

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 730**

51 Int. Cl.:

| | |
|--------------------|-----------|
| G01N 33/574 | (2006.01) |
| C12N 15/09 | (2006.01) |
| A61K 39/395 | (2006.01) |
| A61K 45/00 | (2006.01) |
| A61P 35/00 | (2006.01) |
| A61P 35/02 | (2006.01) |
| C12Q 1/68 | (2008.01) |
| G01N 33/53 | (2006.01) |
| C07K 16/18 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2016 PCT/JP2016/063326**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16175275**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2016 E 16786551 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3290517**

54 Título: **Método para predecir el efecto terapéutico del inhibidor PD-1/PD-L1 usando una anomalía en PD-L1(CD274) como índice**

30 Prioridad:

30.04.2015 JP 2015093599

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2020

73 Titular/es:

**KYOTO UNIVERSITY (50.0%)
36-1, Yoshida-honmachi Sakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, JP y
JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER
RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OGAWA SEISHI;
KATAOKA KEISUKE y
TAKEUCHI KENGO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 767 730 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para predecir el efecto terapéutico del inhibidor PD-1/PD-L1 usando una anomalía en PD-L1(CD274) como índice

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para predecir un efecto de tratamiento mediante un bloqueo PD-1/PD-L1 tal como el anticuerpo anti-PD-1 mediante el examen de la presencia o ausencia de una anomalía del gen PD-L1 en una célula tumoral.

10

Antecedentes de la técnica

Recientemente, se ha dilucidado que un bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz para varios tipos de tumores malignos, incluidos melanoma maligno metastásico, cáncer renal, cáncer de pulmón y la enfermedad de Hodgkin. Como bloqueo PD-1/PD-L1, se ha puesto en uso práctico un anticuerpo monoclonal anti-PD-1, es decir, Nivolumab, (véase, Referencia de patente 1). Actualmente, buscar un biomarcador para predecir un efecto de tratamiento mediante este bloqueo es un problema urgente. Se ha encontrado que la tasa de eficacia es alta cuando se encuentra "PD-L1 positivo" mediante inmunotinción en células tumorales y células inmunitarias periféricas. Sin embargo, la evaluación de la tasa de PD-L1 positivo mediante inmunotinción no es suficiente en vista de la sensibilidad/especificidad. Se desea que la predicción sobre la eficacia de la terapia se mejore aún más.

15

20

Cada vez está más claro que un bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz en muchos tumores malignos. Entre ellos, se incluyen los tumores malignos en los que el bloqueo funciona con menos eficacia. Sin embargo, incluso en dichos tumores, es probable que esté presente un caso que tenga una anomalía estructural de PD-L1 acompañada de una alta expresión del mismo. Sin embargo, todavía no se ha establecido un método útil para resolver un caso en el que posiblemente funcione un bloqueo PD-1/PD-L1.

25

Listado de citas bibliográficas

30

Referencias de patentes

Referencia de patente 1: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2006-340714

35

Sumario de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método eficaz para predecir un efecto de tratamiento mediante un bloqueo PD-1/PD-L1. Otro objetivo es desarrollar una plataforma para resolver un caso en el que estos bloqueos funcionan eficazmente con una alta probabilidad incluso en tumores en los que aún no se ha aplicado un bloqueo PD-1/PD-L1.

40

Solución al problema

45

Los presentes inventores realizaron un análisis génico completo (secuenciación de ARN: 57 casos, secuenciación del genoma completo: 11 casos) de leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (ATL, de sus siglas en inglés). Con base en el análisis génico, se aclaró que una anomalía estructural de PD-L1 (CD274) está presente en aproximadamente un 20 % de los casos de ATL. Los ejemplos de anomalía estructural incluyen todas las anomalías estructurales tales como eliminación, duplicación en tándem, inversión y translocación. Estas anomalías estructurales suelen tener una eliminación de UTR en 3'. Además, en todos los casos que tienen una anomalía estructural, se observó un aumento notable del nivel de ARNm de PD-L1 y se confirmó mediante citometría de flujo un aumento de la expresión de la proteína PD-L1 en la superficie celular. Además, se realizaron estudios sobre la presencia de la misma anomalía en otros tipos de cáncer según los datos de TCGA. Como resultado, se descubrió que la misma anomalía está presente en varios tipos de tumores malignos, tales como cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de intestino grueso, cáncer de cuello uterino, melanoma maligno y linfoma de linfocitos B. Este resultado sugiere que una anomalía estructural, es decir, una eliminación de UTR en 3' de PD-L1 acompañada por una alta expresión de PD-L1 es una anomalía común que ocurre en varios tipos de tumores malignos.

50

55

Basándose en estos resultados, los presentes inventores descubrieron que el efecto de un bloqueo PD-1/PD-L1 se puede determinar y evaluar en base a una eliminación de UTR en 3' en el gen PD-L1 como índice y lograron la presente invención. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

60

Más específicamente, la presente divulgación es la siguiente.

65

[1] Un método para predecir si el bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz o no para el tratamiento de un sujeto que padece

un tumor maligno, que comprende detectar una anomalía del genoma relacionada con la eficacia del bloqueo PD-1/PD-L1 en una célula tumoral extraída del sujeto y evaluar el bloqueo PD-1/PD-L1 como útil para el tratamiento del sujeto cuando existe la anomalía.

[2] El método de acuerdo con [1], en donde la anomalía del genoma relacionada con la eficacia del bloqueo PD-1/PD-L1 es la anomalía del gen PD-L1 relacionada con la aceleración de la expresión del gen PD-L1 (CD274).

[3] El método de acuerdo con [2], en donde la anomalía del gen PD-L1 es la eliminación parcial o completa de la región UTR en 3' del gen PD-L1.

[4] El método de acuerdo con [2], en donde la anomalía del gen PD-L1 es el cambio en el número de copias que induce la eliminación de la región UTR en 3' del gen PD-L1.

[5] El método de acuerdo con [2], en donde la anomalía del gen PD-L1 es el truncamiento completo o parcial del exón 5, el exón 6 y el exón 7 del transcrito de PD-L1.

[6] El método de acuerdo con [2], en donde la anomalía del gen PD-L1 es el truncamiento completo o parcial del exón 5, el exón 6 y el exón 7 del transcrito de PD-L1.

[7] El método de acuerdo con [2], que comprende cuantificar un transcrito de uno cualquiera del exón 1 al exón 4 del gen PD-L1 y un transcrito de la región UTR en 3' del gen PD-L1 y calcular una relación entre la cantidad del transcrito del exón y la cantidad del transcrito de la región UTR en 3', y evaluar el bloqueo PD-1/PD-L1 como útil para el tratamiento del cáncer cuando la relación no es inferior a un valor predeterminado.

[8] El método de acuerdo con [2], en donde la anomalía del gen PD-L1 es la aceleración de la expresión del ARNm de PD-L1.

[9] El método de acuerdo con [2], en donde la anomalía del gen PD-L1 es la anomalía causada por la inserción de un virus.

[10] El método de acuerdo con [9], en donde el virus es el virus del papiloma humano (HPV, de sus siglas en inglés) o EBV (virus de Epstein-barr).

[11] El método de acuerdo con [2], que comprende la tinción de una proteína PD-L1 en una célula tumoral tomada del sujeto mediante tinción inmunohistoquímica usando un anticuerpo contra una región C terminal de PD-L1 y un anticuerpo contra una región N terminal de PD-L1, y evaluar el bloqueo PD-1/PD-L1 como útil para el tratamiento del sujeto cuando la célula tumoral se tiñe con el anticuerpo contra una región N terminal de PD-L1 pero la célula tumoral no se tiñe con el anticuerpo contra una región C terminal de PD-L1.

[12] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11], en donde el tumor maligno se selecciona del grupo que consiste en leucemia de linfocitos T adultos/linfoma de leucemia de linfocitos T adultos, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, adenocarcinoma de pulmón, melanoma maligno cutáneo y linfoma de linfocitos B.

[13] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11], en donde el tumor maligno se selecciona del grupo que consiste en cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cuerpo uterino.

[14] El método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [13], en donde el bloqueo PD-1/PD-L1 es el anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1.

[15] Un método de tratamiento que comprende detectar una anomalía del genoma relacionada con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en una célula tumoral tomada de un sujeto que padece un tumor maligno y aplicar un tratamiento con el bloqueo PD-1/PD-L1 cuando la anomalía está presente.

Efectos ventajosos de la invención

Como se muestra en los Ejemplos, en varios tumores malignos, hay casos en donde PD-L1 se expresa altamente debido a una anomalía estructural del gen PD-L1. Más específicamente, una anomalía estructural de PD-L1 (que sirve principalmente como un punto de control inmunitario) y el gen de fusión resultante con una región no codificante se identificaron como una anomalía génica en varios tipos de tumores malignos más allá de la expectativa ordinal. Teniendo en cuenta que un bloqueo anti PD-1/PD-L1 es abrumadoramente eficaz (tasa de eficacia: aproximadamente 90 %) en un estudio preclínico (modelo de ratón) de esta investigación y en la enfermedad de Hodgkin, que se conoce como solo un caso en donde la PD-L1 se activa constantemente por una anomalía genómica, se espera que un bloqueo anti PD-1/PD-L1 sea extremadamente eficaz para pacientes que tienen una anomalía estructural PD-L1 y se convierte en un biomarcador anticipado. En consecuencia, la anomalía genética directamente relacionada con un tratamiento eficaz es un objetivo extremadamente anticipado para el examen clínico.

En cuanto a un tumor maligno al que ya se ha aplicado un bloqueo PD-1/PD-L1, se puede predecir con éxito un efecto del tratamiento mediante el bloqueo PD-1/PD-L1 basándose en la detección de una anomalía estructural PD-L1. También, incluso en los casos de tumores en los que aún no se ha aplicado un bloqueo PD-1/PD-L1, si existe una anomalía del gen PD-L1, es probable que el bloqueo PD-1/PD-L1 sea eficaz. Si tal caso se resuelve, posiblemente se pueda establecer una nueva terapia. Además, si se lleva a cabo un ensayo clínico basado en una anomalía estructural de PD-L1 como índice, el número de enfermedades para las cuales está indicado puede aumentarse eficazmente. Esto significa que el intervalo de la indicación no se limita a los tumores malignos, para los cuales la indicación ha sido aprobada o bajo consideración, y se puede ampliar a tumores malignos, para los cuales la eficacia del bloqueo en general se considera insuficiente.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra los resultados de búsqueda de la anomalía estructural en la región 9p24.1 en la

secuenciación de ARN (57 casos) y la secuenciación del genoma completo (11 casos).

[Figura 2] La Figura 2 muestra los resultados del análisis sobre la relación entre las anomalías estructurales de la secuenciación de ARN (57 casos) y la expresión de CD274.

[Figura 3] La Figura 3 muestra los resultados del análisis de la expresión de CD274 en exones individuales.

[Figura 4] La Figura 4 muestra la relación entre la expresión en el exón 3, la relación de expresión en el exón 3/expresión de UTR en 3' y la anomalía estructural de CD274.

[Figura 5] La Figura 5 muestra los resultados del análisis de un transcrito de CD274 truncado en el medio e identificado en ATL.

[Figura 6] La Figura 6 muestra secuencias de aminoácidos de transcritos de CD274 truncados en el medio.

[Figura 7] La Figura 7 muestra la expresión de la proteína CD274 en superficies de membrana de células procedentes de pacientes con ATL.

[Figura 8] La Figura 8 muestra resultados de análisis de anomalía estructural y expresión de CD274 en varios tipos de cánceres basados en datos de TCGA.

[Figura 9] La Figura 9 muestra la expresión de CD274 en melanoma maligno, cáncer de intestino grueso, cáncer de estómago y linfoma de linfocitos B.

[Figura 10] La Figura 10 muestra resultados del análisis (I) de la expresión de CD274 en varios tipos de tumores malignos basados en datos de TCGA.

[Figura 11] La Figura 11 muestra resultados del análisis (II) de la expresión de CD274 en varios tipos de tumores malignos basados en datos de TCGA.

[Figura 12] La Figura 12 muestra los resultados (resultados GISTIC) de las anomalías de CD274 detectadas mediante la matriz SNP.

[Figura 13] La Figura 13 muestra resultados (resultados CNAG) de anomalías de CD274 detectadas mediante la matriz SNP.

[Figura 14] La Figura 14 muestra resultados de anomalías de CD274 detectadas mediante RQ-PCR.

[Figura 15] La Figura 15 muestra resultados de inmunotinción de la expresión de PD-L1 en pacientes con ATL.

[Figura 16] La Figura 16 muestra resultados del análisis (II) de anomalía estructural y expresión de CD274 en varios tipos de cánceres basados en datos de TCGA.

[Figura 17] La Figura 17 muestra un implante de un virus de carcinogénesis en la región CD274 y la anomalía en UTR en 3' de CD274.

[Figura 18] La Figura 18 muestra la sobreexpresión de CD274 inducida mediante la introducción de una anomalía de UTR en 3' de CD274 de una línea celular humana y de ratón.

[Figura 19] La Figura 19 muestra que la alta expresión de CD274 en asociación con una anomalía de UTR en 3' de CD274 induce la apoptosis de los linfocitos T que expresan PD-1.

[Figura 20-1] La Figura 20-1 muestra un protocolo de un experimento que evalúa el efecto de la alta expresión de CD274 en asociación con una anomalía de UTR en 3' de CD274 en el potencial tumorigénico.

[Figura 20-2] La Figura 20-2 muestra el efecto de la alta expresión de CD274 en asociación con una anomalía de UTR en 3' de CD274 en el potencial tumorigénico.

[Figura 21-1] La Figura 21-1 muestra imágenes teñidas que muestran que la alta expresión de CD274 en asociación con una anomalía de UTR en 3' de CD274 suprime la infiltración de linfocitos T CD8 positivos en un tumor.

[Figura 21-2] La Figura 21-2 es un gráfico (el número de células) que muestra que la alta expresión de CD274 en asociación con una anomalía de UTR en 3' de CD274 suprime la infiltración de linfocitos T CD8 positivos en un tumor.

[Figura 22-1] La Figura 22-1 es un gráfico que muestra el efecto de un bloqueo PD-1/PD-L1 contra el potencial tumorigénico debido a la alta expresión de CD274 en asociación con una anomalía de UTR en 3' de CD274, basado en un cambio en diámetro dependiente del tiempo de un tumor.

[Figura 22-2] La Figura 22-2 muestra el efecto de un bloqueo PD-1/PD-L1 contra el potencial tumorigénico debido a la alta expresión de CD274 en asociación con una anomalía de UTR en 3' de CD274, basado en inmunotinción.

[Figura 22-3] La Figura 22-3 muestra el efecto de un bloqueo PD-1/PD-L1 contra el potencial tumorigénico debido a la alta expresión de CD274 en asociación con una anomalía de UTR en 3' de CD274, basado en el número de células.

[Figura 23] La Figura 23 muestra la capacidad de unión a PD-1 de un mutante cuyo marco de lectura abierto CD274 está truncado, basada en la evaluación de citometría de flujo.

[Figura 24] La Figura 24 muestra gráficos que muestran que una anomalía estructural de CD274 se relaciona con la sobreexpresión de CD274 independientemente del número de copias de la región de CD274.

Descripción de realizaciones

Ahora, la presente invención se describirá más específicamente, a continuación.

La presente invención se refiere a un método para evaluar y determinar la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en un paciente con un tumor maligno, basado en una anomalía genómica relacionada con la eficacia del bloqueo PD-1/PD-L1 en el paciente como un índice, o un método para obtener datos de apoyo para evaluar y determinar la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en el paciente. En la presente invención, la evaluación/determinación también se denomina predicción. PD-L1 también se denomina como CD274 o B7-H1.

La anomalía genómica relacionada con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en el presente documento se refiere a

una anomalía, que se encuentra en el genoma de un paciente con un tumor maligno y en la que un bloqueo PD-1/PD-L1 tiene un alto efecto. Ejemplos de dicha anomalía incluyen una anomalía del cromosoma 9p24.1, en el que está presente el gen PD-L1, y una anomalía del gen PD-L1. Dicha anomalía también se conoce como una variación estructural (SV, de sus siglas en inglés) del gen PD-L1. Con estas anomalías, se puede inducir la expresión anormal de PD-L1 en las células tumorales de un paciente con un tumor maligno. Ejemplos de la anomalía genómica relacionada con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 incluyen anomalías estructurales tales como duplicación en tándem, eliminación, inversión y translocación de un gen; anomalías en el número de copias, tales como un aumento o disminución en el número y disomía uniparental; y anomalías cualitativas (eliminación de UTR en 3') y cuantitativas de un producto de expresión y un producto de transcripción. La expresión anormal de PD-L1 en células tumorales se refiere a la aceleración de la expresión del gen PD-L1 en comparación con la de las células de una persona sana o la de las células tumorales que tienen un gen PD-L1 normal; más específicamente, para el caso en donde la expresión de PD-L1 a un nivel de ARNm o proteína es 5 veces o más, preferentemente 10 veces o más, más preferentemente 20 veces o más, y más preferentemente 50 veces o más alto como los casos normales. Si se detecta la expresión anormal de PD-L1, es posible predecir que existe una anomalía genómica relacionada con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1.

En un cuerpo vivo, los linfocitos T tienen una función inmunitaria contra un tumor (es decir, los linfocitos T atacan a células tumorales). Sin embargo, cuando el ligando PD-L1 expresado por una célula tumoral se une a PD-1 (muerte celular programada 1) expresada por un linfocito T, se induce la muerte celular del linfocito T, con el resultado de que se suprime la función inmunitaria contra un tumor. Un bloqueo PD-1/PD-L1 bloquea la unión de PD-L1 de una célula tumoral y PD-1 de un linfocito T, suprimiendo así la función inmunitaria del linfocito T contra un tumor. Ejemplos del bloqueo PD-1/PD-L1 incluyen el anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo anti-PD-L1. Ejemplos del anticuerpo anti-PD-1/PD-L1 utilizado como medicamento contra el cáncer incluyen Nivolumab, MPDL3280A, pembrolizumab (MK-3475), MEDI4736, MSB0010718C, Pidilizumab y MEDI0680. Un bloqueo PD-1/PD-L1 funciona de manera altamente eficaz en el caso de un paciente donde PD-L1 se expresa altamente en células tumorales y células inmunitarias periféricas. En consecuencia, si se mide el nivel de expresión de PD-L1, se puede determinar la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1. Por ejemplo, la expresión de PD-L1 en una célula tumoral se puede verificar mediante inmunotinción; sin embargo, la evaluación de una tasa positiva de PD-L1 mediante inmunotinción no es suficiente en vista de la sensibilidad y especificidad.

Si la anomalía genómica en un paciente con un tumor maligno se relaciona con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en las células tumorales se puede encontrar simplemente investigando si la anomalía genómica se relaciona con la aceleración de la expresión del gen PD-L1; más específicamente, se puede determinar mediante el análisis exhaustivo de las anomalías estructurales de todo el genoma en la célula tumoral, al mismo tiempo, determinando la expresión del gen PD-L1 en la célula tumoral a un nivel de ARNm o de proteína y asociando una anomalía genómica (estructural) con la aceleración de la expresión del gen PD-L1. Más específicamente, el ADN se aísla de una célula tumoral y el genoma completo se secuencian y analiza en busca de anomalías estructurales genómicas tales como duplicación en tándem, inversión, translocación y eliminación; al mismo tiempo, se secuencian el ARN total de la célula tumoral y se determina la expresión del gen PD-L1; y luego, se puede analizar la asociación de una anomalía genómica con la expresión del gen PD-L1. Por ejemplo, en varias células tumorales que tienen una determinada anomalía genómica, si se encuentra la aceleración de la expresión del gen PD-L1, se puede determinar que la anomalía está asociada con la aceleración de la expresión del gen PD-L1 y se relaciona con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1.

