

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 355 919

a nome: Julius-Maximilians-Universität Würzburg

a: 97070 Würzburg - GERMANIA

dal titolo: Terapia in combinazione usando inibitori del fattore della crescita e della differenziazione 15 (GDF-15) umano e bloccanti del punto di controllo immunitario.

#### DESCRIZIONE

##### **CAMPO DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione si riferisce a inibitori del fattore della crescita e della differenziazione 15 (GDF-15) umano per usi nel trattamento di cancro solidi, a prodotti in combinazione di inibitori del fattore della crescita e della differenziazione 15 (GDF-15) umano per l'uso nel trattamento di cancro solidi, e a composizioni e kit comprendenti inibitori del fattore della crescita e della differenziazione 15 (GDF-15) umano.

##### **SFONDO**

Finora, molti cancro sono ancora aree di necessità mediche non soddisfatte e, per conseguenza, sono necessari mezzi per trattare il cancro più

efficientemente.

Molti tipi di cancro sono noti per esprimere fattori di crescita, comprendenti fattori come VEGF, PDGF, TGF- $\beta$  e GDF-15.

GDF-15, fattore della crescita e della differenziazione-15, è un membro divergente della superfamiglia di TGF- $\beta$ . Esso è una proteina che viene espressa intracellularmente come un precursore, successivamente processata e infine viene secreta dalla cellula nell'ambiente. Sia la forma attiva, completamente processata (matura), che il precursore di GDF-15 possono trovarsi all'esterno di cellule. Il precursore si lega covalentemente tramite la sua sequenza amminoacidica al terminale COOH alla matrice extracellulare (Bauskin AR et al., Cancer Research 2005) e quindi risiede sull'esterno di una cellula. La forma attiva, completamente processata (matura), di GDF-15 è solubile e si trova in sieri del sangue. Quindi, la forma processata di GDF-15 può potenzialmente agire su qualsiasi cellula bersaglio entro il corpo che sia collegata alla circolazione del sangue, purché la cellula bersaglio potenziale esprima un recettore per il ligando di GDF-15 solubile.

Durante la gravidanza, GDF-15 si trova in

condizioni fisiologiche nella placenta. Tuttavia, molti cancro maligni (specialmente cancro del cervello aggressivi, melanoma, cancro del polmone, tumori gastrointestinali, cancro del colon, cancro pancreatico, cancro della prostata e cancro del seno (Mimeault M e Batra SK, J. Cell Physiol 2010)) presentano livelli di GDF-15 aumentati nel tumore nonché nel siero del sangue. Analogamente, sono state descritte correlazioni, rispettivamente, fra alta espressione di GDF-15 e chemioresistenza (Huang CY et al., Clin. Cancer Res. 2009) e fra alta espressione di GDF-15 e prognosi scarsa (Brown DA et al., Clin. Cancer Res. 2009).

GDF-15 viene espresso in gliomi di gradi WHO differenti valutati mediante immunisto chimica (Roth et al., Clin. Cancer Res. 2010). Inoltre, Roth et al. hanno espresso stabilmente costrutti di DNA che esprimono RNA a forcina corta che mirano GDF-15 endogeno o costrutti di controllo in cellule di glioma SMA560. Quando usano queste linee cellulari stabili prestabilite, essi hanno osservato che la formazione di tumore in topi portatori di cellule SMA560 knockdown per GDF-15 era ritardata rispetto a topi portatori di costrutti di controllo.

Le domande di brevetto WO 2005/099746 e WO 2009/021293 si riferiscono a un anticorpo anti-GDF-15

umano (Mab26) in grado di antagonizzare gli effetti di GDF-15 umano (hGDF-15) su perdita di peso indotta da tumore *in vivo* in topi. Analogamente, Johnen H et al. (Nature Medicine, 2007) hanno riportato effetti di un anticorpo monoclonale anti-GDF-15 umano su anoressia e perdita di peso indotte da cancro, ma non hanno osservato alcun effetto dell'anticorpo anti-GDF-15 umano sulla dimensione del tumore formato mediante il cancro.

WO 2014/049087 e PCT/EP2015/056654 (corrispondente a WO 2015/144855) si riferiscono ad anticorpi monoclonali per hGDF-15 e a loro usi medicali.

Un approccio sviluppato recentemente per la terapia del cancro è l'uso di bloccanti del punto di controllo immunitario come inibitori di PD-1 umano e inibitori di PD-L1 umano. Una base razionale dietro l'uso di questi bloccanti del punto di controllo immunitario consiste nel fatto che bloccando i punti di controllo immunitario, che prevengono che il sistema immunitario miri antigeni del cancro e le rispettive cellule cancerose, una risposta immunitaria al cancro può essere più efficace. Sebbene bloccanti del punto di controllo immunitario, nonché particolari combinazioni di bloccanti del punto di controllo immunitario, abbiano mostrato di migliorare la sopravvivenza dei pazienti in pazienti con melanoma

(Cully M, "Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy"., Nat Rev Drug Discov. Giu 2015; 14(6):374-5), non tutti i pazienti con melanoma hanno presentato una risposta completa, e risultati per molti altri cancri debbano ancora venire descritti, vi sono ragioni (come il carico mutazionale) che suggeriscono che i risultati in altre indicazioni saranno meno favorevoli.

Quindi, finora, vi è ancora una necessità nella tecnica di mezzi per trattare il cancro più efficacemente. Più particolarmente, vi è ancora una mancanza di mezzi che possano venire usati per una immunoterapia per il cancro più efficace.

#### **DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE**

L'invenzione è come definita mediante le rivendicazioni allegate. La presente invenzione soddisfa le necessità precedenti e risolve i problemi precedenti nella tecnica fornendo le forme di realizzazione descritte in seguito:

in particolare, in uno sforzo per identificare mezzi per trattare efficacemente il cancro, i presenti inventori hanno sorprendentemente trovato che la probabilità di una risposta a un trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario diminuisce

significativamente con livelli di hGDF-15 crescenti nei sieri del paziente. Quindi, secondo l'invenzione, un inibitore di hGDF-15 viene usato per inibire gli effetti negativi di hGDF-15 sulle risposte del paziente al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario, e per migliorare le risposte del paziente al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario.

Inaspettatamente, gli inventori hanno anche trovato che vi è una correlazione inversa di hGDF-15 con la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> in metastasi del cancro. Questo è degno di nota, poiché la presenza di linfociti T CD8<sup>+</sup> è specificamente richiesta per la regressione del tumore dopo inibizione del punto di controllo immunitario con un anticorpo anti-PD-1. Quindi, secondo l'invenzione, l'inibizione terapeutica di hGDF-15 può venire usata per aumentare la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> in cancri solidi comprendenti metastasi tumorali. Questo aumento di linfociti T CD8<sup>+</sup> nei cancri solidi può venire favorevolmente usato per la terapia, in particolare immunoterapia, dei cancri solidi. Quindi, gli inventori forniscono una combinazione terapeutica favorevole di un inibitore di hGDF-15 con un bloccante del punto di controllo immunitario. Un effetto

vantaggioso di questa combinazione consiste nel fatto che l'inibizione di hGDF-15 aumenterà la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> nei tumori solidi e quindi porta a un effetto terapeutico sinergico con l'inibizione del punto di controllo immunitario.

In uno sforzo per chiarire ulteriormente come inibitori di hGDF-15 possono aumentare la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> nei tumori solidi, gli inventori hanno trovato che hGDF-15 diminuisce l'adesione di cellule T a cellule endoteliali. Quindi, secondo l'invenzione, un trattamento con inibitori di hGDF-15 può venire usato per aumentare l'adesione di cellule T comprendenti cellule T CD8<sup>+</sup> a cellule endoteliali. Tale trattamento secondo l'invenzione aumenterà l'ingresso di cellule T CD8<sup>+</sup> dal flusso di sangue in tumori solidi. La percentuale aumentata di cellule T CD8<sup>+</sup> in tumori solidi, che deriverà da tale trattamento con inibitori di hGDF-15, è vantaggiosa per, e può venire usata in, terapia del cancro, per esempio immunoterapia del cancro. Poiché l'ingresso di cellule T CD8<sup>+</sup> in tumori solidi e la presenza di queste cellule T CD8<sup>+</sup> nei tumori solidi è particolarmente vantaggiosa per approcci terapeutici usando bloccanti del punto di controllo immunitario, l'invenzione fornisce vantaggiosamente l'uso di

inibitori di hGDF-15 in combinazione con bloccanti del punto di controllo immunitario.

Quindi, la presente invenzione fornisce mezzi migliorati per la terapia del cancro, come definiti mediante le rivendicazioni allegate.

#### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

Figura 1: questa figura mostra i livelli nel siero di GDF-15 per responder e non responder al regime di trattamento.

Figura 2: questa figura mostra i numeri di responder e non responder nei gruppi di pazienti aventi livelli nel siero di hGDF-15 di, rispettivamente, <1,8 ng/ml, 1,8-4,2 ng/ml e >4,2 ng/ml.

Figura 3: probabilità di risposta al trattamento (responder 1) come previsto mediante il modello lineare generalizzato usando GDF-15 come predittore continuo. I cerchi mostrano i dati, la curva mostra il modello. La linea verticale indica la concentrazione di GDF-15 in cui la probabilità di risposta al trattamento è 0,5.

Figura 4: curve di Kaplan-Meier per la sopravvivenza dei tre gruppi definiti mediante il livello nel siero di GDF-15 (<1,8, 1,8-4,2, >4,2 ng/ml).

Figura 5: figura 5A: probabilità di risposta al trattamento (responder 1) prevista mediante il modello

lineare generalizzato usando LDH come predittore continuo. I cerchi mostrano i dati, la curva mostra il modello. La linea verticale indica la concentrazione di LDF in cui la probabilità di risposta al trattamento è 0,5. La coorte di pazienti era identica. Tuttavia, la determinazione affidabile dei livelli di LDH è fallita in quattro pazienti per effetto di emolisi. Figura 5B: rappresentazione grafica di responder e non responder e dei loro rispettivi livelli di hGDF-15 e LDH. Quando vengono scelti valori di taglio per coprire tutti i responder, la valutazione basata su GDF-15 permette l'identificazione di 6 (su 9) non responder, mentre analisi basate sui livelli di LDH possono solo discriminare 4 (su 9) non responder. Per la valutazione con LDH, 4 campioni emolitici erano stati esclusi, il che causa perdita di dati.

Figura 6: questa figura mostra sezioni di tessuto esemplificative ottenute da metastasi cerebrali di melanoma aventi immunoreattività di GDF-15 nulla (riquadro superiore) o alta (riquadro inferiore), che sono state colorate mediante immunistochemica per, rispettivamente, GDF-15 e per le proteine marcatrici di cellule T CD3 e CD8, come indicato nella figura. Cellule CD3 e CD8-positive sono indicate mediante frecce nei

campioni ad alto contenuto di GDF-15. Le colorazioni di CD3 e CD8 sono state effettuate dalla stessa area di sezioni seriali (tuttavia non dalla sezioni identica).

Figura 7: questa figura mostra un grafico della percentuale di cellule CD3<sup>+</sup> rispetto al punteggio di GDF-15 attraverso differenti metastasi cerebrali di melanoma (7A) e un grafico della percentuale di cellule CD8<sup>+</sup> rispetto al punteggio di GDF-15 attraverso differenti metastasi cerebrali di melanoma (7B).

Figura 8: questa figura mostra un grafico del punteggio di GDF-15 rispetto alla percentuale di cellule T, rispettivamente CD8<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>, in metastasi cerebrali provenienti da differenti entità tumorali (melanoma, CRC, RCC, NSCLC e SCLC).

Figura 9: la figura 9A mostra il numero di cellule T rotolanti per campo visivo per secondo. I dati sono stati ottenuti dal canale #3 ("GDF-15") e dal canale #2 ("controllo"). La figura 9B mostra la velocità di rotolamento delle cellule T (misurata in pixel per 0,2 secondi). I dati sono stati ottenuti dal canale #3 ("GDF-15") e dal canale #2 ("controllo"). La figura 9C mostra il numero di cellule aderenti per campo visivo. I dati sono stati ottenuti dal canale #3 ("GDF-15") e dal canale #2 ("controllo"). La figura 9D mostra il numero di

cellule aderenti per campo visivo. I dati sono stati ottenuti dal canale #3 ("GDF-15") e dal canale #2 ("controllo").

Figura 10: la figura 10A mostra numero di cellule T rotolanti per campo visivo per secondo. I dati sono stati ottenuti dal canale #1 (cellule T di controllo su HUVEC non stimolate come "controllo negativo"), dal canale #2 (cellule T di controllo su HUVEC stimolate come "controllo positivo"), dal canale #3 ("GDF-15"), dal canale #4 ("UACC 257": cellule T coltivate nel surnatante di cellule di melanoma UACC 257 contenenti GDF-15 secreto) e dal canale #5 ("UACC257 + anti-hGDF-15": cellule T coltivate nel surnatante di cellule di melanoma UACC 257 private di GDF-15 secreto e con l'anticorpo anti-hGDF-15 B1-23 come un inibitore di hGDF-15). Figura 10B: il saggio di flusso/adesione è stato condotto come descritto nell'esempio 3. Cellule T sono state pre-incubate con 100 ng/ml di GDF-15 per 1 ora o con 100 ng/ml di GDF-15, che è stato pre-incubato con 10 µg/ml di anticorpo per 1 ora, come indicato. Sono stati usati gli anticorpi anti-GDF-15 seguenti: H1L5 (B1-23 umanizzato), 01G06 e 03G05 (anticorpi anti-GDF-15 umanizzati ingegnerizzati secondo le sequenze provenienti da WO 2014/100689). I risultati sono

mostrati nella figura, che mostra il numero di cellule rotolanti per campo visivo per 20 secondi.

Figura 11: topi C57BL/6J sono stati inoculati sottocutaneamente con  $2 \times 10^5$  cellule MC38<sup>tghGDF-15</sup> del colon. Il trattamento con anticorpo anti-GDF-15 (20 mg/kg di peso corporeo) è stato iniziato il giorno 0 e ripetuto i giorni 3, 7, 10, 14, 17 e 21. Il giorno 13, gli animali che presentano tumori di dimensione simile (100-150 mm<sup>3</sup>) sono stati trattati o meno con Poli-ICLC (anche abbreviato come "Poli-IC") e anticorpo anti-CD40. I topi che rigettano il tumore pre-stabilito sono stati seguiti per 57 giorni. I topi portatori di tumore sono stati sacrificati secondo i criteri per il benessere degli animali.

Figura 12: sopravvivenza cumulativa in gruppi di pazienti aventi livelli di GDF-15 di, rispettivamente, <1,5 ng/ml e ≥1,5 ng/ml.

Figura 13: sopravvivenza cumulativa in gruppi di pazienti aventi, rispettivamente, livelli di GDF-15 alti (cioè i 50 pazienti con i livelli di GDF-15 più alti) e livelli di GDF-15 bassi (cioè i 49 pazienti con i livelli di GDF-15 più bassi) (suddivisione mediana della coorte dello studio totale).

Figura 14: i livelli nel siero di hGDF-15 non si

correlano significativamente con il carico mutazionale dei tumori.

I livelli di mRNA di hGDF-15 in campioni provenienti da pazienti con cancro sono stati tracciati contro il numero di mutazioni somatiche che sono state identificate nei cancri. Le mutazioni somatiche sono state determinate mediante uso della sequenziatura di un esoma. I dati sono stati analizzati usando lo strumento web UZH del University Hospital Zurich (Cheng PF et al.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 16 Set 2015; 145:w14183). La figura 14A mostra un grafico per dati di pazienti con cancro ottenuti dal Cancer Genome Atlas (TCGA) considerando solo pazienti con melanoma maligno di grado alto (il Cancer Genome Atlas è descritto nel riferimento di Cheng PF et al.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 16 Set 2015; 145:w14183). L'espressione di GDF-15 è stata valutata mediante normalizzazione usando il pacchetto software RSEM ("RNA Seq by expectation maximization") (Li B e Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-SEQ. ID. n.: data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 4 Ago 2011; 12:323. doi: 10.1186/1471-

2105-12-323). La figura 14B mostra un grafico per dati di pazienti con cancro ottenuti da 40 pazienti addizionali con melanoma maligno metastatico provenienti dalla University Hospital Zurich, che sono stati analizzati separatamente.

Figura 15: sono mostrate fotografie di immunocitochimica per CD8a in topi aventi tumori di tipo selvatico o tumori che sovraesprimono hGDF-15 transgenico (tg). Le sezioni di tessuto sono state colorate con anti-CD8a (diluizione 1:100; anticorpo 4SM15 acquistato da eBioscience).

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

##### Definizioni e tecniche generali

Se non definiti diversamente in seguito, i termini usati nella presente invenzione verranno intesi secondo il loro significato comune noto alla persona esperta nella tecnica.

Il termine "anticorpo" quando usato in questa sede si riferisce a qualsiasi anticorpo funzionale che è in grado di legarsi specificamente all'antigene di interesse, come delineato generalmente nel capitolo 7 di Paul, W.E. (Ed.): Fundamental Immunology 2<sup>a</sup> Ed. Raven Press, Ltd., New York 1989. Senza particolare limitazione, il termine "anticorpo" comprende anticorpi

provenienti da qualsiasi specie di fonte appropriata, comprendente un pollo e un mammifero come topo, capra, primate non umano e uomo. Preferibilmente, l'anticorpo è un anticorpo umanizzato. L'anticorpo è preferibilmente un anticorpo monoclonale che può venire preparato mediante metodi ben noti nella tecnica. Il termine "anticorpo" comprende un anticorpo isotipo IgG-1, -2, -3 o -4, IgE, IgA, IgM o IgD. Il termine "anticorpo" comprende anticorpi monomerici (come IgD, IgE, IgG) o anticorpi oligomerici (come IgA o IgM). Il termine "anticorpo" comprende anche - senza limitazioni particolari - anticorpi isolati e anticorpi modificati come anticorpi geneticamente ingegnerizzati, per esempio anticorpi chimerici.

La nomenclatura dei domini di anticorpi segue i termini noti nella tecnica. Ciascun monomero di un anticorpo comprende due catene pesanti e due catene leggere, come generalmente noto nella tecnica. Di queste, ciascuna catena pesante e leggera comprende un dominio variabile (denominato  $V_H$  per la catena pesante e  $V_L$  per la catena leggera), il che è importante per il legame dell'antigene. Questi domini variabili delle catene pesante e leggera comprendono (in un ordine dal N terminale al C terminale) le regioni FR1, CDR1, FR2,

CDR2, FR3, CDR3 e FR4 (FR, regione strutturale; CDR, regione determinante la complementarità che è anche nota come regione ipervariabile). L'identificazione e l'assegnazione delle regioni dell'anticorpo menzionate sopra entro la sequenza dell'anticorpo avvengono generalmente secondo Kabat et al. (Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983) o Chothia et al. (Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 21-28 Dic 1989; 342(6252):877-83), o possono venire eseguite usando il software IMGT/V-QUEST descritto in Giudicelli et al. (IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res. 1 Lug 2004; 32 (pubblicazione su server web):W435-40). Preferibilmente, le regioni dell'anticorpo indicate sopra vengono identificate e assegnate usando il software IMGT/V-QUEST.

Un "anticorpo monoclonale" è un anticorpo ottenuto da una popolazione di anticorpi essenzialmente omogenea, in cui gli anticorpi sono sostanzialmente identici in sequenza (cioè identici ad eccezione di una frazione minore di anticorpi contenenti modifiche della sequenza

che si verificano in modo naturale come modifiche amminoacidiche ai loro N e C terminali). Diversamente dagli anticorpi policlonali che contengono una miscela di anticorpi differenti diretti a numerosi epitopi, gli anticorpi monoclonali sono diretti allo stesso epitopo e sono quindi altamente specifici. L'espressione "anticorpo monoclonale" comprende (ma non è limitata a) anticorpi che vengono ottenuti da una popolazione di cellule monoclonali derivata da un singolo clone cellulare come, per esempio, gli anticorpi generati mediante il metodo con ibridoma descritto in Köhler e Milstein (Nature, 7 Ago 1975; 256(5517):495-7) o Harlow e Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988). Un anticorpo monoclonale può anche venire ottenuto da altri metodi adatti, comprendenti tecniche di presentazione del fago come quelle descritte in Clackson et al. (Nature. 15 Ago 1991; 352(6336):624-8) o Marks et al. (J Mol Biol. 5 Dic 1991; 222(3):581-97). Un anticorpo monoclonale può essere un anticorpo che è stato ottimizzato per proprietà di legame dell'antigene come valori  $K_d$  diminuiti, cinetiche di associazione e dissociazione ottimizzate mediante metodi noti nella tecnica. Per esempio, i valori  $K_d$  possono venire

ottimizzati mediante metodi di presentazione comprendenti presentazione del fago, ottenendo anticorpi monoclonali con affinità maturata. L'espressione "anticorpo monoclonale" non è limitata a sequenze anticorpali provenienti da specie di origine o da una singola specie di origine particolare. Quindi, il significato dell'espressione "anticorpo monoclonale" comprende anticorpi monoclonali chimerici come anticorpi monoclonali umanizzati.

Gli "anticorpi umanizzati" sono anticorpi che contengono sequenze umane e una porzione minore di sequenze non umane che conferiscono specificità di legame a un antigene di interesse (per esempio GDF-15 umano). Tipicamente, anticorpi umanizzati vengono generati sostituendo sequenze della regione ipervariabile provenienti da un anticorpo accettore umano mediante sequenze della regione ipervariabile provenienti da un anticorpo donatore non umano (per esempio un anticorpo donatore di topo, coniglio, ratto) che si lega a un antigene di interesse (per esempio GDF-15 umano). In alcuni casi, le sequenze della regione strutturale dell'anticorpo accettore possono anche venire sostituite mediante le sequenze corrispondenti dell'anticorpo donatore. Oltre alle sequenze derivate

dagli anticorpi donatore e accettore, un "anticorpo umanizzato" può contenere altri residui (addizionali o sostituiti) o sequenze o meno. Tali altri residui o sequenze possono servire a migliorare ulteriormente le proprietà dell'anticorpo come proprietà di legame (per esempio per diminuire i valori Kd) e/o proprietà immunogeniche (per esempio per diminuire l'antigenicità in uomini). Esempi non limitativi di metodi per generare anticorpi umanizzati sono noti nella tecnica, per esempio da Riechmann et al. (Nature. 24 Mar 1988; 332(6162):323-7) o Jones et al. (Nature. 29 Mag-4 Giu 1986; 321(6069):522-5).

L'espressione "anticorpo umano" si riferisce a un anticorpo contenente sequenze del dominio variabile e costante umane. Questa definizione comprende anticorpi aventi sequenze umane che presentano sostituzioni o modifiche amminoacidiche singole che possono servire a migliorare ulteriormente le proprietà dell'anticorpo come proprietà di legame (per esempio per diminuire i valori Kd) e/o proprietà immunogeniche (per esempio per diminuire l'antigenicità in uomini). L'espressione "anticorpo umano" esclude anticorpi umanizzati in cui una porzione di sequenze non umane conferisce specificità di legame a un antigene di interesse.

Una "porzione legante l'antigene" di un anticorpo quando usata in questa sede si riferisce a una porzione di un anticorpo che mantiene la capacità dell'anticorpo di legarsi specificamente all'antigene (per esempio hGDF-15, PD-1 o PD-L1). Questa capacità può, per esempio, venire determinata determinando la capacità della porzione legante l'antigene di competere con l'anticorpo per il legame specifico all'antigene mediante metodi noti nella tecnica. La porzione legante l'antigene può contenere uno o più frammenti dell'anticorpo. Senza limitazione particolare, la porzione legante l'antigene può venire prodotta mediante qualsiasi metodo adatto noto nella tecnica, comprendente metodi del DNA ricombinante e preparazione mediante frammentazione chimica o enzimatica di anticorpi. Porzioni leganti l'antigene possono essere frammenti Fab, frammenti F(ab'), frammenti F(ab')<sub>2</sub>, anticorpi a catena singola (scFv), anticorpi a dominio singolo, diabody o qualsiasi altra porzione(i) dell'anticorpo che mantiene la capacità dell'anticorpo di legarsi specificamente all'antigene.

Un "anticorpo" (per esempio un anticorpo monoclonale) o una "porzione legante l'antigene" possono venire derivatizzati o venire legati a una molecola

differente. Per esempio, molecole che possono venire legate all'anticorpo sono altre proteine (per esempio altri anticorpi), un marcatore molecolare (per esempio una molecola fluorescente, luminescente, colorata o radioattiva), un agente farmaceutico e/o tossico. L'anticorpo o la porzione legante l'antigene possono venire legati direttamente (per esempio nella forma di una fusione fra due proteine), o tramite una molecola legante (per esempio qualsiasi tipo adatto di legante chimico noto nella tecnica).

Quando usati in questa sede, i termini "legante" o "legame" si riferiscono al legame specifico all'antigene di interesse (per esempio GDF-15 umano). Preferibilmente, il valore  $K_d$  è meno di 100 nM, più preferibilmente meno di 50 nM, ancora più preferibilmente meno di 10 nM, ancora più preferibilmente meno di 5 nM e ancora più preferibilmente meno di 2 nM.

Quando usato in questa sede, un anticorpo o una sua porzione legante l'antigene che è "in grado di competere" con un secondo anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano indica che detto (primo) anticorpo o sua porzione legante l'antigene che è "in grado di competere" è in grado di ridurre il legame di una soluzione di

riferimento 10 nM del secondo anticorpo a GDF-15 umano o umano ricombinante del 50%. Generalmente, "in grado di competere" indica che la concentrazione del (primo) anticorpo o di una sua porzione legante l'antigene che è necessaria per ridurre il legame della soluzione di riferimento 10 nM del secondo anticorpo a GDF-15 umano o umano ricombinante del 50% è meno di 1.000 nM, preferibilmente meno di 100 nM e più preferibilmente meno di 10 nM. Il legame viene misurato mediante misurazioni tramite risonanza del plasmone di superficie o mediante misurazioni tramite saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA), preferibilmente mediante misurazioni tramite risonanza del plasmone di superficie.

Il termine "epitopo" quando usato in questa sede si riferisce a una porzione piccola di un antigene che forma il sito di legame per un anticorpo.

Nel contesto della presente invenzione, il legame o legame competitivo di anticorpi o di loro porzioni leganti l'antigene all'antigene di interesse (per esempio GDF-15 umano) viene preferibilmente misurato usando misurazioni tramite risonanza del plasmone di superficie come saggio standard di riferimento, come descritto in seguito.

Le espressioni "K<sub>D</sub>" o "valore K<sub>D</sub>" si riferiscono alla costante di dissociazione all'equilibrio come noto nella tecnica. Nel contesto della presente invenzione, queste espressioni si riferiscono alla costante di dissociazione all'equilibrio di un anticorpo rispetto a un particolare antigene di interesse (per esempio GDF-15 umano). La costante di dissociazione all'equilibrio è una misura della propensione di un complesso (per esempio un complesso antigene-anticorpo) a dissociarsi reversibilmente nei suoi componenti (per esempio l'antigene e l'anticorpo). Per gli anticorpi secondo l'invenzione, i valori K<sub>D</sub> (come quelli per l'antigene GDF-15 umano) vengono preferibilmente determinati usando misurazioni tramite risonanza del plasmone di superficie come descritto in seguito.

Un "anticorpo isolato" quando usato in questa sede è un anticorpo che è stato identificato e separato dalla maggioranza dei componenti (in peso) del suo ambiente come fonte, per esempio dai componenti di una coltura di cellule ibridoma o una coltura cellulare differente che è stata usata per la sua produzione (per esempio cellule produttrici come cellule di CHO che esprimono in modo ricombinante l'anticorpo). La separazione viene eseguita affinché rimuova sufficientemente componenti che

potrebbero altrimenti interferire con l'idoneità dell'anticorpo per le applicazioni desiderate (per esempio con un uso terapeutico dell'anticorpo anti-GDF-15 umano secondo l'invenzione). Metodi per preparare anticorpi isolati sono noti nella tecnica e comprendono cromatografia con proteina A, cromatografia a scambio anionico, cromatografia a scambio cationico, filtrazione e ultrafiltrazione che trattiene virus. Preferibilmente, la preparazione di anticorpo isolato è pura per almeno il 70% (peso/peso), più preferibilmente pura per almeno l'80% (peso/peso), ancora più preferibilmente pura per almeno il 90% (peso/peso), ancora più preferibilmente pura per almeno il 95% (peso/peso), e ancora più preferibilmente pura per almeno il 99% (peso/peso), quando misurata usando il saggio delle proteine di Lowry.

Un "diabody", quando usato in questa sede, è una piccola porzione di anticorpo legante un antigene bivalente che comprende un dominio variabile della catena pesante legato a un dominio variabile della catena leggera sulla stessa catena polipeptidica legati mediante un legante peptidico che è troppo corto per permettere l'accoppiamento fra i due domini sulla stessa catena. Questo porta ad accoppiamento con i domini complementari di un'altra catena e al gruppo di una

molecola dimera con due siti di legame per l'antigene. I diabody possono essere bivalenti e monospecifici (come diabody con due siti di legame per l'antigene per GDF-15 umano), o possono essere bivalenti e bispecifici (per esempio diabody con due siti di legame per l'antigene, uno essendo un sito di legame per GDF-15 umano, e l'altro essendo un sito di legame per un antigene diverso). Una descrizione dettagliata di diabody si può trovare in Holliger P et al. ("Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments". Proc Natl Acad Sci U S A. 15 Lug 1993; 90(14):6444-8).

Un "anticorpo a dominio singolo" (che viene anche indicato come "Nanobody<sup>TM</sup>") quando usato in questa sede, è un frammento di anticorpo consistente di un dominio di un anticorpo variabile monomero singolo. Strutture e metodi per produrre anticorpi a dominio singolo sono noti dalla tecnica, per esempio da Holt LJ et al. ("Domain antibodies: proteins for therapy" Trends Biotechnol. Nov 2003; 21(11):484-90), Saerens D et al. ("Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics" Curr Opin Pharmacol. Ott 2008; 8(5):600-8. Epub 22 Ago 2008), e Arbabi Ghahroudi M et al. ("Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies". FEBS Lett.

15 Set 1997; 414(3):521-6).

Le espressioni "cancro" e "cellula cancerosa" vengono usate in questa sede secondo il loro significato comune nella tecnica (vedere per esempio Weinberg R. et al.: The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006. 850p).

