

Brevetto europeo No. 3508502

Domanda di brevetto europeo No. 18209399.7

Data di deposito: 18 settembre 2014

Classificazione IPC: C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00

5 Classificazione CPC: C07K16/2818 (EP,IL,KR,US); C07K16/2803 (EP,IL,KR,US); A61P35/00 (EP,IL,KR,US);  
A61K2039/505 (EP,IL,KR,US); A61K2039/507 (EP,IL,KR,US); A61K2039/54 (IL,US); (+)

Priorità: Statunitense No. 201361880606P del 20 settembre 2013

Statunitense No. 201462014471P del 19 giugno 2014

10 Titolo: COMBINAZIONE DI ANTICORPI ANTI-LAG-3 E ANTICORPI ANTI-PD-1 PER IL TRATTAMENTO DI  
TUMORI

Richiedente: Bristol-Myers Squibb Company  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543  
U.S.A.

15 Inventori: KORMAN, Alan J.  
LONBERG, Nils  
FONTANA, David J.  
GUTIERREZ, Andres A.  
SELBY, Mark J.  
20 LEWIS, Katherine E.

\*\*\*\*\*

Descrizione

CAMPO TECNICO

25 L'invenzione riguarda una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo  
anti-PD-1.

## SFONDO

Il gene attivante i linfociti-3 (LAG-3; CD223) è una proteina transmembrana di tipo I che viene espressa sulla superficie cellulare delle cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> attivate e di sottoinsiemi delle cellule NK e dendritiche (Triebel F et al., *J. Exp. Med.* 1990; 171:1393-1405; Workman C. J. et al., *J. Immunol.* 2009; 182(4):1885-91). LAG-3 è strettamente correlata a CD4, che è un co-recettore per l'attivazione delle cellule T helper. Entrambe le molecole hanno 4 domini extracellulari Ig-simili e, per diventare funzionalmente attive, devono legarsi al loro ligando, il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II. Al contrario di CD4, LAG-3 viene solamente espressa sulla superficie cellulare delle cellule T attivate, e il suo taglio dalla superficie cellulare termina la segnalazione di LAG-3. LAG-3 può essere anche trovata nella forma di una proteina solubile che, tuttavia, non si lega all'MHC di classe II e la cui funzione è sconosciuta.

È stato riportato che LAG-3 svolge un ruolo importante nel promuovere l'attività delle cellule T regolatorie (Treg) e nel regolare negativamente l'attivazione e la proliferazione delle cellule T (Workman C. J. et al., *J. Immunol.* 2005; 174:688-695). Sia le Treg naturali che quelle indotte esprimono un livello aumentato di LAG-3 che è necessario per massimizzare la loro funzione soppressiva (Camisaschi C. et al., *J. Immunol.* 2010; 184:6545-6551 e Huang C. T. et al., *Immunity.* 2004; 21:503-513). In aggiunta, l'espressione ectopica di LAG-3 sulle cellule T effettrici CD4<sup>+</sup> riduceva la loro capacità proliferativa e conferiva ad esse un potenziale di regolazione contro cellule T di terze parti (Huang C. T. et al., *Immunity.* 2004; 21:503-513). Studi recenti hanno anche mostrato che un'alta espressione di LAG-3 su cellule T CD8<sup>+</sup> virus della coriomeningite linfocitaria (LCMV)-specifiche esaurite contribuisce al loro stato non reattivo e limita le risposte antitumorali delle cellule T CD8<sup>+</sup> (Blackburn S. D. et al., *Nat. Immunol.* 2009; 10:29-37 e Grosso J. F. et al., *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3383-3392). Infatti, LAG-3 manteneva la tolleranza agli antigeni self e tumorali attraverso effetti diretti sulle cellule CD8<sup>+</sup> in 2 modelli murini (Grosso J. F. et al., *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3383-3392).

WO 2010/019570 descrive anticorpi monoclonali isolati che si legano specificatamente a LAG-3. WO 2014/008218 descrive anticorpi monoclonali isolati che si legano specificatamente a LAG-3.

Sembra tuttavia che l'immunosoppressione osservata nello scenario associato allo sviluppo e alla recidiva dei tumori venga mediata dalla co-espressione di vari recettori regolatori negativi delle cellule T, e non solo da LAG-3. I

dati ricavati da modelli di infezione virale cronica (Blackburn S. D. et al., *Nat. Immunol.* 2009; 10:29-37, Grosso J. F. et al., *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3383-3392, e Lyford-Pike S. et al., *Cancer Res.* 2013;73(6):1733-41), topi knockout (Woo S. R. et al., *Cancer Res.* 2012;72:917-927; Okazaki T. et al., *J. Exp Med.* 2011; 208:395-407, e Bettini M. et al., *J. Immunol.* 2011;187:3493-3498), modelli di recidiva tumorale (Goding S. R. et al., *J. Immunol.* 2013; 190(9):4899-4909) e, in misura più limitata, pazienti oncologici umani (Goding S. R. et al., *J. Immunol.* 2013; 190(9):4899-4909, Matsuzaki J. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA.* 2010;107:7875-7880, e Gandhi M. K. et al., *Blood.* 2006;108:2280-2289) supportano un modello in cui, quando continuamente esposte ad un antigene, le cellule T si inattivano progressivamente attraverso un processo denominato "esaurimento". Le cellule T esaurite sono caratterizzate dall'espressione di recettori regolatori negativi della cellule T, prevalentemente CTLA-4, PD-1 e LAG-3, la cui azione è limitare la capacità della cellula di proliferare, produrre citochine e uccidere le cellule bersaglio e/o aumentare l'attività Treg. Tuttavia, la tempistica e la sequenza di espressione di queste molecole nello sviluppo e nella recidiva dei tumori non sono state completamente caratterizzate.

La morte cellulare programmata 1 (PD-1) è un recettore di segnalazione di superficie cellulare che svolge un ruolo cruciale nella regolazione dell'attivazione e della tolleranza delle cellule T (Keir M. E. et al., *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26:677-704). Trattasi di una proteina transmembrana di tipo I che, insieme a BTLA, CTLA-4, ICOS e CD28, costituisce la famiglia CD28 di recettori costimolatori delle cellule T. PD-1 viene principalmente espressa sulle cellule B, cellule T e cellule mieloidi attivate (Dong H. et al., *Nat. Med.* 1999; 5:1365-1369). Essa viene anche espressa sulle cellule natural killer (NK) (Terme M. et al., *Cancer Res.* 2011; 71:5393-5399). Il legame di PD-1 con i suoi ligandi, PD-L1 e PD-L2, dà luogo alla fosforilazione del residuo di tirosina nel dominio inibitore a base di tirosina degli immunorecettori, che è il dominio intracellulare prossimale, tale fosforilazione essendo seguita dal reclutamento della fosfatasi SHP-2 che, infine, induce una sottoregolazione dell'attivazione delle cellule T. Un ruolo importante di PD-1 è limitare l'attività delle cellule T nei tessuti periferici al momento di una risposta infiammatoria ad un'infezione, limitando così lo sviluppo dell'autoimmunità (Pardoll D. M., *Nat. Rev. Cancer* 2012; 12:252-264). L'evidenza di questo ruolo regolatorio negativo scaturisce dalla scoperta che i topi con deficit di PD-1 sviluppano malattie autoimmuni lupus-simili, tra cui artrite e nefrite, insieme a cardiomiopatia (Nishimura H. et al., *Immunity*, 1999; 11:141-151; e

5 Nishimura H. et al., Science, 2001; 291:319-322). Nello scenario associato ai tumori, la conseguenza è lo sviluppo di un'immunosoppressione all'interno del microambiente tumorale. PD-1 viene altamente espressa sui linfociti infiltranti il tumore, e i suoi ligandi vengono sovraregolati sulla superficie cellulare di molti tumori differenti (Dong H. et al., Nat. Med. 2002; 8:793-800). Molteplici modelli murini di cancro hanno dimostrato che il legame di un ligando a PD-1 è causa di immunoevasione. In aggiunta, il blocco di questa interazione dà luogo ad un'attività antitumorale (Topalian S. L. et al., NEJM 2012; 366(26):2443-2454; Hamid O. et al., NEJM 2013; 369:134-144). Inoltre, è stato mostrato che l'inibizione dell'interazione PD-1/PD-L1 media una potente attività antitumorale in modelli preclinici (brevetti US 8.008.449 e US 7.943.743). Agrawal S, et al., Journal of Clinical Oncology, 2012; 30:15\_suppl, TPS2622-TPS2622, descrivono dati di farmacocinetica (PK) clinica per BMS-936558, che è un anticorpo monoclonale anti-PD-1  
10 completamente umano.

WO 2010/019570 descrive la somministrazione di una combinazione di un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1 in un modello di cancro in vivo.

15 I pazienti con tumori solidi metastatici o refrattari hanno una prognosi molto sfavorevole (Rosenberg S. A. et al., Cancer immunotherapy in Cancer: Principles & Practice of Oncology (redattori DeVita V. T., Lawrence T. S. e Rosenberg S. A.) 2011; 332-344 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)). Nonostante i progressi nella terapia multimodale, la sopravvivenza globale in questa popolazione di pazienti è aumentata in misura limitata. Di conseguenza, uno scopo della presente invenzione è fornire metodi migliorati per trattare soggetti con tali tumori (ad esempio tumori solidi refrattari avanzati).

#### RIEPILOGO

20 L'invenzione è come definita nelle rivendicazioni allegate. Essa riguarda una composizione farmaceutica comprendente un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1, in cui la composizione farmaceutica comprende un trasportatore farmaceuticamente accettabile, 80 mg di un anticorpo anti-LAG-3, e 240 mg di un anticorpo anti-PD-1; in cui l'anticorpo anti-PD-1 comprende regioni variabili di catena pesante e catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:19 e 21; e l'anticorpo anti-LAG-3 comprende regioni variabili di catena pesante e catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:3 e 5.  
25

La composizione farmaceutica dell'invenzione è utile in metodi di trattamento di tumori in un paziente umano, in particolare tumori solidi (ad esempio tumori solidi refrattari avanzati), che prevedono di somministrare una combinazione di un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1 al paziente, in cui la combinazione viene somministrata (o è per la somministrazione) secondo un regime di dosaggio clinico particolare (ovvero in una particolare quantità di dose e secondo uno specifico programma di dosaggio). In una forma esecutiva, il paziente umano è affetto da melanoma, cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC), cancro virus-correlato, cancro di testa e collo (HNC) o adenocarcinoma gastrico.

Un anticorpo anti-LAG-3 esemplificativo è BMS-986016, che comprende una catena pesante e una catena leggera rispettivamente comprendenti le sequenze mostrate in SEQ ID NO:1 e 2, o suoi frammenti leganti l'antigene e sue varianti. L'anticorpo anti-LAG-3 della composizione farmaceutica comprende le regioni variabili (VR) di catena pesante e catena leggera di BMS-986016. Di conseguenza, l'anticorpo comprende la regione variabile di catena pesante (VH) di BMS-986016 avente la sequenza mostrata in SEQ ID NO:3, e la regione variabile di catena leggera (VL) di BMS-986016 avente la sequenza mostrata in SEQ ID NO:5. Di conseguenza, l'anticorpo comprende le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di catena pesante rispettivamente riportate in SEQ ID NO:7, 8, e 9, e le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di catena leggera rispettivamente riportate in SEQ ID NO:10, 11 e 12. L'anticorpo ha regioni VH e VL comprendenti le sequenze di amminoacidi rispettivamente riportate in SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:5. Le regioni VH e/o VL dell'anticorpo potranno essere codificate dalle sequenze di acido nucleico rispettivamente riportate in SEQ ID NO:4 e/o SEQ ID NO:6. L'anticorpo potrà competere per il legame con gli anticorpi citati sopra, e/o potrà legarsi allo stesso epitopo su LAG-3 a cui si legano gli anticorpi citati sopra.

Un anticorpo anti-PD-1 esemplificativo è Nivolumab (anche identificato come "5C4" in WO 2006/121168; e noto come BMS-936558, MDX-1106 e ONO-4538), che comprende una catena pesante e una catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:17 e 18, o suoi frammenti leganti l'antigene e sue varianti. L'anticorpo della composizione farmaceutica comprende le VR di catena pesante e catena leggera di BMS-936558. Di conseguenza, l'anticorpo comprende la regione VH di BMS-936558 avente la sequenza mostrata in SEQ ID NO:19, e la regione VL di BMS-936558 avente la sequenza mostrata in SEQ ID NO:21. Di conseguenza, l'anticorpo

comprende i domini CDR1, CDR2 e CDR3 di catena pesante comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:23, 24, e 25, e i domini CDR1, CDR2 e CDR3 di catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:26, 27 e 28. In un'altra forma esecutiva, l'anticorpo comprende regioni VH e VL comprendenti le sequenze di amminoacidi rispettivamente riportate in SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:21. La regione variabile di catena pesante (VH) e/o la regione variabile di catena leggera (VL) dell'anticorpo potranno essere codificate dalle sequenze di acido nucleico rispettivamente riportate in SEQ ID NO:20 e/o SEQ ID NO:22. L'anticorpo potrà competere per il legame con gli anticorpi citati sopra, e/o potrà legarsi allo stesso epitopo su PD-1 a cui si legano gli anticorpi citati sopra.

Di conseguenza, la composizione farmaceutica dell'invenzione potrà essere usata in metodi di trattamento di tumori solidi (ad esempio tumori solidi refrattari avanzati) in un paziente umano, i metodi prevedendo di somministrare al paziente una quantità efficace di ciascuno di:

- (a) un anticorpo anti-LAG-3 comprendente la regione variabile di catena pesante avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:3 e la regione variabile di catena leggera avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:5,
- (b) un anticorpo anti-PD-1 comprendente la regione variabile di catena pesante avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:19 e la regione variabile di catena leggera avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:21,

in cui il metodo comprende almeno un ciclo di somministrazione, in cui il ciclo è un periodo di otto settimane, in cui, per ciascuno dei cicli che sono almeno uno, vengono somministrate quattro dosi dell'anticorpo anti-LAG-3 ad una dose di 80 mg, e vengono somministrate quattro dosi dell'anticorpo anti-PD-1 ad una dose di 240 mg. Le quattro dosi dell'anticorpo anti-LAG-3 potranno essere somministrate ad una dose di circa 1 mg/kg di peso corporeo, e le quattro dosi dell'anticorpo anti-PD-1 potranno essere somministrate ad una dose di 3 mg/kg di peso corporeo.

Di conseguenza, la composizione farmaceutica potrà essere somministrata in maniera tale che l'anticorpo anti-LAG-3 e l'anticorpo anti-PD-1 vengano somministrati alle seguenti dosi:

80 mg di anticorpo anti-LAG-3 e 240 mg di anticorpo anti-PD-1.

In linea di principio, la composizione farmaceutica potrà essere somministrata in maniera tale che l'anticorpo anti-LAG-3 e l'anticorpo anti-PD-1 vengano somministrati alle seguenti dosi:

1 mg/kg di anticorpo anti-LAG-3 e 3 mg/kg di anticorpo anti-PD-1.

calcolando la dose dell'anticorpo anti-LAG-3 e/o dell'anticorpo anti-PD-1 in mg/kg di peso corporeo. Tuttavia, in una forma esecutiva, la dose dell'anticorpo anti-LAG-3 e/o dell'anticorpo anti-PD-1 è una dose flat-fissa. In un'altra forma esecutiva, i regimi di dosaggio sono regolati per fornire la risposta desiderata ottimale (ad esempio una risposta efficace).

La composizione farmaceutica potrà essere somministrata nei Giorni 1, 15, 29 e 43 di ciascun ciclo. Il trattamento potrà essere costituito da fino a 12 cicli.

La composizione farmaceutica potrà essere usata in metodi di trattamento in cui l'anticorpo anti-PD-1 e l'anticorpo anti-LAG-3 vengono somministrati come trattamento di prima linea (trattamento "frontale") (ad esempio come trattamento iniziale o primo trattamento) o come trattamento di seconda linea (ad esempio dopo un trattamento iniziale con lo stesso prodotto terapeutico o con un prodotto terapeutico differente, incluso dopo una recidiva e/o in caso di insuccesso del primo trattamento). Gli anticorpi anti-LAG-3 e anti-PD-1 possono essere somministrati ad un soggetto attraverso qualsiasi mezzo adatto. In una forma esecutiva, la composizione è formulata per la somministrazione endovenosa. Gli anticorpi vengono somministrati simultaneamente (ad esempio, sono formulati insieme in una singola formulazione).

L'efficacia dei metodi di trattamento può essere accertata usando qualsiasi mezzo adatto. Ad esempio, il trattamento produce almeno un effetto terapeutico selezionato dal gruppo costituito da una riduzione di grandezza di un tumore, una riduzione del numero di lesioni metastatiche nel tempo, una risposta completa, una risposta parziale, e una malattia stabile.

Vengono anche forniti kit che comprendono la composizione farmaceutica dell'invenzione contenente un anticorpo anti-LAG-3, come BMS-986016, un anticorpo anti-PD-1, come BMS-936558, e un trasportatore farmaceuticamente accettabile, che è adatta per l'uso nei metodi qui descritti. In una forma esecutiva, il kit comprende:

- (a) la composizione farmaceutica rivendicata; e
- (b) istruzioni per usare la composizione farmaceutica comprendente l'anticorpo anti-LAG-3 e l'anticorpo anti-PD-1 in un metodo dell'invenzione.

La composizione farmaceutica comprendente un anticorpo anti-LAG-3 comprendente la regione variabile di catena pesante avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:3 e la regione variabile di catena leggera avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:5, un anticorpo anti-PD-1 comprendente la regione variabile di catena pesante avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:19 e la regione variabile di catena leggera avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:21, e un trasportatore farmaceuticamente accettabile, potrà essere usata in almeno un ciclo di somministrazione, in cui, per ciascun ciclo, vengono somministrate quattro dosi dell'anticorpo anti-LAG-3 ad una dose di 80 mg e vengono somministrate quattro dosi dell'anticorpo anti-PD-1 ad una dose di 240 mg. Le quattro dosi dell'anticorpo anti-LAG-3 potranno essere somministrate ad una dose di 1 mg/kg di peso corporeo, e le quattro dosi dell'anticorpo anti-PD-1 potranno essere somministrate ad una dose di 3 mg/kg di peso corporeo.

#### 10 BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La Figura 1 mostra l'inibizione della crescita di un tumore in vivo usando un trattamento di combinazione con un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1 in un modello tumorale murino.

Le Figure 2A e 2B sono schemi che illustrano le parti di una prova clinica di fase I.

15 La Figura 3 è uno schema che illustra le fasi di screening, trattamento, follow-up clinico e follow-up sulla sopravvivenza della prova clinica.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA

##### I. Definizioni

Nel presente contesto, i termini "soggetto" o "paziente" identificano un paziente oncologico umano (ad esempio un paziente avente un tumore solido avanzato, come un tumore solido refrattario avanzato).

20 Nel presente contesto, un "trattamento efficace" identifica un trattamento che produce un effetto benefico, ad esempio l'attenuazione di almeno un sintomo di una malattia o un disturbo. Un effetto benefico può prendere la forma di un miglioramento rispetto al basale, ovvero un miglioramento rispetto ad una misurazione od osservazione effettuata prima di iniziare la terapia secondo il metodo. Un effetto benefico può anche assumere la forma di un arresto, un rallentamento, un ritardo o una stabilizzazione di una progressione deleteria di un marcatore di un tumore solido. Un  
25 trattamento efficace può identificare l'alleviamento di almeno un sintomo di un tumore solido. Ad esempio, tale

trattamento efficace può ridurre il dolore del paziente, ridurre la grandezza e/o il numero delle lesioni, ridurre o prevenire la metastatizzazione di un tumore, e/o rallentare la crescita di un tumore.

L'espressione "quantità efficace" identifica una quantità di un agente che fornisce il risultato biologico, terapeutico e/o profilattico desiderato. Tale risultato può essere una riduzione, un'attenuazione, una palliazione, una diminuzione, un ritardo e/o un alleviamento di uno o più dei segni, dei sintomi o delle cause di una malattia, o qualsiasi altra alterazione desiderata di un sistema biologico. Con riferimento ai tumori solidi, una quantità efficace comprende una quantità sufficiente a causare il restringimento di un tumore e/o a ridurre la velocità di crescita del tumore (ad esempio a sopprimere la crescita del tumore) o a prevenire o ritardare un'altra proliferazione cellulare indesiderata. In alcune forme esecutive, una quantità efficace è una quantità sufficiente a ritardare lo sviluppo di un tumore. In alcune forme esecutive, una quantità efficace è una quantità sufficiente a prevenire o ritardare la recidiva di un tumore. Una quantità efficace può essere somministrata in una o più somministrazioni. La quantità efficace del farmaco o della composizione può: (i) ridurre il numero di cellule cancerose; (ii) ridurre la grandezza di un tumore; (iii) inibire, ritardare, rallentare in una certa misura e possibilmente arrestare l'infiltrazione di cellule cancerose in organi periferici; (iv) inibire (ovvero rallentare in una certa misura e possibilmente arrestare) la metastatizzazione di un tumore; (v) inibire la crescita di un tumore; (vi) prevenire o ritardare l'insorgenza e/o la recidiva di un tumore; e/o (vii) attenuare in una certa misura uno o più dei sintomi associati ad un cancro. In un esempio, una "quantità efficace" è la quantità di anticorpo anti-LAG-3 e la quantità di anticorpo anti-PD-1 che, in combinazione, si dimostrano clinicamente in grado di ridurre significativamente un cancro o rallentare significativamente la progressione di un cancro, come un tumore solido avanzato. Nel presente contesto, le espressioni "dose fissa", "dose flat" e "dose flat-fissa" vengono usate in modo intercambiabile, e identificano una dose che viene somministrata ad un paziente a prescindere dal suo peso o dalla sua area di superficie corporea (BSA). La dose fissa o flat non viene dunque fornita come una dose in mg/kg ma, piuttosto, come una quantità assoluta dell'agente (ad esempio dell'anticorpo anti-LAG-3 e/o dell'anticorpo anti-PD-1).

Nel presente contesto, una "dose basata sull'area di superficie corporea (BSA)" identifica una dose (ad esempio dell'anticorpo anti-LAG-3 e/o dell'anticorpo anti-PD-1) che è regolata in base all'area di superficie corporea (BSA) del singolo paziente. Una dose basata sulla BSA può essere espressa in mg/kg di peso corporeo. Sono stati pubblicati vari

calcoli per arrivare alla BSA senza eseguire una misurazione diretta e, tra essi, quello più utilizzato è rappresentato dalla formula di DuBois (vedere Du Bois D., Du Bois E. F. (giugno 1916) Archives of Internal Medicine 17 (6): 863-71; e Verbraecken J. et al. (aprile 2006). Metabolism - Clinical and Experimental 55 (4): 515-24). Altre formule esemplificative per la BSA comprendono la formula di Mosteller (Mosteller R. D., N. Engl. J. Med., 1987; 317:1098), la formula di Haycock (Haycock G. B. et al., J. Pediatr. 1978, 93:62-66), la formula di Gehan e George (Gehan E. A., George S. L., Cancer Chemother. Rep. 1970, 54:225-235), la formula di Boyd (Current J. D. (1998), The Internet Journal of Anesthesiology 2 (2); e Boyd, Edith (1935), University of Minnesota. The Institute of Child Welfare, Monograph Series, No. x. London: Oxford University Press), la formula di Fujimoto (Fujimoto S. et al., Nippon Eiseigaku Zasshi 1968; 5:443-50), la formula di Takahira (Fujimoto S. et al., Nippon Eiseigaku Zasshi 1968; 5:443-50), e la formula di Schlich (Schlich E. et al., Ernährungs Umschau 2010; 57:178-183).

Il termine "anticorpo" descrive polipeptidi che comprendono almeno un sito legante l'antigene di derivazione anticorpale (ad esempio una regione VH/VL, un Fv o una CDR). Gli anticorpi comprendono forme note di anticorpi. Ad esempio, l'anticorpo può essere un anticorpo umano, un anticorpo umanizzato, un anticorpo bispecifico o un anticorpo chimerico. L'anticorpo può anche essere un Fab, un Fab'2, un ScFv, uno SMIP, un Affibody®, un nanocorpo o un anticorpo a dominio. L'anticorpo può anche essere di uno qualsiasi dei seguenti isotipi: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. L'anticorpo può essere un anticorpo esistente in natura o può essere un anticorpo che è stato alterato (ad esempio per mutazione, delezione, sostituzione, coniugazione ad una porzione non anticorpale). Ad esempio, un anticorpo può comprendere uno o più amminoacidi varianti (rispetto ad un anticorpo esistente in natura) che alterano una proprietà (ad esempio una proprietà funzionale) dell'anticorpo. A titolo esemplificativo, nel ramo sono note numerose di tali alterazioni che, ad esempio, influenzano l'emivita, la funzione effettrice e/o le risposte immunitarie all'anticorpo in un paziente. Il termine anticorpo comprende anche costrutti polipeptidici artificiali che comprendono almeno un sito legante l'antigene di derivazione anticorpale.