Actualmente, cuando la expresión del gen PD-L1 se acelera por una anomalía genómica, se induce la apoptosis de los linfocitos T que expresan PD-1. Además, cuando la expresión del gen PD-L1 se acelera por una anomalía genómica, se suprime la infiltración de linfocitos T citotóxicos CD8 positivos en un tumor y se acelera el crecimiento tumoral. Además, la resistencia de inmunidad debida a la anomalía genómica PD-L1 se suprime por el bloqueo anti-PD-1/PD-L1.

El tipo de tumor, al que se puede aplicar el método de la presente invención para evaluar y determinar la eficacia de un bloqueo PD-L1/PD-1, no es limitante. Al menos, leucemia/linfoma de linfocitos T adultos, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, adenocarcinoma de pulmón, melanoma maligno de la piel, linfoma de linfocitos B, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cuerpo uterino, se mencionan. El cáncer de intestino grueso incluye cáncer de colon y cáncer rectal.

En el método de la presente invención, se toma una muestra de tumor de un sujeto que padece un tumor maligno y las células tumorales de la muestra se pueden someter a análisis de anomalías genómicas.

En el método de la presente invención, como ejemplo específico del objeto de análisis, es decir, anomalía genómica relacionada con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1, se mencionan las siguientes anomalías.

(1) anomalía genómica que tiene una eliminación en UTR en 3' (región no traducida en 3') del gen PD-L1

El gen PD-L1 está presente en la región 9p24.1. Ejemplos de la anomalía estructural del gen incluyen la duplicación en tándem, inversión, translocación y eliminación. Cuando la UTR en 3' tiene una eliminación debido a una anomalía estructural del gen PD-L1, PD-L1 se expresa altamente. Esto se debe a que la UTR en 3' es una región que juega un

papel importante en el mantenimiento de la estabilidad y la regulación de la traducción del ARNm, y si se elimina esta región, el gen pierde estas funciones. La eliminación de UTR en 3' en el gen PD-L1 incluye una eliminación completa y una eliminación parcial. Los ejemplos de la anomalía en el número de copias (CNV) de la región 9p24.1 que incluye el gen PD-L1 incluyen un aumento y una disminución en el número de copias y disomía uniparental. La anomalía en el número de copias ocurre en asociación con la anomalía estructural. Cuando se produce una eliminación en la UTR en 3', PD-L1 se expresa altamente.

El gen PD-L1 que tiene la UTR en 3' eliminada se trunca parcialmente en el medio de una región de exón, con el resultado de que se produce una proteína diferente de una PD-L1 de tipo silvestre. La PD-L1 (proteína) consta de tres dominios, es decir, un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. En la unión a PD-1, participa el dominio extracelular y el dominio transmembrana. Incluso si el gen PD-L1 se trunca en el medio de la región de exón, PD-L1 mantiene una capacidad de unión a PD-1. Más específicamente, incluso si el gen PD-L1 se trunca en el medio de la región de exón, siempre que tenga el dominio extracelular y el dominio transmembrana, PD-L1 tiene una función que suprime la inmunidad antitumoral. En consecuencia, independientemente de si la proteína PD-L1 está truncada o no, una célula tumoral que expresa altamente la proteína PD-L1 debido a una anomalía genómica del gen PD-L1 está bloqueada en la función de suprimir la inmunidad tumoral por un bloqueo PD-1/PD-L1. En consecuencia, el bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz para tratar un tumor maligno que tiene una anomalía genómica del gen PD-L1.

La secuencia de nucleótidos del gen PD-L1 se registra bajo NM_014143. La secuencia de nucleótidos de la UTR en 3' del gen PD-L1 está representada por la SEQ ID NO: 2.

(2) Anomalía en el transcrito y producto traducido del gen PD-L1

Como anomalía del ARNm de PD-L1, se mencionan el truncamiento completo o parcial de la UTR en 3' del ARNm y la alta expresión que lo acompaña. Además, a veces puede estar presente un truncamiento en o cadena abajo del exón 5 o 6. Como el truncamiento de exón, un truncamiento de una región completa del exón 6 y el exón 7, un truncamiento del exón 7 completo y un truncamiento en el medio del exón 7. En la presente invención, dicho truncamiento de exón se refiere a un truncamiento del exón 6 o un truncamiento completo o parcial del exón 7. Adicionalmente, puede producirse un truncamiento en y cadena abajo del exón 4, más específicamente, un truncamiento de la región completa del exón 5, exón 6 y exón 7.

Como anomalía de la proteína PD-L1, se menciona una alta expresión. La alta expresión de la proteína PD-L1 ocurre independientemente del aumento del número de copias del gen PD-L1 y se relaciona con la anomalía estructural del gen PD-L1. Dado que el exón 5 o 6 constituye el dominio citoplasmático de la proteína PD-L1, si está presente una eliminación en y cadena abajo del exón 4, la anomalía de la proteína PD-L1 incluye una eliminación parcial del dominio citoplasmático.

Un virus carcinogénico tal como el HPV (por ejemplo, el virus del papiloma humano (HPV) 16) y el EBV (virus de Epstein-barr), si se introduce en la región del gen PD-L1, a veces induce una anomalía estructural. Por ejemplo, en algunos casos en donde el virus del papiloma humano (HPV) se inserta en el intrón 6 del gen PD-L1 y el gen del virus Epstein-Barr (EBV) se inserta en una región del gen cadena arriba del gen PD-L1 y ubicada cadena arriba del mismo, un transcrito PD-L1 se trunca a la UTR en 3'.

La anomalía genómica relacionada con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 se puede analizar de acuerdo con un método general para analizar la anomalía estructural genómica y la anomalía génica usando células tumorales tomadas de un paciente con un tumor maligno. Ejemplos del método de análisis incluyen un método de análisis basado en el análisis de secuencia mediante la extracción de ADN o ARN de las células tumorales y la determinación directa de la secuencia de los mismos mediante un método conocido en la técnica, tal como el método de secuencia de PCR/Sanger, el método por dideoxido y el método de Maxam-Gilbert; un método de análisis para un gen mundial que incluye una secuenciación completa del genoma, una secuenciación completa del exón y una secuenciación diana por un secuenciador de próxima generación; un método FISH (hibridación fluorescente *in situ*); un método de hibridación que usa una sonda específica para una región que tiene una anomalía génica o una micromatriz (chip de ADN) que tiene una sonda específica inmovilizada en el mismo, tal como un método de análisis de número de copias que usa, por ejemplo, una matriz SNP y una matriz CGH; y métodos que usan un cebador específico para una región que tiene una anomalía génica. Ejemplos del método que usa un cebador incluyen el método PCR, el método NASBA, el método LCR, el método SDA, el método LAMP, un método que usa polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, de sus siglas en inglés) y un método de ampliación del cebador (método TaqMan (marca registrada)). Se pueden usar como secuenciador de próxima generación, por ejemplo, Genome Sequencer FLX (GD FLX) (Roche) e Illumina HiSeq/MiSeq (Illumina).

Una eliminación en la UTR en 3' del gen PD-L1 puede detectarse mediante un método que utiliza una sonda y/o un cebador, así como mediante la secuenciación de ARN y un método FISH.

Se puede detectar una eliminación de la UTR en 3' en el ARNm calculando la proporción de la cantidad de transcrito de exones (exón 1 a 5) del gen PD-L1 que no tiene eliminación y la cantidad de transcrito de la UTR en 3'. Más

específicamente, el ARNm de uno cualquiera de los exones 1 a 5 del gen PD-L1, por ejemplo, del exón 3 o del exón 4 y el ARNm de la región UTR en 3' se cuantifican mediante secuenciación de ARN y PCR cuantitativa y se calcula la relación de expresión del exón 3 o exón 4/expresión de UTR en 3'. De esta manera, se puede determinar la presencia o ausencia de la expresión de UTR en 3', más específicamente, la presencia o ausencia de la eliminación en UTR en 3'. Si la relación es alta, se puede determinar que se elimina la UTR en 3'. El caso en donde la relación de expresión del exón 3/expresión de UTR en 3' es grande se refiere al caso en donde la expresión del exón 3/expresión de UTR en 3' es grande en relación con la expresión del exón 3/expresión de UTR en 3' en una célula tumoral que no tiene anomalía del gen PD-L1; por ejemplo, se refiere al caso en donde la relación de la expresión del exón 3/expresión de UTR en 3' es un valor predeterminado o más, más específicamente, doble o más, preferentemente 3 veces o más, más preferentemente 5 veces o más. Análogamente, el caso en donde la relación de expresión del exón 4/expresión de UTR en 3' es grande se refiere al caso en donde la expresión del exón 4/expresión de UTR en 3' es grande en relación con la expresión del exón 4/expresión de UTR en 3' en una célula tumoral que no tiene anomalía de gen PD-L1, por ejemplo, se refiere al caso en donde la relación de la expresión del exón 4/expresión de UTR en 3' es un valor predeterminado o más, más específicamente, doble o más, preferentemente 3 veces o más, más preferentemente 5 veces o más.

La expresión anormal del gen PD-L1 se puede detectar midiendo el ARNm de PD-L1 en una célula tumoral mediante el uso de una PCR (semi) cuantitativa, tal como RQ-PCR y RT-PCR. La RQ-PCR es un método para detectar continuamente la acumulación de un producto de PCR durante un proceso de PCR, lo que permite una cuantificación fácil y precisa en la fase exponencial al comienzo de la PCR.

La sonda o cebador que se usará en los métodos anteriores, consiste en un fragmento de nucleótido (preferentemente un fragmento de ADN) que consiste en una secuencia de nucleótidos que contiene un sitio de anomalía genómica relacionado con la aceleración de la expresión del gen PD-L1; una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos o una secuencia capaz de hibridarse con cualquiera de estas secuencias en condiciones rigurosas. El número de bases es de 5 a 50, preferentemente de 10 a 30 y más preferentemente de 10 a 25.

En el caso de tener una eliminación en y cadena abajo del exón 4, más específicamente, una eliminación de la región C terminal de la proteína PD-L1 debido a una anomalía estructural del gen PD-L1, más específicamente, un caso que tiene un ORF truncado, la proteína anormal expresada reacciona con un anticuerpo contra la región C terminal de la proteína PD-L1 (anticuerpo contra el extremo C de PD-L1) y no reacciona con un anticuerpo contra la región N terminal de la proteína PD-L1 (anticuerpo contra el extremo N de PD-L1). En consecuencia, si el anticuerpo contra el extremo C de PD-L1 y el anticuerpo contra el extremo N de PD-L1 se usan para examinar la reactividad entre ambos anticuerpos y la proteína PD-L1 producida, se puede identificar la anomalía estructural del gen PD-L1. Más específicamente, por ejemplo, la proteína PD-L1 en una célula tumoral se tiñe con un anticuerpo contra el extremo C de PD-L1 y un anticuerpo contra el extremo N de PD-L1, que se tiñe con, por ejemplo, un colorante fluorescente, para visualizar la proteína PD-L1. Si la proteína se tiñe con el anticuerpo anti-N terminal pero no se tiñe con el anticuerpo anti-C terminal, se puede determinar que el gen PD-L1 tiene una anomalía estructural.

Cuando el método de la presente invención detecta la presencia de una anomalía del gen PD-L1 en relación con la aceleración de la expresión del gen PD-L1 en una célula tumoral tomada de un sujeto, es posible evaluar y determinar que un bloqueo PD-1/PD-L1 tiene un efecto sobre un tumor maligno de un sujeto con una alta probabilidad. También, en una célula tumoral de un tumor maligno, si se encuentra la presencia de la anomalía del gen PD-L1 relacionada con la aceleración de la expresión del gen PD-L1, es posible evaluar y determinar que un bloqueo PD-1/PD-L1 tiene un efecto sobre el tumor maligno con una alta probabilidad.

Se considera que el porcentaje de pacientes en los que funciona eficazmente un bloqueo PD-1/PD-L1 varía según el tipo de tumor maligno. Por ejemplo, en leucemia/linfoma de linfocitos T adultos, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, cáncer de pulmón, melanoma maligno de la piel, linfoma de linfocitos B, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cuerpo uterino, si un transcrito tiene una anomalía en la UTR en 3', se sabe que la expresión de PD-L1 se acelera. Con respecto a los pacientes que padecen estos cánceres malignos, el método de la presente invención puede evaluar si un bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz o no. Además, con respecto a los pacientes que padecen otros tumores malignos, el método de la presente invención puede evaluar si un bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz o no.

Además, por ejemplo, en leucemia de linfocitos T adultos y, cáncer de estómago, la relación de pacientes en los que un bloqueo PD-1/PD-L1 funciona eficazmente es alta, pero es posible que la relación sea baja en, por ejemplo, melanoma maligno, cáncer de pulmón y cáncer renal. El método de la presente invención no solo permite evaluar y determinar la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en los pacientes que padecen un tumor maligno (la relación de pacientes tratados eficazmente con un bloqueo PD-1/PD-L1 es alto) sino también permite evaluar y determinar la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en los pacientes que padecen un tumor maligno (la relación de pacientes tratados eficazmente con un bloqueo PD-1/PD-L1 es baja y un PD-1/PD-L1 no se aplica convencionalmente).

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para predecir si un bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz o no para tratar a un sujeto que padece un tumor maligno, e incluye un método que comprende detectar anomalías genómicas relacionadas con la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en una célula tumoral tomada de un sujeto que

padece un tumor maligno en el que un bloqueo PD-1/PD-L1 tiene un efecto bajo y evaluar que el bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz para tratar al sujeto cuando hay una anomalía, expandiendo así el intervalo de la indicación del bloqueo PD-1/PD-L1 al tumor sobre el cual el bloqueo PD-1/PD-L1 tiene un efecto bajo.

5 Como se ha mencionado anteriormente, el método de la presente invención permite evaluar y determinar si un bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz o no para varios tipos de tumores malignos o pacientes que padecen varios tipos de tumores malignos y permite seleccionar un método de tratamiento apropiado para un paciente.

10 Si se encuentra una anomalía del gen PD-L1 relacionada con la aceleración de la expresión del gen PD-L1 en células tumorales tomadas de un sujeto, y si se puede evaluar y determinar un bloqueo PD-1/PD-L1 para tratar eficazmente un tumor maligno del sujeto con una alta probabilidad, se puede administrar al sujeto un bloqueo de control inmunitario tal como un bloqueo PD-1/PD-L1 que contiene un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 o un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1.

15 La posología varía según, por ejemplo, la edad, peso corporal y síntomas. La posología de 0,001 mg a 100 mg por dosis puede administrarse mediante administración parenteral, tal como inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea e inyección intramuscular o administración oral a intervalos de varios días, varias semanas o varios meses. El bloqueo a administrar puede contener un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La forma de dosificación del bloqueo no está limitada, se puede mencionar una forma de dosificación para administración oral tal como un comprimido, una cápsula, un gránulo, un polvo y un jarabe, o una forma de dosificación para administración parenteral tal como una inyección, un goleo, un supositorio y un aerosol.

Ejemplos

25 La presente invención se describirá más específicamente por medio de los siguientes Ejemplos; sin embargo, la presente invención no está limitada por estos Ejemplos.

1. Búsqueda de anomalía estructural en la región 9p24.1 en la secuenciación de ARN (57 casos) y la secuenciación del genoma completo (11 casos)

30 (Método)

Se realizó la secuenciación de ARN de 57 muestras tumorales de ATL (leucemia de linfocitos T adultos) y la secuenciación del genoma completo de pares de ATL de tumor normal (mucosa bucal) (11 casos).

35 El ARN de las muestras tumorales se extrajo con el kit RNeasy Mini (QIAGEN) y el RINe se midió con el sistema Agilent RNA ScreenTape (Agilent).

40 Se construyó una biblioteca para la secuenciación de ARN utilizando ARN (200 a 500 ng) con un RINe de 7 o más mediante el kit NEBNext Ultra RNA Library Prep (New England Biolabs) y se determinó la secuencia de nucleótidos mediante HiSeq2000/2500. Los datos se analizaron mediante el uso del algoritmo denominado Genomon Fusion (<http://genomon.hgc.jp/rna/>) divulgado públicamente por el centro de análisis del genoma humano del Instituto de Ciencias Médicas, Universidad de Tokio. De esta manera, se identificaron los genes de fusión y se analizó la expresión de los genes.

45 Se construyó una biblioteca de la secuencia del genoma completa usando WGS que utiliza el reactivo de preparación de biblioteca de ADN NEBNext (New England Biolabs) y las secuencias de nucleótidos se determinaron mediante HiSeq2000/2500.

50 El análisis se llevó a cabo como se describe en TOTOKI Y. et al., NATURE GENETICS 46, 1267-1273 (2014) (doi: 10.1038/ng.3126).

(Resultados)

55 Los resultados se muestran en la Figura 1. Se observó una anomalía estructural (gen de fusión) en la región 9p24.1 en 11 casos de 57 casos de pacientes con ATL.

60 Se encontró una amplia variedad de anomalías estructurales de la siguiente manera: duplicación en tándem (línea diagonal en negrita desde la parte superior derecha a la inferior izquierda): tres casos; inversión (línea diagonal delgada desde la parte superior izquierda a la inferior derecha): tres casos; translocación (abierta): tres casos; y eliminación (línea delgada desde la parte superior derecha a la inferior izquierda): dos casos.

Sin embargo, todos estos casos comúnmente tuvieron una eliminación de UTR en 3' (región no traducida responsable de la regulación postranscripcional).

65 CD274 estaba intacto hasta el exón 5 en todos los casos; sin embargo, una parte de la región en y cadena abajo del

exón 5 se truncó en algunos casos.

2. Análisis sobre la relación entre la anomalía estructural de RNAseq (57 casos) y la expresión de CD274

5 (Método)

La relación entre la anomalía estructural y la expresión de CD274 se analizó en base a los resultados de la secuenciación de ARN usando muestras de tumor ATL (57 casos) del Ejemplo 1.

10 Como valor de expresión, se usó FPKM (Fragmentos por Kilobase de transcrito por Millón de fragmentos secuenciados).

(Resultados)

15 Los resultados se muestran en la Figura 2. Los patrones en el gráfico de barras de la Figura 2 (línea diagonal en negrita desde la parte superior derecha a la parte inferior izquierda, línea diagonal delgada desde la parte superior izquierda a la parte inferior derecha, abierta, línea delgada desde la parte superior derecha a la parte inferior izquierda) corresponden a los patrones de la Figura 1.

20 En los casos que tienen una anomalía estructural (común en el Ejemplo 1), se observó una alta expresión de CD274.

CD274 se expresa notablemente y altamente en casi todos los casos que tienen una anomalía estructural (+), en comparación con los casos (sólidos) que no tienen anomalía estructural.

25 3. Análisis sobre la expresión en exones individuales de CD274

(Método)

30 Usando datos de secuenciación de ARN de ATL (57 casos) en el Ejemplo 2, las lecturas de secuencia se mostraron en exones individuales de CD274 (NM_014143) mediante IGV (visor de genoma integrativo) (proporcionado por Broad Institute).

CD274 consta de 7 exones y el exón 7 está ocupado principalmente por la UTR en 3'.

35 (Resultados)

40 Los resultados se muestran en la Figura 3. Los números del 1 al 7 en la parte inferior de la Figura 3 representan los números de exón. En el caso de no tener anomalía estructural (-) (Miya31), la expresión en UTR en 3' fue relativamente alta en comparación con la de otros exones. En contraste, en los casos que tienen una anomalía estructural (+) (Miya26 y 30), la expresión en UTR en 3' desapareció. Los mismos resultados se obtuvieron en otros casos de anomalía estructural (+). Los resultados muestran que en los casos que tienen una anomalía estructural (+), la expresión del sitio UTR en 3' desaparece con la eliminación de UTR en 3'.