I cancri da trattare secondo la presente invenzione sono cancri solidi. Un "cancro solido" è un cancro che forma uno o più tumori solidi. Tali cancri solidi che formano tumori solidi sono generalmente noti nella tecnica. L'espressione "cancro solido" comprende un tumore primario formato mediante il cancro e possibili tumori secondari, che sono anche noti come metastasi. Cancri solidi preferiti da trattare secondo l'invenzione vengono scelti dal gruppo consistente di melanoma, cancro colorettales, cancro della prostata, cancro della testa e del collo, cancro uroteliale, cancro dello stomaco, cancro pancreatico, cancro del fegato, cancro dei testicoli, cancro dell'ovaio, cancro endometriale, cancro cervicale, cancro cerebrale, cancro del seno, cancro gastrico, carcinoma delle cellule renali, sarcoma di Ewing, cancro del polmone a cellule non piccole e cancro del polmone a cellule piccole, preferibilmente scelto dal gruppo consistente di melanoma, cancro

colorettale, cancro della prostata, cancro della testa e del collo, cancro uroteliale, cancro dello stomaco, cancro pancreatico, cancro del fegato, cancro dei testicoli, cancro dell'ovaio, cancro endometriale e cancro cervicale, più preferibilmente scelto dal gruppo consistente di melanoma, cancro colorettale, cancro della prostata, cancro della testa e del collo, cancro uroteliale e cancro dello stomaco, e ancora più preferibilmente scelto dal gruppo consistente di melanoma, cancro colorettale e cancro della prostata.

Quando indicata in questa sede, l'espressione "cancro cerebrale" si riferisce a tutti i cancri cerebrali noti nella tecnica. Essi comprendono, ma non sono limitati a questi, glioma (grado WHO da I a IV), astrocitoma, meningioma e medulloblastoma.

Quando indicata in questa sede, l'espressione "cancro della testa e del collo" si riferisce a tutti i cancri della testa e del collo noti nella tecnica. Essi comprendono, ma non sono limitati a questi, carcinoma dell'esofago, carcinoma a cellule squamose orale e cancro ipofaringeo. Un cancro della testa e del collo particolarmente preferito da trattare secondo l'invenzione è carcinoma a cellule squamose orale.

L'espressione "crescita del cancro" quando usata in

questa sede si riferisce a qualsiasi crescita misurabile del cancro. Per cancri che formano tumori solidi, la "crescita del cancro" si riferisce a un aumento misurabile nel volume del tumore nel tempo. Se il cancro ha formato solo un singolo tumore, la "crescita del cancro" si riferisce solo all'aumento in volume del singolo tumore. Se il cancro ha formato tumori multipli come metastasi, la "crescita del cancro" si riferisce all'aumento in volume di tutti i tumori misurabili. Per i tumori solidi, il volume del tumore può venire misurato mediante qualsiasi metodo noto nella tecnica, comprendente formazione di immagini per risonanza magnetica e tomografia computerizzata (scansione mediante CT).

Espressioni come "trattamento del cancro" o "trattare un cancro" secondo la presente invenzione si riferiscono a un trattamento terapeutico. Una valutazione del fatto se un trattamento terapeutico funziona o meno può, per esempio, venire fatta valutando se il trattamento inibisce la crescita del cancro nel paziente o pazienti trattati. Preferibilmente, l'inibizione è statisticamente significativa quando valutata mediante test statistici appropriati che sono noti nella tecnica. L'inibizione della crescita del

cancro può venire valutata confrontando la crescita del cancro in un gruppo di pazienti trattati secondo la presente invenzione a un gruppo di controllo di pazienti non trattati, o confrontando un gruppo di pazienti che ricevono un trattamento per il cancro standard della tecnica più un trattamento secondo l'invenzione con un gruppo di controllo di pazienti che ricevono solo un trattamento del cancro standard della tecnica. Tali studi per valutare l'inibizione della crescita del cancro sono progettati secondo standard accettati per studi clinici, per esempio studi casualizzati, in doppio cieco, con potenza statistica sufficiente. L'espressione "trattare un cancro" comprende una inibizione della crescita del cancro in cui la crescita del cancro viene inibita parzialmente (cioè quando la crescita del cancro nel paziente viene ritardata rispetto al gruppo di pazienti di controllo), una inibizione in cui la crescita del cancro viene completamente inibita (cioè quando la crescita del cancro nel paziente viene arrestata), e una inibizione in cui la crescita del cancro viene invertita (cioè il cancro si contrae). Preferibilmente, una valutazione del fatto se un trattamento terapeutico funziona o meno può venire effettuata in base a una classificazione di responder e non responder usando i

criteri di valutazione della risposta in tumori solidi, versione 1.1 (RECIST v1.1) (Eisenhauer et al.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: Eur. J. Cancer. 45, n. 2, Gennaio 2009, pag. 228-47). In alternativa, o in aggiunta, una valutazione del fatto se un trattamento terapeutico funziona o meno può venire effettuata in base a indicatori clinici noti di progressione del cancro.

Il trattamento del cancro secondo l'invenzione può essere una terapia di prima linea, una terapia di seconda linea o una terapia di terza linea o una terapia che è oltre una terapia di terza linea. Il significato di queste espressioni è noto nella tecnica e in accordo con la terminologia che viene comunemente usata dal US National Cancer Institute.

Un trattamento del cancro secondo la presente invenzione non esclude che benefici terapeutici addizionali o secondari possano anche verificarsi in pazienti. Per esempio, un beneficio addizionale o secondario può essere una influenza sulla perdita di peso indotta dal cancro. Tuttavia, si comprenderà che il trattamento primario per il quale viene ricercata protezione è per trattare il cancro stesso, qualsiasi

degli effetti secondari o addizionali riflettono solo vantaggi addizionali opzionali del trattamento della crescita del cancro.

L'espressione "immunoterapia per il cancro" è nota nella tecnica e si riferisce generalmente a un trattamento del cancro in cui il sistema immunitario del paziente viene usato per trattare il cancro. Le cellule cancerose contengono mutazioni genomiche che danno luogo ad antigeni delle cellule cancerose che sono specifici per le cellule cancerose e diversi dagli antigeni di cellule non cancerose. Quindi, in un aspetto preferito dell'immunoterapia per il cancro secondo la presente invenzione, una immunoterapia per il cancro è una immunoterapia per il cancro in cui tali antigeni delle cellule cancerose vengono riconosciuti mediante il sistema immunitario, e in cui cellule cancerose che esprimono questi antigeni vengono uccise mediante il sistema immunitario. In un aspetto non limitativo dell'invenzione, tali cellule cancerose che esprimono questi antigeni delle cellule cancerose possono venire uccise mediante cellule T CD8<sup>+</sup> del sistema immunitario. Una immunoterapia per il cancro può venire valutata mediante metodi di immunomonitoraggio noti nella tecnica, per esempio misurando l'espressione di IFN- $\gamma$

intracellulare (per esempio in cellule T CD8<sup>+</sup> e/o cellule NK) in campioni di sangue, misurando l'espressione sulla superficie cellulare di CD107a (per esempio su cellule T CD8<sup>+</sup> e/o cellule NK) in campioni di sangue, misurando l'espressione di TNF- $\alpha$  intracellulare (per esempio su leucociti) in campioni di sangue, l'espressione di interleuchina-2 intracellulare (per esempio in cellule T CD8<sup>+</sup> e/o in cellule T CD4<sup>+</sup>) in campioni di sangue, l'espressione sulla superficie cellulare di CD154 (per esempio in cellule T CD8<sup>+</sup> e/o in cellule T CD4<sup>+</sup>) in campioni di sangue, colorazione del tetramero o destramero per cellule T specifiche per un antigene tumorale in campioni di sangue, l'attività di CTL contro cellule tumorali autologhe o la presenza di cellule T contro neoantigeni derivati da mutazioni tumore-specifiche. Metodi preferiti per valutare l'immunoterapia per il cancro sono i metodi secondo Gouttefangeas C et al.: "Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality Assurance and Future". (2015) In: Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (curatore N. Rezaei). Springer. Capitolo 25: pagine 471-486; e i metodi secondo Van der Burg SH, et al.: "Immunoguiding, the final frontier in the immunotherapy of cancer". (2014) In

Cancer Immunotherapy meets oncology (CM Britten, S Kreiter, M. Diken & HG Rammensee ed). Springer International Publishing Switzerland pag. 37-51 ISBN: 978-3-319-05103-1.

Quando usata in questa sede, una "immunoterapia per il cancro" comprende opzionalmente un trattamento in cui oltre al sistema immunitario che viene usato per trattare il cancro, vengono usati meccanismi addizionali di trattamento del cancro. Per esempio, è stato precedentemente dimostrato che un inibitore di hGDF-15 può venire usato per il trattamento del cancro in un sistema modello di topo in cui il sistema immunitario è stato gravemente compromesso (WO 2014/049087). Quindi, secondo la presente invenzione, una immunoterapia per il cancro mediante inibitori di hGDF-15 in pazienti umani può anche comprendere effetti di un trattamento addizionale di inibitori di hGDF-15 che sono indipendenti dal sistema immunitario. Un altro esempio di una immunoterapia per il cancro in cui possono venire usati meccanismi addizionali di trattamento del cancro è una terapia in combinazione con un agente(i) chemioterapeutico noto. Tale terapia in combinazione con un agente(i) chemioterapeutico noto può, per esempio, comprendere non solo il trattamento del cancro in cui

viene usato il sistema immunitario per trattare il cancro, ma comprende anche un trattamento del cancro in cui le cellule cancerose vengono uccise direttamente mediante detto agente(i) chemioterapeutico.

Quando usata in questa sede, l'espressione "aumentare la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> in un cancro solido" si riferisce a qualsiasi aumento misurabile nella percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> (cioè la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> calcolata rispetto a tutte le cellule) nel tumore o nei tumori formati mediante il cancro solido. Preferibilmente, l'aumento è statisticamente significativo quando valutato mediante test statistici appropriati che sono noti nella tecnica. Un aumento nella percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> nel tumore o nei tumori formati mediante il cancro solido può venire determinato mediante metodi noti per analisi di cellule T CD8<sup>+</sup> in tumori solidi. Tali metodi comprendono analisi di biopsie di tumore per cellule T CD8<sup>+</sup>, per esempio analisi di tali biopsie di tumore mediante immunisto chimica usando anticorpi contro CD8 e usando una colorazione per il numero totale di cellule. L'aumento può venire valutato confrontando la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> in tumori di un gruppo di pazienti trattati secondo la presente invenzione a un gruppo di controllo di pazienti

non trattati, o confrontando un gruppo di pazienti che ricevono un trattamento per il cancro standard della tecnica più un trattamento secondo l'invenzione con un gruppo di controllo di pazienti che ricevono solo un trattamento per il cancro standard della tecnica.

Quando usate in questa sede, "cellule T CD8+" sono preferibilmente cellule che si formano in modo endogeno nel paziente umano.

I livelli nel siero di hGDF-15 possono venire misurati mediante qualsiasi dei metodi noti nella tecnica. Per esempio, un metodo preferito di misurazione dei livelli nel siero di hGDF-15 è una misurazione dei livelli nel siero di hGDF-15 mediante saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA) usando anticorpi per GDF-15. Tali metodi ELISA sono esemplificati nell'esempio 1. In alternativa, i livelli nel siero di hGDF-15 possono venire determinati mediante immunosaggi di elettrochemiluminescenza noti usando anticorpi per GDF-15. Per esempio, la tecnologia Roche Elecsys® può venire usata per tali immunosaggi mediante elettrochemiluminescenza.

Il paziente da trattare secondo l'invenzione è preferibilmente un paziente con livelli elevati nel siero di hGDF-15. L'espressione "livelli elevati nel

siero di hGDF-15" quando usata in questa sede indica che il paziente umano ha livelli di hGDF-15 maggiori nel siero del sangue prima della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15 secondo l'invenzione, quando confrontati ai livelli di hGDF-15 mediani in sieri di sangue di individui di controllo umani sani come un riferimento.

Il livello mediano nel siero di hGDF-15 di individui di controllo umani sani è <0,8 ng/ml. L'intervallo previsto è fra 0,2 ng/ml e 1,2 ng/ml in controlli umani sani (riferimento: Tanno T et al.: "Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease". Curr Opin Hematol. Mag 2010; 17(3): 184-190).

Quindi, in una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, un paziente da trattare secondo l'invenzione è un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,2 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,5 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, e più preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,8 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15.

In una ulteriore forma di realizzazione preferita dell'invenzione, un paziente da trattare secondo l'invenzione è un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,2 ng/ml e di non più di 12 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,5 ng/ml e di non più di 12 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, e più preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,8 ng/ml e di non più di 12 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15.

In una ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione secondo tutte le forme di realizzazione sopra, un paziente da trattare secondo l'invenzione è un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,2 ng/ml e di non più di 10 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,5 ng/ml e di non più di 10 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, e più preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,8 ng/ml e di non più di 10 ng/ml prima dell'inizio della

somministrazione dell'inibitore di hGDF-15.

In una ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione secondo tutte le forme di realizzazione sopra, un paziente da trattare secondo l'invenzione è un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,2 ng/ml e di non più di 8 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,5 ng/ml e di non più di 8 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, e più preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,8 ng/ml e di non più di 8 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15.

In un'altra forma di realizzazione, un paziente da trattare secondo l'invenzione è un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 2 ng/ml, almeno 2,2 ng/ml, almeno 2,4 ng/ml, almeno 2,6 ng/ml, almeno 2,8 ng/ml, almeno 3,0 ng/ml, almeno 3,2 ng/ml, almeno 3,4 ng/ml, almeno 3,6 ng/ml, almeno 3,8 ng/ml, almeno 4,0 ng/ml o almeno 4,2 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15. In questa forma di realizzazione, il paziente è preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di non

più di 12 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15. Più preferibilmente, in questa forma di realizzazione, il paziente è un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di non più di 10 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15. Ancora più preferibilmente, in questa forma di realizzazione, il paziente è un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di non più di 8 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15.

L'espressione "prima dell'inizio della somministrazione" quando usata in questa sede indica il periodo di tempo immediatamente prima della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15 secondo l'invenzione. Preferibilmente, l'espressione "prima dell'inizio della somministrazione" indica un periodo di 30 giorni immediatamente prima della somministrazione; ancora più preferibilmente un periodo di una settimana immediatamente prima della somministrazione.

I termini "significativo", "significativamente", ecc. quando usati in questa sede si riferiscono a una differenza statisticamente significativa fra valori quando valutati mediante metodi appropriati noti nella tecnica.

Gli inibitori di hGDF-15 e i bloccanti del punto di controllo immunitario usati secondo l'invenzione possono venire somministrati usando metodi noti nella tecnica. Tali metodi verranno scelti dalla persona esperta in base a considerazioni ben note, comprendenti la natura chimica del rispettivo inibitore (per esempio a seconda che l'inibitore sia un RNA interferente corto o un anticorpo). La somministrazione di bloccanti del punto di controllo immunitario noti può essere basata su schemi di somministrazione noti di questi bloccanti del punto di controllo immunitario. Per esempio, la somministrazione dei bloccanti del punto di controllo immunitario può essere basata sugli schemi di somministrazione usati nella prova KEYNOTE-006 (C. Robert et al. N Engl J Med 2015; 372:2521-2532).

Secondo la presente invenzione, ciascuna occorrenza del termine "comprendente" può opzionalmente venire sostituita con l'espressione "consistente di".

#### Inibitori di hGDF-15

Un "inibitore di hGDF-15" può essere qualsiasi molecola che sia in grado di inibire specificamente la funzione di GDF-15 umano (hGDF-15), purché sia in accordo con le rivendicazioni allegate.

Se una sostanza di interesse è o meno un "inibitore

di hGDF-15" può venire determinato usando i metodi descritti in questa sede, come dettagliato nelle forme di realizzazione preferite. Un metodo preferito secondo le forme di realizzazione preferite è il metodo usato nell'esempio 3.

È stato precedentemente dimostrato che la proteina GDF-15 umana può venire vantaggiosamente mirata mediante un anticorpo monoclonale (WO2014/049087), e che tale anticorpo ha proprietà vantaggiose comprendenti una alta affinità di legame a GDF-15 umano, come dimostrato mediante una costante di dissociazione all'equilibrio di circa 790 pM per GDF-15 umano ricombinante (vedere l'esempio di riferimento 1). Quindi, secondo l'invenzione, l'inibitore di hGDF-15 da usare è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a hGDF-15, o una sua porzione legante hGDF-15.

Quindi, in una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di hGDF-15 secondo l'invenzione è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il dominio variabile della catena pesante comprende una regione CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 5 o una sequenza amminoacidica identica per almeno il 90% a questa, e in cui il dominio variabile della

catena leggera comprende una regione CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 7 o una sequenza amminoacidica identica per almeno l'85% a questa. In questa forma di realizzazione, preferibilmente, l'anticorpo o una sua porzione legante hGDF-15 comprende un dominio variabile della catena pesante che comprende una regione CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 3 e una regione CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 4, e l'anticorpo o una sua porzione legante hGDF-15 comprende un dominio variabile della catena leggera che comprende una regione CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 6, e una regione CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica ser-ala-ser.

Quindi, in una forma di realizzazione ancora più preferita, l'inibitore di hGDF-15 secondo l'invenzione è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui l'anticorpo o una sua porzione legante hGDF-15 comprende un dominio variabile della catena pesante che comprende una regione CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 3, una regione CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 4 e una regione CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID.

n.: 5, e in cui l'anticorpo o una sua porzione legante hGDF-15 comprende un dominio variabile della catena leggera che comprende una regione CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 6, una regione CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica ser-ala-ser e una regione CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 7.

In un'altra forma di realizzazione secondo le forme di realizzazione sopra dell'anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, il dominio variabile della catena pesante comprende una regione comprendente una regione FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 e una FR3 e comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 1 o una sequenza identica a questa per l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98% o il 99%, e il dominio variabile della catena leggera comprende una regione comprendente una regione FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 e una FR3 e comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 2 o una sequenza identica a questa per almeno l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98% o il 99%.

In una forma di realizzazione preferita secondo le

forme di realizzazione sopra dell'anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, l'anticorpo è un anticorpo umanizzato o una sua porzione legante hGDF-15. Il dominio costante della catena pesante di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 29, o una sequenza amminoacidica identica a questa per almeno l'85%, preferibilmente almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95%, e il dominio costante della catena leggera di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 32, o una sequenza amminoacidica identica a questa per almeno l'85%, preferibilmente almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95%. Più preferibilmente, il dominio costante della catena pesante di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 29, o una sequenza amminoacidica identica a questa per almeno il 98%, preferibilmente almeno il 99%, e il dominio costante della catena leggera di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 32, o una sequenza

amminoacidica identica a questa per almeno il 98%, preferibilmente almeno il 99%. Ancora più preferibilmente, il dominio costante della catena pesante di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 29, e il dominio costante della catena leggera di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 32. Il dominio variabile della catena pesante di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 28, o una sequenza amminoacidica identica a questa per almeno il 90%, preferibilmente almeno il 95%, più preferibilmente almeno il 98%, ancora più preferibilmente almeno il 99%, e il dominio variabile della catena leggera di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 può comprendere la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 31, o una sequenza amminoacidica identica a questa per almeno il 90%, preferibilmente almeno il 95%, più preferibilmente almeno il 98%, ancora più preferibilmente almeno il 99%. Ancora più preferibilmente, il dominio variabile della catena pesante di questo anticorpo monoclonale o di una sua

porzione legante hGDF-15 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 28, e il dominio variabile della catena leggera di questo anticorpo monoclonale o di una sua porzione legante hGDF-15 comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 31.

In un'altra forma di realizzazione secondo le forme di realizzazione sopra dell'anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, il dominio variabile della catena pesante comprende una regione CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 3 e una regione CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 4, e il dominio variabile della catena leggera comprende una regione CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 6 e una regione CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 7. In un aspetto preferito di questa forma di realizzazione, l'anticorpo può avere sequenze della CDR3 come definite in qualsiasi delle forme di realizzazione dell'invenzione descritte sopra.

In un'altra forma di realizzazione secondo l'anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, la porzione legante hGDF-15 è un anticorpo a dominio singolo (anche

indicato come "Nanobody<sup>TM</sup>"). In un aspetto di questa forma di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo comprende le sequenze amminoacidiche delle CDR1, CDR2 e CDR3 di, rispettivamente, SEQ. ID. n.: 3, SEQ. ID. n.: 4 e SEQ. ID. n.: 5. In un altro aspetto di questa forma di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo comprende le sequenze amminoacidiche di CDR1, CDR2 e CDR3 di, rispettivamente, SEQ. ID. n.: 6, ser-ala-ser e SEQ. ID. n.: 7. In un aspetto preferito di questa forma di realizzazione, l'anticorpo a dominio singolo è un anticorpo umanizzato.

Preferibilmente, gli anticorpi in grado di legarsi a GDF-15 umano o le loro porzioni leganti hGDF-15 hanno una costante di dissociazione all'equilibrio per GDF-15 umano che è uguale a o meno di 100 nM, meno di 20 nM, preferibilmente meno di 10 nM, più preferibilmente meno di 5 nM e ancora più preferibilmente fra 0,1 nM e 2 nM.

In un'altra forma di realizzazione secondo le forme di realizzazione sopra dell'anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 si legano allo stesso epitopo di GDF-15 umano come l'anticorpo per GDF-15 umano ottenibile dalla linea cellulare B1-23

depositata presso Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ) con il n. di accesso DSM ACC3142. Come descritto in questa sede, il legame dell'anticorpo a GDF-15 umano secondo la presente invenzione viene preferibilmente valutato mediante misurazioni della risonanza del plasmone di superficie come un metodo standard di riferimento, secondo le procedure descritte nell'esempio di riferimento 1. Il legame allo stesso epitopo su GDF-15 umano può venire analogamente valutato mediante esperimenti di legame competitivo con risonanza del plasmone di superficie dell'anticorpo a GDF-15 umano ottenibile dalla linea cellulare B1-23 e dell'anticorpo che si prevede si legghi allo stesso epitopo di GDF-15 umano come l'anticorpo per GDF-15 umano ottenibile dalla linea cellulare B1-23.

In un'altra forma di realizzazione preferita, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il dominio variabile della catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 39 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il

96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, e il dominio variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 40 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%.

In un'altra forma di realizzazione preferita, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il dominio variabile della catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 41 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, e il dominio variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 42 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%.

In un'altra forma di realizzazione preferita,

l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il dominio variabile della catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 43 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, e il dominio variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 44 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%.

In un'altra forma di realizzazione preferita, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il dominio variabile della catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 45 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il

96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, e il dominio variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 46 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%.

In un'altra forma di realizzazione preferita, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale che è in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il dominio variabile della catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 47 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, e il dominio variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 48 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%.

In un'altra forma di realizzazione preferita,

l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il dominio variabile della catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 49 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, e il dominio variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 50 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%.

In un'altra forma di realizzazione preferita, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il dominio variabile della catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 51 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il

96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%, e il dominio variabile della catena leggera comprende la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 52 o una sequenza che è identica a questa per almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98% o almeno il 99%.

In un'altra forma di realizzazione preferita, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale o una sua porzione legante hGDF-15, che è in grado di competere con uno qualsiasi degli anticorpi in grado di legarsi a GDF-15 umano indicati in questa sede per il legame a GDF-15 umano, preferibilmente per il legame a GDF-15 umano ricombinante.

In una forma di realizzazione molto preferita, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale umanizzato o una sua porzione legante hGDF-15. Per qualsiasi data sequenza di un anticorpo non umano secondo l'invenzione (cioè una sequenza di anticorpo donatore), anticorpi monoclonali anti-GDF-15 umano umanizzati dell'invenzione o loro porzioni leganti hGDF-15 possono venire generati secondo tecniche note nella tecnica,

come descritto sopra.

In una forma di realizzazione molto preferita, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a GDF-15 umano, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui il legame è legame a un epitopo conformazionale o discontinuo su GDF-15 umano formato dalle sequenze amminoacidiche di SEQ. ID. n.: 25 e SEQ. ID. n.: 26. In un aspetto preferito di questa forma di realizzazione, l'anticorpo o una sua porzione legante hGDF-15 è un anticorpo o una sua porzione legante hGDF-15 come definiti mediante le sequenze di una qualsiasi delle forme di realizzazione sopra.

L'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 può essere legato a un farmaco. In aspetti non limitativi di questa forma di realizzazione, il farmaco può essere un agente anticancro e/o una molecola immuno-stimolatrice noti. Agenti anticancro noti comprendono agenti alchilanti come cisplatino, carboplatino, ossaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamide, clorambucile e ifosfamide; anti-metaboliti come azatioprina e mercaptopurina; alcaloidi come alcaloidi della vinca (per esempio vincristina, vinblastina, vinorelbina e

vindesina), tassani (per esempio paclitaxel, docetaxel), etoposide e teniposide; inibitori di topoisomerasi come camptotecine (per esempio irinotecano e topotecano); antibiotici citotossici come actinomicina, antracicline, doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina, epirubicina, bleomicina, plicamicina e mitomicina; e radioisotopi.

In una ulteriore forma di realizzazione secondo le forme di realizzazione sopra, l'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o la sua porzione legante hGDF-15 è modificato mediante un marcatore amminoacidico. Esempi non limitativi di tali marcatori comprendono marcatori di poliistidina (His-), marcatore FLAG, marcatore di emagglutinina (HA), marcatore di glicoproteina D (gD) e marcatore c-myc. I marcatori possono venire usati per vari scopi. Per esempio, possono venire usati per contribuire alla purificazione dell'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o della sua porzione legante hGDF-15. Preferibilmente, tali marcatori sono presenti al C terminale o al N terminale dell'anticorpo in grado di legarsi a GDF-15 umano o della sua porzione legante hGDF-15.

#### Bloccanti del punto di controllo immunitario

Le cellule cancerose contengono mutazioni genomiche

che danno luogo ad antigeni delle cellule cancerose che sono specifici per le cellule cancerose e diversi dagli antigeni di cellule non cancerose. Quindi, un sistema immunitario intatto che non è inibito dovrebbe riconoscere questi antigeni di cellule cancerose, per cui viene stimolata una risposta immunitaria contro questi antigeni. Tuttavia, molti cancri hanno sviluppato meccanismi di immunotolleranza contro questi antigeni. Una classe di meccanismi mediante i quali cellule cancerose ottengono tale immunotolleranza è l'utilizzazione di punti di controllo immunitario. Un "punto di controllo immunitario" quando usato in questa sede indica generalmente un meccanismo immunologico mediante il quale una risposta immunitaria può venire inibita. Più particolarmente, un punto di controllo immunitario è un meccanismo che è caratterizzato dal fatto che una molecola del sistema immunitario (o un gruppo di molecole del sistema immunitario) inibisce la risposta immunitaria inibendo l'attivazione di cellule del sistema immunitario. Tale molecola (o gruppo di molecole) del sistema immunitario che inibisce (inibiscono) la risposta immunitaria inibendo l'attivazione di cellule del sistema immunitario è (sono) anche nota (noto) come molecola(e) del punto di

controllo.

Quando usato in questa sede, un "bloccante del punto di controllo immunitario" è una molecola che è in grado di bloccare un punto di controllo immunitario. Mentre si comprende che un inibitore di hGDF-15 quando usato secondo l'invenzione ha effetti sul sistema immunitario comprendenti effetti su cellule T CD8+, l'espressione "bloccante del punto di controllo immunitario" quando usata in questa sede non si riferisce all'inibitore di hGDF-15, ma indica una molecola che è diversa da un inibitore di hGDF-15.

I bloccanti del punto di controllo immunitario maggiormente comuni che sono noti finora sono inibitori di molecole del punto di controllo immunitario come inibitori di PD-1 umana e inibitori di PD-L1 umana. Ulteriori bloccanti del punto di controllo immunitario sono anti-LAG-3, anti-B7H3, anti-TIM3, anti-VISTA, anti-TIGIT, anti-KIR, anti-CD27, anti-CD137, nonché inibitori di IDO. Quindi, una forma preferita di un bloccante del punto di controllo immunitario è un inibitore di una molecola del punto di controllo immunitario. In alternativa, un bloccante del punto di controllo immunitario può essere un attivatore di un segnale co-stimolante che aggira il punto di controllo immunitario.

Metodi per misurare la potenza di bloccanti del punto di controllo immunitario comprendono saggi di legame *in vitro*, saggi di rilascio di citochine basati su cellule T primarie e sistemi modello *in vivo*. Inoltre, la Promega ha ora sviluppato un sistema reporter bioluminescente commercialmente disponibile per PD-1/PD-L1, che viene per esempio indicato in Mei Cong, Ph.D. et al.: Advertorial: Novel Bioassay to Assess PD-1/PD-L1 Therapeutic Antibodies in Development for Immunotherapy Bioluminescent Reporter-Based PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay. (<http://www.genengnews.com/gen-articles/advertorial-novel-bioassay-to-assess-pd-1-pd-l1-therapeutic-antibodies-in-development-for-immun/5511/>).

Bloccanti del punto di controllo immunitario preferiti sono inibitori di PD-1 umana e inibitori di PD-L1 umana. In una forma di realizzazione preferita secondo tutte le forme di realizzazione dell'invenzione, il bloccante del punto di controllo immunitario non è un inibitore di CTLA4 umano.

Quando usato in questa sede, un "inibitore di PD-1 umana" può essere qualsiasi molecola che è in grado di inibire specificamente la funzione di PD-1 umana. Esempi non limitativi di tali molecole sono anticorpi in grado

di legarsi a PD-1 umana e DARPins (proteine progettate con ripetizioni di anchirina) in grado di legarsi a PD-1 umana.

L'inibitore di PD-1 da usare secondo l'invenzione è un anticorpo in grado di legarsi a PD-1 umana, più preferibilmente un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-1 umana. Ancora più preferibilmente, l'anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-1 umana viene scelto dal gruppo consistente di nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab e AMP-224.

Quando usato in questa sede, un "inibitore di PD-L1 umana" può essere qualsiasi molecola che è in grado di inibire specificamente la funzione di PD-L1 umana. Esempi non limitativi di tali molecole sono anticorpi in grado di legarsi a PD-L1 umana e DARPins (proteine progettate con ripetizioni di anchirina) in grado di legarsi a PD-L1 umana.

L'inibitore di PD-L1 umana da usare secondo l'invenzione è un anticorpo in grado di legarsi a PD-L1 umana, più preferibilmente un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-L1 umana. Ancora più preferibilmente, l'anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-L1 umana viene scelto dal gruppo consistente di BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 e MSB0010718C.

### Metodi e tecniche

Generalmente, se non definiti altrimenti in questa sede, i metodi usati nella presente invenzione (per esempio metodi di clonazione o metodi relativi ad anticorpi) vengono eseguiti secondo procedure note nella tecnica, per esempio le procedure descritte in Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual"., 2<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989), Ausubel et al. ("Current Protocols in Molecular Biology". Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992), e Harlow e Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988).

