トレオニン 最小/最大: 21 - 157 μ M

トレオニン 平均/標準偏差: 84.5 +/- 24.1 μ M

中央値: 82 μ M

【 0 1 1 8 】

6.11 アルブミン の血清レベル

【表 1 6】

病的状態での正常血清範囲と偏差

検査値: アルブミン 35-50 g/l (3.5-5 g/dl)

30

標準偏差

	平均	(l.val_flo	最小	最大	中央値	
パラメータ	(l.val_float)	単位	(l.val_float)	(l.val_float)	(l.val_float)	
アルブミン血	39.95	G/L	4.39	26	48	41

【 0 1 1 9 】

6.12 直接ビリルビンのレベル

40

【表 1 7】

検査値: 0 - 5.1 μ M

IMA-901 試験の血清範囲:

最小/最大: 0.5 - 4.4 μ M (21個の明確な値)

平均/標準偏差: 2.0 - 0.89 μ M

中央値: 1.7 μ M

【 0 1 2 0 】

6.13 MMP-3 のレベル

50

【表 1 8】

IMA-901 試験の範囲:

最小/最大: 1.85 - 41.2 ng/ml ml (3 例のみ17 ng/ml を上回る;58 個の離散値)

平均/標準偏差: 8.5 +/- 6.0 ng/ml

中央値: 6.7 ng/ml

正常血清範囲: 製造者による範囲: 0.2 - 2.17 ng/ml

【 0 1 2 1】

6.14 CA19-9 レベル

【表 1 9】

10

高い血清範囲 (提供者)	パラメータ	平均	単位	標準 偏差	最 小	最大	中央 値	計測 数
52	CA_19-9	15.63	U/ml	29.73	0	167	5.94	45

【 0 1 2 2】

6.15 IgE レベル

【表 2 0】

20

パラメータ	平均 (l.val_float)	単位	標準偏 差 (l.val_flo at)	最小 (l.val_flo at)	最大 (l.val_float)	中央値 (l.val_float)
IgE	104.09	ng/ml	261.00	0	1362	22.5

提供者(RBM): 正常値最大 606 ng/ml IgE

【 0 1 2 3】

6.16 IL-6 レベル

【表 2 1】

30

パラメータ	平均 (l.val_float)	単位	標準偏差 (l.val_float)	最小 (l.val_float)	最大 (l.val_float)	中央値 (l.val_float)
IL-6	16.32	pg/ml	67.65	0	532	2.86

提供者(RBM): 正常最大値 42.6 pg/ml IL-6

【 0 1 2 4】

6.17 IL-33 レベル

【表 2 2】

40

パラメータ	平均 (l.val_floa t)	単位	標準偏 差 (l.val_flo at)	最小 (l.val_flo at)	最大 (l.val_flo at)	中央値 (l.val_float)
IL-33	166.95	pg/ml	293.28	55.0672	1867	75.73