Il termine "LAG-3" identifica il gene attivante i linfociti-3. Il termine "LAG-3" comprende varianti, isoforme, omologhi, ortologhi e paraloghi. Ad esempio, gli anticorpi specifici per una proteina LAG-3 umana possono in alcuni casi cross-reagire con una proteina LAG-3 di una specie diversa da quella umana. In altre forme esecutive, gli anticorpi

specifici per una proteina LAG-3 umana possono essere completamente specifici per la proteina LAG-3 umana senza mostrare cross-reattività di specie o altri tipi di cross-reattività, o possono cross-reagire con le LAG-3 di certe altre specie ma non con quelle di tutte le altre specie (ad esempio, possono cross-reagire con la LAG-3 di scimmia ma non con la LAG-3 di topo). Il termine "LAG-3 umana" identifica una LAG-3 di sequenza umana, come la sequenza di amminoacidi completa della LAG-3 umana con n° d'ingresso GenBank NP\_002277 (SEQ ID NO:13). Il termine "LAG-3 murina" identifica una LAG-3 di sequenza murina, come la sequenza di amminoacidi completa della LAG-3 murina con n° d'ingresso GenBank NP\_032505. La LAG-3 è anche nota nel ramo come, ad esempio, CD223. Benché la sequenza di una LAG-3 umana possa divergere dalla LAG-3 umana con n° d'ingresso GenBank NP\_002277, ad esempio a causa della presenza di mutazioni conservate o mutazioni in regioni non conservate, la LAG-3 avrà sostanzialmente la stessa funzione biologica della LAG-3 umana con n° d'ingresso GenBank NP\_002277. Ad esempio, una funzione biologica di una LAG-3 umana è il fatto di possedere un epitopo nel dominio extracellulare della LAG-3 che viene specificatamente legato da un anticorpo della presente divulgazione, o una funzione biologica di una LAG-3 umana è la capacità di legarsi alle molecole MHC di classe II.

Il termine "LAG-3 di scimmia" intende abbracciare le proteine LAG-3 espresse dalle scimmie del Vecchio Mondo e del Nuovo Mondo tra cui, ma senza limitazioni, le LAG-3 di scimmia cynomolgus e le LAG-3 di scimmia rhesus. Una sequenza di amminoacidi rappresentativa delle LAG-3 di scimmia è la sequenza di amminoacidi della LAG-3 di scimmia rhesus che è anche depositata con il n° d'ingresso GenBank XM\_001108923. Un'altra sequenza di amminoacidi rappresentativa delle LAG-3 di scimmia è la sequenza alternativa del clone pa23-5 di scimmia rhesus che è descritta in US 2011/0150892 A1. Questa sequenza di rhesus alternativa mostra una singola differenza di amminoacido, nella posizione 419, rispetto alla sequenza depositata in GenBank.

La sequenza di una LAG-3 umana particolare sarà generalmente una sequenza di amminoacidi almeno 90% identica a quella della LAG-3 umana con n° d'ingresso GenBank NP\_002277, e conterrà residui di amminoacido che identificheranno la sequenza di amminoacidi come umana quando confrontata con le sequenze di amminoacidi delle LAG-3 di altre specie (ad esempio quella murina). In certi casi, una LAG-3 umana può avere una sequenza di amminoacidi con un'identità di almeno 95%, o addirittura di almeno 96%, 97%, 98% o 99%, con quella della LAG-3

con n° d'ingresso GenBank NP\_002277. In certe forme esecutive, la sequenza di una LAG-3 umana mostrerà non più di 10 differenze di amminoacido rispetto alla sequenza della LAG-3 con n° d'ingresso GenBank NP\_002277. In certe forme esecutive, la LAG-3 umana può mostrare non più di 5, o addirittura non più di 4, 3, 2 o 1 differenza di amminoacido rispetto alla sequenza della LAG-3 con n° d'ingresso GenBank NP\_002277. La percentuale di identità può essere determinata come qui descritto.

Nel presente contesto, i termini "morte programmata 1", "morte cellulare programmata 1", "proteina PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" e "hPD-I" vengono usati in modo intercambiabile, e comprendono varianti, isoforme, omologhi di specie della PD-1 umana, e analoghi aventi almeno un epitopo in comune con PD-1. La sequenza completa di PD-1 può essere trovata al n° d'ingresso GenBank U64863 (SEQ ID NO:29).

La proteina morte programmata 1 (PD-1) è un membro inibitorio della famiglia di recettori CD28 che annovera anche CD28, CTLA-4, ICOS e BTLA. PD-1 viene espressa sulle cellule B, cellule T e cellule mieloidi attivate (Agata et al., sopra; Okazaki et al. (2002), *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett et al. (2003), *J. Immunol.* 170:711-8). I membri iniziali della famiglia, CD28 e ICOS, sono stati scoperti in base ai loro effetti funzionali di promozione della proliferazione delle cellule T dopo l'aggiunta di anticorpi monoclonali (Hutloff et al., *Nature* (1999); 397:263-266; Hansen et al., *Immunogenics* (1980); 10:247-260). PD-1 è stata scoperta attraverso lo screening dell'espressione differenziale nelle cellule apoptotiche (Ishida et al., *EMBO J.* (1992); 11:3887-95). Gli altri membri della famiglia, CTLA-4 e BTLA, sono stati rispettivamente scoperti attraverso lo screening dell'espressione differenziale nei linfociti T citotossici e nelle cellule TH1. CD28, ICOS e CTLA-4 hanno tutti un residuo di cisteina spaiato che ne permette l'omodimerizzazione. Viceversa, è presumibile che PD-1 esista in forma di monomero, essendo priva del residuo di cisteina spaiato che è caratteristico di altri membri della famiglia CD28.

Il gene PD-1 codifica per una proteina transmembrana di tipo I di 55 kDa e appartiene alla superfamiglia dei geni Ig (Agata et al. (1996), *Int. Immunol.* 8:765-72). PD-1 contiene un motivo inibitorio a base di tirosina degli immunorecettori (ITIM) che si trova prossimale alla membrana, e un motivo interruttore a base di tirosina degli immunorecettori (ITSM) che si trova distale alla membrana (Thomas M. L. (1995), *J. Exp. Med.* 181:1953-6; Vivier E. e Daeron M. (1997), *Immunol. Today* 18:286-91). Benché strutturalmente simile a CTLA-4, PD-1 è priva del motivo

MYPPPY che è fondamentale per il legame a B7-1 e B7-2. Sono stati identificati due ligandi per PD-1, PD-L1 e PD-L2, che si sono dimostrati in grado di sottoregolare l'attivazione delle cellule T quando legati a PD-1 (Freeman et al. (2000), *J. Exp. Med.* 192:1027-34; Latchman et al. (2001), *Nat. Immunol.* 2:261-8; Carter et al. (2002), *Eur. J. Immunol.* 32:634-43). Sia PD-L1 che PD-L2 sono omologhi di B7 che si legano a PD-1 senza tuttavia legarsi ad altri membri della famiglia CD28. PD-L1 è abbondante in una varietà di tumori umani (Dong et al. (2002), *Nat. Med.* 8:787-9). L'interazione tra PD-1 e PD-L1 è causa di diminuzione dei linfociti infiltranti il tumore, diminuzione della proliferazione mediata dai recettori per le cellule T, e immunoevasione delle cellule cancerose (Dong et al. (2003), *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005), *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004), *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). La soppressione immunitaria può essere invertita inibendo l'interazione locale tra PD-1 e PD-L1, e l'effetto è additivo in caso di blocco concomitante dell'interazione tra PD-1 e PD-L2 (Iwai et al. (2002), *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown et al. (2003), *J. Immunol.* 170:1257-66).

Coerentemente con il fatto che PD-1 è un membro inibitorio della famiglia CD28, gli animali con deficit di PD-1 sviluppano vari fenotipi autoimmuni, tra cui cardiomiopatia autoimmune e sindrome lupus-simile con artrite e nefrite (Nishimura et al. (1999), *Immunity* 11:141-51; Nishimura et al. (2001), *Science* 291:319-22). In aggiunta, è stato riscontrato che PD-1 svolge un ruolo in encefalomielite autoimmune, lupus eritematoso sistemico, malattia dell'innesto contro l'ospite (GVHD), diabete di tipo I e artrite reumatoide (Salama et al. (2003), *J. Exp. Med.* 198:71-78; Prokunina e Alarcon-Riquelme (2004), *Hum. Mol. Genet.* 13:R143; Nielsen et al. (2004), *Lupus* 13:510). In una linea tumorale a cellule B murina, è stato scoperto che il motivo ITSM di PD-1 è essenziale per bloccare il flusso BCR-mediato di  $Ca^{2+}$  e la fosforilazione delle tirosine nelle molecole effettrici a valle (Okazaki et al. (2001), *PNAS* 98:13866-71).

Il "ligando della morte programmata-1 (PD-L1)" è uno di due ligandi glicoproteici di superficie cellulare per PD-1 (l'altro essendo PD-L2) che sottoregolano l'attivazione delle cellule T e la secrezione delle citochine quando legati a PD-1. Nel presente contesto, il termine "PD-L1" comprende la PD-L1 umana (hPD-L1), varianti, isoforme e omologhi di specie di hPD-L1, e 5 analoghi aventi almeno un epitopo in comune con hPD-L1. La sequenza completa di hPD-L1 può essere trovata al n° d'ingresso GenBank Q9NZQ7.

25 Iia. Anticorpi anti-LAG-3

Gli anticorpi anti-LAG-3 umana (o i domini VH/VL da essi derivati) possono essere generati usando metodi ben noti nel ramo. Gli anticorpi anti-LAG-3 riconosciuti nel ramo comprendono, ad esempio, l'anticorpo anti-LAG-3 umana descritto in US2011/0150892 A1 e identificato come anticorpo monoclonale 25F7 (anche noto come "25F7" e "LAG3.1"), e IMP731, descritto in US 2011/007023.

5 Un anticorpo anti-LAG-3 esemplificativo che può essere incluso nella composizione farmaceutica secondo l'invenzione è BMS-986016, che comprende una catena pesante e una catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:1 e 2, o suoi frammenti leganti l'antigene e sue varianti, come descritto in PCT/US13/48999.

10 L'anticorpo anti-LAG-3 ha le regioni variabili di catena pesante e catena leggera di BMS-986016. Di conseguenza, l'anticorpo comprende la regione VH di BMS-986016 avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:3, e la regione VL di BMS-986016 avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:5. Di conseguenza, l'anticorpo comprende i domini CDR1, CDR2 e CDR3 comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:7, 8, e 9, e i domini CDR1, CDR2 e CDR3 comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:10, 11 e 12. L'anticorpo comprende regioni VH e VL comprendenti le sequenze di amminoacidi rispettivamente riportate in SEQ ID NO:3 e  
15 SEQ ID NO:5. La regione variabile di catena pesante (VH) e/o la regione variabile di catena leggera (VL) potranno essere codificate dalle sequenze di acido nucleico rispettivamente riportate in SEQ ID NO:4 e/o SEQ ID NO:6.

#### Iib. Anticorpi anti-PD-1

Gli anticorpi anti-PD-1 umana (o i domini VH e/o VL da essi derivati) possono essere generati usando metodi ben noti nel ramo. Gli anticorpi anti-PD-1 riconosciuti nel ramo comprendono, ad esempio, gli anticorpi monoclonali  
20 5C4 (qui identificato come Nivolumab o BMS-936558), 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 e 5F4, descritti in WO 2006/121168. Altri anticorpi noti per PD-1 comprendono Lambrolizumab (MK-3475), descritto in WO 2008/156712, e AMP-514, descritto in WO 2012/145493. Ulteriori anticorpi noti per PD-1 e altri inibitori di PD-1 comprendono quelli descritti in WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335 e WO 2011/161699.

Un anticorpo anti-PD-1 esemplificativo che può essere incluso nella composizione farmaceutica secondo l'invenzione è BMS-936558, che comprende una catena pesante e una catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente mostrate in SEQ ID NO:17 e 18, o suoi frammenti leganti l'antigene e sue varianti.

5 L'anticorpo anti-PD-1 ha le regioni variabili di BMS-936558. Di conseguenza, l'anticorpo comprende la VH di BMS-936558 avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:19, e la VL di BMS-936558 avente la sequenza riportata in SEQ ID NO:21. Di conseguenza, l'anticorpo comprende i domini CDR1, CDR2 e CDR3 comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:23, 24, e 25, e i domini CDR1, CDR2 e CDR3 comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:26, 27 e 28. L'anticorpo comprende regioni VH e VL comprendenti le sequenze di amminoacidi rispettivamente riportate in SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:21. La regione variabile di catena pesante (VH) e/o la regione variabile di catena leggera (VL) potranno essere codificate dalle sequenze di acido nucleico  
10 rispettivamente riportate in SEQ ID NO:20 e/o SEQ ID NO:22.

#### IIC. Anticorpi anti-PD-L1

Gli anticorpi anti-PD-L1 umano (o i domini VH e/o VL da essi derivati) possono essere generati usando metodi ben noti nel ramo. Gli anticorpi anti-PD-L1 riconosciuti nel ramo comprendono, ad esempio, gli anticorpi anti-  
15 PD-L1 umani divulgati nel brevetto US 7.943.743. Tali anticorpi anti-PD-L1 comprendono 3G10, 12A4 (anche identificato come BMS-936559), 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4. Altri anticorpi anti-PD-L1 riconosciuti nel ramo comprendono quelli descritti, ad esempio, nei brevetti US 7.635.757 e US 8.217.149, nella pubblicazione U.S. N° 2009/0317368, e nelle pubblicazioni PCT WO 2011/066389 e WO 2012/145493

#### III. Composizioni farmaceutiche

20 Le composizioni farmaceutiche adatte per la somministrazione a pazienti umani sono tipicamente formulate per la somministrazione parenterale, ad esempio in un trasportatore liquido, o sono adatte per la ricostituzione in una soluzione o sospensione liquida per la somministrazione endovenosa.

Tali composizioni comprendono un trasportatore farmaceuticamente accettabile. Nel presente contesto, l'espressione "farmaceuticamente accettabile" significa approvato da un'agenzia di regolamentazione governativa o  
25 elencato nella Farmacopea Statunitense o in altra farmacopea generalmente riconosciuta per l'uso negli animali, in

particolare negli umani. Il termine "trasportatore" identifica un diluente, adiuvante, eccipiente o veicolo con cui il composto viene somministrato. Tali trasportatori farmaceuticamente accettabili possono essere liquidi sterili, come acqua e oli, inclusi quelli di origine petrolifera, animale, vegetale o sintetica, come olio di arachidi, olio di soia, olio minerale, olio di sesamo, glicerolo polietilenglicole ricinoleato, e simili. Come trasportatori, in particolare per le soluzioni iniettabili, sarà possibile usare acqua, soluzione salina acquosa, destrosio acquoso, e soluzioni di glicerolo. Le composizioni liquide da somministrare per via parenterale possono essere formulate per la somministrazione per iniezione o infusione continua. Le vie di somministrazione per iniezione o infusione comprendono la via endovenosa, quella intraperitoneale, quella intramuscolare, quella intratecale e quella sottocutanea. In una forma esecutiva, la composizione farmaceutica dell'invenzione è adatta per la somministrazione endovenosa.

#### IV. Popolazioni di pazienti

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione potranno essere usate in metodi clinici di trattamento di tumori solidi (ad esempio tumori solidi refrattari avanzati) in pazienti umani usando una combinazione di un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1.

Esempi di cancro che potranno essere trattati usando le composizioni dell'invenzione comprendono cancro del fegato, cancro dell'osso, cancro del pancreas, cancro della pelle, cancro di testa o collo, cancro della mammella, cancro del polmone, melanoma maligno cutaneo o intraoculare, cancro del rene, cancro dell'utero, cancro dell'ovaio, cancro del colon-retto, cancro del colon, cancro del retto, cancro della regione anale, cancro dello stomaco, cancro del testicolo, cancro dell'utero, carcinoma della tuba di Falloppio, carcinoma dell'endometrio, carcinoma della cervice, carcinoma della vagina, carcinoma della vulva, linfoma non Hodgkin, cancro dell'esofago, cancro dell'intestino tenue, cancro del sistema endocrino, cancro della ghiandola tiroidea, cancro della ghiandola paratiroidea, cancro della ghiandola surrenale, sarcoma del tessuto molle, cancro dell'uretra, cancro del pene, tumori solidi dell'infanzia, linfoma linfocitario, cancro della vescica, cancro del rene o dell'uretere, carcinoma della pelvi renale, neoplasia del sistema nervoso centrale (SNC), linfoma del SNC primario, angiogenesi tumorale, tumore dell'asse spinale, glioma del tronco cerebrale, adenoma dell'ipofisi, sarcoma di Kaposi, cancro epidermoide, cancro a cellule squamose, cancro indotti dall'ambiente, tra cui quelli indotti dall'amianto, neoplasie maligne ematologiche tra cui, ad esempio, mieloma multiplo, linfoma a

5 cellule B, linfoma di Hodgkin/linfoma a cellule B del mediastino, linfomi non Hodgkin, linfoma mieloide acuto, leucemia mielogena cronica, leucemia linfoide cronica, linfoma follicolare, linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma di Burkitt, linfoma immunoblastico a grandi cellule, linfoma linfoblastico a precursori B, linfoma a cellule mantellari, leucemia linfoblastica acuta, micosi fungoide, linfoma anaplastico a grandi cellule, linfoma a cellule T, linfoma linfoblastico a precursori T, e qualsiasi combinazione di detti cancri. La presente invenzione è anche applicabile per l'uso nel trattamento di cancri metastatici.

10 Ad esempio, il paziente umano potrà essere affetto da cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC), cancro virus-correlato (ad esempio un tumore correlato al papilloma virus umano (HPV)) o adenocarcinoma gastrico. Il tumore correlato a HPV potrà essere un cancro di testa e collo (HNC) HPV+. L'adenocarcinoma gastrico potrà essere associato ad un'infezione da virus di Epstein-Barr (EBV).

I pazienti possono essere esaminati o selezionati per uno o più degli attributi clinici descritti sopra prima, durante o dopo il trattamento.

#### V. Terapia di combinazione

15 Qualsiasi riferimento a metodi di trattamento identifica le composizioni farmaceutiche della presente invenzione per l'uso in un metodo di trattamento del corpo umano (o animale) mediante terapia.

20 Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione potranno essere usate in terapie di combinazione qui fornite che prevedono di somministrare un anticorpo anti-LAG-3 e un altro anticorpo che blocca un recettore immunoinibitorio (ad esempio un recettore che, quando legato ad un suo ligando naturale, inibisce/neutralizza un'attività, come un'attività citotossica) e che è un anticorpo anti-PD-1, per trattare soggetti aventi tumori solidi (ad esempio tumori solidi refrattari avanzati).

Un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1 in combinazione in una composizione farmaceutica secondo l'invenzione potranno essere usati secondo un regime di dosaggio clinico definito nel trattamento di soggetti aventi un tumore solido (ad esempio un tumore solido refrattario avanzato). In una forma esecutiva particolare, l'anticorpo anti-LAG-3 è BMS-986016. In un'altra forma esecutiva, l'anticorpo anti-PD-1 è BMS-936558. In un'altra

forma esecutiva, i regimi di dosaggio sono regolati per fornire la risposta desiderata ottimale (ad esempio una risposta efficace).

Nel presente contesto, la somministrazione adiuvante o combinata (co-somministrazione) comprende la somministrazione simultanea dei composti nella stessa forma di dosaggio secondo l'invenzione. Segnatamente, gli anticorpi anti-LAG-3 e anti-PD-1 vengono somministrati simultaneamente in una singola formulazione.

#### VI. Protocolli di trattamento

La composizione farmaceutica secondo la presente invenzione potrà essere per l'uso in adatti protocolli di trattamento per trattare un tumore solido in un paziente umano che, ad esempio, prevedono di somministrare una quantità efficace della composizione dell'invenzione al paziente,

in cui il metodo comprende almeno un ciclo di somministrazione, in cui il ciclo è un periodo di otto settimane, in cui, per ciascuno dei cicli che sono almeno uno, vengono somministrate almeno quattro dosi dell'anticorpo anti-LAG-3 ad una dose flat di circa 50 o 80 mg, e vengono somministrate almeno quattro dosi dell'anticorpo anti-PD-1 ad una dose flat di 150 o 240 mg.

In un protocollo di trattamento, l'anticorpo anti-LAG-3 e l'anticorpo anti-PD-1 nella composizione vengono somministrati alle seguenti dosi:

80 mg di anticorpo anti-LAG-3 e 240 mg di anticorpo anti-PD-1.

In una forma esecutiva, la dose dell'anticorpo anti-LAG-3 e/o dell'anticorpo anti-PD-1 è una dose flat-fissa. In un'altra forma esecutiva, la dose dell'anticorpo anti-LAG-3 e/o dell'anticorpo anti-PD-1 varia nel tempo. Ad esempio, l'anticorpo anti-LAG-3 e l'anticorpo anti-PD-1 potranno essere inizialmente somministrati ad un'alta dose che potrà essere poi abbassata nel tempo. In un'altra forma esecutiva, l'anticorpo anti-LAG-3 e l'anticorpo anti-PD-1 vengono inizialmente somministrati ad una dose bassa che viene poi aumentata nel tempo.

In un'altra forma esecutiva, la quantità somministrata degli anticorpi anti-LAG-3 e anti-PD-1 è costante per ciascuna dose. In un'altra forma esecutiva, la quantità di anticorpo somministrata varia con ciascuna dose. Ad esempio, la dose di mantenimento (o di follow-on) dell'anticorpo può essere superiore o uguale alla dose di carico che viene

somministrata per prima. In un'altra forma esecutiva, la dose di mantenimento dell'anticorpo può essere inferiore o uguale alla dose di carico.

5 In un'altra forma esecutiva, la composizione farmaceutica dell'invenzione comprendente gli anticorpi anti-LAG-3 e anti-PD-1 è formulata per la somministrazione endovenosa. In una forma esecutiva, la composizione farmaceutica dell'invenzione comprendente l'anticorpo anti-PD-1 e l'anticorpo anti-LAG-3 viene somministrata nei Giorni 1, 15, 29 e 43 di ciascun ciclo.

In altre forme esecutive, gli anticorpi anti-LAG-3 e anti-PD-1 vengono somministrati una volta alla settimana, una volta ogni due o tre settimane, una volta al mese, o fino a osservare un beneficio clinico, o fino a ottenere una risposta completa, una malattia progressiva confermata, o una tossicità ingestibile.

10 In un'altra forma esecutiva, un ciclo di somministrazione, all'occorrenza ripetibile, dura otto settimane. In un'altra forma esecutiva, il trattamento è costituito da fino a 12 cicli.

In un'altra forma esecutiva, per ogni ciclo di otto settimane, vengono somministrate 4 dosi dell'anticorpo anti-PD-1 e dell'anticorpo anti-LAG-3.

15 In un'altra forma esecutiva, l'anticorpo anti-PD-1 e l'anticorpo anti-LAG-3 vengono somministrati come trattamento di prima linea (ad esempio come trattamento iniziale o primo trattamento). In un'altra forma esecutiva, l'anticorpo anti-PD-1 e l'anticorpo anti-LAG-3 vengono somministrati come trattamento di seconda linea (ad esempio dopo il trattamento iniziale o primo trattamento, incluso dopo una recidiva e/o in caso di insuccesso del primo trattamento).

#### VII. Esiti

20 Con riferimento alle lesioni bersaglio, le risposte alla terapia potranno comprendere:

Risposta completa (CR) (RECIST V1.1)	Scomparsa di tutte le lesioni bersaglio. Tutti i linfonodi patologici (siano essi bersaglio o non bersaglio) devono mostrare una riduzione nell'asse corto di < 10 mm.
--------------------------------------	--

Risposta parziale (PR) (RECIST V1.1)	Diminuzione di almeno 30% della somma dei diametri delle lesioni bersaglio prendendo come riferimento i diametri cumulativi al livello basale.
Malattia progressiva (PD) (RECIST V1.1)	Aumento di almeno 20% della somma dei diametri delle lesioni bersaglio prendendo come riferimento la somma più piccola durante lo studio (che comprende la somma al livello basale se essa è la più piccola durante lo studio). In aggiunta all'aumento relativo di 20%, la somma deve anche dimostrare un aumento assoluto di almeno 5 mm (nota: anche la comparsa di una o più nuove lesioni è considerata una progressione).
Malattia stabile (SD) (RECIST V1.1)	Restringimento insufficiente per raggiungere la qualifica di PR o aumento insufficiente per raggiungere la qualifica di PD prendendo come riferimento i diametri cumulativi più piccoli durante lo studio.
Risposta completa immunocorrelata (irCR) (irRECIST)	Scomparsa di tutte le lesioni bersaglio. Tutti i linfonodi patologici (siano essi bersaglio o non bersaglio) devono mostrare una riduzione nell'asse corto di < 10 mm.
Risposta parziale immunocorrelata (irPR) (irRECIST)	Diminuzione di almeno 30% della somma dei diametri delle lesioni bersaglio e di tutte le nuove lesioni misurabili (ovvero percentuale di variazione del carico tumorale) prendendo come riferimento i diametri cumulativi al livello basale. Nota: la comparsa di nuove lesioni misurabili viene tenuta in considerazione nel calcolo del carico tumorale generale, ma non ottiene automaticamente la qualifica di malattia progressiva fino a quando la somma dei diametri non aumenta di $\geq 20\%$ rispetto al nadir.

