

DOMENIUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la inhibitori ai factorului uman de Creștere și Diferențiere 15 (GDF-15) pentru utilizări în tratamentul cancerelor solide, la produse combinate de inhibitori ai factorului uman de Creștere și Diferențiere 15 (GDF-15), pentru utilizare în tratament de cancer solide, și la compoziții și kituri care cuprind inhibitori ai factorului uman de Creștere și Diferențiere 15 (GDF-15).

BAZA INVENȚIEI

Până în prezent, multe tipuri de cancer sunt încă arii cu nevoi medicale nesatisfăcute și, în consecință, mijloace pentru a trata mai eficient cancerul sunt necesare.

Multe tipuri de cancer sunt cunoscute a exprima factori de creștere, incluzând factori cum ar fi VEGF, PDGF, TGF- β și GDF-15.

GDF-15, factorul de creștere și diferențiere 15, este un membru divergent al superfamiliei TGF- β . Acesta este o proteină care este exprimată intracelular ca un precursor, ulterior procesată și în cele din urmă, devine secretată din celulă în mediu. Atât forma activă, complet procesată (matură), cât și precursorul GDF-15 pot fi găsite în afara celulelor. Precursorul se leagă în mod covalent prin intermediul secvenței sale de aminoacizi COOH-terminală la matricea extracelulară (Bauskin AR și colab., Cancer Research 2005) și astfel se află în exteriorul unei celule. Forma activă, complet procesată (matură) a GDF-15 este solubilă și se găsește în serurile sanguine. Astfel, forma procesată a GDF-15 poate acționa în mod potențial asupra oricărei celule țintă din corp care este conectată la circulația sanguină, cu condiția ca celula țintă potențială să exprime un receptor pentru ligandul GDF-15 solubil.

În timpul sarcinii, GDF-15 se găsește în condiții fiziologice în placentă. Totuși, multe cancere maligne (în special cancerurile cerebrale agresive, melanomul, cancerul pulmonar, tumorile gastrointestinale, cancerul de colon, cancerul pancreatic, cancerul de prostată și cancerul de sân (Mimeault M și Batra SK, J. Cell Physiol 2010)) prezintă niveluri crescute de GDF-15 în tumoră, precum și în serul sanguin. De asemenea, corelații au fost descrise între expresia ridicată a GDF-15 și chimiorezistență (Huang CY și colab., Clin. Cancer Res. 2009) și între expresia ridicată a GDF-15 și, respectiv, prognosticul nesatisfăcător (Brown DA și colab., Clin. Cancer Res. 2009).

GDF-15 este exprimat în glioame de diferite grade OMS, așa cum a fost evaluat prin imunohistochimie (Roth și colab., Clin. Cancer Res. 2010). Mai mult, Roth și colab. a exprimat în mod stabil construcții de ADN care exprimă ARN în ac de păr scurt, care țintesc GDF-15 endogen sau construcții de control în celule de gliom SMA560. Atunci când se utilizează aceste linii celulare stabile prestabilite, aceștia au observat faptul că formarea tumorii la șoarecii care poartă celule SMA560 de eliminare GDF-15 a fost întârziată în comparație cu șoarecii care poartă construcții de control.

Cererile de brevet WO 2005/099746 și WO 2009/021293 se referă la un anticorp anti-GDF-15 uman (Mab26) capabil de antagonizarea efectelor GDF-15 uman (hGDF-15) asupra pierderii în greutate induse de tumoră *in vivo* la șoareci. În mod asemănător, Johnen H și colab. (Medicina naturii, 2007) au raportat efectele unui anticorp monoclonal anti-GDF-15 uman asupra anorexiei și pierderii în greutate induse de cancer, dar nu au observat niciun efect al anticorpului anti-GDF-15 uman asupra dimensiunii tumorii formate de cancer.

WO 2014/049087 și PCT/EP2015/056654 (corespunde WO 2015/144855) se referă la anticorpi monoclonali împotriva hGDF-15 și la utilizări medicale ale acestora.

O abordare recent dezvoltată pentru terapia cancerului este utilizarea agenților de blocare a punctelor de control imunitare, cum ar fi inhibitorii de PD-1 uman și inhibitorii de PD-L1 uman. O rațiune din spatele utilizării acestor agenți de blocare a punctelor de control imunitare este faptul că prin blocarea punctelor de control imunitare care previn sistemul imunitar să țintească antigenele canceroase și celulele canceroase respective, un răspuns imunitar împotriva cancerului poate fi mai eficient. În timp ce agenții de blocare a punctelor de control imunitare, precum și combinațiile particulare de agenți de blocare a punctelor de control imunitare au fost prezentate că îmbunătățesc supraviețuirea pacienților la pacienții cu melanom (Cully M, "Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy.", Nat Rev Drug Discov. 2015 Jun;14(6):374-5.), nu toți pacienții cu melanom au prezentat un răspuns complet, și rezultatele pentru multe alte cancere încă urmează să fie expuse, totuși există motive (cum ar fi sarcina mutațională) care sugerează faptul că rezultatele pentru alte afecțiuni vor fi mai puțin favorabile. Astfel, până în prezent, există încă o nevoie în domeniu de mijloace pentru a trata mai eficient cancerul. Mai precis, încă există o lipsă a mijloacelor care pot fi utilizate pentru o imunoterapie mai eficientă împotriva cancerului.

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția este așa cum a fost definită de revendicările anexate. Prezenta invenție îndeplinește nevoile de mai sus și rezolvă problemele de mai sus din domeniu prin asigurarea realizărilor descrise mai jos: În special, într-un efort de a identifica mijloace pentru a trata în mod eficient cancerul, prezenții inventatori au descoperit, în mod surprinzător, faptul că posibilitatea unui răspuns la un tratament cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare scade în mod semnificativ cu nivelurile în creștere de hGDF-15 în serul pacientului. Astfel, în conformitate cu invenția, un inhibitor de hGDF-15 este utilizat pentru a inhiba efectele negative ale hGDF-15 asupra răspunsurilor pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare și pentru a îmbunătăți răspunsurile pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctului de control imunitar.

În mod neașteptat, inventatorii au descoperit, de asemenea, faptul că există o corelație inversă a hGDF-15 cu procentul de limfocite T CD8⁺ în metastazele canceroase. Acest aspect este de remarcat, deoarece prezența limfocitelor T CD8⁺ este în special necesară pentru regresia tumorii după inhibarea punctului de control imunitar cu un anticorp anti-PD-1. Astfel, în conformitate cu invenția, inhibarea terapeutică a hGDF-15 poate fi utilizată pentru a crește procentul de limfocite T CD8⁺ în cancerurile solide, incluzând metastazele tumorale. Această creștere a limfocitelor T CD8⁺ în cancerurile solide poate fi utilizată în mod favorabil pentru terapia, în special imunoterapie, împotriva cancerelor solide. Astfel, inventatorii asigură o combinație terapeutică favorabilă a unui inhibitor de hGDF-15 cu un agent de blocare a punctului de control imunitar. Un efect avantajos al acestei combinații este faptul că inhibarea hGDF-15 va crește procentul de limfocite T CD8⁺ în cancerurile solide și, prin urmare, duce la un efect terapeutic sinergic cu inhibarea punctului de control imunitar.

Într-un efort de a elucida în plus modul în care inhibitorii de hGDF-15 pot crește procentul de limfocite T CD8⁺ în cancerurile solide, inventatorii au descoperit faptul că hGDF-15 scade aderența celulelor T la celulele endoteliale. Prin urmare, în conformitate

cu invenția, un tratament cu inhibitori de hGDF-15 poate fi utilizat pentru a crește aderența celulelor T, incluzând celulele T CD8⁺ la celulele endoteliale. Un astfel de tratament în conformitate cu invenția va crește intrarea celulelor T CD8⁺ din fluxul sanguin în cancere solide. Procentul crescut de celule T CD8⁺ în cancerurile solide, care va rezulta dintr-un astfel de tratament cu inhibitori de hGDF-15, este avantajos pentru, și poate fi utilizat în, terapia cancerului, de exemplu, imunoterapia împotriva cancerului. Din moment ce intrarea celulelor T CD8⁺ în cancerurile solide și prezența acestor celule T CD8⁺ în cancerurile solide sunt deosebit de avantajoase pentru abordări terapeutice care utilizează agenți de blocare a punctelor de control imunitare, invenția asigură în mod avantajos utilizarea inhibitorilor hGDF-15 în combinație cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare. Astfel, prezenta invenție asigură mijloace îmbunătățite pentru terapia împotriva cancerului, așa cum a fost definit de revendicările anexate.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1: Această Figură prezintă nivelurile serice de GDF-15 pentru respondenți și non-respondenți la regimul de tratament.

Figura 2: Această Figură prezintă numărul de respondenți și non-respondenți în grupurile de pacienți care prezintă niveluri serice de hGDF-15 <1,8 ng/ml, 1,8 - 4,2 ng/ml și, respectiv, >4,2 ng/ml.

Figura 3: Probabilitatea de răspuns la tratament (respondentul 1) așa cum a fost prezis de Modelul Linear Generalizat folosind GDF-15 ca factor de predicție continuu. Cercurile prezintă datele, curba prezintă modelul. Linia verticală indică concentrația de GDF-15 unde probabilitatea răspunsului la tratament este de 0,5.

Figura 4: Curbele Kaplan-Meier pentru supraviețuire în cele trei grupuri definite de nivelul seric de GDF-15 (<1,8, 1,8 - 4,2, >4,2 ng/ml).

Figura 5: Figura 5A: Probabilitatea de răspuns la tratament (respondentul 1) așa cum a fost prezis de modelul Modelului Liniar Generalizat folosind LDH ca factor de predicție continuu. Cercurile prezintă datele, curba prezintă modelul. Linia verticală indică concentrația de LDH unde probabilitatea răspunsului la tratament este de 0,5. Cohorta de pacienți a fost identică. Cu toate acestea, determinarea fiabilă a nivelurilor de LDH a eșuat la patru pacienți din cauza hemolizei.

Figura 5B: Reprezentare grafică a respondenților și non-respondenților și a nivelurilor lor respective de hGDF-15 și LDH. Atunci când valorile limită sunt selectate pentru a acoperi toți respondenții, testarea pe bază de GDF-15 permite identificarea a 6 (din 9) non-respondenți, în timp ce analizele pe baza nivelurilor de LDH pot identifica doar 4 (din 9) non-respondenți. Pentru testarea LDH, 4 probe hemolitice au trebuit să fie excluse, ceea ce cauzează pierdere a datelor.

Figura 6: Această Figură prezintă secțiuni exemplificative de țesut din metastazele cerebrale de melanom care nu prezintă nicio imunoreactivitate GDF-15 (panoul superior) sau imunoreactivitate ridicată (panoul inferior), care au fost colorate prin imunohistochimie pentru GDF-15 și pentru proteinele CD3 și, respectiv, CD8 marker de celule T, așa cum a fost indicat în Figură. Celulele CD3 și CD8 pozitive sunt indicate prin săgeți în probele cu GDF-15 ridicat. Colorările cu CD3 și CD8 au fost făcute din aceeași arie a secțiunilor în serie (totuși, nu din secțiunea identică).

Figura 7: Această Figură prezintă un grafic al procentului de celule CD3⁺ împotriva scorului GDF-15 în diferite metastaze cerebrale de melanom (7A) și un grafic al

procentului de celule CD8⁺ împotriva scorului GDF-15 în diferite metastaze cerebrale de melanom (7B).

Figura 8: Această Figură prezintă un grafic al scorului GDF-15 față de procentul de celule T CD8⁺ și, respectiv, CD3⁺, în metastazele cerebrale din diferite entități tumorale (melanom, CRC, RCC, NSCLC și SCLC).

Figura 9: Figura 9A prezintă numărul de celule T rulate per câmp vizual per secundă. Datele au fost obținute din canalul #3 ("GDF-15") și canalul #2 ("control"). Figura 9B prezintă viteza de rulare a celulelor T (măsurată în pixeli per 0,2 secunde). Datele au fost obținute din canalul #3 ("GDF-15") și canalul #2 ("control"). Figura 9C prezintă numărul de celule aderente per câmp vizual. Datele au fost obținute din canalul #3 ("GDF-15") și canalul #2 ("control"). Figura 9D prezintă numărul de celule aderente per câmp vizual. Datele au fost obținute din canalul #3 ("GDF-15") și canalul #2 ("control").

Figura 10: Figura 10A prezintă numărul de celule T rulate per câmp vizual per secundă. Datele au fost obținute din canalul # 1 (celule T de control pe HUVEC nestimulate ca și „control negativ”), canalul # 2 (celule T de control pe HUVEC stimulate ca și „control pozitiv”), canalul # 3 („GDF-15”) canalul # 4 ("UACC 257": celule T cultivate în supernatantul celulelor de melanom UACC 257 care conțin GDF-15 secretat) și canalul # 5 ("UACC257 + anti-hGDF-15": celule T cultivate în supernatantul celulelor de melanom UACC 257 depletizate din GDF-15 secretat cu anticorpul anti-hGDF-15 B1-23 ca un inhibitor de hGDF-15). Figura 10B: analiza de curgere/aderență a fost realizată așa cum a fost descris în Exemplul 3. Celulele T au fost pre-incubate cu 100 ng/ml de GDF-15 timp de 1 oră sau cu 100 ng/ml de GDF-15, care au fost pre-incubați cu 10 μg/ml de anticorp timp de 1 oră, așa cum a fost indicat. Următorii anticorpi Anti-GDF-15 au fost utilizați: H1L5 (B1-23 umanizat), 01G06 și 03G05 (Anticorpi anti-GDF-15 umanizați, structurați pe calea ingineriei, în conformitate cu secvențele din WO 2014/100689). Rezultatele sunt prezentate în Figură, care prezintă numărul de celule rulate per câmp vizual per 20 de secunde.

Figura 11: Șoareci C57BL/6J au fost inoculați pe cale subcutanată cu 2×10^5 celule de colon MC38^{tgGDF-15}. Tratamentul cu anticorp anti GDF-15 (20 mg/kg de greutate corporală) a fost inițiat în ziua 0 și a fost repetat în zilele 3, 7, 10, 14, 17 și 21. În ziua 13, animalele care prezintă tumori de dimensiuni asemănătoare (100 - 150 mm³) au fost fie tratate sau nu, cu Poli-ICLC (de asemenea, abreviat ca „Poli-IC”) și anticorp anti CD40. Șoarecii care resping tumora prestabilită au fost urmăriți timp de 57 de zile. Șoarecii care prezintă tumoră au fost sacrificați în conformitate cu criteriile pentru bunăstarea animalelor.

Figura 12: Supraviețuirea cumulativă în grupurile de pacienți care prezintă niveluri de GDF-15 <1,5 ng/ml și, respectiv, ≥1,5 ng/ml.

Figura 13: Supraviețuirea cumulativă în grupurile de pacienți care prezintă niveluri ridicate de GDF-15 (adică, cei 50 de pacienți cu cele mai mari niveluri de GDF-15) și, respectiv (împărțirea mediană a coortei totale de studiu), niveluri scăzute de GDF-15 (adică, cei 49 de pacienți cu cele mai scăzute niveluri de GDF-15).

Figura 14: Nivelurile Serice de hGDF-15 nu se Corelează în mod Semnificativ cu Sarcina Mutațională a Tumorilor. Nivelurile de ARNm de hGDF-15 în probele de la pacienții cu cancer au fost reprezentate grafic în funcție de numărul de mutații

somatrice care au fost identificate în cancere. Mutațiile somatrice au fost determinate prin utilizarea secvențierii exomului. Datele au fost analizate prin utilizarea instrumentului web UZH de la Spitalul Universitar din Zurich (Cheng PF și colab.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly.* 2015 Sep 16;145:w14183.). Figura 14A prezintă un grafic pentru datele pacientului cu cancer obținute din Atlasul Genomului de Cancer (TGCA) luând în considerare numai pacienții cu melanom malign de grad înalt (Atlasul Genomului de Cancer este descris în referința din Cheng PF și colab.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly.* 2015 Sep 16;145:w14183.). Expresia GDF-15 a fost evaluată prin normalizare folosind pachetul software RSEM ("Secvențierea ARN-ului prin maximizarea expectației") (Li B și Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics.* 2011 Aug 4;12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323.). Figura 14B prezintă un grafic pentru datele pacientului cu cancer de la 40 de pacienți suplimentari cu melanom malign metastatic de la Spitalul Universitar din Zurich, care au fost analizați în mod separat.