n.a. 正常範囲

【 0 1 2 5】

引用文献

50

【 0 1 2 6 】

- Donskov F, Hokland M, Marcussen N, Torp Madsen HH, von der MH (2006). Monocytes and neutrophils as 'bad guys' for the outcome of interleukin-2 with and without histamine in metastatic renal cell carcinoma--results from a randomised phase II trial. *Br. J Cancer* 94, 218-226.
- Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Sato S (2006). Both Th1 and Th2 chemokines are elevated in sera of patients with autoimmune blistering diseases. *Arch. Dermatol. Res* 298, 38-45. 10
- Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S (2004). Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol. Sci.* 35, 43-51.
- Haeryfar SM, Berczi I (2001). The thymus and the acute phase response. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 47, 145-156.
- Leung TF, Ma KC, Hon KL, Lam CW, Wan H, Li CY, Chan IH (2003). Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 14, 296-301. 20
- Moroni M, Porta C, De AM, Quaglini S, Cattabiani MA, Buzio C (2000). Eosinophils and C4 predict clinical failure of combination immunotherapy with very low dose subcutaneous interleukin-2 and interferon in renal cell carcinoma patients. *Hematologica* 85, 298-303.
- Muller AJ, Sharma MD, Chandler PR, Duhadaway JB, Everhart ME, Johnson BA, III, Kahler DJ, Pihkala J, Soler AP, Munn DH, Prendergast GC, Mellor AL (2008). Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 17073-17078. 30
- Panse J, Friedrichs K, Marx A, Hildebrandt Y, Luetkens T, Barrels K, Horn C, Stahl T, Cao Y, Milde-Langosch K, Niendorf A, Kroger N, Wenzel S, Leuwer R, Bokemeyer C, Hegewisch-Becker S, Atanackovic D (2008). Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients. *Br. J Cancer* 99, 930-938.
- Rashid F, Waraich N, Bhatti I, Saha S, Khan RN, Ahmed J, Leeder PC, Larvin M, Iftikhar SY (2010). A pre-operative elevated neutrophil: lymphocyte ratio does not predict survival from oesophageal cancer resection. *World J Surg Oncol* 8, 1. 40
- Riesen, WF (2008). Fettstoffwechsel, Referenzbereich. In *Labor und Diagnose*, L. Thomas, ed. (Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH), p. 236.
- Saeki H, Tamaki K (2006). Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol. Sci.* 43, 75-84.
- Sansonno D, Tucci FA, Troiani L, Lauletta G, Montrone M, Conteduca V, Sansonno L 50

, Dammacco F (2008). Increased serum levels of the chemokine CXCL13 and up-regulation of its gene expression are distinctive features of HCV-related cryoglobulinemia and correlate with active cutaneous vasculitis. *Blood* 112, 1620-1627.

Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Kitano S (2006). Prognostic value of preoperative peripheral blood monocyte count in patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery* 139, 755-764.

Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, Sano Y, Morita A, Matsushima K, Hirai K (2002). Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy* 57, 173-177. 10

Shimada Y, Takehara K, Sato S (2004). Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol. Sci.* 34, 201-208.

Simon D, Simon HU (2007). Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1291-1300. 20

Su F, Kozak KR, Imaizumi S, Gao F, Amneus MW, Grijalva V, Ng C, Wagner A, Hough G, Farias-Eisner G, Anantharamaiah GM, Van Lenten BJ, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST, Farias-Eisner R (2010). Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Sugawara N, Yamashita T, Ote Y, Miura M, Terada N, Kurosawa M (2002). TARC in allergic disease. *Allergy* 57, 180-181.

Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ (2004). T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol. Med* 10, 119-124. 30

Vermaat JS, van dT, I, Mehra N, Sleijfer S, Haanen JB, Roodhart JM, Engwegen JY, Korse CM, Langenberg MH, Kruit W, Groenewegen G, Giles RH, Schellens JH, Beijnen JH, Voest EE (2010). Two-protein signature of novel serological markers apolipoprotein-A2 and serum amyloid alpha predicts prognosis in patients with metastatic renal cell cancer and improves the currently used prognostic survival models. *Ann Oncol* 21, 1472-1481. 40

Wanner, C., P. Schollmeyer, and W. H. Horl. 1988. Serum carnitine levels and carnitine esters of patients after kidney transplantation: role of immunosuppression. *Metabolism* 37:263-267.

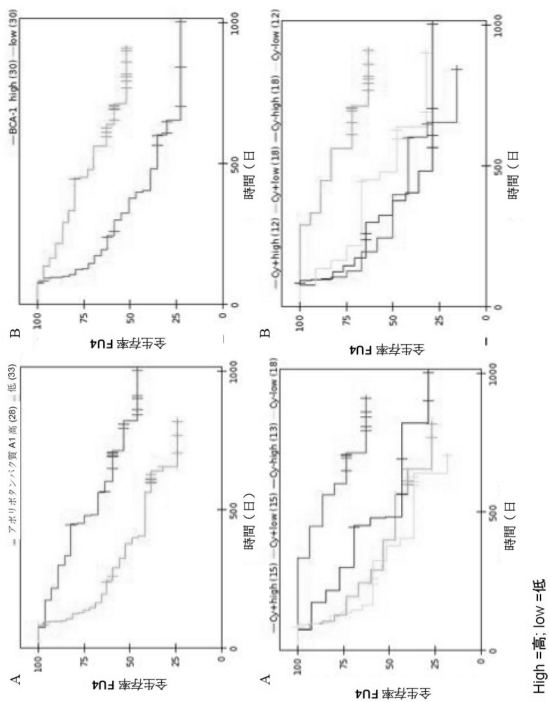
Longenecker, B. M., M. Reddish, R. Koganty, and G. D. MacLean. 1993. Immune responses of mice and human breast cancer patients following immunization with synthetic sialyl-Tn conjugated to KLH plus detox adjuvant. *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690:276-291.