45 4. Expresión en el exón 3 y relación entre la relación de expresión en el exón 3 y la expresión en UTR en 3' y anomalía estructural CD274

(Método)

50 En los casos que tienen una anomalía estructural (+), la expresión en UTR en 3' desaparece. Por tanto, la expresión se subestima cuando se evalúa la expresión del gen completo como en el Ejemplo 3. Como resultado, la relación con la anomalía estructural probablemente no sea clara. Después, usando datos de secuenciación de ARN de ATL (57 casos) del Ejemplo 3, se calcularon las relaciones de expresión de exones individuales de CD274 y la expresión de UTR en 3'. De los resultados del cálculo, la expresión del exón 3, que tenía la relación más clara con la anomalía estructural, y la relación de expresión del exón 3/expresión de UTR en 3' (exp. ex3/exp. UTR en 3') se mostraba como un diagrama de dispersión.

55 (Resultados)

60 Los resultados se muestran en la Figura 4. En la Figura 4, los círculos abiertos representan casos que tienen una anomalía estructural (+), mientras que los círculos sólidos representan casos que no tienen anomalía estructural (-). La abreviatura "ex3" representa el exón 3 y "exp" representa la expresión. En vista de la expresión de CD274 solo en el exón 3 y la relación de expresión del exón 3 con respecto a la expresión de UTR en 3', la exp. ex3/exp. UTR en 3', es alta en casos de anomalía estructural (+). Por tanto, los casos de anomalía estructural (+) (círculo abierto) estaban claramente separados.

65 5. Análisis de un transcrito truncado en el medio de CD274 identificado en ATL

(Método)

5 En aproximadamente la mitad de los casos de anomalía estructural (+) de CD274 (11 casos) identificados en base a los resultados de secuenciación de ARN de los casos de ATL (57 casos), los transcritos se truncaron en el exón 5 o el exón 6. En estos casos, las secuencias de los transcritos se confirmaron mediante secuenciación de ARN para identificar las secuencias.

(Resultados)

10 Los resultados se muestran en la Figura 5. La secuencia de nucleótidos en la parte inferior de la Figura 5 es la secuencia de un transcrito de un caso que tiene una anomalía estructural (+) (Miya26). Se transcribió un CD274 de tipo silvestre hasta el extremo 3' del exón 6. El transcrito fue seguido por una región intrón del gen CBLB en el cromosoma 3 (área enmarcada). La región intrón contiene un codón de terminación (representado por TGA en cursiva), una secuencia de señal de poliA (AATAAA subrayada: la secuencia requerida para la unión de poliA) y una secuencia de poliA (doblemente subrayada). Este resultado muestra que un transcrito alternativo formado por anomalía estructural CD274 funciona como un transcrito adecuado. La secuencia completa que se muestra en la Figura 5 está representada por la SEQ ID NO: 1; mientras que la secuencia de UTR en 3' está representada por la SEQ ID NO: 2.

20 6. Secuencia de aminoácidos del caso donde la transcripción de CD274 se trunca en el medio

(Método)

25 Se utilizó NP_054862 como secuencia de referencia. Basado en la secuencia del transcrito del Ejemplo 5, la secuencia de aminoácidos de un caso en donde CD274 se truncó en el medio se identificó *in silico*.

(Resultados)

30 Los resultados se muestran en la Figura 6. CD274 consta de un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Los primeros dos dominios se consideran importantes para la resistencia inmunitaria de las células tumorales debido al mecanismo PD1/PD-L1.

35 En la Figura 6, se muestran las secuencias de la parte media de los dominios transmembrana (secuencias en marco). Las secuencias en los cuadros son las secuencias de dominios transmembrana y las secuencias en cursiva y subrayadas representan las secuencias de los dominios citoplasmáticos. El "CD274 Ts" en la parte superior de la Figura 6 representa una secuencia de tipo silvestre.

40 En la CD274 truncada (Miya15, Miya24, Miya26, Miya30, Sas8, Kyo4), los dos primeros dominios se mantienen intactos, lo que sugiere que los transcritos alternativos pueden funcionar como CD274 con una alta probabilidad.

7. Expresión de la proteína CD274 evaluada en la superficie de la membrana de la célula procedente del paciente ATL

(Método)

45 La expresión de CD274 en la superficie celular se evaluó mediante citometría de flujo usando células tumorales en el caso en donde se identificó una anomalía estructural de CD274 mediante secuenciación de ARN. Las células tumorales se tiñeron con anticuerpo anti-CD274 humano PE/Cy7 (B7-H1, PD-L1) (clon: 29E.2A3, BioLegend) y se analizaron mediante LSR2 Fortessa (BD Biosciences).

50 (Resultados)

55 Los resultados se muestran en la Figura 7. En la Figura 7, los casos que tienen una anomalía estructural (+) están rodeados por un marco. También en los casos que tienen una anomalía estructural (-), se observa baja expresión de CD274; sin embargo, en el caso de tener una anomalía estructural (+), se confirma una expresión significativamente alta de CD274. El nivel de expresión se incrementó aproximadamente 100 veces.

Los resultados muestran que CD274 se expresa altamente a un nivel de proteína en los casos que tienen una anomalía estructural (+).

60 8. Análisis de anomalía estructural de CD274 en varios tipos de tumores malignos basado en datos y expresión de TCGA

(Método)

65 Utilizando datos de secuenciación de ARN almacenados en la base de datos de EE.UU. de datos de secuencia de próxima generación de varios tipos de tumores malignos, TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>), se analizaron la

expresión y las anomalías estructurales de CD274 en varios tipos de tumores malignos.

(Resultados)

5 Los resultados se muestran en la Figura 8. En la figura, las abreviaturas muestran los siguientes carcinomas. ACC: carcinoma adenoideo quístico, BLCA: carcinoma de vejiga, CESC: carcinoma de células escamosas cervicales, COAD: adenocarcinoma de colon, DLBC: linfoma difuso de linfocitos B grandes, ESCA: carcinoma esofágico, GBM: glioblastoma, HNSC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, KICH: carcinoma de cromóforo renal, KIRC: carcinoma de células transparentes de estómago, KIRP: carcinoma renal de células papilares renales, LAML: leucemia mielógena aguda, LGG: glioma de bajo grado, LIHC: carcinoma hepatocelular de hígado, LUAD: adenocarcinoma de pulmón, LUSC: carcinoma de células escamosas de pulmón, MESO: mesotelioma maligno, OV: cáncer de ovario, PAAD: adenocarcinoma de páncreas, PCPG: feocromocitoma y paraganglioma, PRAD: adenocarcinoma de próstata, READ: adenocarcinoma rectal, SARC: sarcoma, SKCM: melanoma cutáneo de la piel, STAD: adenocarcinoma de estómago, TGCT: tumor testicular de células germinales, THCA: carcinoma de tiroides, THYM: timoma, UCEC: carcinoma endometrial del cuerpo uterino, UCS: carcinosarcoma uterino, UVM: melanoma uveal

(CTRL: control)

20 Los números en la figura representan el número de muestras de tumores individuales sometidos a secuenciación de ARN. En total, se analizaron 10.000 casos o más.

9. Expresión de CD274 en cánceres individuales

25 (Método)

TCGA divulga públicamente datos de expresión (se emplean valores RSEM y se emplean valores RPKM solo en cáncer de estómago) calculados en base a datos de secuenciación de ARN. Los niveles de expresión de CD274 (después de la transformación logarítmica) de los casos individuales de cáncer obtenidos en base a los datos se muestran como un histograma.

(Resultados)

35 La Figura 9 muestra los resultados de cuatro tipos de cánceres. Se observó una alta expresión de CD274 en algunos casos de varios tipos de cáncer. Por tanto, se determinó un valor de corte basado en valores de expresión y se realizó un análisis más específico. Como valor de corte, se utilizaron valores RSEM transformados logarítmicamente en los casos, excepto cáncer de estómago; considerando que se utilizó un valor RPKM transformado logarítmicamente en el caso del cáncer de estómago; más específicamente, se usó 8 en casos de cáncer, excepto cáncer de estómago y se usó 11 en el caso de cáncer de estómago (los valores de corte se establecen adecuadamente para la evaluación). En la Figura 9, SKCM representa melanoma cutáneo de piel (Figura 9A), COADREAD adenocarcinoma colorrectal, (Figura 9B), STAD adenocarcinoma de estómago (Figura 9C) y DLBC linfoma difuso de linfocitos B grandes (Figura 9D).

10. Análisis de la expresión de CD274 basado en datos TCGA

45 (Método)

Con respecto a los casos que exhiben un valor de corte TCGA o más (caso de expresión de CD274 alta), las expresiones de exones individuales se evaluaron en base a los datos de secuenciación de ARN ya mapeados, de la misma manera que en el Ejemplo 4, y mostrados por el IGV (visor de genoma integrativo) (proporcionado por Broad Institute).

(Resultados)

55 Los resultados se muestran en la Figura 10. De esos casos, se encontraron casos de mostrar el mismo patrón de expresión que ATL (expresión alta y sin expresión de UTR en 3'). Adicionalmente, en estos casos, las secuencias se analizaron más específicamente en función de los datos de secuenciación de ARN. Como resultado, se confirmó una anomalía estructural de CD274. Por ejemplo, se mencionan adenocarcinoma de estómago (STAD) (Figura 10A) y adenocarcinoma de colon (COAD) (Figura 10B). Aparte de estos, carcinoma de vejiga (BLCA): caso único; carcinoma de células escamosas cervicales (CESC): caso único; carcinoma renal de células transparentes renales (KIRC): caso único; adenocarcinoma de pulmón (LUAD): dos casos; adenocarcinoma de colon (COAD): caso único (dos casos en total)/cáncer rectal (READ): caso único; melanoma maligno cutáneo (SKCM): caso único; y adenocarcinoma de estómago (STAD): tres casos (4 casos en total) fueron los casos en donde se encontró el mismo patrón de expresión que ATL (alta expresión de CD274 y sin expresión de UTR en 3').

65 En la Figura 11, dos casos de linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBC) se mostraron de manera similar como

ejemplo (Figuras 11A y B). En DLBC, CD274 se expresó altamente en 2 casos de 48 casos con datos de secuenciación de ARN y se encontró la misma anomalía estructural en los dos casos.

Los números del 1 al 7 en la parte inferior de las Figuras 10 y 11 representan los números de exón.

Los resultados mostrados en las Figuras 10 y 11 demuestran que la anomalía estructural de CD274 incluyendo UTR en 3' y la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía estructural ocurren en varios tipos de cánceres.

11. Detección de anomalía de CD274 usando la matriz SNP

(Método)

El análisis del número de copias se realizó mediante una matriz SNP (método: GISTIC) en casos 426 de ATL.

De los pacientes que fueron diagnosticados como ATL y se obtuvieron sus consentimientos informados, se tomaron muestras de tumor de acuerdo con el protocolo aprobado por el comité de ética de la Universidad de Kyoto y se sometieron a análisis de mutación genética global.

En primer lugar, el análisis del número de copias utilizando muestras tumorales de casos 426 de ATL se realizó mediante una matriz SNP (282 casos de Affymetrix 250K, 144 casos de Illumina 610K). Como algoritmo, se utilizaron CNAG/AsCNAR y GISTIC2.0. Se identificó un aumento o disminución en el número de copias en los sitios locales.

(Resultados)

Los resultados basados en GISTIC se muestran en la Figura 12. En los pacientes con ATL, el número de copias aumentó en 26 sitios locales y el número de copias disminuyó en 50 sitios locales. Uno de los sitios es la región 9p24.1, en la que se observó la duplicación en tándem (14 %) de CD274 (PD-L1).

Los resultados basados en CNAG se muestran en la Figura 13. En la Figura 13, se muestra un aumento en el número de copias en el panel superior; mientras que se muestra una disminución en el número de copias en el panel inferior. La mayoría de las copias amplificadas en tándem en la región 9p24.1 (llamada GISTIC) eran copias truncadas que contenían el gen CD274 hasta la mitad del mismo y carecían de la UTR en 3'. Se observó una disminución en el número de copias, incluida parte del lado en 3' del gen CD274, lo que demuestra que una UTR en 3' defectuosa también es causada por una disminución en el número de copias. Al menos, en los casos que tienen un aumento en el número de copias de Miya23, Miya24 y Miya26, se encontró una anomalía estructural (+) con la UTR en 3' defectuosa por secuenciación del genoma completo y se encontró una alta expresión de CD274 por secuenciación de ARN. Los mismos hallazgos se obtuvieron también en los casos que tienen una disminución en el número de copias de Miya37, Miya38 y Sas2.

12. Detección de anomalía de CD274 mediante RQ-PCR

(Método)

La expresión de CD274 se evaluó mediante RQ-PCR en 13 casos de ATL.

El ARN se extrajo de las muestras de tumor ATL mediante el kit RNeasy Mini (QIAGEN) y se sometió a transcripción inversa mediante el kit ReverTra Ace (marca registrada) qPCR RT (TOYOBO), y luego, la PCR se realizó mediante SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA). La secuencia del cebador directo fue GGCATCCAAGATACAAACTCAA (SEQ ID NO: 10) y la secuencia del cebador inverso fue CAGAAGTTCCAATGCTGGATTA (SEQ ID NO: 11). En la PCR, se llevó a cabo una etapa de mantenimiento a 95 °C durante 10 segundos y se repitió 50 veces una etapa de ciclado (95 °C 5 segundos, 60 °C 30 segundos, 72 °C 30 segundos). La detección se realizó mediante LightCycler (marca registrada) 480 System (Roche Applied Science). Como control interno, se usó 18S y se mostró la relación con CD274.

(Resultados)

Los resultados se muestran en la Figura 14. En los casos de pacientes con ATL, se observaron tres casos que tenían una anomalía estructural (en el gráfico de barras, dos barras con una línea diagonal en negrita desde la parte superior derecha a la inferior izquierda (se observó duplicación en tándem) y una sola barra con una línea diagonal delgada desde la parte superior izquierda a la inferior derecha (se observó inversión)). En estos casos, CD274 se expresó altamente.

13. Inmunotinción de PD-L1 en ATL

(Método)

En tres casos, es decir, ATL059 sin anomalía estructural PD-L1 (SV: variación estructural), ATL075 de PD-L1 SV (+)

con ORF intacto y ATL012 de SV (+) con ORF truncado, Se inmunotizó PD-L1 con un anticuerpo anti-N terminal (E1J2J, Tecnología de Señalización Celular) y un anticuerpo anti-C terminal (SP142, Spring Bioscience).

5 Se visualizó un complejo de antígeno-anticuerpo mediante Histofine (marca registrada) Simple Stain MAXPO (Nichirei Bioscience).

(Resultados)

10 Los resultados se muestran en la Figura 15. La Figura 15A muestra los resultados de ATL059 sin PD-L1 SV (ATL059: PD-L1 SV (-)). La Figura 15B muestra los resultados de ATL075 de PD-L1 SV (+) que tiene un ORF intacto (ATL075: PD-L1 SV (+), ORF intacto). La Figura 15C muestra los resultados de ATL012 de SV (+) que tiene un ORF truncado (ATL012: PD-L1 SV (+), ORF truncado). En el panel superior de la Figura 15, se muestran los resultados de la inmunotinción con el anticuerpo anti-N terminal. En el panel inferior de la Figura 15, se muestran los resultados de la inmunotinción con el anticuerpo anti-C terminal. Como se muestra en la Figura 15A, en ATL059 que no tiene PD-L1 SV, las células tumorales no se tiñeron (en la Figura 15A, las células teñidas esporádicamente (se ve en gris en una fotografía monocroma) son macrófagos).

20 Como se muestra en la Figura 15B, ATL075 de PD-L1 SV (+) que tiene un ORF intacto se tiñó intensamente con anticuerpo anti-N terminal y anticuerpo anti-C terminal.

Como se muestra en la Figura 15C, ATL012 de SV (+) que tiene un ORF truncado se tiñó intensamente con el anticuerpo anti-N terminal y no se tiñó con el anticuerpo anti-C terminal.

25 Los resultados muestran que si PD-L1 SV está presente, la expresión de PD-L1 (a nivel de proteína) es fuerte y aumenta. El hecho de que ATL012 no esté teñido con el anticuerpo anti-C terminal es consistente con el hecho de que ORF está truncado. Adicionalmente, los resultados muestran que PD-L1 SV se puede identificar mediante doble tinción con el anticuerpo anti-N terminal y el anticuerpo anti-C terminal.

30 Los resultados muestran que los mismos resultados se obtienen también en transferencia de Western por anticuerpos contra PD-L1, es decir, un anticuerpo anti-N terminal y un anticuerpo anti-C terminal.

14. Expresión de PD-L1 en varios tipos de carcinomas

(Método)

35 Los casos (30 casos más bajos) correspondientes al 10 % superior se seleccionaron en base a 33 tipos de carcinomas (cáncer sólido) divulgados públicamente a partir de TCGA y datos de expresión (valores RSEM) calculados en base a datos de secuenciación de ARN de 10210 casos. Se descargaron los datos de secuenciación de ARN y se seleccionaron los casos del gen de fusión CD274 (+) y/o un inserto de virus (+) en la región CD274 y/o una relación de exón 4/UTR en 3' de CD274 relativamente alta. En cuanto a DLBC y STAD, dado que la frecuencia era alta, todos los casos se utilizaron como sujetos.

45 Se descargaron y analizaron datos de secuenciación de ARN de un total de 1691 casos. Basándose en los datos, se mostró la expresión de CD274 (después de que el valor RPKM del exón 4 se transformó logarítmicamente) de casos individuales de cada carcinoma.

(Resultados)

50 Los resultados se muestran en la Figura 16.

En la Figura 16, los círculos sólidos representan casos de gen de fusión CD274 (+) y/o una relación relativamente alta de exón 4/UTR en 3' de CD274. Los círculos dobles representan casos que tienen un inserto de virus (+) en la región CD274.

55 En 12 tejidos cancerosos en total (26 casos en total), se observó el gen de fusión CD274 (+) y/o un inserto de virus (+) en la región CD274 y/o una relación de exón 4/UTR en 3' de CD274 relativamente alta. A partir de los resultados, se encontró que se observó una anomalía de UTR en 3' truncada en CD274 en varios tipos de cánceres. Adicionalmente, estos casos ocurren principalmente donde CD274 se expresa más altamente en carcinomas, lo que sugiere que la UTR en 3' es extremadamente importante para regular la expresión de CD274.

60 BLCA: carcinoma de vejiga: caso único
 CESC: carcinoma de células escamosas cervicales: 2 casos
 COAD: adenocarcinoma de colon: 2 casos
 DLBC: linfoma difuso de linfocitos B grandes: 4 casos
 65 ESCA: carcinoma esofágico: caso único
 HNSC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello: caso único

KIRC: carcinoma de células transparentes de hígado: caso único
 LUAD: adenocarcinoma de pulmón: 2 casos
 READ: adenocarcinoma rectal: caso único
 SKCM: melanoma cutáneo de la piel: caso único
 STAD: adenocarcinoma de estómago: 9 casos
 UCEC: carcinoma endometrial del cuerpo uterino: caso único

15. Inserción del virus de carcinogénesis en la región CD274 y anomalía de UTR en 3' de CD274

(Método)

Utilizando datos de secuenciación de ARN de 1.691 casos descargados de TCGA, se investigó si la inserción de un virus relacionado con el cáncer en el genoma se encuentra dentro del gen CD274 o la periferia del mismo.

(Resultados)

Entre ellos, en los 26 casos mencionados anteriormente, tres casos (CESC: caso único, HNSC: caso único, STAD: caso único) tuvieron una inserción de un virus de carcinogénesis en la región CD274.

La Figura 17 muestra los resultados de la verificación de un caso VS-A9U7-01 (CESC) (Figura 17A) y un caso FP-7998-01 (STAD) (Figura 17B).