Il legame di anticorpi alle loro rispettive proteine bersaglio può venire valutato mediante metodi noti nella tecnica. Il legame di anticorpi monoclonali ai loro rispettivi bersagli viene preferibilmente valutato mediante misurazioni della risonanza del plasmone di superficie. Queste misurazioni vengono preferibilmente eseguite usando un sistema Biorad ProteOn XPR36 e chip sensori Biorad GLC, come esemplificato per mAb-B1-23 anti-GDF-15 umano nell'esempio di riferimento 1.

Allineamenti di sequenze di sequenze secondo l'invenzione vengono eseguiti usando l'algoritmo BLAST (vedere Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool". Journal of Molecular Biology 215. pag. 403-410; Altschul et al.: (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Preferibilmente, vengono usati i parametri seguenti: sequenze bersaglio massime 10; dimensione parola 3; matrice BLOSUM 62; costi spazio: esistenza 11, estensione 1; regolazione della matrice del punteggio composizionale condizionale. Quindi, quando usati in connessione con sequenze, termini come "identità" o "identiche" si riferiscono al valore di identità ottenuto usando l'algoritmo BLAST.

Anticorpi monoclonali secondo l'invenzione possono venire prodotti mediante qualsiasi metodo noto nella tecnica, comprendente, ma senza essere limitato a questi, i metodi indicati in Siegel DL ("Recombinant monoclonal antibody technology". Transfus Clin Biol. Gen 2002; 9(1):15-22). In una forma di realizzazione, un anticorpo secondo l'invenzione viene prodotto mediante la linea cellulare ibridoma B1-23 depositata presso Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

GmbH (DSMZ) con il n. di accesso DSM ACC3142 ai sensi del trattato di Budapest. Il deposito è stato registrato il 29 settembre 2011.

La proliferazione cellulare può venire misurata mediante metodi adatti noti nella tecnica, comprendenti (ma senza essere limitati a questi) microscopia ottica, saggi metabolici come quelli che misurano tramite il saggio del potenziale redox mitocondriale (per esempio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio); colorazione con Resazurina che è anche nota come saggio Alamar Blue®), colorazione di biomarcatori di proliferazione endogeni noti (per esempio Ki-67), e metodi che misurano la sintesi di DNA cellulare (per esempio saggi di incorporazione di BrdU e [<sup>3</sup>H]-timidina).

I livelli di GDF-15 umano (hGDF-15) possono venire misurati mediante qualsiasi metodo noto nella tecnica, comprendente misurazioni dei livelli di proteina hGDF-15 mediante metodi comprendenti (ma senza essere limitati a questi) spettrometria di massa per proteine o peptidi derivati da GDF-15 umano, Western Blotting usando anticorpi specifici per GDF-15 umano, citometria a flusso usando anticorpi specifici per GDF-15 umano, test con strisce reattive usando anticorpi specifici per

GDF-15 umano, o immunocitochimica usando anticorpi specifici per GDF-15 umano. Un metodo preferito di misurazione dei livelli nel siero di hGDF-15 è una misurazione dei livelli nel siero di hGDF-15 mediante saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA) usando anticorpi per GDF-15. Tali metodi ELISA sono esemplificati nell'esempio 1. In alternativa, i livelli nel siero di hGDF-15 possono venire determinati mediante immunosaggi di elettrochemiluminescenza noti usando anticorpi per GDF-15. Per esempio, la tecnologia Roche Elecsys® può venire usata per tali immunosaggi con elettrochemiluminescenza.

#### Preparazione di composizioni dell'invenzione

Composizioni secondo la presente invenzione vengono preparate secondo standard noti per la preparazione di composizioni farmaceutiche.

Per esempio, le composizioni vengono preparate in un modo affinché possano venire conservate e somministrate appropriatamente, per esempio usando componenti farmaceuticamente accettabili come veicolanti, eccipienti o stabilizzanti.

Tali componenti farmaceuticamente accettabili sono non tossici nelle quantità usate quando si somministra la composizione farmaceutica a un paziente. I componenti

farmaceutici accettabili aggiunti alle composizioni farmaceutiche possono dipendere dalla natura chimica degli inibitori presenti nella composizione (per esempio a seconda che gli inibitori siano anticorpi, costrutti a forcina di siRNA o RNAs interferenti corti), il particolare uso designato delle composizioni farmaceutiche e la via di somministrazione.

In generale, i componenti farmaceuticamente accettabili usati in connessione con la presente invenzione vengono usati secondo la conoscenza disponibile nella tecnica, per esempio da Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20<sup>a</sup> edizione, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA.

#### Prodotti per l'uso in metodi terapeutici

La presente invenzione si riferisce agli inibitori di hGDF-15 per gli usi definiti nelle rivendicazioni allegate.

In una forma di realizzazione degli inibitori di hGDF-15 per l'uso, dei kit per l'uso o delle composizioni per l'uso sopra, l'inibitore di hGDF-15 e il bloccante del punto di controllo immunitario sono i soli ingredienti che sono farmaceuticamente attivi contro il cancro.

In una forma di realizzazione alternativa,

l'inibitore di hGDF-15 viene usato in combinazione con uno o più ingredienti ulteriori farmaceuticamente attivi contro il cancro. In un aspetto di questa forma di realizzazione, gli uno o più ingredienti ulteriori farmaceuticamente attivi contro il cancro sono un agente anticancro e/o una molecola immuno-stimolatrice noti. Agenti anticancro noti comprendono, ma non sono limitati a questi, agenti alchilanti come cisplatino, carboplatino, ossaliplatino, mecloretammina, ciclofosfamide, clorambucile e ifosfamide; anti-metaboliti come azatioprina e mercaptopurina; alcaloidi come alcaloidi della vinca (per esempio vincristina, vinblastina, vinorelbina e vindesina), tassani (per esempio paclitaxel, docetaxel), etoposide e teniposide; inibitori di topoisomerasi come camptotecine (per esempio irinotecano e topotecano); antibiotici citotossici come actinomicina, antracicline, doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina, epirubicina, bleomicina, plicamicina e mitomicina; e radioisotopi. I seguenti ingredienti farmaceuticamente attivi contro il cancro sono particolarmente preferiti da usare in combinazione con l'inibitore di hGDF-15: molecole immuno-stimolatrici comprendono anti-LAG-3, anti-B7H3, anti-TIM3, anti-VISTA, anti-TIGIT, anti-KIR,

anti-CD27, anti-CD137, anti-Ox40, anti-4-1BB, anti-GITR, anti-CD28, anti-CD40 o inibitori di IDO. Inoltre, altri trattamenti con anticorpi come anti-Her2, anti-EGFR, anti-Claudina, o loro successori glico-ottimizzati sono anche particolarmente preferiti poiché trarranno beneficio da una combinazione con l'inibitore di hGDF-15, per esempio per effetto di una infiltrazione di cellule immunitarie potenziata nel cancro solido causata dall'inibitore di hGDF-15. Analogamente, approcci di vaccinazione (per esempio con peptidi o cellule dendritiche) o terapie con cellule adottive, cellule T tumore-reattive o cellule dendritiche sono anche particolarmente preferiti poiché trarranno beneficio da una combinazione con l'inibitore di hGDF-15. Inoltre, i trattamenti seguenti sono anche particolarmente preferiti poiché sinergizzeranno con l'inibitore di hGDF-15:

- trattamenti con anticorpi o molecole tipo anticorpo aventi una o più specificità per il tumore e cellule immunitarie (per esempio Bites, DARTS, DARPINS, Catumaxomab);

- trattamenti mediante immunoterapia basata su vaccino contro peptidi associati a tumore, per esempio con vaccini multi-peptide come IMA901, ISA203 o con

vaccini a base di RNA (per esempio CV9104), e/o

- trattamenti con sostanze che attivano cellule immunitarie (per esempio derivati di FAA per attivare macrofagi, o ligandi per recettori a tipo Toll come coniugati SLP-AMPLIVANT).

#### Combinazioni per usi secondo l'invenzione

La presente invenzione comprende prodotti in combinazione per l'uso, come definito dalle rivendicazioni allegate.

La combinazione dell'inibitore di hGDF-15 e il bloccante del punto di controllo immunitario possono venire somministrati insieme o separatamente.

Per esempio, in una forma di realizzazione preferita, la somministrazione dell'inibitore di hGDF-15 viene iniziata prima dell'inizio della somministrazione del bloccante del punto di controllo immunitario. Questa disposizione permette vantaggiosamente di aumentare la percentuale di cellule T, e in particolare la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup>, nel cancro solido, per cui un successivo trattamento con il bloccante del punto di controllo immunitario può essere più efficace per effetto della percentuale di partenza aumentata di cellule T CD8<sup>+</sup> nel cancro solido.

Kit

La presente descrizione fornisce anche un kit comprendente un inibitore di hGDF-15 e almeno un bloccante del punto di controllo immunitario come definiti sopra. Il kit dell'invenzione è come definito nelle rivendicazioni allegate.

L'inibitore di hGDF-15 e uno o più o tutti i bloccanti del punto di controllo immunitario possono essere contenuti in contenitori separati o in un singolo contenitore.

Un contenitore quando usato può essere qualsiasi tipo di contenitore che sia adatto per contenere l'inibitore di hGDF-15 e/o l'almeno un bloccante del punto di controllo immunitario. Esempi non limitativi di tali contenitori sono fiale e siringhe pre-caricate.

Oltre all'inibitore di hGDF-15 e all'almeno un bloccante del punto di controllo immunitario, il kit può contenere ulteriori agenti terapeutici. Per esempio, il kit può contenere uno o più ingredienti ulteriori farmaceuticamente attivi contro il cancro. Gli uno o più ingredienti ulteriori farmaceuticamente attivi contro il cancro possono essere come definiti sopra. Tali ingredienti ulteriori farmaceuticamente attivi contro il cancro possono venire usati nei metodi dell'invenzione insieme con l'inibitore di hGDF-15 e l'almeno un

bloccante del punto di controllo immunitario.

Preferibilmente, un kit secondo l'invenzione comprende inoltre istruzioni per l'uso.

Sequenze

Le sequenze amminoacidiche indicate nella presente domanda sono come segue (in un ordine dal N terminale al C terminale; rappresentate nel codice degli amminoacidi a una lettera):

SEQ. ID. n.: 1 (regione del dominio variabile della catena pesante comprendente una regione FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 e una FR3 dalla sequenza polipeptidica del mAb monoclonale anti-GDF-15 umano B1-23):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISK  
DPSRNQVFLKITSVDTADTATYYC

SEQ. ID. n.: 2 (regione del dominio variabile della catena leggera comprendente una regione FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 e una FR3 dalla sequenza polipeptidica del mAb monoclonale anti-GDF-15 umano B1-23):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF  
LTISNVQSEDLAEYFC

SEQ. ID. n.: 3 (sequenza peptidica della regione CDR1 della catena pesante del mAb monoclonale anti-GDF-15 umano B1-23):

GFSLSSTSGMG

SEQ. ID. n.: 4 (sequenza peptidica della regione

CDR2 della catena pesante del mAb monoclonale anti-GDF-15 umano B1-23):

IYWDDDK

SEQ. ID. n.: 5 (sequenza peptidica della regione CDR3 della catena pesante del mAb monoclonale anti-GDF-15 umano B1-23):

ARSSYGAMDY

SEQ. ID. n.: 6 (sequenza peptidica della regione CDR1 della catena leggera del mAb monoclonale anti-GDF-15 umano B1-23):

QNVGTN

Sequenza peptidica della regione CDR2 della catena leggera del mAb monoclonale anti-GDF-15 umano B1-23:

SAS

SEQ. ID. n.: 7 (sequenza peptidica della regione CDR3 della catena leggera del mAb monoclonale anti-GDF-15 umano B1-23):

QQYNNFPYT

SEQ. ID. n.: 8 (proteina GDF-15 umana matura ricombinante):

GSARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLK  
PDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI

SEQ. ID. n.: 9 (proteina precursore GDF-15 umana):

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQS  
WEDSNTDLPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQL  
SLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPRCCRLHTV  
RASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKT  
DTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

SEQ. ID. n.: 10 (proteina precursore GDF-15 umana  
+ legante GSGS al N terminale e C terminale):

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSSELHSEDSRFRELRKRYEDLL  
TRLRANQSWEDSNTDLPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDV  
TRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPG  
RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASY  
NPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCIGSGSGSG

SEQ. ID. n.: 11 (peptide Flag): DYKDDDDKGG

SEQ. ID. n.: 12 (peptide HA): YPYDVPDYAG

SEQ. ID. n.: 13 (peptide derivato da GDF-15 umano):  
ELHLRPQAARGRR

SEQ. ID. n.: 14 (peptide derivato da GDF-15 umano):  
LHLRPQAARGRRR

SEQ. ID. n.: 15 (peptide derivato da GDF-15 umano):  
HLRPQAARGRRRA

SEQ. ID. n.: 16 (peptide derivato da GDF-15 umano):  
LRPQAARGRRRAR

SEQ. ID. n.: 17 (peptide derivato da GDF-15 umano):  
RPQAARGRRRARA

SEQ. ID. n.: 18 (peptide derivato da GDF-15 umano):  
PQAARGRRRARAR

SEQ. ID. n.: 19 (peptide derivato da GDF-15 umano):

QAARGRRRARARN

SEQ. ID. n.: 20 (peptide derivato da GDF-15 umano):

MHAQIKTSLHRLK

SEQ. ID. n.: 25 (peptide di GDF-15 comprendente parte dell'epitopo di GDF-15 che si lega a B1-23):

EVQVTMCIGACPSQFR

SEQ. ID. n.: 26 (peptide di GDF-15 comprendente parte dell'epitopo di GDF-15 che si lega a B1-23):

TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

Le sequenze di acido nucleico indicate nella presente domanda sono come segue (in un ordine da 5' a 3'; rappresentate secondo il codice dell'acido nucleico standard):

SEQ. ID. n.: 21 (sequenza nucleotidica di DNA codificante la sequenza amminoacidica definita in SEQ. ID. n.: 1):

CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTCT  
TTCTCTGGGTTTTCACTGAGTACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTC  
TGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAOPCAACCCTGAAGAGCCGGCTCA  
CAATCTCCAAGGATCCCTCCAGAAACCAGGTATTCTCAAGATCACCAGTGTGGACTGCAGATACTGC  
CACATACTACTGT

SEQ. ID. n.: 22 (sequenza nucleotidica di DNA codificante la sequenza amminoacidica definita in SEQ. ID. n.: 2):

GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCA  
AGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTGGCCTGGTTTCTACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
TATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGA  
TTTCACTCTCACCATCAGCAACGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGT

SEQ. ID. n.: 23 (sequenza nucleotidica di DNA  
codificante la sequenza amminoacidica definita in SEQ.  
ID. n.: 5):

GCTCGAAGTTCCTACGGGGCAATGGACTAC

SEQ. ID. n.: 24 (sequenza nucleotidica di DNA  
codificante la sequenza amminoacidica definita in SEQ.  
ID. n.: 7):

CAGCAATATAACAACCTTCCGTACACG

Ulteriori sequenze amminoacidiche sono come segue  
(in un ordine dal N terminale al C terminale;  
rappresentate nel codice degli amminoacidi a una  
lettera):

SEQ. ID. n.: 27 (sequenza amminoacidica della  
catena pesante dell'anticorpo anti-GDF-15 B1-23  
umanizzato H1L5):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKLEWLAHYWDKRYNPTLKSRLTITKD  
PSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSSYGAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGC  
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP  
KSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ. ID. n.: 28 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena pesante dell'anticorpo anti-GDF-

15 B1-23 umanizzato H1L5):

QITLKESGPTLVKPTQLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTITKD  
PSKNQVVLMTNMDPVDATYICARSSYGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ. ID. n.: 29 (sequenza amminoacidica del dominio  
costante della catena pesante dell'anticorpo anti-GDF-

15 B1-23 umanizzato H1L5):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTP  
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
WVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ. ID. n.: 30 (sequenza amminoacidica della  
catena leggera dell'anticorpo anti-GDF-15 B1-23  
umanizzato H1L5):

DIVLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTEFTL  
TISSLQPEDFAAYFCQQYNFPYTFGGGTKLEIKRAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWK  
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ. ID. n.: 31 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena leggera dell'anticorpo anti-GDF-  
15 B1-23 umanizzato H1L5):

DIVLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTEFTL  
TISSLQPEDFAAYFCQQYNFPYTFGGGTKLEIKR

SEQ. ID. n.: 32 (sequenza amminoacidica del dominio  
costante della catena leggera dell'anticorpo anti-GDF-  
15 B1-23 umanizzato H1L5):

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA  
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ. ID. n.: 33 (sequenza amminoacidica della

catena pesante dell'anticorpo anti-GDF-15 B1-23  
chimerico):

QVKLQQSGPGILQSSQTLTLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISK  
DPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMDYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEP  
KSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ. ID. n.: 34 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena pesante dell'anticorpo anti-GDF-  
15 B1-23 chimerico):

QVKLQQSGPGILQSSQTLTLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISK  
DPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMDYWGQGSTVTVSS

SEQ. ID. n.: 35 (sequenza amminoacidica del dominio  
costante della catena pesante dell'anticorpo anti-GDF-  
15 B1-23 chimerico):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP  
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
WVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ. ID. n.: 36 (sequenza amminoacidica della  
catena leggera dell'anticorpo anti-GDF-15 B1-23  
chimerico):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF  
LTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC

SEQ. ID. n.: 37 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena leggera dell'anticorpo anti-GDF-

15 B1-23 chimerico):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF  
LTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKRTVA

SEQ. ID. n.: 38 (sequenza amminoacidica del dominio  
costante della catena leggera dell'anticorpo anti-GDF-

15 B1-23 chimerico):

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTKA  
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ. ID. n.: 39 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena pesante dell'anticorpo 01G06):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYNMDWVRQAPGQSLEWVGQINPNGLIFFNQKFKGRVTL  
TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGTLVTVSS

SEQ. ID. n.: 40 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena leggera dell'anticorpo 01G06):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSENHNYLAWYQQKPGKSPKLLIYDAKTLADGVPSRFSGSGSGTDY  
TLTISSLQPEDFATYYCQHFWSDPYTFGGGKLEIK

SEQ. ID. n.: 41 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena pesante dell'anticorpo 03G05):

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTFSYWIHWVNRPGQGLEWIGDINPSNGRSKYNEKFKNKATMT  
ADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVLDGAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ. ID. n.: 42 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena leggera dell'anticorpo 03G05):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGSVPARFSGSGS  
GTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGSKLEIK

SEQ. ID. n.: 43 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena pesante dell'anticorpo 04F08):

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTYGMGVTWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSRLTI  
SKDTSNNQVFLKITSVDTADTATYYCAQTGYSNLFAYWGQGTLVTVSA

SEQ. ID. n.: 44 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena leggera dell'anticorpo 04F08):  
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKLGQSPKTLIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF  
TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGKLEIK

SEQ. ID. n.: 45 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena pesante dell'anticorpo 06C11):  
QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLNTYGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTI  
SKDASNNRVFLKITSVDTADTATYYCAQRGYDDYWGYYWGQGLVTISA

SEQ. ID. n.: 46 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena leggera dell'anticorpo 06C11):  
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF  
ILTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELK

SEQ. ID. n.: 47 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena pesante dell'anticorpo 08G01):  
EVLLQQSGPEVVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGEINPNNGGTFYNQKFKGKATLT  
VDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ. ID. n.: 48 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena leggera dell'anticorpo 08G01):  
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTQY  
SLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSPPYTFGGGKLEIK

SEQ. ID. n.: 49 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena pesante dell'anticorpo 14F11):  
QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWLADIWDDDKYYNPSLKSRLTI  
SKDTSSNEVFLKIAIVDTADTATYYCARRGHYSAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ. ID. n.: 50 (sequenza amminoacidica del dominio  
variabile della catena leggera dell'anticorpo 14F11):  
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSPSYRYSGVPDRFTGSGSGTDF  
TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPHTFGGGTKLEMK

SEQ. ID. n.: 51 (sequenza amminoacidica del dominio variabile della catena pesante dell'anticorpo 17B11):  
QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHNDWDDDKRYKSSLKSRLLI  
SKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARRVGGLEGYFDYWGQGTTLVSS

SEQ. ID. n.: 52 (sequenza amminoacidica del dominio variabile della catena leggera dell'anticorpo 17B11):  
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSRFSYMHWFQQKPGQAPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGS  
GTDFTLNHPVEGEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGKLEIK

### **Esempi**

Gli esempi di riferimento da 1 a 3 esemplificano un inibitore di hGDF-15, che può venire usato nelle composizioni, nei kit, nei metodi e negli usi secondo l'invenzione. Questo inibitore di hGDF-15 è un anticorpo monoclonale che è noto da WO 2014/049087:

**Esempio di riferimento 1**: generazione e caratterizzazione dell'anticorpo B1-23 per GDF-15.

L'anticorpo B1-23 è stato generato in topo knockout per GDF-15. GDF-15 umano ricombinante (SEQ. ID. n.: 8) è stato usato come l'immunogene.

La linea cellulare ibridoma B1-23 che produce il mAb B1-23 è stata depositata dalla Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Sanderring 2, 97070 Würzburg, Germania, presso il Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con il n. di accesso DSM ACC3142, ai sensi del trattato di

Budapest.

Per mezzo di un sistema a striscia di test commercialmente disponibile, B1-23 è stato identificato come un isotipo IgG2a (catena kappa). Usando misurazioni della risonanza del plasmone di superficie, la costante di dissociazione (Kd) è stata determinata come segue:

il legame dell'anticorpo monoclonale anti-GDF-15 umano mAb B1-23 anti-GDF-15 umano secondo l'invenzione è stato misurato impiegando misurazioni della risonanza del plasmone di superficie usando un sistema Biorad ProteOn XPR36 e chip sensori Biorad GLC:

Per preparare i biosensori, proteina GDF-15 umana matura ricombinante è stata immobilizzata sulle celle di flusso 1 e 2. Su una cella di flusso è stato usato GDF-15 ricombinante derivato da cellule di insetto transfettate con Baculovirus (cellule di insetto HighFive) e sull'altra proteina ricombinante derivata dall'espressione in E. coli. Il chip sensore GLC è stato attivato usando Solfo-NHS (N-idrossisolfosuccinimide) ed EDC (1-etil-3-[3-dimetilamminopropil]carbodiimide cloridrato) (kit di accoppiamento dell'ammina Biorad ProteOn) secondo le raccomandazioni del produttore, la superficie del sensore è stata successivamente caricata con le proteine fino a una densità di circa 600 RU (1 Ru

= 1 pg mm<sup>-2</sup>). I gruppi di accoppiamento che non hanno reagito sono quindi stati bloccati mediante perfusione con etanolamina 1 M, pH 8,5, e il biosensore è stato equilibrato mediante perfusione del chip con tampone corrente (HEPES 10 M, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tween-20 0,005%, pH 7,4, indicato come HBS150). Come controlli sono state usate due celle di flusso, una vuota senza proteina accoppiata e una accoppiata con un partner di proteina non fisiologica (interleuchina-5 umana), che è stata immobilizzata usando la stessa chimica di accoppiamento e la stessa densità di accoppiamento. Per le misurazioni dell'interazione, mAb B1-23 anti-GDF-15 umano è stato disciolto in HBS150 e usato in sei concentrazioni diverse come analita (concentrazione: 0,4, 0,8, 3, 12, 49 e 98 nM). L'analita è stato perfuso sul biosensore usando la disposizione delle cinetiche one-shot per evitare rigenerazione intermittente, tutte le misurazioni sono state eseguite a 25°C e usando una portata di 100 µl min<sup>-1</sup>. Per processare l'effetto superficiale in massa e il legame non specifico al sensore, la matrice è stata rimossa sottraendo i dati SPR della cella di flusso vuota (cella di flusso 3) da tutti gli altri dati SPR. Il sensogramma risultante è stato analizzato usando il software ProteOn Manager

versione 3.0. Per l'analisi delle cinetiche di legame è stata ipotizzata una interazione di tipo Langmuir 1:1. Per la costante della velocità di associazione possono venire determinati un valore di  $5,4 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $k_{\text{on}}$ ) e per la costante della velocità di dissociazione un valore di  $4,3 \pm 0,03 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ( $k_{\text{off}}$ ) (i valori sono per l'interazione di mAb B1-23 anti-GDF-15 umano con GDF-15 derivato dall'espressione in cellule di insetto). La costante di dissociazione all'equilibrio è stata calcolata usando l'equazione  $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  per ottenere un valore di circa 790 pM. I valori dell'affinità per l'interazione di GDF-15 derivato dall'espressione in E. coli e del mAb B1-23 anti-GDF-15 umano differiscono di meno di un fattore di 2, le costanti di velocità per GDF-15 derivato da cellule di insetto ed E. coli deviano di circa il 45% e sono quindi entro l'accuratezza di misurazioni di SPR e probabilmente non riflettono una differenza reale in affinità. Alle condizioni usate il mAb B1-23 anti-GDF-15 umano non mostra legame a interleuchina-5 umana e quindi conferma la specificità dei dati di interazione e del mAb B1-23 anti-GDF-15 umano.

La sequenza amminoacidica di GDF-15 umano ricombinante (quando espresso in cellule di insetto

transfettate con Baculovirus) è:

GSARNGDHCP LGPGRCCRLH TVRASLEDLG WADWVLSPRE VQVTCIGAC PSQFRAANMH  
AQIKTSLHRL KPDTVPAPCC VPASYNPML IQKTDGTVSL QTYDDLLAKD CHCI

(SEQ. ID. n.: 8)

Quindi, usando misurazione della risonanza del plasmone di superficie è stata determinata la costante di dissociazione (Kd) di 790 pM. Per quanto riguarda un confronto: l'anticorpo usato terapeuticamente Rituximab ha una affinità significativamente minore (Kd = 8 nM).

È stato precedentemente dimostrato che il mAb B1-23 inibisce la proliferazione di cellule cancerose *in vitro*, e che il mAb B1-23 inibisce la crescita di tumori *in vivo* (WO2014/049087).

**Esempio di riferimento 2:** il mAb B1-23 riconosce un epitopo conformazionale o uno discontinuo di GDF-15 umano

Mappatura dell'epitopo: anticorpo monoclonale di topo GDF-15 contro peptidi lineari 13meri derivati da GDF-15

Antigene: GDF-15:

GGSGSGMPPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGLSLAEASRASFPGPSSELHSEDSRFRELRKRYEDLL  
TRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDV  
TRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPPLGPG  
RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASY

**NPMMLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCIGSGSGSG** (322 amminoacidi con legante) (SEQ. ID. n.: 10)

La sequenza della proteina è stata tradotta in peptidi 13meri con uno spostamento di un amminoacido. I C e N terminali sono stati allungati mediante un legante GSGS neutro per evitare peptidi troncati (lettere in grassetto).

Peptidi di controllo:

marcatore: **DYKDDDDKGG** (SEQ. ID. n.: 13), 78 macchie;  
HA: **YPYDVPDYAG** (SEQ. ID. n.: 14), 78 macchie (ciascuna copia di una serie)

Identificatore del chip peptidico:

000264\_01 (10/90, legante Ala2Asp)

Condizioni di colorazione:

tampone standard: PBS, pH 7,4 + 0,05% di Tween 20

Tampone di bloccaggio: tampone di bloccaggio Rockland MB-070

Tampone di incubazione: tampone standard con il 10% di tampone di bloccaggio Rockland MB-070

Campione primario: anticorpo monoclonale di topo GDF-15 (1 µg/µl): colorazione in tampone di incubazione per 16 h a 4°C a una diluizione di 1:100 e leggera agitazione a 500 giri/minuto

Anticorpo secondario: IgG anti-topo di capra (H+L)

IRDye680, colorazione in tampone di incubazione con una diluizione di 1:5.000 per 30 minuti a temperatura ambiente (RT)

Anticorpi di controllo: monoclonale anti-HA (12CA5)-LL-Atto 680 (1:1.000), monoclonale anti-FLAG(M2)-FluoProbes752 (1:1.000); colorazione in tampone di incubazione per 1 h a RT

Scanner:

sistema per la formazione di immagini Odyssey, LICOR Biosciences

Impostazioni: sfalsamento: 1 mm; risoluzione: 21  $\mu$ m; intensità verde/rosso: 77

Risultati:

dopo 30 minuti di pre-rigonfiamento in tampone standard e 30 minuti in tampone di bloccaggio, la serie di peptidi con peptidi lineari derivati da B7H3 10, 12 e 15meri è stata incubata con anticorpo IgG anti-topo di capra secondario (H+L) IRDye680 solo a una diluizione di 1:5.000 per 1 h a temperatura ambiente per analizzare le interazioni di sfondo dell'anticorpo secondario. Il PEPperCHIP® è stato lavato 2 x 1 minuto con tampone standard, risciacquato con acqua distillata e asciugato in una corrente di aria. Le letture sono state effettuate con il sistema per la formazione di immagini Odyssey a

una risoluzione di 21  $\mu\text{m}$  e intensità verde/rosso di 7/7: abbiamo osservato una interazione debole di peptidi ricchi di arginina (ELHLRPQAARGRR (SEQ. ID. n.: 15), LHLRPQAARGRRR (SEQ. ID. n.: 16), HLRPQAARGRRRA (SEQ. ID. n.: 17), LRPQAARGRRRAR (SEQ. ID. n.: 18), RPQAARGRRRARA (SEQ. ID. n.: 19), PQAARGRRRARAR (SEQ. ID. n.: 20) e QAARGRRRARARN (SEQ. ID. n.: 21)) che sono noti come leganti frequenti, e con il peptide basico MHAQIKTSLHRLK (SEQ. ID. n.: 22) per effetto di interazioni ioniche con il colorante per l'anticorpo caricato.

Dopo pre-rigonfiamento per 10 minuti in tampone standard, la microserie di peptidi è stata incubata per una notte a 4°C con anticorpo monoclonale di topo GDF-15 a una diluizione di 1:100. Il lavaggio ripetuto in tampone standard (2 x 1 minuto) è stato seguito da incubazione per 30 minuti con l'anticorpo secondario a una diluizione di 1:5.000 a temperatura ambiente. Dopo lavaggio per 2 x 10 s in tampone standard e breve risciacquo con acqua distillata, il PEPperCHIP® è stato asciugato in una corrente di aria. La lettura è stata eseguita con un sistema per la formazione di immagini Odyssey a una risoluzione di 21  $\mu\text{m}$  e intensità verde/rosso di 7/7 prima e dopo la colorazione dei peptidi di controllo mediante gli anticorpi anti-HA e

anti-FLAG (M2).

È stato dimostrato che nessuno dei peptidi 13meri lineari derivati da GDF-15 ha interagito con l'anticorpo monoclonale di topo GDF-15 anche a intensità sovraregolate. La colorazione dei peptidi di controllo Flag e HA che costituiscono la serie, tuttavia, ha dato luogo a intensità delle macchie buone e omogenee.