Sachan, D. S. and W. L. Dodson. 1987. The serum carnitine status of cancer patients 50

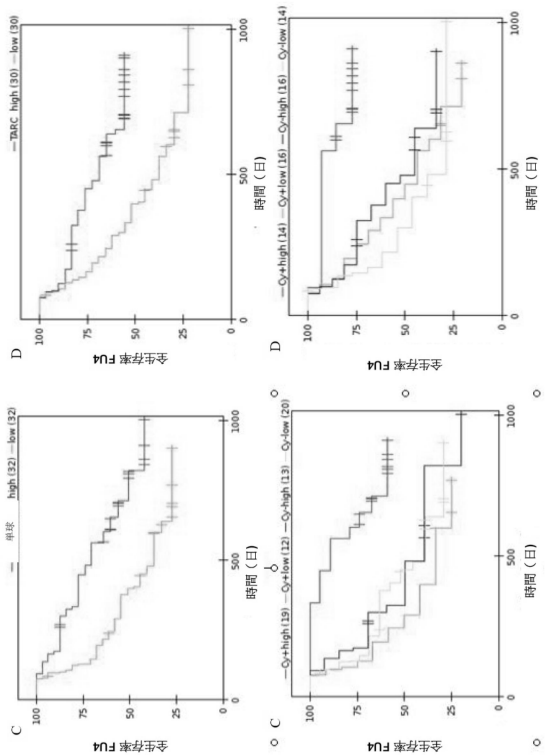
nts. J Am Coll.Nutr. 6:145-150.

Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolla nd, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinma n, and J. Fay. 2001a. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. Cancer Res. 61:64 51-6458.

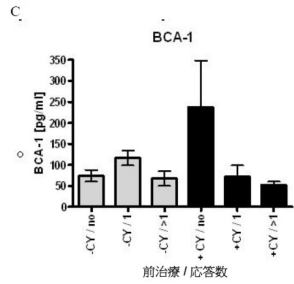
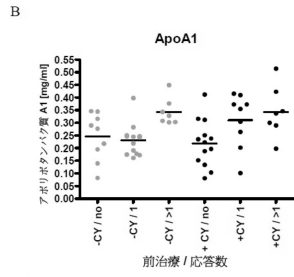
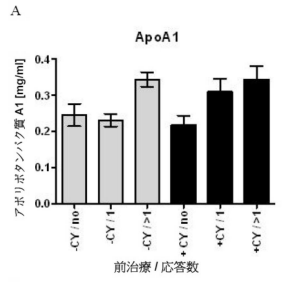
【 図 1 - 1 】



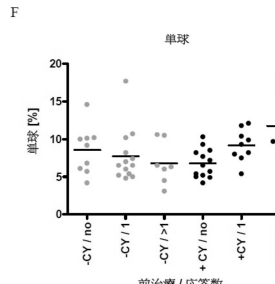
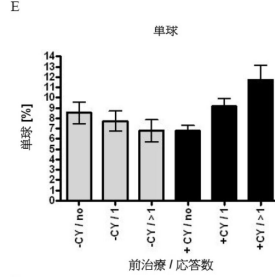
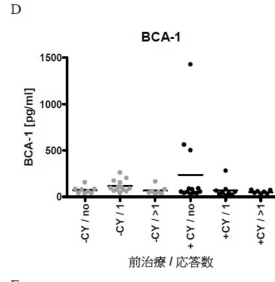
【 図 1 - 2 】