En el caso VS-A9U7-01 (CESC) que tiene un inserto del virus del papiloma humano (HPV) 16 en el intrón 6 de CD274, el ORF de un transcrito de CD274 se truncó en el exón 6 y se formó un transcrito que tiene el intrón 6 de CD274 seguido por el gen E2/E5 del HPV (virus del papiloma humano).

En el caso de FP-7998-01 (STAD) que tiene un inserto del virus de Epstein-Barr (EBV) en el intrón 3 de PLGRKT, que es un gen cadena arriba adyacente a CD274, se produjo una duplicación en tándem que incluye la región y se truncó un transcrito de CD274 en UTR en 3'.

Estos resultados muestran que la inserción de un virus de carcinogénesis en la región CD274 está asociada con una anomalía de UTR en 3' de CD274.

16. La expresión de CD274 aumenta notablemente al introducir una eliminación o una inversión en UTR en 3' de CD274 mediante el sistema CRISPR/Cas9.

(Método)

Se transfectó una línea celular humana (panel superior) o de ratón (panel inferior) con ARN_g y Cas9 (que apunta a dos sitios: extremo 5' y extremo 3' de la UTR en 3' de CD274). De esta manera, a estas líneas celulares, se introdujo mediante CRISPR (sistema de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares)/Cas9 una eliminación o inversión correspondiente a la longitud total (2,7 kb) de la UTR en 3' de CD274. Las células resultantes se purificaron y la expresión de CD274 en la superficie celular se evaluó mediante citometría de flujo. Se confirmó si se introdujo una eliminación o inversión deseada mediante PCR y secuenciación.

Como sujetos, se seleccionaron líneas celulares humanas, es decir, HEK293T (riñón fetal), T2 (híbrido de linfocitos T y linfocitos B), PC-9 (cáncer de pulmón) y líneas celulares de ratón, es decir, EG7-OVA (linfoma de linfocitos T, que expresa ovoalbúmina), P815 (mastocitoma) y B16-F10 (melanoma maligno).

(Resultados)

Los resultados se muestran en la Figura 18. Los resultados de las líneas celulares humanas se muestran en el panel superior y los resultados de las líneas celulares del ratón se muestran en el panel inferior.

Como resultado, en todas las líneas celulares humanas/de ratón utilizadas como sujetos, las líneas celulares (SgPD-L1 FxR) que tienen una eliminación o una inversión introducida en la UTR en 3' exhibieron un aumento notable en la expresión de CD274, en comparación con las líneas celulares parentales y las líneas celulares simuladas introducidas.

Estos resultados demuestran experimentalmente que existe una relación causal entre una anomalía estructural de UTR en 3' de CD274 identificada mediante análisis de genes y una alta expresión de CD274; más específicamente que la sobreexpresión de CD274 es inducida por la anomalía de UTR en 3' de CD274.

17. La alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 induce la apoptosis de los linfocitos T que expresan PD-1

(Método)

Para evaluar el efecto de la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 en el sistema de inmunidad *in vitro*, una línea celular PC-9 en la que se indujo una alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 mediante el sistema CRISPR-Cas9 o una línea celular de control (Simulado), y la línea de linfocitos T Jurkat con PD-1 introducida en el mismo o una línea celular de control que no tenía PD-1 (Simulado) introducida allí fueron cultivadas conjuntamente y, posteriormente, el grado de apoptosis de los linfocitos T Jurkat se evaluó mediante citometría de flujo utilizando anexina-V.

(Resultados)

Los resultados se muestran en la Figura 19. "SgPD-L1" de "PC-9" en el eje horizontal indica una línea celular PC-9 en la que se indujo una alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274. El "(-)" indica una línea celular PC-9 en la que no se indujo una alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274. PD-1 de "Jurkat" en el eje horizontal indica una línea de linfocitos T Jurkat que tiene PD-1 introducido en el mismo y "Simulado" indica una línea celular de control en la que no se introduce PD-1.

Se demostró que la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 induce fuertemente la apoptosis de los linfocitos T que expresan PD-1 (los resultados del control de isotipo a la derecha en la Figura 19).

Los resultados sugieren que la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 es responsable de la resistencia de la inmunidad.

18. La alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 promueve la tumorigénesis.

(Método)

Para evaluar el efecto de la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 en un potencial tumorigénico *in vivo*, se trasplantaron subcutáneamente a los ratones isogénicos la línea celular EG7-OVA (SgPd-L1), en la cual la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 se indujo mediante el sistema CRISPR-Cas9, y una línea celular de control (Simulado). Se administró un agente inmunoestimulador, poli (I: C) o PBS como control a partir del 7º día después del trasplante y se midió periódicamente el diámetro del tumor. En este experimento, se considera que poli (I: C) induce una inmunidad contra un tumor (en particular, ovoalbúmina).

(Resultados)

La Figura 20-1 muestra el protocolo del experimento. La Figura 20-2 muestra cambios en el diámetro del tumor; más específicamente, se muestra un cambio en el diámetro del tumor de Simulado en la Figura 20-2A y se muestra un cambio en el diámetro del tumor de la línea celular EG7-OVA (SgPD-L1), en el que se indujo una alta expresión de CD274, en la Figura 20-2B.

En la línea celular de control, se observó una reducción en el diámetro del tumor mediante la administración de poli (I: C); sin embargo, en la línea celular que tiene una alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274, el tumor aumentó, incluso si se administró poli (I: C), al mismo nivel que en la línea celular a la que no se administró poli (I: C).

Los resultados muestran que la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 puede superar el efecto de supresión tumoral por inmunidad antitumoral, *in vivo*.

19. La alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 suprime la infiltración de linfocitos T CD8 positivos en el tumor.

(Método)

En el experimento de trasplante de la línea celular EG7-OVA a ratones isogénicos realizado de la misma manera que en el Ejemplo 18, se extrajo un tumor de un ratón 14 o 15 días después del trasplante y se inmunotizó con CD8 y DAPI. De esta manera, se evaluó la infiltración de linfocitos T CD8 positivos en el tumor. El número de células CD8 positivas se contó en no menos de 20 campos de visualización de cortes tomados de 2 a 3 ratones representativos.

(Resultados)

La Figura 21-1 muestra imágenes teñidas. La Figura 21-2 muestra linfocitos T CD8 positivos dentro del tumor. De las imágenes teñidas de la Figura 21-1, en una imagen teñida (arriba a la derecha) de la línea celular de control (Simulado) a la que se administró poli (I: C), aumenta el número de linfocitos T CD8 positivos teñidos de verde.

En la línea celular de control (Simulado), la infiltración de linfocitos T CD8 positivos en el tumor aumentó mediante la administración de poli (I: C); sin embargo, en la línea celular (SgPD-L1) que expresa altamente CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274, incluso si se administró poli (I: C), el número de células infiltrantes solo aumentó ligeramente.

Los resultados sugieren que la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 tiene un efecto supresor de la infiltración de linfocitos T de citotoxicidad CD8 positivos en un tumor *in vivo*.

20. El bloqueo PD-1/PD-L1 puede suprimir la promoción de la formación de tumores y el efecto inmunosupresor por la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía UTR en 3' de CD274.

(Método)

Para confirmar el efecto del bloqueo PD-1/PD-L1 contra el potencial tumorigénico debido a la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 *in vivo*, una línea celular EG7-OVA, en la que la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 se indujo mediante el sistema CRISPR-Cas9, se trasplantó subcutáneamente a los ratones isogénicos. A los ratones a los que se administró un agente inmunoestimulante, poli (I:C), se les inyectó un anticuerpo anti-PD-L1 o un control de isotipo por vía intraperitoneal y se evaluó el efecto sobre el tumor EG7-OVA. En estos ratones receptores, se midió periódicamente el diámetro de un tumor. Catorce o quince días después del trasplante, se realizó una inmunotinción con CD8 y DAPI para evaluar el grado de infiltración de linfocitos T CD8 positivos en el tumor.

(Resultados)

La Figura 22-1 es un gráfico que muestra un cambio del diámetro del tumor con el tiempo. La Figura 22-2 muestra imágenes con inmunotinción con CD8 y DAPI. La Figura 22-3 muestra linfocitos T CD8 positivos en un tumor. En las imágenes teñidas en la Figura 22-2, el número de linfocitos T CD8 positivos teñidos de verde es mayor en un ratón al que se administró un anticuerpo anti-PD-L1 (Figura 22-3B) que en el ratón (Figura 22-3A) al que se administró un control de isotipo.

Como se muestra en las figuras, se encontró que la tumorigenicidad y la infiltración de linfocitos T CD8 positivos en un tumor se suprimen por un anticuerpo anti-PD-L1.

Los resultados muestran que el bloqueo PD-1/PD-L1 puede suprimir la formación de tumores y el efecto inmunosupresor debido a la alta expresión de CD274 en asociación con la anomalía de UTR en 3' de CD274 *in vivo*.

21. El mutante en el que CD274 SV ejecutó un ORF de CD274 mantiene la capacidad de unión a PD-1.

(Método)

Utilizando muestras de pacientes con ATL (5 muestras de ATL049, ATL050, ATL022 y ATL079) o una línea celular PC-9, a la que se introdujo CD274 tipo silvestre (TS) o un mutante de truncamiento mediante un retrovirus, se evaluó la capacidad de unión a PD-1 Ig mediante citometría de flujo. De las muestras de pacientes con ATL, ATL050 tenía ORF intacto (Intacto) sin truncamiento, ATL022 y ATL079 tenían un ORF truncado (truncado). El mutante introducido en PC-9 procedió de ATL020 (Ex7 defectuoso) o ATL079 (Ex6 y 7 defectuoso).

(Resultados)

La Figura 23 muestra los resultados. La Figura 23A muestra los resultados de la evaluación de las muestras de pacientes con ATL y la Figura 23B muestra los resultados de la línea celular PC-9.

Se confirmó cualquiera de las muestras de pacientes con ATL y la línea celular PC-9 introducida en el gen CD274, independientemente del ORF intacto o truncado, que se une a un receptor de PD-L1, es decir, PD-1.

Los resultados muestran que la capacidad de unión de PD-1 no se ve afectada por el truncamiento de ORF de CD274 debido a una anomalía estructural de CD274 y se mantiene la función de CD274 sobreexpresada como se ve en los casos de CD274 SV (+).

22. CD274 SV se refiere a la sobreexpresión de CD274 independientemente del número de copias en la región CD274

(Método)

Usando la muestra DLBC 48 y la muestra STAD415 descargadas de TCGA y la muestra ATL43 (muestra experimental de la invención), se examinó cómo relacionar la expresión de CD274 (exón 4 RPKM) obtenida por análisis de secuenciación de ARN y el número de copias en la región CD274 obtenida por la matriz SNP con la expresión de CD274. Como método estadístico, se empleó el análisis de covarianza.

(Resultados)

5 La Figura 24 muestra los resultados. La Figura 24A muestra los resultados de DLBC (linfoma de linfocitos B). La Figura 24B muestra los resultados de STAD (adenocarcinoma de estómago). La Figura 24C muestra los resultados de ATL (leucemia de linfocitos T adultos). En la Figura 24, los círculos sólidos representan los casos del gen de fusión CD274 (+) y/o una relación de exón 4/UTR en 3' de CD274 relativamente alta y los círculos dobles representan los casos de un inserto de virus (+) en la región CD274.

10 En uno cualquiera de DLBC, STAD y ATL, CD274 SV se relacionó significativamente de forma independiente con la alta expresión de CD274.

15 Se sabe que un aumento en el número de copias de CD274 se relaciona con una alta expresión de CD274; sin embargo, los resultados demuestran que CD274 SV se relaciona con la expresión de CD274 independientemente del número de copias de CD274.

Aplicabilidad industrial

20 La presente invención permite determinar la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 en varios tipos de cánceres, y determinar además la eficacia de un bloqueo PD-1/PD-L1 por paciente con un tumor maligno. Como resultado, se puede aumentar la posibilidad de un bloqueo PD-1/PD-L1 en el tratamiento de tumores malignos.

Texto libre del listado de secuencias

25 SEQ ID NO: 10, cebador 11

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Kyoto University

<120> Un método para predecir la eficacia de la terapia de inhibición de PD-1/PD-L1 mediante la evaluación de la anomalía genómica del gen PD-L1(CD274)

35 <130> PH-6552-PCT

<150> JP 2015-093599

<151> 30/04/2015

40 <160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1135

45 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 767 730 T3

atgaggatat ttgctgtctt tatattcatg acctactggc atttgctgaa cgcatttact 60
 gtcacgggtc ccaaggacct atatgtggtg gagtatggta gcaatatgac aattgaatgc 120
 aaattcccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180
 gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaaggttca gcatagtagc 240
 tacagacaga gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300
 atcacagatg tgaaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgatcag ctatggtggt 360
 gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaaaga 420
 attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaactga catgtcaggc tgagggtctac 480
 cccaaggccg aagtcactctg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540
 accaccaatt ccaagagaga ggagaagctt ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600
 acaacaacta atgagatfff ctactgcact tttaggagat tagatcctga ggaaaacat 660
 acagctgaat tggatcatccc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aaggactcac 720
 ttggttaattc tgggagccat cttattatgc cttggtgtag cactgacatt catcttccgt 780
 ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aatgtggca tccaagatac aactcaaag 840
 aagcaaagtg gcctccaggc ctgtgatgag agaagctgcc gtgaagacct ctgacatgcc 900
 ctggagacat tttcctcatt gtcttgggtga ttaacatttg gctcctcctt acttatacaa 960
 atttctgcag ccagcttgag gttcttctca gagaatgtgt ttttcttttt tatcacattg 1020
 tcaggctgca aatfffctga actffaatgc tccgcttctt cttgaaacat aagttccaat 1080
 tccatatcat atctttgtga atgaataaaa cttaatgctt ttaaaaaaaaa aaaaa 1135

<210> 2
 <211> 2710
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

5

ES 2 767 730 T3

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| tccagcattg | gaacttctga | tcttcaagca | gggattctca | acctgtggtt | taggggttca | 60 |
| tcggggctga | gcgtgacaag | aggaaggaat | gggccctgg | gatgcaggca | atgtgggact | 120 |
| taaaaggccc | aagcactgaa | aatggaacct | ggcgaaagca | gaggaggaga | atgaagaaag | 180 |
| atggagtcaa | acagggagcc | tggagggaga | ccttgatact | ttcaaatgcc | tgaggggctc | 240 |
| atcgacgcct | gtgacagggg | gaaaggatac | ttctgaacaa | ggagcctcca | agcaaatcat | 300 |
| ccattgctca | tcctaggaag | acggggtgag | aatccctaata | ttgaggggtca | gttcctgcag | 360 |
| aagtgcctt | tgctccact | caatgcctca | atttgttttc | tgcatgactg | agagtctcag | 420 |
| tgttggaacg | ggacagtatt | tatgtatgag | tttttctat | ttattttgag | tctgtgaggt | 480 |
| cttcttgctca | tgtgagtgtg | gttgtgaatg | atctcttttg | aagatatatt | gtagtagatg | 540 |
| ttacaatfff | gtcgccaaac | taaacttgct | gcttaatgat | ttgctcacat | ctagtaaac | 600 |
| atggagtatt | tgtaaggtgc | ttggtctcct | ctataactac | aagtatacat | tggaagcata | 660 |
| aagatcaaac | cgttggttgc | ataggatgtc | acctttatff | aaccattaa | tactctggtt | 720 |
| gacctaatct | tattctcaga | cctcaagtgt | ctgtgcagta | tctgttccat | ttaaatatca | 780 |
| gctttacaat | tatgtggtag | cctacacaca | taatctcatt | tcacgctgt | aaccacctg | 840 |
| ttgtgataac | cactattatt | ttacccatcg | tacagctgag | gaagcaaac | gattaagtaa | 900 |
| cttgcccaa | ccagtaaata | gcagacctca | gactgccacc | cactgtcctt | ttataataca | 960 |
| atftacagct | atattttact | ttaagcaatt | cttttattca | aaaaccattt | attaagtgcc | 1020 |
| cttgcaatat | caatcgctgt | gccaggcatt | gaatctacag | atgtgagcaa | gacaaagtac | 1080 |
| ctgtcctcaa | ggagctcata | gtataatgag | gagattaaca | agaaaatgta | ttattacaat | 1140 |
| ttagtccagt | gtcatagcat | aaggatgatg | cgaggggaaa | acccgagcag | tgttgccaag | 1200 |
| aggaggaaat | aggccaatgt | ggtctgggac | ggttgatata | acttaaacat | cttaataatc | 1260 |
| agagtaatff | tcattttaca | agagaggtcg | gtacttaaaa | taaccctgaa | aaataacact | 1320 |
| ggaattcctt | ttctagcatt | atattttattc | ctgatttgcc | tttgccatat | aatctaagtc | 1380 |
| ttgtttatat | agtgtctggt | attgtttaac | agttctgtct | tttctattta | aatgccacta | 1440 |
| aatfttaaat | tcatacctff | ccatgattca | aaattcaaaa | gatcccattg | gagatggttg | 1500 |
| gaaaatctcc | acttcatcct | ccaagccatt | caagtttctt | ttccagaagc | aactgctact | 1560 |
| gcctttcatt | catatgttct | tctaaagata | gtctacattt | ggaaatgtat | gttaaaagca | 1620 |
| cgtatftfta | aaatftftft | cctaaatagt | aacacattgt | atgtctgctg | tgtactttgc | 1680 |
| tatftftatt | tatftftagt | tttcttatat | agcagatgga | atgaatttga | agttcccagg | 1740 |
| gctgaggatc | catgccttct | ttgtttctaa | gttatctttc | ccatagcttt | tcattatctt | 1800 |

ES 2 767 730 T3

tcatatgatc cagtatatgt taaatatgtc ctacatatac atttagacaa ccaccatttg 1860
 ttaagtattt gctctaggac agagtttggg tttgtttatg tttgctcaaa aggagaccca 1920
 tgggctctcc aggggtgact gagtcaatct agtcctaaaa agcaatctta ttattaactc 1980
 tgtatgacag aatcatgtct ggaacttttg ttttctgctt tctgtcaagt ataaacttca 2040
 ctttgatgct gtacttgcaa aatcacattt tctttctgga aattccggca gtgtaccttg 2100
 actgctagct accctgtgcc agaaaagcct cattcgttgt gcttgaacct ttgaatgcca 2160
 ccagctgtca tcactacaca gccctcctaa gaggcttcct ggaggtttcg agattcagat 2220
 gccctgggag atcccagagt ttcctttccc tcttggccat attctggtgt caatgacaag 2280
 gagtaccttg gctttgccac atgtcaaggc tgaagaaaca gtgtctcaa cagagctcct 2340
 tgtgttatct gtttgtacat gtgcatttgt acagtaattg gtgtgacagt gttctttgtg 2400
 tgaattacag gcaagaattg tggctgagca aggcacatag tctactcagt ctattcctaa 2460
 gtcctaactc ctcttctgtg tgttggattt gtaaggcact ttatcccttt tgtctcatgt 2520
 ttcacatgta atggcatagg cagagatgat acctaatct gcatttgatt gtcacttttt 2580
 gtacctgcat taatttaata aatattctt atttattttg ttacttggtg caccagcatg 2640
 tccattttct tgtttatttt gtgtttaata aatggttcag ttaacatcc cagtggagaa 2700
 agttaaaaaa 2710

<210> 3
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 20 25 30

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 35 40 45

Glu Thr
 50

10

<210> 4
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 4

ES 2 767 730 T3

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 20 25 30

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Ala Glu Thr Gly Phe
 35 40 45

His Cys Val Ser Gln Asp Gly Leu Asn Leu Leu Thr Ser
 50 55 60

<210> 5
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 20 25 30

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp His Pro Gly Ser
 35 40 45

His His Ser Pro Ala Ser Val Ser Arg Val Ala Gly Thr Thr Gly Ala
 50 55 60

His His His Ala Gln Gln Ile Phe Cys Val Phe
 65 70 75

10

<210> 6
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 6

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 20 25 30

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Gly Leu Gln Ala Cys
 35 40 45