Sommario:

la mappatura dell'epitopo dell'anticorpo monoclonale di topo GDF-15 contro GDF-15 non rivela alcun epitopo lineare con i peptidi 13meri derivati dell'antigene. Secondo questo riscontro è molto probabile che l'anticorpo monoclonale di topo GDF-15 riconosca un epitopo conformazionale o uno discontinuo con bassa affinità di epitopi parziali. Per effetto dell'ovvia assenza di qualsiasi segnale di GDF-15 oltre la colorazione di sfondo del solo anticorpo secondario, la quantificazione delle intensità delle macchie con l'analizzatore PepSlide® e successiva annotazione dei peptidi sono state omesse.

**Esempio di riferimento 3:** identificazione strutturale di epitopi di un ligando peptidico mediante escissione dell'epitopo ed estrazione dell'epitopo tramite spettrometria di massa

L'epitopo di GDF-15 umano ricombinante che si lega all'anticorpo B1-23 è stato identificato per mezzo del metodo di escissione dell'epitopo e del metodo di estrazione dell'epitopo (Suckau et al. Proc Natl Acad Sci U S A. Dicembre 1990; 87(24): 9848-9852; R. Stefanescu et al., Eur.J.Mass Spectrom. 13, 69-75 (2007)).

Per la preparazione della colonna dell'anticorpo, l'anticorpo B1-23 è stato aggiunto ad acido 6-amminoesanoico attivato con NHS accoppiato a sepharose. L'anticorpo B1-23 accoppiato a sepharose è stato quindi caricato in una microcolonna da 0,8 ml e lavato con i tamponi di bloccaggio e lavaggio.

Esperimento di estrazione dell'epitopo:

GDF-15 umano ricombinante è stato digerito con tripsina per 2 h a 37°C (in soluzione), ottenendo differenti peptidi, a seconda dei siti di scissione con tripsina nella proteina. Dopo digestione completa, i peptidi sono stati caricati sulla colonna di affinità contenente l'anticorpo B1-23 immobilizzato. I peptidi non legati nonché potenzialmente legati di GDF-15 sono stati usati per l'analisi mediante spettrometria di massa. Una identificazione dei peptidi per mezzo di spettrometria di massa non è stata possibile. Questo era

un ulteriore indicatore che la regione di legame di GDF-15 nell'immunocomplesso B1-23 comprende un epitopo discontinuo o conformazionale. Nel caso di un epitopo lineare continuo, i peptidi digeriti possono legarsi ai loro partner di interazione, a meno che vi sia un sito di scissione con tripsina nel peptide dell'epitopo. Un epitopo discontinuo o conformazionale può venire confermato mediante il metodo di escissione dell'epitopo descritto nella parte seguente.

Esperimento di escissione dell'epitopo:

l'anticorpo B1-23 immobilizzato sulla colonna di affinità è stato quindi incubato con GDF-15 ricombinante per 2 h. L'immunocomplesso formato sulla colonna di affinità è stato quindi incubato con tripsina per 2 h a 37°C. La scissione ha portato a differenti peptidi derivati dal GDF-15 ricombinante. L'anticorpo immobilizzato stesso è proteoliticamente stabile. I peptidi risultanti della proteina GDF-15 digerita, che erano schermati mediante l'anticorpo e quindi protetti dalla scissione proteolitica, sono stati eluiti in condizioni acide (TFA, pH 2), raccolti e identificati mediante spettrometria di massa.

Il metodo di escissione dell'epitopo usando identificazione tramite MS/MS ha portato ai peptidi

seguenti:

Peptide	Posizione nella sequenza	Massa	Ione/Carica
EVQVTMCIGACPSQFR (SEQ. ID. n.: 25)	40-55	1769,91	590.50(3+)
TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ. ID. n.: 26)	94-114	2310,96	771:33(3+)

La parte di GDF-15 umano, che lega l'anticorpo B1-23, comprende un epitopo discontinuo o conformazionale. La spettrometria di massa ha identificato 2 peptidi nella proteina GDF-15, che sono responsabili della formazione dell'immunocomplesso. Questi peptidi sono limitati alle posizioni 40-55 (EVQVTMCIGACPSQFR) e 94-114 (TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI) nella sequenza amminoacidica di GDF-15. Quindi, questi due peptidi comprendono un epitopo della proteina GDF-15 che si lega all'anticorpo B1-23.

La presente invenzione viene illustrata mediante i seguenti esempi non limitativi:

**Esempio 1:** in pazienti umani con melanoma che avevano ricevuto un trattamento precedente con Ipilimumab (un anticorpo monoclonale anti-CTLA4) e non avevano mostrato una risposta completa, e che hanno ricevuto un trattamento con Pembrolizumab (un anticorpo monoclonale anti-PD-1), i livelli nel siero di hGDF-15 si correlano con una scarsa risposta al trattamento a un

punto di tempo di quattro mesi dopo l'inizio del trattamento con pembrolizumab.

I presenti inventori hanno stabilito di indagare se pazienti con cancro che ricevono bloccanti del punto di controllo immunitario possono trarre beneficio da una inibizione di hGDF-15. Per testare questa possibilità, sieri ottenuti da pazienti con melanoma che avevano ricevuto un trattamento precedente con Ipilimumab (un anticorpo monoclonale anti-CTLA4) e ricevuto un trattamento con Pembrolizumab (un anticorpo monoclonale anti-PD-1) in uno studio clinico, sono stati analizzati per i livelli nel siero di hGDF-15. Per indagare se hGDF-15 influenza la risposta dei pazienti a bloccanti del punto di controllo immunitario, i livelli nel siero di hGDF-15 ottenuti sono quindi stati correlati con le risposte dei pazienti. I sieri sono stati prelevati dai pazienti prima del trattamento con Pembrolizumab.

Lo studio e le analisi successive sono stati condotti come segue:

Criteri di inclusione dello studio clinico:

i pazienti idonei avevano 18 anni di età o più e avevano melanoma allo stadio III o stadio IV non asportabile confermato istologicamente o citologicamente non suscettibile a terapia locale; progressione della

malattia confermata entro 24 settimane dall'ultima dose di ipilimumab (minimo due dosi, 3 mg/kg una volta ogni 3 settimane); precedente terapia con inibitore di BRAF o MEK o entrambi (se positivo al mutante BRAFV600); risoluzione o miglioramento di eventi negativi correlati a ipilimumab a grado 0-1 e dose di prednisone di 10 mg/giorno o meno per almeno 2 settimane prima della prima dose del farmaco di studio; stato della prestazione del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 0 o 1; malattia misurabile per i criteri di valutazione della risposta in tumori solidi, versione 1.1 (RECIST v1.1); e valori entro l'intervallo prespecificato per il conteggio assoluto di neutrofili ( $\geq 1.500$  cellule per ml), piastrine ( $\geq 100.000$  cellule per ml), emoglobina ( $\geq 90$  g/l), creatinina nel siero ( $\leq 1.5$  del limite superiore della norma [ULN]), bilirubina totale nel siero ( $\leq 1.5$  ULN o bilirubina diretta  $\leq$  ULN per pazienti con concentrazioni di bilirubina totale  $> 1.5$  ULN), aspartato e alanina amminotransferasi ( $\leq 2.5$  ULN o  $\leq 5$  ULN per pazienti con metastasi epatiche), rapporto normalizzato internazionale o tempo di protrombina ( $\leq 1.5$  ULN se non usano anticoagulanti), e tempo di tromboplastina parziale attivata ( $\leq 1.5$  ULN se non usano anticoagulanti). I pazienti hanno avuto un periodo di

interruzione di almeno 4 settimane fra l'ultima dose della terapia più recente e la prima dose di pembrolizumab. I pazienti con metastasi cerebrali attive note o meningite carcinomatosa, malattia autoimmune attiva, infezione attiva che richiede terapia sistemica, anamnesi nota di infezione da HIV, infezione attiva con virus dell'epatite B o virus dell'epatite C, una anamnesi di eventi negativi correlati a ipilimumab di grado 4 o eventi negativi correlati a ipilimumab di grado 3 che dura da più di 12 settimane, o trattamento precedente con qualsiasi altra terapia anti-PD-1 o anti-PD-L1 sono stati esclusi dallo studio.

Trattamento di pazienti:

i pazienti con melanoma umano che soddisfano i criteri di inclusione definiti sopra erano già stati trattati (con due eccezioni) con ipilimumab (un anticorpo monoclonale anti-CTLA4) e non avevano mostrato una risposta completa. Pembrolizumab (un anticorpo monoclonale anti-PD-1) è stato somministrato a 2 mg/kg di peso corporeo o a 10 mg/kg di peso corporeo. Poiché non sono state osservate differenze dipendenti dalla dose fra i due gruppi di trattamento, i pazienti trattati sono stati valutati congiuntamente.

Criteri per la risposta:

i responder e i non responder al trattamento nonché le risposte in corso sono stati classificati usando i criteri di valutazione della risposta in tumori solidi, versione 1.1 (RECIST v1.1) (Eisenhauer et al.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: Eur. J. Cancer. 45, n. 2, Gennaio 2009, pag. 228-47).

Analisi dei livelli nel siero di hGDF-15 mediante saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA):

i livelli nel siero di GDF-15 umano sono stati misurati mediante saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA).

Tamponi e reagenti:

soluzione di bloccaggio tamponata: BSA all'1% (frazione V pH 7,0, PAA) in PBS

Soluzione di lavaggio: PBS-Tween (0,05%)

Standard: GDF-15 umano (concentrazione base 120 µg/ml, della R&D Systems)

Anticorpo di cattura: MAb GDF-15 umano (Clone 147627) della R&D Systems, IgG2B di topo (catalogo #MAB957, della R&D Systems, concentrazione base 360 µg/ml)

Anticorpo di rilevazione: PAb purificato per affinità biotinilato GDF-15 umano, IgG di capra

(catalogo #BAF940, della R&D Systems, concentrazione base 9 µl/ml)

Streptavidina-HRP (catalogo #DY998, della R&D Systems)

Soluzione substrato: 10 ml di NaOAc 0,1 M pH 6,0 + 100 µl di TMB + 2 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Soluzione di arresto: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M

Procedura per l'analisi:

1. Preparazione della piastra:

a. L'anticorpo di cattura è stato diluito alla concentrazione operativa di 2 µg/ml in PBS. Una micropiastra a 96 pozzetti (Nunc maxisorp®) è stata immediatamente rivestita con 50 µl per pozzetto dell'anticorpo di cattura diluito escludendo le file esterne (A e H). Le file A e H sono state riempite con tampone per prevenire l'evaporazione dei campioni durante l'esperimento. La piastra è stata delicatamente picchiettata per assicurare che il fondo di ciascun pozzetto fosse coperto accuratamente. La piastra è stata posta in una camera umida e incubata per una notte a temperatura ambiente (RT).

b. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

c. 150 µl di soluzione di bloccaggio sono stati

aggiunti a ciascun pozzetto, facendo seguire incubazione a RT per 1 ora.

d. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

2. Procedura di saggio:

a. Sono stati preparati standard. GDF-15 è stato diluito in soluzione di bloccaggio tamponata a una concentrazione finale di 1 ng/ml (4,17 µl di GDF + 496 µl di soluzione di bloccaggio tamponata). Sono state prodotte diluizioni seriali 1:2.

b. Sono stati preparati campioni in duplicato 1:20 (6 µl + 114 µl di soluzione di bloccaggio tamponata).

c. 50 µl di campioni diluiti o standard sono stati aggiunti per pozzetto, facendo seguire incubazione per 1 ora a RT.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	s1	s2	...									s12
C	s1	s2	...									s12
D	s13	s14	...									s24
E	s13	s14	...									s24
F	St	and	ard					dil	ui	zion	i	
G					se	riale						
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

b. L'anticorpo di rilevazione è stato diluito a una

concentrazione finale di 50 ng/ml (56  $\mu$ l + 10 ml di tampone di bloccaggio). 50  $\mu$ l dell'anticorpo di rilevazione diluito sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, facendo seguire incubazione per 1 ora a RT.

c. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

d. Streptavidina-HRP è stata diluita 1:200 (50  $\mu$ l + 10 ml di tampone di bloccaggio). 50  $\mu$ l della diluizione operativa di streptavidina-HRP sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, facendo seguire incubazione per 20 minuti a RT.

e. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

f. È stata preparata soluzione substrato. 50  $\mu$ l di soluzione substrato sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, facendo seguire incubazione per 20 minuti a RT.

g. 50  $\mu$ l di soluzione di arresto sono stati aggiunti a ciascun pozzetto.

h. La densità ottica di ciascun pozzetto è stata determinata immediatamente, usando un lettore di micropiastre regolato a 450 nm.

3. Calcolo del titolo nel siero di GDF-15:

a. Ciascuna diluizione standard di campione/GDF-15

è stata applicata in duplicato. Per determinare il titolo di GDF-15, è stata calcolata la media dei duplicati ed è stato sottratto lo sfondo (campione senza GDF-15).

b. Per creare una curva standard, valori ottenuti dall'intervallo lineare sono stati tracciati su un diagramma X-Y (asse X: concentrazione di GDF-15, asse Y: DO450), ed è stata applicata interpolazione di una curva lineare. Il titolo nel siero di GDF-15 dei campioni di test è stato calcolato mediante interpolazione dai valori DO450 delle diluizioni standard con concentrazione nota.

c. Per calcolare la concentrazione finale di GDF-15 dei campioni, è stato considerato il fattore di diluizione distinto. Campioni che forniscono valori DO sotto o sopra l'intervallo standard sono stati ri-analizzati a diluizioni appropriate.

Confronto dei livelli nel siero di hGDF-15 con dati del paziente:

in seguito, i livelli nel siero di hGDF-15 misurati sono stati confrontati con dati di risposta del paziente ottenuti dallo studio.

La figura 1 mostra i livelli nel siero di GDF-15 per responder e non responder al regime di trattamento. Come si può vedere dalla figura, molti dei non responder

hanno livelli nel siero di GDF-15 maggiori rispetto a tutti i responder.

Questo risultato viene anche riflesso nella figura 2, che mostra i numeri di responder e non responder nei pazienti aventi livelli nel siero di hGDF-15 di, rispettivamente, < 1,8 ng/ml, 1,8-4,2 ng/ml e > 4,2 ng/ml.

Questi riscontri suggeriscono che alti livelli di GDF-15 sono correlati a una risposta scarsa al trattamento. Quindi, questi riscontri sono stati testati per la loro significatività statistica:

Correlazione statistica di livelli nel siero di hGDF-15 con dati dei pazienti:

Dati:

L'analisi dei dati era basata su un file di dati contenente dati ottenuti da campioni ottenuti da 35 pazienti contenenti le colonne (variabili) Designazione del campione, GDF-15 (ng/ml), Responder/non responder, Giorni (fino alla morte o alla censura) e Ongoing (un indice variabile per la vita in corso). La classificazione di responder/non responder di questi dati è stata effettuata in un punto di tempo di quattro mesi dopo l'inizio del trattamento con pembrolizumab. Poiché alcuni campioni di siero sono stati ottenuti solo

appena prima dell'analisi, la risposta può venire valutata solo in 29 pazienti. Un responder parziale (> 30% di riduzione nella dimensione del tumore) è stato classificato come responder. Per la determinazione di LDH, 4 campioni sono stati esclusi a causa di emolisi. Variabili dell'esito (punti finali):

a. Sopravvivenza globale (tempo fino alla morte). Questo punto finale è formato dall'indicatore dell'evento per la morte (1 = morto/0 = vivo), che è stato derivato dal file di dati, e dal tempo fino alla morte o alla censura (l'ultima volta in cui il paziente era noto per essere vivo), corrispondente alla variabile "giorni".

b. Risposta al trattamento, per esempio se un paziente era un responder o meno (codificato come 1 = responder, 0 = non responder). I responder parziali sono stati considerati come responder.

Designazione del campione	GDF-15 (ng/ml)	LDH[U/l]	responder/ non responder	Giorni da anti-PD-1	Prima del trattamento con Ipilimumab	Risposta Ongoing
HG12.950	2.010	398	NR	72	x	
HG13.1002	0.479	340	R	538		x
HG13.1012	12.010	3734	NR	71	x	
HG13.1067	9.173	591	NR	83	x	
HG13.1069	4.635	2419	NR	53	x	
HG13.1099	1.285	370	R	693	x	x
HG13.1202	1.641	480	R	575	x	
HG13.1341	4.595	1930	NR	15	x	
HG13.1377	0.539	388	R	269	x	
HG13.1419	0.914	317	R	617		x
HG13.1432	1.195	269	R	611	x	x
HG13.1458	0.433	453	R	605	x	x
HG13.1557	4.045	564	R	293	x	
HG13.1587	0.345	371	R	186	x	
HG13.1663	1.320	emolitico	R	176	x	
HG13.516	0.641	342	R	264	x	
HG13.578	2.841	1143	R	266	x	
HG13.596	1.085	emolitico	R	772	x	x
HG13.757	3.310	emolitico	NR	117	x	
HG13.811	4.029	763	R	596	x	x
HG14.1080	5.979	1359	NR	43	x	
HG14.1108	0.979	555	R	206	x	x
HG14.1147	2.084	227	R	154	x	x
HG14.1159	2.150	333	R	227	x	x
HG14.161	0.889	343		108	x	x
HG14.557	2.014	368	R	317	x	x
HG14.707	2.783	442	NR	71	x	
HG14.853	0.846	343	NR	71	x	
HG14.885	0.874	emolitico	PR	63	x	
HG15.299	0.412	354		86	x	x
HG15.47	1.465	475		80	x	x
HG15.49	3.912	631		93	x	x
HG15.546	0.358	emolitico		23	x	x
HG15.560	2.389	768		21	x	x
HG15.59	8.122	588	NR	23	x	

Analisi dei dati:

la sopravvivenza globale è stata analizzata mediante i modelli di sopravvivenza al rischio proporzionale di Cox. Un modello è stato adattato con

GDF-15 (ng/ml) come predittore continuo e un altro modello con una variabile di raggruppamento basata su GDF-15 come predittore categorico (i gruppi erano: < 1,8 ng/ml, 1,8-4,2 ng/ml, > 4,2 ng/ml di GDF-15). Complessivamente, i dati di sopravvivenza erano disponibili da 35 pazienti.

La risposta al trattamento (variabile binaria) è stata analizzata mediante modelli lineari generalizzati (GLMs) con distribuzione dell'errore binomiale e funzione di collegamento logit (regressione logistica). Per la risposta al trattamento quando valutata mediante i criteri RECIST1.1 dopo 4 mesi, un modello è stato adattato con GDF-15 (ng/ml) come predittore continuo. Poiché nessuno dei pazienti ha risposto nel gruppo con GDF-15 > 4,2 ng/ml, la stima del rapporto di previsione per questo gruppo rispetto al gruppo con GDF-15 < 1,8 ng/ml può essere molto grande, con un intervallo di confidenza molto largo. Invece di adattare un altro modello con la variabile di raggruppamento basata su GDF-15 come predittore categorico, un test del chi quadrato ( $\chi^2$ ) è stato usato per confrontare i gruppi (valutazione dell'uguaglianza della proporzione di responder). Poiché il numero di responder/non responder era talvolta molto piccolo (< 5), è stata effettuata

inoltre una analisi della sensibilità usando il test esatto di Fisher. Pazienti che avevano solo ricevuto anti-PD-1 entro gli ultimi 4 mesi non possono ancora venire classificati come responder o non responder. Quindi, solo 29 pazienti possono venire valutati per la risposta alla terapia.

L'analisi dei dati è stata eseguita usando il pacchetto software statistico R (R Core Team, 2014, versione 3.1.0).

Risultati:

le tabelle 1-2 mostrano i risultati ottenuti dai modelli con GDF-15 come predittore continuo. Il rischio di morte è aumentato significativamente per concentrazioni maggiori di GDF-15 ( $HR > 1$ , tabella 1), mentre la probabilità di risposta al trattamento è diminuita significativamente, come indicato dal rapporto di previsione (OR) ( $OR < 1$ , tabella 2). La figura 3 mostra dati corrispondenti su responder/non responder nonché la probabilità di risposta al trattamento prevista mediante il modello.

La tabella 3 mostra il risultato ottenuto dal modello dei rischi proporzionale di Cox con il gruppo basato su GDF-15 come predittore categorico. Il gruppo con  $GDF-15 < 1,8$  ng/ml viene usato come gruppo di

riferimento (non mostrato nella tabella). I due rapporti di rischio nella tabella 3 rappresentano il confronto del gruppo con GDF-15 fra 1,8 e 4,2 e il gruppo con GDF-15 > 4,2 con il gruppo di riferimento. Il rischio di morte è aumentato in entrambi questi gruppi (rispetto al gruppo di riferimento), ma in un modo maggiore nel gruppo con GDF-15 > 4,2. La figura 4 mostra le curve di Kaplan-Meier per la sopravvivenza nei tre gruppi.

La proporzione di responder differisce significativamente fra i gruppi (responder 1:  $\chi^2_{df=2} = 16,04$ ,  $P = 0,0003$ ). Questo risultato è stato confermato mediante i risultati del test esatto di Fisher ( $P = 0,0003$ ). I numeri di morti e responder per gruppo vengono forniti nella tabella 4. Inoltre, la tabella 5 mostra alcune statistiche descrittive del GDF-15 per ciascun gruppo.

**Tabella 1:**

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

La tabella 1 mostra il rapporto di rischio (HR) stimato dal modello dei rischi proporzionale di Cox con la sopravvivenza globale (tempo fino alla morte) come variabile dell'esito e GDF-15 come predittore continuo. L'analisi ha incluso campioni ottenuti da 35 pazienti.

**Tabella 2:**

	Stima (OR)	I.C. 95%	z	p
(Intercetta)	25.281	[4.219,364.950]	2.94	0.00324
GDF-15	0.389	[0.159,0.698]	-2.54	0.01120

La tabella 2 mostra le stime del rapporto di previsione (OR) ottenute dal modello lineare generalizzato con risposta al trattamento (responder 1) come variabile dell'esito e GDF-15 come predittore continuo. L'analisi ha incluso campioni ottenuti da 29 pazienti.

**Tabella 3:**

	HR	I.C. 95%	z	p
GDF-15-gruppo(1.8,4.2]	1.54	[0.48,4.92]	0.73	0.466
GDF-15-gruppo(4.2,13]	21.52	[5.20,89.06]	4.24	<0.001

La tabella 3 mostra stime del rapporto di rischio (HR) ottenute dal modello dei rischi proporzionale di Cox con sopravvivenza globale (tempo fino alla morte) come variabile dell'esito e il gruppo basato su GDF-15 come predittore categorico. L'analisi ha incluso campioni ottenuti da 35 pazienti.

**Tabella 4:**

Variabile	Livelli	n <sub>[0,1.8]</sub>	% <sub>[0,1.8]</sub>	n <sub>(1.8,4.2]</sub>	% <sub>(1.8,4.2]</sub>	n <sub>(4.2,13]</sub>	% <sub>(4.2,13]</sub>	n <sub>tutti</sub>	% <sub>tutti</sub>
morte	0	11	61.1	6	54.5	0	0.0	17	48.6
	1	7	38.9	5	45.5	6	100.0	18	51.4
	tutti	18	100.0	11	100.0	6	100.0	35	100.0
responder1	0	1	7.1	3	33.3	6	100.0	10	34.5
	1	13	92.9	6	66.7	0	0.0	19	65.5
	tutti	14	100.0	9	100.0	6	100.0	29	100.0

La tabella 4 mostra il numero di morti e responder (responder1) nei tre gruppi definiti mediante GDF-15 (< 1,8, 1,8-4,2, > 4,2 ng/ml).

**Tabella 5:**

Variabile	Livelli	n	$\tilde{x}$	$\bar{x}$	s	Min	Max
GDF-15	[0,1.8]	18	0.9	0.9	0.4	0.3	1.6
	(1.8,4.2]	11	2.8	2.9	0.8	2.0	4.0
	(4.2,13]	6	7.1	7.4	2.9	4.6	12.0
	tutti	35	1.6	2.6	2.7	0.3	12.0

**Tabella 5:** variabile predittore continuo GDF-15 (ng/ml) nei tre gruppi definiti mediante GDF-15 (< 1,8, 1,8-4,2, > 4,2 ng/ml). Sono mostrati il numero di pazienti (n), la mediana ( $\tilde{x}$ ), la media ( $\bar{x}$ ), la deviazione standard (s), il minimo (Min) e il massimo (Max).

In seguito, per confrontare i risultati statistici ottenuti per i livelli di GDF-15, analisi statistica è stata anche eseguita per i livelli di un fattore prognostico noto, lattato deidrogenasi (LDH), nei sieri dei pazienti:

la lattato deidrogenasi viene considerata un marcatore prognosticamente rilevante per tumori solidi. Questo è stato recentemente confermato mediante una meta-analisi globale su un grande gruppo di studi clinici (31.857 pazienti). Un effetto coerente di LDH elevata su OS (HR = 1,48, I.C. 95% = da 1,43 a 1,53) è stato trovato attraverso tutti i sottogruppi e gli stadi della malattia. Inoltre, vi era una tendenza verso un valore prognostico più forte di LDH nella malattia metastatica rispetto alla malattia non metastatica, che si ritiene rifletta un carico tumorale maggiore. Mentre il meccanismo esatto rimane sconosciuto e può anche essere correlato a ipossia e riprogrammazione metabolica tramite un effetto Warburg, la LDH può venire interpretata come riflettente una aggressività del tumore o un carico tumorale alti (Zhang, J., Yao, Y.-H., Li, B.-G., Yang, Q., Zhang, P.-Y. e Wang, H.-T. (2015). Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. Scientific Reports 5, 9800). Poiché i livelli di LDH nel siero sono stati incorporati nello schema di stadiazione per il melanoma, questo parametro viene ordinariamente misurato durante prove diagnostiche cliniche dal laboratorio di

riferimento dell'università.

**Tabella 6:**

	GDF-15 (ng/ml)		LDH (U/l)	
	Responder (n=19)	non responder (n=10)	Responder (n=9)	non responder (n=16)
Mediana	1.2	4.6	371	591
Media	1,7	5.6	455	1312
Deviazione standard	1.2	3.6	218	1108
test t (2 lati, tipo 3)	0.012		0.061	

**Tabella 6:** GDF-15 e LDH in responder rispetto a non responder

La determinazione di LDH è fallita in 4 campioni di sangue a causa di emolisi.

La tabella 7 è analoga alla tabella 2, tranne che LDH è stata usata come predittore continuo della risposta al trattamento (responder1) al posto di GDF-15. La probabilità di risposta al trattamento diminuisce in modo marginalmente significativo con valori crescenti di LDH (OR < 1, p < 0,1). La figura 5 mostra i dati corrispondenti su responder/non responder nonché la probabilità di risposta al trattamento prevista mediante il modello.

Per determinare se GDF-15 è il predittore migliore della risposta al trattamento (responder1) rispetto a LDH, sono stati predisposti due modelli addizionali: un modello contenente entrambi i marcatori come predittori

(che include automaticamente solo pazienti con misurazioni su entrambi i marcatori), e un modello con GDF-15 come il solo predittore, ma che usa anche i pazienti con una misurazione di LDH. Quindi, un criterio di informazione di Akaike (AIC) è stato calcolato per tutti e tre i modelli (tabella 8). Un AIC minore indica un modello più efficiente. Infatti, il AIC del modello con GDF-15 era minore del AIC del modello con LDH come predittore. Anche il modello con solo GDF-15 ha un AIC minore del modello con entrambi i predittori, indicando che LDH come un predittore addizionale non migliora il modello. Naturalmente, il modello con entrambi i predittori non può spiegare la risposta al trattamento peggiore, ma come una misura di "efficienza del modello", il AIC penalizza i modelli con predittori che non migliorano considerevolmente il modello e favorisce modelli più semplici. Un confronto di modelli alternativo è stato effettuato mediante analisi della devianza (simile all'analisi della varianza, ma per modelli lineari generalizzati), cioè confrontando la differenza nella devianza spiegata fra il modello più complesso con entrambi i predittori ed entrambi i modelli più semplici con solo uno dei predittori (corrispondente a una riduzione del modello mediante LDH o GDF-15). La

rimozione di GDF-15 dal modello più complesso ha portato a una riduzione significativa nella devianza spiegata ( $P = 0,02$ ), mentre la rimozione di LDH no ( $P = 0,41$ ).

**Tabella 7:**

	Stima (OR)	I.C. 95%	z	p
(Intercetta)	9.741	[2.055,89.308]	2.44	0.0146
LDH	0.997	[0.994,0.999]	-1.79	0.0727

Tabella 7: stima del rapporto di previsione (OR) ottenuto dal modello lineare generalizzato con risposta al trattamento (responder 1, come definito nel file A) come variabile dell'esito e LDH come predittore continuo. L'analisi include campioni ottenuti da 25 pazienti.

**Tabella 8:**

	df	AIC
Modello con LDH e GDF-15	3.00	25.10
Modello con solo LDH	2.00	28.55
Modello con solo GDF-15	2.00	23.77

Tabella 8: confronto dei modelli sulla base del criterio dell'informazione di Akaike (AIC) del quale valori minori indicano un modello più efficiente. df: gradi di libertà. Tutti i modelli includevano campioni ottenuti da 25 pazienti.

La figura 5A mostra la probabilità di risposta al trattamento (responder 1) quando prevista mediante il

modello Modello Lineare Generalizzato usando LDH come predittore continuo. I cerchi mostrano i dati, la curva mostra il modello. La linea verticale indica la concentrazione di LDH in cui la probabilità di risposta al trattamento è 0,5. La coorte di pazienti era identica. Tuttavia, una determinazione affidabile dei livelli di LDH è fallita in quattro pazienti a causa di emolisi. La figura 5B mostra una rappresentazione grafica di responder e non responder e i loro rispettivi livelli di hGDF-15 e LDH. Quando i valori di taglio vengono scelti per coprire tutti i responder, la valutazione basata su GDF-15 permette l'identificazione di 6 (su 9) non responder, mentre analisi basate sui livelli di LDH possono solo discriminare 4 (su 9) non responder. Per la valutazione di LDH, 4 campioni emolitici sono stati esclusi, il che causa perdita di dati.

Sommario:

presi insieme, i risultati statistici dell'esempio 1 sopra hanno dimostrato che la probabilità di una risposta al trattamento diminuisce significativamente con livelli di hGDF-15 crescenti nei sieri dei pazienti. Per esempio, il rapporto di previsione di 0,389 mostrato nella tabella 2 indica che se i livelli nel siero di hGDF-15 vengono aumentati di 1 ng/ml, la probabilità di

una risposta al trattamento diminuisce al valore di 0,389 volte il valore originale, cioè diminuisce di circa il 60%. Se i livelli nel siero di hGDF-15 vengono aumentati di 2 ng/ml, la probabilità di una risposta al trattamento diminuisce al valore di  $0,389 \times 0,389$  volte = 0,151 volte il valore originale, cioè diminuisce di circa l'85%.