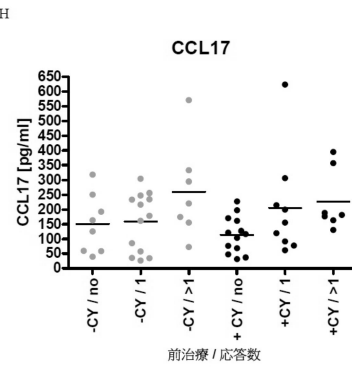
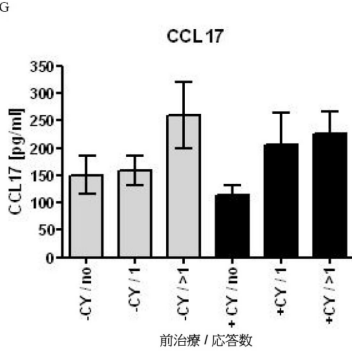
【図 2 - 1】



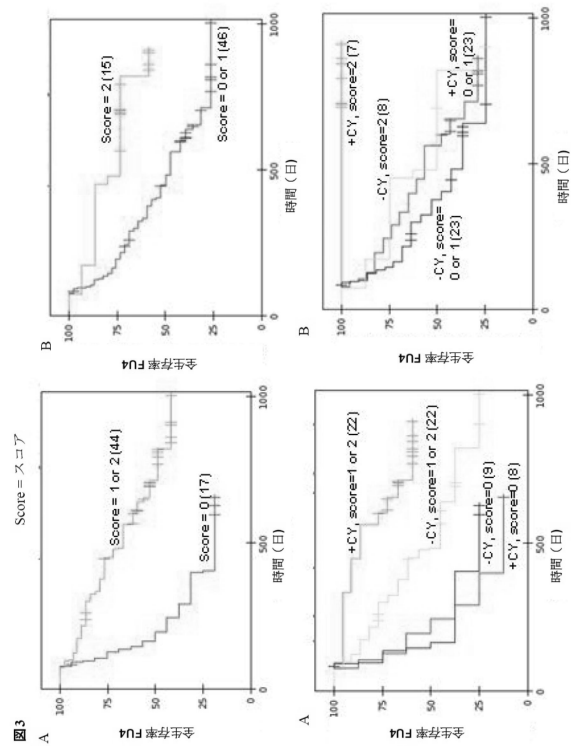
【図 2 - 2】



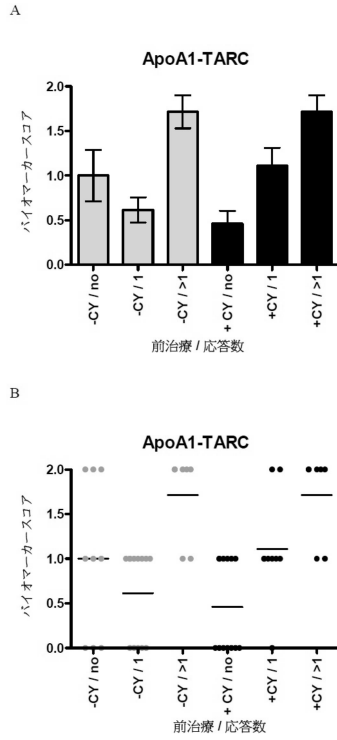
【図 2 - 3】



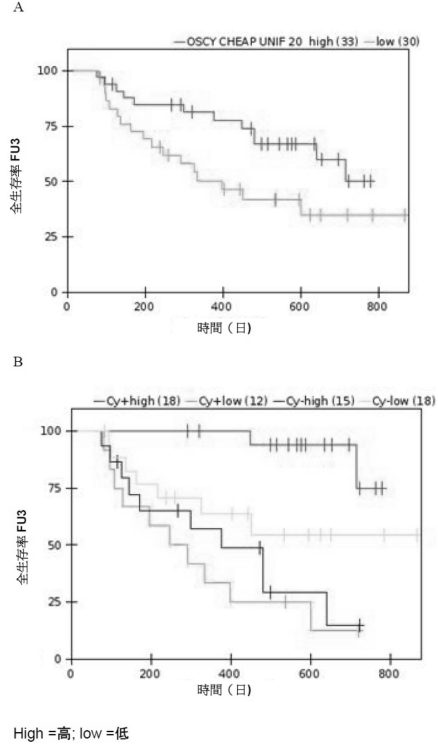
【図 3】



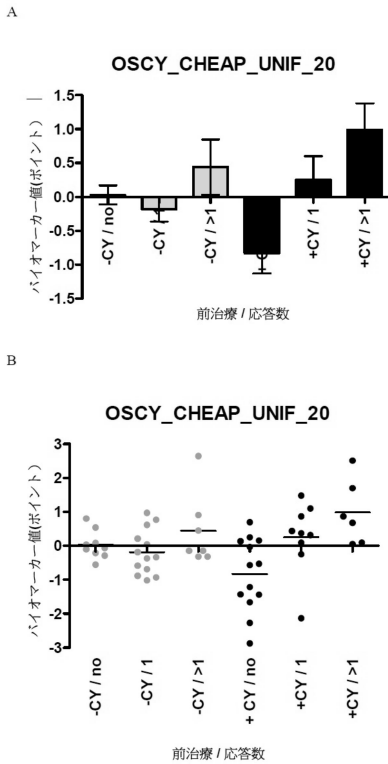
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

0006005051000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 37/04

(31)優先権主張番号 61/423,652

(32)優先日 平成22年12月16日(2010.12.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ヴァインシェンク, トニ
 ドイツ, 7 3 7 7 3 アイヒヴァルト, イム モルゲンレイン 1 5

(72)発明者 シン, ハーブリート
 ドイツ, 7 2 0 7 2 テューピンゲン, バイ デン プファーアデストーレン 9

(72)発明者 フリツチェ, イェンス
 ドイツ, 7 2 0 7 6 テューピンゲン, イム ションブリック 4 8

(72)発明者 メア, アンドレア
 ドイツ, 7 2 0 7 6 テューピンゲン, キルシェンウエーク 2 2

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0086570(US, A1)

国際公開第2009/037454(WO, A2)

特表2009-515167(JP, A)

特表2010-534627(JP, A)

特開平11-344495(JP, A)

特表2009-534691(JP, A)

Cornforth AN、外4名、Increases in serum TARC/CCL17 levels are associated with progression-free survival in advanced melanoma patients in response to dendritic cell-based immunotherapy. , J Clin Immunol. , 2009年, Vol.29, No.5, Page.657-664

Walter S等、Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival , Nat Med. , 2012年, Vol.18, No.8, Page.1254-1261

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

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 (S T N)