Malattia progressiva immunocorrelata (irPD) (irRECIST)	Aumento di almeno 20% del carico tumorale (ovvero la somma dei diametri delle lesioni bersaglio e di qualsiasi nuova lesione misurabile) prendendo come riferimento la somma più piccola durante lo studio (che comprende la somma al livello basale se essa è la più piccola durante lo studio). In aggiunta all'aumento relativo di 20%, la somma deve inoltre dimostrare un aumento assoluto di almeno 5 mm. Gli accertamenti dei tumori che sono basati su criteri immunocorrelati per la malattia progressiva tengono conto del contributo delle nuove lesioni misurabili. Ciascuna variazione percentuale netta del carico tumorale per ciascun accertamento tiene conto della grandezza e della cinetica di crescita sia delle lesioni vecchie che di quelle nuove man mano che esse appaiono.
Malattia stabile immunocorrelata (irSD) (irRECIST)	Restringimento insufficiente per raggiungere la qualifica di irPR o aumento insufficiente per raggiungere la qualifica di irPD prendendo come riferimento i diametri cumulativi più piccoli durante lo studio.

Con riferimento alle lesioni non bersaglio, le risposte alla terapia possono comprendere:

Risposta completa (CR) (RECIST V1.1)	Scomparsa di tutte le lesioni non bersaglio. Tutti i linfonodi devono avere una grandezza non patologica (asse corto <10 mm).
Non CR/non PD (RECIST V1.1)	Persistenza di una o più lesioni non bersaglio.
Malattia progressiva (PD) (RECIST V1.1)	Progressione inequivocabile delle lesioni non bersaglio esistenti. Anche la comparsa di una o più nuove lesioni è considerata una progressione.

Risposta completa immunocorrelata (irCR) (irRECIST)	Scomparsa di tutte le lesioni non bersaglio. Tutti i linfonodi devono avere una grandezza non patologica (asse corto <10 mm).
Malattia progressiva immunocorrelata (irPD) (irRECIST)	Gli aumenti della/delle lesioni non bersaglio in numero o grandezza non rappresentano una malattia progressiva a meno che il carico tumorale non aumenti di 20% (ovvero a meno che la somma dei diametri delle lesioni bersaglio al nadir e di qualsiasi nuova lesione misurabile non aumenti della percentuale richiesta) o fino a quando tale condizioni non si verifica. Le lesioni non bersaglio non vengono prese in considerazione nella definizione di malattia stabile e risposta parziale.

5 I pazienti trattati secondo i metodi qui divulgati sperimentano preferibilmente un miglioramento in almeno un segno di un cancro. In una forma esecutiva, il miglioramento viene misurato come una riduzione in quantità e/o grandezza delle lesioni tumorali misurabili. In un'altra forma esecutiva, le lesioni possono essere misurate su lastre radiografiche, CT o MRI del torace. In un'altra forma esecutiva, la responsività ad una terapia può essere valutata usando un approccio citologico o istologico.

10 In una forma esecutiva, il paziente trattato mostra una risposta completa (CR), una risposta parziale (PR), una malattia stabile (SD), una risposta completa immunocorrelata (irCR), una risposta parziale immunocorrelata (irPR) o una malattia stabile immunocorrelata (irSD). In un'altra forma esecutiva, il paziente trattato sperimenta un restringimento del tumore e/o una diminuzione della sua velocità di crescita, ovvero una soppressione della crescita del tumore. In un'altra forma esecutiva, la proliferazione cellulare indesiderata viene ridotta o inibita. In un'altra forma esecutiva ancora, è possibile ottenere uno o più dei seguenti eventi: è possibile ridurre il numero di cellule cancerose; è possibile ridurre la grandezza di un tumore; è possibile inibire, ritardare, rallentare o arrestare l'infiltrazione di cellule cancerose in organi periferici; è possibile rallentare o inibire la metastatizzazione di un tumore; è possibile inibire la

crescita di un tumore; è possibile prevenire o ritardare la recidiva di un tumore; è possibile attenuare, in una certa misura, uno o più dei sintomi associati ad un cancro.

5 In altre forme esecutive, la somministrazione di quantità efficaci dell'anticorpo anti-LAG-3 e dell'anticorpo anti-PD-1 secondo uno qualsiasi dei metodi qui forniti produce almeno un effetto terapeutico selezionato dal gruppo costituito da riduzione di grandezza di un tumore, riduzione del numero di lesioni metastatiche che appaiono nel tempo, remissione completa, remissione parziale, o malattia stabile. In altre forme esecutive ancora, la composizione è per l'uso in metodi di trattamento che producono un tasso di beneficio clinico comparabile ( $CBR = CR + PR + SD \geq 6$  mesi) che è migliore di quello ottenuto con un anticorpo anti-LAG-3 o un anticorpo anti-PD-1 da solo. In altre forme esecutive, il miglioramento del tasso di beneficio clinico è circa 20%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o più rispetto a quello  
10 ottenuto con un anticorpo anti-LAG-3 o un anticorpo anti-PD-1 da solo.

#### VIII. Kit e forme monodose

Qui vengono anche forniti kit che comprendono una composizione farmaceutica contenente un anticorpo anti-LAG-3, come BMS-986016, un anticorpo anti-PD-1, come BMS-936558, e un trasportatore farmaceuticamente accettabile, in una quantità terapeuticamente efficace come definita nelle rivendicazioni allegate e adatta per l'uso nei  
15 metodi di sopra. Opzionalmente, i kit possono anche comprendere istruzioni, tra cui ad esempio programmi di somministrazione, che permettono ad un operatore (ad esempio un medico, un infermiere o un paziente) di somministrare la composizione in essi contenuta allo scopo di somministrare la composizione ad un paziente avente un cancro (ad esempio un tumore solido). Il kit può anche comprendere una siringa.

Opzionalmente, i kit comprendono molteplici confezioni delle composizioni farmaceutiche monodose,  
20 ciascuna contenente una quantità efficace dell'anticorpo anti-LAG-3 e dell'anticorpo anti-PD-1 per una singola somministrazione secondo i metodi forniti sopra. I kit potranno anche comprendere strumenti o dispositivi necessari per somministrare la/le composizioni farmaceutiche. Ad esempio, un kit potrà fornire una o più siringhe preriempite che contengono una quantità dell'anticorpo anti-LAG-3 e dell'anticorpo anti-PD-1.

In una forma esecutiva, la presente invenzione fornisce un kit per trattare un tumore solido in un paziente  
25 umano, il kit comprendendo:

(a) la composizione farmaceutica dell'invenzione, e

(b) istruzioni per usare la composizione comprendente l'anticorpo anti-LAG-3 e l'anticorpo anti-PD-1 nei metodi qui descritti.

#### ESEMPI

##### 5 Esempio 1: Farmacologia preclinica dell'anticorpo anti-PD-1 (BMS-936558)

BMS-936558 è un anticorpo monoclonale interamente umano di isotipo IgG4 (kappa) che si lega a PD-1 con un'affinità nanomolare, misurata via risonanza plasmonica di superficie usando un sistema biosensore Biacore®, e con un alto grado di specificità, precludendo così il legame ai suoi ligandi PD-L1 e PD-L2. BMS-936558 non si lega ad altri membri correlati della famiglia, come BTLA, CTLA-4, ICOS o CD28. Test pre-clinici su BMS-936558 hanno  
10 dimostrato che il legame a PD-1 promuove la proliferazione delle cellule T e il rilascio di interferone gamma (IFN-gamma) in vitro. Le sequenze di amminoacidi della catena pesante e della catena leggera di BMS-936558 sono rispettivamente fornite in SEQ ID NO:1 e 2.

##### Esempio 2: Tossicità in vivo dell'anticorpo anti-PD-1 Nivolumab (BMS-936558)

Studi tossicologici in scimmie cynomolgus hanno confermato che BMS-936558 veniva ben tollerato a dosi  
15 fino a 50 mg/kg quando somministrato due volte alla settimana per 27 dosi. I reperti farmaco-correlati erano limitati ad una diminuzione reversibile della triiodotironina (T3) di 28% senza anomalie concomitanti in altri marcatori della funzione tiroidea (dati non mostrati).

##### Esempio 3: Farmacologia e sicurezza clinica dell'anticorpo anti-PD-1 (BMS-936558)

L'esperienza globale di sicurezza con BMS-936558 in monoterapia o in combinazione con altri prodotti  
20 terapeutici è basata sull'esperienza con circa 1500 soggetti finora trattati. In generale, per la monoterapia, il profilo di sicurezza è simile passando da un tipo di tumore all'altro. La sola eccezione è rappresentata dagli eventi avversi (AE) di infiammazione polmonare che possono essere numericamente maggiori nei soggetti con NSCLC perché, in alcuni casi, può essere difficile distinguere le cause di sintomi polmonari e alterazioni radiografiche che sono correlate a BMS-936558 da quelle non correlate. Il profilo di sicurezza è generalmente coerente nelle prove cliniche completate e in

corso, senza raggiungere la dose massima tollerata a qualsiasi dose esaminata fino a 10 mg/kg. Gli eventi avversi correlati al livello di dose di BMS-936558 non mostravano pattern in termini di incidenza, severità o causalità.

5 Ad oggi, lo studio CA209003 è quello che ha offerto il maggiore contributo all'esperienza clinica con BMS-936558 nei soggetti affetti da NSCLC e altre neoplasie maligne solide. CA209003 era uno studio di escalation multidose di fase 1 in soggetti con melanoma, RCC, NSCLC, cancro del colon-retto o cancro della prostata ormono-refrattario avanzato o metastatico già trattato. CA209003 prevedeva di somministrare BMS-936558 ai soggetti per via endovenosa ogni 2 settimane con dosi di 0,1, 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg. CA209003 non ha identificato la dose massima tollerata. Il livello di dose massimo valutato era 10 mg/kg. L'incidenza, la severità e la correlazione degli eventi avversi erano generalmente simili tra i livelli di dose e i tipi di tumore.

10 Al 03 luglio 2012, 296 (97,4%) dei 304 soggetti trattati con BMS-936558 avevano almeno 1 evento avverso riportato a prescindere dalla causalità. Gli eventi avversi correlati al livello di dose di BMS-936558 non mostravano pattern in termini di incidenza, severità o correlazione. 220 soggetti (72,4%) sperimentavano eventi avversi trattamento-correlati di qualsiasi grado. Gli eventi avversi farmaco-correlati più frequenti che interessavano > 5% dei soggetti comprendevano astenia (25,7%), rash (13,5%), diarrea (11,8%), prurito (10,2%), nausea (7,9%), appetito ridotto (7,9%),  
15 emoglobina ridotta (5,9%) e ipertensione (5,3%). La maggior parte degli eventi avversi trattamento-correlati era di basso grado (grado 1 o 2). 45 dei soggetti (14,8%) riportavano eventi avversi trattamento-correlati di alto grado (grado 3 o 4), i più comuni essendo astenia (1,6%), appetito ridotto (1,0%) e diarrea (1,0%). 150 (49,3%) dei 304 soggetti a tutti i livelli di dose riportavano almeno un evento avverso serio (SAE). 23 soggetti (7,6%) riportavano SAE di grado 3-4. La percentuale di soggetti che sperimentava SAE farmaco-correlati di qualsiasi grado era 11,5%. Almeno 2 soggetti  
20 riportavano SAE farmaco-correlati di grado 3-4 che comprendevano diarrea (3 soggetti [1,0%]), infiammazione polmonare (3 soggetti [1,0%]), polmonite (2 soggetti [0,7%]) e lipasi aumentata (2 soggetti [0,7%]). In analogia al profilo di eventi avversi globale, gli eventi avversi farmaco-correlati associati al livello di dose di BMS-936558 non mostravano correlazioni apparenti in termini di incidenza o severità. Gli eventi avversi non mostravano differenze apparenti di frequenza in relazione al tipo di tumore dei soggetti.

Alcuni eventi avversi trattamento-correlati selezionati di bassa frequenza (< 5%) sono comunque considerati clinicamente significativi a causa della maggiore vigilanza richiesta per il tempestivo riconoscimento e il pronto intervento. Questi eventi avversi comprendono alanina amminotransferasi (ALT) aumentata (4,3%), aspartato amminotransferasi (AST) aumentata (3,6%), infiammazione polmonare (3,3%), ipotiroidismo (3,0%), ipertiroidismo (1,3%), insufficienza surrenale (0,7%) e colite (0,7%). Come descritto sopra, 3 soggetti (1,0%) riportavano eventi di infiammazione polmonare di grado 3-4 (1 evento era di grado 4). Ciascuno di 2 soggetti (0,7%) riportava eventi di grado 3 di colite, ALT aumentata e AST aumentata. 1 soggetto (0,3%) riportava eventi di grado 3 di insufficienza surrenale, ipertiroidismo e ipotiroidismo. A causa del rischio di eventi avversi BMS-936558-correlati clinicamente significativi che richiedevano un riconoscimento tempestivo e un pronto intervento, sono stati sviluppati algoritmi gestionali per i casi di sospetta tossicità polmonare, diarrea o sospetta colite, epatotossicità, endocrinopatia e nefrotossicità.

18 (5,9%) dei 304 soggetti trattati in CA209003 riportavano eventi avversi trattamento-correlati che imponevano l'interruzione del trattamento. I soli eventi riportati in più di 1 soggetto erano infiammazione polmonare (4 soggetti [1,3%]) ed epatite (2 soggetti [0,7%]). I decessi correlati al farmaco erano 3 (1,0%); ciascuno di essi avveniva in seguito allo sviluppo di un'infiammazione polmonare.

La sicurezza di BMS-936558 in combinazione con altri prodotti terapeutici è attualmente oggetto di esplorazione in diverse prove cliniche in corso.

Esempio 4: Farmacocinetica dell'anticorpo anti-PD-1 (BMS-936558)

La farmacocinetica (PK) di BMS-936558 in monodose è stata valutata in 39 soggetti con molteplici tipi di tumore in CA209001 nell'intervallo di dosi da 0,3 a 10 mg/kg. Il Tmax mediano tra i livelli di dose variava da 1,6 a 3,1 ore con valori individuali nell'intervallo tra 0,9 e 7 ore. La PK di BMS-936558 era lineare nell'intervallo tra 0,3 e 10 mg/kg con un aumento dose-proporzionale di Cmax e AUC(INF) e con osservazione di una variabilità inter-soggetto di grado basso-moderato a ciascun livello di dose (nel senso che il coefficiente di variazione [CV] si trovava nell'intervallo tra 16 e 45%). La clearance media geometrica (CLT) dopo una singola dose EV si trovava nell'intervallo da 0,13 a 0,19 mL/h/kg, mentre il volume medio di distribuzione (Vz) variava tra 83 e 113 mL/kg tra le dosi. La T-HALF terminale

media di BMS-936558 era 17 - 25 giorni, un valore coerente con l'emivita delle IgG4 endogene che indicava una possibile somiglianza tra il meccanismo di eliminazione di BMS-936558 e quello delle IgG4. Sia l'eliminazione che la distribuzione di BMS-936558 apparivano indipendenti dalla dose nell'intervallo di dosi studiato. In uno studio multidoso su molteplici tipi di tumore (CA209003), i dati disponibili da 128 soggetti indicavano una T-HALF media di 21 - 24 ore e un T-max mediano nell'intervallo da 0,6 a 3,3 tra i livelli di dose, in linea con i dati per la monodose.

Esempio 5: Prova clinica di fase I con l'anticorpo anti-PD-1 (BMS-936558)

BMS-936558 ha dimostrato attività clinica in uno studio monodoso di fase 1 completato e in 2 studi di escalation multidoso in corso (monoterapia di fase 1: CA209003, e terapia di combinazione di fase 1b con ipilimumab) in soggetti affetti da NSCLC, melanoma, RCC e altre neoplasie maligne. La risposta tumorale è stata determinata usando una variante dei criteri di valutazione della risposta nei tumori solidi (RECIST) stabiliti dall'NCI. La popolazione valutabile è costituita da 294 soggetti con una varietà di neoplasie tumorali maligne solide (melanoma, n=138; NSCLC, n=122; RCC, n=34) sotto trattamento con Nivolumab.

In CA209003, il tasso di risposta obiettiva (ORR) nei soggetti con melanoma trattato con BMS-936558 in monoterapia ogni 2 settimane (Q2W) a dosi nell'intervallo tra 0,1 e 10 mg/kg era 31,1% (33 soggetti valutabili per la risposta su 106). Le risposte erano per lo più durevoli e superavano i 6 mesi.

Nell'intervallo di dosaggio più attivo (tra 3 e 10 mg/kg), l'ORR riportato tra i soggetti affetti da NSCLC era tra 13,5% e 27,8%, con un tasso di sopravvivenza libera da progressione (PFSR) a 24 settimane tra 23% e 51%. Le risposte osservate sia nel sottotipo squamoso che in quello non squamoso erano durevoli.

Per quanto concerne i 34 soggetti con RCC valutabili per la risposta in CA209003, entrambi i gruppi di trattamento a 1 mg/kg (5 soggetti su 18, 27,8%) e a 10 mg/kg (5 soggetti su 16, 31,3%) riportavano risposte. La stima del tasso di sopravvivenza libera da progressione (PFSR) a 24 settimane era 50% per il gruppo di trattamento con BMS-936558 a 1 mg/kg e 67% per il gruppo di trattamento con BMS-936558 a 10 mg/kg.

I risultati preliminari dello studio di fase 1b sulla terapia di combinazione con BMS-936558 e ipilimumab suggeriscono che la combinazione di due terapie che prendono a bersaglio le cellule T è vantaggiosa per i soggetti con melanoma. Il gruppo di trattamento con BMS-936558 a 0,3 mg/kg + ipilimumab a 3 mg/kg mostrava risposte in 5 dei

14 soggetti valutabili (35,7%, 1 risposta completa e 2 risposte parziali secondo i criteri convenzionali modificati dell'Organizzazione mondiale della sanità [mWHO], e 2 risposte parziali secondo i criteri mWHO immunocorrelati). Il gruppo di trattamento con BMS-936558 a 1 mg/kg + ipilimumab a 3 mg/kg mostrava risposte in 9 dei 15 soggetti valutabili (60%, 3 CR e 6 PR; tutte secondo i criteri mWHO convenzionali). Il gruppo di trattamento con BMS-936558 a 3 mg/kg + ipilimumab a 3 mg/kg mostrava risposte in 4 dei 6 soggetti valutabili (66,7%, 3 risposte parziali secondo i criteri mWHO convenzionali e 1 risposta parziale secondo i criteri mWHO immunocorrelati). Ulteriori dettagli sono forniti in Wolchok et al. (2013), NEJM 369(2):122-33, e/o in PCT/US2013/040764.

Esempio 6: Farmacologia preclinica dell'anticorpo anti-LAG-3 (BMS-986016)

10 BMS-986016 è un anticorpo interamente umano che è specifico per la LAG-3 e che è stato isolato da topi transgenici immunizzati per esprimere geni immunoglobulinici umani. Esso viene espresso come un anticorpo di isotipo IgG4 che comprende una mutazione stabilizzante nella cerniera (S228P) per ridurre il legame ai recettori per Fc e dunque diminuire o eliminare la possibilità di uccisione anticorpo- o complemento-mediata delle cellule bersaglio. Le sequenze di amminoacidi della catena pesante e della catena leggera di BMS-986016 sono rispettivamente fornite in SEQ ID NO:1 e 2.

15 La capacità di BMS-986016 di legare un antigene LAG-3 umano ricombinante è stata determinata via Biacore e saggio immunosorbente legato ad enzima (ELISA). Il legame a trasfettanti LAG-3+ di essere umano e primate e a cellule T attivate di essere umano e primate è stato misurato via analisi flussocitometrica e analisi di Scatchard. BMS-986016 si lega alla LAG-3 umana con un'alta affinità ( $K_D = 0,12-0,5$  nM) e inibisce il legame di LAG-3 alle cellule che esprimono il suo ligando, MHC di classe II (IC<sub>50</sub>, 0,67 nM). BMS-986016 si lega alla LAG-3 di cynomolgus su cellule CHO trasfettate e su cellule T di cynomolgus attivate con un'affinità più bassa (EC<sub>50</sub>, 21,5-34,3 nM) rispetto alle cellule T umane attivate. In assenza di una co-stimolazione secondaria, il farmaco BMS-986016 ad un'alta concentrazione non suscita risposte citochiniche misurabili in cellule di sangue periferico umano coltivate né media un grado misurabile di uccisione anticorpo-dipendente o complemento-dipendente delle cellule bersaglio. BMS-986016 promuove l'attivazione di un ibridoma di cellule T murine antigene-specifiche che esprime la LAG-3 umana quando co-coltivato con una cellula presentante l'antigene positiva a MHC di classe II. Inoltre, BMS-986016 potenzia l'attivazione

delle cellule T umane in saggi di stimolazione da superantigene quando aggiunto da solo o in combinazione con BMS-936558 (un anticorpo anti-PD-1).

Esempio 7: Tossicità dell'anticorpo anti-LAG-3 (BMS-986016) da solo o in combinazione con l'anticorpo anti-PD-1 (BMS-936558)

5 Sono stati condotti i seguenti studi tossicologici preclinici:

A. Studio esplorativo della farmacodinamica e della tossicità di un regime endovenoso intermittente di quattro settimane (QW) in scimmie cynomolgus con la combinazione anticorpo anti-LAG3.1 (un precursore di BMS-986016) e BMS-936558

10 I risultati chiave erano i seguenti. Quando somministrato a 50 mg/kg/settimana da solo o in combinazione con BMS-936558 a 50 mg/kg/settimana, anti-LAG3.1 non produceva cambiamenti avversi. La stima del livello senza effetti avversi osservati (NOAEL) per anti-LAG3.1 come singolo agente era 50 mg/kg/settimana ( $AUC[0-168\text{ h}] = 231.000\ \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ), e la stima del NOAEL per anti-LAG3.1 in combinazione con BMS-936558 a 50 mg/kg/settimana era 50 mg/kg/settimana ( $AUC[0-168\text{ h}]$  media per anti-LAG3.1 =  $210.000\ \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ;  $AUC[0-168\text{ h}]$  media per BMS-936558 =  $159.500\ \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ).

15 B. Studio GLP-conforme della tossicità di un regime endovenoso di quattro settimane con la combinazione BMS-986016 e BMS-936558 in scimmie cynomolgus con recupero di 6 settimane

20 I risultati chiave erano i seguenti. Quando somministrato come singolo agente fino a 100 mg/kg/settimana, BMS-986016 non produceva cambiamenti avversi. Quando somministrato come singolo agente a 50 mg/kg/settimana, BMS-936558 produceva infiammazione linfoplasmocitaria irreversibile di grado lieve-minimo nel plesso coroideo del cervello, che veniva considerata non avversa per via dei livelli più bassi di severità e incidenza dell'infiammazione linfoplasmocitaria rispetto al trattamento di combinazione con BMS-986016 e BMS-936558, assenza di vasculite o distruzione tissutale, e assenza di manifestazioni cliniche durante il corso del trattamento. Il giorno 29 dello studio, la somministrazione combinata di BMS-986016 e BMS-936558 (rispettivamente a 100 e 50 mg/kg/settimana) produceva 1 maschio moribondo su 9 scimmie. Tra il giorno 26 e il giorno 29, questa scimmia presentava temperatura corporea elevata, brividi, scarico nasale rosso o limpido, feci alterate (feci informi, scarse o assenti), comportamento alimentare

25

ridotto, disidratazione moderata, starnuti, attività diminuita e postura ingobbata. Dopo 2 giorni di cure veterinarie e trattamento con antibiotici, questo animale non mostrava segni di miglioramento e, il giorno 29, veniva eutanizzato a causa della cattiva condizione clinica.

5 La necropsia non mostrava reperti macroscopici degni di nota. I reperti istopatologici in questa scimmia comprendevano: leggera infiammazione linfoplasmocitaria nel plesso coroideo; infiammazione linfoplasmocitaria di grado minimo-moderato nella vascolarizzazione di parenchima cerebrale, meningi e midollo spinale (cervicale e lombare); e infiammazione a cellule miste di grado minimo-moderato in epididimi, vescicole seminali e testicoli. Le alterazioni clinico-patologiche indicavano diminuzioni in conta dei globuli rossi, concentrazione di emoglobina ed ematocrito di causa incerta, e aumento del fibrinogeno correlato all'infiammazione osservata nel sistema nervoso  
10 centrale (SNC) e nell'apparato riproduttivo maschile.

Gli altri reperti istopatologici associati alla somministrazione combinata di BMS-986016 e BMS-936558 (rispettivamente a 100 e 50 mg/kg/settimana) erano limitati ad infiammazione linfoplasmocitaria irreversibile di grado minimo-leggero nel plesso coroideo del cervello di 7 delle 8 scimmie rimanenti, e infiammazione linfocitocitaria nella vascolarizzazione del parenchima cerebrale in 1 delle 8 scimmie rimanenti la cui reversibilità era impossibile da  
15 accertare.