I risultati dell'esempio 1 suggeriscono che hGDF-15 agisce per influenzare negativamente le risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario. Quindi, secondo l'invenzione, un inibitore di hGDF-15 sarà utile per inibire gli effetti negativi di hGDF-15 sulle risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario, e per migliorare le risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario non solo in melanoma, ma in tutti i cancri solidi indicati in questa sede.

**Esempio 2:** i livelli di GDF-15 si correlano inversamente con linfociti infiltranti il tumore (TIL) CD8<sup>+</sup> in metastasi di entità tumorali diverse.

Per identificare un meccanismo di hGDF-15 che contribuisce all'effetto negativo di hGDF-15 sulla risposta dei pazienti, metastasi cerebrali ottenute da tumori solidi diversi sono state analizzate per

l'espressione di hGDF-15 e per la presenza di cellule del sistema immunitario:

Campione di tessuto e trattamento del tessuto:

è stato analizzato tessuto fissato in formalina e incorporato in paraffina (FFPE) ottenuto da metastasi cerebrali archiviate, che è stato raccolto e trattato come micromatrici di tessuto (TMA). Tutti i campioni sono stati ottenuti dalla banca dei tumori UCT (Goethe University, Frankfurt am Main, Germania, membro del German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg, Germania e del German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germania) o dalla banca dei tumori del registro del cancro "Blut-und Gewebebank zur Erforschung des malignen Melanoms" (Department of Dermato-oncolgy, University Hospital Tübingen, Germania). L'approvazione per questo studio è stata conferita da due commissioni etiche indipendenti (Ethics committee UCT Frankfurt/Goethe University Frankfurt am Main, Germania: numeri del progetto: GS 4/09; SNO\_01-12; Ethics committee University of Tübingen, numero del progetto: 408/2013B02). In totale, sono stati studiati 190 pazienti con metastasi cerebrali comprendenti: melanoma (n = 98), NSCLC (n = 33), carcinoma del seno (n = 18), RCC (n = 10), SCLC (n = 7), carcinoma coloretale (n =

7), carcinomi che non sono stati diversamente specificati (carcinoma NOS n = 11) e campioni di tumori rari riassunti come altri (n = 6). Sono stati raccolti i dati di sopravvivenza di 155 pazienti (tempo di sopravvivenza dopo resezione del tumore), inoltre è stato analizzato il numero di metastasi cerebrali in 169 pazienti e la dimensione delle metastasi cerebrali in una sotto-coorte di 55 pazienti con melanoma.

Immunoistochimica:

L'immunoistochimica per tutti gli anticorpi è stata eseguita usando vetrini spessi 3 µm e protocolli standard sul sistema di colorazione con IHC automatizzato Discovery XT (Roche/Ventana, Tucson, Arizona, USA). Sono stati usati gli anticorpi seguenti: anti GDF-15 (HPA011191, diluizione 1:50, Sigma/Atlas, protocollo #730), CD3 (clone A0452, diluizione 1:500, DAKO, Glostrup, Danimarca), CD8 (clone C8/144B, diluizione 1:100, DAKO, Glostrup, Danimarca), PD-1 (clone NAT105; diluizione 1:50; Abcam, Cambridge, Regno Unito), PD-L1 (E1L3N; diluizione 1:200; Cell Signaling, Boston, U.S.A.), FOXP3 (clone 236A/E7; diluizione 1:100; eBioscience, San Diego, U.S.A.). I vetrini sono stati controcolorati con ematossilina e montati.

Analisi statistiche:

tutti i campioni sono stati valutati secondo la frequenza di cellule positive correlata a tutte le cellule (come percentuale) al centro della TMA colorata. Per l'espressione di hGDF-15, è stato usato un punteggio come descritto in precedenza in dettaglio [21, 22]: frequenza dello 0-1% punteggio 0; 1-10% punteggio 1; 10-25% punteggio 2; 25-50% punteggio 3; > 50% punteggio 4; inoltre, il punteggio della frequenza è stato moltiplicato per l'intensità di colorazione (1 colorazione debole, 2 colorazione moderata, 3 colorazione forte), portando infine al punteggio di hGDF-15 in scala ordinale (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12). Le variabili in scala ordinale sono state confrontate con il test non parametrico di Wilcoxon/Kruskal-Wallis e il metodo di Dunn per correggere una valutazione multipla. Per variabili continue, le medie sono state confrontate fra entità di metastasi cerebrali diverse usando ANOVA, facendo seguire test post-hoc HSD di Tukey-Kramer. Per le analisi di correlazione fra la dimensione delle metastasi cerebrali e l'espressione del marcatore, è stato eseguito un adattamento lineare seguito da ANOVA, nel caso di variabili in scala ordinale è stata usata l'analisi della correlazione rho di Spearman. Un livello di significatività di  $p < 0,05$  è stato impostato per

tutte le analisi statistiche.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite usando JMP8 e JMP11 (SAS, Cary, U.S.A.), grafici addizionali sono stati creati con Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, U.S.A.).

Risultati:

la figura 6 mostra sezioni di tessuto esemplificative ottenute da metastasi cerebrali di melanoma aventi immunoreattività per GDF-15 non alta (riquadro superiore) o alta (riquadro inferiore), che sono state colorate mediante immunistochemica per GDF-15 e per le proteine marcatrici di cellule T rispettivamente CD3 e CD8, come indicato nella figura. Nella sezione senza espressione di GDF-15, le numerose cellule immunitarie infiltranti vengono osservate come punti scuri. Nell'immagine che mostra la metastasi che esprime alti livelli di GDF-15, le scarse cellule immunitarie infiltranti sono rappresentate da frecce (le cellule positive a CD3 e CD8 vengono indicate da frecce). Come si può vedere dalla figura, è stato sorprendentemente trovato che nella sezione di tessuto con alta immunoreattività per hGDF-15 (riquadro inferiore), il numero di cellule CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> è stato fortemente ridotto rispetto alla sezione di tessuto

senza immunoreattività per hGDF-15 (riquadro superiore). In modo notevole, altri marcatori colorati come PD-L1, PD-1 hanno mostrato tutti una correlazione positiva con il numero di cellule T CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> infiltranti il tumore.

Quindi, è stato analizzato in seguito se esiste una correlazione inversa fra i livelli di hGDF-15 e la percentuale di cellule T CD3<sup>+</sup> attraverso metastasi cerebrali di melanoma differenti. La figura 7A mostra un grafico della percentuale di cellule CD3<sup>+</sup> contro il punteggio di GDF-15 (ottenuto come descritto sopra nella sezione "Analisi statistiche"). Come indicato nella figura 7A, vi era una correlazione inversa statisticamente significativa fra la percentuale di cellule CD3<sup>+</sup> e il punteggio di GDF-15 ( $p = 0,0015$ ).

Analogamente, è stato anche analizzato se esiste una correlazione inversa fra i livelli di hGDF-15 e la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> attraverso metastasi cerebrali di melanoma differenti. La figura 7B mostra un grafico della percentuale di cellule CD8<sup>+</sup> contro il punteggio di GDF-15 (ottenuto come descritto sopra nella sezione "Analisi statistiche"). Come indicato nella figura 7B, vi era una correlazione inversa statisticamente significativa fra la percentuale di cellule CD8<sup>+</sup> e il punteggio di GDF-15 ( $p = 0,0038$ ).

La correlazione di GDF-15 con FOXP3, al contrario, non ha fornito un risultato statisticamente significativo secondo il test con coefficiente di correlazione dei ranghi ( $\rho$ ) di Spearman ( $p = 0,8495$  attraverso entità tumorali differenti;  $p = 0,2455$  quando si valutano solo metastasi da melanoma).

Infine, è stato anche analizzato se esiste una correlazione inversa fra i livelli di hGDF-15 e le percentuali di cellule T CD8<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> attraverso metastasi cerebrali derivanti da entità tumorali diverse. La figura 8 mostra un grafico del punteggio di GDF-15 contro la percentuale, rispettivamente, di cellule T CD8<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> in, rispettivamente, 168 (per CD3) o 169 (per CD8) metastasi cerebrali derivanti da entità tumorali diverse (melanoma, CRC, RCC, carcinoma del seno, NSCLC e SCLC). Il grafico è stato ottenuto come descritto sopra nella sezione "Analisi statistiche". Come indicato nella figura 8, vi era una correlazione inversa statisticamente significativa fra la percentuale di cellule CD8<sup>+</sup> e il punteggio di GDF-15 ( $p = 0,0311$ ), come pure una correlazione inversa statisticamente significativa fra la percentuale di cellule CD3<sup>+</sup> e il punteggio di GDF-15 ( $p = 0,0093$ ). Altri marcatori (PD-L1, PD-1, FOXP3) hanno mostrato nuovamente correlazioni

positive con infiltrazione di cellule T CD3 e CD8.

Sommario:

i risultati sopra dimostrano che vi è non solo una correlazione inversa di hGDF-15 con la percentuale di cellule T che esprimono la proteina marcatrice di cellule T generale CD3 nelle metastasi, ma anche una correlazione inversa con la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> nelle metastasi. Questo è degno di nota, poiché la presenza di linfociti T CD8<sup>+</sup> ha precedentemente dimostrato di essere specificamente richiesta per la regressione tumorale dopo inibizione del punto di controllo immunitario con un anticorpo anti-PD-1 (Tumeh et al., Nature. 27 Nov 2014; 515(7528):568-71).

Quindi, secondo l'invenzione, l'inibizione terapeutica di hGDF-15 può venire usata per aumentare la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> in tumori solidi comprendenti metastasi tumorali. Questo aumento di linfociti T CD8<sup>+</sup> nei tumori solidi può venire usato per terapia dei tumori solidi. In un aspetto non limitativo dell'invenzione, una combinazione terapeutica particolarmente favorevole è la combinazione di un inibitore di hGDF-15 con un bloccante del punto di controllo immunitario. Un effetto vantaggioso di questa combinazione consiste nel fatto che l'inibizione di

hGDF-15 aumenterà la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup> nei tumori solidi, e quindi porterà a un effetto terapeutico sinergico con l'inibizione del punto di controllo immunitario. L'invenzione può quindi venire applicata a tutti i tumori solidi indicati nelle forme di realizzazione preferite.

**Esempio 3:** GDF-15 diminuisce l'adesione di cellule T a cellule endoteliali.

Gli inventori hanno iniziato in seguito a determinare come hGDF-15 influenza la percentuale di cellule T nei tumori solidi.

Una fase che è richiesta per l'invasione di cellule T dal flusso sanguigno nel tessuto tumorale consiste nel fatto che le cellule T devono dapprima aderire all'endotelio prima che possano entrare nel tumore. Per simulare questa fase e per valutare se questa fase può venire influenzata da hGDF-15, gli inventori hanno usato un sistema modello che misura l'adesione di cellule T a cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC): Esperimento di flusso/adesione di cellule T (su HUVEC):

Giorno 1:

a. un  $\mu$ -slide VI 0.4 (ibidi GmbH, Germania) è stato rivestito con fibronectina (100  $\mu$ g/ml); 30  $\mu$ l per apertura di caricamento. Essi sono stati incubati per 1

h a 37°C (o è stato usato un vetrino pre-rivestito).

b. La fibronectina è stata aspirata, facendo seguire un lavaggio con mezzo per HUVEC.

c. Le HUVECs sono state tripsinizzate da una piastra a 6 pozzetti (conteggio:  $2 \times 10^5$ /ml (totale 2 ml))

d. Esse sono state lavate e diluite a  $1 \times 10^6$  cellule/ml

e. 30  $\mu$ l di HUVECs sono stati applicati nelle aperture di caricamento del  $\mu$ -slide VI e controllati sotto un microscopio

f. Il  $\mu$ -slide VI è stato coperto con un coperchio e incubato a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>

Giorno 2:

a. Le HUVECs sono state attivate con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) e IFN $\gamma$  (10 ng/ml) nei canali 2-5 (vedere la tabella seguente): tutti i mezzi sono stati aspirati dai canali e sostituiti con mezzi pre-riscaldati contenenti citochina.

Giorno 3:

a. Le cellule T sono state isolate (isolamento negativo di cellule pan T).

b. Le cellule T sono state pre-incubate nel pozzetto 1 ( $1 \times 10^6$  cellule/ml) con o senza GDF-15 (100 ng/ml) per 1 h.

c. Le HUVECs sono state pre-incubate nei canali 4 e 5 con GDF-15 (100 ng/ml) per 1 h: tutto il mezzo nelle aperture di caricamento è stato aspirato, ed entrambe le aperture di caricamento sono state riempite con mezzo pre-riscaldato contenente GDF15.

d. Un incubatore con supporto superiore vicino al microscopio è stato pre-riscaldato, ed è stata collegata una miscela di gas (5% di CO<sub>2</sub>, 16% di O<sub>2</sub>, 79% di N<sub>2</sub>).

e. Sono state preparate 3 siringhe da 50 ml:

i. Cellule T (1 × 10<sup>6</sup> cellule/ml): 1 ml

ii. Cellule T e GDF15 (1 × 10<sup>6</sup> cellule/ml): 1 ml

iii. Mezzo

f. La siringa 1 è stata collegata al canale 1 (vedere la tabella seguente) e il flusso è stato iniziato (0,5 dina/cm<sup>2</sup>: 0,38 ml/minuto = 22,8 ml/h).

g. Le cellule T sono state fatte fluire per 3 minuti e al contempo 10 campi visivi sono stati predefiniti sul microscopio.

h. È stata ottenuta una immagine video di ciascun campo visivo per 5 s.

i. I canali rimanenti sono stati valutati in modo analogo al canale 1 (f-h) con i campioni di cellule T come indicato nella tabella seguente.

Canale #	cellule endoteliali	cellule T nel flusso	commenti
----------	---------------------	----------------------	----------

1	HUVEC non stimulate	cellule T	[controllo negativo]
2	HUVEC stimolate	cellule T	[controllo positivo]
3	HUVEC stimolate	cellule T GDF-15	
4	HUVEC stimolate GDF-15	cellule T	
5	HUVEC stimolate GDF-15	cellule T GDF-15	

GDF-15 ricombinante è stato ottenuto da Invigate GmbH, Jena, Germania.

Analisi statistica:

tutti i dati sono stati confrontati usando test di Mann-Whitney per la valutazione di dati distribuiti non normalmente. Valori di  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati:

i risultati dell'esperimento sono mostrati nella figura 9. Questa figura mostra analisi di vari parametri di adesione, cioè

a. Il numero di cellule T rotolanti per campo visivo per secondo (9A; i dati sono stati ottenuti dal canale #3 ("GDF-15") e dal canale #2 ("controllo")), che

riflette una forma di adesione moderata delle cellule T alle cellule endoteliali,

b. La velocità di rotolamento delle cellule T (misurata in pixel per 0,2 secondi) (9B; i dati sono stati ottenuti dal canale #3 ("GDF-15") e dal canale #2 ("controllo")), che aumenta con la diminuzione dell'adesione fra le cellule T e le cellule endoteliali, e

c. Il numero di cellule aderenti per campo visivo (9C; i dati sono stati ottenuti dal canale #3 ("GDF-15") e dal canale #2 ("controllo"); e 9D).

Come si può vedere dalla figura 9C, è stato trovato che il trattamento delle cellule T con hGDF-15 diminuisce significativamente l'adesione alle cellule endoteliali, come riflesso nel numero di cellule aderenti per campo visivo. Risultati simili sono stati ottenuti quando si analizza l'adesione mediante conteggio dei numeri di cellule T rotolanti (figura 9A). Inoltre, e coerentemente con i risultati sopra, è stato trovato che il trattamento delle cellule T con hGDF-15 aumenta significativamente la velocità di rotolamento, indicando una diminuzione nel tempo di interazione fra le cellule T e le cellule endoteliali, e indicando anche una adesione ridotta fra le cellule T e le cellule

endoteliali (figura 9B).

Gli inventori hanno analizzato in seguito quali cellule sono state mirate da hGDF-15 (figura 9D). Nel campione in cui solamente HUVEC sono state trattate con hGDF-15, è stata osservata una diminuzione moderata nell'adesione delle cellule T alle cellule endoteliali (HUVECs). Al contrario, una forte diminuzione nell'adesione delle cellule T alle cellule endoteliali (HUVECs) è stata osservata quando solamente le cellule T sono state trattate con hGDF-15, o quando sia le cellule T che le cellule endoteliali (HUVECs) sono state trattate con hGDF-15. Questi risultati indicano che hGDF-15 agisce sia sulle cellule T che sulle cellule endoteliali, ma indicano anche che l'effetto di adesione principale di hGDF-15 è un effetto sulle cellule T.

In seguito, gli inventori hanno testato se gli effetti di hGDF-15, che viene secreto da cellule tumorali, sull'adesione di cellule T possa venire inibito con un inibitore di hGDF-15. Per testare questo, gli inventori hanno usato una linea di cellule di melanoma che secernono hGDF-15, UACC257:

Esperimento di flusso/adesione di cellule T (su HUVEC) in presenza o assenza di GDF-15 in surnatante di cellule tumorali:

Giorno 1:

a. Un  $\mu$ -slide VI 0.4 (ibidi GmbH, Germania; da ora indicato come  $\mu$ -slide) è stato rivestito con fibronectina (100  $\mu\text{g/ml}$ ): 30  $\mu\text{l}$  per apertura di caricamento. Essi sono stati incubati per 1 h a 37°C (o è stato usato un vetrino pre-rivestito).

b. La fibronectina è stata aspirata, facendo seguire un lavaggio con mezzo per HUVEC.

c. Le HUVECs sono state tripsinizzate da una piastra a 6 pozzetti (conteggio:  $2 \times 10^5/\text{ml}$  (2 ml totali))

d. Esse sono state lavate e diluite a  $1 \times 10^6$  cellule/ml

e. 30  $\mu\text{l}$  di HUVECs sono stati applicati in aperture di caricamento del  $\mu$ -slide e controllati sotto un microscopio

f. Il  $\mu$ -slide è stato coperto con un coperchio e incubato a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>.

Giorno 2:

a. Le HUVECs sono state attivate con TNF $\alpha$  (10 ng/ml) e IFN $\gamma$  (10 ng/ml) nei canali 2-5 del  $\mu$ -slide (vedere la tabella seguente): tutti i mezzi sono stati aspirati dai canali e sostituiti con mezzi pre-riscaldati contenenti citochina.

Giorno 3:

a. Cellule T sono state isolate (isolamento negativo di cellule pan T).

b. In parallelo, 24 pozzetti di una piastra per ELISA a 96 pozzetti (Nunc maxisorb) sono stati rivestiti con 200  $\mu$ l di anti-GDF-15 (10  $\mu$ g/ml diluiti in PBS), incubati per 45 minuti e quindi lavati con PBS.

c. Per esaurire il surnatante dalla linea cellulare di melanoma UACC257 che secreta GDF-15 (dati non mostrati) da GDF-15, il surnatante è stato incubato in pozzetti della piastra per ELISA (vedere b.) che erano stati pre-rivestiti con anti-GDF-15.

d. Per quanto riguarda un controllo, un surnatante della linea cellulare di melanoma UACC257 è stato incubato in pozzetti della piastra per ELISA (vedere b.) che non erano stati pre-rivestiti con anti-GDF-15.

e. Le cellule T sono state pre-incubate in una piastra per coltura cellulare a 12 pozzetti ( $1 \times 10^6$  cellule/ml) con GDF-15 (100 ng/ml), senza GDF-15, in surnatante della linea cellulare di melanoma UACC257 privata di GDF-15 (vedere c.) o in surnatante della linea cellulare di melanoma UACC257 contenente GDF-15 (vedere d.) per 1 h.

f. Un incubatore con supporto superiore vicino al microscopio è stato pre-riscaldato, ed è stata collegata

una miscela di gas (5% di CO<sub>2</sub>, 16% di O<sub>2</sub>, 79% di N<sub>2</sub>).

g. Sono state preparate 4 provette da 2 ml di un sistema con flusso microfluidico:

- i. Cellule T ( $1 \times 10^6$  cellule/ml): 1 ml
- ii. Cellule T e GDF15 ( $1 \times 10^6$  cellule/ml): 1 ml
- iii. Cellule T UACC 257 (contenenti GDF-15)
- iv. Cellule T UACC 257 private di GDF-15

h. La provetta 1 è stata collegata al canale 1 (vedere tabella seguente) e il flusso è stato iniziato (0,4 ml/minuto = 24 ml/h).

i. Le cellule T sono state fatte fluire per 3 minuti e al contempo 5 campi visivi sono stati predefiniti sul microscopio.

j. È stata ottenuta una immagine video di ciascun campo visivo per 5 s.

k. I canali rimanenti sono stati valutati in modo analogo al canale **1** (f-h) con i campioni di cellule T come indicato nella tabella seguente.

Canale #	cellule endoteliali	cellule T nel flusso	commenti
1	HUVEC non stimulate	cellule T	[controllo negativo]
2	HUVEC stimolate	cellule T	[controllo positivo]
3	HUVEC stimolate	cellule T GDF-15	

4	HUVEC stimolate	cellule T UACC 257	
5	HUVEC stimolate	UACC 257 private di GDF- 15 con anti GDF-15	

GDF-15 ricombinante è stato ottenuto da Invigate GmbH, Jena, Germania.

Risultati:

i risultati dell'esperimento sono mostrati nella figura 10A. Questa figura mostra analisi del numero di cellule T rotolanti per campo visivo per secondo. I dati sono stati ottenuti dal canale # 1 (cellule T di controllo su HUVEC non stimolate come "controllo negativo"), dal canale # 2 (cellule T di controllo su HUVEC stimolate come "controllo positivo"), dal canale # 3 ("GDF-15"), dal canale # 4 ("UACC 257": cellule T coltivate nel surnatante di cellule di melanoma UACC 257 contenenti GDF-15 secreto) e dal canale # 5 ("UACC257 + anti-hGDF-15": cellule T coltivate nel supernatante di cellule di melanoma UACC 257 private di GDF-15 secreto con anti GDF-15 B1-23).

Rispetto a cellule T che fluiscono su HUVEC non stimolate ("controllo negativo"; mediana = 28 cellule rotolanti per campo visivo per secondo), il flusso di cellule T su HUVEC stimolate ("controllo positivo") aumenta il numero di cellule rotolanti per campo visivo

per secondo (mediana = 46). Il trattamento delle cellule T con hGDF-15 diminuisce sostanzialmente il numero di cellule rotolanti per campo visivo per secondo (mediana = 29). Inoltre, la pre-incubazione delle cellule T con surnatante della linea cellulare di melanoma UACC257 che secreta GDF-15 diminuisce sostanzialmente il numero di cellule rotolanti per campo visivo per secondo (mediana = 36) rispetto a cellule T che fluiscono su HUVEC stimulate ("controllo positivo"). Contrariamente a questo, la pre-incubazione delle cellule T con surnatante della linea cellulare di melanoma UACC257 privata di GDF-15 secreto con anti GDF-15 B1-23 ha portato a numeri di cellule rotolanti per campo visivo per secondo (mediana = 45) che erano paragonabili a cellule T che fluiscono su HUVEC stimulate ("controllo positivo").

Quindi, secondo l'invenzione, inibitori di hGDF-15 possono venire usati per aumentare l'adesione di cellule T, comprendenti cellule CD8+, a cellule endoteliali, per esempio nel trattamento di cancro solidi.

Inoltre, il saggio sopra fornisce un sistema *in vitro* semplice che può venire usato per determinare se una sostanza di interesse è un inibitore di hGDF-15.

Sommario:

questo esempio dimostra che GDF-15, compreso GDF-15 secreto da cellule tumorali, diminuisce l'adesione di cellule T a cellule endoteliali. Quindi, secondo l'invenzione, un trattamento con inibitori di hGDF-15 può venire usato per aumentare l'adesione di cellule T, comprendenti cellule T CD8<sup>+</sup>, a cellule endoteliali. Tale trattamento aumenterà l'ingresso di cellule T, comprendenti cellule T CD8<sup>+</sup>, dal flusso sanguigno in cancri solidi. La percentuale aumentata di cellule T CD8<sup>+</sup> in cancri solidi, che deriverà da tale trattamento con inibitori di hGDF-15, è vantaggiosa per, e può venire usata in, terapia del cancro, per esempio immunoterapia del cancro. Poiché l'ingresso di cellule T CD8<sup>+</sup> in cancri solidi e la presenza di queste cellule T CD8<sup>+</sup> nei cancri solidi è particolarmente vantaggiosa per approcci terapeutici usando bloccanti del punto di controllo immunitario, un uso particolarmente vantaggioso di inibitori di hGDF-15 secondo l'invenzione è il loro uso in combinazione con bloccanti del punto di controllo immunitario.

Saggio di flusso-adesione comprendente neutralizzazione di anticorpi mediante anticorpi H1L5 (B1-23 umanizzato) e 01G06 e 03G05 (anticorpi anti-GDF-15 umanizzati ingegnerizzati secondo sequenze secondo WO 2014/100689)

Questo esperimento è stato eseguito per confermare ulteriormente gli effetti osservati sopra, comprendenti il riscontro che inibitori di hGDF-15 possono venire usati per aumentare l'adesione di cellule T a cellule endoteliali o il rotolamento di cellule T.

Procedure sperimentali:

il saggio di flusso/adesione è stato condotto come descritto sopra nel presente esempio. Cellule T sono state pre-incubate con 100 ng/ml di GDF-15 per 1 ora o con 100 ng/ml di GDF-15, che è stato pre-incubato con 10 µg/ml di anticorpo per 1 ora. Sono stati usati i seguenti anticorpi anti-GDF-15: H1L5 (B1-23 umanizzato), 01G06 e 03G05 (anticorpi anti-GDF-15 umanizzati ingegnerizzati secondo sequenze ottenute da WO 2014/100689).

Risultati:

i risultati sono mostrati nella figura 10B. Rispetto a cellule T che fluiscono su HUVEC non stimolate (controllo negativo), il flusso di cellule T su HUVEC stimolate (controllo positivo) ha aumentato il numero di cellule rotolanti per campo visivo per 20 secondi. Il trattamento delle cellule T con hGDF-15 ha sostanzialmente diminuito il numero di cellule rotolanti per campo visivo per 20 secondi. Contrariamente a questo, la pre-incubazione delle cellule T con hGDF-15, che è

stato pre-incubato con gli anticorpi anti GDF-15 H1L5 (B1-23 umanizzato), 01G06 o 03G05, ha portato a numeri di cellule rotolanti per campo visivo per 20 secondi che erano sostanzialmente aumentati rispetto al campione in cui non è stato aggiunto anticorpo anti-GDF-15. Questo effetto era presente per tutti gli anticorpi anti-GDF-15 testati ed era molto pronunciato per l'anticorpo H1L5 (B1-23 umanizzato), che ha invertito pressoché completamente l'effetto di hGDF-15 sul rotolamento delle cellule T.

#### Conclusioni

Quindi, secondo l'invenzione, inibitori di hGDF-15 possono venire usati per aumentare l'adesione di cellule T, comprendenti cellule CD8+, a cellule endoteliali, o il rotolamento di dette cellule T, comprendenti cellule CD8+. Secondo l'invenzione, gli inibitori di hGDF-15 aumenteranno la percentuale di cellule CD8+ in cancro solidi e possono venire usati per il trattamento di questi cancro. Questi inibitori di hGDF-15 possono essere - ma non sono limitati a questi - qualsiasi degli anticorpi anti-GDF-15 noti come gli anticorpi H1L5 (B1-23 umanizzato), 01G06 e 03G05.

**Esempio 4: valutazione dell'efficacia anti-tumorale dell'anticorpo di test in combinazione con**

**l'immunizzazione adiuvante in topi portatori di tumore  
MC38<sup>tg hGDF-15+</sup> singenico.**

Per valutare se l'inibizione del fattore di crescita e differenziazione (GDF) umano-15 può migliorare la risposta a una immunoterapia, e in particolare una risposta a una immunoterapia che richiede cellule T CD8<sup>+</sup> nel tumore, cellule di cancro del colon MC38 murino sono state transfettate per esprimere GDF-15 umano a livelli simili a quelli che si trovano in linee di cellule cancerose umane. Quando valutate mediante il saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA, R&D Systems, ELISA DuoSet per GDF-15 di topo), le cellule MC38 non esprimono livelli rilevabili di GDF-15 murino (limite di rilevazione: 7,81 pg/ml).

Il giorno 0, topi C57BL/6J femmina di 9 settimane di età (forniti da Charles River Laboratories, BP 0109, F 69592 L'Arbresle, Cedex) sono stati anestetizzati e inoculati sottocutaneamente con  $2 \times 10^5$  cellule MC38<sup>tg hGDF-15</sup> del colon. Il trattamento con anticorpo anti GDF-15 (20 mg/kg di peso corporeo, cioè circa 400 µg per topo in 100 µl di soluzione salina tamponata con fosfato con lo 0,5% di albumina di siero bovino) è stato iniziato il giorno 0 (circa 6 h dopo l'inoculazione delle cellule tumorali) e ripetuto i giorni 3, 7, 10, 14, 17 e 21. Il

giorno 13, quando i tumori hanno raggiunto un volume fra 100 e 150 mm<sup>3</sup>, gli animali sono stati casualizzati attraverso i differenti gruppi di trattamento, e i rispettivi animali sono stati iniettati intraperitonealmente con adiuvante (100 µg di acido Poliinosinico:policitidilico (Poli-ICLC (Hiltonol<sup>®</sup>, Oncovir, Washington D.C., USA)) e 50 µg di anticorpo anti-CD40 murino(m) InVivoMAb (clone FGK4.5/FGK45)) in un volume totale di 50 µl di soluzione salina tamponata con fosfato.

Per effetto della sua somiglianza strutturale a RNA a filamento doppio, che è presente in alcuni virus e stimola TLR3, Poli-ICLC stimola una infezione. L'anticorpo anti-CD40 agonista fornisce un segnale addizionale a cellule di presentazione dell'antigene. La "autorizzazione" di cellule dendritiche tramite stimolazione di CD40 supporta l'attivazione di cellule T CD8<sup>+</sup> antigene-specifiche. Il trattamento con adiuvante serve quindi a indurre cellule immunitarie tumore-specifiche in topi mantenuti in condizioni prive di patogeni specifici (Yadav M et al., Nature. 27 Nov 2014; 515(7528):572-6).

Questo trattamento con adiuvante rappresenta quindi un sistema modello per una immunoterapia per il cancro

che richiede cellule immunitarie nel tumore, e in particolare cellule T CD8<sup>+</sup> nel tumore. Quindi, è un sistema modello che è adatto per confermare ulteriormente che un trattamento con un inibitore di hGDF-15 come un anticorpo anti-hGDF-15 agisce in sinergia con l'immunoterapia per il cancro, comprendente una immunoterapia per il cancro che richiede cellule T CD8<sup>+</sup> nel tumore.