P u b M e d

专利名称(译)	新型生物标志物预测免疫疗法的结果		
公开(公告)号	JP6005051B2	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	JP2013540324	申请日	2011-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	伊玛提克斯生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	Imatikusu生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Imatikusu生物技术有限公司		
[标]发明人	ヴァインシエンクトニ シンハープリート フリッチェイエンス メアアンドレア		
发明人	ヴァインシエンク,トニ シン,ハープリート フリッチェ,イエンス メア,アンドレア		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/72 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/04		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/57488 G01N2333/523 G01N2333/775 G01N2800/52 G01N33/5011		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.W G01N33/53.K G01N33/72.ZNA A61K39/00.H A61P35/00 A61P37/04		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	61/416981 2010-11-24 US 2010021289 2010-12-15 GB 61/423652 2010-12-16 US		
其他公开文献	JP2014500493A5 JP2014500493A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及基于新生物标志物预测癌症患者的免疫疗法效果的方法。本发明还涉及基于所述生物标志物的结果预后。本发明还涉及用于上述方法的一组生物标记物。

配列 ID 番号:	略号	タンパク質	配列
1	MMP-001	マトリックスメタロプロテ アーゼ 7	SQDDIKGIQKLYGKRS
2	ADF-002	アジポフィリン	VMAGDIYSV
3	ADF-001	アジポフィリン	SVASTITGV
4	APO-001	アポリポプロテイン L1	ALADGVQKV
5	CCN-001	サイクリン D1	LLGATCMFV
6	GUC-001	GUCY1A3	SVFAGVVGV
7	K67-001	KIAA0367	ALFDGDPHL
8	MET-001	c-met が原遺伝子	YVDPVITSI
9	MUC-001	MUC1	STAPPVHNV
10	RGS-001	RGS 5	LAALPHSCL