Figura 15: Sunt prezentate imagini de imunocitochimie pentru CD8a la șoareci care prezintă tumori de tip sălbatic sau tumori care supra-exprimă hGDF15 transgenic (tg). Secțiunile de țesut au fost colorate cu anti-CD8a (diluție 1:100; anticorp 4SM15 achiziționat de la eBioscience).

DESCRIERE DETALIATĂ A INVENȚIEI

Definiții și tehnici generale

Cu excepția cazului în care a fost definit altfel mai jos, termenii utilizați în prezenta invenție vor fi înțeleși în conformitate cu înțelesul lor obișnuit cunoscut de profesionistul în domeniu.

Termenul "anticorp", așa cum a fost utilizat aici, se referă la orice anticorp funcțional care este capabil de legarea specifică la antigenul de interes, așa cum a fost subliniat în general în capitolul 7 din Paul, W.E. (Ed.): *Fundamental Immunology* 2nd Ed. Raven Press, Ltd., New York 1989. Fără o limitare specială, termenul "anticorp" cuprinde anticorpi din orice specie sursă corespunzătoare, incluzând pui și mamifere cum ar fi șoarece, capră, primată non-umană și om. De preferat, anticorpul este un anticorp umanizat. Anticorpul este, de preferat, un anticorp monoclonal care poate fi preparat prin metode binecunoscute în domeniu. Termenul "anticorp" cuprinde un anticorp de izotip IgG-1, -2, -3 sau -4, IgE, IgA, IgM sau IgD. Termenul "anticorp" cuprinde anticorpi monomerici (cum ar fi IgD, IgE, IgG) sau anticorpi oligomerici (cum ar fi IgA sau IgM). Termenul "anticorp" cuprinde, de asemenea, - fără limitări particulare - anticorpi izolați și anticorpi modificați, cum ar fi anticorpi structurați pe calea ingineriei genetice, de exemplu, anticorpi himerici.

Nomenclatura domeniilor de anticorpi urmează termenii, așa cum sunt cunoscuți în domeniu. Fiecare monomer al unui anticorp cuprinde două lanțuri grele și două lanțuri ușoare, așa cum a fost cunoscut, în general, în domeniu. Dintre acestea, fiecare lanț greu și ușor cuprinde un domeniu variabil (denumit V_H pentru lanțul greu și V_L pentru lanțul ușor) care este important pentru legarea antigenului. Aceste domenii variabile de lanț greu și ușor cuprind (într-o ordine de la N-terminal la C-terminal) regiunile FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 și FR4 (FR, regiune cadru; CDR, regiune de determinare a

complementarității care este, de asemenea, cunoscută ca regiune hipervariabilă). Identificarea și atribuirea regiunilor de anticorp menționate mai sus în cadrul secvenței de anticorpi sunt, în general, în conformitate cu Kabat și colab. (Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983), sau Chothia și colab. (Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*. 1989 Dec 21-28;342(6252):877-83.), sau poate fi efectuată prin utilizarea software-ului IMGT/V-QUEST, descris în Giudicelli și colab. (IMGT/V-QUEST, un program software integrat pentru analiza de rearanjare V-J și V-D-J a imunoglobulinei și receptorului de celule T. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 1;32 (Web Server issue):W435-40.). De preferat, regiunile de anticorpi indicate mai sus sunt identificate și atribuite prin utilizarea software-ului IMGT/V-QUEST.

Un „anticorp monoclonal” este un anticorp dintr-o populație de anticorpi în mod esențial omogenă, în care anticorpii sunt în mod substanțial identici în secvență (adică, identici, cu excepția unei fracțiuni minore de anticorpi care conțin modificări de secvență care apar pe cale naturală, cum ar fi modificările de aminoacizi la capetele terminale N- și C-). Spre deosebire de anticorpii policlonali care conțin un amestec de anticorpi diferiți, orientați către numeroși epitopi, anticorpii monoclonali sunt orientați către același epitop și, prin urmare, sunt foarte specifici. Termenul "anticorp monoclonal" include (dar nu este limitat la) anticorpi care sunt obținuți dintr-o populație de celule monoclonale derivate dintr-o clonă celulară unică, precum, de exemplu, anticorpii generați prin metoda hibridomului descrisă în Köhler și Milstein (*Nature*, 7 august 1975;256(5517):495-7) sau Harlow și Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988). Un anticorp monoclonal poate fi, de asemenea, obținut din alte metode corespunzătoare, incluzând tehnici cu expunere de fagi, cum ar fi cele descrise în Clackson și colab. (*Nature*. 15 august 1991;352(6336):624-8) sau Marks și colab. (*J Mol Biol*. 1991 Dec 5;222(3):581-97). Un anticorp monoclonal poate fi un anticorp care a fost optimizat pentru proprietățile de legare a antigenului, cum ar fi valori Kd scăzute, parametri cinetici de asociere și disociere optimizați prin metode cunoscute în domeniu. De exemplu, valorile Kd pot fi optimizate prin metode cu expunere, incluzând expunerea de fagi, având ca rezultat anticorpi monoclonali cu afinitatea maturată. Termenul "anticorp monoclonal" nu este limitat la secvențe de anticorpi dintr-o specie particulară de origine sau dintr-o singură specie de origine. Astfel, înțelesul termenului "anticorp monoclonal" cuprinde anticorpi monoclonali himerici, cum ar fi anticorpi monoclonali umanizați.

"Anticorpii umanizați" sunt anticorpi care conțin secvențe umane și o porțiune minoră de secvențe non-umane care conferă specificitate de legare la un antigen de interes (de exemplu, GDF-15 uman). În mod obișnuit, anticorpii umanizați sunt generați prin înlocuirea secvențelor din regiunea hipervariabilă dintr-un anticorp acceptor uman cu secvențe din regiunea hipervariabilă dintr-un anticorp donor non-uman (de exemplu, un anticorp donor de șoarece, iepure, șobolan) care se leagă la un antigen de interes (de exemplu, GDF-15 uman). În anumite cazuri, secvențele regiunii cadru a anticorpului acceptor pot fi, de asemenea, înlocuite cu secvențele corespunzătoare ale anticorpului donor. În plus față de secvențele derivate din anticorpii donor și acceptor, un "anticorp umanizat" poate conține, fie alte resturi sau secvențe (suplimentare sau substitutive), fie nu. Astfel de alte resturi sau secvențe pot servi pentru a îmbunătăți în plus proprietățile anticorpului, cum ar fi proprietățile de legare (de exemplu, pentru a scădea valorile Kd)

și/sau proprietățile imunogene (de exemplu, pentru a scădea antigenitatea la oameni). Exemple non-limitative pentru metode pentru a genera anticorpi umanizați sunt cunoscute în domeniu, de exemplu, din Riechmann și colab. (Nature. 24 martie 1988; 332(6162):323-7) sau Jones și colab. (Nature. 29 mai-4 iunie 1986; 321(6069):522-5).

Termenul "anticorp uman" se referă la un anticorp care conține secvențe de domeniu variabil și constant uman. Această definiție cuprinde anticorpi care prezintă secvențe umane care poartă substituții sau modificări unice de aminoacizi care pot servi pentru a îmbunătăți în plus proprietățile anticorpilor, cum ar fi proprietățile de legare (de exemplu, pentru a scădea valorile K_d) și/sau proprietățile imunogene (de exemplu, pentru a scădea antigenitatea la oameni). Termenul "anticorp uman" exclude anticorpii umanizați în care o porțiune de secvențe non-umane conferă specificitate de legare la un antigen de interes.

O "porțiune de legare la antigen" a unui anticorp, așa cum a fost utilizat aici, se referă la o porțiune a unui anticorp care păstrează capacitatea anticorpului de a se lega în mod specific la antigen (de exemplu, hGDF-15, PD-1 sau PD-L1). Această capacitate poate fi, de exemplu, determinată prin determinarea capacității porțiunii de legare la antigen de a concura cu anticorpul pentru legare specifică la antigen, prin metode cunoscute în domeniu. Porțiunea de legare la antigen poate conține unul sau mai multe fragmente ale anticorpului. Fără o limitare specială, porțiunea de legare la antigen poate fi produsă prin orice metodă corespunzătoare cunoscută în domeniu, incluzând metode cu ADN recombinant și preparare prin fragmentarea chimică sau enzimatică a anticorpilor. Porțiunile de legare la antigen pot fi fragmente Fab, fragmente F(ab'), fragmente F(ab')₂, anticorpi cu lanț unic (scFv), anticorpi cu un singur domeniu, diacorpi sau orice altă (alte) porțiune (porțiuni) a (ale) anticorpului care păstrează capacitatea anticorpului de a se lega în mod specific la antigen.

Un „anticorp” (de exemplu, un anticorp monoclonal) sau o „porțiune de legare la antigen” poate să fi fost derivatizată sau să fi fost legată la o moleculă diferită. De exemplu, moleculele care pot fi legate la anticorp sunt alte proteine (de exemplu, alți anticorpi), un marker moleculară (de exemplu, o moleculă fluorescentă, luminiscentă, colorată sau radioactivă), un agent farmaceutic și/sau unul toxic. Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen poate fi legată în mod direct (de exemplu, sub forma unei fuziuni între două proteine) sau prin intermediul unei molecule agent de interconectare (de exemplu, orice tip corespunzător de agent de interconectare chimic cunoscut în domeniu).

Așa cum au fost utilizați aici, termenii "legare" sau "leagă" se referă la legarea specifică la antigenul de interes (de exemplu, GDF-15 uman). De preferat, valoarea K_d este mai mică de 100 nM, mai de preferat, mai mică de 50 nM, încă mai de preferat, mai mică de 10 nM, încă mai de preferat, mai mică de 5 nM și cel mai de preferat, mai mică de 2 nM.

Așa cum a fost utilizat aici, un anticorp sau o porțiune a acestuia de legare la antigen care este „capabil să concureze” cu un al doilea anticorp capabil de legare la GDF-15 uman, înseamnă faptul că anticorpul menționat (primul) sau porțiunea acestuia de legare la antigen care este „capabilă să concureze” este capabil să reducă legarea unei soluții de referință 10 nM a celui de-al doilea anticorp la GDF-15 uman sau recombinant uman cu 50%. În general, „capabil să concureze” înseamnă faptul că, concentrația (primului) anticorp sau a porțiunii acestuia de legare la antigen care este

necesară pentru a reduce legarea soluției de referință 10 nM a celui de-al doilea anticorp la GDF-15 uman sau recombinant uman cu 50%, este mai puțin de 1000 nM, de preferat, mai puțin de 100 nM și mai de preferat, mai puțin de 10 nM. Legarea este măsurată prin măsurători de rezonanță plasmonică de suprafață sau prin măsurători ale analizei ELISA (Analiza Imunosorbentului Legat de Enzime), de preferat, prin măsurători de rezonanță plasmonică de suprafață.

Termenul "epitop", așa cum a fost utilizat aici, se referă la o mică porțiune a unui antigen care formează zona de legare pentru un anticorp.

În contextul prezentei invenții, legarea sau legarea competitivă a anticorpilor sau a porțiunilor lor de legare la antigen, la antigenul de interes (de exemplu, GDF-15 uman) este, de preferat, măsurată prin utilizarea măsurătorilor de rezonanță plasmonică de suprafață, ca analiză standard de referință, așa cum a fost descris mai jos.

Termenii „ K_D ” sau "valoare K_D ” se referă la constanta de disociere de echilibru, așa cum a fost cunoscută în domeniu. În contextul conform prezentei invenții, acești termeni se referă la constanta de disociere de echilibru a unui anticorp în raport cu un antigen particular de interes (de exemplu, GDF-15 uman). Constanta de disociere de echilibru este o măsură a propensității unui complex (de exemplu, un complex antigen-anticorp) de a se disocia în mod reversibil în componentele sale (de exemplu, antigen și anticorp). Pentru anticorpii în conformitate cu invenția, valorile K_D (cum ar fi cele pentru antigenul uman GDF-15) sunt, de preferat, determinate prin utilizarea măsurătorilor rezonanței plasmonice de suprafață, așa cum a fost descris mai jos.

Un "anticorp izolat" așa cum a fost utilizat aici este un anticorp care a fost identificat și separat de majoritatea componentelor (prin greutate) din mediul său sursă, de exemplu, din componentele unei culturi de celule de hibridom sau ale unei culturi de celule diferite care a fost utilizată pentru producerea sa (de exemplu, celule producătoare, cum ar fi celulele CHO care exprimă în mod recombinant anticorpul). Separarea este realizată astfel încât aceasta să îndepărteze suficient componentele care altfel pot interfera cu caracterul corespunzător al anticorpului pentru aplicațiile dorite (de exemplu, cu o utilizare terapeutică a anticorpului anti-GDF-15 uman, în conformitate cu invenția). Metode pentru prepararea anticorpilor izolați sunt cunoscute în domeniu și includ cromatografia cu proteină A, cromatografia cu schimb de anioni, cromatografia cu schimb de cationi, filtrarea și ultrafiltrarea cu retenție a virusului. De preferat, preparatul de anticorp izolat este cel puțin 70% pur (g/g), mai de preferat, cel puțin 80% pur (g/g), încă mai de preferat, cel puțin 90% pur (g/g), încă mai de preferat, cel puțin 95 % pur (g/g) și cel mai de preferat, cel puțin 99 % pur (g/g), așa cum a fost măsurat prin utilizarea analizei cu proteină Lowry.

Un "diacorp" așa cum a fost utilizat aici este o porțiune mică bivalentă de anticorp de legare a antigenului care cuprinde un domeniu variabil de lanț greu legat la un domeniu variabil de lanț ușor pe același lanț de polipeptidă printr-un agent de interconectare peptidic care este prea scurt pentru a permite împerecherea între cele două domenii pe același lanț. Aceasta fapt are ca rezultat împerecherea cu domeniile complementare ale altui lanț și asamblarea unei molecule dimerice cu două zone de legare a antigenului. Diacorpii pot fi bivalenți și monospecifici (cum ar fi diacorpii cu două zone de legare a antigenului pentru GDF-15 uman) sau pot fi bivalenți și bispecifici (de exemplu, diacorpii cu două zone de legare a antigenului, una fiind o zonă de legare pentru GDF-15 uman și celălaltă fiind o zonă de legare pentru un antigen diferit). O descriere detaliată a

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

Un „anticorp cu domeniu unic” (la care s-a făcut referire, de asemenea, ca „Nanocorp™”) așa cum a fost utilizat aici este un fragment de anticorp care constă dintr-un domeniu unic de anticorp monomeric variabil. Structurile și metodele pentru producerea anticorpilor cu domeniu unic sunt cunoscute din domeniu, de exemplu din Holt LJ și colab. ("Domain antibodies: proteins for therapy." Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90.), Saerens D și colab. ("Single-domain anticorps as building blocks for novel therapeutics." Curr Opin Pharmacol. 2008 Oct;8(5):600-8. Epub 2008 Aug 22.), și Arbabi Ghahroudi M și colab. („Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies." FEBS Lett. 1997 Sep 15;414(3):521-6.) .

Termenii "cancer" și "celulă canceroasă" sunt utilizați aici în conformitate cu înțelesul lor obișnuit în domeniu (vezi, de exemplu, Weinberg R. și colab.: The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006. 850p.).

Canceralele tratate în conformitate cu prezenta invenție sunt cancer solid. Un „cancer solid” este un cancer care formează una sau mai multe tumori solide. Astfel de cancer solid care formează tumori solide sunt în general cunoscute în domeniu. Termenul „cancer solid” cuprinde atât o tumoră primară formată de cancer, cât și posibile tumori secundare, care sunt cunoscute de asemenea, ca metastaze. Canceralele solide preferate care urmează să fie tratate în conformitate cu invenția sunt selectate din grupul format din melanom, cancer colorectal, cancer de prostată, cancer de cap și gât, cancer urotelial, cancer de stomac, cancer pancreatic, cancer de ficat, cancer testicular, cancer ovarian, cancer endometrial, cancer de col uterin, cancer cerebral, cancer de sân, cancer gastric, carcinom cu celule renale, sarcom Ewing, cancer pulmonar cu celule non-mici și cancer pulmonar cu celule mici, de preferat, selectate din grupul format din melanom, cancer colorectal, cancer de prostată, cancer de cap și gât, cancer urotelial, cancer de stomac, cancer pancreatic, cancer de ficat, cancer testicular, cancer ovarian, cancer endometrial și cancer de col uterin, mai de preferat, selectate din grupul format din melanom, cancer colorectal, cancer de prostată, cancer de cap și gât, cancer urotelial și cancer de stomac, și cel mai de preferat, selectate din grupul format din melanom, cancer colorectal și cancer de prostată.