Per riassumere, sono stati studiati i seguenti gruppi di animali (10 topi per gruppo):

- gruppo con veicolo senza immunizzazione adiuvante
- gruppo trattato con anticorpo anti hGDF-15 B1-23 senza immunizzazione adiuvante
- gruppo con veicolo con immunizzazione adiuvante
- gruppo trattato con anticorpo anti hGDF-15 B1-23 con immunizzazione adiuvante

La dimensione del tumore è stata misurata 3 volte alla settimana mediante misurazione basata su un calibro della lunghezza e della larghezza del tumore.

I topi sono stati sacrificati quando il loro volume del tumore ha superato 2.000 mm<sup>3</sup> calcolato mediante la formula  $V = \text{lunghezza} \times \text{larghezza}^2/2$ . Analogamente, i

topi sono stati sacrificati quando è stato riscontrato che la loro condizione peggiora oltre i limiti comunemente accettati per il benessere degli animali (perdita di peso  $\geq$  15%, perdita di mobilità, comportamento prostrato, cattiva condizione del pelo).

Per i topi che sopravvivono, la presenza di tumori è stata determinata mediante esame fisico fino al giorno 57 oltre l'inoculazione del tumore. I risultati sono mostrati nella figura 11.

In uno studio precedente eseguito dagli inventori, è stato dimostrato che un trattamento con un anticorpo anti-GDF-15 da solo può venire vantaggiosamente usato per trattare il cancro, ma non per eliminare completamente i tumori, cioè non cura il cancro. Analogamente, nella figura 11, né i topi trattati con veicolo né i topi che sono stati trattati con anti-hGDF-15 da solo sono stati curati. Il trattamento con l'adiuvante (cioè con poli ICLC e l'anticorpo anti-CD40) ha curato 3 topi su 10. In modo importante, quando il trattamento con l'adiuvante è stato combinato con il trattamento con l'anticorpo anti-hGDF-15, sono stati curati 8 topi su 10. Quindi, il trattamento con l'anticorpo anti-hGDF-15 agisce in forte sinergia con il trattamento con l'adiuvante.

Conclusioni:

i risultati ottenuti in questo sistema modello confermano ulteriormente che inibitori di hGDF-15 agiscono in sinergia con l'immunoterapia per il cancro, e in particolare con l'immunoterapia per il cancro che richiede l'attivazione di cellule immunitarie come cellule T CD8<sup>+</sup> che esercitano quindi l'attività citotossica nel tessuto tumorale. I risultati confermano anche inoltre che l'aumento nella percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> nel cancro, che viene causato mediante gli usi di inibitori di hGDF-15 secondo l'invenzione, può vantaggiosamente venire usato nella terapia per il cancro.

Alle condizioni sperimentali scelte il sistema modello immunitario murino aveva pochissimo tempo per accumulare una risposta di cellule T CD8<sup>+</sup> antigene-specifiche nei confronti di un cancro a crescita rapida. Quindi, un adiuvante è stato usato per sostenere ulteriormente la risposta immunitaria spontanea nel sistema murino. Al contrario, in pazienti umani, in cui i cancri si sviluppano per un periodo di tempo più lungo (per esempio diversi anni), cellule T antigene-specifiche dirette contro antigeni del cancro sono tipicamente già presenti alla diagnosi, cioè l'innesco

di una risposta immunitaria si verifica usualmente anche prima che il cancro venga diagnosticato. Queste cellule T CD8<sup>+</sup> specifiche per un antigene del cancro esistono già in uomini, ma a un grado molto minore nel sistema modello murino. Quindi, secondo l'invenzione, gli usi di inibitori di hGDF-15 secondo l'invenzione saranno ancora più efficaci in uomini rispetto al presente sistema modello murino. Per conseguenza, inibitori di hGDF-15 possono venire efficacemente usati per il trattamento di pazienti con cancro umano secondo l'invenzione, per esempio per aumentare la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> in un cancro solido, e agiranno in sinergia con altre immunoterapie per il cancro in uomini, e in particolare con immunoterapie per il cancro che richiedono cellule T CD8<sup>+</sup> nel cancro, comprendenti immunoterapie per il cancro con bloccanti del punto di controllo immunitario come anticorpi anti-PD-1 e anti-PD-L1.

**Esempio 5: i livelli nel siero di GDF-15 definiscono la sopravvivenza di pazienti con melanoma trattati con anti PD-1**

Lo studio in questo esempio è stato eseguito per validare ulteriormente i risultati ottenuti nello studio dell'esempio 1, per esempio il riscontro che hGDF-15 influenza la risposta di pazienti a bloccanti del punto

di controllo immunitario, mediante uno studio indipendente addizionale.

I termini seguenti sono stati usati in connessione con questo studio:

"Censurato" = il paziente è stato rimosso dalla coorte dello studio quando non erano disponibili ulteriori dati di follow-up.

"Evento" = il paziente era morto.

"Sopravvivenza" = il paziente era vivo al momento del follow-up.

Pazienti provenienti dal Dipartimento di dermatologia, Università di Tübingen, Germania, con melanoma confermato istologicamente sono stati identificati nel database Central Malignant Melanoma Registry (CMMR) che registra in prospettiva pazienti provenienti da più di 60 centri dermatologici in Germania. Sono stati selezionati 99 pazienti con (a) campioni di siero archiviati, (b) dati di follow-up disponibili, (c) anamnesi o presenza di metastasi locoregionali o distanti nel punto di tempo del prelievo di sangue e (d) trattamento sperimentale con anticorpo anti PD-1. Gli scopi e i metodi della raccolta dei dati mediante il CMMR sono stati precedentemente pubblicati in dettaglio (Lasithiotakis, KG et al., Cancer / 107 /

1331-9. 2006). I dati ottenuti per ciascun paziente comprendono età, genere, la data dell'ultimo follow-up, e la data e la causa di morte, se applicabile. Tutti i pazienti avevano fornito consenso informato scritto per avere i dati clinici registrati dal registro CMMR. Il comitato etico istituzionale di Tübingen ha approvato lo studio (voto etico 125/2015B02). I pazienti idonei avevano età di 18 anni o più e presentavano melanoma allo stadio III o allo stadio IV non asportabile confermato istologicamente o citologicamente non assoggettabile a terapia locale, e mostravano progressione della malattia nonostante abbiano ricevuto terapie precedenti secondo le linee guida attuali. I pazienti con tumori mutanti BRAFV600 avevano ricevuto il trattamento di prima linea raccomandato o uno sperimentale comprendente la terapia con inibitore di BRAF o MEK o entrambi. Il trattamento precedente con ipilimumab, se applicabile, è stato considerato fallito quando i pazienti avevano ricevuto un minimo di due dosi, 3 mg/kg una volta ogni 3 settimane, ma mostravano progressione della malattia confermata entro 24 settimane dall'ultima dose di ipilimumab. Prima della somministrazione di anti PD-1, la risoluzione o il miglioramento di eventi avversi correlati a ipilimumab

a un grado 0-1 e una dose di prednisone di 10 mg/giorno o meno, erano richiesti per almeno 2 settimane prima della prima dose del farmaco dello studio. I pazienti idonei presentavano uno stato della prestazione del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) di 0 o 1; malattia misurabile per criteri di valutazione della risposta in tumori solidi, versione 1.1 (RECIST v1.1); e valori entro l'intervallo prespecificato per conteggio di neutrofili assoluto ( $\geq 1.500$  cellule per ml), piastrine ( $\geq 100.000$  cellule per ml), emoglobina ( $\geq 90$  g/l), creatinina nel siero ( $\leq 1.5$  limite superiore della norma [ULN]), bilirubina totale nel siero ( $\leq 1.5$  ULN o bilirubina diretta  $\leq$  ULN per pazienti con concentrazioni di bilirubina totale  $> 1.5$  ULN), aspartato e alanina amminotransferasi ( $\leq 2.5$  ULN o  $\leq 5$  ULN per pazienti con metastasi epatiche), rapporto normalizzato internazionale o tempo di protrombina ( $\leq 1.5$  ULN se non usano anticoagulanti), e tempo di tromboplastina parziale attivata ( $\leq 1.5$  ULN se non usano anticoagulanti). I pazienti hanno presentato un periodo di interruzione di almeno 4 settimane fra l'ultima dose della terapia più recente e la prima dose di pembrolizumab o nivolumab.

Analisi dei livelli nel siero di hGDF-15 mediante saggio

di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA):

i livelli nel siero di GDF-15 umano sono stati misurati mediante saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA).

Tamponi e reagenti:

soluzione di bloccaggio tamponata: 1% di BSA (frazione V pH 7,0, PAA, Pasching, Austria) in PBS

Soluzione di lavaggio: PBS-Tween (0,05%)

Standard: GDF-15 umano (concentrazione base 120 µg/ml, della R&D Systems)

Anticorpo di cattura: MAb GDF-15 umano (Clone 147627) della R&D Systems, IgG2B di topo (catalogo #MAB957, della R&D Systems, concentrazione base 360 µg/ml)

Anticorpo di rilevazione: PAb purificato per affinità biotinilato GDF-15 umano, IgG di capra (catalogo #BAF940, della R&D Systems, concentrazione base 9 µl/ml)

Streptavidina-HRP (catalogo #DY998, della R&D Systems)

Soluzione substrato: 10 ml di NaOAc 0,1 M pH 6,0 + 100 µl di TMB + 2 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Soluzione di arresto: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M

Procedura di analisi:

1. Preparazione della piastra:

e. L'anticorpo di cattura è stato diluito alla concentrazione operativa di 2 µg/ml in PBS. Una micropiastra a 96 pozzetti (Nunc maxisorp®) è stata immediatamente rivestita con 50 µl per pozzetto dell'anticorpo di cattura diluito escludendo le file esterne (A e H). Le file A e H sono state riempite con tampone per prevenire l'evaporazione dei campioni durante l'esperimento. La piastra è stata delicatamente picchiettata per assicurare che il fondo di ciascun pozzetto fosse accuratamente coperto. La piastra è stata posta in una camera umida e incubata per una notte a temperatura ambiente (RT).

f. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

g. 150 µl di soluzione di bloccaggio sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, facendo seguire incubazione a RT per 1 ora.

h. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

2. Procedura di saggio:

d. Sono stati preparati standard. GDF-15 è stato diluito in soluzione di bloccaggio tamponata a una concentrazione finale di 1 ng/ml (4,17 µl di GDF + 496

µl di soluzione di bloccaggio tamponata). Sono state prodotte diluizioni seriali 1:2.

e. Sono stati preparati campioni in duplicato 1:20 (6 µl + 114 µl di soluzione di bloccaggio tamponata).

f. 50 µl di campioni diluiti o standard sono stati aggiunti per pozzetto, facendo seguire incubazione per 1 ora a RT.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	s1	s2	...									s12
C	s1	s2	...									s12
D	s13	s14	...									s24
E	s13	s14	...									s24
F	St	and	ard					dil	ui	zion	i	
G					se	riale						
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

i. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

j. L'anticorpo di rilevazione è stato diluito a una concentrazione finale di 50 ng/ml (56 µl + 10 ml di tampone di bloccaggio). 50 µl dell'anticorpo di rilevazione diluito sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, facendo seguire incubazione per 1 ora a RT.

k. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

l. Streptavidina-HRP è stata diluita 1:200 (50 µl

+ 10 ml di tampone di bloccaggio). 50  $\mu$ l della diluizione operativa di streptavidina-HRP sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, facendo seguire incubazione per 20 minuti a RT.

m. Ciascun pozzetto è stato aspirato e lavato tre volte con PBS-Tween (0,05%).

n. È stata preparata la soluzione substrato. 50  $\mu$ l di soluzione substrato sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, facendo seguire incubazione per 20 minuti a RT.

o. 50  $\mu$ l di soluzione di arresto sono stati aggiunti a ciascun pozzetto.

p. La densità ottica di ciascun pozzetto è stata determinata immediatamente, usando un lettore di micropiastre regolato a 450 nm.

3. Calcolo del titolo nel siero di GDF-15:

d. Ciascuna diluizione standard di campione/GDF-15 è stata applicata in duplicato. Per determinare il titolo di GDF-15, è stata calcolata la media dei duplicati e lo sfondo (campione senza GDF-15) è stato sottratto.

e. Per creare una curva standard, valori ottenuti dall'intervallo lineare sono stati tracciati su un diagramma X-Y (asse X: concentrazione di GDF-15, asse Y: DO450), ed è stata applicata interpolazione di una curva

lineare. Il titolo nel siero di GDF-15 dei campioni di test è stato calcolato mediante interpolazione dai valori DO450 delle diluizioni standard con concentrazione nota.

f. Per calcolare la concentrazione finale di GDF-15 dei campioni, è stato considerato il fattore di diluizione distinto. Campioni che forniscono valori di DO sotto o sopra l'intervallo standard sono stati ri-analizzati a diluizioni appropriate.

Confronto dei livelli nel siero di hGDF-15 con dati dei pazienti:

in seguito, i livelli nel siero di hGDF-15 misurati sono stati confrontati con dati di risposta dei pazienti ottenuti dallo studio.

Correlazione statistica di livelli nel siero di hGDF-15 con dati dei pazienti:

Dati:

l'analisi dei dati era basata su un file di dati contenente dati ottenuti da campioni provenienti da 99 pazienti contenenti le colonne (variabili) Designazione del campione, GDF-15 (ng/ml), Giorni (fino alla morte o alla censura) e Ongoing (una variabile indice per la vita in corso).

Variabili dell'esito (punti finali):

a. Sopravvivenza globale (tempo fino alla morte). Questo punto finale è formato dall'indicatore dell'evento per la morte (1 = morto/0 = vivo), che è stato derivato dal file di dati, e il tempo fino alla morte o alla censura (l'ultima volta che il paziente era noto per essere vivo), corrispondente alla variabile "giorni".

Risposta al trattamento, per esempio se un paziente era un responder o meno (codificato come 1 = r)

Analisi dei dati:

il tempo di follow-up per l'analisi della sopravvivenza è stato definito dalla data del campionamento del sangue fino all'ultimo follow-up (cioè l'ultima informazione ottenuta dal paziente) o alla morte. Tutti i campioni di sangue sono stati prelevati entro giorni prima del trattamento con l'anticorpo anti-PD1. Per l'analisi di OS, i pazienti che erano vivi al momento dell'ultimo follow-up sono stati censurati, mentre i pazienti che erano morti sono stati considerati un "evento". Le probabilità di sopravvivenza cumulativa secondo Kaplan-Meier sono state calcolate insieme con intervalli di confidenza (ICs) del 95% e confrontate usando statistiche con il test del logaritmo del rango a due lati. I valori p per la sopravvivenza globale sono

stati calcolati mediante statistiche del logaritmo del rango a due lati. Un modello è stato adattato con una variabile di raggruppamento basata su GDF-15 come predittore categorico (i gruppi erano:  $< 1,5$  ng/ml ( $n = 62$ ),  $\geq 1,5$  ng/ml ( $n = 37$ ) o GDF-15<sup>basso</sup> ( $n = 49$ ), GDF-15<sup>alto</sup> ( $n = 50$ ), in base alla suddivisione mediana). Le curve di Kaplan-Meier risultanti sono mostrate nelle figure 12 e 13 in cui la censura è indicata mediante linee verticali. Inoltre, le tabelle seguenti contengono un sommario dei casi (tabella 9), dati di sopravvivenza dei pazienti per gruppi di pazienti aventi livelli di GDF-15 di  $< 1,5$  ng/ml e  $\geq 1,5$  ng/ml (tabelle 10 e 11) e confronti statistici totali dei gruppi di pazienti aventi livelli di GDF-15 di  $< 1,5$  ng/ml e  $\geq 1,5$  ng/ml (tabella 12).

**Tabella 9:** sommario dei casi

	Numero	Numero di eventi	Censurati	
			H*	% sopravvivenza
GDF-15 $< 1.5$ ng/ml	62	11	51	82.3%
GDF-15 $\geq 1.5$ ng/ml	37	18	19	51.4%
Totale	99	29	70	70.7%

\*H = senza eventi

**Tabella 10:** media e mediana per sopravvivenza (numero di giorni di sopravvivenza)

	Media <sup>a</sup>				Mediana	
	Stima	Errore standard	Intervallo di confidenza 95%		Stima	Errore standard
			limite inferiore	limite superiore		
<1.5ng/ml	701.928	44.172	615.350	788.506	n/d.	n/d.
≥1.5ng/ml	381.683	48.882	285.875	477.491	309.000	127.570
Totale	569.056	44.477	481.882	656.231	n/d.	n/d.

a. Dopo censura la stima è limitata alla sopravvivenza nota più lunga.

n/d: nessun dato di sopravvivenza mediana può venire calcolato a causa della presenza di > 50% di sopravvissuti nel gruppo.

**Tabella 11:** media e mediana per la durata di sopravvivenza (numero di giorni di sopravvivenza)

	Mediana <sup>a</sup>	
	Intervallo di confidenza 95%	
	limite inferiore	limite superiore
<1.5ng/ml	n/d.	n/d.
≥1.5ng/ml	58.963	559.037
Totale	n/d.	n/d.

a. Dopo censura la stima è limitata alla sopravvivenza nota più lunga.

n/d: nessun dato di sopravvivenza mediana può venire calcolato a causa della presenza di > 50% di sopravvissuti nel gruppo.

**Tabella 12:** confronti totali

	Chi quadrato	df*	Significatività
Logaritmo del rango (Mantel-Cox)	8,129	1	0,004

\* df = grado di libertà

Test sulla distribuzione uguale di sopravvivenza per livelli diversi di GDF-15 (< 1,5 ng/ml, ≥ 1,5 ng/ml)

Risultati e conclusioni:

i risultati statistici precedenti di questo esempio hanno ulteriormente confermato i risultati dell'esempio 1. Per esempio, è stato confermato che la probabilità di una risposta al trattamento, indicata dalla sopravvivenza dei pazienti, diminuisce significativamente con livelli di hGDF-15 crescenti nei sieri dei pazienti. Per esempio, la tabella 12 mostra che la sopravvivenza fra i due gruppi di pazienti aventi livelli di GDF-15 di, rispettivamente, < 1,5 ng/ml e ≥ 1,5 ng/ml, era significativamente diversa, come evidenziato da un livello di significatività di 0,004. Analogamente, la tabella 9 dimostra che una percentuale maggiore di pazienti (82,3%) è sopravvissuta nel gruppo avente livelli di GDF-15 di < 1,5 ng/ml, e le tabelle 10 e 11 e le figure 12 e 13 dimostrano che per pazienti aventi livelli di GDF-15 di < 1,5 ng/ml, i tempi di sopravvivenza erano marcatamente più lunghi rispetto a

pazienti aventi livelli di GDF-15 di  $\geq 1,5$  ng/ml.

Quindi, i risultati di questo esempio confermano ulteriormente che hGDF-15 agisce per influenzare negativamente le risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario. Quindi, secondo l'invenzione, un inibitore di hGDF-15 sarà utile per inibire gli effetti negativi di hGDF-15 sulle risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario, e per migliorare le risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario non solo in melanoma, ma in tutti i cancri solidi indicati in questa sede.

**Esempio 6: in pazienti con cancro del polmone a cellule non piccole (NSCLC) umano trattati con un anticorpo anti-PD1, i livelli mediani nel siero di hGDF-15 in pazienti con malattia progressiva sono maggiori rispetto a pazienti che mostrano una risposta parziale.**

Questo esempio è stato eseguito per validare ulteriormente i risultati ottenuti nello studio dell'esempio 1, per esempio il riscontro che hGDF-15 influenza la risposta di pazienti a bloccanti del punto di controllo immunitario, in uno studio indipendente addizionale in un cancro solido diverso.

Pazienti:

pazienti con NSCLC sono stati trattati con anticorpi anti-PD1 secondo la marcatura del farmaco approvata degli anticorpi anti-PD1. I pazienti comprendevano pazienti che erano stati pre-trattati con altre terapie per il cancro. Per il fatto che una risposta completa viene raramente osservata in pazienti con NSCLC, il gruppo di pazienti comprendeva pazienti che mostrano malattia progressiva e mostrano una risposta parziale dopo trattamento con PD-1, ma non pazienti che mostrano una risposta completa dopo trattamento con PD-1.

Campioni di siero:

campioni di siero sono stati prelevati dai pazienti prima del trattamento con gli anticorpi anti-PD1.

Analisi dei livelli nel siero di hGDF-15 mediante saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA):

i livelli nel siero di hGDF-15 nei campioni di siero sono stati analizzati mediante saggio di immunoassorbimento legato a enzimi (ELISA), come descritto nell'esempio 1.

Risultati:

sono stati ottenuti i livelli nel siero di hGDF-15 da 5 pazienti che mostrano una risposta parziale dopo trattamento con anti-PD-1 e da 5 pazienti che mostrano

malattia progressiva dopo trattamento con anti-PD-1. In particolare, il livello mediano nel siero di hGDF-15 nei pazienti che mostrano una risposta parziale era 0,55 ng/ml, mentre il livello mediano nel siero di hGDF-15 nei pazienti che mostrano malattia progressiva era 1,56 ng/ml. Quindi, il livello mediano nel siero di hGDF-15 nei pazienti che mostrano una malattia progressiva era circa 2,8 volte maggiore rispetto ai pazienti che mostrano una risposta parziale.

Conclusioni:

i risultati di questo esempio confermano ulteriormente che i livelli di hGDF-15 si correlano negativamente con la risposta dei pazienti a bloccanti del punto di controllo immunitario. I risultati di questo esempio confermano anche inoltre che hGDF-15 agisce per influenzare negativamente le risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario come PD-1. Quindi, secondo l'invenzione, un inibitore di hGDF-15 sarà utile per inibire gli effetti negativi di hGDF-15 sulle risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario, e per migliorare le risposte dei pazienti al trattamento con bloccanti del punto di controllo immunitario non solo in melanoma, ma anche in cancri del

polmone come NSCLC e in tutti gli altri cancri solidi indicati in questa sede.

**Esempio 7: i livelli nel siero di hGDF-15 non si correlano significativamente con il carico mutazionale dei tumori**

Il carico mutazionale è un fattore prognostico positivo noto per una risposta di pazienti con cancro a bloccanti del punto di controllo immunitario. Generalmente, cellule cancerose contenenti mutazioni genomiche danno luogo ad antigeni delle cellule cancerose che sono specifici per le cellule cancerose e diversi dagli antigeni di cellule non cancerose. Un alto carico mutazionale porta a un alto numero di tali antigeni specifici di cellule cancerose. In cancri che presentano tale alto numero di antigeni specifici di cellule cancerose, la stimolazione della risposta immunitaria mediante bloccanti del punto di controllo immunitario viene considerata particolarmente efficace, poiché sono disponibili più antigeni specifici di cellule cancerose come antigeni bersaglio per la risposta immunitaria.

Per confermare ulteriormente che hGDF-15 non è semplicemente un marcatore surrogato per il carico mutazionale dei tumori, e per confermare ulteriormente

che un trattamento con inibitori di hGDF-15 agisce tramite un meccanismo che è indipendente dal carico mutazionale dei tumori, i livelli di mRNA di hGDF-15 in campioni di cancro ottenuti da pazienti con cancro sono stati tracciati contro il numero di mutazioni somatiche che sono state identificate nei cancri. Le mutazioni somatiche sono state determinate mediante uso di sequenziamento dell'esoma. I dati sono stati analizzati usando lo strumento web UZH della University Hospital Zurich (Cheng PF et al.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 16 Set 2015; 145:w14183). I risultati sono mostrati nella figura 14. La figura 14A mostra un grafico per dati di pazienti con cancro ottenuti dal Cancer Genome Atlas (TCGA) considerando solo pazienti con melanoma maligno di grado alto (il Cancer Genome Atlas è descritto nel riferimento di Cheng PF et al.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 16 Set 2015; 145:w14183). L'espressione di GDF-15 è stata valutata mediante normalizzazione usando il pacchetto software RSEM ("RNA Seq by expectation maximization") (Li B e Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics.

4 Ago 2011; 12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323). La figura 14B mostra un grafico per dati di pazienti con cancro ottenuti da 40 pazienti addizionali con melanoma maligno metastatico dalla University Hospital Zurich, che sono stati analizzati separatamente.

In particolare, entrambe le figure 14A e 14B mostrano un valore p di 0,5, indicante che non vi è una correlazione significativa fra il carico mutazionale nei cancri e i livelli di hGDF-15. Questi risultati confermano inoltre che hGDF-15 non è semplicemente un marcatore surrogato per il carico mutazionale dei tumori, e che un trattamento con inibitori di hGDF-15 agisce tramite un meccanismo che è indipendente dal carico mutazionale dei tumori.

**Esempio 8: infiltrazione di cellule T CD8<sup>+</sup> in tumori di tipo selvatico o tumori che (sovra)esprimono GDF-15 umano**

In uno studio pilota usando cellule di cancro del colon MC38 di tipo selvatico o che (sovra)esprimono GDF-15 umano impiantate nel fianco destro di topi singenici immunocompetenti C57BL/6, la sovraespressione di GDF-15 era associata con ridotta infiltrazione di cellule immunitarie. Fotografie di immunocitochimica per CD8a in topi sacrificati dopo 29 giorni che contengono tumori di

tipo selvatico o tumori che sovraesprimono hGDF15 transgenico (tg) sono mostrate nella figura 15. Come si può vedere dalla figura, i tumori di tipo selvatico contenevano più cellule CD8a-positivo rispetto a tumori che sovraesprimono hGDF15 transgenico (tg).

Questi risultati supportano inoltre il riscontro che, secondo la presente invenzione, hGDF-15 diminuisce la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> in cancri solidi e che, al contrario, inibitori di hGDF-15 come anticorpi anti-GDF-15 possono venire usati per aumentare la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> in un cancro solido in un paziente umano.

#### Applicabilità industriale

Le combinazioni di inibitori, le composizioni e i kit secondo la presente invenzione possono venire prodotti industrialmente e venduti come prodotti per i metodi e gli usi rivendicati (per esempio per trattare un cancro come definito in questa sede), secondo standard noti per la produzione di prodotti farmaceutici. Per conseguenza, la presente invenzione è applicabile industrialmente.

## **Riferimenti**

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

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

Bauskin AR et al.: "The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome." Cancer Res. 15 Mar 2005;65(6):2330-6.

Brown DA et al.: "Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer." Clin Cancer Res. 1 Nov 2009;15(21):6658-64.

Cheng PF et al.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 16 Set 2015;145:w14183.

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

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

Mei Cong, Ph.D. et al.: Advertorial: "Novel Bioassay to Assess PD-1/PD-L1 Therapeutic Antibodies in Development for Immunotherapy Bioluminescent Reporter-Based PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay." (<http://www.genengnews.com/gen-articles/advertorial-novel-bioassay-to-assess-pd-1-pd-l1-therapeutic-antibodies-in-development-for-immun/5511/>).

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

Eisenhauer et al.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur. J. Cancer. 45, n. 2, Gennaio 2009, pag. 228-47.

Giudicelli V et al.: IMGTV-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res. 1 Lug 2004;32(pubblicato su server web):W435-40.

Gouttefangeas C et al.: "Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality Assurance and Future." (2015) In: Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (N. Rezaei curatore). Springer. Capitolo 25: pagine 471-486; e i metodi secondo

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

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

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

Huang CY et al.: "Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15." Clin Cancer Res. 1 Ott 2007;13(19):5825-33.

Jackson e Linsley: "Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application." Nat Rev Drug Discov. Gen 2010; 9(1):57-67.

Johnen H et al.: "Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1." Nat Med. Nov 2007;13(11):1333-40.

Jones PT et al.: "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature. 29 Mag-4 Giu 1986;321(6069):522-5.

Kabat et al.: Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983.

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

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

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

Lasithiotakis, KG et al., Cancer / 107 / 1331-9. 2006.

Li B e Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 4 Ago 2011;12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323.

Marks JD et al.: "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J Mol Biol. 5 Dic 1991;222(3):581-97.

Mimeault M e Batra SK: "Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer." J Cell Physiol. Set 2010;224(3):626-35.

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

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

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

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

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

Roth P et al.: "GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas." Clin Cancer Res. 1 Ago 2010;16(15):3851-9.

Saerens D et al.: "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics." Curr Opin Pharmacol. Ott 2008;8(5):600-8. Epub 22 Ago 2008

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

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

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

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

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

Van der Burg SH, et al.: "Immunoguiding, the final frontier in the immunotherapy of cancer." (2014) In *Cancer Immunotherapy meets oncology* (CM Britten, S Kreiter, M. Diken & HG Rammensee ed). Springer International Publishing Switzerland p37-51 ISBN: 978-3-319-05103-1.

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

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

Zhang, J., Yao, Y.-H., Li, B.-G., Yang, Q., Zhang, P.-Y., e Wang, H.-T. (2015). Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 5, 9800

Zhou et al. Growth differentiation factor-15 suppresses maturation and function of dendritic cells and inhibits tumor-specific immune response. *PLoS One*. 13 Nov 2013;8(11):e78618.

WO 2005/099746

WO 2009/021293

WO 2014/049087

PCT/EP2015/056654 (corrispondente a WO 2015/144855)

WO 2014/100689

#### RIVENDICAZIONI

1. Un inibitore di hGDF-15 per l'uso in un metodo per l'immunoterapia del cancro, il metodo essendo un metodo di trattamento di un cancro solido in combinazione con un bloccante del punto di controllo immunitario in un paziente umano, in cui l'inibitore di hGDF-15 deve venire somministrato al paziente umano, in cui l'inibitore di hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a hGDF-15, o una sua porzione legante hGDF-15, e in cui il bloccante del punto di controllo immunitario viene scelto da uno o più del gruppo seguente consistente di:

- i) un inibitore di PD-1 umana, l'inibitore essendo un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-1 umana, o una sua porzione che si lega a PD-1 umana; e
- ii) un inibitore di PD-L1 umana, l'inibitore essendo un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-L1 umana, o una sua porzione che si lega a PD-L1 umana.

2. L'inibitore di hGDF-15 per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il paziente è un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,2 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, in cui il paziente è preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno

1,5 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15, e in cui il paziente è più preferibilmente un paziente che ha un livello nel siero di hGDF-15 di almeno 1,8 ng/ml prima dell'inizio della somministrazione dell'inibitore di hGDF-15;

e/o in cui il cancro viene scelto dal gruppo consistente di melanoma, cancro coloretale, cancro della prostata, cancro della testa e del collo, cancro uroteliale, cancro dello stomaco, cancro pancreatico, cancro del fegato, cancro dei testicoli, cancro dell'ovaio, cancro endometriale, cancro cervicale, cancro cerebrale, cancro del seno, cancro gastrico, carcinoma delle cellule renali, sarcoma di Ewing, cancro del polmone a cellule non piccole e cancro del polmone a cellule piccole, in cui il cancro viene preferibilmente scelto dal gruppo consistente di melanoma, cancro coloretale, cancro della prostata, cancro della testa e del collo, cancro uroteliale, cancro dello stomaco, cancro pancreatico, cancro del fegato, cancro dei testicoli, cancro dell'ovaio, cancro endometriale e cancro cervicale, e in cui il cancro viene più preferibilmente scelto dal gruppo consistente di melanoma, cancro coloretale, cancro della prostata, cancro della testa e del collo, cancro uroteliale e cancro dello stomaco;

e/o in cui il cancro viene scelto dal gruppo consistente di melanoma, carcinoma a cellule squamose orale, cancro coloretale e cancro della prostata.