Asp Glu Arg Ser Cys Arg Glu Asp Leu
 50 55

20

ES 2 767 730 T3

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Asp Trp Glu Arg Asp Phe His Met Asn
20 25 30

Cys Leu Gln Ile Pro Arg Glu
35

10

<210> 8
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 8

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Ala Glu Gly Leu Ser Gln Leu Ser
20 25 30

Pro Gln Leu Leu
35

20

<210> 9
<211> 37
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 9

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
1 5 10 15

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Asp Arg Asp Lys Arg Lys Thr Ala Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Gly Leu
35

30

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

35

<220>
<223> Cebador

<400> 10
ggcatccaag atacaaactc aa

22

ES 2 767 730 T3

| | | |
|----|--|----|
| 5 | <210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <223> Cebador | |
| 10 | <400> 11 cagaagttcc aatgctggat ta | 22 |
| 15 | <210> 12 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <223> Sintético | |
| 20 | <400> 12 acacagctga tcacaaaaat gtaaacata aaagtgcaat | 40 |
| 25 | <210> 13 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial | |
| | <220> <223> Sintético | |
| 30 | <400> 13 aaactcaaag aagcaaagt gtaagaatat cagaaggaat | 40 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para predecir si un bloqueo PD-1/PD-L1 es eficaz o no para el tratamiento de un sujeto que padece un tumor maligno, que comprende detectar una eliminación completa o parcial en la región UTR en 3' del gen PD-L1 en una célula tumoral que se ha tomado del sujeto y evaluar el bloqueo PD-1/PD-L1 como útil para el tratamiento del sujeto cuando está presente la eliminación completa o parcial en la región UTR en 3' del gen PD-L1.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la eliminación en la región UTR en 3' del gen PD-L1 se induce por el cambio en el número de copias del gen PD-L1.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende cuantificar un transcrito de uno cualquiera del exón 1 al exón 5 del gen PD-L1 y un transcrito de la región UTR en 3' del gen PD-L1 y calcular una relación entre la cantidad del transcrito del exón y la cantidad del transcrito de la región UTR en 3', y evaluar el bloqueo PD-1/PD-L1 como útil para el tratamiento del cáncer cuando la relación no es inferior a un valor predeterminado.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la tinción de una proteína PD-L1 en una célula tumoral tomada del sujeto mediante tinción inmunohistoquímica usando un anticuerpo contra una región C terminal de PD-L1 y un anticuerpo contra una región N terminal de PD-L1, y evaluar el bloqueo PD-1/PD-L1 como útil para el tratamiento del sujeto cuando la célula tumoral se tiñe con el anticuerpo contra una región N terminal de PD-L1 pero la célula tumoral no se tiñe con el anticuerpo contra una región C terminal de PD-L1.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tumor maligno se selecciona del grupo que consiste en leucemia de linfocitos T adultos/linfoma de leucemia de linfocitos T adultos, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, adenocarcinoma de pulmón, melanoma maligno cutáneo y linfoma de linfocitos B.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tumor maligno se selecciona del grupo que consiste en cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer rectal y cáncer de cuerpo uterino.
- 35 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el bloqueo PD-1/PD-L1 es el anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además detectar una anomalía estructural de duplicación en tándem, inversión, translocación o eliminación en la región 9p24.1 en asociación con la eliminación completa o parcial en la región UTR en 3' del gen PD-L1.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el tumor maligno es leucemia de linfocitos T adultos/linfoma de leucemia de linfocitos T adultos.