Așa cum s-a făcut referire aici, termenul "cancer cerebral" se referă la toate canceralele cerebrale cunoscute în domeniu. Acesta include, dar nu este limitat la, gliom (gradul I până la IV OMS), astrocitom, meningiom și meduloblastom.

Așa cum s-a făcut referire aici, termenul "cancer de cap și gât" se referă la toate canceralele de cap și gât cunoscute în domeniu. Acesta include, dar nu este limitat la, carcinom de esofag, carcinom bucal cu celule scuamoase și cancer hipofaringian. Un cancer de cap și gât preferat în mod special pentru a fi tratat în conformitate cu invenția este carcinomul bucal cu celule scuamoase.

Termenul "creștere a cancerului" așa cum a fost utilizat aici se referă la orice creștere măsurabilă a cancerului. Pentru canceralele care formează tumori solide, „creșterea cancerului” se referă la o creștere măsurabilă în volumul tumorii în timp. Dacă cancerul a format doar o singură tumoră, „creșterea cancerului” se referă doar la creșterea în volum a unei singure tumori. Dacă cancerul a format mai multe tumori, cum ar fi metastazele, „creșterea cancerului” se referă la creșterea în volum a tuturor tumorilor măsurabile. Pentru tumorile solide, volumul tumorii poate fi măsurat prin orice metodă

cunoscută în domeniu, incluzând imagistica prin rezonanță magnetică și tomografia computerizată (scanare CT).

Termeni cum ar fi „tratamentul împotriva cancerului” sau „tratarea împotriva cancerului” în conformitate cu prezenta invenție se referă la un tratament terapeutic. O evaluare a faptului dacă un tratament terapeutic funcționează sau nu poate fi făcută, de exemplu, prin evaluarea dacă tratamentul inhibă creșterea cancerului la pacientul sau pacienții tratați. De preferat, inhibarea este semnificativă din punct de vedere statistic, așa cum a fost evaluată prin teste statistice corespunzătoare care sunt cunoscute în domeniu. Inhibarea creșterii cancerului poate fi evaluată prin compararea creșterii cancerului într-un grup de pacienți tratați în conformitate cu prezenta invenție cu un grup de control de pacienți netratați sau prin compararea unui grup de pacienți care primesc un tratament standard împotriva cancerului în domeniu, plus un tratament în conformitate cu invenția cu un grup de control de pacienți care primesc doar un tratament standard pentru cancer în domeniu. Astfel de studii pentru evaluarea inhibării creșterii cancerului sunt proiectate în conformitate cu standardele acceptate pentru studiile clinice, de exemplu, studii dublu-orb, randomizate, cu suficientă putere statistică. Termenul „tratarea împotriva cancerului” include o inhibare a creșterii cancerului în care creșterea cancerului este inhibată parțial (adică, în cazul în care creșterea cancerului la pacient este întârziată în comparație cu grupul de control de pacienți), o inhibare în care creșterea cancerului este inhibată în mod complet (de exemplu, în cazul în care creșterea cancerului la pacient este oprită) și o inhibare în care creșterea cancerului este inversată (adică, cancerul se micșorează). De preferat, o evaluare a faptului dacă un tratament terapeutic funcționează sau nu poate fi făcută pe baza unei clasificări a respondenților și non-respondenților, prin utilizarea criteriilor de evaluare a răspunsului în tumorile solide, versiunea 1.1 (RECIST v1.1) (Eisenhauer și colab.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (versiunea 1.1). În: Eur. J. Cancer. 45, nr. 2, ianuarie 2009, p. 228-47). În mod alternativ sau suplimentar, o evaluare a faptului dacă un tratament terapeutic funcționează sau nu poate fi făcută pe baza indicatorilor clinici cunoscuți ai progresiei cancerului.

Tratamentul împotriva cancerului în conformitate cu invenția poate fi o terapie de linia întâi, o terapie de linia a doua sau o terapie de linia a treia sau o terapie care este dincolo de terapia de linia a treia. Înțelesul acestor termeni este cunoscut în domeniu și în conformitate cu terminologia care este utilizată în mod obișnuit de către Institutul Național al Cancerului din SUA.

Un tratament împotriva cancerului în conformitate cu prezenta invenția nu exclude faptul ca beneficii terapeutice adiționale sau secundare să aibă loc de asemenea, la pacienți. De exemplu, un beneficiu adițional sau secundar poate fi o influență asupra pierderii în greutate indusă de cancer. Totuși, se înțelege faptul că tratamentul primar pentru care se caută protecție este pentru tratarea cancerului în sine, orice efecte secundare sau adiționale reflectând doar avantaje opționale, adiționale ale tratamentului împotriva creșterii cancerului.

Termenul „imunoterapie împotriva cancerului” este cunoscut în domeniu și se referă în general la un tratament împotriva cancerului în care sistemul imunitar al pacientului este utilizat pentru a trata cancerul. Celulele canceroase prezintă mutații genomice care dau naștere la antigene ale celulelor canceroase care sunt specifice celulelor canceroase și diferite de antigenele celulelor non-canceroase. Astfel, dintr-un

punct de vedere preferat al imunoterapiei împotriva cancerului în conformitate cu prezenta invenție, o imunoterapie împotriva cancerului este o imunoterapie împotriva cancerului în care astfel de antigene de celule canceroase sunt recunoscute de sistemul imunitar și în care celulele canceroase care exprimă aceste antigene sunt distruse de sistemul imunitar. Dintr-un punct de vedere non-limitativ conform invenției, astfel de celule canceroase care exprimă aceste antigene de celule canceroase pot fi ucise de celulele T CD8⁺ ale sistemului imunitar. O imunoterapie împotriva cancerului poate fi evaluată prin metode de imunomonitorizare cunoscute în domeniu, de exemplu, prin măsurarea expresiei intracelulare a IFN- γ (de exemplu, în celule T CD8⁺ și/sau celule NK) în probe de sânge, măsurarea expresiei suprafeței celulei CD107a (de exemplu, în celule T CD8⁺ și/sau celule NK) în probele de sânge, măsurarea expresiei intracelulare a TNF- α (de exemplu, pe leucocite) în probele de sânge, expresia intracelulară a interleukinei-2 (de exemplu, în celule T CD8⁺ și/sau în celule T CD4⁺) în probele de sânge, expresia suprafeței celulelor CD154 (de exemplu, în CD8⁺ celule T și/sau în CD4⁺ celule T) în probe de sânge, colorare cu tetramer sau dextramer pentru celulele T specifice antigenului tumoral în probele de sânge, activitate CTL împotriva celulelor tumorale autologe sau prezența celulelor T împotriva neoantigenelor derivate din mutații specifice tumorii. Metodele preferate de evaluare a imunoterapiei împotriva cancerului sunt metodele în conformitate cu Gouttefangeas C și colab.: „Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality Assurance and Future.” (2015) In: Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (N. Rezaei editor). Springer. Capitolul 25: paginile 471-486; și metodele în conformitate cu Van der Burg SH, et al.: „Immunoguiding, the final frontier in the immunotherapy of cancer.” (2014) In Cancer Immunotherapy meets oncology (CM Britten, S Kreiter, M. Diken & HG Rammensee eds). Springer International Publishing Switzerland p37-51 ISBN: 978-3-319-05103-1.

Așa cum a fost utilizată aici, o "imunoterapie împotriva cancerului" cuprinde, în mod opțional, un tratament în care, în plus față de sistemul imunitar care este utilizat pentru a trata cancerul, mecanisme adiționale de tratament împotriva cancerului sunt utilizate. De exemplu, s-a prezentat anterior faptul că un inhibitor de hGDF-15 poate fi utilizat pentru tratamentul împotriva cancerului într-un sistem de model de șoarece în care sistemul imunitar a fost grav compromis (WO 2014/049087). Astfel, în conformitate cu prezenta invenție, o imunoterapie împotriva cancerului cu inhibitori de hGDF-15 la pacienți umani poate cuprinde, de asemenea, efecte adiționale de tratament ale inhibitorilor de hGDF-15 care sunt independente de sistemul imunitar. Un alt exemplu al unei imunoterapii împotriva cancerului în care mecanisme adiționale de tratament împotriva cancerului pot fi utilizate este o terapie combinată cu agent (agenți) chimioterapeutic (chimioterapeutici) cunoscut (cunoscuți). O astfel de terapie combinată cu agent (agenți) chimioterapeutic (chimioterapeutici) cunoscut (cunoscuți) poate include, de exemplu, nu numai tratamentul împotriva cancerului în care sistemul imunitar este utilizat pentru a trata cancerul, ci include și un tratament împotriva cancerului în care celulele canceroase sunt ucise de agentul (agenții) chimioterapeutic (chimioterapeutici) menționat (menționați) în mod direct.

Așa cum a fost utilizat aici, termenul „creșterea procentului de celulele T CD8⁺ într-un cancer solid” se referă la orice creștere măsurabilă a procentului de celule T CD8⁺ (adică procentul de celule T CD8⁺ calculat în raport cu toate celulele) în tumora sau tumorile formate de cancerul solid. De preferat, creșterea este semnificativă din punct de

vedere statistic, așa cum a fost evaluat prin teste statistice corespunzătoare, care sunt cunoscute în domeniu. O creștere a procentului de celule T CD8⁺ din tumoră sau din tumorile formate de cancerul solid poate fi determinată prin metode cunoscute pentru analiza celulelor T CD8⁺ în tumorile solide. Astfel de metode includ analize ale biopsiilor tumorale pentru celulele T CD8⁺, de exemplu, analize ale unor astfel de biopsii tumorale prin imunohistochimie folosind anticorpi împotriva CD8 și folosind o colorare pentru numărul total de celule. Creșterea poate fi evaluată prin compararea procentelor de celule T CD8⁺ din tumorile unui grup de pacienți tratați în conformitate cu prezenta invenție cu un grup de control de pacienți netratați sau prin compararea unui grup de pacienți care primesc un tratament standard împotriva cancerului din domeniu plus un tratament în conformitate cu invenția cu un grup de control de pacienți care primesc doar un tratament standard împotriva cancerului din domeniu.

Așa cum au fost utilizate aici, „celulele T CD8⁺” sunt, de preferat, celule care apar în mod endogen la pacientul uman.

Nivelurile serice de hGDF-15 pot fi măsurate prin orice metode cunoscute în domeniu. De exemplu, o metodă preferată de măsurare a nivelurilor serice de hGDF-15 este o măsurare a nivelurilor serice de hGDF-15 prin Analiza Imunosorbentului Legat de Enzime (ELISA) prin utilizarea anticorpilor față de GDF-15. Astfel de metode ELISA sunt exemplificate în Exemplul 1. În mod alternativ, nivelurile serice de hGDF-15 pot fi determinate prin imunoanalize de electrochimiluminiscentă cunoscute, utilizând anticorpi față de GDF-15. De exemplu, tehnologia Roche Elecsys[®] poate fi utilizată pentru astfel de imunoanalize de electrochimiluminiscentă.

Pacientul care urmează să fie tratat în conformitate cu invenția este, de preferat, un pacient cu niveluri serice crescute de hGDF-15. Termenul „niveluri serice crescute de hGDF-15”, așa cum a fost utilizat aici, înseamnă faptul că pacientul uman are niveluri de hGDF-15 mai mari în serul sanguin înainte de administrarea inhibitorului de hGDF-15 în conformitate cu invenția, în comparație cu nivelurile de hGDF-15 medii în serurile sanguine ale persoanelor sănătoase de control uman, ca referință.

Nivelul seric de hGDF-15 mediu al persoanelor de control uman sănătos este < 0,8 ng/ml. Intervalul așteptat este între 0,2 ng/ml și 1,2 ng/ml la controalele umane sănătoase (Referință: Tanno T și colab.: „Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease.” Curr Opin Hematol. 2010 May; 17(3): 184-190.

Astfel, într-o realizare preferată conform invenției, un pacient care urmează să fie tratat în conformitate cu invenția este un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,2 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15, de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,5 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15 și, mai de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,8 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15.

Într-o altă realizare preferată conform invenției, un pacient care urmează să fie tratat în conformitate cu invenția este un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,2 ng/ml și nu mai mult de 12 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului hGDF-15, de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,5 ng/ml și nu mai mult de 12 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15 și, mai de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de

cel puțin 1,8 ng/ml și nu mai mult de 12 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15.

Într-o altă realizare conform invenției, în conformitate cu toate realizările de mai sus, un pacient care urmează să fie tratat în conformitate cu invenția este un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,2 ng/ml și nu mai mult de 10 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15, de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,5 ng/ml și nu mai mult de 10 ng/ml anterior începerii administrării de hGDF-15, și mai de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,8 ng/ml și nu mai mult de 10 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15.

Într-o altă realizare conform invenției în conformitate cu toate realizările de mai sus, un pacient care urmează să fie tratat în conformitate cu invenția este un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,2 ng/ml și nu mai mult de 8 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15, de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,5 ng/ml și nu mai mult de 8 ng/ml anterior începerii administrării de hGDF-15, și mai de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 1,8 ng/ml și nu mai mult de 8 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15.

Într-o altă realizare, un pacient care urmează să fie tratat în conformitate cu invenția este un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel puțin 2 ng/ml, cel puțin 2,2 ng/ml, cel puțin 2,4 ng/ml, cel puțin 2,6 ng/ml, cel puțin 2,8 ng/ml, cel puțin 3,0 ng/ml, cel puțin 3,2 ng/ml, cel puțin 3,4 ng/ml, cel puțin 3,6 ng/ml, cel puțin 3,8 ng/ml, cel puțin 4,0 ng/ml sau cel puțin 4,2 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului hGDF-15. În această realizare, pacientul este de preferat, un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel mult 12 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15. Mai de preferat, în această realizare, pacientul este un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel mult 10 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15. Cel mai de preferat, în această realizare, pacientul este un pacient care prezintă un nivel seric de hGDF-15 de cel mult 8 ng/ml anterior începerii administrării inhibitorului de hGDF-15.

Termenul "anterior începerii administrării", așa cum a fost utilizat aici, înseamnă perioada de timp imediat înainte de administrarea inhibitorului de hGDF-15 în conformitate cu invenția. De preferat, termenul „anterior începerii administrării” înseamnă o perioadă de 30 de zile imediat înainte de administrare; cel mai de preferat, o perioadă de o săptămână imediat înainte de administrare.

Termenii „semnificativ”, „în mod semnificativ”, etc. așa cum au fost utilizați aici se referă la o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între valori, așa cum au fost evaluate prin metode corespunzătoare cunoscute în domeniu.

Inhibitorii de hGDF-15 și agenții de blocare a punctelor de control imunitare utilizați în conformitate cu invenția pot fi administrați prin utilizarea metodelor cunoscute în domeniu. Astfel de metode vor fi selectate de către un profesionist în domeniu pe baza considerațiilor bine-cunoscute, inclusiv a naturii chimice a inhibitorului respectiv (de exemplu, în funcție de faptul dacă inhibitorul este un ARN de interferență scurt sau un anticorp). Administrarea de agenți cunoscuți de blocare a punctelor de control imunitare se poate baza pe scheme cunoscute de administrare a acestor agenți de blocare a punctelor de control imunitare. De exemplu, administrarea agenților de blocare a

punctelor de control imunitare se poate baza pe schemele de administrare utilizate în studiul KEYNOTE-006 (C. Robert și colab. N Engl J Med 2015; 372:2521-2532).

În conformitate cu prezenta invenție, fiecare apariție a termenului "care cuprinde" poate fi în mod opțional substituită cu termenul "format din".

Inhibitori de hGDF-15

Un "inhibitor de hGDF-15" poate fi orice moleculă care este capabilă să inhibe în mod specific funcția GDF-15 uman (hGDF-15), cu condiția ca aceasta să fie în conformitate cu revendicările anexate.

Dacă sau nu o substanță de interes este un "inhibitor de hGDF-15", poate fi determinat prin utilizarea metodelor expuse aici, așa cum a fost detaliat în realizările preferate. O metodă preferată în conformitate cu realizările preferate este metoda utilizată în Exemplul 3.