3. L'inibitore di hGDF-15 per l'uso secondo qualsiasi delle rivendicazioni precedenti,

in cui l'inibitore è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a hGDF-15, o una sua porzione legante hGDF-15, in cui

(i) il legame è legame a un epitopo conformazionale o discontinuo su hGDF-15, e in cui l'epitopo conformazionale o discontinuo è formato dalle sequenze amminoacidiche di SEQ. ID. n.: 25 e SEQ. ID. n.: 26, e/o in cui

(ii) l'anticorpo o la sua porzione legante hGDF-15 comprende un dominio variabile della catena pesante che comprende una regione CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 3, una regione CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 4 e una regione CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 5, e in cui l'anticorpo o una sua porzione legante hGDF-15 comprende un dominio variabile della catena leggera che comprende una regione CDR1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID.

n.: 6, una regione CDR2 comprendente la sequenza amminoacidica ser-ala-ser e una regione CDR3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ. ID. n.: 7.

4. L'inibitore di hGDF-15 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il metodo è un metodo per il trattamento di metastasi del cancro, e/o in cui l'inibitore di hGDF-15 aumenta la percentuale di cellule T CD8<sup>+</sup> nel cancro aumentando l'adesione di cellule T CD8<sup>+</sup> a cellule endoteliali e quindi incrementando l'ingresso delle cellule T CD8<sup>+</sup> dal flusso sanguigno nel cancro.

5. Una composizione comprendente un inibitore di hGDF-15 e un bloccante del punto di controllo immunitario, in cui l'inibitore di hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a hGDF-15, o una sua porzione legante hGDF-15, e in cui il bloccante del punto di controllo immunitario viene scelto da uno o più del gruppo seguente consistente di:

i) un inibitore di PD-1 umana, l'inibitore essendo un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-1 umana,

o una sua porzione che si lega a PD-1 umana; e  
ii) un inibitore di PD-L1 umana, l'inibitore essendo un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-L1 umana, o una sua porzione che si lega a PD-L1 umana.

6. La composizione secondo la rivendicazione 5, per l'uso in medicina.

7. Un kit comprendente un inibitore di hGDF-15 e almeno un bloccante del punto di controllo immunitario, in cui l'inibitore di hGDF-15 è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a hGDF-15, o una sua porzione legante hGDF-15, e in cui il bloccante del punto di controllo immunitario viene scelto da uno o più del gruppo seguente consistente di:

i) un inibitore di PD-1 umana, l'inibitore essendo un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-1 umana, o una sua porzione che si lega a PD-1 umana; e  
ii) un inibitore di PD-L1 umana, l'inibitore essendo un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a PD-L1 umana, o una sua porzione che si lega a PD-L1 umana.

8. Il kit secondo la rivendicazione 7, in cui l'inibitore di hGDF-15 e uno o più o tutti dei bloccanti del punto di controllo immunitario sono contenuti in contenitori

separati o in un contenitore singolo.

9. Una composizione per l'uso in medicina secondo la rivendicazione 6, o un kit secondo la rivendicazione 7 o 8,

per l'uso in un metodo per il trattamento di un cancro solido, in cui il metodo è preferibilmente un metodo per l'immunoterapia del cancro e in cui il cancro è preferibilmente come definito nella rivendicazione 2.

10. L'inibitore di hGDF-15 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui l'uso è un uso in combinazione con acido poliinosinico:policitidilico, in cui la combinazione è una combinazione con acido poliinosinico:policitidilico.

11. L'inibitore di hGDF-15 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 e 10, in cui l'uso è un uso in combinazione con un anticorpo anti-CD40 umana immunostimolante, preferibilmente un anticorpo anti-CD40 umana monoclonale immunostimolante.

12. Un prodotto in combinazione comprendente un inibitore di hGDF-15 e uno qualsiasi dei seguenti:

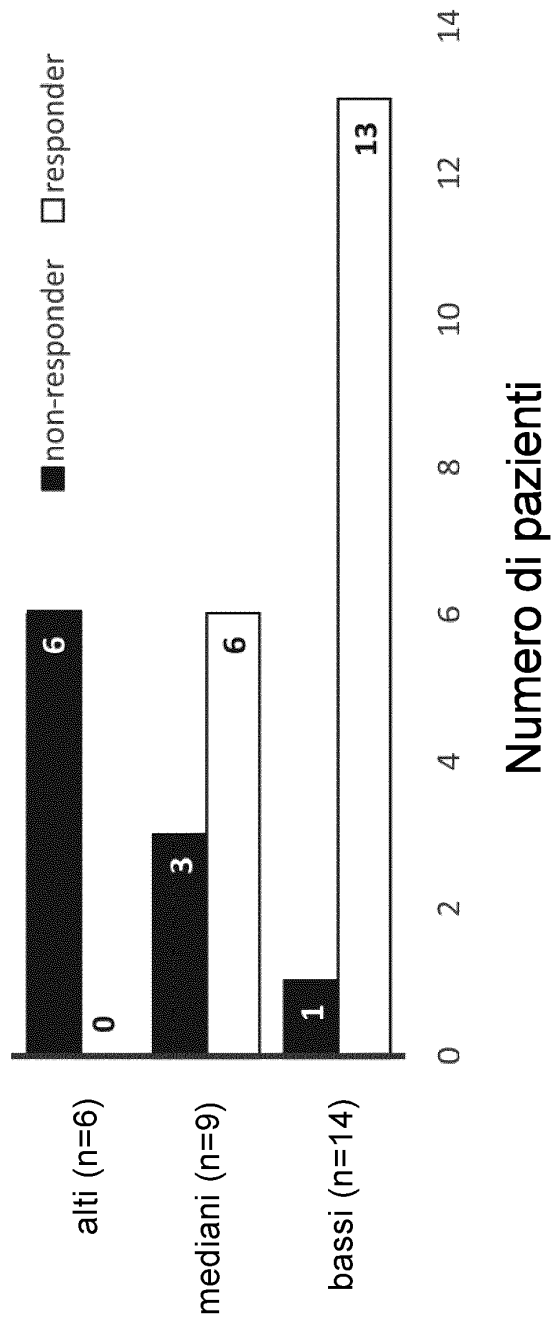
- a) acido poliinosinico:policitidilico;
- b) un anticorpo anti-CD40 umana immunostimolante, preferibilmente un anticorpo anti-CD40 umana monoclonale immunostimolante; o
- c) acido poliinosinico:policitidilico e un anticorpo anti-CD40 umana immunostimolante, preferibilmente un anticorpo anti-CD40 umana monoclonale immunostimolante, per l'uso in un metodo di trattamento di un cancro solido in un paziente umano, in cui la combinazione comprende opzionalmente un bloccante del punto di controllo immunitario, e in cui l'inibitore è un anticorpo monoclonale in grado di legarsi a hGDF-15, o una sua porzione legante hGDF-15.



2/21

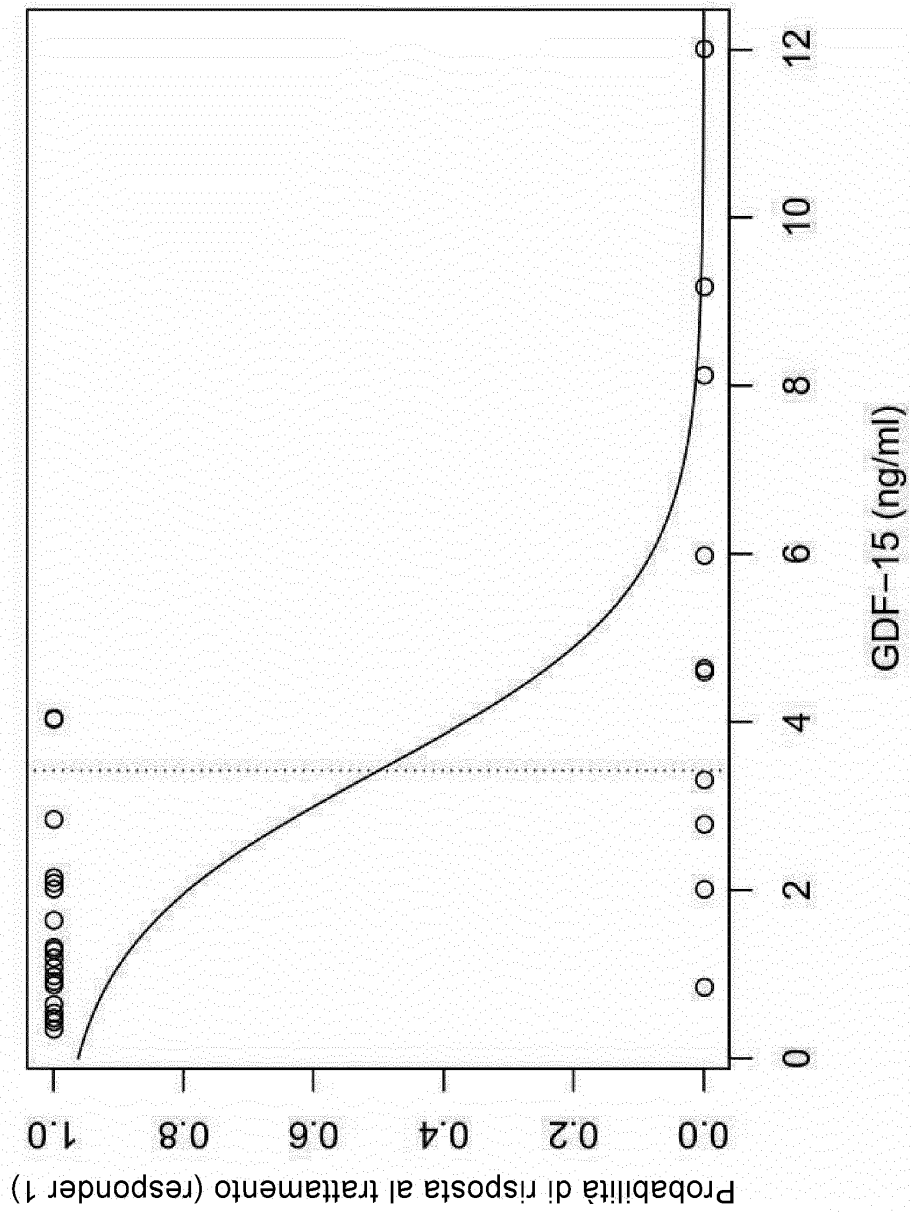
Figura 2

**Livelli nel siero di GDF-15 come predittori categorici per la risposta ad anti-PD-1**



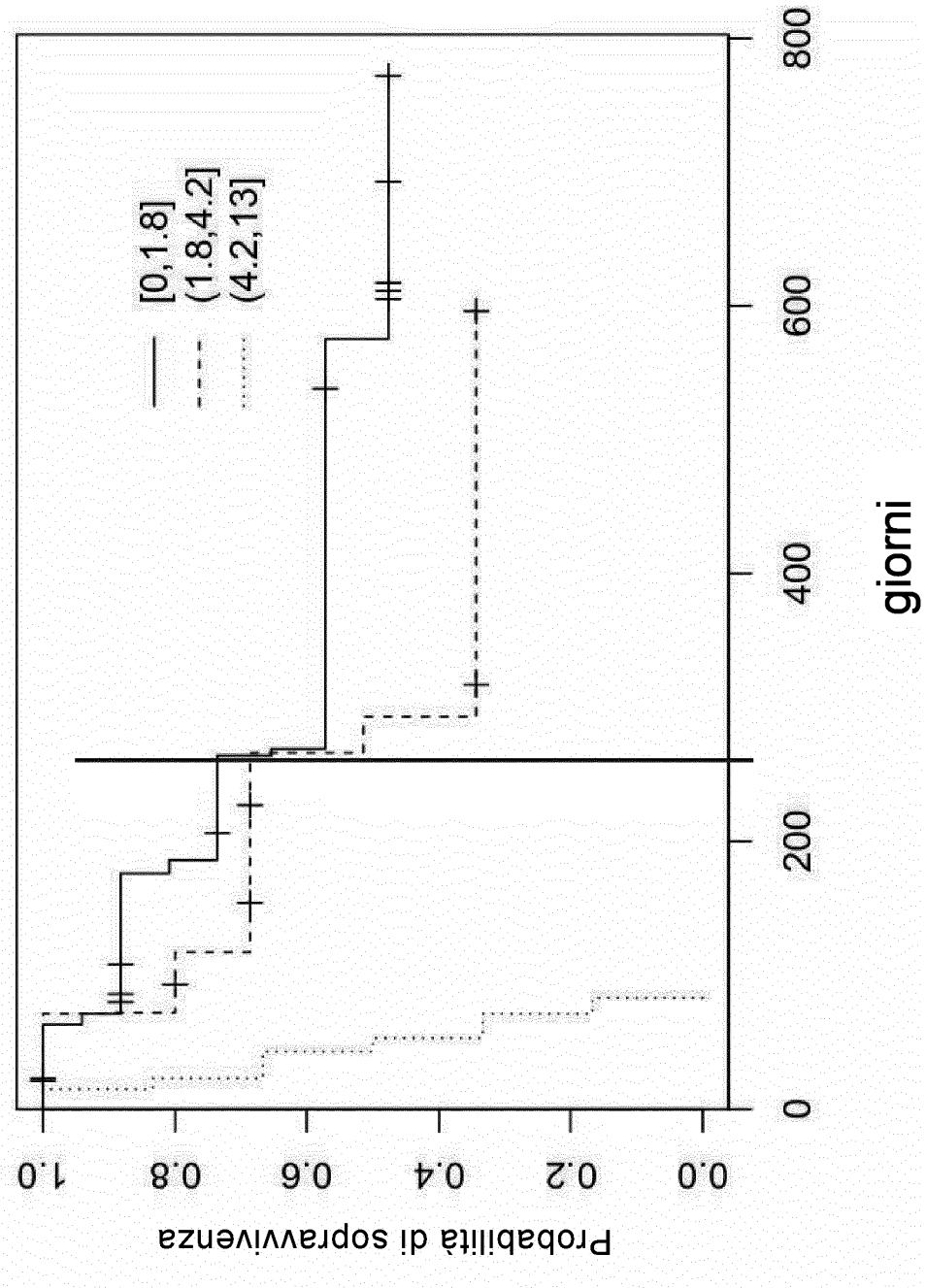
3/21

Figura 3



4/21

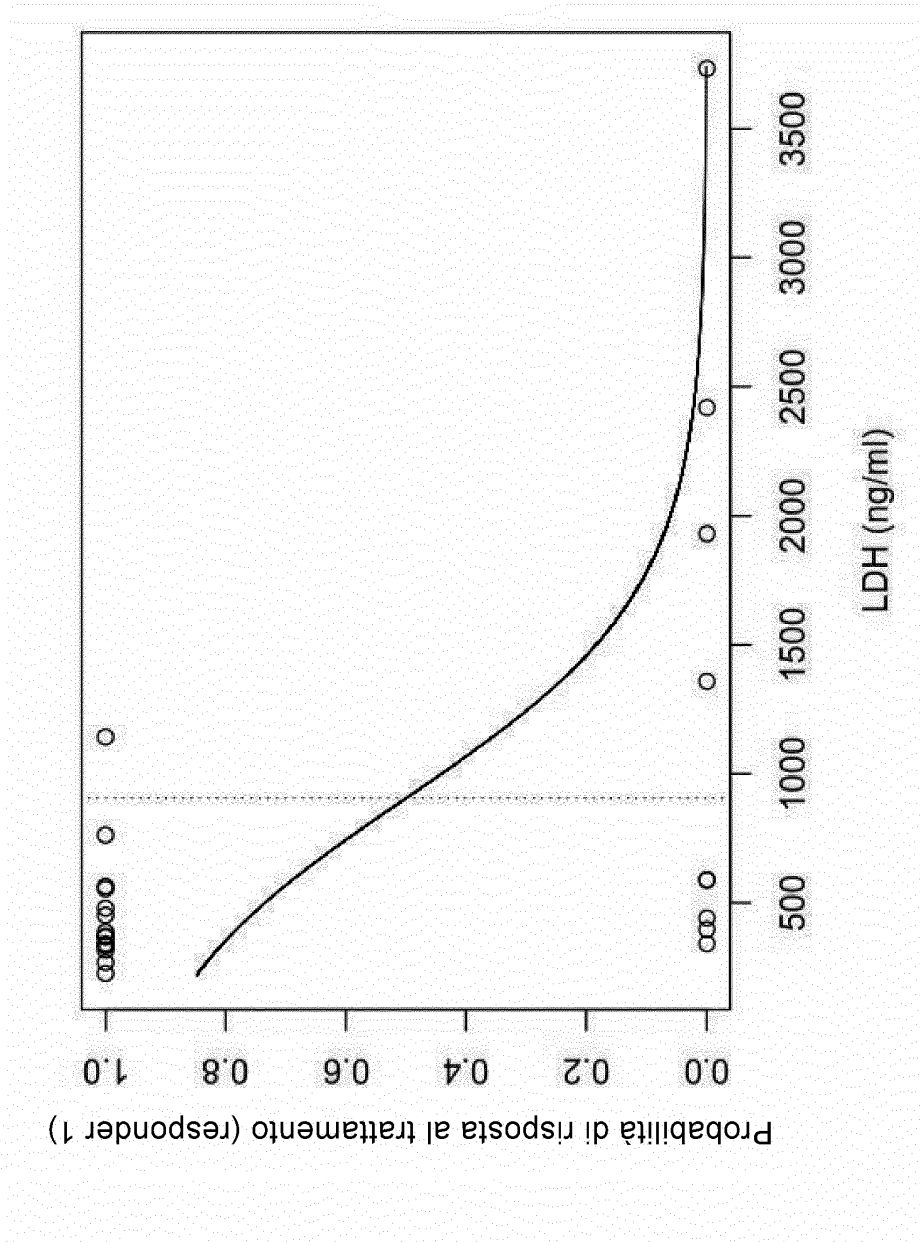
Figura 4



5/21

Figura 5

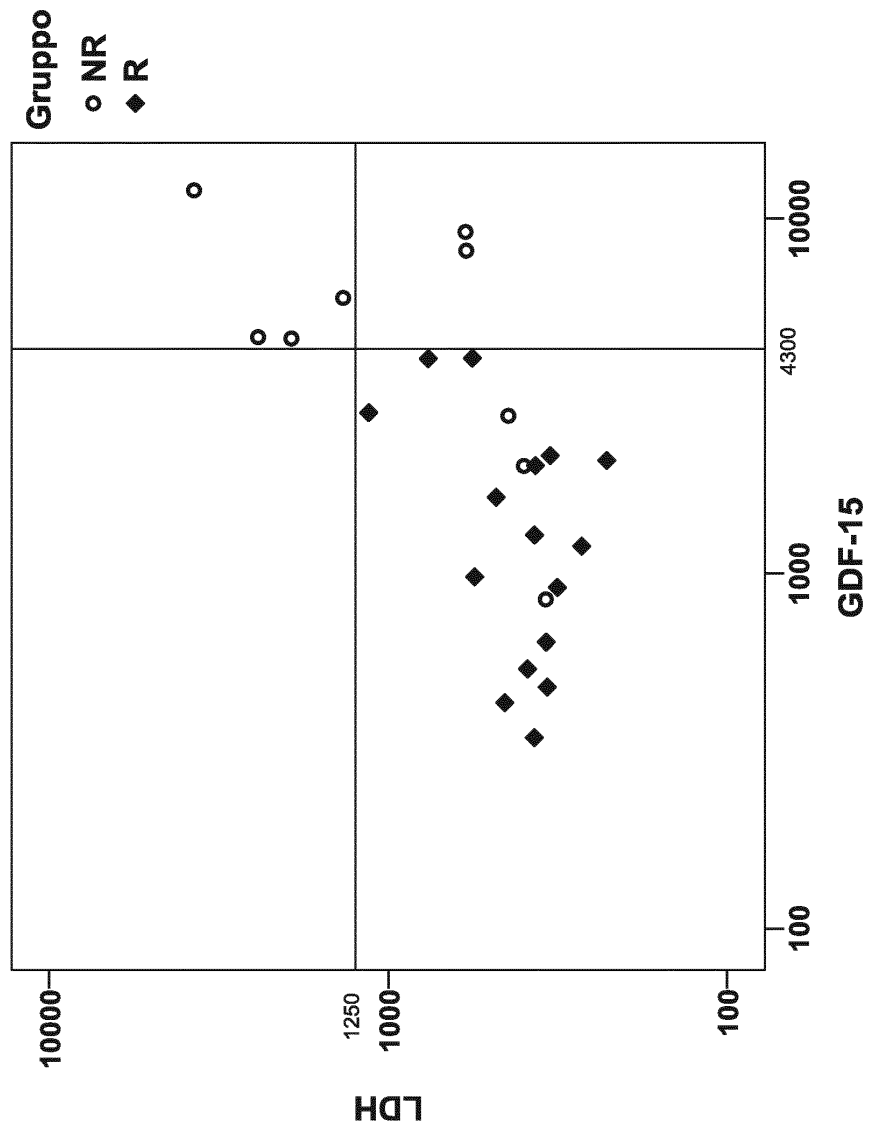
A)



6/21

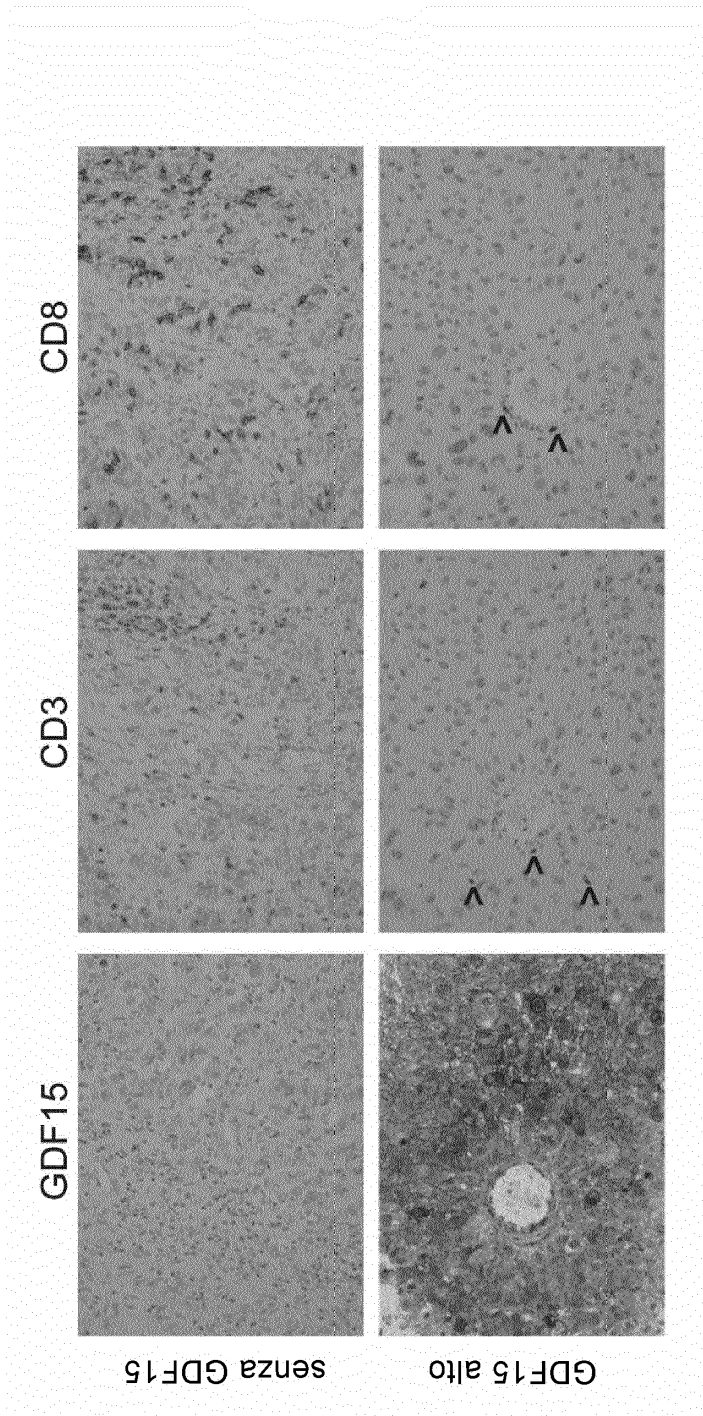
Figura 5, segue

B)



7/21

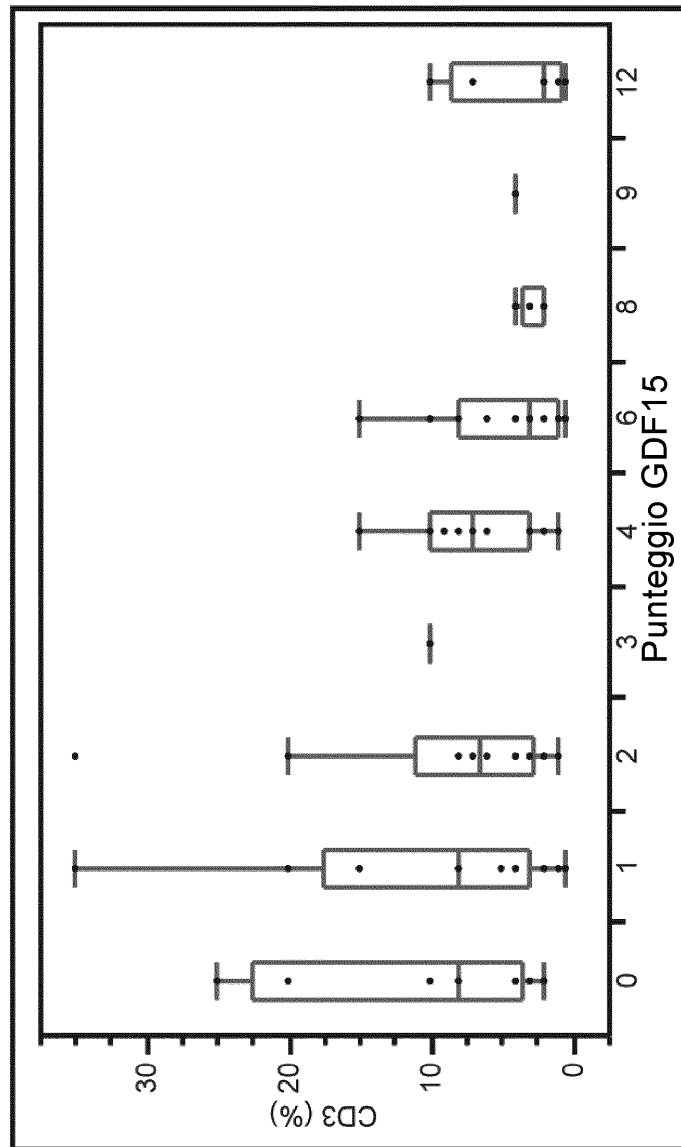
Figura 6



8/21

Figura 7

A)



Correlazione del rango di Spearman

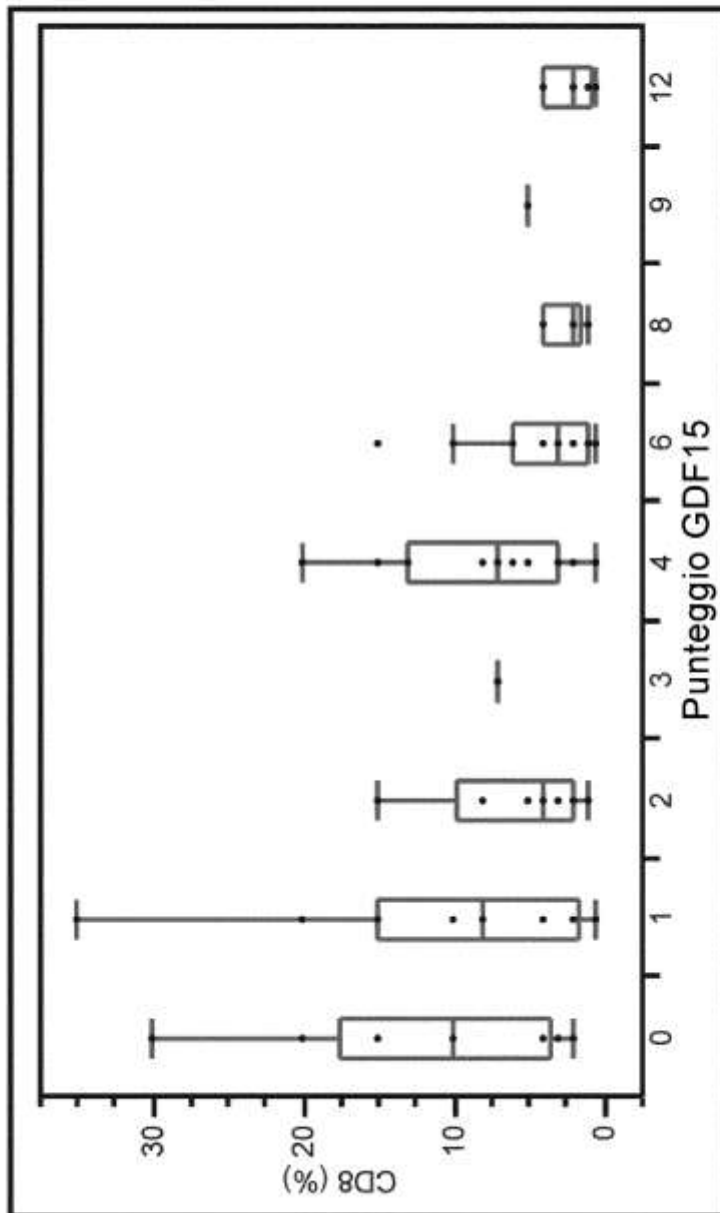
Rho di Spearman: -0.3717

p=0.0015

9/21

Figura 7, segue

B)