Fig. 1

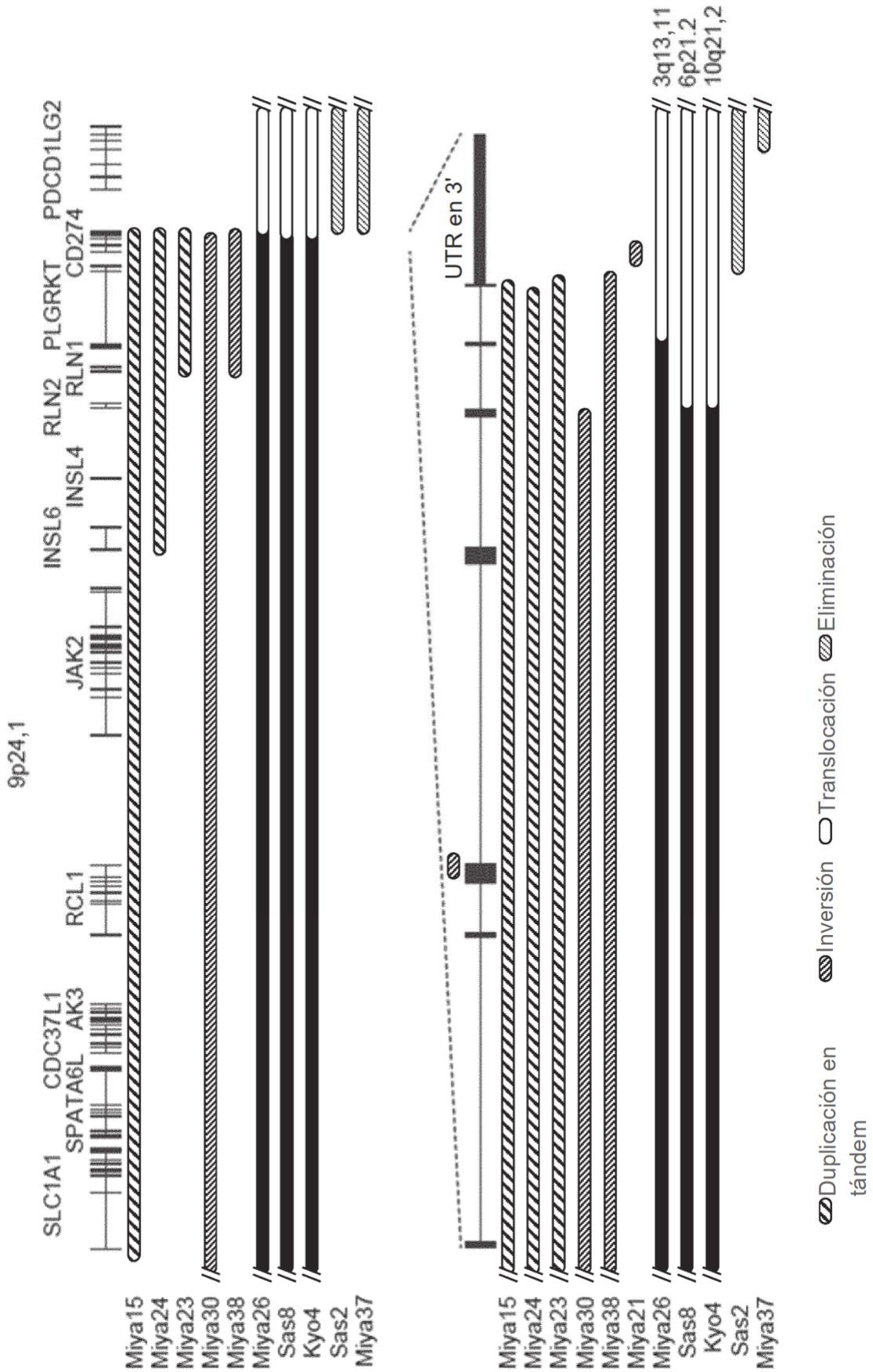


Fig. 2

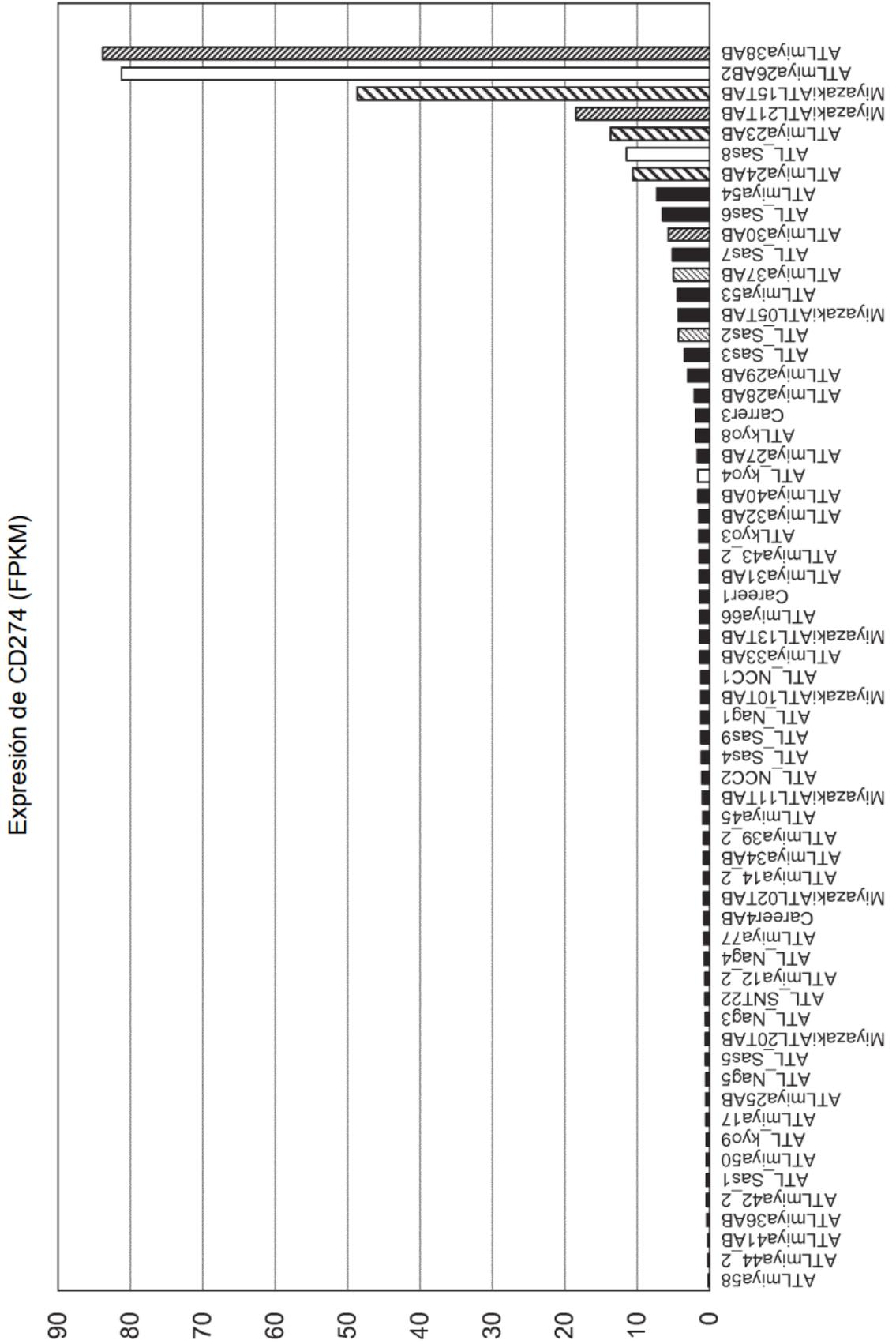


Fig. 3

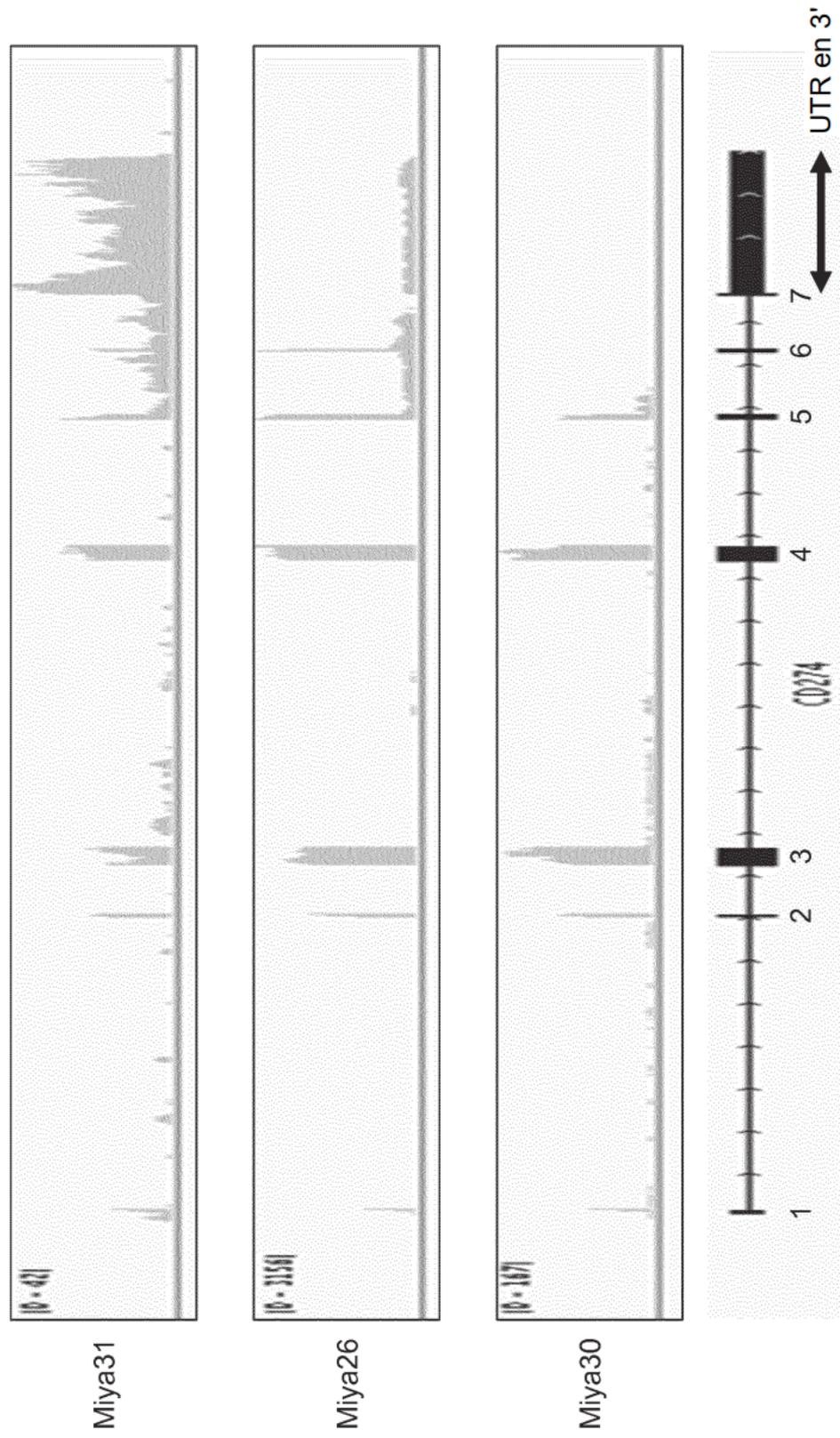


Fig. 4

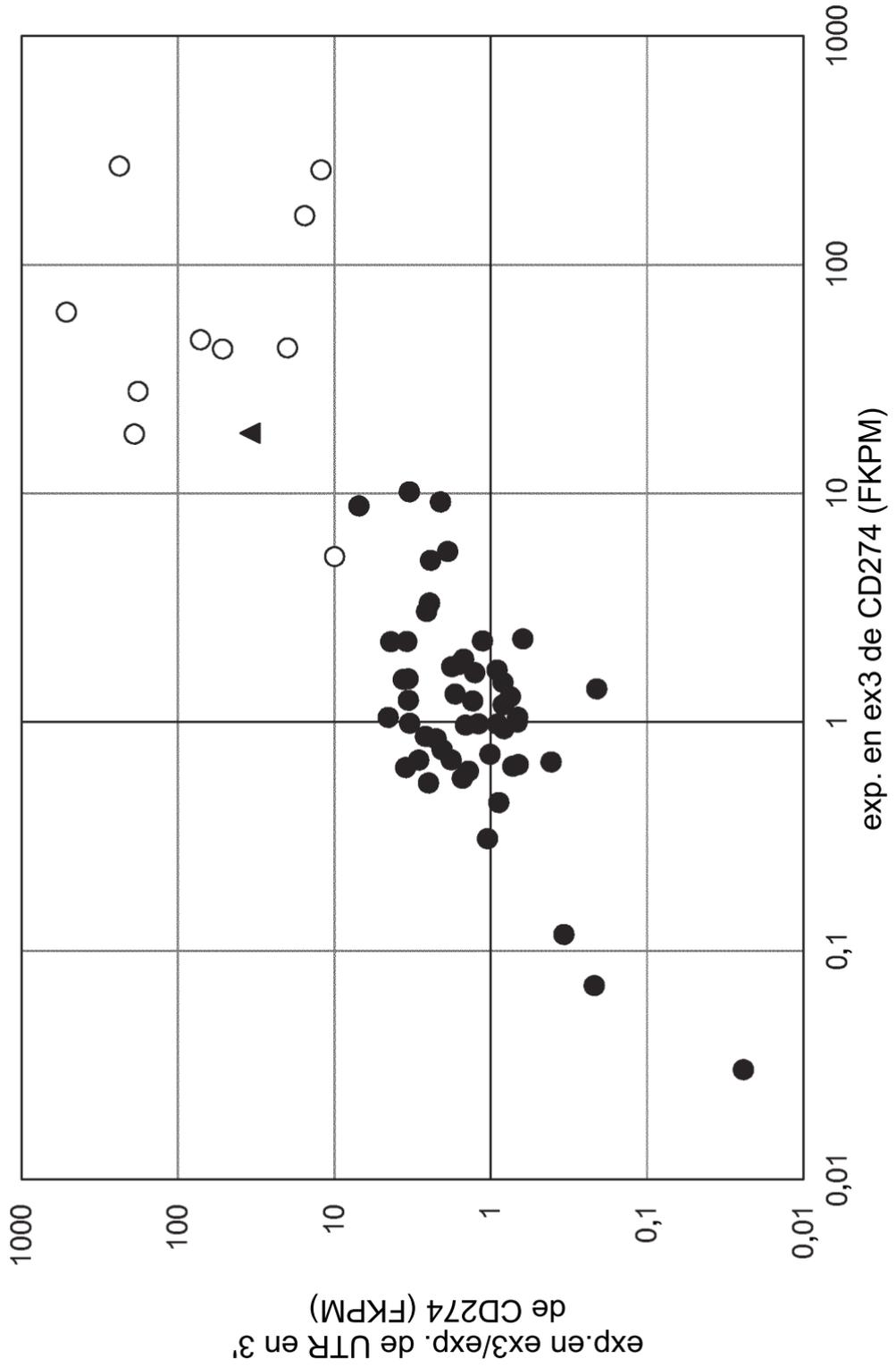


Fig. 5

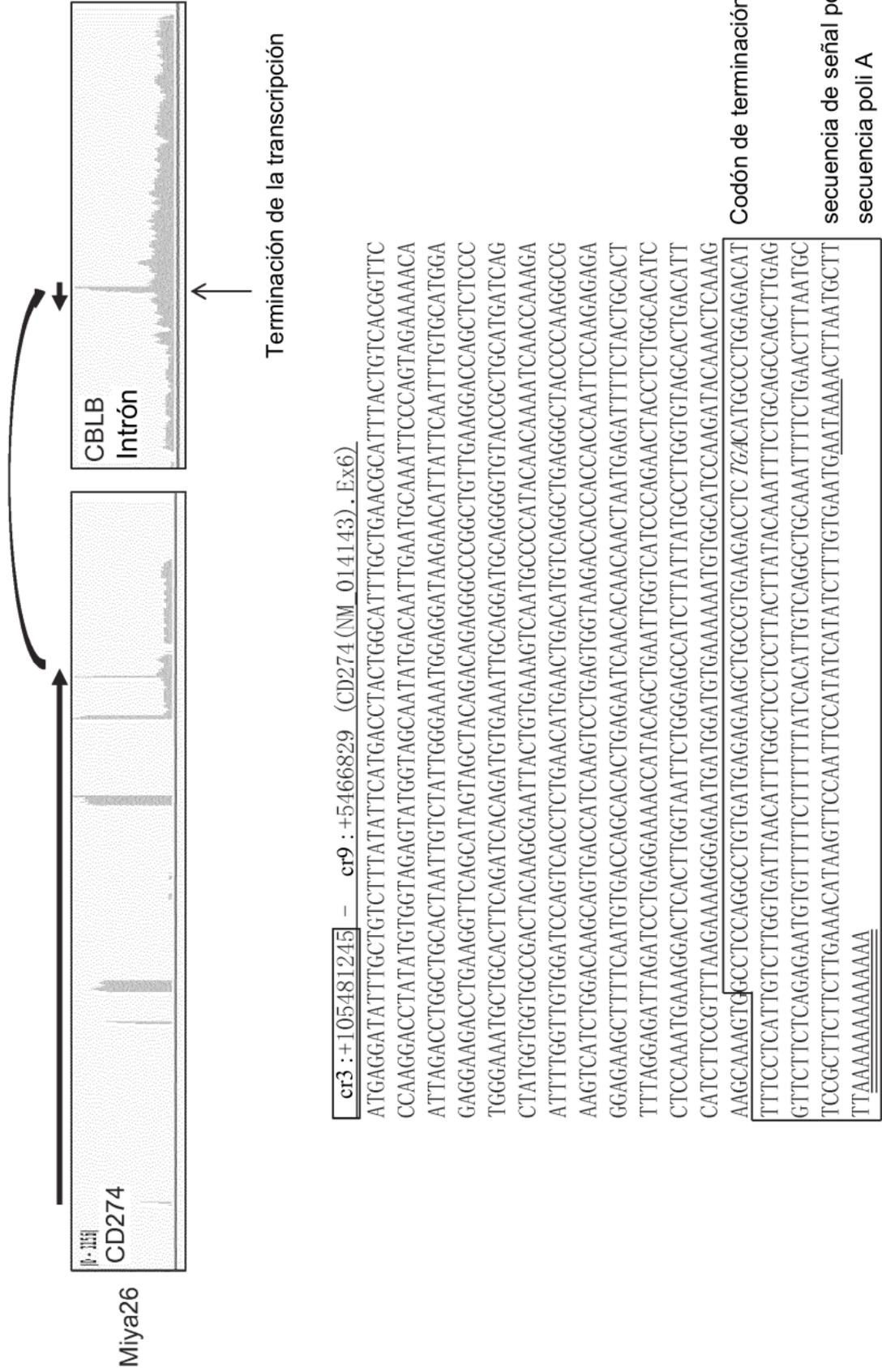


Fig. 6

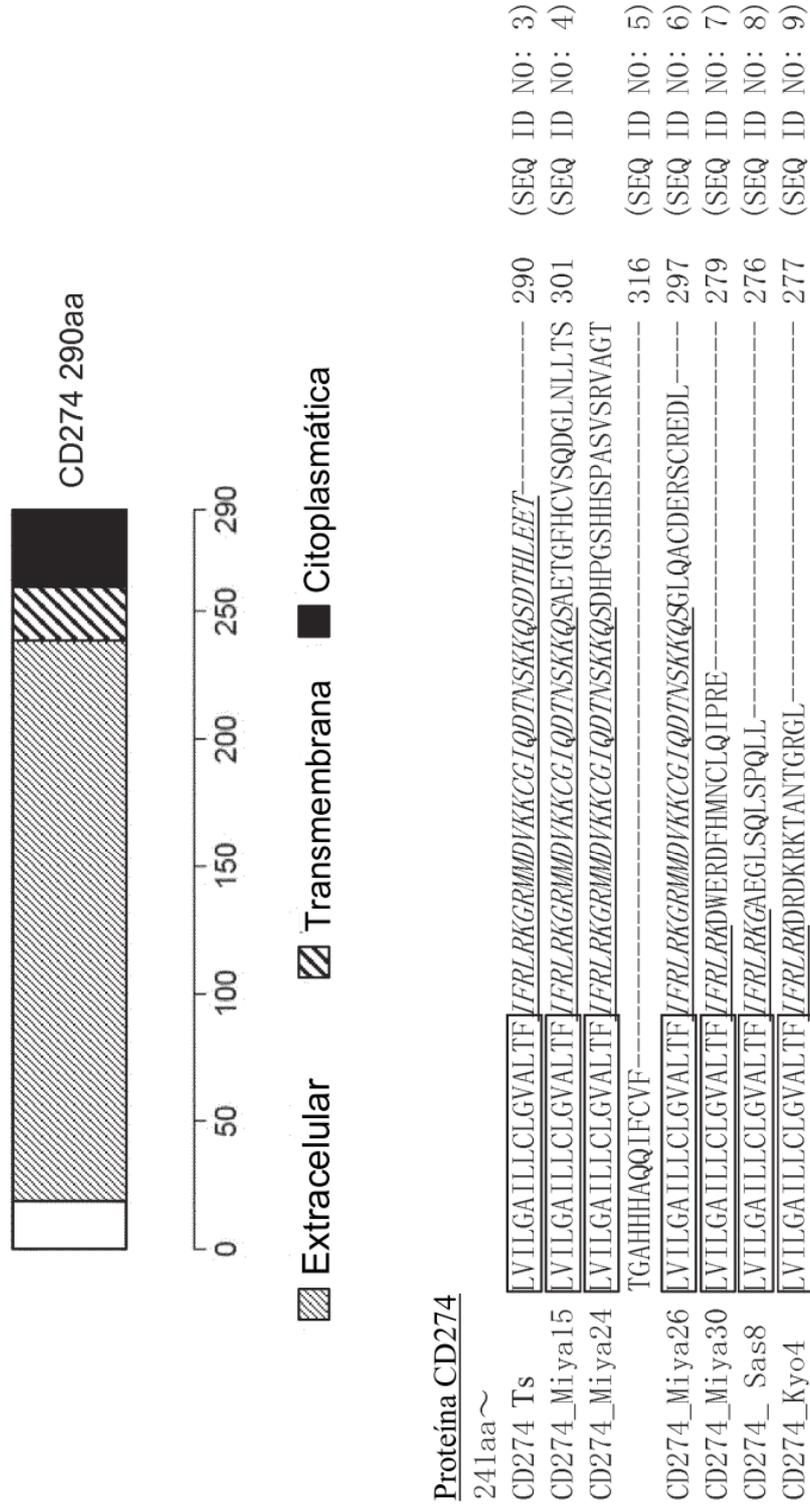
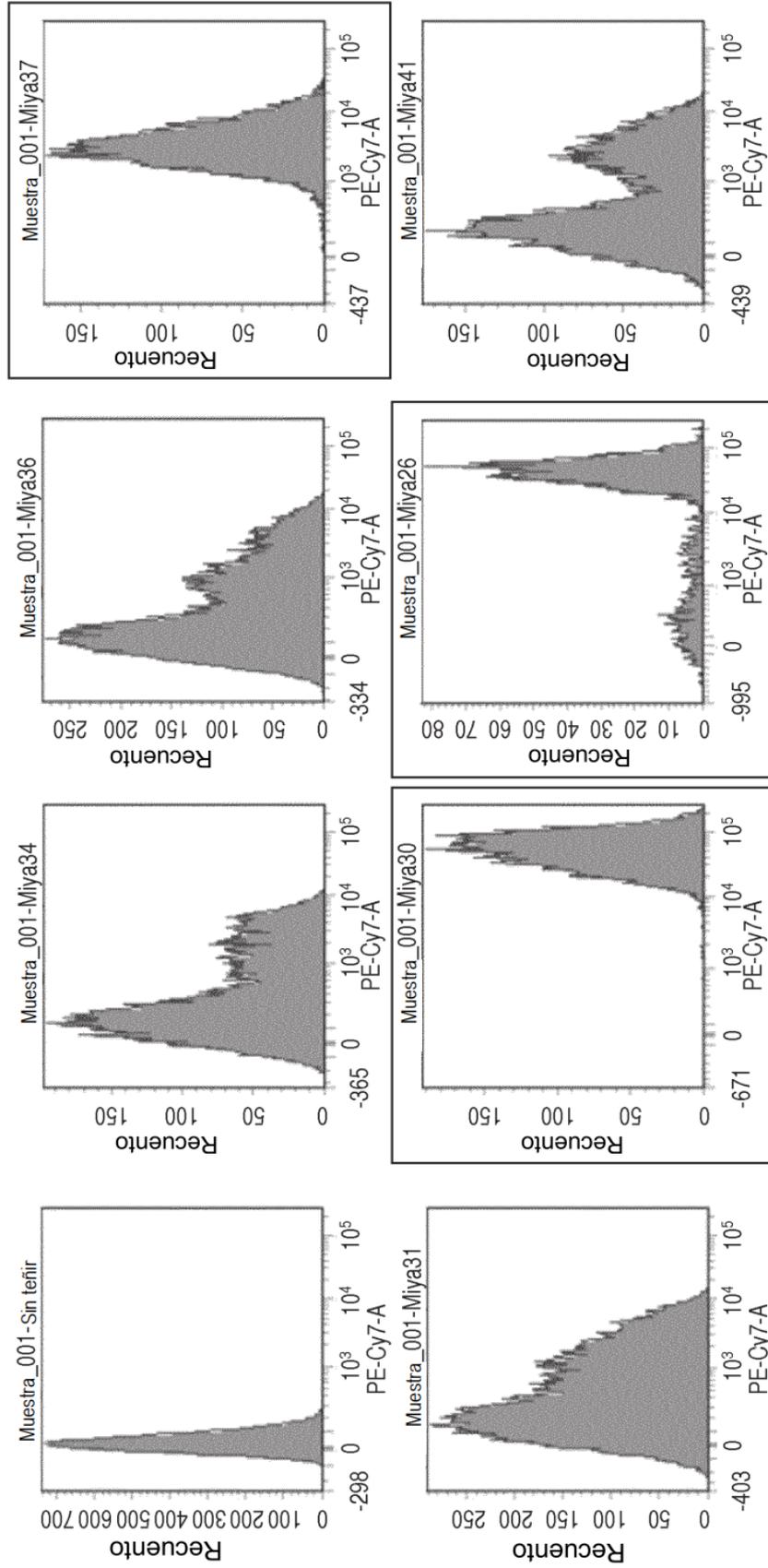


Fig. 7



Expresión de CD274

Fig. 8

TCGA

| | | | | | |
|------|------|------|------|-------|------|
| ACC | BLCA | BRCA | CESC | CHOL | CNTL |
| 79 | 414 | 1119 | 306 | 36 | 1 |
| COAD | DLBC | ESCA | GBM | HNSC | KICH |
| 486 | 48 | 185 | 170 | 522 | 66 |
| KIRC | KIRP | LAML | LGG | LIHC | LUAD |
| 542 | 291 | 179 | 534 | 374 | 541 |
| LUSC | MESO | OV | PAAD | PCPG | PRAD |
| 502 | 87 | 420 | 179 | 184 | 502 |
| READ | SARC | SKCM | STAD | TGCT | THCA |
| 167 | 263 | 472 | 420 | 156 | 513 |
| THYM | UCEC | UCS | UVM | TOTAL | |
| 120 | 557 | 57 | 80 | 10572 | |

Fig. 9

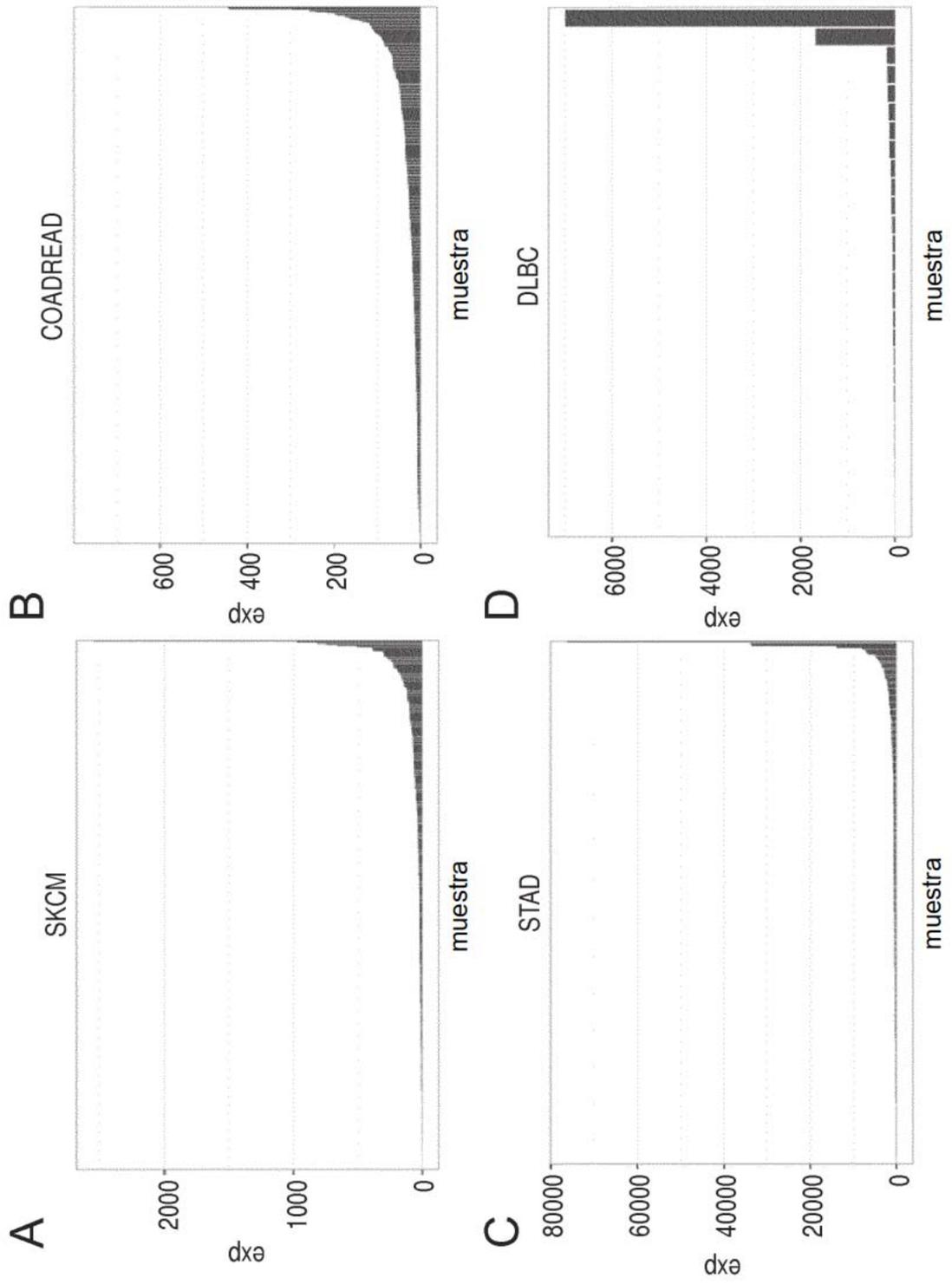


Fig. 10

A

TCGA-FP-7998-01A-11R-2203-13 (STAD) → cr9:+5468590- cr9:-3212251 (Duplicación en tándem)



B

TCGA-AZ-4616-01A-21R-1839-07 (COAD) → truncado en cr 9

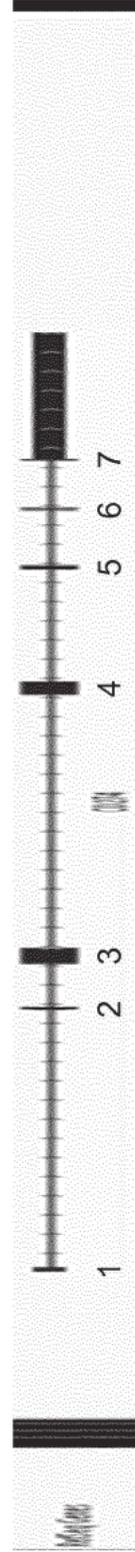
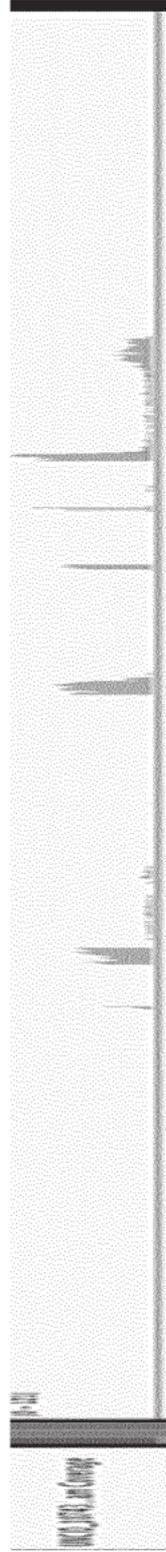


Fig. 11

A

TCGA-FA-A4XK-01A-11R-A310-07 (DLBC) → cr9:+5467897 - cr9:-5514203 (Duplicación en tándem)