La stima del NOAEL per BMS-986016 come singolo agente era 100 mg/kg/settimana (AUC [0-168 h] media = 474.000 µg·h/mL); la stima del NOAEL per BMS-936558 come singolo agente era 50 mg/kg/settimana (AUC [0-168 h] media = 193.000 µg·h/mL); il NOAEL per la combinazione BMS-986016 e BMS-936558 non è stato determinato. Tuttavia, la terapia di combinazione veniva generalmente ben tollerata, osservando segni clinici di tossicità solo in 1  
20 scimmia su 9 (circa 10%). Pertanto, come STD10, è stata presa BMS-986016/Nivolumab a 100/50 mg/kg/settimana (AUC [0-168 h] media per BMS-986016 = 514.000 µg·h/mL; AUC[0-168 h] media per Nivolumab = 182.000 µg·h/mL).

Le dosi somministrate (BMS-986016 a 100 mg/kg e BMS-936558 a 50 mg/kg) erano  $\geq 10$  volte più alte delle dosi massime proposte per lo studio corrente. La dose iniziale di 20 mg (0,25 mg/kg) per BMS-986016 in monoterapia  
25 (parte A) è meno di 1/10 dell'equivalente umano del NOAEL nella scimmia cynomolgus (636 mg; 8,0 mg/kg), ed è

sotto la HED dopo un aggiustamento lineare dell'esposizione al valore bersaglio del NOAEL per la stima della più alta differenza di affinità di 265-X (24 mg; 0,30 mg/kg). Senza tenere conto delle differenze di affinità, il multiplo di sicurezza calcolato per le esposizioni alla dose iniziale di 20 mg (0,25 mg/kg) in base al NOAEL di 100 mg/kg/settimana per la scimmia cynomolgus è 315-X.

5 Per la terapia di combinazione (parte B), la dose iniziale di 3 mg (0,03 mg/kg) per BMS-986016 è basata su un aggiustamento lineare della STD10 nella scimmia cynomolgus per la stima della più alta differenza di affinità di 265-X con aggiunta di un fattore di sicurezza di 10-X. In base ad una STD10 di 100 mg/kg/settimana, la dose iniziale massima raccomandata (MRSD) di BMS-986016 per gli esseri umani è 0,03 mg/kg. Per la terapia di combinazione (parte B), la  
10 dose iniziale di 80 mg (1 mg/kg) per BMS-936558 è basata su parametri PK noti per BMS-936558 negli esseri umani con aggiunta di un fattore di sicurezza di 10-X. In base alla STD10 di 50 mg/kg/settimana nella scimmia cynomolgus, la MRSD di BMS-936558 per gli esseri umani è 4,3 mg/kg, ed è stata ulteriormente ridotta per identificare una dose con livelli accettabili di eventi avversi.

C. Studio GLP-conforme della cross-reattività tissutale di BMS-986016 in tessuti umani e in una selezione di tessuti di scimmia cynomolgus.

15 BMS-986016-FITC mostrava una colorazione positiva nella membrana plasmatica o nei granuli della membrana plasmatica dei seguenti tessuti umani: leucociti mononucleati della vescica urinaria, globuli, colon - intestino crasso, occhio, esofago, intestino tenue, stomaco, rene, polmone, linfonodo, placenta, ghiandola salivare, pelle, milza, timo, tonsille, utero - cervice, e utero - endometrio; e cellule ematopoietiche del midollo osseo. In aggiunta, BMS-986016-FITC mostrava una colorazione positiva nel citoplasma dell'epitelio delle cellule endocrine ipofisarie umane.  
20 All'interno del pannello limitato di tessuti di scimmia cynomolgus valutati, BMS-986016-FITC mostrava una colorazione positiva nella membrana plasmatica o nei granuli della membrana plasmatica dei leucociti mononucleati della milza. Basandosi su rapporti scientifici che indicavano la presenza di cellule capaci di esprimere LAG-3 nei centri germinali e nelle aree di cellule T interfollicolari dei tessuti linfoidei umani normali (linfonodo, tonsilla, milza, timo, midollo osseo e tessuto linfoide associato alla mucosa), e avendo la morfologia e la distribuzione dei linfociti, era  
25 previsto che BMS-986016-FITC colorasse i leucociti mononucleati e le cellule ematopoietiche in questo studio (nei

tessuti di essere umano e di scimmia cynomolgus). Poiché l'mRNA di LAG-3 viene espresso nell'ipofisi e avendo osservato che LAG3.1-G4P-FITC colora l'adenoipofisi dell'ipofisi umana in uno studio di cross-reattività tissutale pilota, era previsto che BMS-986016-FITC colorasse anche il citoplasma e i granuli citoplasmatici dell'epitelio delle cellule endocrine ipofisarie umane. Benché non sia previsto che BMS-986016 abbia accesso al compartimento citoplasmatico in vivo e quantunque non siano stati osservati effetti sulla ghiandola ipofisaria in studi tossicologici a

5

dose ripetuta sulle scimmie, queste scoperte potrebbero assumere un significato clinico.

D. Valutazione del rilascio di citochine e dell'attivazione dei linfociti in vivo con BMS-986016 usando cellule mononucleate di sangue periferico umano.

Quando presentato alle PBMC umane, BMS-986016 non induceva un rilascio di citochine a prescindere da concentrazione, donatore o tempo di incubazione. I livelli di citochine osservati erano uguali o prossimi ai limiti inferiori di quantificazione del saggio, senza evidenze di dipendenze dal dosaggio o pattern tra i donatori (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-12p70 e IFN- $\gamma$ ), o si sovrapponevano generalmente ai livelli di citochine in PBMC incubate con controlli negativi (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ).

10

Coerentemente con l'assenza di un rilascio di citochine, niente suggeriva che BMS-986016 inducesse l'attivazione delle cellule T o NK, come misurato dall'espressione di CD25 e CD69 sulla superficie. I livelli di espressione di questi marcatori sulle cellule T ed NK dopo la stimolazione con BMS-986016 erano simili a quelli osservati in caso di stimolazione con controlli negativi.

15

Nel complesso, questi dati indicano che BMS-986016 non possiede un potenziale agonistico per indurre l'attivazione delle cellule T o NK o il rilascio di citochine.

20 Esempio 8: Farmacocinetica preclinica dell'anticorpo anti-LAG-3 (BMS-986016)

Secondo le linee guida di regolamentazione per i prodotti farmaceutici di origine biotecnologica (ICH Harmonised Tripartite Guideline, S6(R1) Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. International Conference on Harmonisation, 2011), BMS-986016 non è stato oggetto di studi di metabolismo condotti sugli animali. I prodotti attesi dalla degradazione in vivo degli anticorpi monoclonali (mAb) sono piccoli peptidi e amminoacidi la cui formazione avviene attraverso vie biochimiche che non dipendono dagli enzimi del citocromo P450.

25

BMS-986016 dimostrava proprietà farmacocinetiche (PK) favorevoli nelle scimmie cynomolgus. In due studi di PK EV a dose singola e a dose ripetuta, BMS-986016 mostrava un decadimento bi-esponenziale con un'esposizione pressoché proporzionale alla dose. La clearance sistemica (CL<sub>TP</sub>) è nell'intervallo da 0,12 a 0,22 mL/h/kg, mentre l'emivita terminale (T-HALF) è nell'intervallo da 133 a 414 ore. Il volume di distribuzione allo stato stazionario (V<sub>ss</sub>) era nell'intervallo da 62 a 72 mL/kg, suggerendo una distribuzione limitata al di fuori del plasma. Alcune scimmie mostravano anticorpi anti-BMS-986016, ma la presenza degli anticorpi anti-BMS-986016 non esercitava apparentemente alcun impatto sull'esposizione di BMS-986016.

Esempio 9: Inibizione della crescita di un tumore in vivo attraverso un trattamento combinato con un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1

Per vagliare l'ipotesi che la combinazione anti-LAG-3 e anti-PD-1 fosse in grado di potenziare l'efficacia antitumorale, è stato condotto un esperimento in un modello tumorale murino. Questi studi valutavano l'inibizione della crescita tumorale in modelli tumorali singenici (fibrosarcoma Sa1N e adenocarcinoma del colon MC38) e monitoravano l'accelerazione dell'autoimmunità nel modello diabetico non obeso (NOD). Come mostrato nella Figura 1, la somministrazione dell'anticorpo anti-LAG-3 produceva sia un'inibizione della crescita tumorale globale che un aumento del numero di topi liberi da tumore (TF) nei corrispondenti gruppi di trattamento. L'anticorpo anti-LAG-3 somministrato in combinazione con l'anticorpo anti-PD-1 forniva un'attività antitumorale potenziata rispetto all'attività di uno qualsiasi dei due agenti quando somministrato da solo. Ad esempio, in molteplici modelli di tumore Sa1N, l'anticorpo anti-LAG-3 produceva 20%-30% di topi TF rispetto ai topi di controllo e a quelli trattati con l'anticorpo anti-PD-1 (0%-10% di topi TF), mentre la combinazione di anticorpi anti-LAG-3 e anti-PD-1 produceva 60%-90% di topi TF. Nel modello MC38, l'anticorpo anti-LAG-3 mostrava una modesta inibizione della crescita tumorale quando usato da solo mentre, quando somministrato in combinazione con l'anticorpo anti-PD-1, produceva un'attività antitumorale potenziata rispetto a quella osservata con l'anticorpo anti-PD-1 da solo (80% contro 40% di topi TF, rispettivamente).

Esempio 10: Prova di fase 1 in pazienti con tumori solidi

L'anticorpo anti-LAG-3 (BMS-986016) e l'anticorpo anti-PD-1 (BMS-936558) vengono usati in una prova di fase 1 su pazienti con tumori solidi avanzati per dimostrare l'efficacia della somministrazione di BMS-986016 e BMS-936558 come trattamento di combinazione.

#### 1. Obiettivi

5 L'obiettivo primario dello studio è accertare la sicurezza e la tollerabilità di BMS-986016 quando dato in combinazione con BMS-936558, e identificare le tossicità limitanti la dose (DLT) e la dose massima tollerata (MTD) della combinazione, in soggetti con tumori solidi avanzati.

10 Gli obiettivi secondari comprendono accertare l'attività antitumorale preliminare della combinazione di BMS-986016 e BMS-936558 in soggetti con tumori solidi avanzati, caratterizzare la farmacocinetica (PK) di BMS-986016 e BMS-936558 quando co-somministrati, monitorare l'immunogenicità di BMS-986016 e BMS-936558 quando somministrati come terapia di combinazione, e accertare l'effetto di BMS-986016 e BMS-936558 sul QT corretto ("QTc"). Ulteriori obiettivi esplorativi comprendono accertare gli effetti farmacodinamici della terapia di combinazione con BMS-986016 e BMS-936558 in base ad una selezione di biomarcatori nel sangue periferico e in provini biotipici tumorali, caratterizzare la funzione delle cellule T durante la terapia di combinazione con BMS-986016 e BMS-936558, 15 accertare la sopravvivenza globale a 2 anni in soggetti trattati con BMS-986016 e BMS-936558, esplorare l'attività antitumorale preliminare della terapia di combinazione con BMS-986016 e BMS-936558 in soggetti con tumori solidi avanzati, caratterizzare la farmacocinetica e le relazioni esposizione-risposta in soggetti trattati con BMS-986016 e BMS-936558, e studiare la relazione tra l'efficacia clinica e una selezione di biomarcatori periferici e tumorali.

#### 2. Architettura e durata dello studio

20 Questo è uno studio in aperto di fase 1 in cui BMS-986016 viene somministrato come singolo agente e in combinazione con BMS-936558 (Nivolumab) a soggetti con tumori solidi avanzati. Lo studio si articola in 3 parti. La parte A e la parte B hanno un'architettura di escalation della dose 3 + 3 + 3 in cui BMS-986016 viene somministrato come singolo agente (parte A) o in combinazione con BMS-936558 (parte B) a soggetti con tumori solidi avanzati. Il trattamento nella parte B viene iniziato una volta presa la decisione di scalare alla coorte con la terza dose nella parte A 25 (secondo le regole di escalation della dose). Successivamente, l'escalation nelle 2 parti procede in parallelo. La dose di

BMS-986016 somministrata in combinazione con BMS-936558 (parte B) non supera mai le dosi di BMS-986016 già stabilite come sicure nel braccio di escalation della dose in monoterapia (parte A). La parte C prevede di ampliare le coorti in 6 popolazioni malattia-circoscritte di circa 16 soggetti ciascuna in cui BMS-986016 viene somministrato in combinazione con BMS-936558. Il trattamento nella parte C viene iniziato dopo aver determinato la dose massima tollerata (MTD) (o la dose massima somministrata (MAD) se la MTD non viene determinata) per la parte B. Le dosi selezionate per la parte C non superano la MTD o la MAD per la parte B, ma la determinazione delle dosi può tenere conto della valutazione di altri dati ricavati nelle parti A e B, come le tossicità e i dati di PK e di farmacodinamica. La Figura 2 fornisce uno schema dello studio.

I soggetti completano fino a 4 periodi dello studio nel seguente modo: screening (fino a 28 giorni), trattamento (fino ad un massimo di dodici cicli di 8 settimane della terapia di studio), follow-up clinico (135 giorni), follow-up sulla sopravvivenza (fino a 2 anni dalla prima dose del farmaco di studio; sarà possibile prendere in considerazione un periodo di follow-up più lungo in casi selezionati con un segnale franco di efficacia). Durante questo periodo, è possibile acquisire immagini diagnostiche ogni 12 settimane fino alla progressione nei soggetti che interrompono il trattamento causa CR e nei soggetti con PR al termine del ciclo 12.

Il periodo di trattamento si articola in un massimo di dodici cicli di trattamento di 8 settimane. Ogni ciclo di trattamento è costituito da 4 dosi di BMS-986016 da solo (parte A) o in combinazione con BMS-936558 (parti B e C) che vengono somministrate nei giorni 1, 15, 29 e 43 di ciascuno dei cicli di trattamento. Nelle parti B e C che prevedono di somministrare i due anticorpi in combinazione, Nivolumab verrà dato per primo, seguito da BMS-986016 entro 30 minuti dal completamento dell'infusione di Nivolumab. La risposta tumorale viene valutata usando RECIST v1.1. I soggetti vengono lasciati proseguire la terapia di studio fino a quando non si verifica uno dei seguenti eventi: (1) risposta completa (CR) confermata, (2) completamento del numero massimo di dodici cicli di 8 settimane, (3) malattia progressiva (PD), (4) deterioramento clinico, e/o (5) soddisfacimento ad altri criteri di interruzione del trattamento. Il trattamento post-progressione è ammesso in soggetti selezionati con PD iniziale definita secondo RECIST v1.1 che ricevono un beneficio clinico e tollerano il trattamento. I soggetti che interrompono il trattamento entrano in un periodo di follow-up clinico di 135 giorni.

Una volta concluso il periodo di follow-up clinico, i soggetti entrano nel periodo di follow-up sulla sopravvivenza. Questo periodo prevede visite cliniche o contatti telefonici ogni 12 settimane per accertare lo stato di sopravvivenza. La durata di questo periodo è fino a 2 anni dalla prima dose del farmaco di studio, ma con la possibilità di prendere in considerazione un periodo di follow-up più lungo in casi selezionati con un segnale franco di efficacia. I  
5 soggetti nel periodo di follow-up sulla sopravvivenza che mostrano una progressione possono ricevere una terapia tumore-diretta in base alle necessità. La Figura 3 raffigura uno schema dello studio.

Gli accertamenti, tra cui esami fisici, misurazioni dei segni vitali, ECG a 12 derivazioni e valutazioni cliniche di laboratorio, vengono condotti in momenti selezionati durante l'intero intervallo di dosaggio. I soggetti vengono  
10 strettamente monitorati per gli eventi avversi durante l'intero corso dello studio. Entro 4 ore dall'inizio della somministrazione del farmaco di studio, vengono raccolti campioni di sangue per l'analisi farmacocinetica.

I soggetti vengono lasciati proseguire la terapia per un massimo di dodici cicli di 8 settimane, fino ad ottenere una risposta completa confermata, una malattia progressiva confermata o un deterioramento clinico confermato, o fino a soddisfare i criteri di interruzione del trattamento. I soggetti possono rimanere nello studio per un totale di massimo 2,3  
15 anni circa, che comprende un periodo di screening di 28 giorni, fino a dodici cicli di trattamento di 8 settimane, un periodo di follow-up clinico di 135 giorni, e fino a 2 anni di follow-up sulla sopravvivenza (partendo dalla prima dose del farmaco di studio). La durata totale prevista dello studio dal momento della prima visita del primo soggetto fino al follow-up sulla sopravvivenza richiesto per l'ultimo soggetto arruolato è circa 5 anni.

### 3. Escalation della dose

#### Parte A

20 La parte A adotta un'architettura 3 + 3 + 3 per accertare la sicurezza di BMS-986016 dato come singolo agente. All'inizio di una coorte con escalation della dose è possibile arruolare un quarto soggetto se il soggetto è in grado di iniziare il primo giorno di dosaggio entro circa una settimana dal terzo soggetto nella stessa coorte con escalation della dose. I dosaggi durante l'escalation della dose sono forniti nelle Figure 2A e 2B e nella Tabella 1 (riportata sotto). I  
25 soggetti inizialmente trattati in ciascuna coorte di dosaggio sono tre (o 4 se applicabile). Nella coorte di dosaggio 1, ciascuno dei primi 3 soggetti (o 4 se applicabile) viene designato come soggetto sentinella e inizia il trattamento ad

almeno 5 giorni di distanza. Non è necessario che i soggetti nelle coorti successive osservino l'intervallo di 5 giorni tra le date di inizio del trattamento. L'escalation della dose nella parte A procede nel seguente modo:

- Se 0 dei primi 3 soggetti (o 4 se applicabile) sperimentano una tossicità limitante la dose (DLT) all'interno dell'intervallo di valutazione delle DLT, trattare una nuova coorte di 3 soggetti (o 4 se applicabile) al livello di dose immediatamente superiore.
- Se 1 soggetto su 3 (o 4 se applicabile) sperimenta una DLT all'interno dell'intervallo di valutazione delle DLT, ampliare quella coorte a 6 soggetti.
- Se 2 soggetti su 6 sperimentano una DLT all'interno dell'intervallo di valutazione delle DLT, ampliare quella coorte a 9 soggetti.
- Se  $\geq 2$  soggetti su 3 (o 4 se applicabile),  $\geq 3$  soggetti su 6 o  $\geq 3$  soggetti su 9 sperimentano DLT all'interno di una coorte di dosaggio durante l'intervallo di valutazione delle DLT, stabilire che quel livello di dose ha superato la MTD.

Tabella 1: Programma di escalation della dose per la parte A - BMS-986016 in monoterapia

Numero di coorti per dose	Soggetti totali	Dose di BMS-986016 (EV; mg)
1	n = circa 3-9	20
2	n = circa 3-9	80
3	n = circa 3-9	240
4	n = circa 3-9	800
Totale	N = circa 12-36	

Prima di dichiarare la MTD (o la MAD), qualsiasi coorte già giudicata sicura viene ampliata per ottenere più esperienza o per esaminare livelli di dose intermedi a quelli definiti nel protocollo. Per queste coorti ampliate o aggiuntive, valgono le regole di escalation della dose (grandezza delle coorti, intervallo di valutazione delle DLT, criteri di ampliamento delle coorti, ecc.). Il numero massimo di soggetti arruolati in qualsiasi coorte di dosaggio aggiuntiva o ampliata è 9.

Non sono ammesse escalation di dose intra-soggetto. Se un livello di dose risulta maggiore della MTD, i soggetti arruolati per quel livello di dose vengono trattati ad una dose più bassa.

#### Parte B

5 Il trattamento nella parte B viene iniziato dopo aver preso la decisione di scalare alla coorte con la terza dose nella parte A (secondo le regole di escalation della dose). Successivamente, l'escalation nelle 2 parti procede in parallelo. La dose di BMS-986016 somministrata in combinazione con BMS-936558 (parte B) non supera mai le dosi di BMS-986016 già stabilite come sicure nel braccio di escalation della dose in monoterapia (parte A). Le assegnazioni ai trattamenti per i soggetti eleggibili sia per la parte A che per la parte B vengono alternate tra le 2 parti, se possibile con i soggetti trattati consecutivamente che vengono assegnati a parti differenti attraverso un sistema di risposta vocale interattiva (IVRS). Se la parte a cui il soggetto viene assegnato da questo algoritmo non ha posti liberi, il soggetto viene 10 assegnato alla coorte o parte successiva che è ancora incompleta. In analogia alla parte A, anche la parte B adotta un'architettura 3 + 3 + 3 per accertare la sicurezza di BMS-986016 dato in combinazione con Nivolumab. All'inizio di una coorte con escalation della dose è possibile arruolare un quarto soggetto se il soggetto è in grado di iniziare il primo giorno di dosaggio entro circa una settimana dal terzo soggetto nella stessa coorte con escalation della dose. I dosaggi valutati durante l'escalation della dose sono forniti nelle Figure 2A e 2B e nella Tabella B (riportata sotto). In analogia 15 alla parte A, ciascuno dei primi 3 soggetti (o 4 se applicabile) nella corte di dosaggio uno della parte B verrà designato come soggetto sentinella e inizierà il trattamento ad almeno 5 giorni di distanza.

Tabella 2: Programma di escalation della dose per la parte B - BMS-986016 in combinazione con BMS-936558

Numero di coorti per dose	Soggetti totali	Dose di BMS-986016 (EV; mg)	Dose di BMS-936558 (EV; mg)
1	n = circa 3-9	3	80
2	n = circa 3-9	3	240
3	n = circa 3-9	20	240
4	n = circa 3-9	80	240

5	n = circa 3-9	240	240
Totale	N = circa 15-45		

I soggetti inizialmente trattati in ciascuna coorte di dosaggio sono tre. Nella coorte di dosaggio 1, ciascuno dei primi 3 soggetti, designato come soggetto sentinella, inizia il trattamento ad almeno 5 giorni di distanza. Non è necessario che i soggetti nelle coorti successive osservino l'intervallo di 5 giorni tra le date di inizio del trattamento.

L'escalation della dose nella parte B procede come descritto per la parte A. Se la coorte di dosaggio 2 supera la MTD, la coorte successiva viene trattata con 20 mg di BMS-986016 e 80 mg di BMS-936558. Se questa combinazione di dosi risulta sicura, l'escalation procede alle dosi predefinite di BMS-986016 mantenendo la dose di BMS-936558 a 80 mg.

Se la MTD non viene raggiunta procedendo fino alla corte di dosaggio 5, e basandosi sull'esperienza globale di sicurezza durante l'escalation della dose, vengono prese in considerazione ulteriori coorti per la combinazione BMS-986016 + BMS-936558.

Prima di dichiarare la MTD (o la MAD), qualsiasi coorte già giudicata sicura viene ampliata per ottenere più esperienza o per esaminare livelli di dose intermedi a quelli definiti nel protocollo. Per queste coorti ampliate o aggiuntive, valgono le regole di escalation della dose (grandezza delle coorti, intervallo di valutazione delle DLT, criteri di ampliamento delle coorti, ecc.). Il numero massimo di soggetti arruolati in qualsiasi coorte di dosaggio aggiuntiva o ampliata è 9.

Non sono ammesse escalation di dose intra-soggetto. Se un livello di dose risulta maggiore della MTD, i soggetti arruolati per quel livello di dose ricevono una dose più bassa.

#### 4. Ampliamento delle coorti

Lo scopo dell'ampliamento delle coorti è raccogliere ulteriori informazioni su sicurezza, tollerabilità, efficacia preliminare, farmacocinetica e farmacodinamica della combinazione di BMS-986016 e BMS-936558. Le dosi selezionate per la parte C non superano la MTD (o la MAD se la MTD non viene determinata) nella parte B, ma possono tenere conto della valutazione di altri dati ricavati nelle parti A e B, tra cui le tossicità e i dati di PK e di

farmacodinamica. Le dosi comprendono dosi intermedie a quelle valutate nella parte B. Se la dose scelta è più bassa della MTD, la modellazione aiuta ad ottenere una selezione informata del livello di dose della combinazione da portare avanti nella parte C. Le sei coorti di ampliamento sono circoscritte ai tipi di tumore elencati sotto nelle Tabelle 3A e 3B. Durante l'intera procedura di arruolamento nelle coorti di ampliamento, viene condotta una valutazione continua degli eventi di tossicità nelle coorti ampliate. Se il tasso aggregato di tossicità correlate al trattamento che soddisfano i criteri DLT supera in qualsiasi momento il 33% tra tutti i soggetti trattati durante l'ampliamento delle coorti della parte C, l'arruolamento viene interrotto. A seconda della natura e del grado di tossicità, e una volta accertato il rapporto rischi:benefici, tutte le coorti iniziano una o più dosi ad un livello di dose più basso già esaminato o ad un livello di dose intermedio rispetto a livelli di dose più bassi già esaminati.