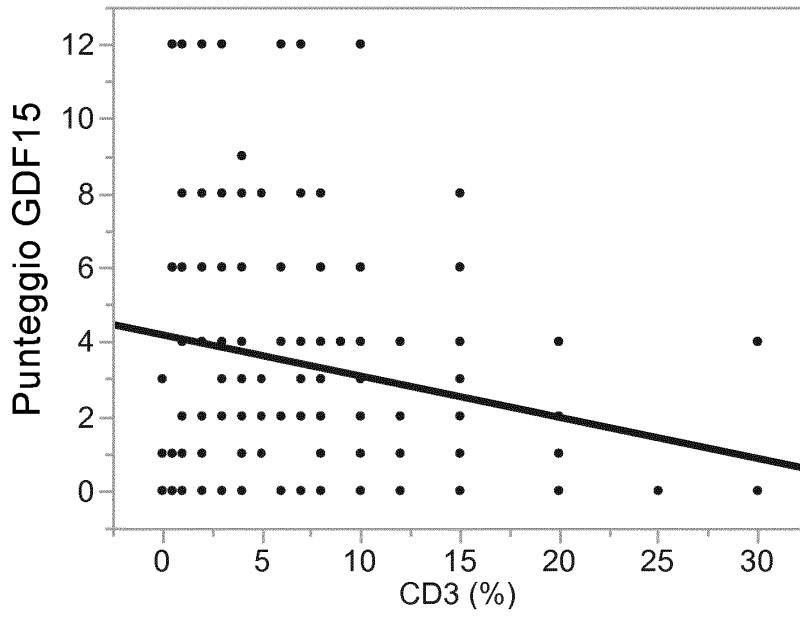
Correlazione del rango di Spearman

Rho di di Spearman: -0.3390

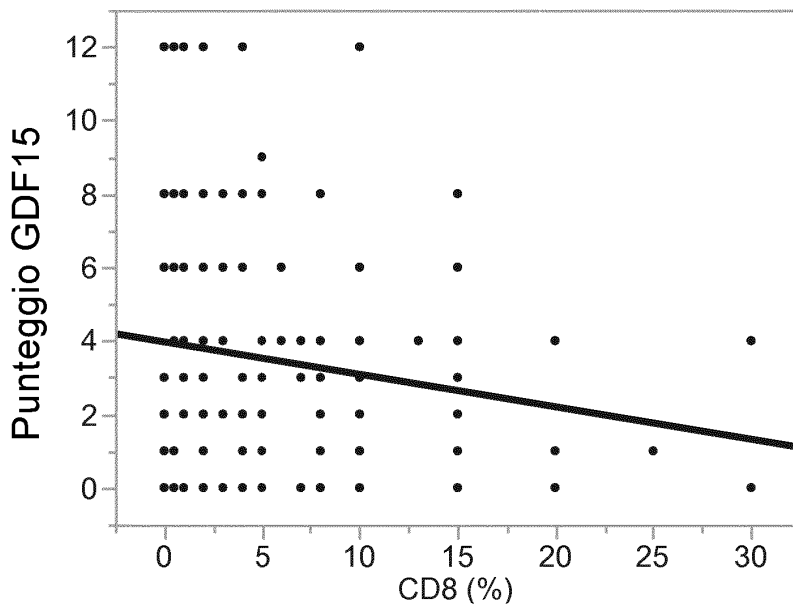
p=0.0038

10/21

Figura 8



**p=0.0093**

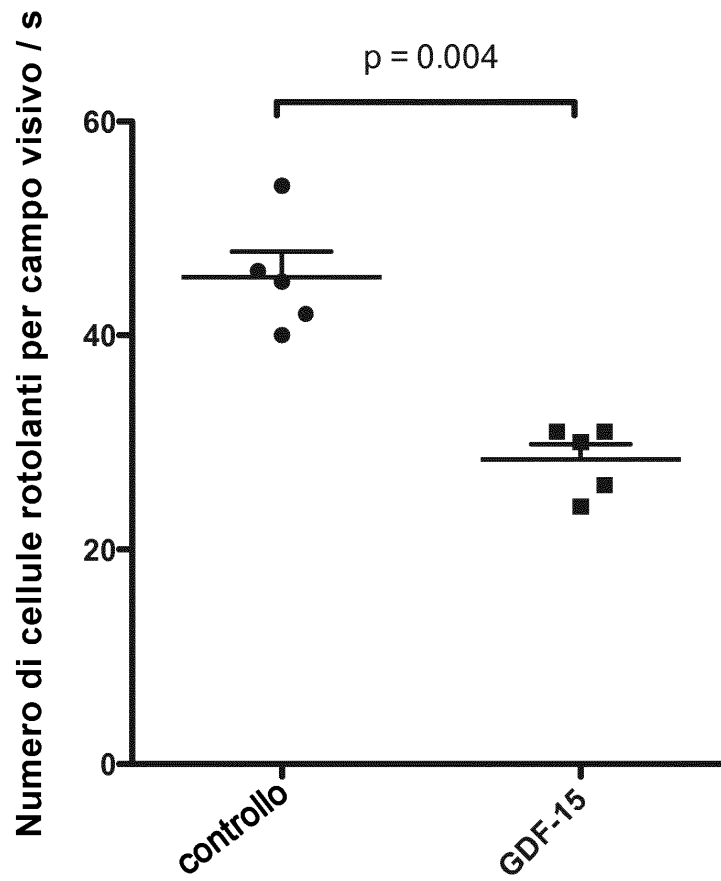


**p=0.0311**

11/21

Figura 9

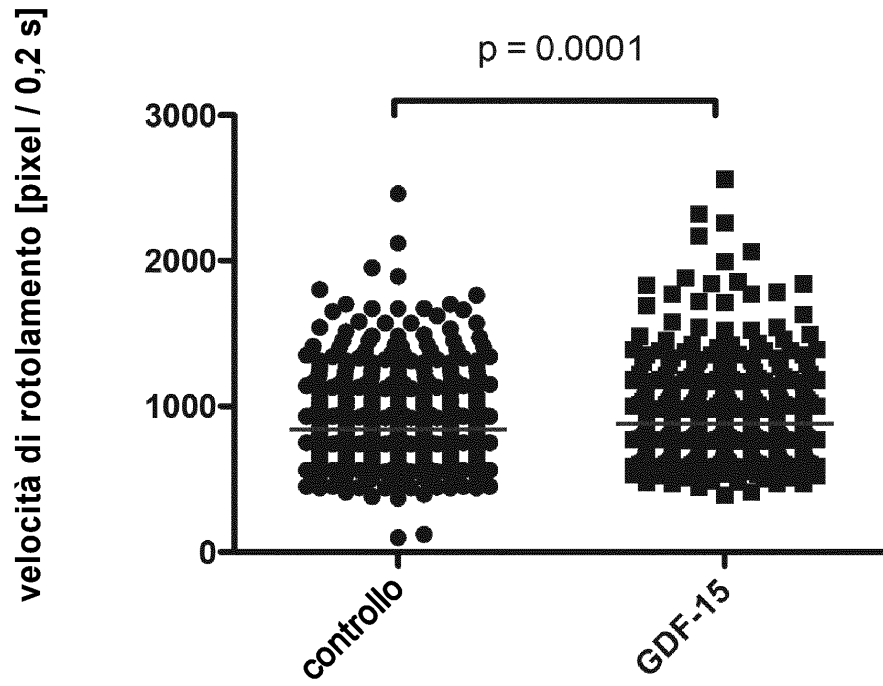
A)



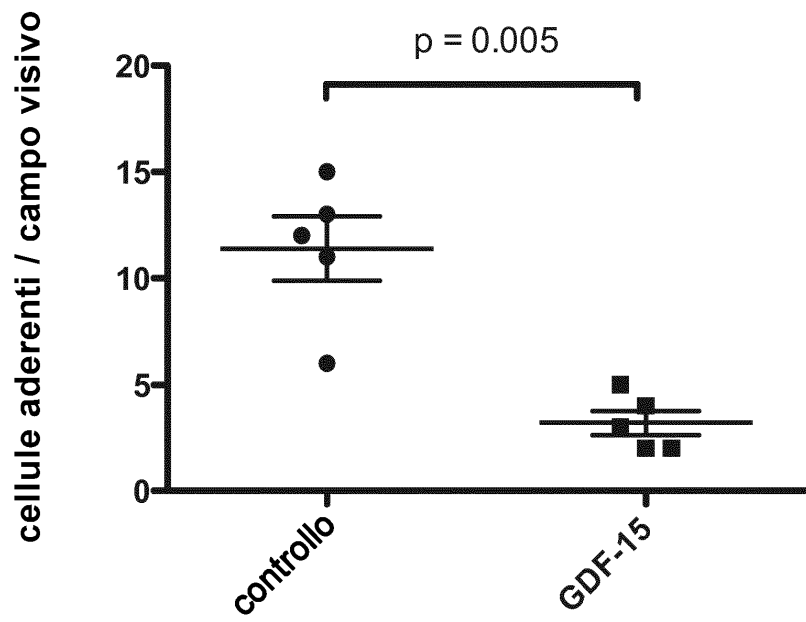
12/21

Figura 9, segue

B)



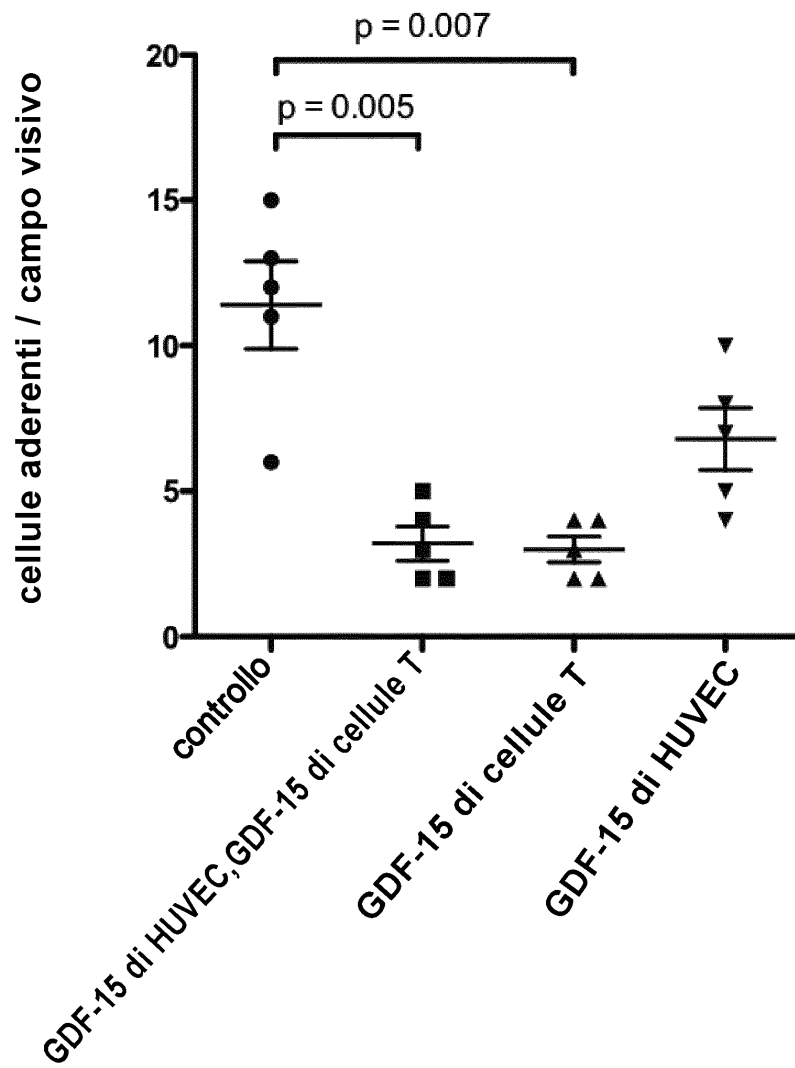
C)



13/21

Figura 9, segue

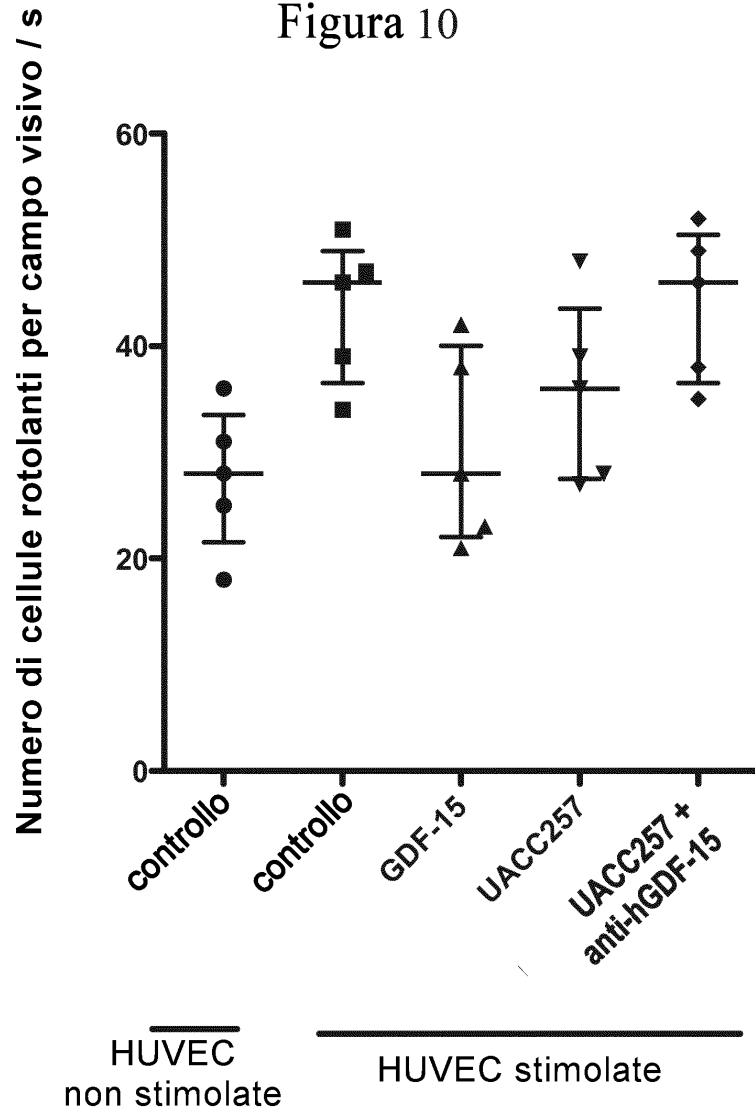
D)



14/21

Figura 10

A)

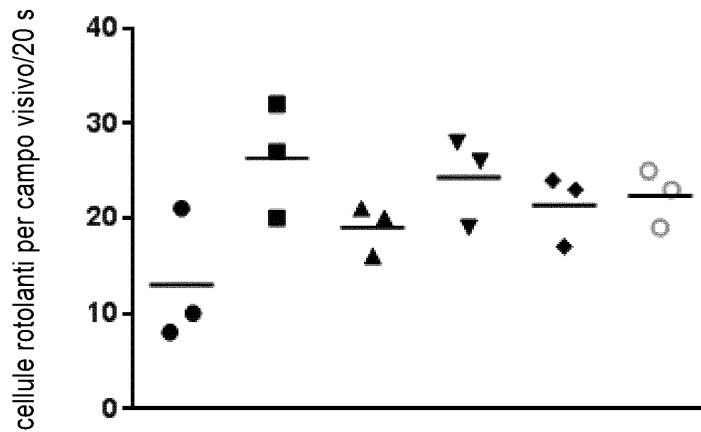


mediana con intervalli interquartile

15/21

Figura 10, segue

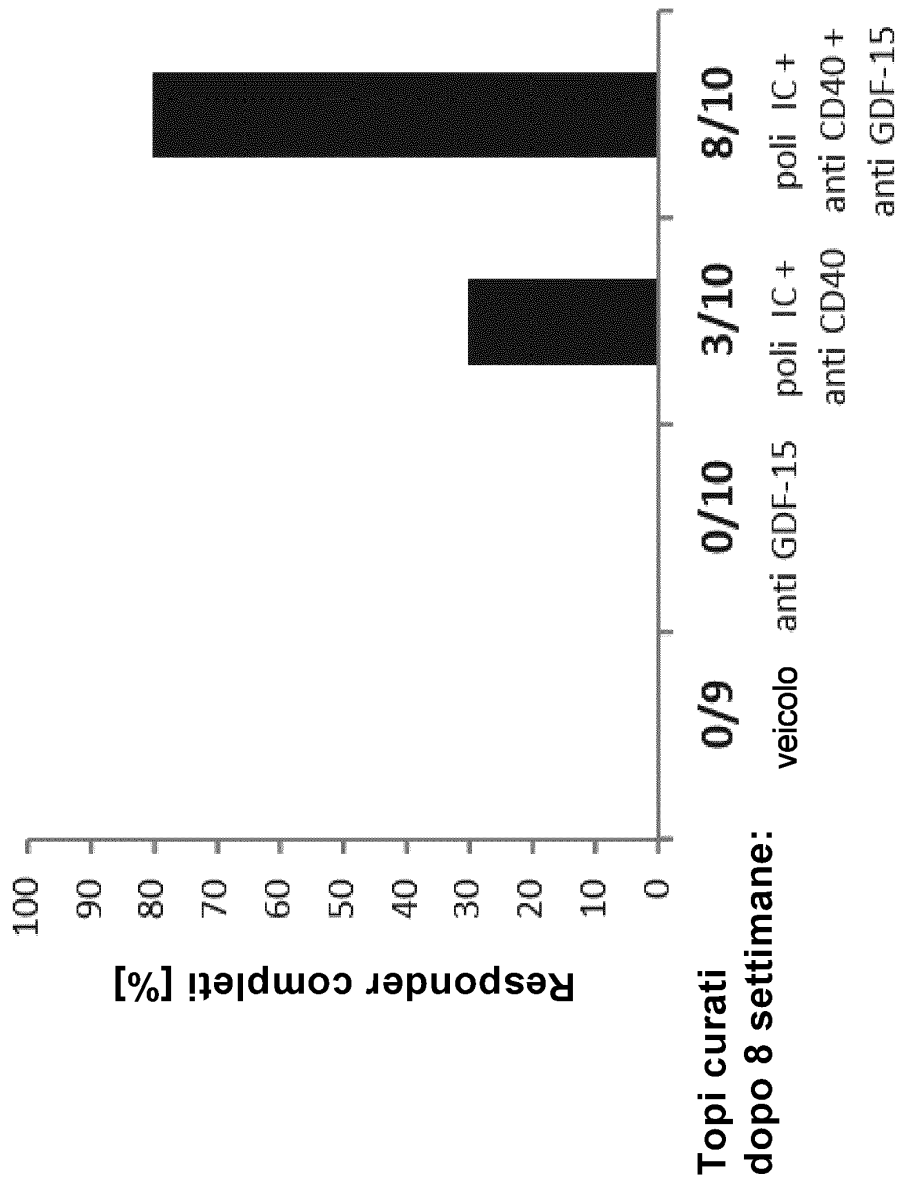
B)



Stimolazione con TNF- $\alpha$ di HUVECs:	senza	+	+	+	+	+
Preincubazione di cellule T con GDF-15:	senza	senza	+	+	+	+
Preincubazione di GDF-15 con anticorpo:	senza	senza	senza	+	+	+
	Anticorpo:			H1 L5	01 G06	03 G05

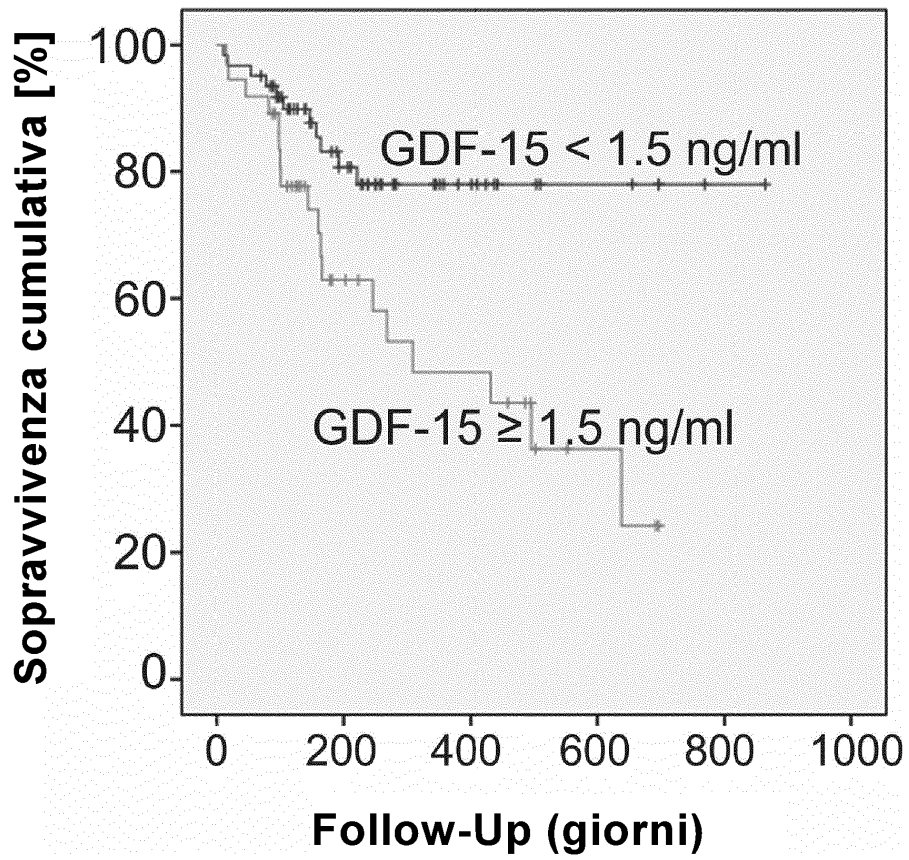
16/21

Figura 11



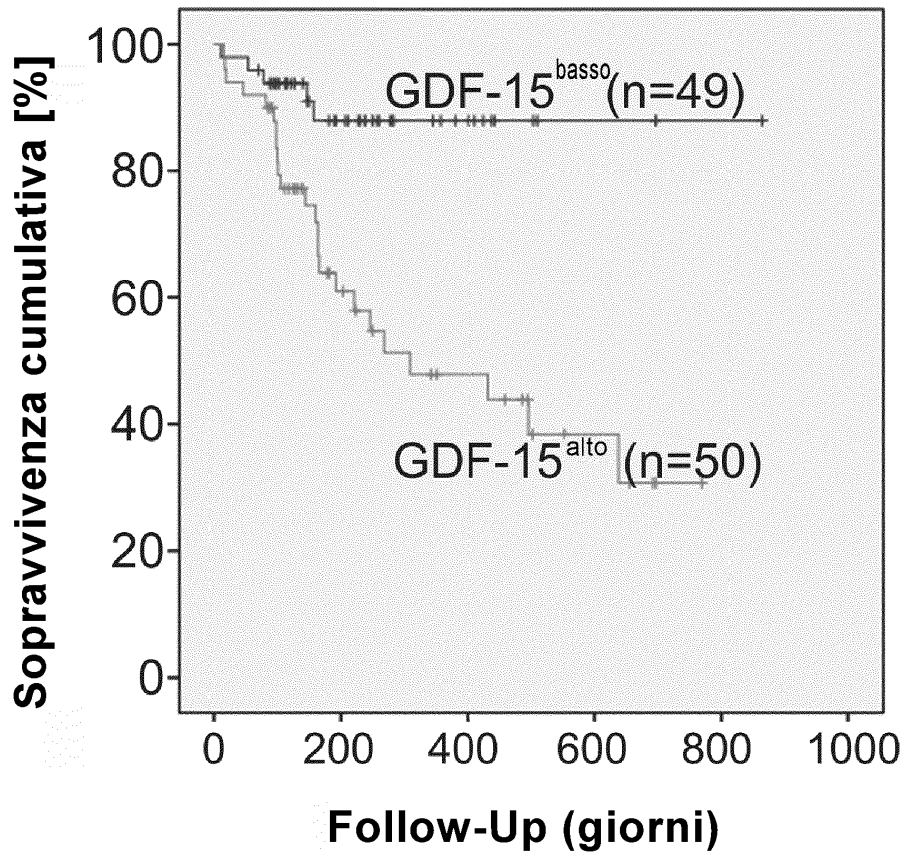
17/21

Figura 12



18/21

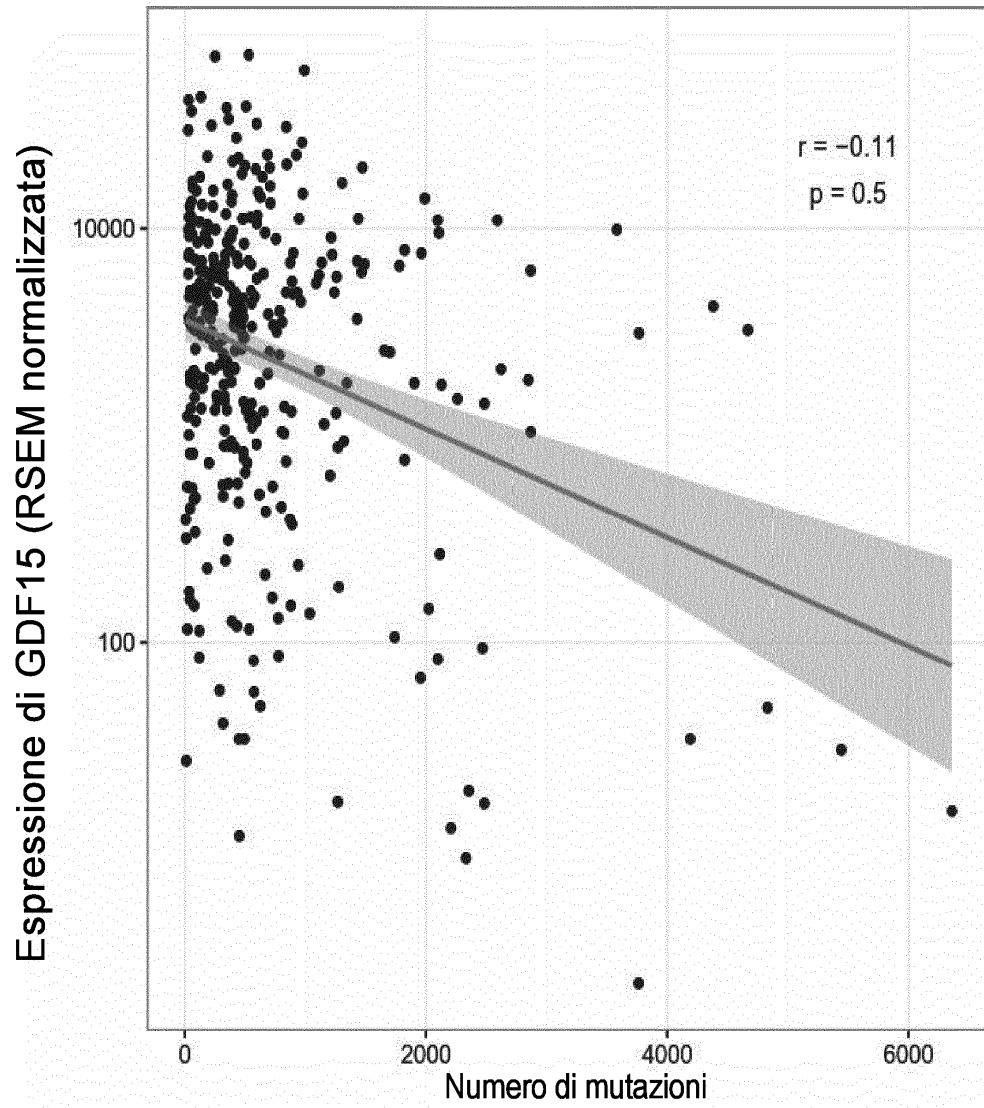
Figura 13



19/21

Figura 14

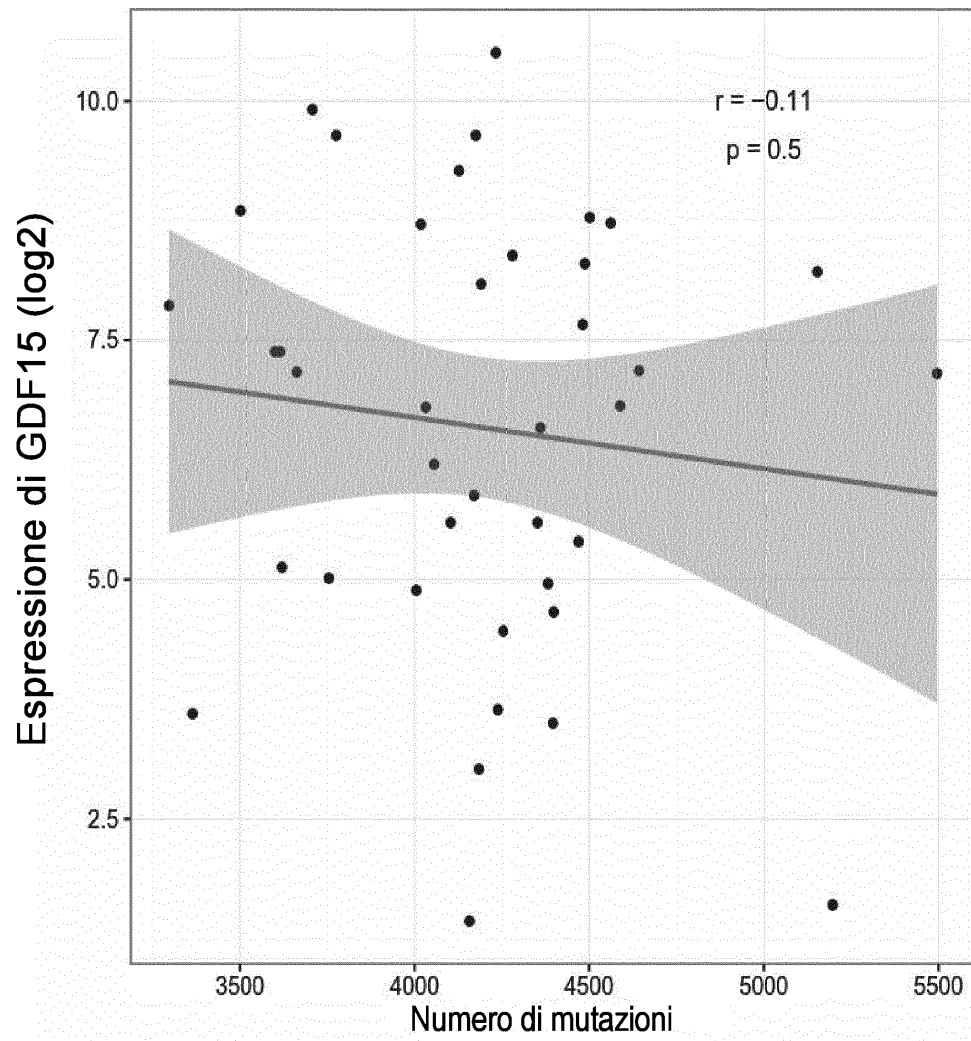
A)



20/21

Figura 14, segue

B)



21/21

Figura 15