A fost prezentat anterior faptul că proteina umană GDF-15 poate fi țintită în mod avantajos de către un anticorp monoclonal (WO 2014/049087), și faptul că un astfel de anticorp prezintă proprietăți avantajoase, incluzând o afinitate înaltă de legare la GDF-15 uman, așa cum a fost demonstrat de o constantă de disociere de echilibru de aproximativ 790 pM pentru GDF-15 uman recombinant (vezi, Exemplul de Referință 1). Astfel, în conformitate cu invenția, inhibitorul de hGDF-15 care urmează să fie utilizat este un anticorp monoclonal capabil de legare la hGDF-15 sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15.

Astfel, într-o realizare preferată, inhibitorul de hGDF-15 în conformitate cu invenția este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau la o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care domeniul variabil de lanț greu cuprinde o regiune CDR3, care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 5 sau o secvență de aminoacizi cel puțin 90% identică cu aceasta și în care domeniul variabil de lanț ușor cuprinde o regiune CDR3 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 7 sau o secvență de aminoacizi cel puțin 85% identică cu aceasta. În această realizare, de preferat, anticorpul sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde un domeniu variabil de lanț greu care cuprinde o regiune CDR1 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 3 și o regiune CDR2 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 4, și anticorpul sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde un domeniu variabil de lanț ușor care cuprinde o regiune CDR1 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 6 și o regiune CDR2 care cuprinde secvența de aminoacizi ser-ala-ser.

Astfel, într-o realizare încă mai preferată, inhibitorul de hGDF-15 în conformitate cu invenția este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care anticorpul sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde un domeniu variabil de lanț greu care cuprinde o regiune CDR1 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 3, o regiune CDR2 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 4 și o regiune CDR3 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 5 și în care anticorpul sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde un domeniu variabil de lanț ușor care cuprinde o regiune CDR1 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 6, o regiune CDR2 care cuprinde secvența de aminoacizi ser-ala-ser și o regiune CDR3 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 7.

Într-o altă realizare în conformitate cu realizările de mai sus ale anticorpului monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau la o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, domeniul variabil de lanț greu cuprinde o regiune care cuprinde o FR1, un CDR1, o FR2, o regiune CDR2 și o regiune FR3 și care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 1 sau o secvență 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde o regiune care cuprinde o FR1, un CDR1, o FR2, o regiune CDR2 și o regiune FR3 și care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 2 sau o secvență 85%, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identică cu aceasta.

Într-o realizare preferată în conformitate cu realizările de mai sus ale anticorpului monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau ale porțiunii acestuia de legare la hGDF-15, anticorpul este un anticorp umanizat sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15. Domeniul constant de lanț greu al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 poate cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 29 sau o secvență de aminoacizi de cel puțin 85%, de preferat, cel puțin 90%, mai de preferat, cel puțin 95% identică cu aceasta, și domeniul constant de lanț ușor al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 poate cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 32 sau o secvență de aminoacizi de cel puțin 85%, de preferat cel puțin 90%, mai de preferat, cel puțin 95% identică cu aceasta. Mai de preferat, domeniul constant de lanț greu al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 29 sau o secvență de aminoacizi de cel puțin 98%, de preferat, cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul constant de lanț ușor al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 32 sau o secvență de aminoacizi de cel puțin 98%, de preferat, cel puțin 99% identică la aceasta. Încă mai de preferat, domeniul constant de lanț greu al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 29 și domeniul constant de lanț ușor al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 32. Domeniul variabil de lanț greu al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 poate cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 28 sau o secvență de aminoacizi cel puțin 90%, de preferat, cel puțin 95%, mai de preferat, cel puțin 98%, încă mai de preferat, cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 poate cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 31, sau o secvență de aminoacizi de cel puțin 90%, de preferat cel puțin 95%, mai de preferat, cel puțin 98%, încă mai de preferat, cel puțin 99% identică cu aceasta. Cel mai de preferat, domeniul variabil de lanț greu al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 28 și domeniul variabil de lanț ușor al acestui anticorp monoclonal sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15 cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 31.

Într-o altă realizare în conformitate cu realizările de mai sus ale anticorpului monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau ale porțiunii acestuia de legare la hGDF-15, domeniul variabil de lanț greu cuprinde o regiune CDR1 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 3 și o regiune CDR2 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 4, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde o regiune CDR1

care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 6 și o regiune CDR2 care cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 7. Dintr-un punct de vedere preferat conform acestei realizări, anticorpul poate avea secvențe CDR3, așa cum au fost definite în oricare dintre realizările conform invenției, descrise mai sus.

Într-o altă realizare în conformitate cu anticorpul monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau la o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, porțiunea de legare la hGDF-15 este un anticorp cu domeniu unic (denumit și „Nanocorp™”). Dintr-un punct de vedere conform acestei realizări, anticorpul cu domeniu unic cuprinde secvențele de aminoacizi CDR1, CDR2 și CDR3 din SEQ ID NR: 3, SEQ ID NR: 4 și, respectiv, SEQ ID NR: 5. Dintr-un alt punct de vedere conform acestei realizări anticorpul cu domeniu unic cuprinde secvențele de aminoacizi CDR1, CDR2 și CDR3 ale SEQ ID NR: 6, ser-ala-ser și, respectiv, SEQ ID NR: 7. Dintr-un punct de vedere preferat conform acestei realizări, anticorpul cu domeniu unic este un anticorp umanizat.

De preferat, anticorpii capabili de legare la GDF-15 uman sau porțiunile acestora de legare la hGDF-15 prezintă o constantă de disociere de echilibru pentru GDF-15 uman care este egală cu sau mai mică de 100 nM, mai mică de 20 nM, de preferat, mai mică de 10 nM, mai de preferat, mai puțin de 5 nM și cel mai de preferat, între 0,1 nM și 2 nM.

Într-o altă realizare, în conformitate cu realizările de mai sus, ale anticorpului monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau ale porțiunii acestuia de legare la hGDF-15, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 se leagă la același epitop uman GDF-15 precum anticorpul la GDF-15 uman care poate fi obținut din linia celulară B1-23 depozitată la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ) sub numărul de acces DSM ACC3142. Așa cum a fost descris aici, legarea anticorpului la GDF-15 uman în conformitate cu prezenta invenție este de preferat, evaluată prin măsurători de rezonanță plasmonică de suprafață ca metodă standard de referință, în conformitate cu procedurile descrise în Exemplul de Referință 1. Legarea la același epitop pe GDF uman -15 poate fi evaluat în mod asemănător prin experimente de legare competitivă prin rezonanță plasmonică de suprafață a anticorpului la GDF-15 uman care poate fi obținut din linia celulară B1-23 și anticorpul care este anticipat a se lega la același epitop uman GDF-15 precum anticorpul uman. GDF-15 care poate fi obținut din linia celulară B1-23.

Într-o altă realizare preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care domeniul variabil de lanț cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 39 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 40 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta.

Într-o altă realizare preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care domeniul variabil de lanț cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 41 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin

94%, cel puțin cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 42 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta.

Într-o altă realizare preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care domeniul variabil de lanț cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 43 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 44 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta.

Într-o altă realizare preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care domeniul variabil de lanț cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 45 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 46 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta.

Într-o altă realizare preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care domeniul variabil de lanț cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 47 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 48 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta.

Într-o altă realizare preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care domeniul variabil de lanț cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 49 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 50 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta.

Într-o altă realizare preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care domeniul variabil de lanț cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 51 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta, și domeniul variabil de lanț ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NR: 52 sau o secvență care este cel puțin 85%, cel puțin 90%, cel puțin 91%, cel puțin 92%, cel puțin 93%, cel puțin 94%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu aceasta.

Într-o altă realizare preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal sau o porțiune a acestuia care leagă hGDF-15, care este capabil să concureze cu oricare dintre anticorpii capabili de legarea la GDF-15 uman la care se face referire aici, pentru legarea la GDF-15 uman, de preferat, pentru legare la GDF-15 uman recombinant.

Într-o realizare foarte preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau la porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal umanizat sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15. Pentru orice secvență de anticorp non-uman dată, în conformitate cu invenția (adică, o secvență de anticorp donor), anticorpii monoclonali umanizați anti-GDF-15 uman în conformitate cu invenția sau porțiunile acestora de legare la hGDF-15 pot fi generate în conformitate cu tehnicile cunoscute. În domeniu, așa cum a fost descris mai sus.

Într-o realizare foarte preferată, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este un anticorp monoclonal capabil de legare la GDF-15 uman sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, în care legarea este legare la un epitop conformațional sau discontinuu pe GDF-15 uman, cuprins din secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NR: 25 și SEQ ID NR: 26. Dintr-un punct de vedere preferat conform acestei realizări, anticorpul sau porțiunea de legare la hGDF-15 acesta este un anticorp sau o porțiune a acestuia de legare la hGDF-15, așa cum a fost definit de secvențele conform oricăreia dintre realizările de mai sus.

Anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 poate fi legată la un medicament. Din puncte de vedere non-limitative conform acestei realizări, medicamentul poate fi un agent anticancer cunoscut și/sau o moleculă imunostimulatoare. Agenți anticancer cunoscuți includ agenți de alchilare cum ar fi cisplatină, carboplatină, oxaliplatină, mecloretamina, ciclofosamidă, clorambucil și ifosfamidă; anti-metaboliți cum ar fi azatioprină și mercaptopurină; alcaloizi cum ar fi alcaloizi vinca (de exemplu, vincristină, vinblastină, vinorelbină și vindesină), taxani (de exemplu, paclitaxel, docetaxel) etoposid și teniposid; inhibitori de topoizomerază, cum ar fi camptotecine (de exemplu, irinotecan și topotecan); antibiotice citotoxice cum ar fi actinomicină, antraciclină, doxorubicină, daunorubicină, valrubicină, idarubicină, epirubicină, bleomicina, plicamicină și mitomicina; și radioizotopi.

Într-o altă realizare în conformitate cu exemplele de mai sus, anticorpul capabil de legare la GDF-15 uman sau porțiunea acestuia de legare la hGDF-15 este modificată printr-un marker de aminoacid. Exemple non-limitative de astfel de markeri includ markeri de Polihistidină (His-), marker FLAG, marker de hemaglutinină (HA), marker de glicoproteină D (gD) și marker c-myc. Markerii pot fi folosiți în diverse scopuri. De

exemplu, ei pot fi utilizați pentru a ajuta la purificarea anticorpului capabil de legare la GDF-15 uman sau a porțiunii acestuia de legare la hGDF-15. De preferat, astfel de markeri sunt prezenți la capătul C-terminal sau N-terminal al anticorpului capabil de legare la GDF-15 uman sau al porțiunii acestuia de legare la hGDF-15.

Agenți de blocare a punctelor de control imunitare

Celulele canceroase prezintă mutații genomice care dau naștere la antigene ale celulelor canceroase care sunt specifice celulelor canceroase și diferite de antigenele celulelor necanceroase. Prin urmare, un sistem imunitar intact care nu este inhibat ar trebui să recunoască aceste antigene ale celulelor canceroase, astfel încât un răspuns imunitar împotriva acestor antigene să fie determinat. Cu toate acestea, majoritatea cancerelor au dezvoltat mecanisme de toleranță imunitară împotriva acestor antigene. O clasă de mecanisme prin care celulele canceroase ating o astfel de toleranță imunitară este utilizarea punctelor de control imunitar. Un "punct de control imunitar" așa cum a fost utilizat aici, înseamnă în general un mecanism imunologic prin care un răspuns imunitar poate fi inhibat. Mai particular, un punct de control imunitar este un mecanism care este caracterizat prin faptul că o moleculă a sistemului imunitar (sau un grup de molecule ale sistemului imunitar) inhibă răspunsul imunitar prin inhibarea activării celulelor sistemului imunitar. O astfel de moleculă (sau grup de molecule) a sistemului imunitar care inhibă (inhibă) răspunsul imunitar prin inhibarea activării celulelor sistemului imunitar este (sunt) cunoscută (cunoscute) și sub denumirea de molecule de punct de control.

Așa cum a fost utilizat aici, un "agent de blocare a punctului de control imunitar" este o moleculă care este capabilă de blocarea unui punct de control imunitar. În timp ce se înțelege faptul că un inhibitor de hGDF-15, așa cum a fost utilizat în conformitate cu invenția, are efecte asupra sistemului imunitar, incluzând efecte asupra celulelor T CD8+, termenul „agent de blocare a punctului de control imunitar” așa cum a fost utilizat aici nu se referă la un inhibitor de hGDF-15, ci înseamnă o moleculă care este diferită de un inhibitor de hGDF-15. Cei mai obișnuiți agenți de blocare a punctelor de control imunitare care sunt cunoscuți până în prezent sunt inhibitorii moleculelor punctelor de control imune, cum ar fi inhibitorii PD-1 uman și inhibitorii PD-L1 uman. Alți agenți de blocare a punctelor de control imunitare sunt anti-LAG-3, anti-B7H3, anti-TIM3, anti-VISTA, anti-TIGIT, anti-KIR, anti-CD27, anti-CD137 precum și inhibitorii deIDO. Prin urmare, o formă preferată de agent de blocare a punctului de control imunitar este un inhibitor al unei molecule a punctului de control imunitar. În mod alternativ, un agent de blocare a punctului de control imunitar poate fi un activator al unui semnal de co-stimulare care trece peste punctul de control imunitar. Metode pentru a măsura potența agenților de blocare a punctelor de control imunitare includ analize de legare in vitro, analize primare de eliberare a citokinelor pe bază de celule T și sisteme de model in vivo. În plus, Promega a dezvoltat în prezent un sistem reporter bioluminiscent disponibil din punct de vedere comercial pentru PD-1/PD-L1, care este, de exemplu, menționat în Mei Cong, Ph.D. și colab.: Advertorial: Novel Biotest to Assess PD-1/PD-L1 Therapeutic Anticorpi in Development for Immunotherapy Bioluminescent Reporter-Based PD-1/PD-L1 Blockade Bioasy. (<http://www.genengnews.com/gen-articles/advertorial-novel-bioassay-to-assess-pd-1-pd-l1-therapeutic-antibodies-in-development-for-immun/5511/>).

Agenți preferați de blocare a punctelor de control imunitare sunt inhibitorii de PD-1 uman și inhibitorii de PD-L1 uman. Într-o realizare preferată în conformitate cu toate

realizările conform invenției, agentul de blocare a punctului de control imunitar nu este un inhibitor de CTLA4 uman.

Așa cum a fost utilizat aici, un "inhibitor de PD-1 uman" poate fi orice moleculă care este capabilă să inhibe în mod specific funcția PD-1 umană. Exemple non-limitative de astfel de molecule sunt anticorpii capabili de legare la PD-1 uman și DARPin-uri (Proteine de Ankirină Proiectate cu Repetare) capabile de legare la PD-1 uman.

Inhibitorul de PD-1 care trebuie utilizat în conformitate cu invenția este un anticorp capabil de legare la PD-1 uman, mai de preferat, un anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 uman. Cel mai de preferat, anticorpul monoclonal capabil de legare la PD-1 uman este selectat din grupul format din nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab și AMP-224.

Așa cum a fost utilizat aici, un "inhibitor de PD-L1 uman" poate fi orice moleculă care este capabilă să inhibe în mod specific funcția PD-L1 umană. Exemple non-limitative de astfel de molecule sunt anticorpi capabili de legare la PD-L1 uman și DARPin-uri (Proteine de Ankirină Proiectate cu Repetare) capabile de legare la PD-L1 uman.

Inhibitorul de PD-L1 uman care trebuie utilizat în conformitate cu invenția este un anticorp capabil de legare la PD-L1 uman, mai de preferat, un anticorp monoclonal capabil de legare de PD-L1 uman. Cel mai de preferat, anticorpul monoclonal capabil de legare la PD-L1 uman este selectat din grupul format din BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 și MSB0010718C.

Metode și tehnici

În general, cu excepția cazului în care a fost definit altfel aici, metodele utilizate în prezenta invenție (de exemplu, metode de clonare sau metode referitoare la anticorpi) sunt efectuate în conformitate cu procedurile cunoscute în domeniu, de exemplu, procedurile descrise în Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", Ed. a doua, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989), Ausubel și colab. ("Current Protocols in Molecular Biology." Greene Publishing Associates și Wiley Interscience; New York 1992), și Harlow și Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988) .

Legarea anticorpilor la proteinele lor țintă respective poate fi evaluată prin metode cunoscute în domeniu. Legarea anticorpilor monoclonali la țintele lor respective este, de preferat, evaluată prin măsurători de rezonanță plasmonică de suprafață. Aceste măsurători sunt, de preferat, efectuate utilizând un sistem Biorad ProteOn XPR36 și cipuri cu senzor Biorad GLC, așa cum a fost exemplificat pentru mAb-B1-23 GDF-15 anti-uman în Exemplul de Referință 1.