Una coorte in monoterapia con BMS-986016 viene presa in considerazione per l'ampliamento non appena viene determinata la MTD (o la MAD se la MTD non viene determinata). Questo ampliamento delle coorti è limitato al/ai tipi di tumore risultati responsivi alla monoterapia con BMS-986016. La dose selezionata per l'ampliamento in monoterapia non supera la MTD della parte A (o la MAD se la MTD non viene determinata) e tiene conto della valutazione di altri dati ricavati nella parte A, tra cui le tossicità e i dati di PK e di farmacodinamica. La dose selezionata è intermedia a quelle esaminate nella parte A. Se la dose scelta è più bassa della MTD, la modellazione aiuta ad ottenere una selezione informata del livello di dose da portare avanti nella parte C.

Tabella 3A: Tipi di tumore eleggibili per la parte C - terapia di combinazione con ampliamento delle coorti

Tipo di tumore	Soggetti totali
Melanoma: naïve a ICMAR <sup>a</sup>	circa 16
Melanoma: anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente <sup>b</sup>	circa 16
NSCLC <sup>c</sup> : naïve a ICMAR <sup>a</sup>	circa 16
NSCLC <sup>c</sup> : anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente <sup>b</sup>	circa 16
Cancro di testa e collo HPV <sup>d</sup> -positivo naïve a ICMAR <sup>a</sup>	circa 16
Adenocarcinoma gastrico naïve a ICMAR <sup>a</sup>	circa 16

Totale circa 96

a ICMAR: regimi con anticorpi modulanti le cellule immunitarie (come, ma senza limitazioni, ipilimumab, tremelimumab o anticorpi anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 e/o anti-OX40)

b I soggetti con un anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente sono soggetti non responsivi con progressione entro 16 settimane dall'inizio della terapia. I soggetti devono fornire il consenso informato entro 60 giorni dall'ultima dose di anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 e non dovranno aver interrotto la terapia con l'anticorpo a causa di tossicità serie e/o potenzialmente letali (ad esempio una tossicità limitante la dose in uno studio precedente). I soggetti con un anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente non devono essere già stati esposti a qualsiasi altro ICMAR.

c NSCLC: cancro del polmone non a piccole cellule

d HPV: papilloma virus umano

Tabella 3B: Tipi di tumore eleggibili per la parte C - terapia di combinazione con ampliamento delle coorti

Tipo di tumore	Soggetti totali
Melanoma: naïve a ICMAR <sup>a</sup>	circa 16
Melanoma: terapia pregressa con anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1 o anti-PD-L1	circa 16
NSCLC <sup>c</sup> : naïve a ICMAR <sup>a</sup>	circa 16
NSCLC <sup>c</sup> : anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente <sup>b</sup>	circa 16
Cancro di testa e collo naïve a ICMAR <sup>a</sup>	circa 16
Adenocarcinoma gastrico naïve a ICMAR <sup>a</sup>	circa 16
Totale	circa 96

a ICMAR: regimi con anticorpi modulanti le cellule immunitarie (come, ma senza limitazioni, anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1 o anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137, e/o anti-OX40)

b I soggetti con melanoma che progrediscono durante o dopo la ricezione di terapie con anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1 o anti-PD-L1 (in regimi sequenziali o combinati) sono eleggibili. I soggetti con

---

melanoma non eleggibili in questo gruppo comprendono quelli con: 1) ultima dose di terapia con anticorpo anti-CTLA-4 ricevuta entro 100 giorni dalla prima dose della medicazione di studio; 2) esposizione pregressa a ICMAR diversi da regimi di terapia con anticorpi anti-CTLA-4, anti-PD-1 o anti-PD-L1; 3) interruzione di terapia con anticorpi anti-CTLA-4, anti-PD-1 o anti-PD-L1 a causa di tossicità serie e/o potenzialmente letali (ad esempio una tossicità limitante la dose in un'esposizione precedente).

c NSCLC: cancro del polmone non a piccole cellule

d Soggetti con NSCLC la cui malattia progredisce durante o dopo la terapia con un anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente. Il soggetto non dovrà aver interrotto la terapia con l'anticorpo a causa di tossicità serie e/o potenzialmente letali (ad esempio una tossicità limitante la dose in uno studio precedente). I soggetti con un anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente non devono essere già stati esposti a qualsiasi altro ICMAR.

---

#### 5. Tossicità limitanti la dose

5 BMS-986016 ha il potenziale di aumentare la frequenza e la severità di eventi avversi già descritti che sono associati a BMS-936558 o di produrre nuove tossicità. Per guidare le decisioni sull'escalation della dose nella parte A e nella parte B, la tossicità limitante la dose (DLT) viene determinata in base a incidenza, intensità e durata degli eventi avversi che sono correlati al farmaco di studio e che si manifestano entro 56 giorni (8 settimane) dall'inizio del farmaco di studio (ovvero durante l'intervallo di valutazione delle DLT, fino al completamento del ciclo 1). La severità degli eventi avversi viene classificata secondo i criteri comuni di terminologia per gli eventi avversi (CTCEAE) v.4.0 del National Cancer Institute (NCI). Ai fini della gestione dei soggetti, le DLT che si manifestano in qualsiasi momento, sia durante l'escalation della dose (parte A e parte B) che durante l'ampliamento delle coorti (parte C), causano la 10 sospensione di tutti i farmaci di studio (uno o più) in attesa di valutare la correlazione tra l'evento e il farmaco di studio. Prima di riprendere il trattamento di studio, i soggetti devono soddisfare criteri di ripresa del trattamento.

I soggetti che si ritirano dallo studio durante l'intervallo di valutazione delle DLT per motivi diversi da una DLT possono essere sostituiti allo stesso livello di dose. Se un'infusione non può essere somministrata ad una visita

programmata durante l'intervallo di valutazione delle DLT, essa deve essere somministrata non appena possibile. Se il ritardo è 1 - 7 giorni, si dovranno condurre le procedure previste nella visita originariamente programmata, e i soggetti verranno considerati valutabili per la determinazione delle DLT. Se il ritardo è più di 7 giorni, la dose verrà considerata persa e non verrà sostituita. Per prendere le decisioni sull'escalation della dose dal punto di vista della sicurezza, i  
5 soggetti verranno considerati valutabili se avranno ricevuto 3 delle 4 dosi programmate di BMS-986016 nella parte A (o 3 delle 4 dosi programmate di BMS-986016 e Nivolumab nella parte B) durante l'intero periodo di osservazione di 8 settimane solo quando la singola dose persa è secondaria ad una progressione della malattia o a motivi non medici. I soggetti non valutabili potranno essere sostituiti allo stesso livello di dose.

Le DLT epatiche, non ematologiche ed ematologiche sono definite separatamente come illustrato sotto.

#### 10 DLT epatiche

Uno qualsiasi dei seguenti eventi farmaco-correlati è considerato una DLT epatica:

- ALT o AST  $> 8 \times \text{ULN}$  a prescindere dalla durata, o
- ALT o AST  $> 5 \times e \leq 8 \times \text{ULN}$  che non riesce a tornare a  $\leq$  grado 1 entro 2 settimane nonostante un intervento medico, o
- 15 • Bilirubina totale  $> 5 \times \text{ULN}$ , o
- ALT o AST  $> 3 \times \text{ULN}$  e, contestualmente, bilirubina totale  $> 2 \times \text{ULN}$

#### DLT non ematologiche

Uno qualsiasi dei seguenti eventi farmaco-correlati è considerato una DLT non ematologica:

- Dolore oculare immunocorrelato di grado 2 o riduzione del visus che richiede un trattamento sistemico, o
- 20 • Dolore oculare di grado 2 o riduzione del visus che non risponde a terapia topica e che non migliora al grado 1 entro 2 settimane dall'inizio della terapia topica, o
- Tossicità non epatica o non ematologica di grado  $\geq 3$  con le eccezioni annotate sotto.

I seguenti eventi non ematologici di grado 3 non sono considerati DLT:

- Anomalia elettrolitica di grado 3 che dura < 72 ore, che non è clinicamente complicata e che si risolve spontaneamente o risponde ad un intervento medico convenzionale
- Elevazione di amilasi o lipasi di grado 3 che persiste per < 3 settimane e che non è associata a evidenza clinica o radiografica di pancreatite
- 5 • Nausea o emesi di grado 3 che dura < 48 ore e che si risolve a grado  $\leq 1$  spontaneamente o con un intervento medico convenzionale
- Febbre di grado 3 che dura < 72 ore e che non è associata a emodinamica compromessa (incluse ipotensione o evidenza clinica o di laboratorio di perfusione terminale compromessa degli organi)
- Endocrinopatia di grado 3 ben controllata via terapia ormonale sostitutiva
- 10 • Esacerbazione tumorale di grado 3 (definita come dolore, irritazione o rash localizzato in siti di tumore acclarato o sospetto)
- Astenia di grado 3 che dura meno di 7 giorni

#### DLT ematologiche

Uno qualsiasi dei seguenti eventi farmaco-correlati è considerato una DLT ematologica:

- 15 • Neutropenia febbrile di grado 4 di qualsiasi durata
- Neutropenia di grado 4 che dura > 5 giorni
- Trombocitopenia di grado 4
- Anemia di grado 4
- Trombocitopenia di grado 3 associata a sanguinamento clinicamente significativo
- 20 • Neutropenia febbrile di grado 3 che dura > 48 ore
- Emolisi di grado 3

#### 6. Criteri di inclusione

Consenso informato scritto firmato

Prima di sottoporsi a qualsiasi procedura correlata allo studio che non è considerata parte degli standard di cura, il soggetto deve firmare e datare il modulo di consenso scritto approvato da IRB/IEC.

5           Consenso per i campioni biotipici tumorali per l'escalation della dose della parte A o B: Il soggetto deve fornire il consenso per l'acquisizione di un tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) esistente, in  
10           forma di blocchetto o vetrini non colorati, per l'esecuzione di studi di correlazione. In assenza di un campione archiviato disponibile, il soggetto deve fornire il consenso per una biopsia tumorale pre-trattamento. In entrambi i casi, il personale dello studio deve accertare l'esistenza effettiva del blocchetto o dei vetrini di tessuto prima di iniziare la terapia. I  
15           soggetti che non sono in grado di fornire un campione tumorale archiviato, che non forniscono il consenso per una biopsia tumorale pre-trattamento e che non hanno lesioni accessibili non sono eleggibili (a prescindere, i soggetti la cui  
20           biopsia pre-trattamento fornisce un tessuto di quantità o qualità inadeguata non sono eleggibili esclusivamente su questa base).

            Consenso per i campioni biotipici tumorali per l'ampliamento delle coorti della parte C: Soggetti con melanomi o tumori di testa e collo: Tutti i soggetti nelle 2 coorti con melanomi e tutti i soggetti nella coorte con tumori di testa e collo devono sottoporsi a biopsie pre-trattamento e in corso di trattamento; pertanto, i soggetti devono avere una lesione  
15           localizzata per permettere l'ottenimento del provino ad un rischio clinico accettabile giudicato dal ricercatore. I siti di biopsia per tutti i soggetti devono essere distinti da quelli delle lesioni valutabili. I soggetti nelle coorti con melanomi e  
20           cancro di testa e collo che non soddisfano questi criteri non sono eleggibili; a prescindere, i soggetti la cui biopsia di screening fornisce un tessuto di quantità o qualità inadeguata non sono eleggibili esclusivamente su questa base. Soggetti nelle coorti rimanenti (NSCLC o adenocarcinoma gastrico): Il soggetto deve fornire il consenso per  
25           l'acquisizione di un tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) esistente, in forma di blocchetto o vetrini non colorati, per l'esecuzione di studi di correlazione. In assenza di un campione archiviato disponibile, il soggetto deve fornire il consenso per una biopsia tumorale pre-trattamento. In entrambi i casi, il personale dello studio deve accertare l'esistenza effettiva del blocchetto o dei vetrini di tessuto prima di iniziare la terapia. I soggetti che non sono in grado di fornire un campione tumorale archiviato, che non forniscono il consenso per una biopsia tumorale pre-trattamento e che non hanno lesioni accessibili non sono eleggibili (a prescindere, i soggetti la cui biopsia pre-

trattamento fornisce un tessuto di quantità o qualità inadeguata non sono eleggibili esclusivamente su questa base). Le biopsie non devono essere raccolte in soggetti con una singola lesione misurabile anche se accessibile.

Popolazione bersaglio

5 a) I soggetti devono avere una neoplasia maligna solida incurabile istologicamente o citologicamente confermata che è avanzata (metastatica e/o non resecabile):

i) Parte A - escalation della dose: Monoterapia con BMS-986016

(1) Sono ammesse tutte le istologie di tumore solido ad eccezione dei soggetti con tumori primari del SNC

10 (2) Sono ammessi solo i soggetti senza esposizione pregressa a regimi con anticorpi modulanti le cellule immunitarie (ICMAR) come, ma senza limitazioni, CTLA-4, ipilimumab, tremelimumab o anticorpi anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 o anti-OX40;

(3) I soggetti devono aver ricevuto almeno un regime di trattamento standard nello scenario avanzato o metastatico, sempre che tale terapia esista, ed essere poi progrediti o risultati intolleranti a tale regime.

ii) Parte B - escalation della dose: BMS-986016 + BMS-936558

15 (1) Sono ammesse tutte le istologie di tumore solido ad eccezione dei soggetti con tumori primari del SNC. I soggetti con o senza terapia pregressa con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 sono eleggibili. In alternativa, saranno ammesse tutte le istologie di tumore solido naïve a ICMAR come, ma senza limitazioni, anticorpi anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 o anti-OX40, ad eccezione dei soggetti con tumori primari del SNC.

20 (2) I soggetti senza terapia pregressa con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 non devono essere già stati esposti a qualsiasi altro ICMAR come, ma senza limitazioni, ipilimumab, tremelimumab o anticorpi anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 o anti-OX40. In alternativa, i soggetti senza terapia pregressa con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 non devono essere già stati esposti a qualsiasi altro ICMAR come, ma senza limitazioni, ipilimumab, tremelimumab o anticorpi anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 o anti-OX40.

(3) Soggetti con NSCLC la cui malattia progredisce durante o dopo la terapia con un anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente. In alternativa, per i soggetti con terapia pregressa con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente:

5 (a) La malattia non risponde alla terapia con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 e diventa PD (secondo RECIST) entro 16 settimane dall'inizio della terapia.

(b) I soggetti non devono aver interrotto la terapia a causa di tossicità serie e potenzialmente letali che sono correlate all'anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 (ad esempio una tossicità limitante la dose in uno studio precedente).

10 (c) I soggetti devono fornire il consenso informato entro 60 giorni dall'ultima dose di terapia con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1.

(d) I soggetti non devono essere già stati esposti a terapia con ICMAR come, ma senza limitazioni, anti-CTLA-4, ipilimumab, tremelimumab o anticorpi anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 o anti-OX40.

15 (4) Soggetti con melanoma la cui malattia progredisce durante o dopo la ricezione di terapie con anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1 o anti-PD-L1: (a) le terapie con anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1 o anti-PD-L1 dovranno essere state ricevute in regimi sequenziali o combinati, (b) l'ultima dose di terapia con anticorpo anti-CTLA-4 deve essere stata ricevuta  $\geq 100$  giorni dalla prima dose della medicazione di studio, (c) i soggetti non devono aver interrotto la terapia a causa di tossicità serie e potenzialmente letali che sono correlate agli anticorpi (ad esempio una tossicità limitante la dose in uno studio precedente), (d) i soggetti non devono essere già stati

20 (5) I soggetti devono aver ricevuto almeno un regime di trattamento standard ed essere poi progrediti o risultati intolleranti a tale regime.

iii) Parte C - ampliamento delle coorti

(1) Sono arruolabili i seguenti gruppi:

(a) Melanoma - soggetti naïve a ICMAR

(b) Melanoma - soggetti la cui malattia non risponde ad una terapia con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente e diventa PD (secondo RECIST) entro 16 settimane dall'inizio della terapia. Il soggetto deve fornire il consenso informato entro 60 giorni dall'ultima dose di anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 e non dovrà aver interrotto la terapia con l'anticorpo a causa di tossicità serie e/o potenzialmente letali (ad esempio una tossicità limitante la dose in uno studio precedente). Questi soggetti non devono essere già stati esposti a qualsiasi altro ICMAR come, ma senza limitazioni, ipilimumab, tremelimumab o anticorpi anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 o anti-OX40. In alternativa, i soggetti la cui malattia progredisce durante o dopo la ricezione di una terapia con anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1 o anti-PD-L1 (in regimi sequenziali o combinati) sono eleggibili. L'ultima dose di terapia con anticorpo anti-CTLA-4 deve essere stata ricevuta  $\geq$  100 giorni dalla prima dose della medicazione di studio. I soggetti non dovranno aver interrotto la terapia con l'anticorpo a causa di tossicità serie e/o potenzialmente letali (ad esempio una tossicità limitante la dose in uno studio precedente). Questi soggetti non devono essere stati già esposti a qualsiasi ICMAR diverso da una terapia con anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1 o anti-PD-L1.

(c) Cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC) - soggetti naïve a ICMAR

(d) NSCLC - soggetti la cui malattia non risponde ad una terapia con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente e diventa PD (secondo RECIST) entro 16 settimane dall'inizio della terapia. Il soggetto deve fornire il consenso informato entro 60 giorni dall'ultima dose di anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 e non dovrà aver interrotto la terapia con l'anticorpo a causa di tossicità serie e/o potenzialmente letali (ad esempio una tossicità limitante la dose in uno studio precedente). Questi soggetti non devono essere già stati esposti a qualsiasi altro ICMAR come, ma senza limitazioni, ipilimumab, tremelimumab o anticorpi anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 o anti-OX40. In alternativa, soggetti con NSCLC la cui malattia progredisce durante o dopo la terapia con un anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 come terapia più recente. Il soggetto non dovrà aver interrotto la terapia con l'anticorpo a causa di tossicità serie e/o potenzialmente letali (ad esempio una tossicità limitante la dose in uno studio precedente). Questi soggetti

non devono essere già stati esposti a qualsiasi altro ICMAR come, ma senza limitazioni, anticorpi anti-CTLA-4, anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 o anti-OX40.

(e) Tumori di testa e collo associati a HPV - soggetti naïve a ICMAR e con positività a HPV definita come positività all'immunoistochimica (IHC) per p16 e/o come positività all'ibridazione in situ (ISH) per HPV-16

(i) Istologia circoscritta al carcinoma a cellule squamose. In alternativa, per i soggetti con tumori di testa e collo avanzati/metastatici che sono naïve a ICMAR: (i) istologia circoscritta al carcinoma a cellule squamose.

(f) Soggetti con adenocarcinoma gastrico naïve a ICMAR

(i) Sono ammessi i soggetti HER2(+) ed HER2(-)

b) I soggetti devono aver ricevuto almeno un regime di trattamento standard nello scenario avanzato o metastatico, sempre che tale terapia esista, ed essere poi progrediti o risultati intolleranti a tale regime.

c) I soggetti con qualsiasi regime di trattamento pregresso sono eleggibili. Le seguenti non sono considerate linee di trattamento separate: aggiunta di un composto ad un regime in corso, ripresa dello stesso regime dopo un periodo di vacanza dal farmaco, o passaggio dalla terapia EV a quella orale.

d) Presenza di almeno una lesione con malattia misurabile come definita dai criteri RECIST v1.1 per l'accertamento delle risposte. I soggetti con lesioni in un campo già irraggiato come unico sito di malattia misurabile possono arruolarsi a condizione che la/le lesioni abbiano dimostrato una progressione franca prima del consenso informato e possano essere misurate accuratamente.

e) Stato ECOG di 0 o 1.

f) Aspettativa di vita  $\geq$  12 settimane all'atto del consenso informato.

g) Funzione adeguata degli organi definita dai seguenti parametri:

i) Globuli bianchi (WBC)  $\geq$  2000/ $\mu$ L (stabili senza assumere qualsiasi fattore di crescita entro 4 settimane dalla prima somministrazione del farmaco di studio)

- ii) Neutrofili  $\geq 1500/\mu\text{L}$  (stabili senza assumere qualsiasi fattore di crescita entro 4 settimane dalla prima somministrazione del farmaco di studio)
  - iii) Piastrine  $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$  (non è ammessa una trasfusione per raggiungere questo livello entro 2 settimane dalla prima somministrazione del farmaco di studio)
  - 5 iv) Emoglobina  $\geq 8,5 \text{ g/dL}$  (non è ammessa una trasfusione per raggiungere questo livello entro 2 settimane dalla prima somministrazione del farmaco di studio)
  - v) Creatinina  $< 1,5 \times \text{ULN}$  o clearance della creatinina  $\geq 40 \text{ mL/min.}$  (formula di Cockcroft-Gault)
  - vi) ALT e AST  $\leq 3 \times \text{ULN}$
  - vii) Lipasi e amilasi  $< 1,5 \times \text{ULN}$
  - 10 viii) Bilirubina totale  $\leq 1,5 \times \text{ULN}$  (eccetto i soggetti con sindrome di Gilbert che devono avere la bilirubina diretta normale)
  - h) Funzione tiroidea normale o stabile sotto integrazione ormonale
  - i) Capacità di compliance a trattamento, raccolta dei campioni di PK e farmacodinamica, e follow-up di studio obbligatorio.
  - 15 j) Riarruolamento dei soggetti: Questo studio ammette il riarruolamento di un soggetto che ha interrotto lo studio a causa di un errore pre-trattamento (nel senso che il soggetto non è stato randomizzato/non è stato trattato). Se riarruolato, il soggetto deve nuovamente fornire il consenso.
- Età e stato riproduttivo
- a) Uomini e donne, età  $\geq 18$  anni all'atto del consenso informato
  - 20 b) Le donne in età fertile (WOCBP) devono adottare metodi contraccettivi. Se il farmaco di studio è teratogeno e/o le informazioni per accertare la teratogenicità sono insufficienti (non esecuzione di studi preclinici), sono richieste 2 forme di contraccezione. Il primo metodo deve essere altamente efficace (tasso di fallimento minore di 1% quando usato in modo regolare e corretto), e anche il secondo metodo può essere altamente efficace. I singoli metodi contraccettivi dovranno essere determinati previo consulto con il ricercatore. Le WOCBP devono attenersi alle
  - 25 istruzioni di controllo delle nascite per un totale di 24 settimane dall'ultima dose del farmaco sperimentale (un

- periodo di 30 giorni più il tempo necessario affinché il farmaco sperimentale passi attraverso 5 emivite). Una donna in età fertile (WOCBP) è definita come qualsiasi femmina che ha avuto il menarca e che non si è sottoposta a sterilizzazione chirurgica (isterectomia od ooforectomia bilaterale) e non è post-menopausale. La menopausa è definita come 12 mesi di amenorrea in una donna di età superiore a 45 anni in assenza di altre cause biologiche o fisiologiche. Inoltre, per confermare la menopausa, le femmine di età inferiore a 55 anni devono avere un livello documentato di ormone follicolo-stimolante (FSH) nel siero > 40 mIU/mL. Le femmine trattate con una terapia di sostituzione ormonale (HRT) tendono ad avere livelli di FSH artificialmente soppressi e possono richiedere un periodo di washout per raggiungere un livello di FSH fisiologico. La durata del periodo di washout dipende dal tipo di HRT usato. Le durate riportate sotto per il periodo di washout sono linee guida suggerite, e i ricercatori dovranno usare il loro giudizio per controllare il livelli sierici di FSH. Se il livello sierico di FSH è >40 mIU/ml in qualsiasi momento durante il periodo di washout, la donna può essere considerata post-menopausale.
- 5
- 10
- 15
- 20
- Minimo di 1 settimana per i prodotti ormonali vaginali (anelli, creme, gel)
  - Minimo di 4 settimane per i prodotti transdermici
  - Minimo di 8 settimane per i prodotti orali
  - Altri prodotti parenterali possono richiedere periodi di washout fino a 6 mesi.
  - c) Le donne devono avere un test di gravidanza negativo nel siero o nell'urina (sensibilità minima del test di gravidanza nell'urina di 25 IU/l per la gonadotropina corionica umana (hCG) o la frazione beta) entro 24 ore prima dell'inizio del prodotto sperimentale.
  - d) Le donne non devono allattare al seno.
  - e) Gli uomini sessualmente attivi con WOCBP devono adottare metodi contraccettivi. Se il farmaco di studio è teratogeno e/o le informazioni per accertare la teratogenicità sono insufficienti (non esecuzione di studi preclinici), sono richieste 2 forme di contraccezione. Il primo metodo deve essere altamente efficace (tasso di fallimento minore di 1% quando usato in modo regolare e corretto), e anche il secondo metodo può essere altamente efficace. Gli uomini sessualmente attivi con WOCBP devono attenersi alle istruzioni di controllo delle nascite per un totale di 33

settimane dall'ultima dose del farmaco sperimentale (un periodo di 90 giorni più il tempo necessario affinché il farmaco sperimentale passi attraverso 5 emivite).

5 Le donne non in età fertile (ovvero post-menopausali o chirurgicamente sterili) e gli uomini in stato di azoospermia permanente (ad esempio per orchietomia bilaterale) non richiedono contraccezione. Le donna in età fertile (WOCBP) sono definite come femmine che hanno avuto il menarca e che non si sono sottoposte a sterilizzazione chirurgica (isterectomia od ooforectomia bilaterale) e non sono post-menopausali. La menopausa è clinicamente definita come 6 mesi di amenorrea in una donna di età superiore a 45 anni in assenza di altre cause biologiche o fisiologiche. Inoltre, per confermare la menopausa, le donne di età inferiore a 55 anni devono avere un livello documentato di ormone follicolo-stimolante (FSH) nel siero > 40 mIU/mL.