B

TCGA-G8-6909-01A-11R-2213-07 -07 (DLBC) → truncado en cr 9:5467913

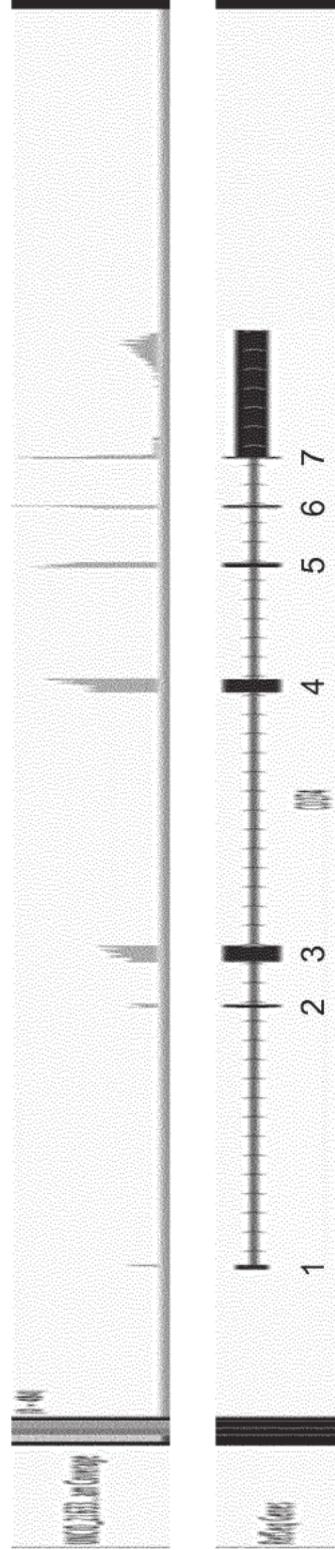


Fig. 12

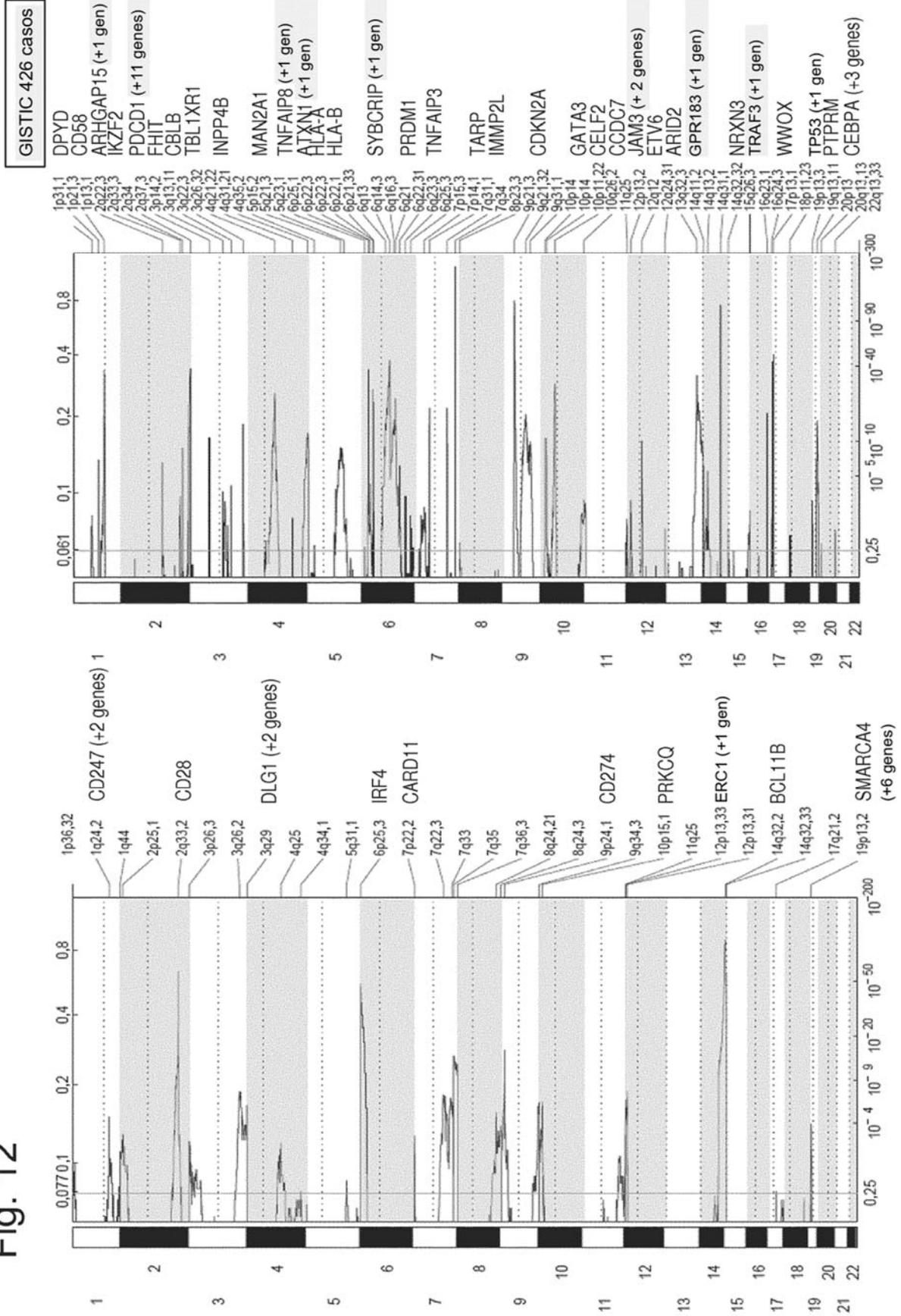


Fig. 13

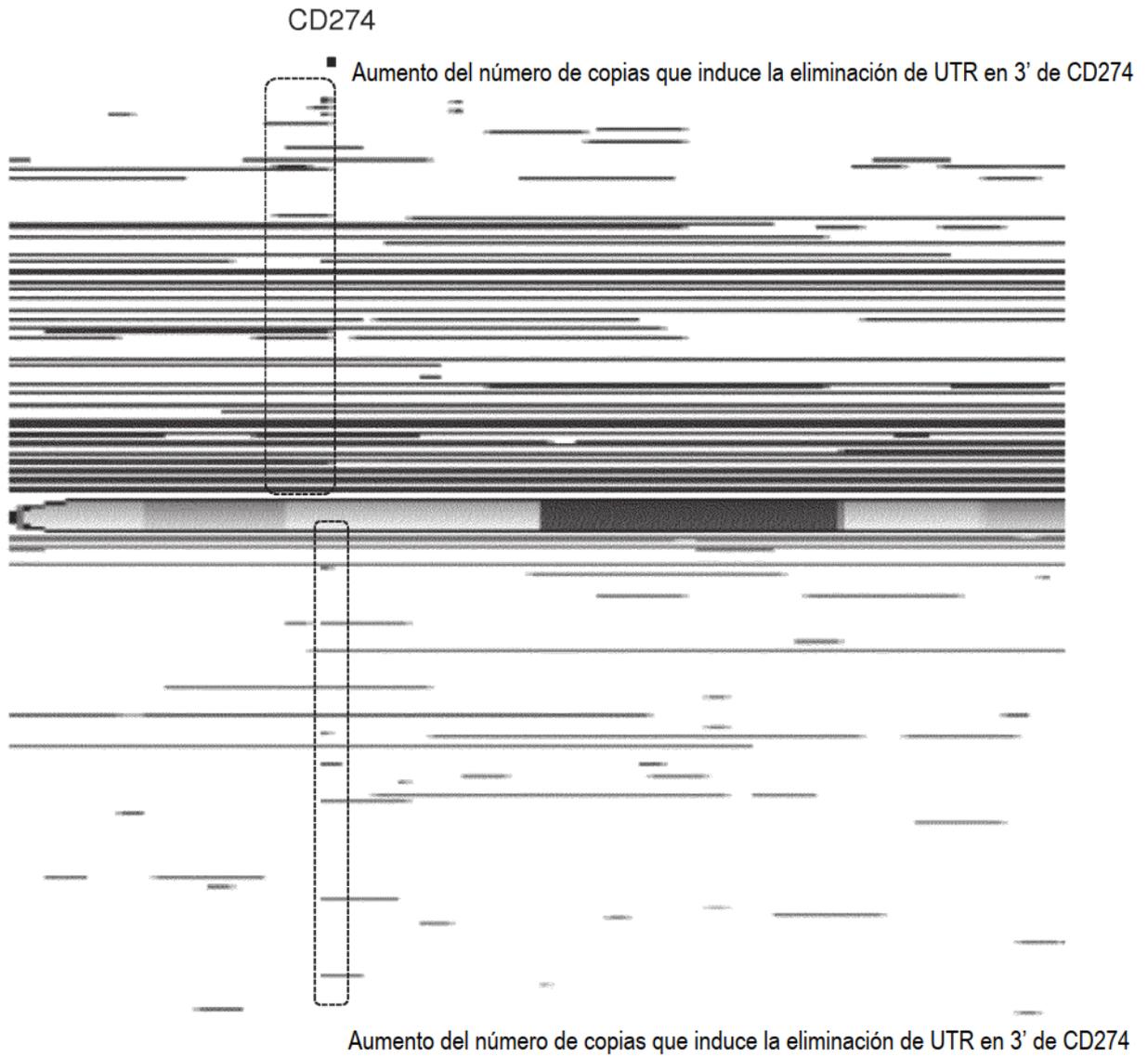


Fig. 14

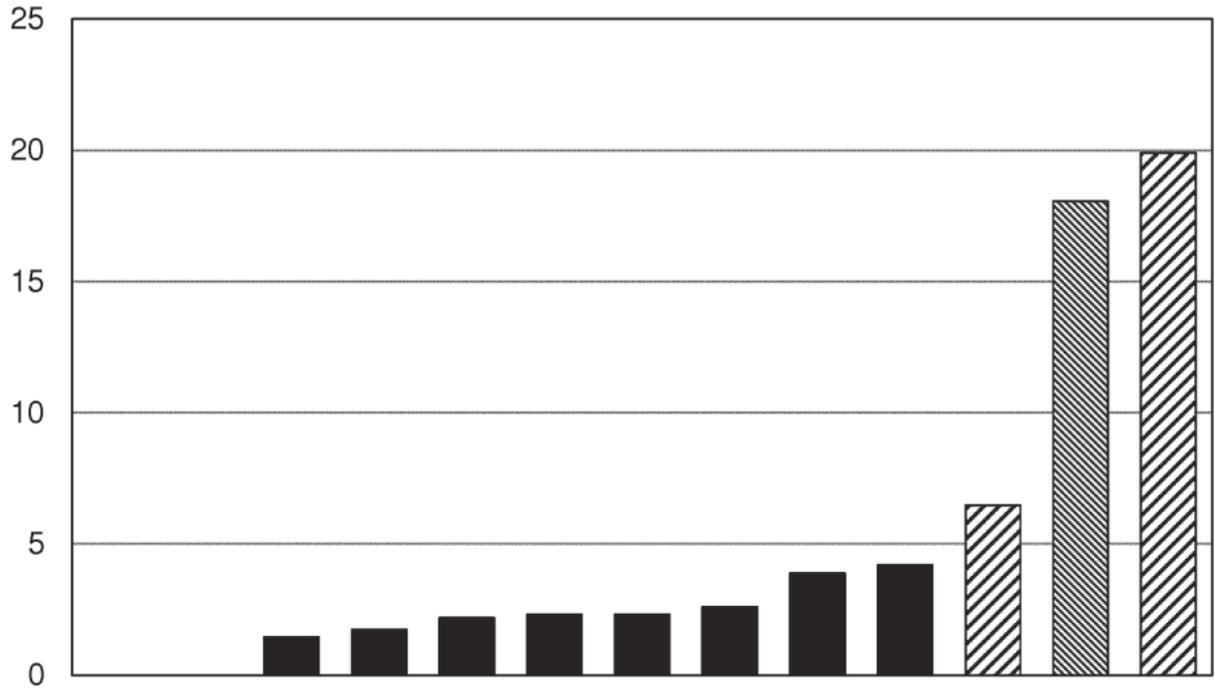


Fig. 15

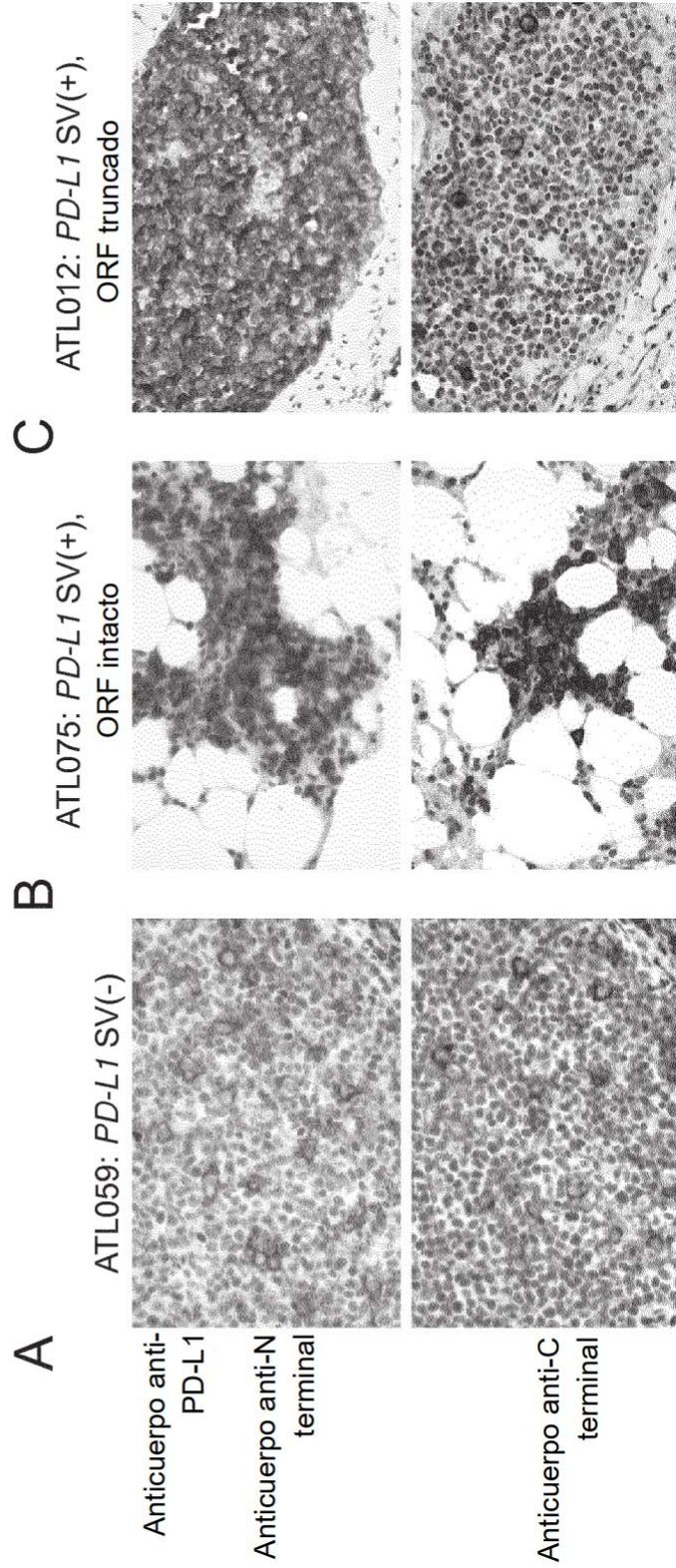
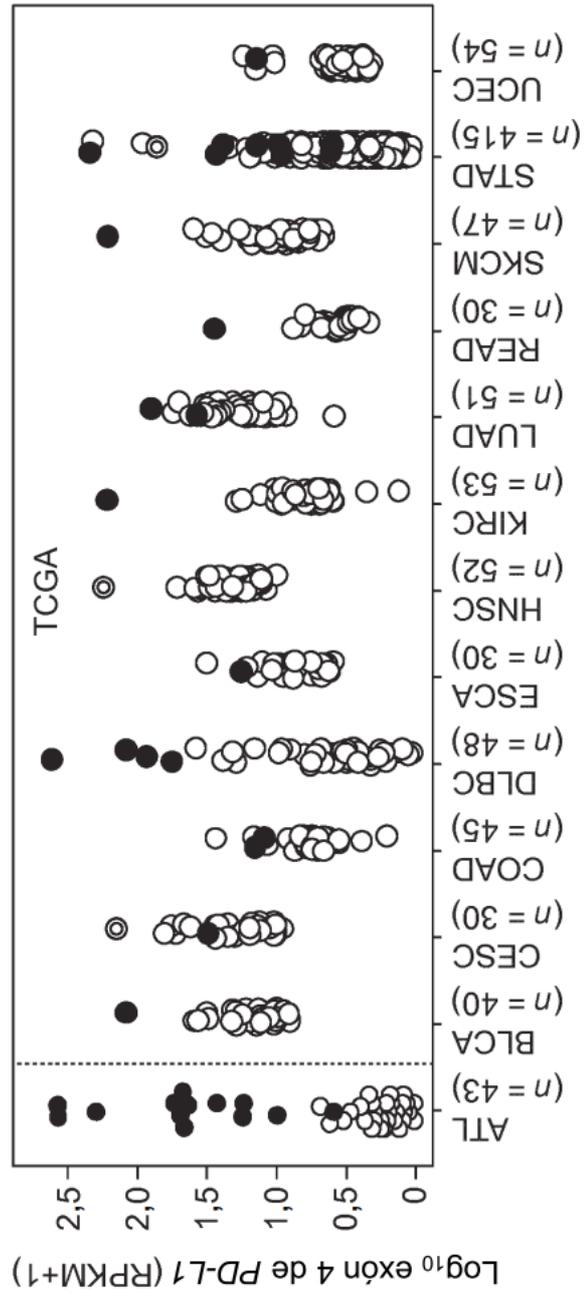