Alinierea secvențelor în conformitate cu invenția se realizează prin utilizarea algoritmului BLAST (vezi Altschul și colab. (1990) „Basic local alignment search tool." Journal of Molecular Biology 215. p. 403-410.; Altschul și colab.: (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.). De preferat, următorii parametri sunt utilizați: Secvențe țintă maxime 10; Dimensiunea cuvântului 3; matricea BLOSUM 62; costuri gap: existență 11, extensie 1; ajustarea matricei scorului compozițional condiționat. Astfel, atunci când sunt utilizați în legătură cu secvențe, termeni cum ar fi „identitate” sau „identic” se referă la valoarea de identitate obținută prin utilizarea algoritmului BLAST.

Anticorpilor monoclonali în conformitate cu invenția pot fi produși prin orice metodă cunoscută în domeniu, incluzând, dar fără a fi limitată la metodele menționate în Siegel DL („Recombinant monoclonal antibody technology.” Transfus Clin Biol. 2002 Jan;9(1):15-22.). Într-o realizare, un anticorp în conformitate cu invenția este produs de linia celulară de hibridom B1-23 depozitată la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) sub nr. de acces DSM ACC3142 potrivit Tratatului de la Budapesta. Depozitul a fost depus la 29 septembrie 2011.

Proliferarea celulară poate fi măsurată prin metode corespunzătoare cunoscute în domeniu, incluzând (dar fără a fi limitate la) microscopia vizuală, analize metabolice, cum ar fi cele care măsoară potențialul redox mitocondrial (de exemplu, analiza MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) bromură de 2,5-difeniltetrazoliu); colorare cu resazurină, care cunoscută de asemenea ca analiză Alamar Blue®), colorarea biomarkerilor cunoscuți de proliferare endogenă (de exemplu, Ki-67) și metode care măsoară sinteza ADN-ului celular (de exemplu, BrdU și analize de incorporare a timidinei [³H]).

Nivelurile de GDF-15 uman (hGDF-15) pot fi măsurate prin orice metodă cunoscută în domeniu, incluzând măsurători ale nivelurilor de proteină hGDF-15 prin metode care includ (dar fără a fi limitate la) spectrometrie de masă pentru proteine sau peptide derivate din GDF-15 uman, Blotare Western folosind anticorpi specifici pentru GDF-15 uman, citometrie în flux folosind anticorpi specifici pentru GDF-15 uman, analize cu bandă care folosesc anticorpi specifici pentru GDF-15 uman sau imunocitochimie care folosește anticorpi specifici pentru GDF-15 uman. O metodă preferată de măsurare a nivelurilor serice de hGDF-15 este o măsurare a nivelurilor serice de hGDF-15 prin Analiza Imunosorbentului Legat de Enzime (ELISA) prin utilizarea anticorpilor la GDF-15. Astfel de metode ELISA sunt exemplificate în Exemplul 1. În mod alternativ, nivelurile serice de hGDF-15 pot fi determinate prin imunoanalizele de electrochimiluminiscentă cunoscute utilizând anticorpi față de GDF-15. De exemplu, tehnologia Roche Elecsys® poate fi utilizată pentru astfel de analize imunologice de electrochimiluminiscentă.

Prepararea compozițiilor conform invenției

Compozițiile în conformitate cu prezenta invenție sunt preparate în conformitate cu standardele cunoscute pentru prepararea compozițiilor farmaceutice.

De exemplu, compozițiile sunt preparate într-un mod în care acestea pot fi depozitate și administrate în mod corespunzător, de exemplu, prin utilizarea componentelor acceptabile din punct de vedere farmaceutic, cum ar fi agenți transportori, excipienți sau agenți de stabilizare.

Astfel de componente acceptabile din punct de vedere farmaceutic nu sunt toxice în cantitățile utilizate atunci când se administrează compoziția farmaceutică la un pacient. Componentele acceptabile din punct de vedere farmaceutic adăugate la compozițiile farmaceutice pot depinde de natura chimică a inhibitorilor prezenți în compoziție (de exemplu, depind de faptul dacă inhibitorii sunt anticorpi, construcții de ac de păr ARNsi sau ARN-uri scurte de interferență), de utilizarea particulară intenționată a compozițiilor farmaceutice și de calea de administrare.

În general, componentele acceptabile din punct de vedere farmaceutic utilizate în legătură cu prezenta invenție sunt utilizate în conformitate cu cunoștințele disponibile în domeniu, de exemplu, din Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, ediția a 20-a, 2000, Williams & Wilkins, PA, SUA.

Produse pentru utilizare în metode terapeutice

Prezenta invenție se referă la inhibitorii de hGDF-15 pentru utilizări, așa cum au fost definite în revendicările anexate.

Într-o realizare a inhibitorilor de hGDF-15 de mai sus pentru utilizare, kituri pentru utilizare sau compoziții pentru utilizare, inhibitorul de hGDF-15 și agentul de blocare a punctului de control imunitar sunt singurele ingrediente care sunt active din punct de vedere farmaceutic împotriva cancerului.

Într-o realizare alternativă, inhibitorul de hGDF-15 este utilizat în combinație cu unul sau mai multe ingrediente active din punct de vedere farmaceutic împotriva cancerului. Dintr-un punct de vedere al acestei realizări, acel unul sau mai multe ingrediente suplimentare active din punct de vedere farmaceutic împotriva cancerului este un agent anticancer și/sau o moleculă imunostimulatoare cunoscute. Agenții anticancer cunoscuți includ, dar nu sunt limitați la, agenți de alchilare cum ar fi cisplatină, carboplatină, oxaliplatină, mecloretamina, ciclofosfamidă, clorambucil și ifosfamidă; anti-metaboliți cum ar fi azatioprină și mercaptopurină; alcaloizi cum ar fi alcaloizi vinca (de exemplu, vincristină, vinblastină, vinorelbina și vindesină), taxani (de exemplu, paclitaxel, docetaxel) etoposid și teniposid; inhibitori de topoizomerază, cum ar fi camptotecine (de exemplu, irinotecan și topotecan); antibiotice citotoxice cum ar fi actinomicina, antracicline, doxorubicină, daunorubicină, valrubicină, idarubicină, epirubicină, bleomicina, plicamicină și mitomicina; și radioizotopi. Următoarele ingrediente active din punct de vedere farmaceutic împotriva cancerului sunt de preferat să fie utilizate în combinație cu inhibitorul de hGDF-15: Moleculele imunostimulatoare includ anti-LAG-3, anti-B7H3, anti-TIM3, anti-VISTA, anti-TIGIT, anti-KIR, anti-CD27, anti-CD137, anti-Ox40, anti-4-1BB, anti-GITR, anti-CD28, anti-CD40 sau inhibitori IDO. Mai mult, alte tratamente cu anticorpi cum ar fi anti-Her2, anti-EGFR, anti-Claudină sau succesorii lor glico-optimizezați sunt, de asemenea, preferate în mod deosebit, din moment ce acestea vor beneficia de o combinație cu inhibitorul de hGDF-15, de exemplu, datorită infiltrației îmbunătățite a celulelor imune în cancerul solid cauzat de inhibitorul hGDF-15. De asemenea, abordările de vaccinare (de exemplu, cu peptide sau celule dendritice) sau terapiile cu celule adoptive, celulele T reactive tumorale sau celulele dendritice sunt, de asemenea, preferate în mod deosebit, din moment ce acestea vor beneficia de o combinație cu inhibitorul de hGDF-15. În plus, următoarele tratamente sunt, de asemenea, preferate în special, din moment ce se vor sinergiza cu inhibitorul de hGDF-15:

- Tratamente cu anticorpi sau molecule de tip anticorp care prezintă una sau mai multe specificități pentru celulele tumorale și imune (de exemplu, Bites, DART-uri, DARPIN-uri, Catumaxomab);
- tratamente prin imunoterapie pe bază de vaccin împotriva peptidelor asociate cu tumora, de exemplu cu vaccinuri cu multipeptide, cum ar fi IMA901, ISA203 sau cu vaccinuri pe bază de ARN (de exemplu, CV9104) și/sau
- tratamente cu substanțe care activează celulele imune (de exemplu, derivați FAA pentru a activa macrofagele sau liganzi pentru receptorii de tip toll, cum ar fi conjugații SLP-AMPLIVANT).

Combinatii pentru utilizări în conformitate cu invenția

Prezenta invenție cuprinde produse combinate pentru utilizare, așa cum au fost definite de revendicările anexate.

Combinăția dintre inhibitorul de hGDF-15 și agentul de blocare a punctului de control imunitar poate fi administrată fie împreună, fie separat.

De exemplu, într-o realizare preferată, administrarea inhibitorului de hGDF-15 trebuie începută anterior începerii administrării agentului de blocare a punctului de control imunitar. Această setare permite în mod avantajos creșterea procentului de celule T, și în special a procentului de celule T CD8⁺ din cancerul solid, astfel încât un tratament ulterior cu agentul de blocare a punctului de control imunitar să poată fi mai eficient datorită procentului de început crescut de celule T CD8⁺ în cancerul solid.

Kituri

Prezenta expunere asigură, de asemenea, un kit care cuprinde un inhibitor de hGDF-15 și cel puțin un agent de blocare a punctului de control imunitar, așa cum a fost definit mai sus. Kitul în conformitate cu invenția este așa cum a fost definit în revendicările anexate.

Inhibitorul de hGDF-15 și unul sau mai mulți sau toți agenții de blocare a punctului de control imunitar pot fi conținuți în recipiente separate sau într-un singur recipient.

Un recipient, așa cum a fost utilizat, poate fi orice tip de recipient care este corespunzător pentru a păstra inhibitorul de hGDF-15 și/sau cel puțin un agent de blocare a punctului de control imunitar. Exemple non-limitative de astfel de recipiente sunt flacoane și seringi pre-umplute.

În plus față de inhibitorul hGDF-15 și cel puțin un agent de blocare a punctului de control imunitar, kitul poate conține alți agenți terapeutici. De exemplu, kitul poate conține unul sau mai multe ingrediente active din punct de vedere farmaceutic împotriva cancerului. Acel unul sau mai multe ingrediente suplimentare active din punct de vedere farmaceutic împotriva cancerului pot fi așa cum au fost definite mai sus. Astfel de ingrediente suplimentare active din punct de vedere farmaceutic împotriva cancerului pot fi utilizate în metodele conform invenției împreună cu inhibitorul de hGDF-15 și cel puțin un agent de blocare a punctului de control imun.

De preferat, un kit în conformitate cu invenția, cuprinde în plus instrucțiuni de utilizare.

Secvențe

Secvențele de aminoacizi la care se face referire în prezenta cerere sunt după cum urmează (într-o ordine de la N-terminal la C-terminal; reprezentate în codul de aminoacizi, cu o literă):

SEQ ID NR: 1 (Regiunea Domeniului Variabil de Lanț Greu care cuprinde o FR1, un CDR1, o FR2, un CDR2 și o regiune FR3 din secvența de polipeptidă a mAb-B1-23 monoclonal anti-uman GDF-15):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISK

DPSRNQVFLKITSVDTADTATYYC

SEQ ID NR: 2 (Regiunea Domeniului Variabil de Lanț Ușor care cuprinde o FR1, un CDR1, o FR2, un CDR2 și o regiune FR3 din secvența de polipeptidă a mAb-B1-23 monoclonal anti-uman GDF-15):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGDTFT

LTISNVQSEDLAEYFC

SEQ ID NR: 3 (Secvența de peptidă a regiunii CDR1 de Lanț Greu a mAb-B1-23 GDF-15 monoclonal anti-uman):

GFSLSTSGMG

SEQ ID NR: 4 (Secvența de peptidă a regiunii CDR2 de Lanț Greu a mAb-B1-23 GDF-15 monoclonal anti-uman):

IYWDDDK

SEQ ID NR: 5 (Secvența de peptidă a regiunii CDR3 de Lanț Greu a mAb-B1-23 GDF-15 monoclonal anti-uman):

ARSIGAMDIA

SEQ ID NR: 6 (Secvența de peptidă a regiunii CDR1 de Lanț Ușor a mAb-B1-23 GDF-15 monoclonal anti-uman):

QNVGTN

Secvența de peptidă a regiunii CDR2 de Lanț Ușor de mAb-B1-23 GDF-15 monoclonal anti-uman:

SAS

SEQ ID NR: 7 (Secvența de peptidă a regiunii CDR3 de Lanț Ușor a mAb-B1-23 GDF-15 monoclonal anti-uman):

QQYNNFPYT

SEQ ID NR: 8 (proteina GDF-15 umană matură recombinantă):

GSARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLK

PDTVPAAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NR: 9 (proteina precursoră de GDF-15 uman):

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSALAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLLTRLRANQS

WEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQL

SLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCLHTV

RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD

DTGVSQTYDDLLAKDCHCI

SEQ ID NR: 10 (proteina precursoră de GDF-15 uman + agent de interconectare GSGS N-terminal și C-terminal):

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSALAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYEDLL

TRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDV

TRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSARPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPG

RCCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASY

NPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCIGSGSGSG

SEQ ID NR: 11 (Peptidă Flag): DYKDDDDKGG

SEQ ID NR: 12 (peptidă HA): YPYDVPDYAG

SEQ ID NR: 13 (peptidă derivată din GDF-15 uman): ELHLRPQAARGRR

SEQ ID NR: 14 (peptidă derivată din GDF-15 uman): LHLRPQAARGRRR

SEQ ID NR: 15 (peptidă derivată din GDF-15 uman): HLRPQAARGRRRA

SEQ ID NR: 16 (peptidă derivată din GDF-15 uman): LRPQAARGRRRAR

SEQ ID NR: 17 (peptidă derivată din GDF-15 uman): RPQAARGRRRARAR

SEQ ID NR: 18 (peptidă derivată din GDF-15 uman): PQAARGRRRARAR

SEQ ID NR: 19 (peptidă derivată din GDF-15 uman): QAARGRRRARARN

SEQ ID NR: 20 (peptidă derivată din GDF-15 uman): MHAQIKTSLHRLK

SEQ ID NR: 25 (peptidă GDF-15 care cuprinde o parte a epitopului GDF-15 care se leagă la B1-23): EVQVTMCIGACPSQFR

SEQ ID NR: 26 (peptidă GDF-15 care cuprinde o parte a epitopului GDF-15 care se leagă la B1-23): TDTGVSQTYDDLLAKDCHCI

Secvențele de acid nucleic la care se face referire în prezenta cerere sunt după cum urmează (într-o ordine de la 5' la 3'; reprezentate în conformitate cu codul standard de acid nucleic):

SEQ ID NR: 21 (secvența de nucleotidă de ADN care codifică secvența de aminoacizi definită în SEQ ID NR: 1):

CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCTCCAGACCCCTCAGTCTGACTTGTCT
TTCTCTGGGTTTTCACTGAGTACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGT
TGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACCCAACCCTGAAGAGCCGGCTCA
CAATCTCCAAGGATCCCTCCAGAAACCAGGTATTCTCAAGATCACCAGTGTGGACTGCAGATACTGC
CACATACTACTGT

SEQ ID NR: 22 (secvența de nucleotidă de ADN care codifică secvența de aminoacizi definită în SEQ ID NR: 2):

GACATTGTGCTACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACTGCA
AGGCCAGTCAGAATGTGGTACTAATGTGGCCTGGTTTCTACAGAAACCAGGGCAATCTCTAAAGCACT
TATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGA
TTTCACTCTACCATCAGCAACGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGT

SEQ ID NR: 23 (secvența de nucleotidă de ADN care codifică secvența de aminoacizi definită în SEQ ID NR: 5):

GCTCGAAGTTCCTACGGGGCAATGGACTAC

SEQ ID NR: 24 (secvența de nucleotidă de ADN care codifică secvența de aminoacizi definită în SEQ ID NR: 7): CAGCAATATAACAACCTTCCGTACACG

Secvențe suplimentare de aminoacizi sunt după cum urmează (într-o ordine de la N-terminal la C-terminal; reprezentate de codul de aminoacizi, cu o literă.):

SEQ ID NR: 27 (secvența de aminoacizi a lanțului greu de anticorp H1L5 umanizat B1-23 anti-GDF-15):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTITKD
PSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSSYGAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NR: 28 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp H1L5 umanizat B1-23 anti-GDF-15):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTITKD
PSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSSYGAMDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NR: 29 (secvența de aminoacizi a domeniului constant de lanț greu de anticorp H1L5 umanizat B1-23 anti-GDF-15):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NR: 30 (secvența de aminoacizi a lanțului ușor de anticorp H1L5 umanizat B1-23 anti-GDF-15):