## 10 7. Criteri di esclusione

### Eccezioni per le malattie bersaglio

Sono esclusi i soggetti con metastasi acclerate o sospette nel SNC o in cui il SNC è l'unico sito di malattia attiva, con le seguenti eccezioni:

15 i) I soggetti con metastasi cerebrali controllate possono arruolarsi. Le metastasi cerebrali controllate sono definite come quelle senza progressione radiografica di almeno 4 settimane dopo un trattamento radioterapico e/o chirurgico all'atto del consenso. I soggetti non devono aver assunto steroidi per almeno 2 settimane prima del consenso informato, e non devono presentare segni o sintomi neurologici nuovi o progressivi.

ii) I soggetti con segni o sintomi di metastasi cerebrali non sono eleggibili a meno che le metastasi cerebrali non vengano escluse alla tomografia computerizzata (TC) o alla risonanza magnetica per immagini (MRI).

20 Partecipazione a qualsiasi studio clinico precedente con BMS-936558, inclusi i soggetti nei bracci comparatori, in cui la sopravvivenza globale è elencata come endpoint primario o co-primario, senza che il soggetto abbia completato l'analisi basata sull'endpoint primario.

### Anamnesi e malattie concomitanti

25 I soggetti con neoplasia maligna progressa sono esclusi eccetto quelli con cancro della pelle a cellule basali o cellule squamose, cancro della prostata localizzato, carcinoma in situ della cervice, carcinoma in situ della vescica, o

carcinoma duttale o lobulare in situ della mammella adeguatamente trattato. Sono eleggibili i soggetti con altre neoplasie maligne pregresse diagnosticate più di 2 anni prima (all'atto del consenso informato) che hanno ricevuto una terapia con intento curativo senza evidenza di malattia durante l'intervallo e che sono considerati a basso rischio di recidiva.

5 Soggetti con qualsiasi malattia autoimmune attiva o storia di malattia autoimmune acclarata o sospetta ad eccezione dei soggetti con vitiligine isolata, asma/atopia infantile risolto, ipoadrenalismo o ipopituitarismo controllato e dei pazienti eutiroidei con storia di malattia di Graves (i soggetti con ipertiroidismo controllato devono essere negativi agli anticorpi anti-tireoglobulina e anti-perossidasi tiroidea e alle immunoglobuline stimolanti la tiroide prima della somministrazione del farmaco di studio).

10 Condizione medica acclarata o soggiacente che potrebbe rendere pericolosa la somministrazione del farmaco di studio per il soggetto o che potrebbe influenzare negativamente la capacità del soggetto di rispettare o tollerare lo studio.

Necessità di ossigenoterapia giornaliera.

15 Cardiovascolopatia incontrollata o significativa tra cui, ma senza limitazioni, una qualsiasi delle seguenti: infarto del miocardio o ictus/attacco ischemico transitorio (TIA) entro 6 mesi prima del consenso, angina incontrollata entro 3 mesi prima del consenso, qualsiasi storia di aritmia clinicamente significativa (come tachicardia ventricolare, fibrillazione ventricolare o torsione di punta), QTc prolungato > 480 ms, storia di altra cardiopatia clinicamente significativa (ovvero cardiomiopatia, scompenso cardiaco congestizio di grado III-IV secondo la classificazione funzionale della New York Heart Association [NYHA], pericardite, versamento pericardico significativo).

20 Necessità di ossigenoterapia giornaliera correlata a cardiovascolopatia.

Storia confermata di encefalite, meningite o convulsioni incontrollate nell'anno che precede il consenso informato.

Ematologia positiva al virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) acclarata.

Storia di qualsiasi epatite cronica evidenziata da test positivo agli anticorpi anti-epatite A (IgM anti-HepA) (nota: una storia di infezione da virus dell'epatite A risulta non è un criterio di esclusione), test positivo all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) e/o all'antigene core dell'epatite B, test positivo alla carica virale qualitativa dell'epatite C (via PCR).

- 5 Evidenza di infezione attiva che richiede una terapia antibatterica, antivirale o antimicotica attiva  $\leq 7$  giorni prima dell'inizio della terapia con il farmaco di studio.
- Qualsiasi altra patologia medica acuta o cronica significativa.
- Soggetti incapaci di sottoporsi a venipuntura e/o di tollerare un accesso venoso.
- Qualsiasi altro motivo medico, psichiatrico e/o sociale attendibile.
- 10 Una qualsiasi delle seguenti procedure o medicazioni:
- Entro 2 settimane dall'atto del consenso informato: corticosteroidi sistemici o topici a dosi immunosoppressive ( $\geq 7,5$  mg/giorno di prednisone o equivalente), radiazione palliativa e radiocirurgia stereotassica nel SNC, o preparazioni erboristiche medicinali.
- Entro 4 settimane dalla somministrazione del farmaco di studio: qualsiasi farmaco sperimentale o placebo, qualsiasi
- 15 terapia anticancro (chemioterapia, prodotti biologici, vaccini terapeutici, radioterapia o trattamento ormonale), vaccini non oncologici contenenti virus vivi, terapia di iposensibilizzazione ad allergeni, fattori di crescita, ad esempio fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF), eritropoietina, interventi chirurgici importanti, o bifosfonati.
- Entro 10 settimane dalla somministrazione del farmaco di studio: inibitori dell'attivatore del recettore del fattore
- 20 nucleare kappa-B (RANK-L).
- Allergie e reazioni avverse al farmaco
- Storia di allergia a terapia con anticorpo anti-PD-1 o anti-PD-L1, ad altri anticorpi monoclonali o composti correlati o a qualsiasi dei loro componenti (ad esempio, storia di reazioni di ipersensibilità severa a farmaci formulati con polisorbato 80).
- 25 Altri criteri di esclusione

Detenuti o soggetti incarcerati involontariamente.

Individui soggetti a ricovero coatto per il trattamento di una patologia psichiatrica o fisica (ad esempio una malattia infettiva).

Incapacità di rispettare le restrizioni e le proibizioni in termini di attività e trattamenti.

## 5 8. Linee guida per la modifica delle dosi

Questo studio non ammette un'escalation della dose intra-soggetto per BMS-986016 o BMS-936558. Con la possibile eccezione dei soggetti trattati ad un livello di dose che viene successivamente giudicato superiore alla MTD, non è permesso ridurre la dose intra-soggetto di BMS-986016 o BMS-936558.

10 In alcuni casi, la storia naturale di eventi avversi selezionati che sono associati all'immunoterapia può essere differente e più severa rispetto agli eventi avversi causati da altre classi di prodotti terapeutici. Le tossicità severe possono essere mitigate attraverso misure tempestive di riconoscimento e gestione.

Inoltre, gli algoritmi gestionali possono essere d'aiuto con tossicità selezionate. Le tossicità per cui sono stati sviluppati algoritmi gestionali comprendono:

- Polmonari
- 15 • Gastrointestinali
- Epatiche
- Endocrine
- Renali
- Dermatologiche
- 20 • Neurologiche

I soggetti che sperimentano quanto segue devono sospendere tutti i farmaci di studio (uno o più):

- DLT (che sono correlate al farmaco di studio per definizione)
- Eventi avversi farmaco-correlati selezionati e anomalie di laboratorio farmaco-correlate selezionate:
  - Infiammazione polmonare di grado  $\geq 1$

- Anomalia in AST, ALT, bilirubina totale, amilasi, o lipasi di grado  $\geq 2$
- Creatinina di grado  $\geq 2$
- Diarrea o colite di grado  $\geq 2$
- Eventi neurologici avversi di grado  $\geq 2$

- 5
- Un evento avverso, un'anomalia di laboratorio o una patologia concomitante che, a giudizio del ricercatore, legittima il differimento della dose del farmaco di studio.

Le dosi con ritardo  $> 7$  giorni sono considerate perse e non devono essere sostituite.

#### 9. Accertamenti correlati alla sicurezza

Gli eventi avversi vengono accertati continuamente durante lo studio e per 135 giorni dall'ultimo trattamento.

- 10 Gli eventi avversi vengono valutati secondo i criteri NCI CTCAE versione 4.0. Gli eventi avversi vengono codificati usando la versione più recente del dizionario medico per le attività di regolamentazione (MedDRA) e riesaminati per determinarne il potenziale di significato e importanza.

#### 10. Altre analisi

- 15 Come elencato sotto nella Tabella 4, i marcatori tumorali sierologici, gli stati di mutazione genica e le analisi aggiuntive necessarie variano a seconda del tipo di tumore del soggetto. Ad eccezione dei marcatori tumorali sierologici, gli accertamenti non vengono eseguiti in caso di disponibilità di risultati di laboratorio di test precedenti.

Tabella 4: Biomarcatori per tipo di tumore

Tipo di tumore	Parte dello studio	Matrice	Test di laboratorio	Accertamento	Punto temporale
Colon-retto	SOLO parti A, B	Sangue	Marcatore tumorale sierologico	CEA <sup>a</sup>	Molteplici
	SOLO parti A, B	Tessuto tumorale	Stato di mutazione genica	EGFR <sup>b</sup> K-RAS MSI <sup>c</sup>	Screening

Gastrico	Parti A, B, C	Sangue	Marcatore tumorale sierologico	CEA <sup>a</sup>	Molteplici
	Parti A, B, C	Tessuto tumorale	Stato di mutazione genica	HER-2 <sup>d</sup>	Screening
	Parti A, B, C	Tessuto tumorale	qPCR in tempo reale <sup>e</sup>	EBV <sup>f</sup>	Screening
Cellule germinali	SOLO parti A, B	Sangue	Marcatore tumorale sierologico	$\beta$ hCG <sup>g</sup> AFP <sup>h</sup>	Molteplici
Testa e collo	SOLO parte C	Tessuto tumorale	IHC e/o ISH <sup>i</sup>	HPV <sup>j</sup>	Screening (eleggibilità)
Melanoma	Parti A, B, C	Tessuto tumorale	Stato di mutazione genica	BRAF	Screening
NSCLC	Parti A, B, C	Tessuto tumorale	Stato di mutazione genica	ALK <sup>k</sup> K-RAS EGFR <sup>b</sup>	Screening
Ovaio	SOLO parti A, B	Sangue	Marcatore tumorale sierologico	CA125 <sup>l</sup>	Molteplici
Prostata	SOLO parti A, B	Sangue	Marcatore tumorale sierologico	PSA <sup>m</sup>	Molteplici

a CEA: antigene carcinoembrionario  
 b EGFR: recettore per il fattore di crescita dell'epidermide  
 c MSI: instabilità dei microsatelliti  
 d HER-2: stato del recettore per il fattore di crescita dell'epidermide umana-2 via IHC e/o ISH  
 e qPCR in tempo reale: reazione a catena della polimerasi in tempo reale quantitativa per il gene della cornice di lettura-1 di BamHI-A (BARF1)  
 f EBV: virus di Epstein-Barr  
 g  $\beta$ hCG: beta-gonadotropina corionica umana  
 h AFP: alfa-fetoproteina  
 i IHC e/o ISH: immunoistochimica (IHC) per p16 e/o ibridazione in situ (ISH) per HPV-16  
 j HPV: papilloma virus umano  
 k ALK: chinasi del linfoma anaplastico  
 l CA125: antigene tumorale 125  
 m: PSA: antigene prostata-specifico

Le misure aggiuntive, tra cui i test di laboratorio non richiesti dallo studio, vengono condotte su indicazione clinica. I risultati di tutti gli esami di laboratorio richiesti da questo protocollo vengono registrati.

#### 11. Accertamenti correlati all'efficacia

5 L'efficacia viene valutata sia nelle parti A e B (escalation della dose) che nella parte C (ampliamento delle coorti). Nel corso di ciascuno degli accertamenti, vengono determinati i cambiamenti nelle misurazioni tumorali e nella risposta tumorale. L'accertamento basale durante il periodo di screening richiede scansioni TC o MRI di torace, addome e pelvi e di altre regioni anatomiche suggerite dal tipo di tumore e/o dall'anamnesi patologica del singolo soggetto. I punti temporali successivi richiedono scansioni di torace, addome e pelvi e delle altre regioni anatomiche che sono state scansionate al basale in funzione del tipo di tumore e/o dell'anamnesi patologica del singolo soggetto. Le scansioni del  
 10 cervello sono comunque richieste su indicazione clinica.

Le analisi degli endpoint di risposta vengono condotte secondo i criteri di risposta immunocorrelati irRECIST che riflettono l'esperienza clinica con altre immunoterapie dirette alle cellule T in cui i soggetti mostravano risposte obiettive e durature dopo la progressione e senza interferenza di una terapia anticancro alternativa (Wolchok J. D. et al., Clin. Can. Res. 2009; 15(23):7412-7420). All'occorrenza, vengono calcolate la migliore risposta globale (BOR), la durata di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la durata della risposta (DOR) del singolo soggetto.

Gli stati dei tumori vengono accertati al basale, durante il trattamento (ogni 8 settimane) per un massimo di dodici cicli di 8 settimane di terapia, e una volta durante il follow-up. Le scansioni CT e MRI acquisite vengono valutate localmente secondo RECIST v1.1. Tutte le immagini scansionate vengono rese anonime e archiviate nel loro formato DICOM nativo (Digital Imaging & Communications in Medicine) come parte del file di studio del soggetto.

Gli accertamenti dell'efficacia comprendono i criteri ORR (ad esempio PR + CR), DOR e PFSR ai punti temporali di reperi (ad esempio 24 settimane) basati sull'accertamento della risposta tumorale usando irRECIST e RECIST v1.1. Sopravvivenza globale (OS) ai 2 anni.

#### 12. Accertamenti farmacocinetici

Gli accertamenti della farmacocinetica e degli anticorpi anti-farmaco (ADA) per BMS-986016 vengono condotti su campioni di siero raccolti da tutti i soggetti. Tutti i soggetti arruolati nelle parti B e C forniscono campioni di siero per gli accertamenti della farmacocinetica e degli ADA per BMS-936558. I campioni di siero vengono analizzati per BMS-986016 e BMS-936558 attraverso un immunosaggio validato. In aggiunta, alcuni campioni di siero selezionati vengono analizzati attraverso un metodo ortogonale esplorativo (ad esempio via cromatografia liquida [LC]-spettrometria di massa [MS]/MS) che misura il livello totale di BMS-986016 e/o BMS-936558.

#### 13. Accertamento esplorativo dei biomarcatori

La farmacodinamica del trattamento con BMS-986016 somministrato da solo o in combinazione con BMS-936558 viene valutata quantificando i biomarcatori nel sangue periferico e nel tessuto tumorale dei primi 3 soggetti arruolati a ciascun livello di dose durante la fase di escalation della dose (parti A e B) e dei soggetti con melanomi e cancri di testa e collo durante la fase di ampliamento delle coorti (parte C) dello studio. Le Tabelle 5-6 sottostanti

forniscono i programmi dettagliati delle valutazioni farmacodinamiche. La Tabella 7 sottostante fornisce i dettagli sui requisiti dei tessuti tumorali per i soggetti nelle parti A, B e C dello studio.

Tabella 5A: Parti A e B (escalation della dose) - Programma di campionamento dei biomarcatori (SOLO per i primi 3 soggetti a ciascun livello di dose)

Tempo di raccolta	Siero	PBMC		Tumore	Sangue intero	
Giorno di studio	Biomarc. sol. (biomarc. siero)	Immunofenotip. / tetramero (flussocit./PBM C)	Saggio funz. ex vivo (saggio cellulare)	Tessuto d'archivio <sup>a</sup>	Espres. genica (mRNA sangue intero)	SN P
Screening				X		
Ciclo 1						
Giorno 1	X	X	X		X	X
Giorno 5 <sup>a</sup>	X					
Giorno 8	X	X				
Giorno 15	X	X			X	
Giorno 29	X	X			X	
Giorno 43	X	X	X		X	
Ciclo 2						
Giorno 29	X	X	X		X	
Alla progressione						
Alla progressione <sup>b</sup>	X	X	X	X	X	

a La visita del giorno 5 può essere effettuata il giorno 3 o il giorno 4  
 b Opzionale; raccolta effettuata previa conferma di PD  
 NOTA: Tutti i campioni vengono prelevati pre-dose

Tabella 5B: Parti A e B (escalation della dose) - Programma di campionamento dei biomarcatori (SOLO per i primi 3 soggetti a ciascun livello di dose)

Tempo di raccolta	Siero	PBMC		Tumore	Sangue intero	
Giorno di studio	Biomarc. sol. (biomarc. siero)	Immunofenotip./ tetramero (flussocit./PBMC)	Saggio funz. ex vivo (saggio cellulare)	Tessuto d'archivio	Espres. genica (mRNA sangue intero)	SNP
Screening				X		
Ciclo 1						
Giorno 1	X	X	X		X	X
Giorno 5 <sup>b</sup>	X					
Giorno 8	X	X				
Giorno 15	X	X			X	
Giorno 29	X	X			X	
Giorno 43	X	X	X		X	
Ciclo 2						
Giorno 29	X	X	X		X	
Alla progressione						

Alla progressione <sup>b</sup>	X	X	X	X	X	
Alla comparsa di un AE farmaco-correlato						
Alla comparsa di infiam. polmonare farmaco-correlata grado $\geq 2$ o AE neurologico	X	X	X			
<p>a La visita del giorno 5 può essere effettuata il giorno 3 o il giorno 4. La visita del giorno 8 può essere effettuata il giorno 7 o il giorno 9.</p> <p>b Opzionale; raccolta effettuata previa conferma di PD</p> <p>NOTA: Tutti i campioni vengono prelevati pre-dose</p>						

Tabella 6A: Parte C (ampliamento delle coorti) - Programma di campionamento dei biomarcatori (SOLO per i soggetti con melanoma e cancro di testa e collo)

Tempo di raccolta	Siero	PBMC		Tumore	Sangue intero	
Giorno di studio	Biomarc. sol. (biomarc. siero)	Immunofenotip./ tetramero (flussocit./PBMC)	Saggio funz. ex vivo (saggio cellulare)	Biopsia tumorale "fresca"	Espres. genica (mRNA di sangue intero)	SNP
Screening				X <sup>a</sup>		

Ciclo 1						
Giorno 1	X <sup>b</sup>	X	X		X	X
Giorno 5 <sup>c</sup>	X					
Giorno 8	X	X				
Giorno 15	X	X			X	
Giorno 29	X	X			X	
Giorno 43	X	X	X		X	
Giorni 50-56				X <sup>d</sup>		
Ciclo 2						
Giorno 29	X	X	X		X	
Alla progressione						
Alla progressione <sup>e</sup>	X	X	X	X	X	
<p>NOTA: Tutti i campioni vengono prelevati pre-dose</p> <p><sup>a</sup> La biopsia tumorale deve essere fresca per i soggetti con melanoma e cancro di testa e collo nella parte C.</p> <p><sup>b</sup> Siero e plasma per il giorno 1 del ciclo 1. Solo siero per tutti gli altri punti temporali.</p> <p><sup>c</sup> La visita del giorno 5 può essere effettuata il giorno 3 o il giorno 4</p> <p><sup>d</sup> La biopsia tumorale deve essere fresca per i soggetti con melanoma e cancro di testa e collo nella parte C. La biopsia viene ottenuta in qualsiasi momento durante la settimana 8 del ciclo 1 (giorni 50-56) in concomitanza con l'acquisizione delle immagini diagnostiche.</p> <p><sup>e</sup> Opzionale; raccolta effettuata previa conferma di PD</p>						

Tabella 6B: Parte C (ampliamento delle coorti) - Programma di campionamento dei biomarcatori (SOLO per i soggetti con melanoma e cancro di testa e collo)

Tempo di raccolta	Siero	Plasma	PBMC <sup>b</sup>		Tumore	Sangue intero	
Giorno di studio	Biomarc. solubili	(biomarc. c. siero)	Immunofen./ tetramero (flussocit./ PBMC)	Saggio funz. ex vivo (saggio cellulare)	Biopsia tumorale "fresca"	Espress. genica (mRNA di sangue intero)	SNP
Screening					X <sup>a</sup>		
Ciclo 1							
Giorno 1	X	X	X	X		X	X
Giorno 5 <sup>c</sup>	X						
Giorno 8 <sup>c</sup>	X		X				
Giorno 15	X		X			X	
Giorno 29	X	X	X			X	
Giorno 36	X		X			X	
Giorno 43	X	X	X	X		X	
Giorni 50-56					X <sup>d</sup>		
Ciclo 2							
Giorno 29	X		X	X		X	
Alla progressione							
Alla progressione <sup>e</sup>	X		X	X	X	X	
Alla comparsa di un AE farmaco-correlato							

<p>Alla comparsa di infiam. polmonare farmaco-correlata grado <math>\geq 2</math> o AE neurologico</p>	X		X	X			
<p>a La biopsia tumorale deve essere fresca per i soggetti con melanoma e cancro di testa e collo nella parte C.</p> <p>b I campioni di PBMC devono essere raccolti solo dai soggetti negli USA, non richiesti per i soggetti extra-USA.</p> <p>c La visita del giorno 5 può essere effettuata il giorno 3 o il giorno 4. La visita del giorno 8 può essere effettuata il giorno 7 o il giorno 9.</p> <p>d La biopsia tumorale deve essere fresca per i soggetti con melanoma e cancro di testa e collo nella parte C. La biopsia può essere ottenuta in qualsiasi momento durante la settimana 8 del ciclo 1 (giorni 50-56) in concomitanza con l'acquisizione delle immagini diagnostiche.</p> <p>e Opzionale; da raccogliere previa conferma di PD.</p>							

Tabella 7: Requisiti dei tessuti tumorali per le parti A, B e C

Parte dello studio	Parti A e B (escalation della dose)	Parte C (ampliamento delle coorti)	
Soggetti	TUTTI i soggetti nella parte A o B	SOLO soggetti con melanomi o tumori di testa e collo	SOLO soggetti con NSCLC o adenocarcinoma gastrico

Tipo di provino	Tessuto tumorale archiviato. In assenza di un campione archiviato disponibile, la biopsia tumorale pre-trattamento deve essere ottenuta "fresca"	Biopsie "fresche" obbligatorie (pre-trattamento e in corso di trattamento)	Tessuto tumorale archiviato. In assenza di un campione archiviato disponibile, la biopsia tumorale pre-trattamento deve essere ottenuta "fresca"
Alla progressione	Biopsia "fresca" opzionale previa conferma di PD	Biopsia "fresca" opzionale previa conferma di PD	Biopsia "fresca" opzionale previa conferma di PD

Biomarcatori solubili (biomarcatori del siero) - parti A, B e C

I livelli sierici pre-trattamento e in corso di trattamento di chemochine, citochine e proteine solubili tumore-associati vengono accertati attraverso tecniche che comprendono, ma senza limitazioni, saggi ELISA o saggi multiplex. Gli analiti comprendono marcatori di infiammazione, marcatori di immunoattivazione, fattori di crescita tumorale dell'ospite e proteine di derivazione tumorale.

5

Anticorpi antitumorali (biomarcatori sierici) - parti A, B e C

Il trattamento con BMS-986016 e BMS-936558 potrà causare la generazione di nuovi anticorpi contro antigeni tumore-associati o potrà indurre un aumento di quelli esistenti. L'accertamento degli anticorpi contro un pannello di > 8000 proteine viene condotto attraverso saggi ELISA o multiplex usando il siero pre-trattamento e in corso di trattamento. Questi dati vengono usati non solo per esplorare l'eventuale associazione tra gli anticorpi antitumorali e la risposta clinica e i parametri di sicurezza, ma anche per ottenere informazioni sulla farmacodinamica associata alla somministrazione del farmaco.

10

Immunofenotipizzazione (flussocitometria/PBMC) - parti A, B e C

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) vengono usate per caratterizzare e quantificare lo stato di attivazione e regolazione delle cellule mieloidi e linfoidi via flussocitometria policromatica. I sottoinsiemi di cellule che vengono caratterizzati attraverso l'immunofenotipizzazione comprendono le popolazioni di cellule T effettrici e memoria naïve, attivate ed esaurite, le cellule T regolatorie, e le cellule soppressorie di derivazione mieloide.

5 Saggi funzionali ex vivo (saggi cellulari) - parti A, B e C

Per capire se la combinazione BMS-986016 + BMS-936558 sia in grado di ripristinare l'attivazione e la funzione delle cellule T, le PBMC vengono isolate e criopreservate. Lo stato funzionale delle cellule T effettrici tra cui, ma senza limitazioni, IFN- $\gamma$  e granzima B, viene accertato mediante colorazione flussocitometrica.

Espressione genica nel sangue periferico (mRNA di sangue intero) ed espressione genica nel tumore - parti A, B e C

10 Il livello di espressione dei geni correlati alla risposta a BMS-986016  $\pm$  BMS-936558 viene quantificato su campioni di sangue intero e di tumore via analisi su microarray o via analisi per reazione a catena della polimerasi con retrotrascrizione (RT-PCR) quantitativa. L'analisi comprende, senza esserne necessariamente limitata, i geni codificanti per funzioni effettrici stimulate da BMS-986016 (perforina, granzima B e IFN- $\gamma$ ) e i geni codificanti per recettori costimolatori delle cellule T (PD-1, PD-L1 e CTLA-4).