Fig. 16



12 tejidos; identificado en 26 casos

Fig. 17

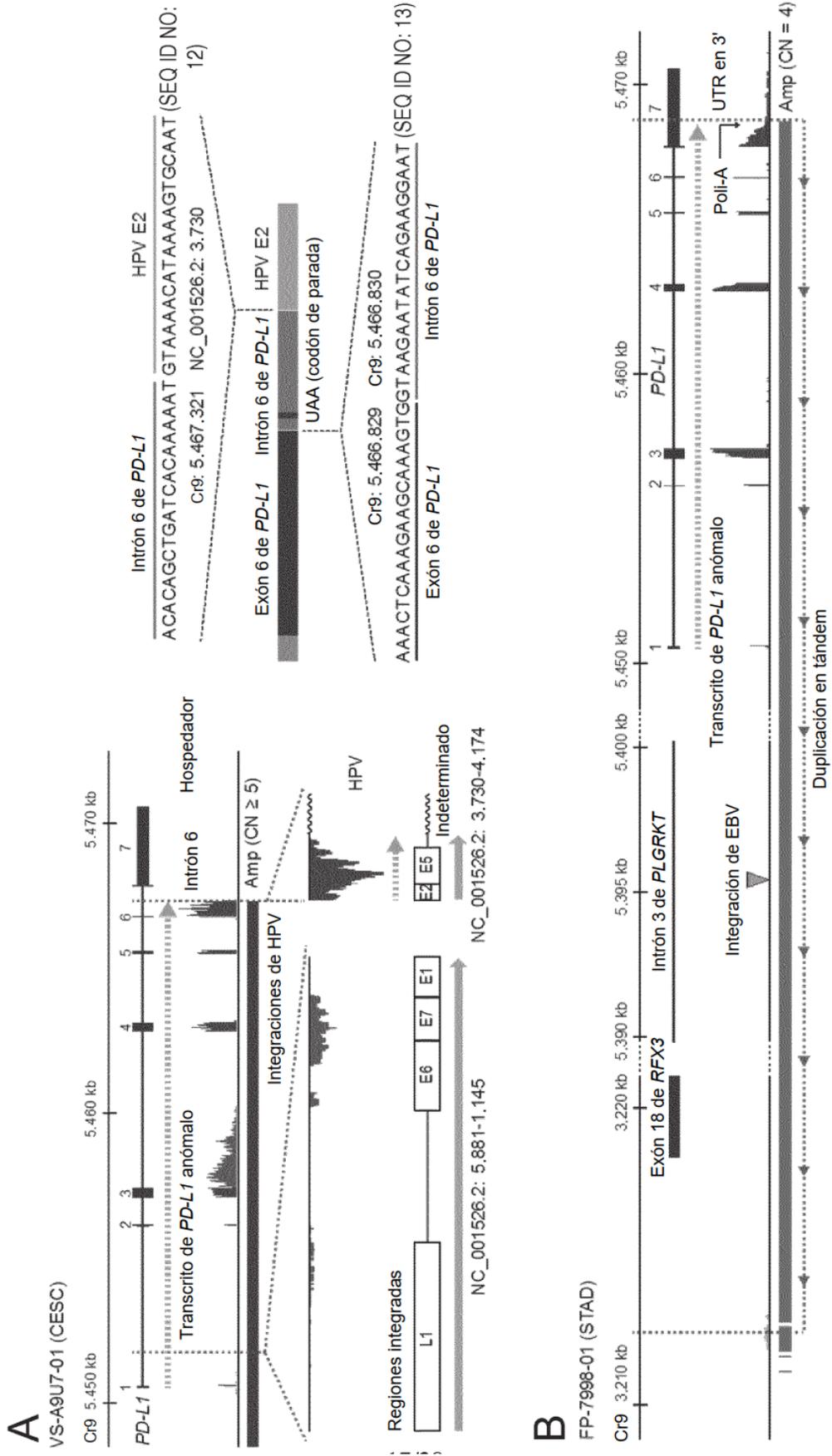


Fig. 18

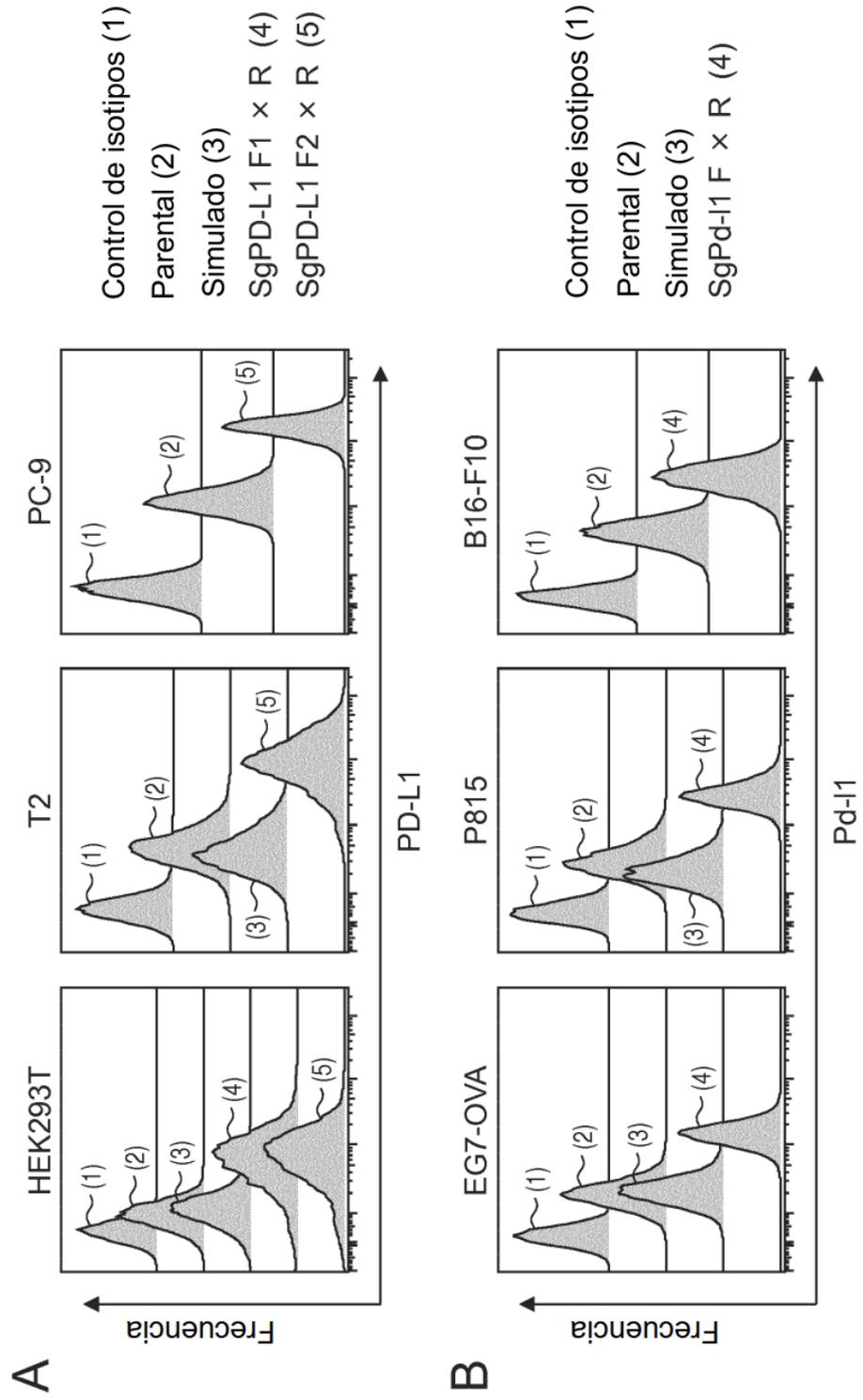


Fig. 19

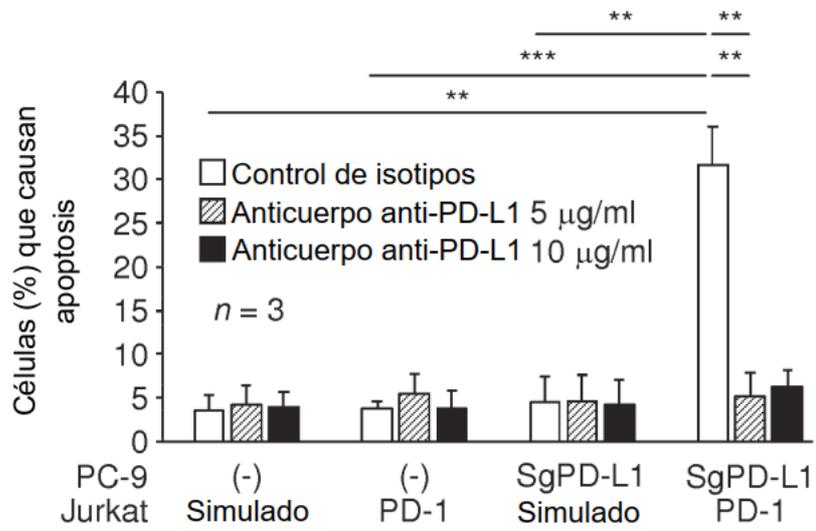


Fig. 20-1

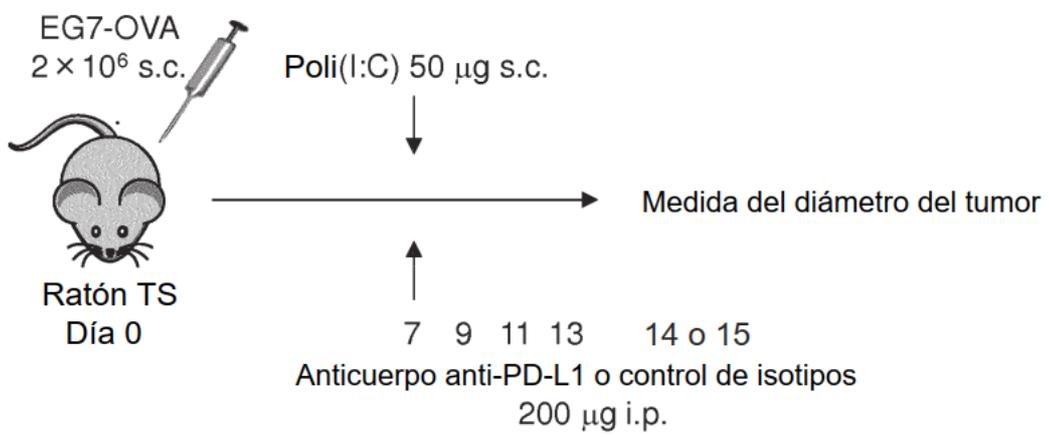


Fig. 20-2

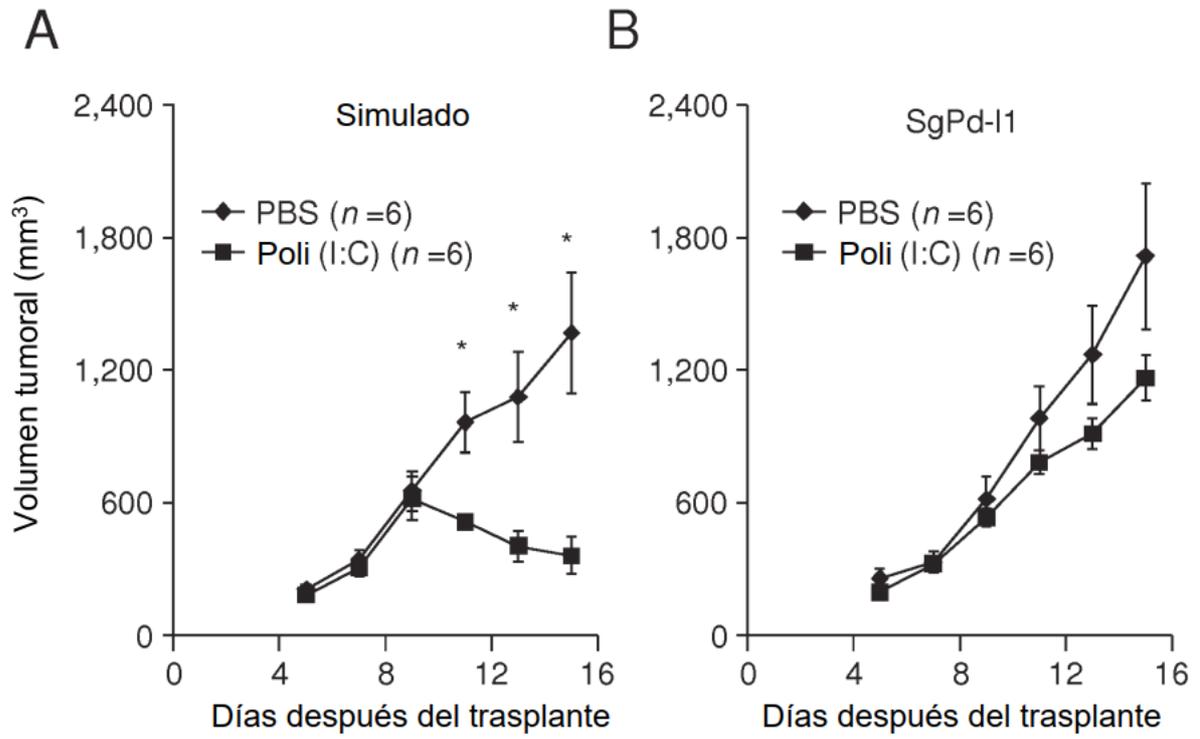


Fig. 21-1

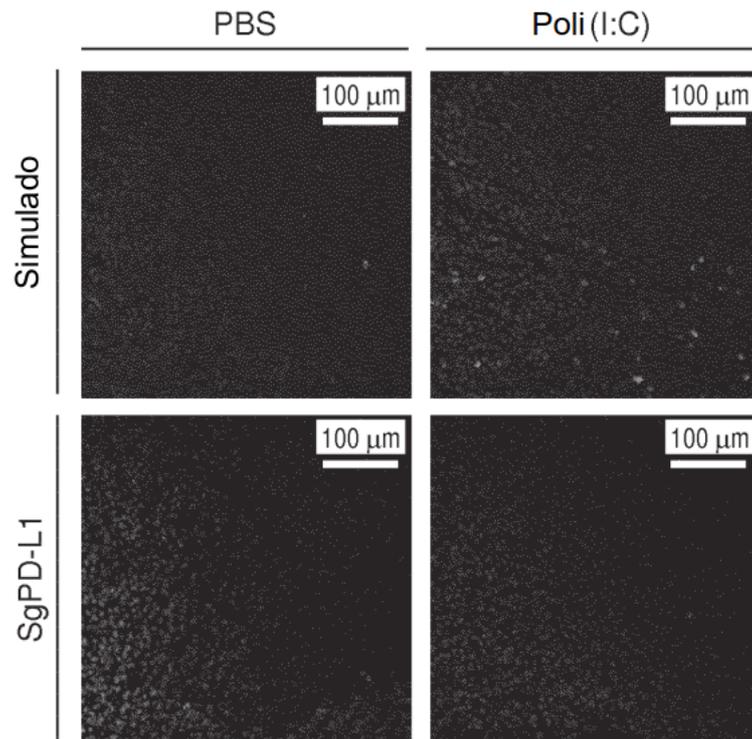


Fig. 21-2

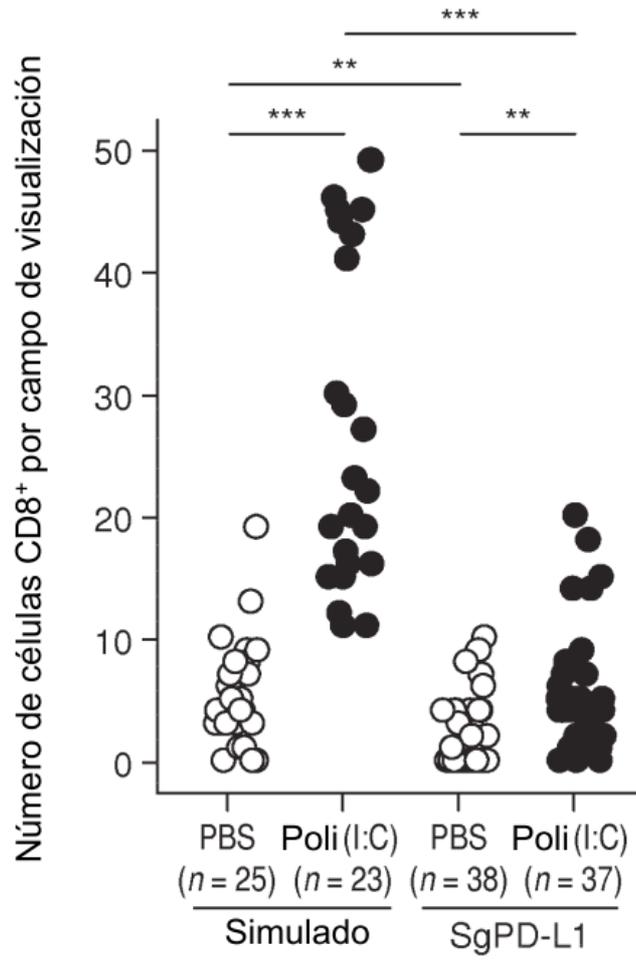


Fig. 22-1

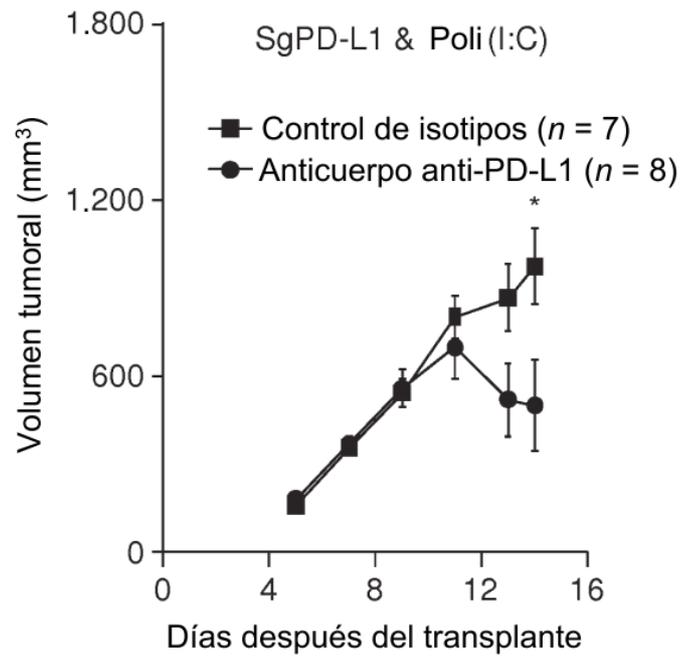


Fig. 22-2

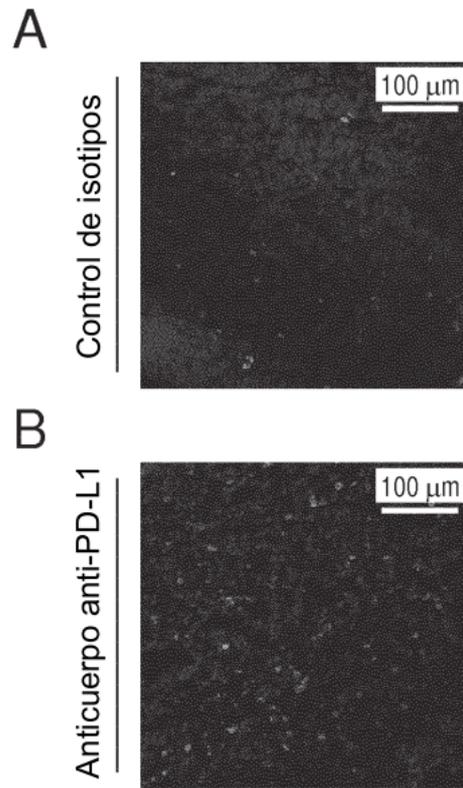


Fig. 22-3

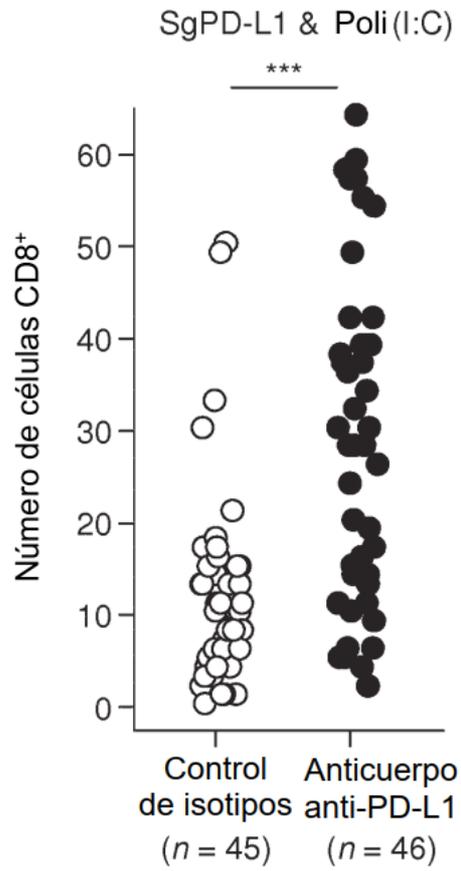


Fig. 23

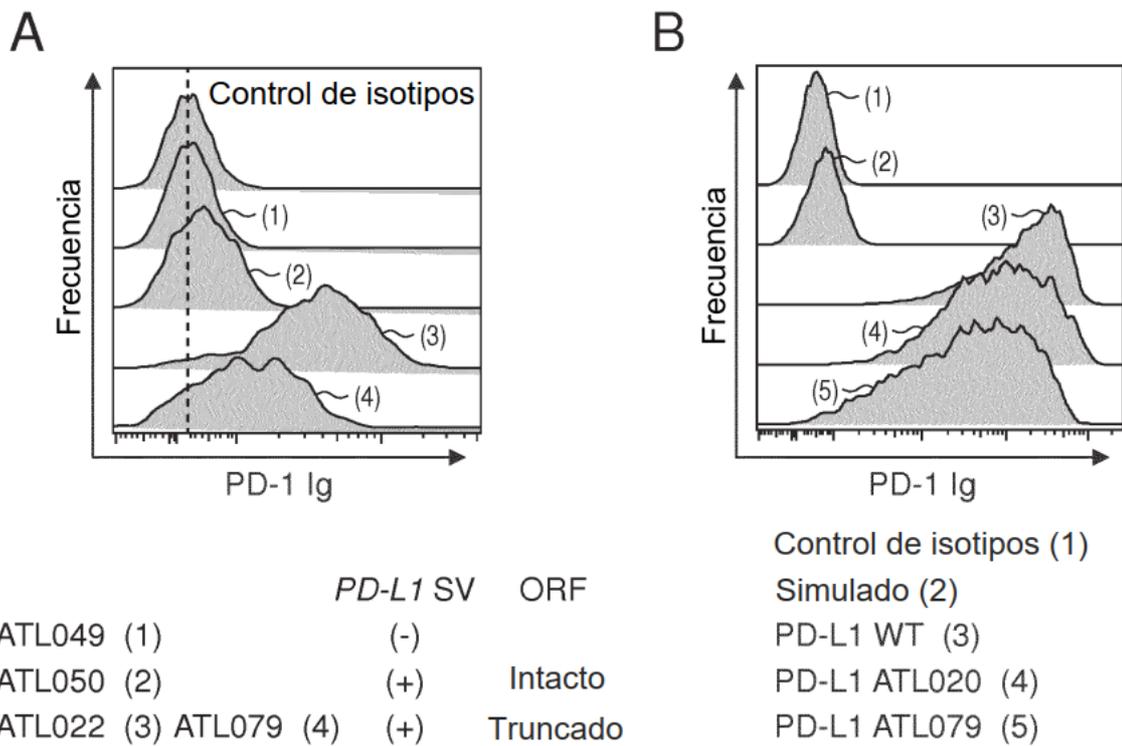


Fig. 24