DIVLTQSPSFLSASVGDVRTITCKASQNVGTNVAWFQKPKGKSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTEFTL
 TISSLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKRAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NR: 31 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp H1L5 umanizat B1-23 anti-GDF-15):

DIVLTQSPSFLSASVGDVRTITCKASQNVGTNVAWFQKPKGKSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTEFTL
 TISSLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NR: 32 (secvența de aminoacizi a domeniului constant de lanț ușor de anticorp H1L5 umanizat B1-23 anti-GDF-15):

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKA
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NR: 33 (secvența de aminoacizi a lanțului greu de anticorp himeric B1-23 anti-GDF-15):

QVKLQQSGPGLQSSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISK
 DPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
 HNHYTQKSLSPGK

SEQ ID NR: 34 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp himeric B1-23 anti-GDF-15):

QVKLQQSGPGLQSSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPTLKSRLTISK
 DPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NR: 35 (secvența de aminoacizi a domeniului constant de lanț greu de anticorp himeric B1-23 anti-GDF-15):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

SEQ ID NR: 36 (secvența de aminoacizi a lanțului ușor de anticorp himeric B1-23 anti-GDF-15):

DIVLTQSPKFMSTSVGDVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFT
 LTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NR: 37 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp himeric B1-23 anti-GDF-15):

DIVLTQSPKFMSTSVGDVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFT
 LTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKRTVA

SEQ ID NR: 38 (secvența de aminoacizi a domeniului constant de lanț ușor de anticorp himeric B1-23 anti-GDF-15):

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKA
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NR: 39 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp 01G06):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFDYNDMDWVRQAPGQSLEWMGQINPNNGLIFFNQKFQGRVTL

TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NR: 40 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp 01G06):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSENHNYLAWYQQKPKGSPKLLIYDAKTLADGVPSRFSGSGSGTDY

TLTISSLQPEDFATYYCQHFWSDPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NR: 41 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp 03G05):

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTFSYWIHWVNQRPGQGLEWIGDINPSNGRSKYNEKFNKATMT

ADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVLDGAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NR: 42 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp 03G05):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGGVPARFSGSGS

GTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGSKLEIK

SEQ ID NR: 43 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp 04F08):

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTYGMGVTWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTI

SKDTSNNQVFLKITSVDTADTATYYCAQTGYSNLFAYWGQGLTVTVSA

SEQ ID NR: 44 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp 04F08):

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKLGQSPKTLIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF

: TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGSKLEIK

SEQ ID NR: 45 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp 06C11):

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLNTYGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTI

SKDASNNRVFLKITSVDTADTATYYCAQRGYDDYWGYYWGQGLTVTISA

SEQ ID NR: 46 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp 06C11):

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF

ILTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NR: 47 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp 08G01):

EVLLQQSGPEVVKPGASVKIPCKASGYFTFDYNDMDWVKQSHGKSLEWIGEINPNNGGTFYNQKFKGKATLT

VDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NR: 48 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp 08G01):

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTQY

SLKINSLQPEDFGSYCQHFWSPPYTFGGGSKLEIK

SEQ ID NR: 49 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp 14F11):

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWLADIWWDDDKYYNPSLKSRLTI

SKDTSNEVFLKIAIVDTADTATYYCARRGHYSAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NR: 50 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp 14F11):

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSPSYRYSGVPDRFTGSGSGTDF

TLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPHTFGGGTKLEMK

SEQ ID NR: 51 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț greu de anticorp 17B11):

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHNDWDDDKRYKSSLKSRLLTI

SKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARRVGGLEGYFDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NR: 52 (secvența de aminoacizi a domeniului variabil de lanț ușor de anticorp 17B11):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSRFSYMHWFQKPGQAPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGS

GTDFTLNHPVEGEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

Exemple

Exemplele de Referință 1 până la 3 exemplifică un inhibitor de hGDF-15, care poate fi utilizat în compozițiile, kiturile, metodele și utilizările în conformitate cu invenția. Acest inhibitor de hGDF-15 este un anticorp monoclonal care este cunoscut din WO 2014/049087:

Exemplul de Referință 1: Generarea și caracterizarea anticorpului GDF-15 B1-23

Anticorpul B1-23 a fost generat într-un șoarece knock-out GDF-15. GDF-15 uman recombinant (SEQ ID NR: 8) a fost utilizat ca imunogen.

Linia celulară de hibridom B1-23 care produce mAb-B1-23 a fost depusă de Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Sanderring 2, 97070 Würzburg, Germania, la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) sub numărul de acces DSM ACC3142, în conformitate cu Tratatul de la Budapesta.

Prin intermediul unui sistem cu bandă de analiză disponibil din punct de vedere comercial, B1-23 a fost identificat ca un izotip IgG2a (lanț kappa). Folosind măsurătorile de rezonanță plasmonică de suprafață, constanta de disociere (K_d) a fost determinată după cum urmează: Legarea anticorpului monoclonal anti-GDF-15 mAb-B1-23 anti-GDF-15 uman în conformitate cu invenția a fost măsurată prin utilizarea măsurătorilor de rezonanță plasmonică de suprafață, folosind un sistem Biorad ProteOn XPR36 și cipuri cu senzori Biorad GLC: Pentru prepararea biosenzorilor, proteina GDF-15 umană matură recombinantă a fost imobilizată pe celulele de flux 1 și 2. Pe o celulă de flux GDF-15 recombinant derivat din celule de insecte transfectate cu Baculvirus (celule de insecte HighFive) și pe cealaltă proteină recombinată derivată din expresia în *E. Coli* a fost utilizată. Cipul senzorului GLC a fost activat folosind Sulfo-NHS (N-Hidroxisulfosuccinimidă) și EDC (clorhidrat de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimidă) (Biorad ProteOn Amine Coupling Kit) în conformitate cu recomandările producătorului, suprafața senzorului a fost ulterior încărcată cu proteine până la o densitate de aproximativ 600RU ($1 \text{ Ru} = 1 \text{ pg mm}^{-2}$). Grupările de cuplare care nu au intrat în reacție fost apoi stinse prin perfuzie cu etanolamină 1 M pH 8,5 și biosenzorul a fost echilibrat prin perfuzarea cipului cu tampon de rulare (HEPES 10 M, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tween-20 0,005%, pH 7,4, la care s-a făcut referire ca HBS150). Ca și controale, au fost utilizate două celule de flux, una goală fără proteină cuplată și una cuplată cu un partener proteic nefiziologic (interleukina-5 umană), care a fost imobilizat folosind aceleași reacții chimice de cuplare și aceeași densitate de cuplare. Pentru măsurătorile de interacțiune, mAb-B1-23 anti-GDF-15 uman a fost dizolvat în HBS150 și utilizat în șase concentrații diferite ca analit (concentrație: 0,4, 0,8, 3, 12, 49 și 98 nM).

Analitul a fost perfuzat peste biosenzor folosind setarea parametrilor cinetici pentru o singură lovitură, pentru a evita regenerarea intermitentă, toate măsurătorile au fost efectuate la 25°C și folosind un debit de $100 \mu\text{l min}^{-1}$. Pentru procesarea efectului de

suprafață total, legarea nespecifică la matricea senzorului a fost eliminată prin scăderea datelor SPR ale fluxului celular gol (celula de flux 3) din toate celelalte date SPR. Senzograma rezultată a fost analizată folosind software-ul ProteOn Manager versiunea 3.0. Pentru analiza cineticii de legare, o interacțiune de tip Langmuir 1:1 a fost presupusă. Pentru constanta vitezei de asociere, o valoare de $5,4 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (k_{on}) și pentru constanta vitezei de disociere o valoare de $4,3 \pm 0,03 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_{off}) ar putea fi determinate (valorile sunt pentru interacțiunea mAb-B1-23 anti-uman GDF-15 cu GDF-15 derivat din expresia celulelor de insecte). Constanta de disociere de echilibru a fost calculată folosind ecuația $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ pentru a produce o valoare de aproximativ 790 pM. Valorile de afinitate pentru interacțiunea GDF-15 derivat din expresia E. coli și mAb-B1-23 anti-uman GDF-15 diferă cu mai puțin de un factor de 2, constantele de viteză pentru GDF-15 derivat din celule de insecte și E. coli deviază cu aproximativ 45% și se încadrează astfel în acuratețea măsurătorilor SPR și probabil că nu reflectă o diferență reală de afinitate.

În condițiile utilizate, mAb-B1-23 anti-GDF-15 uman nu prezintă nicio legare la interleukina-5 umană și astfel confirmă specificitatea datelor de interacțiune și mAb-B1-23 anti-GDF-15 uman.

Secvența de aminoacizi a GDF-15 uman recombinant (așa cum a fost exprimată în celule de insecte transfectate cu Baculovirus) este:

```
GSARNGDHCP LGPGRCCRLH TVRASLEDLG WADWVLSPRE VQVTMCIGAC PSQFRAANMH
AQIKTSLHRL KPDTVAPCC VPASYNPMVL IQKTDGTGVS QTYDDLLAKD CHCI
```

(SEQ ID NR: 8)

Astfel, folosind măsurători de rezonanță plasmonică de suprafață, constanta de disociere (K_d) de 790 pM a fost determinată. Ca o comparație: anticorpul Rituximab utilizat terapeutic prezintă o afinitate în mod semnificativ mai scăzută ($K_d = 8 \text{ nM}$).

A fost arătat anterior faptul că mAb B1-23 inhibă proliferarea celulelor canceroase *in vitro*, și că mAb B1-23 inhibă creșterea tumorilor *in vivo* (WO 2014/049087).

Exemplul de Referință 2: mAb B1-23 recunoaște un epitop conformațional sau discontinuu al GDF-15 uman

Cartografierea epitopilor: anticorp monoclonal de șoarece GDF-15 împotriva peptidelor liniare 13mer derivate din GDF-15

Antigen: GDF-15:

```
GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELKRYEDLL
TRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRALFRLSPTASRSWDV
TRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPOAARGRRRARARNGDHCPGPG
RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPASY
NPMMLIQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCIGSGSGSG (322 amino acids with linker)(SEQ ID NR: 10)
```

Secvența de proteine a fost tradusă în peptide 13mer cu o schimbare a unui aminoacid. Capetele terminale C- și N- au fost alungite cu un agent de interconectare GSGS neutru pentru a evita peptidele trunchiate (litere aldine).

Peptide de control:

Marker: DYKDDDDKGG (SEQ ID NR: 13), 78 de puncte; HA: YPYDVPDYAG (SEQ ID NR:14), 78 de puncte (fiecare copie de matrice)

Identificator de chip de peptidă:

000264_01 (10/90, agent de interconectare Ala2Asp)

Condiții de colorare:

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

Tampon de blocare: tampon de blocare Rockland MB-070

Tampon de incubare: tampon standard cu 10% tampon de blocare Rockland MB-070

Probă primară: Anticorp monoclonal de șoarece GDF-15 (1 μg/μl): Colorare în tampon de incubare timp de 16 ore la 4°C la o diluție de 1:100 și agitare ușoară la 500 rpm

Anticorp secundar: IgG de capră anti-șoarece (H+L) IRDye680, colorare în tampon de incubare cu o diluție de 1:5000 timp de 30 de minute la temperatura camerei (RT)

Anticorpi de control: monoclonal anti-HA (12CA5)-LL-Atto 680 (1:1000), monoclonal anti-FLAG(M2)-FluoProbes752 (1:1000); colorare în tampon de incubare timp de 1 oră la RT

Scanner:

Sistemul de Imagistică Odyssey, LI-COR Biosciences

Setări: decalaj: 1 mm; rezoluție: 21 μm; intensitate verde/roșu: 7/7

Rezultate:

După 30 de minute de pre-umflare în tampon standard și 30 de minute în tampon de blocare, matricea de peptide cu peptide liniare derivate din 10, 12 și 15mer B7H3 a fost incubată cu anticorp secundar de capră anti-șoarece IgG (H+L) IRDye680 doar la o diluție de 1:5000 timp de 1 oră la temperatura camerei, pentru a analiza interacțiunile de fond ale anticorpului secundar. PEPperCHIP-ul® a fost spălat 2x1 min cu tampon standard, clătit cu apă distilată și uscată într-un curent de aer. Citirea a fost efectuată cu Sistemul de Imagistică Odyssey la o rezoluție de 21 μm și intensități verde/roșu de 7/7: Am observat o interacțiune slabă a peptidelor bogate în arginină (ELHLRPQAARGRR (SEQ ID NR: 15), LHLRPQAARGRRR (SEQ ID NR: 16), HLRPQAARGRRRA (SEQ ID NR: 17), LRPQAARGRRRAR (SEQ ID NR: 18), RPQAARGRRRARA (SEQ ID NR: 19), PQAARGRRRARAR (SEQ ID NR: 20) și QAARGRRRARARN (SEQ ID NR: 21) care sunt cunoscuți ca agenți de legare frecvenți și cu peptida de bază MHAQIKTSLHRLK (SEQ ID NR: 22) datorită interacțiunilor ionice cu colorantul cu anticorp încărcat.

După pre-umflare timp de 10 minute în tampon standard, micromatricea de peptide a fost incubată în timpul nopții la 4 °C cu anticorp monoclonal de șoarece GDF-15 la o diluție de 1:100. Spălarea repetată în tampon standard (2x1 minut) a fost urmată de incubare timp de 30 de minute cu anticorpul secundar la o diluție de 1:5000 la temperatura camerei. După spălare de 2x10 secunde în tampon standard și clătire scurtă cu apă distilată, PEPperCHIP® a fost uscat într-un curent de aer. Citirea a fost efectuată cu Sistemul de Imagistică Odyssey la o rezoluție de 21 μm și intensități de verde/roșu de 7/7 înainte și după colorarea peptidelor de control cu anticorpi anti-HA și anti-FLAG(M2).

A fost prezentat faptul că niciuna dintre peptidele liniare 13mer derivate din GDF-15 nu a interacționat cu anticorpul monoclonal de șoarece GDF-15 chiar și la intensități

suprareglate. Cu toate acestea, colorarea peptidelor de control Flag și HA care încadrează matricea a dat naștere la intensități punctiforme bune și omogene.

Rezumat:

Cartografierea epitopului anticorpului monoclonal GDF-15 de șoarece împotriva GDF-15 nu a evidențiat niciun epitop liniar cu peptidele 13mer derivate din antigen. În conformitate cu această descoperire, este foarte probabil ca anticorpul monoclonal de șoarece GDF-15 să recunoască un epitop conformațional sau discontinuu, cu afinitate scăzută a epitopilor parțiali. Datorită absenței evidente a oricărui semnal GDF-15 deasupra colorării de fond doar a anticorpului secundar, cuantificarea intensităților punctiforme cu dispozitivul de analiză PepSlide® și adnotarea ulterioară a peptidei au fost omise.

Exemplul de referință 3: Identificarea structurală a epitopilor ligandului peptidic prin excizia epitopului prin spectrometria de masă și extracția epitopului

Epitopul GDF-15 uman recombinant care se leagă la anticorpul B1-23 a fost identificat prin metoda de excizie a epitopului și metoda de extracție a epitopului (Suckau și colab. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 decembrie; 87(24): 9848-9852.; R.Stefanescu și colab., Eur.J.Mass Spectrom. 13, 69-75 (2007)).

Pentru prepararea coloanei de anticorp, anticorpul B1-23 a fost adăugat la sefaroză cuplată cu acid 6-aminohexanoic activat cu NHS. Anticorpul B1-23 cuplat cu sefaroză a fost apoi încărcat într-o microcoloană de 0,8 ml și spălat cu tampon de blocare și spălare.

Experiment de extracție a epitopului:

GDF-15 uman recombinant a fost digerat cu tripsină timp de 2 ore la 37°C (în soluție), având ca rezultat diferite peptide, în funcție de zonele de scindare a tripsinei din proteină. După digestie completă, peptidele au fost încărcate pe coloana de afinitate care conține anticorpul imobilizat B1-23. Peptidele nelegate, precum și cele potențial legate ale GDF-15 au fost utilizate pentru analiza spectrometriei de masă. O identificare a peptidelor prin intermediul spectrometrie de masă nu a fost posibilă. Acest fapt a fost un indicator suplimentar al faptului că regiunea de legare a GDF-15 din complexul imun B1-23 cuprinde un epitop discontinuu sau conformațional. În cazul unui epitop liniar continuu, peptidele digerate ar trebui să lege partenerul lor de interacțiune, cu excepția cazului în care a existat o zonă de clivare a tripsinei în peptida epitopului. Un epitop discontinuu sau conformațional ar putea fi confirmat prin metoda de excizie a epitopului descrisă în partea următoare.