15 Analisi del DNA tumorale circolante (biomarcatori sierici (plasmatici)) - parte C

La presenza di DNA acellulare nel sangue circolante è un fenomeno ben documentato. Le cellule che si dividono durante la proliferazione cellulare o la morte cellulare riversano frammenti di DNA nel flusso sanguigno. Nei pazienti oncologici, una frazione di questo DNA deriva dal tumore e prende il nome di DNA tumorale circolante (ctDNA). Benché piccoli, i frammenti di DNA hanno una dimensione media tra 180 e 200 bp, e alcune loro regioni genomiche specifiche possono essere amplificate via PCR. Inoltre, diversi studi hanno rilevato mutazioni nel ctDNA che corrispondono esattamente alle mutazioni presenti nel tumore di provenienza. Adoperando il tessuto e il plasma di pazienti con mutazioni pilota acclarate nel melanoma o nel cancro di testa e collo, la frequenza delle mutazioni nella circolazione viene contata adoperando la tecnologia BEAMing.

20 Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) - parti A, B e C

Per identificare i potenziali polimorfismi associati alla sicurezza e all'efficacia di BMS-986016, alcuni geni selezionati vengono valutati per i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP). I geni d'interesse comprendono, ma senza limitazioni, PD-1, PD-L1, MHC di classe II, LAG-3 e CTLA-4.

Analisi delle biopsie tumorali - parti A e B

5 Il tessuto tumorale viene raccolto da tutti i soggetti che si trovano nel braccio di escalation della dose del protocollo. L'accertamento del numero e della composizione degli infiltrati immunitari via immunoistochimica permette di definire i sottoinsiemi di cellule immunitarie che sono presenti all'interno del tessuto tumorale FFPE prima di e potenzialmente dopo l'esposizione a BMS-986016 e a BMS-936558. Queste analisi via IHC comprendono, senza esserne necessariamente limitate, i seguenti marcatori: CD4, CD8, LAG-3, MHC II, PD-1, PD-L1 e PD-L2. Tra i saggi, vengono effettuate correlazioni tra l'espressione genica e l'espressione IHC se ritenute utili a livello informativo.

10 Misurazione dei biomarcatori di derivazione tumorale - parte C

Tutti i soggetti con melanoma o cancro di testa e collo che sono arruolati nella Parte C (ampliamento delle coorti) devono essere sottoposti a biopsie tumorali pre-trattamento e in corso di trattamento appaiate. I soggetti le cui biopsie pre-trattamento e in corso di trattamento appaiate non sono adeguate possono essere sostituiti.

15 I soggetti devono avere almeno una lesione abbastanza grande da poter essere sottoposta a biopsie ripetute (biopsie pre-trattamento e in corso di trattamento) attraverso un ago a scatto (calibro minimo 18 gauge), o devono avere almeno 2 lesioni distinte passibili di biopsia con ago a scatto o escissionale. La lunghezza prevista dell'ago a scatto dovrà essere maggiore di 5 mm. Per le lesioni cutanee, è accettabile la biopsia a punzone. Le biopsie aspirative con ago sottile non sono accettate. Benché le biopsie con ago a scatto da eseguire in ciascun punto temporale debbano essere almeno due, la raccolta di ulteriori campioni è fortemente incoraggiata se giudicata clinicamente sicura dal ricercatore. L'accertamento della qualità della biopsia da parte di un patologo al momento della procedura è fortemente incoraggiato. Per tutte le biopsie raccolte, il provino deve essere accompagnato da un report patologico dettagliato.

20 I provini biotipici tumorali vengono ottenuti dai soggetti previo consenso prima e durante il trattamento con BMS-986016 e BMS-936558 in modo da caratterizzare le popolazioni di cellule immunitarie e l'espressione di marcatori tumorali selezionati. I campioni biotipici vengono usati per i seguenti accertamenti:

- Caratterizzazione dei TIL e degli antigeni tumorali. L'accertamento del numero e della composizione degli infiltrati immunitari via immunohistochimica permette di definire i sottoinsiemi di cellule immunitarie che sono presenti all'interno del tessuto tumorale FFPE prima e dopo l'esposizione a BMS-986016 e a Nivolumab. Queste analisi via IHC comprendono, senza esserne necessariamente limitate, i seguenti marcatori: CD4, CD8, LAG-3, MHC II, PD-1, PD-L1 e PD-L2. Tra i saggi, vengono effettuate correlazioni tra l'espressione genica e l'espressione IHC se ritenute utili a livello informativo.
- Microdissezione a cattura laser. L'isolamento del tumore e/o dei TIL sulle sezioni FFPE viene condotto via microdissezione a cattura laser (LCM) per ottenere una profilazione ad alto rendimento degli eventi molecolari all'interno del microambiente del tumore.
- Caratterizzazione del repertorio di cellule T. Il tessuto tumorale FFPE pre- e post-trattamento viene sottoposto a sequenziamento del DNA per accertare la composizione del repertorio di cellule T. Un basso grado di diversità dei recettori per le cellule T può essere un fattore prognostico infausto di sopravvivenza globale nei pazienti con cancro della mammella metastatico. Partendo dall'ipotesi che il meccanismo principale di BMS-936558 e BMS-986016 sia il ripristino funzionale dell'immunità antitumorale delle cellule T, la comprensione della diversità dei recettori per le cellule T come fattore predittivo della risposta all'immunoterapia è attualmente scarsa. La diversità del compartimento di cellule T nella periferia e all'interno del tumore viene dunque caratterizzata al basale e in corso di trattamento mediante sequenziamento di prossima generazione del DNA dei recettori per le cellule T. L'analisi del repertorio di cellule T viene anche condotta sul DNA isolato dal sangue periferico per confrontare lo stato del tumore e il repertorio di cellule T periferiche pre- e post-trattamento.
- Profilazione dell'espressione genica. Le biopsie tumorali raccolte in RNAlater o reagente simile vengono esaminate per l'espressione dei geni per mRNA attraverso la tecnologia di array genico Affymetrix e/o attraverso la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (qPCR) quantitativa in modo da rilevare l'espressione di geni immunocorrelati selezionati.
- Espressione in situ delle citochine e dei regolatori negativi. Le biopsie tumorali vengono valutate quantitativamente per gli RNA, tra cui quelli di CD3, IFN- $\gamma$ , LAG-3 e PD-1.

I soggetti la cui biopsia di screening fornisce un tessuto di quantità o qualità inadeguata possono proseguire lo studio. Anche i soggetti la cui biopsia in corso di trattamento non va a buon fine proseguono lo studio. Tali soggetti vengono rimpiazzati in modo da ottenere 48 soggetti con biopsie tumorali appaiate adeguate. È possibile che i soggetti che mostrano una risposta al trattamento non possano fornire biopsie in corso di trattamento. Anche in questo caso, i  
5 soggetti proseguono lo studio.

Il tessuto tumorale ottenuto da queste biopsie viene equamente suddiviso in campioni FFPE e campioni congelati che possono essere usati sia per confermare istologicamente i melanomi che per eseguire i saggi elencati sopra.

Le biopsie vengono effettuate sotto anestesia locale o sedazione cosciente. Le linee guida seguite sono quelle  
10 istituzionali per l'esecuzione delle biopsie in sicurezza. Alcuni campioni biotipici tumorali vengono ottenuti mediante biopsia escissionale. I provini biotipici non possono essere ottenuti attraverso procedure invasive che richiedono un'anestesia generale. Tuttavia, in caso di esecuzione di una procedura chirurgica per un'indicazione clinica, il tessuto tumorale eccedente potrà essere usato per scopi di ricerca con il consenso del soggetto.

#### 14. Accertamenti correlati all'immunogenicità

15 I campioni di siero raccolti nei punti temporali vengono analizzati attraverso un saggio immunogenico validato. I campioni di siero selezionati vengono analizzati attraverso un metodo ortogonale esplorativo che misura gli anti-BMS-986016 o gli anti-BMS-936558. I potenziali risultati generati da qualsiasi metodo ortogonale intendono assumere una valenza informativa per scopi di esplorazione tecnologica e non vengono riportati.

In aggiunta, se necessario, l'analisi dell'immunogenicità adopera campioni di siero ad hoc da usare  
20 appositamente per gli accertamenti della farmacocinetica o dei biomarcatori (ad esempio quando il volume è insufficiente per ottenere una valutazione completa dell'immunogenicità o quando si desidera monitorare un sospetto evento avverso correlato all'immunogenicità).

#### 15. Eventi avversi

25 Per definizione, un evento avverso (AE) è qualsiasi manifestazione medica indesiderata nuova o qualsiasi peggioramento di una condizione medica preesistente in un soggetto sotto investigazione clinica a cui viene

somministrato un prodotto (medicinale) sperimentale, senza necessariamente mostrare una relazione causale con questo trattamento. Un AE è dunque qualsiasi segno (come un reperto di laboratorio anormale), sintomo o disturbo sfavorevole e impreveduto che è temporalmente associato all'uso del prodotto sperimentale a prescindere dal fatto che esso venga giudicato correlato al prodotto sperimentale.

5 La relazione causale con il farmaco di studio viene determinata da un medico e usata per accertare tutti gli eventi avversi (AE). La relazione causale può essere una delle seguenti:

Correlata: Esiste una relazione causale ragionevole tra la somministrazione del farmaco di studio e l'AE.

Non correlata: Non esiste una relazione causale ragionevole tra la somministrazione del farmaco di studio e l'AE.

10 L'espressione "relazione causale ragionevole" intende l'esistenza di un'evidenza che suggerisce una relazione causale.

Eventi avversi seri

Un evento avverso serio (SAE) è qualsiasi manifestazione medica indesiderata che, a qualsiasi dose:

- causa il decesso
  - è potenzialmente letale (definito come un evento in cui il soggetto era a rischio di decesso al momento dell'evento; non identifica un evento che avrebbe potuto portare ipoteticamente alla morte se fosse stato più severo)
  - richiede un'ospedalizzazione con degenza o causa il prolungamento di un'ospedalizzazione esistente
  - causa una disabilità/incapacità persistente o significativa
  - è un'anomalia congenita/un difetto alla nascita
  - è un evento medico importante (definito come uno o più eventi medici che, senza rappresentare una minaccia potenzialmente letale, portare alla morte o richiedere un'ospedalizzazione, e sulla base di un giudizio medico e scientifico competente, possono mettere a repentaglio il soggetto o richiedere un intervento (ad esempio medico o chirurgico) per prevenire uno degli altri esiti seri elencati nella definizione di sopra). Esempi di tali eventi comprendono, ma senza limitazioni, trattamento intensivo in pronto soccorso o a domicilio per broncospasmo allergico; discrasie ematiche o convulsioni che non richiedono un'ospedalizzazione). Anche un danno epatico farmaco-indotto (DILI) potenziale è considerato un evento medico importante.
- 20
- 25

La trasmissione sospetta di un agente infettivo (ad esempio patogeno o non patogeno) attraverso il farmaco di studio è un SAE. Nonostante la gravidanza, il sovradosaggio, il cancro e il danno epatico farmaco-indotto (DILI) potenziale non siano sempre seri secondo la definizione prevista da regolamento, tali eventi devono essere gestiti come SAE. Qualsiasi componente di un endpoint dello studio che viene giudicata correlata alla terapia di studio viene riportata come SAE (ad esempio, il decesso è un endpoint e, se la morte avviene per anafilassi, l'anafilassi deve essere riportata).

Le seguenti tipologie di ospedalizzazione non sono considerate SAE:

- un accesso al pronto soccorso o ad altro reparto ospedaliero < 24 ore che non dà luogo ad un ricovero (a meno che non venga considerato un evento medico importante o potenzialmente letale)
- 10 - un intervento chirurgico elettivo programmato prima di firmare il consenso
- ricoveri secondo protocollo per una procedura medica/chirurgica programmata
- un accertamento sanitario di routine che richiede il ricovero per valutare il basale/il trend dello stato di salute (ad esempio una colonscopia di routine)
- un ricovero medico/chirurgico programmato prima dell'ingresso nello studio il cui scopo non è rimediare ad una cattiva condizione di salute. In questi casi, è richiesta una documentazione adeguata
- 15 - un ricovero dovuto ad un'altra circostanza della vita che non si ripercuote sullo stato di salute e che non richiede interventi medici/chirurgici (ad esempio mancanza di alloggio, inadeguatezza economica, riposo dei prestatori di cura, circostanze familiari, motivi amministrativi).

Tutti i SAE, a prescindere che essi siano o no correlati al farmaco di studio e inclusi quelli giudicati associati alle procedure specificate nel protocollo, vengono raccolti dopo aver ottenuto il consenso scritto del soggetto per la partecipazione allo studio. Vengono raccolti tutti i SAE che si manifestano durante il periodo di screening ed entro 135 giorni dall'interruzione del dosaggio. Se applicabile, vengono raccolti i SAE correlati a qualsiasi procedura successiva che è specificata nel protocollo (ad esempio una biopsia cutanea di follow-up). Tutti i SAE vengono monitorati fino alla loro risoluzione o stabilizzazione.

25 Eventi avversi non seri

Un evento avverso non serio è un AE non classificato come serio. La raccolta di informazioni sugli AE non seri comincia all'inizio del farmaco di studio e prosegue per 135 giorni dopo l'interruzione del dosaggio. Gli AE non seri vengono monitorati fino alla loro risoluzione o stabilizzazione, o vengono riportati come SAE se diventano seri. Il follow-up è necessario anche per gli AE non seri che causano interruzione o sospensione del farmaco in studio e, all'occorrenza, per quelli presenti al termine del trattamento di studio. Tutti gli AE non seri identificati vengono registrati e descritti sulla pagina degli AE non seri della scheda raccolta dati (CRF, cartacea o elettronica).

Gli AE e/o le anomalie di laboratorio che vengono riportati/identificati durante il corso dello studio richiedono la compilazione di ulteriori CRF.

#### 16. Considerazioni statistiche

##### 10 Determinazione della dimensione dei campioni

Escalation della dose (parti A e B): La dimensione del campione per ciascuna dose dipende dalla tossicità osservata e non può essere determinata con precisione. La parte A e la parte B hanno tra 3 e 9 soggetti in ciascuna coorte.

Ampliamento delle coorti (parte C): L'ampliamento delle coorti permette di stimare meglio il tasso di tossicità e fornisce una migliore precisione riguardo le stime preliminari dell'efficacia. Se  $\leq 5$  soggetti su 16 (ovvero ~30% dei soggetti in una coorte) sperimentano una tossicità, la confidenza che il tasso effettivo di tossicità non sia maggiore di 50,4% è almeno 90% (in base ad un intervallo di confidenza al 90% secondo il metodo esatto binomiale monolaterale di Clopper-Pearson). Una dimensione del campione di 16 soggetti per coorte permette inoltre di stimare la proporzione di soggetti con una risposta oggettiva (ovvero CR + PR) all'interno di una coorte con una distanza massima di 27,4% tra il tasso stimato e uno dei due limiti dell'intervallo di confidenza al 95% secondo il metodo esatto bilaterale di Clopper-Pearson.

##### Popolazioni per le analisi

- Serie di analisi per tutti i soggetti arruolati: Questa serie di analisi contiene tutti i soggetti (inclusi quelli esclusi allo screening) che hanno firmato il consenso informato per lo studio.

- Serie di analisi per tutti i soggetti trattati: Questa serie di analisi comprende tutti i soggetti che ricevono un qualunque farmaco.
- Soggetti con risposta valutabile: Questa serie di analisi comprende tutti i soggetti che ricevono un qualunque farmaco di studio, che hanno un tumore accertato con malattia misurabile al basale, e che mostrano una delle  
5 seguenti cose: (1) almeno un tumore valutabile accertato in corso di trattamento, (2) progressione clinica, o (3) decesso avvenuto prima della prima valutazione del tumore in corso di trattamento.
- Serie di analisi per la farmacocinetica di BMS-986016: Questa serie di analisi comprende tutti i soggetti che ricevono BMS-986016 e che hanno almeno un parametro PK valido da includere nelle analisi statistiche dei dati PK per BMS-986016.
- 10 • Serie di analisi per l'immunogenicità di BMS-986016: Questa serie di analisi comprende tutti i soggetti che ricevono BMS-986016 e che hanno almeno un campione disponibile per la determinazione dell'immunogenicità di BMS-986016.
- Serie di analisi per l'immunogenicità di BMS-936558: Questa serie di analisi comprende tutti i soggetti che ricevono BMS-936558 e che hanno almeno un campione disponibile per la determinazione dell'immunogenicità di  
15 BMS-936558.
- Serie di analisi per la farmacodinamica: Questa serie di analisi comprende tutti i soggetti trattati per cui sono disponibili misurazioni farmacodinamiche al basale e in almeno un altro punto temporale.

#### Endpoint

20 L'endpoint primario di questo studio di fase 1 è la sicurezza, misurata in base al tasso di AE, agli eventi avversi seri (SAE), ai decessi e alle anomalie di laboratorio (ad esempio di grado 3 o più secondo CTCAE v 4), che viene valutata durante il trattamento e fino a 135 giorni di follow-up. La sicurezza viene analizzata in tutti i soggetti che ricevono almeno una dose di BMS-986016 o BMS-936558.

25 La PK di BMS-986016 somministrato da solo e in combinazione con BMS-936558 viene valutata come obiettivo secondario adoperando i seguenti endpoint derivati dai dati sulla concentrazione sierica nel tempo per il ciclo 1 e il ciclo 3:

C <sub>max</sub>	Concentrazione sierica massima osservata
T <sub>max</sub>	Tempo alla concentrazione sierica massima osservata
C <sub>trough</sub>	Concentrazione sierica minima osservata
C <sub>tau</sub>	Concentrazione al termine di un intervallo di dosaggio (ad esempio, concentrazione a 336 ore)
C <sub>ss,avg</sub>	Concentrazione media durante un intervallo di dosaggio ( $[AUC(TAU)/tau]$ )
AUC(TAU)	Area sottesa dalla curva concentrazione-tempo in un singolo intervallo di dosaggio
CLT	Clearance corporea totale
V <sub>ss</sub>	Volume di distribuzione allo stato stazionario
T-HALF <sub>eff</sub> AUC	Emivita di eliminazione effettiva che spiega il grado di accumulo di AUC osservato
T-HALF <sub>eff</sub> C <sub>max</sub>	Emivita di eliminazione effettiva che spiega il grado di accumulo di C <sub>max</sub> osservato
AI_AUC	Indice di accumulo; rapporto tra AUC(TAU) allo stato stazionario e AUC(TAU) dopo la prima dose
AI_C <sub>max</sub>	Indice di accumulo di C <sub>max</sub> ; rapporto tra C <sub>max</sub> allo stato stazionario e C <sub>max</sub> dopo la prima dose
AI_C <sub>tau</sub>	Indice di accumulo di C <sub>tau</sub> ; rapporto tra C <sub>tau</sub> allo stato stazionario e C <sub>tau</sub> dopo la prima dose
DF	Grado di fluttuazione o indice di fluttuazione ( $([C_{max} - C_{tau}]/C_{ss,avg})$ )

I valori dei parametri PK per i singoli soggetti vengono ricavati attraverso metodi non compartimentali usando un programma validato di analisi della PK. I tempi adoperati per le analisi sono quelli effettivi.

#### Efficacia

- 5 L'efficacia viene accertata come obiettivo secondario usando gli endpoint descritti sotto per irRECIST e RECIST v1.1. Ai fini della gestione dei pazienti, il processo decisionale clinico è basato su RECIST. Le analisi statistiche e i report sono basati su entrambi i criteri.

- La migliore risposta globale (BOR), basata sui criteri RECIST v1.1 o irRECIST, è la migliore risposta registrata dall'inizio del trattamento di studio fino all'ultimo accertamento del tumore specificato nel protocollo (ad esempio la visita di follow-up a 30 giorni) tenendo conto di qualsiasi requisito di conferma. Le CR o PR determinate da includere nell'accertamento della BOR vengono confermate attraverso una seconda valutazione consecutiva (confermativa) che verifica il soddisfacimento dei criteri di risposta e che viene eseguita almeno 4 settimane dopo la prima verifica del soddisfacimento dei criteri di risposta.
- Il tasso di risposta obiettiva (ORR) è definito come il numero totale di soggetti la cui BOR è CR o PR diviso il numero totale di soggetti nella popolazione d'interesse.
- La durata della risposta (DOR), calcolata solo per i soggetti con una BOR di CR o PR, è definita come il numero di giorni tra la data della prima risposta e la data successiva di progressione della malattia oggettivamente documentata in base ai criteri (RECIST v1.1 o irRECIST) o il decesso, a seconda di quale condizione si verifica per prima. La durata della risposta per i soggetti che rimangono vivi e che non progrediscono o non ricevono una terapia successiva viene censurata alla data dell'ultimo accertamento del tumore che è specificato nel protocollo. I soggetti che ricevono una terapia successiva vengono censurati all'inizio della terapia successiva.
- La sopravvivenza libera da progressione (PFS) è definita come la probabilità di un soggetto di rimanere libero da progressione e di sopravvivere. La probabilità viene calcolata in base al numero di giorni tra la prima dose del farmaco di studio e la progressione della malattia (definita secondo RECIST o irRECIST) o il decesso. La PFS per i soggetti che rimangono vivi e che non progrediscono viene censurata alla data dell'ultimo accertamento del tumore che è specificato nel protocollo.

Questi endpoint vengono determinati in base alle misurazioni eseguite sul tumore ogni 8 settimane durante il periodo di trattamento (fino a dodici cicli di 8 settimane) e una volta durante il periodo di follow-up clinico (30 giorni), per un totale di ~1,9 anni.

#### Immunogenicità

A livello di campioni, i singoli campioni vengono caratterizzati come ADA-positivi o ADA-negativi. Un soggetto è giudicato avere un campione positivo al basale se l'ultimo campione prima dell'inizio del trattamento è ADA-

positivo. Ad esempio, un campione post-basale di un soggetto che è ADA-negativo al basale viene giudicato ADA-positivo in caso di rilevamento di ADA. Un campione post-basale di un soggetto che è ADA-positivo al basale viene giudicato ADA-positivo in presenza di un aumento rilevante del titolo (il grado di aumento del titolo giudicato rilevante può variare a seconda del farmaco e del saggio, ed è delineato nel programma di analisi statistica). A livello di soggetti, gli endpoint rilevanti per gli ADA possono comprendere:

- Proporzioni di soggetti con un campione ADA-positivo al basale
- Proporzioni di soggetti ADA-positivi (in corso di trattamento e globale)
- Proporzioni di soggetti con positività persistente (ad esempio 2 o più campioni ADA-positivi sequenziali intervallati da un lasso di tempo adeguato)
- Proporzioni di soggetti con anticorpi neutralizzanti rilevati in uno o più campioni

Refertazione centralizzata degli ECG (parti A e B)

Nella parte A e nella parte B, il QTc viene valutato da un refertante centrale alla visita di follow-up 1 e il giorno 1 del ciclo 1 e del ciclo 3 (nei punti temporali pre-dose e 4 ore post-dose). Queste valutazioni vengono usate per conseguire l'obiettivo secondario di valutare l'effetto di BMS-986016 sul QTc quando somministrato da solo e in combinazione con BMS-936558. Gli ECG raccolti all'inizio di ogni ciclo vengono valutati localmente dal ricercatore.

Endpoint per i biomarcatori

Gli endpoint per i biomarcatori nel sangue periferico vengono generalmente misurati in molteplici punti temporali e valutati sia come marcatori predittivi che come marcatori farmacodinamici nel contesto degli obiettivi esplorativi associati ai biomarcatori. Questi possono comprendere misure, come i livelli e le variazioni dei livelli dal basale, dei seguenti elementi in ciascun punto temporale programmato:

- Fattori solubili nel siero
- Proporzioni di specifici sottoinsiemi di linfociti/livelli di espressione di marcatori costimolatori delle cellule T, accertata via flussocitometria
- Espressione di geni codificanti per funzioni effettrici stimulate da BMS-986016 (perforina, granzima B e IFN- $\gamma$ ) e di geni codificanti per recettori costimolatori delle cellule T (PD-1, PD-L1 e CTLA-4).

- Percentuale di soggetti che esprimono polimorfismi a singolo nucleotide collegati ai geni PD-1 (secondo SNP)
- Misure della quantità e della diversità degli anticorpi osservati contro antigeni tumore-associati (solo parte C)

5 Gli endpoint per i biomarcatori nelle biopsie tumorali vengono esplorati prevalentemente nel tentativo di identificare i marcatori basali predittivi dell'efficacia, dato che essi vengono misurati solo al basale per la maggior parte dei soggetti. Per il sottoinsieme di soggetti con biopsie sia pre-trattamento che in corso di trattamento, vengono esplorate le associazioni farmacodinamiche. Gli endpoint possono comprendere misure, come i livelli pre-trattamento e le variazioni di livello osservate in corso di trattamento, di:

- Stato funzionale dei linfociti, misurato come percentuale di cellule T CD8+ che sono positive per l'espressione di IFN- $\gamma$  e del granzima B e come intensità media geometrica (in scala logaritmica) delle cellule CD8+ che sono positive per l'espressione di IFN- $\gamma$  e del granzima B (attraverso un saggio funzionale ex vivo)
- Espressione di geni codificanti per funzioni effettrici stimulate da BMS-986016 (perforina, granzima B e IFN- $\gamma$ ) e di geni codificanti per recettori costimolatori delle cellule T (PD-1, PD-L1 e CTLA-4)
- Accertamento via IHC della presenza/assenza e dell'intensità di espressione (misurata usando una scala discreta: come 0, 1, 2, 3, 4) di LAG-3, MHC di classe II, PD-1, PD-L1 e PD-L2.