Experiment de excizie a epitopului:

Anticorpul imobilizat B1-23 pe coloana de afinitate a fost apoi incubat cu GDF-15 recombinant timp de 2 ore.

Complexul imun format pe coloana de afinitate a fost apoi incubat cu tripsină timp de 2 ore la 37°C. Scindarea a avut ca rezultat diferite peptide derivate din GDF-15 recombinant. Anticorpul imobilizat însuși este stabil din punct de vedere proteolitic. Peptidele rezultate ale proteinei GDF-15 digerate, care au fost protejate de anticorp și astfel protejate de scindare proteolitică, au fost eluate în condiții acide (TFA, pH2), colectate și identificate prin spectrometrie de masă.

Metoda de excizie a epitopului care folosește identificarea MS/MS a avut ca rezultat următoarele peptide:

Peptide	Poziție în succesiune	Masa	Ion/Încărcare
EVQVTMCIGACPSQFR (SEQ ID NR: 25)	40-55	1769,91	590,50(3+)
TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NR: 26)	94-114	2310,96	771:33(3+)

Partea GDF-15 umană, care leagă anticorpul B1-23, cuprinde un epitop discontinuu sau conformațional. Spectrometria de masă a identificat 2 peptide în proteina GDF-15, care sunt responsabile pentru formarea complexului imun. Aceste peptide sunt restricționate la pozițiile 40-55 (EVQVTMCIGACPSQFR) și 94-114 (TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI) în secvența de aminoacizi de GDF-15. Astfel, aceste două peptide cuprind un epitop al proteinei GDF-15 care se leagă la anticorpul B1-23.

Prezenta invenție este ilustrată prin următoarele exemple non-limitative:

Exemplul 1: La pacienții cu melanom uman care au primit un tratament anterior cu Ipilimumab (un anticorp monoclonal anti-CTLA4) și nu au putut să prezinte un răspuns complet, și care au primit un tratament cu Pembrolizumab (un anticorp monoclonal anti-PD-1), nivelurile serice de hGDF-15 se corelează cu răspunsul slab la tratament la un moment de timp de patru luni după începutul tratamentului cu pembrolizumab.

Prezenții inventatori și-au stabilit să investigheze dacă pacienții cu cancer care primesc agenți de blocare a punctelor de control imunitare ar putea beneficia de o inhibare a hGDF-15. Pentru a testa această posibilitate, serurile de la pacienți cu melanom, care au primit un tratament anterior cu Ipilimumab (un anticorp monoclonal anti-CTLA4) și care au primit un tratament cu Pembrolizumab (un anticorp monoclonal anti-PD-1) într-un studiu clinic, au fost analizate pentru nivelurile serice de hGDF-15. Pentru a investiga dacă hGDF-15 influențează răspunsul pacienților la agenții de blocare punctelor de control imune, nivelurile serice de hGDF-15 obținute au fost apoi corelate cu răspunsurile pacienților. Serurile au fost prelevate de la pacienți anterior tratamentului cu Pembrolizumab.

Studiul și analizele ulterioare au fost efectuate după cum urmează:

Criterii de includere ale studiului clinic:

Pacienții eligibili au fost cu vârsta de 18 ani sau mai mult și au prezentat melanom stadiul III sau stadiul IV nerezecabil confirmat histologic sau citologic, care nu poate fi supus terapiei locale; progresie confirmată a bolii în 24 de săptămâni de la ultima doză de ipilimumab (minim două doze, 3 mg/kg o dată la fiecare 3 săptămâni); terapie anterioară cu inhibitor BRAF sau MEK sau ambele (dacă este pozitiv la mutant BRAFV600); rezolvarea sau îmbunătățirea evenimentelor adverse asociate cu ipilimumab la gradul 0-1 și doză de prednison 10 mg/zi sau mai puțin, timp de cel puțin 2 săptămâni înainte de prima doză din medicamentul de studiu; Stare de performanță a Grupului Oncologic al Cooperării Estice (ECOG) 0 sau 1; boală măsurabilă pe Criterii de Evaluare a Răspunsului în Tumorile Solide, versiunea 1.1 (RECIST v1.1); și valori în cadrul intervalului prestabilit pentru numărul absolut de neutrofile (≥ 1500 celule per ml), trombocite ($\geq 100\ 000$ celule per ml), hemoglobină (≥ 90 g/L), creatinină serică ($\leq 1,5$ limita superioară a normalului [ULN]), bilirubină totală serică ($\leq 1,5$ LSN sau bilirubină directă \leq

LSN pentru pacienții cu concentrații totale de bilirubină >1,5 LSN), aspartat și alanin aminotransferaze (≤ 25 LSN sau ≤ 5 LSN pentru pacienții cu metastaze hepatice), raport internațional normalizat sau timpul de protrombină (≤ 1.5 LSN dacă nu se utilizează anticoagulante) și timpul de tromboplastină parțială activată (≤ 1.5 LSN dacă nu se utilizează anticoagulante). Pacienții au avut o perioadă de eliminare de cel puțin 4 săptămâni între ultima doză a celei mai recente terapii și prima doză de pembrolizumab. Pacienți cu metastaze cerebrale active cunoscute sau meningită carcinomatoasă, boală autoimună activă, infecție activă care necesită terapie sistemică, antecedente cunoscute de infecție cu HIV, infecție activă cu virusul hepatitei B sau virusul hepatitei C, antecedente de evenimente adverse de gradul 4 legate de ipilimumab sau ipilimumab de gradul 3, evenimentele adverse asociate cu o durată mai mare de 12 săptămâni sau tratamentul anterior cu orice altă terapie anti-PD-1 sau anti-PD-L1 au fost excluși din studiu.

Tratamentul pacienților:

Pacienții cu melanom uman care au îndeplinit criteriile de includere definite mai sus au fost deja tratați (cu două excepții) cu ipilimumab (un anticorp monoclonal anti-CTLA4) și nu au prezentat un răspuns complet. Pembrolizumab (un anticorp monoclonal anti-PD-1) a fost administrat fie la 2 mg/kg greutate corporală, fie la 10 mg/kg greutate corporală. Deoarece nu au fost observate diferențe dependente de doză între cele două grupuri de tratament, pacienții tratați au fost evaluați împreună.

Criterii de răspuns:

Răspondenții și non-răspondenții la tratament, precum și răspunsurile în curs au fost clasificate utilizând criteriile de evaluare a răspunsului în tumorile solide, versiunea 1.1 (RECIST v1.1) (Eisenhauer și colab.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: Eur. J. Cancer. 45, No. 2, January 2009, pp 228-47).

Analiza nivelurilor serice de hGDF-15 prin analiza imunosorbentului legat de enzime (ELISA):

Nivelurile serice de GDF-15 uman au fost măsurate prin Analiza Imunosorbentului Legat de Enzime (ELISA).

Tampoane și reactivi:

Soluție de blocare tamponată: 1% BSA (fracție V pH 7,0, PAA) în PBS

Soluție de spălare: PBS-Tween (0,05%)

Standard: GDF-15 uman (concentrație stoc 120 $\mu\text{g/ml}$, de la R&D Systems)

Anticorp de captare: MAb de GDF-15 uman (Clona 147627) de la R&D Systems, IgG2B de șoarece (catalog #MAB957, de la R&D Systems, concentrație stoc 360 $\mu\text{g/ml}$)

Anticorp de detectare: PAb purificat cu afinitate biotinitată de GDF-15 uman, IgG de capră (catalog #BAF940, de la R&D Systems, concentrație stoc 9 $\mu\text{l/ml}$)

Streptavidină-HRP (Catalog #DY998, de la R&D Systems)

Soluție de substrat: 10 ml 0,1 M NaOAc pH6,0 + 100 μl TMB + 2 μl H₂O₂

Soluție de oprire: 1 M H₂ASA DE₄

Procedura de analiză:

1. Pregătirea plăcii:

- A. Anticorpul de captare a fost diluat la concentrație de lucru de 2 $\mu\text{g/ml}$ în PBS. O microplacă cu 96 de godeuri (Nunc maxisorp[®]) a fost imediat acoperit cu 50 μl per godeu de anticorp de captare diluat, excluzând rândurile exterioare (A și H). Rândurile A și H au fost umplute cu tampon pentru a preveni evaporarea probelor în timpul experimentului. Placa a fost bătută ușor pentru a se asigura că fundul fiecărei godeuri a fost acoperit bine. Placa a fost pusă într-o cameră umedă și incubată în timpul nopții la temperatura camerei (RT).
- b. Fiecare godeu a fost aspirat și spălat de trei ori cu PBS-Tween (0,05%).
- c. 150 μl de soluție de blocare au fost adăugați în fiecare godeu, urmat de incubare la temperatura camerei timp de 1 oră.
- d. Fiecare godeu a fost aspirat și spălat de trei ori cu PBS-Tween (0,05%).

2. Procedura de analiză:

- a. Standarde au fost preparate. GDF-15 a fost diluat în soluție de blocare tamponată la o concentrație finală de 1 ng/ml (4,17 μl GDF + 496 μl soluție de blocare tamponată). Diluții în serie 1:2 au fost realizate.
- b. Probe duplicate 1:20 (6 μl + 114 μl soluție tampon de blocare) au fost preparate.
- c. 50 μl de probe sau standarde diluate au fost adăugați per godeu, urmat de incubare timp de 1 oră la temperatura camerei.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	s1	s2	...									s12
C	s1	s2	...									s12
D	s13	s14	...									s24
E	s13	s14	...									s24
F	Di	lu	ție					St	an	da	Rd	
G					se	rie						
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- a. Fiecare godeu a fost aspirat și spălat de trei ori cu PBS-Tween (0,05%).
- b. Anticorpul de detectare a fost diluat la o concentrație finală de 50 ng/ml (56 μl + 10 ml tampon de blocare). 50 μl de anticorp de detectare diluat au fost adăugați în fiecare godeu, urmat de incubare timp de 1 oră la temperatura camerei.
- c. Fiecare godeu a fost aspirat și spălat de trei ori cu PBS-Tween (0,05%).
- d. Streptavidină-HRP a fost diluată 1:200 (50 μl + 10 ml tampon de blocare). 50 μL din diluția de lucru de Streptavidină-HRP au fost adăugați, urmat de incubare timp de 20 de minute la RT.
- e. Fiecare godeu a fost aspirat și spălat de trei ori cu PBS-Tween (0,05%).
- f. Soluția de substrat a fost preparată. 50 μL de soluție de substrat au fost adăugați în fiecare godeu, urmat de incubare timp de 20 de minute la RT.
- g. 50 μL de soluție de oprire au fost adăugați la fiecare godeu
- h. Densitatea optică a fiecărui godeu a fost determinată imediat, utilizând un cititor de microplacă setat la 450 nm.

3. Calculul titrului seric de GDF-15:

- a. Fiecare probă/diluție standard de GDF-15 a fost aplicată în duplicat. Pentru a determina titrul de GDF-15, media duplicatelor a fost calculată și fundalul (probă fără GDF-15) a fost scăzut.
- b. Pentru a crea o curbă standard, valorile din intervalul liniar au fost reprezentate grafic pe o diagramă X-Y (axa X: concentrația GDF-15, axa Y: OD450) și o potrivire a curbei liniare a fost aplicată. Titrul seric de GDF-15 al probelor de testat a fost calculat prin interpolarea valorilor OD450 ale diluțiilor standard cu concentrație cunoscută.
- c. Pentru a calcula concentrația finală de GDF-15 a probelor, factorul de diluție distinct a fost luat în considerare. Probele care au dus obținerea de valori OD sub sau peste intervalul standard au fost reanalizate la diluții corespunzătoare.

Comparația nivelurilor serice de hGDF-15 cu datele pacientului:

În continuare, nivelurile serice de hGDF-15 măsurate au fost comparate cu datele de răspuns ale pacientului obținute din studiu.

Figura 1 prezintă nivelurile serice de GDF-15 pentru respondenți și non-respondenți la regimul de tratament. Așa cum se poate observa din Figură, majoritatea non-respondenților prezintă niveluri serice de GDF-15 mai mari decât toți respondenții.

Acest rezultat este reflectat de asemenea în Figura 2, care prezintă numerele de respondenți și non-respondenți la pacienții care prezintă niveluri serice de hGDF-15 <1,8 ng/ml, 1,8-4,2 ng/ml și, respectiv, >4,2 ng/ml.

Aceste descoperiri au sugerat faptul că nivelurile ridicate de GDF-15 sunt asociate cu un răspuns slab la tratament. Prin urmare, aceste descoperiri au fost testate pentru semnificația lor statistică:

Corelația statistică a nivelurilor serice de hGDF-15 cu datele pacientului:

Date:

Analiza datelor s-a bazat pe un fișier de date care conține date din probe de la 35 de pacienți care conțin coloanele (variabile) Denumirea probei, GDF-15 (ng/ml), răspundent/non-respondent, zile (până la deces sau cenzurare) și În viață (un indice variabil pentru viața în curs). Clasificarea repondent/non-respondent a acestor date a fost făcută la un moment de timp de patru luni după începerea tratamentului cu pembrolizumab. Din moment ce anumite probe de ser au fost obținute doar cu puțin timp înainte de analiză, răspunsul a putut fi evaluat doar la 29 de pacienți. Un respondent parțial (reducere > 30% în dimensiunea tumorii) a fost evaluat ca respondent. Pentru determinarea LDH au trebuit să fie excluse 4 probe din cauza hemolizei.

Variabile de rezultat (puncte finale):

- a. Supraviețuirea generală (timpul până la moarte). Acest efect este compus din indicatorul de eveniment pentru deces (1 = mort/0 = în viață), care a fost derivat din fișierul de date și timpul până la moarte sau cenzurare (ultima dată când pacientul a fost cunoscut că este în viață), corespunzător variabilei „zile”.
- b. Răspunsul la tratament, de exemplu, dacă un pacient a fost un respondent sau nu (codat ca 1=respondent, 0=non-respondent). Răspunsurile parțiale au fost considerate respondenți.

Denumirea probei	GDF-15 (ng/ml)	LDH[U/I]	respondent/non-respondent	Zile de la anti PD-1	Anterior Ipilimumab treatment	Răspuns în curs
HG12.950	2,010	398	NR	72	x	
HG13.1002	0,479	340	R	538		x
HG13.1012	12,010	3734	NR	71	x	
HG13.1067	9,173	591	NR	83	x	
HG13.1069	4,635	2419	NR	53	x	
HG13.1099	1,285	370	R	693	x	x
HG13.1202	1,641	480	R	575	x	
HG13.1341	4,595	1930	NR	15	x	
HG13.1377	0,539	388	R	269	x	
HG13.1419	0,914	317	R	617		x
HG13.1432	1,195	269	R	611	x	x
HG13.1458	0,433	453	R	605	x	x
HG13.1557	4,045	564	R	293	x	
HG13.1587	0,345	371	R	186	x	
HG13.1663	1,320	hemolytic	R	176	x	
HG13.516	0,641	342	R	264	x	
HG13.578	2,841	1143	R	266	x	
HG13.596	1,085	hemolytic	R	772	x	x
HG13.757	3,310	hemolytic	NR	117	x	
HG13.811	4,029	763	R	596	x	x
HG14.1080	5,979	1359	NR	43	x	
HG14.1108	0,979	555	R	206	x	x
HG14.1147	2,084	227	R	154	x	x
HG14.1159	2,150	333	R	227	x	x
HG14.161	0,889	343		108	x	x
HG14.557	2,014	368	R	317	x	x
HG14.707	2,783	442	NR	71	x	
HG14.853	0,846	343	NR	71	x	

Denumirea probei	GDF-15 (ng/ml)	LDH[U/I]	respondent/non-respondent	Zile de la anti PD-1	Anterior Ipilimumab treatment	Răspuns în curs
HG14.885	0,874	hemolitic	PR	63	x	
HG15.299	0,412	354		86	x	x
HG15.47	1,465	475		80	x	x
HG15.49	3,912	631		93	x	x
HG15.546	0,358	hemolytic		23	x	x
HG15.560	2,389	768		21	x	x
HG15.59	8,122	588	NR	23	x	

Analiza datelor:

Supraviețuirea generală a fost analizată prin modelele de supraviețuire cu risc proporțional Cox. Un model a fost echipat cu GDF-15 (ng/ml) ca factor predictiv continuu și un alt model cu o variabilă de grupare pe bază de GDF-15 ca factor predictiv categoric (grupurile au fost: <1,8 ng/ml, 1,8-4,2 ng/ml, >4,2 ng/ml de GDF-15). În total, date de supraviețuire au fost disponibile de la 35 de pacienți.