15 Se necessario, queste misure esplorative vengono sottoposte a trasformazioni funzionali appropriate.

#### Farmacocinetica

I dati concentrazione-tempo per BMS-936558 acquisiti nei punti temporali programmati di minimo (C<sub>trough</sub>) e fine infusione vengono valutati come endpoint esplorativo. Le misurazioni vengono raccolte durante trattamento (fino a 12 cicli) e per un massimo di 135 giorni durante il follow-up post-trattamento.

20 I parametri di PK per BMS-986016 vengono calcolati usando analisi non compartimentali. Le statistiche riepilogative per i parametri di PK di BMS-986016 vengono tabulate secondo la dose e il giorno/ciclo di studio. Per ogni giorno/ciclo misurato, vengono forniti grafici a dispersione di C<sub>max</sub> e AUC(TAU) in funzione della dose per descrivere l'associazione tra questi parametri e la dose di BMS-986016. Basandosi su un modello energetico, viene anche accertata la proporzionalità alla dose di BMS-986016 quando somministrato da solo o co-somministrato con  
25 BMS-936558. Le concentrazioni di minimo per BMS-986016 vengono rappresentate graficamente in funzione del

giorno e del ciclo di studio. Le concentrazioni di fine infusione e di minimo (C trough) per BMS-936558 vengono tabulate usando statistiche riepilogative.

RIEPILOGO DELLE SEQUENZE

SEQ ID NO:	SEQUENZA
1	<p>mAb anti-LAG-3, catena pesante, sequenza di amminoacidi (BMS-986016) (regione variabile sottolineata; regione costante in grassetto)</p> <p><u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC</u>AVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKLEWIGE  <u>INHRG</u>STNSNP<u>SLKSRV</u>TL<u>SLD</u>TSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYS  <u>DYEYNW</u>FDPWGQGT<u>LVTVSS</u><b>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</b>  <b>DYFPEP</b>VTVSWNSGALTS<b>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</b>TV<b>PSSSLG</b>TKT  <b>YTCNV</b>DHKPSNTKVDKRVESKY<b>GPPCPP</b>PAPE<b>FLGGPSVFLFPPKPKDT</b>  <b>LMI</b>SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK<b>PREEQFN</b>STY  <b>RVVSV</b>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI<b>SKAKGQPREPQVY</b>T  <b>LPPSQE</b>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<b>PPVLD</b>S  <b>DGSFF</b>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*</p>
2	<p>mAb anti-LAG-3, catena leggera, sequenza di amminoacidi (BMS-986016) (regione variabile sottolineata; regione costante in grassetto)</p> <p><u>EIVLTQSPATLSLSPGERATL</u>SCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD  <u>ASNRATGI</u>PARFSGSGSDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ  <u>GTNLEIKRTVAAPS</u>VFI<b>FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</b>PREAKVQW<b>KV</b>  <b>DNALQ</b>SGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQ<b>G</b>  <b>LSSP</b>VTKSFNRGEC*</p>
3	<p>mAb anti-LAG-3, regione variabile di catena pesante (VH), sequenza di amminoacidi (BMS-986016)</p> <p>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKLEWI          GEINHRGSTNSNP<u>SLKSRV</u>TL<u>SLD</u>TSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFG          YSDYEYNWFD<u>PGQGT</u>LVTVSS</p>

4	<p>mAb anti-LAG-3, regione variabile di catena pesante (VH), sequenza di nucleotidi (BMS-986016)</p> <p>caggtgcagctacagcagtgggggcgcaggactggtgaagccttcggagaccct  gtccctcacctgcgctgtctatggggtccttcagtgattactactggaact  ggatccgccagccccagggaaagggctggagtggttggggaaatcaatcat  cgtggaagcaccaactccaaccogtccctcaagagtcgagtcaccctatcact  agacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgaggtctgtgaccgccgcg  acacggctgtgtattactgtgcgtttggatatagtgactacgagtacaactgg  ttcgaccctggggccagggaaaccctggtcaccgtctectca</p>
5	<p>mAb anti-LAG-3, regione variabile di catena leggera (VL), sequenza di amminoacidi (BMS-986016)</p> <p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD  ASN RATGI PARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ  GTNLEIK</p>
6	<p>mAb anti-LAG-3, regione variabile di catena leggera (VL), sequenza di nucleotidi (BMS-986016)</p> <p>gaaattgtgttgacacagttccagccaccctgtctttgtotccaggggaaag  agccaccctctcctgcagggccagtcagagtattagcagctacttagcctggt  accaacagaaacctggccaggtcccaggtcctcatctatgatgcatccaac  agggccactggcatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggacagactt  cactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtc  agcagcgtagcaactggcctctcacttttggccaggggaccaacctggagatc  aaa</p>
7	<p>mAb anti-LAG-3, catena pesante, CDR1, sequenza di amminoacidi (BMS-986016)</p> <p>DYYWN</p>
8	<p>mAb anti-LAG-3, catena pesante, CDR2, sequenza di amminoacidi (BMS-986016)</p> <p>EINHRGSTNSNPSLKS</p>

9	mAb anti-LAG-3, catena pesante, CDR3, sequenza di amminoacidi (BMS-986016) GYSDYEYNWFDP
10	mAb anti-LAG-3, catena leggera, CDR1, sequenza di amminoacidi (BMS-986016) RASQISSYLA
11	mAb anti-LAG-3, catena leggera, CDR2, sequenza di amminoacidi (BMS-986016) DASNRAT
12	mAb anti-LAG-3, catena leggera, CDR3, sequenza di amminoacidi (BMS-986016) QQRSNWPLT
13	LAG-3 umana, sequenza di amminoacidi MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAIEVPPVWVAQEGAPQLPCSPTIPLQD LSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVG PGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDR ALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQ GRVPVRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLG LEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDN GDFTLRLEDVSSQAQAGTYTCHIHLQEQQLNATVTLAIITVTPKSEFGSPGSLGKL LCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERL LGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLTLGVLSLLLLVTGAFGFHLW RRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL*
14	LAG-3, epitopo PGHPLAPG
15	LAG-3, epitopo HPAAPSSW
16	LAG-3, epitopo PAAPSSWG

17	<p>mAb anti-PD-1, catena pesante, sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (regione variabile sottolineata; regione costante in grassetto)</p> <p><u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGL</u>  <u>EWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDT</u>  <u>AVYYCATNDDYWGQGLVTVSS</u><b>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA</b>  <b>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT</b>  <b>VPSSSLGKTKYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG</b>  <b>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGV</b>  <b>EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG</b>  <b>LPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS</b>  <b>DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV</b>  <b>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK</b></p>
18	<p>mAb anti-PD-1, catena leggera, sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (regione variabile sottolineata; regione costante in grassetto)</p> <p><u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI</u>  <u>YDASNRATGIPARFSGSGGTDFLTITISSLEPEDFAVYYCQSSNWPR</u>  <u>TFGQGTKVEIK</u><b>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</b>  <b>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK</b>  <b>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</b></p>
19	<p>mAb anti-PD-1, catena pesante, regione variabile (VH), sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:4 di WO 2006/121168)</p> <p><u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV</u>  <u>IWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND</u>  <u>DYWGQGLVTVSS</u></p>

20	<p>mAb anti-PD-1, catena pesante, regione variabile (VH), sequenza di nucleotidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:60 di WO 2006/121168)</p> <p>cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg  agg tcc ctg aga ctc gac tgt aaa gcg tct gga atc acc ttc agt  aac tct ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg  gag tgg gtg gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat  gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc  aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac  acg gct gtg tat tac tgt gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag  gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca</p>
21	<p>mAb anti-PD-1, catena leggera, regione variabile (VL), sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:11 di WO 2006/121168)</p> <p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD  ASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTLSISLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQ  GTKVEIK</p>
22	<p>mAb anti-PD-1, catena leggera, regione variabile (VL), sequenza di nucleotidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:67 di WO 2006/121168)</p> <p>gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca  ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt  agt tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg  ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc  agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc  agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag  agt agc aac tgg cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa  atc aaa</p>
23	<p>mAb anti-PD-1, catena pesante, CDR1, sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:18 di WO 2006/121168)</p> <p>NSGMH</p>

24	mAb anti-PD-1, catena pesante, CDR2, sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:25 di WO 2006/121168) VIWYDGSKRYYADSVKG
25	mAb anti-PD-1, catena pesante, CDR3, sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:32 di WO 2006/121168) NDDY
26	mAb anti-PD-1, catena leggera, CDR1, sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:39 di WO 2006/121168) RASQSVSSYLA
27	mAb anti-PD-1, catena leggera, CDR2, sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:46 di WO 2006/121168) DASNRAT
28	mAb anti-PD-1, catena leggera, CDR3, sequenza di amminoacidi (BMS936558; 5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:53 di WO 2006/121168) QQSSNWPRT

29	<p>PD-1, sequenza completa (n° ingresso GenBank: U64863)</p> <pre> agtttccctt ccgctcaccct ccgctgagc agtggagaag gggcactct ggtggggctg ctccaggcat gcagatccca caggcgccct ggccagtcgt ctgggcggtg ctacaactgg gctggcggcc aggatgggtc ttagactccc cagacaggcc ctggaacccc cccacettct tcccagccct gctcgtggg accgaagggg acaacgccac cttcacctgc agcttctcca acacatcgga gagcttcgtg ctaaactggg accgcatgag ccccagcaac cagacggaca agctggcggc ctccccggag gaccgcagcc agcccggcca ggactgccc ttccgtgtca cacaactgcc caacgggctg gacttccaca tgagcgtggg cagggccccg cgcaatgaca gggcaccta cctctgtggg gccatctccc tggcccccaa ggcgcagatc aaagagagcc tgggggcaga gctcagggg acagagagaa gggcagaagt gcccacagcc cccccagcc cctcaccag gccagccggc cagttccaaa ccttgggtgg tgggtgctgt ggccgctgc tgggcagcct ggtgctgcta gtctgggtcc tggccgcat ctgctcccgg gccgcacgag ggacaatagg agccagggc accggccagc cctgaagga ggaccctca gccgtgctg tgttctctgt ggactatggg gagctggatt tccagtggcg agagaagacc ccggagcccc ccgtgcccctg tgcctctgag cagacggagt atgccaccat tgtctttct agcggaatgg gcacctcctc ccccgccccg aggggctcag ccgacggccc tgggagtgc cagecactga ggcctgagga tggacactgc tcttgcccc tctgaccggc ttccttggcc accagtgttc tgcagacct ccaccatgag cccgggtcag cgcatttct caggagaagc aggcaggggtg caggccattg caggccgtcc aggggctgag ctgctgggg gcgaccgggg ctccagcctg cacctgcacc aggcacagcc ccaccacagg actcatgtct caatgcccac agtgagcca ggcagcagg gtcaccgtcc cctacagggg gggccagatg cagtcactgc ttcaggctct gccagcacag agctgctgc gtccagctcc ctgaatctct gctgctgctg ctgctgctgc tgctgctgccc tggggccccg ggctgaaggc gccgtggccc tgctgacgc cccggagcct cctgctgaa cttgggggct ggttggagat ggccttggag cagccaagggt gccctggca gtggcatccc gaaacgcct ggacgcaggg cccaagactg ggcacaggag tgggaggtac atggggctgg ggactcccc ggagttatct gctccctgca ggcctagaga agtttcaggg aaggtcagaa gagctcctg ctgtgggtgg cagggcagga aaccctccc accttacac atgcccaggc agcacctcag gcccttgtg ggcagggaa gctgaggcag taagcgggca ggcagagctg gaggccttc aggcagcca gactctggc ctctgcggc cgcattccac cccagccct cacaccctc gggagagggg cactctacgg tccaaggctc aggagggcag ggctggggtt gactcaggcc cctcccagct gtggccacct ggggtgtggg agggcagaag tgcaggcacc tagggcccc catgtgcca cctggggagc tctccttga accattctt gaaattattt aaaggggttg gccgggctcc caccagggc tgggtgggaa ggtacaggcg tcccccggtt gectagtacc cccgcgtggc ctatccactc ctacatcca cacactgcac cccactcct ggggcagggc caccagcctc cagggggcca gcaggcacct gagtggctgg gacaaggat ccccctccc tgtggttcta ttatattata attataatta aatatgagag catgct </pre>
----	---

**mAb anti-LAG-3, catena pesante, sequenza di nucleotidi (BMS-986016)**

caggtgcagctacagcagtgggggcgcaggactggtgaagccttcggagacccctgtccct  
cacctgcgctgtctatggggtgggtccttcagtgattactactggaactggatccgccag  
ccccaggggaaggggctggagtggttggggaatcaatcatcgtggaagcaccact  
ccaaccgctccctcaagagtcgagtcaccctatcactagacacgtccaagaaccagtt  
ctccctgaagctgaggtctgtgaccgcccgggacacggctgtgtattactgtgctttg  
gatatagtgactacgagtacaactggttcgacccctggggccagggaaccctggtcacc  
gtctcctcagctagcaccgaagggcccacccgtcttccccctggcgccctgtccaggag  
acctccgagagcacagccgcccctgggctgcccgtggtcaaggactacttccccgaaccggt  
acgggtgtcgtggaactcagggcccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcct  
cagtcctcaggactctactcccctcagcagcgtgggtgaccgtgcccctccagcagcttggg  
acgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaga  
ggttgagtccaaatatgggtcccccatgcccaccatgcccagcacctgagttcctgggggg  
ccatcagttctcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggacccc  
gaggtcacgtgctggtgggtggacgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaactg  
tacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcccggaggagcagttcaa  
cagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggca  
ggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatct  
caaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatcccaggagg  
gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctaccccagcgaca  
cgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc  
gctggactccgacggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggt  
gcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactaca  
acagaagagcctctccctgtctctgggtaaatga

**mAb anti-LAG-3, catena leggera, sequenza di nucleotidi (BMS-986016)**

gaaattgtggttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc  
ctctcctgcagggccagtcagaggtattagcagctacttagcctggtaccaacagaaacc  
ggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggcactggcatcccag  
ccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagcctagag  
ctgaagatTTTgcagTTTattactgtcagcagcgtagcaactggcctctcactTTTggc  
aggggaccaacctggagatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatttccgc  
catctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgTTgtgtgctgctgaataacttc  
atcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcc  
aggagagtgTcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctg  
cgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccccatcag  
gcctgagctcgcctcgcacaaagagcttcaacaggggagagtgtag

## RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica comprendente un anticorpo anti-LAG-3 e un anticorpo anti-PD-1, in cui la composizione farmaceutica comprende un trasportatore farmaceuticamente accettabile, 80 mg di un anticorpo anti-LAG-3, e 240 mg di un anticorpo anti-PD-1;
- 5 in cui l'anticorpo anti-PD-1 comprende regioni variabili di catena pesante e catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:19 e 21; e  
l'anticorpo anti-LAG-3 comprende regioni variabili di catena pesante e catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:3 e 5.
2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo anti-LAG-3 è un anticorpo umano.
- 10 3. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui l'anticorpo anti-PD-1 è un anticorpo umano.
4. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui l'anticorpo anti-LAG-3 è un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE.
5. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui l'anticorpo anti-PD-1 è un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE.
- 15 6. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui l'anticorpo anti-LAG-3 e l'anticorpo anti-PD-1 sono anticorpi umani di isotipo IgG4.
7. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui l'anticorpo anti-LAG-3 comprende una catena pesante e una catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID  
20 NO:1 e 2.
8. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui l'anticorpo anti-PD-1 comprende una catena pesante e una catena leggera comprendenti le sequenze rispettivamente riportate in SEQ ID NO:17 e 18.
9. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, che è formulata per la  
25 somministrazione parenterale.

10. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9, che è formulata per l'iniezione o l'infusione.

11. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10, che è formulata per la somministrazione endovenosa.

5 12. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-11, in cui il trasportatore farmaceuticamente accettabile è un liquido sterile.

13. Composizione farmaceutica di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, in cui il trasportatore farmaceuticamente accettabile è acqua, un olio, soluzione salina acquosa, destrosio acquoso, o una soluzione di glicerolo.

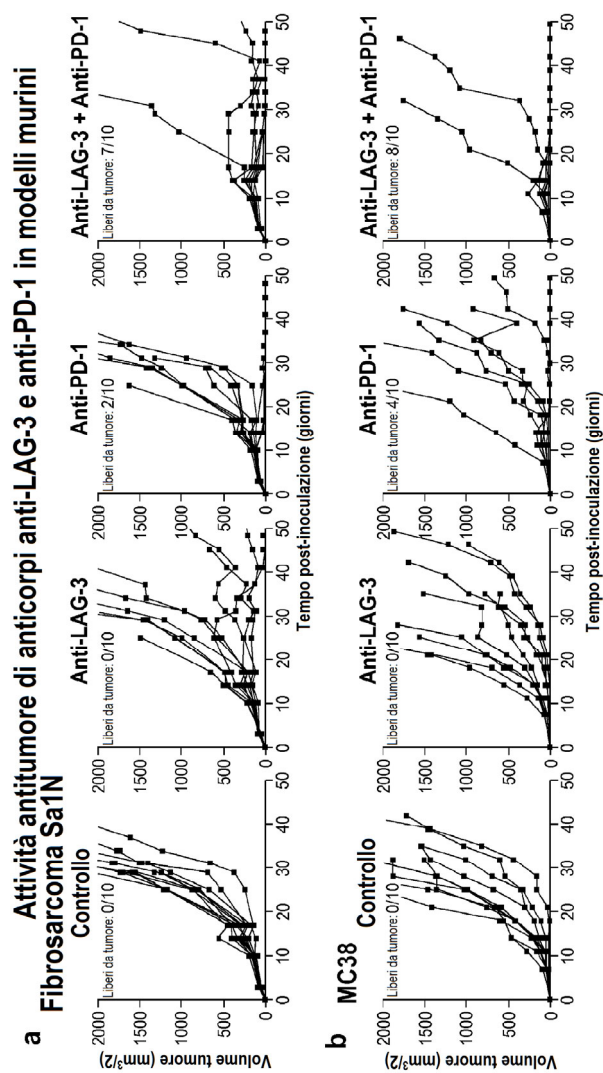
10

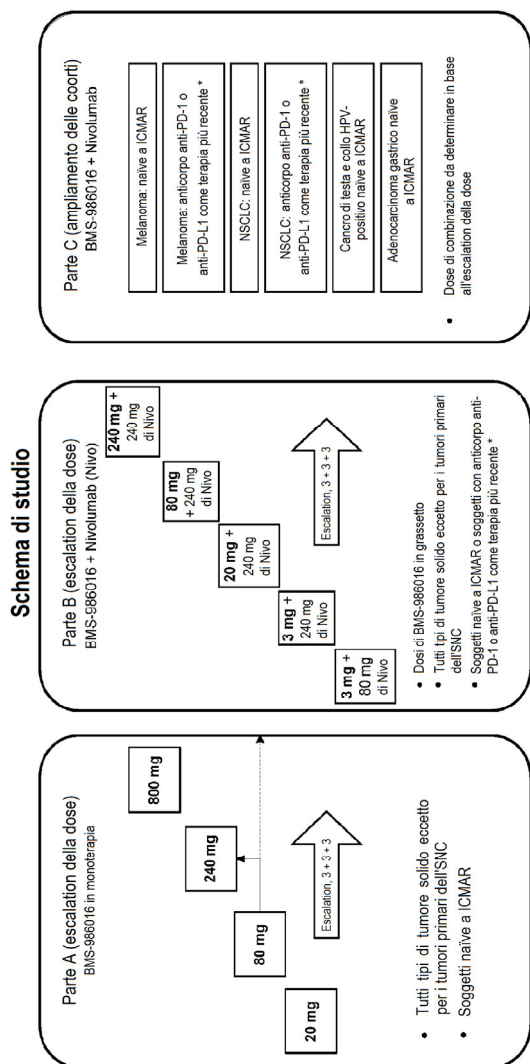
Il sottoscritto dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale.



Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

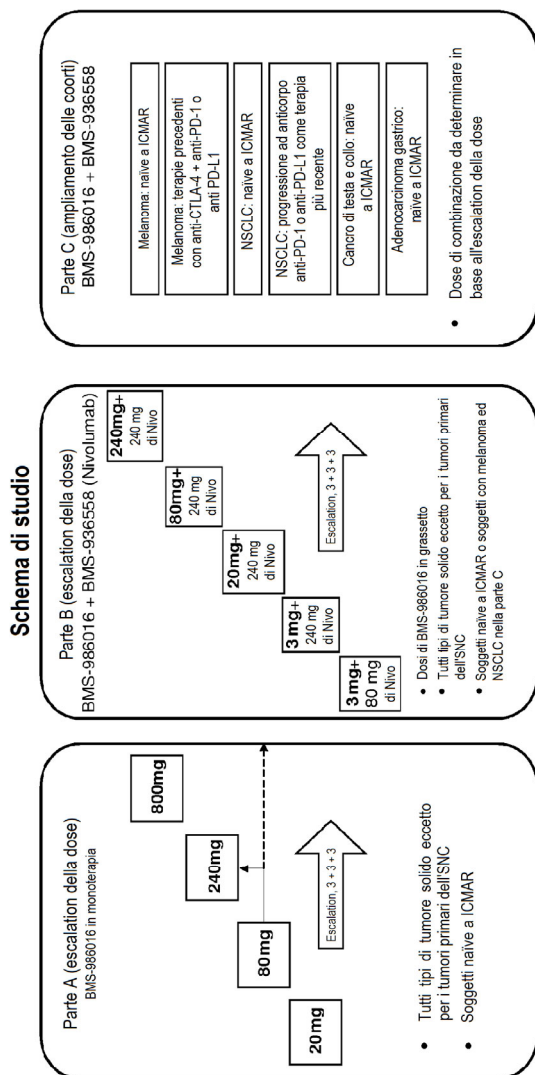
15





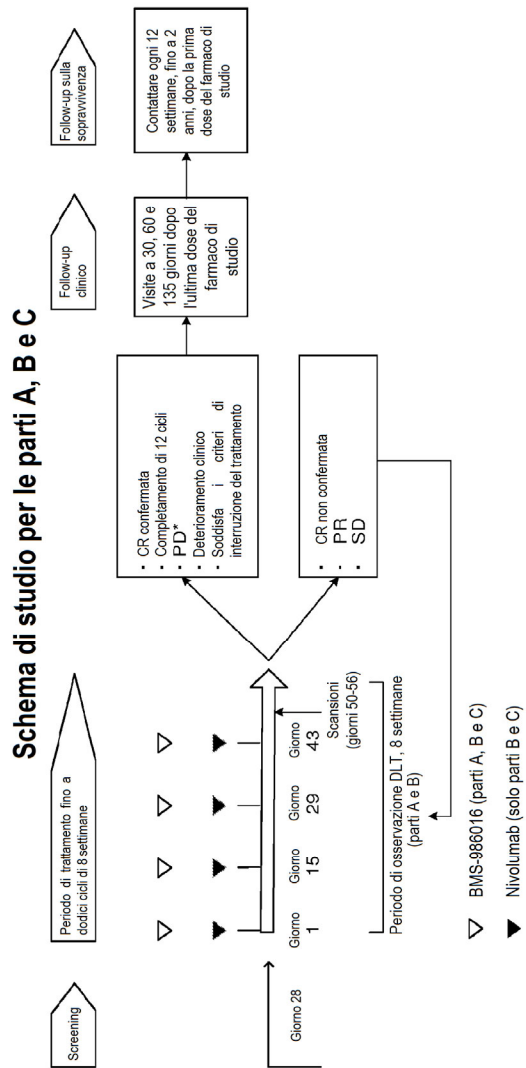
ICMAR = regimi con anticorpi modulanti le cellule immunitarie (come, ma senza limitazioni, ipilimumab, tremelimumab, anticorpi anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 e/o anti-OX40)

**Fig. 2A**



ICMAR = regimi con anticorpi modulanti le cellule immunitarie (come, ma senza limitazioni, ipilimumab, tremelimumab, anticorpi anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-KIR, anti-CD137 e/o anti-OX40)

**Fig. 2B**



Acquisizione di immagini diagnostiche ogni 12 settimane fino alla progressione nei soggetti che interrompono il trattamento causa CR e nei soggetti con PR al termine del ciclo 12.  
 Per le visite di trattamento che prevedono di somministrare sia BMS-986016 che nivolumab, nivolumab verrà somministrato per primo, seguito da BMS-986016 entro 30 minuti dal completamento dell'infusione di nivolumab.

**Fig. 3**