Răspunsul la tratament (variabilă binară) a fost analizat prin Modele Liniare Generalizate (GLM) cu distribuție binomială a erorilor și funcției logit link (regresie logistică). Pentru răspunsul la tratament, așa cum a fost evaluat prin criteriile RECIST1.1, după 4 luni, un model a fost echipat cu GDF-15 (ng/ml) ca factor predictiv continuu. Deoarece niciun pacient nu a răspuns în grupul cu GDF-15 > 4,2 ng/ml, raportul de șanse estimat pentru acest grup față de grupul cu GDF-15 <1,8 ng/ml ar fi foarte mare, cu un interval de încredere foarte larg. În loc de potrivirea unui alt model cu variabila de grupare bazată pe GDF-15 ca factor predictiv categoric, un test chi-pătrat (χ^2) a fost folosit pentru a compara grupurile (testând egalitatea proporției de respondenți). Deoarece numărul de respondenți/non-respondenți a fost uneori destul de mic (< 5), o analiză a sensibilității folosind testul exact Fisher a fost efectuată în plus. Pacienții care au primit anti PD-1 doar în ultimele 4 luni nu au putut fi încă clasificați ca respondenți sau non-respondenți. Prin urmare, doar 29 de pacienți au putut fi evaluați pentru răspunsul la terapie.

Analiza datelor a fost realizată folosind pachetul software statistic R (R Core Team, 2014, versiunea 3.1.0).

Rezultate:

Tabelele 1-2 prezintă rezultatele modelelor cu GDF-15 ca factor predictiv continuu. Riscul de deces a crescut în mod semnificativ pentru concentrații mai mari de GDF-15 (HR > 1, Tabelul 1), în timp ce probabilitatea de răspuns la tratament a scăzut în mod semnificativ, așa cum a fost indicat de raportul de șanse (OR) (OR < 1, Tabelul 2). Figura 3 prezintă datele corespunzătoare despre respondenți/non-respondenți, precum și probabilitatea de răspuns la tratament prezisă de model.

Tabelul 3 prezintă rezultatul modelului de riscuri proporționale Cox cu grupul bazat pe GDF-15 ca factor predictiv categoric. Grupul cu GDF-15 <1,8 ng/ml este utilizat ca grup de referință (nu este prezentat în Tabel). Cele două rapoarte de risc din Tabelul 3 reprezintă comparația grupului cu GDF-15 între 1,8 și 4,2 și a grupului cu GDF-15 >4,2 cu grupul de referință. Riscul de deces este crescut în ambele grupuri (comparativ cu grupul de referință), dar într-un grad mai mare în grupul cu GDF-15 >4,2. Figura 4 prezintă curbele Kaplan-Meier pentru supraviețuire în cele trei grupuri.

Proporția respondenților a diferit în mod semnificativ între grupuri (respondent 1: $\chi^2_{df=2} = 16,04$, $P = 0,0003$). Acest rezultat a fost confirmat de rezultatele testului exact al lui Fisher ($P=0,0003$). Numerele de decese și de respondenți per grup sunt prezentate în Tabelul 4. Mai mult, Tabelul 5 prezintă câteva statistici descriptive ale GDF-15 pentru fiecare grup.

Tabelul 1:

	HR	95% CI	z	p
GDF-15	1,27	[1,10, 1,47]	3,27	0,00109

Tabelul 1 prezintă estimările Raportului de Risc (HR) din modelul de riscuri proporționale Cox cu supraviețuirea generală (timpul până la deces) ca variabilă de rezultat și GDF-15 ca factor predictiv continuu. Analiza a inclus probe de la 35 de pacienți.

Tabelul 2:

	Estimare (OR)	95% CI	z	p
(Intercepție)	25,281	[4,219, 364,950]	2,94	0,00324
GDF-15	0,389	[0,159, 0,698]	-2,54	0,01120

Tabelul 2 prezintă estimările raportului de șanse (OR) din Modelul Liniar Generalizat cu răspunsul la tratament (respondentul 1) ca variabilă de rezultat și GDF-15 ca factor predictiv continuu. Analiza a inclus probe de la 29 de pacienți.

Tabelul 3:

	HR	95% CI	z	p
Grup de GDF-15- (1,8, 4,2]	1,54	[0,48, 4,92]	0,73	0,466
Grup GDF-15- (4,2, 13]	21,52	[5,20, 89,06]	4,24	<0,001

Tabelul 3 prezintă estimările Raportului de Șanse (HR) din modelul de riscuri proporționale Cox cu supraviețuirea generală (timpul până la deces) ca variabilă de rezultat și grupul bazat pe GDF-15 ca factor predictiv categoric. Analiza a inclus probe de la 35 de pacienți.

Tabelul 4:

Variabilă	Niveluri	n _[0,1,8]	% _[0,1,8]	n _{(1,8,4,2]}	% _{(1,8,4,2]}	n _{(4,2,13]}	% _{(4,2,13]}	n _{all}	% _{all}
Deces	0	11	61,1	6	54,5	0	0,0	17	48,6
	1	7	38,9	5	45,5	6	100,0	18	51,4
	toate	18	100,0	11	100,0	6	100,0	35	100,0
Respondent 1	0	1	7,1	3	33,3	6	100,0	10	34,5
	1	13	92,9	6	66,7	0	0,0	19	65,5
	toate	14	100,0	9	100,0	6	100,0	29	100,0

Tabelul 4 prezintă numărul de decese și de respondenți (respondent 1) în cele trei grupuri definite de GDF-15 (<1,8, 1,8 - 4,2, >4,2 ng/ml).

Tabelul 5:

Variabilă	Niveluri	n	\bar{x}	\bar{x}	s	Min	Max
GDF-15	[0,1,8]	18	0,9	0,9	0,4	0,3	1,6
	(1,8,4,2]	11	2,8	2,9	0,8	2,0	4,0
	(4,2,13]	6	7,1	7,4	2,9	4,6	12,0
	toate	35	1,6	2,6	2,7	0,3	12,0

Tabelul 5: Variabila de factorului predictiv continuu GDF-15 (ng/ml) în cele trei grupuri definite de GDF-15 (<1,8, 1,8-4,2, >4,2 ng/ml). Numărul de pacienți (n), mediana (\bar{x}), media (\bar{x}), deviația standard (s), minimul (Min) și maximul (Max) sunt prezentate.

În continuare, pentru a compara rezultatele statistice obținute pentru nivelurile de GDF-15, analize statistice au fost de asemenea, realizate pentru nivelurile unui factor de prognostic cunoscut de lactat dehidrogenază (LDH) din serul pacientului: Lactat dehidrogenaza este considerată a fi un marker relevant din punct de vedere prognostic pentru tumorile solide. Acesta a fost confirmat recent de o meta-analiză cuprinzătoare bazată pe un grup mare de studii clinice (31.857 de pacienți). Un efect consistent al unui LDH crescut asupra OS (HR = 1,48, 95%CI = 1,43 până la 1,53) a fost găsit în toate subgrupurile și etapele de boală. În plus, a existat o tendință către o valoare prognostică mai puternică a LDH în boala metastatică în comparație cu boala non-metastatică, care a fost considerată că reflectă o sarcină mai mare a tumorii.

În timp ce mecanismul exact rămâne necunoscut și poate fi, de asemenea, asociat cu hipoxia și reprogramarea metabolică prin intermediul unui efect Warburg, LDH poate fi interpretat ca reflectând o sarcină mare a tumorii sau agresivitatea tumorii (Zhang, J., Yao, Y.-H., Li, B.-G., Yang, Q., Zhang, P.-Y. și Wang, H.-T. (2015). Valoarea prognostică a nivelului de lactat dehidrogenază seric de pre-tratament la pacienții cu tumori solide: o revizuire sistematică și meta-analiză. Scientific Reports 5, 9800). Din moment ce nivelurile serice de LDH au fost încorporate în schema de stadializare pentru melanom, acest parametru este măsurat în mod obișnuit în timpul diagnosticului clinic de către laboratorul de referință universitar.

Tabelul 6:

	GDF-15 (ng/ml)		LDH (U/l)	
	Respondent (n=19)	non-respondent (n=10)	Respondent (n=9)	non-respondent (n=16)
Mediană	1,2	4,6	371	591
Medie	1,7	5,6	455	1312
Deviație Standard	1,2	3,6	218	1108
Test t (2-fete, tip 3)	0,012		0,061	

Tabelul 6: GDF-15 și LDH la respondenți față de non-respondenți
Determinarea LDH a eșuat în 4 probe de sânge din cauza hemolizei.

Tabelul 7 este analog cu Tabelul 2, cu excepția faptului că LDH a fost utilizat ca factor predictiv continuu al răspunsului la tratament (respondent 1) în loc de GDF-15. Probabilitatea de răspuns la tratament a scăzut în mod semnificativ marginal cu valorile în creștere de LDH ($OR < 1$, $p < 0,1$). Figura 5 prezintă datele corespunzătoare asupra respondenților/non-respondenților, precum și probabilitatea de răspuns la tratament prezisă de model.

Pentru a determina dacă GDF-15 este cel mai bun factor predictiv al răspunsului la tratament (respondent 1) decât LDH, două modele adiționale au fost montate: un model care conține ambii markeri ca factori predictivi (care include în mod automat doar pacienții cu măsurători asupra ambilor markeri) și un model cu GDF-15 ca singur factor predictiv, dar folosind de asemenea, doar pacienții cu o măsurare a LDH. Apoi, criteriul de informare al lui Akaike (AIC) a fost calculat pentru toate cele trei modele (Tabelul 8). Un AIC mai mic indică un model mai eficient. De fapt, AIC al modelului cu GDF-15 a fost mai mic decât AIC al modelului cu LDH ca factor predictiv. Modelul cu GDF-15 prezintă doar un AIC mai mic decât modelul cu ambii factori predictivi, indicând faptul că LDH ca factor predictiv adițional nu îmbunătățește modelul. Desigur, modelul cu ambii factori predictivi nu poate explica răspunsul la tratament mai rău, dar ca măsurătoare a „eficienței modelului”, AIC penalizează modelele cu factori predictivi care nu îmbunătățesc modelul în mod considerabil și favorizează modelele mai simple. O comparație de model alternativ a fost realizată prin analiza devianței (asemănător cu analiza varianței, dar pentru modele liniare generalizate), adică, comparând diferența în devianță explicată între un model mai complex cu ambii factori predictivi și ambele modele mai simple cu doar un singur model din factorii predictivi (corespunzător unei reduceri a modelului, fie cu LDH, fie cu GDF-15). Eliminarea GDF-15 din modelul mai complex a dus la o reducere semnificativă în devianța explicată ($P = 0,02$), în timp ce eliminarea LDH nu a realizat acest fapt ($P = 0,41$).

Tabelul 7:

	Estimare (OR)	95% CI	z	p
(Intercepție)	9,741	[2,055, 89,308]	2,44	0,0146
LDH	0,997	[0,994, 0,999]	-1,79	0,0727

Tabelul 7: Estimările raportului de șanse (OR) din Modelul Liniar Generalizat cu răspuns la tratament (respondent 1, așa cum a fost definit în fișierul A) ca variabilă de rezultat și LDH ca factor predictiv continuu. Analiza a inclus probe de la 25 de pacienți.

Tabelul 8:

	df	AIC
Model cu LDH și GDF-15	3,	00 25,10
Model doar cu LDH	2,00	28,55
Modelul doar cu GDF-15	2,00	23,77

Tabelul 8: Compararea de model pe baza criteriului de informare al lui Akaike (AIC) al cărui valori mai mici indică un model mai eficient. df: grade de libertate. Toate modelele au inclus probe de la 25 de pacienți.

Figura 5A prezintă probabilitatea de răspuns la tratament (respondent 1) așa cum a fost prezisă de modelul Modelului Liniar Generalizat folosind LDH ca factor predictiv continuu. Cercurile prezintă datele, curba prezintă modelul. Linia verticală indică concentrația de LDH unde probabilitatea de răspuns la tratament este de 0,5. Cohorta de pacienți a fost identică. Totuși, determinarea fiabilă a nivelurilor de LDH a eșuat la patru pacienți din cauza hemolizei.

Figura 5B prezintă o reprezentare grafică a respondenților și a non-respondenților și a nivelurilor lor respective de hGDF-15 și LDH. Atunci când valorile limită sunt selectate pentru a acoperi toți respondenții, testarea bazată pe GDF-15 permite identificarea a 6 (din 9) non-respondenți, în timp ce analizele bazate pe nivelurile de LDH pot identifica doar 4 (din 9) non-respondenți. Pentru testarea LDH, 4 probe hemolitice au trebuit să fie excluse, ceea ce cauzează pierderea datelor.

Rezumat:

Luată împreună, rezultatele statistice de mai sus din Exemplul 1 au prezentat faptul că probabilitatea unui răspuns la tratament scade în mod semnificativ cu nivelurile în creștere de hGDF-15 în serurile pacientului. De exemplu, raportul de șanse de 0,389 prezentat în Tabelul 2 indică faptul că, dacă nivelurile serice de hGDF-15 sunt crescute cu 1 ng/ml, probabilitatea unui răspuns la tratament scade la valoarea de 0,389 ori a valorii inițiale, adică, scade cu aproximativ 60%. Dacă nivelurile serice de hGDF-15 sunt crescute cu 2 ng/ml, probabilitatea unui răspuns la tratament scade la valoarea de $0,389 \times 0,389$ ori = 0,151 ori din valoarea inițială, adică scade cu aproximativ 85%.

Rezultatele Exemplului 1 sugerează faptul că hGDF-15 acționează pentru a afecta în mod negativ răspunsurile pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare. Astfel, în conformitate cu invenția, un inhibitor al hGDF-15 va fi util

pentru a inhiba efectele negative ale hGDF-15 asupra răspunsurilor pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare și pentru a îmbunătăți răspunsurile pacienților la tratamentul cu agenți de blocare punctelor de control imunitare nu numai în melanom, dar la toate cancerurile solide la care s-a făcut referire aici.

Exemplul 2: Nivelurile de GDF-15 se corelează invers cu limfocitele de infiltrare tumorale CD8⁺ (TIL-uri) în metastazele diferitelor entități tumorale.

Pentru a identifica un mecanism al hGDF-15 care contribuie la efectul negativ al hGDF-15 asupra răspunsurilor pacienților, metastazele cerebrale din diferite tumori solide au fost analizate pentru expresia hGDF-15 și pentru prezența de celule ale sistemului imunitar:

Specimenul de țesut și procesarea țesutului:

Țesut fixat în formalină și încorporat în parafină (FFPE) din metastazele cerebrale arhivate a fost analizat, care a fost colectat și procesat ca micromatrici de țesut (TMA-uri). Toate speciunile au fost obținute fie de la banca de tumori UCT (Universitatea Goethe, Frankfurt pe Main, Germania, membru al Consorțiului German pentru Cancer (DKTK), Heidelberg, Germania și Centrul German de Cercetare a Cancerului (DKFZ), Heidelberg, Germania), fie de la registrul cancerului din banca de tumori "Blut-und Gewebebank zur Erforschung des malignen Melanoms" (Departamentul de Dermatologie, Spitalul Universitar Tübingen, Germania). Aprobarea pentru acest studiu a fost acordată de două comitete etice independente (Comitetul de etică UCT Frankfurt / Universitatea Goethe Frankfurt am Main, Germania: numere de proiect: GS 4/09; SNO_01-12; comitet de etică Universitatea din Tübingen numărul de proiect: 408/2013BO2) În total, 190 de pacienți cu metastaze cerebrale au fost investigați, incluzând: melanom (n=98), NSCLC (n=33), carcinom mamar (n=18), RCC (n=10), SCLC (n=7), carcinom colorectal (n=7), carcinoame care nu au fost altfel specificate (carcinom NOS n=11) și speciune de tumori rare rezumate ca și altele (n=6). Datele de supraviețuire de la 155 pacienți (timp de supraviețuire după rezecția tumorii) au fost colectate, în plus numărul de metastaze cerebrale la 169 de pacienți și dimensiunea metastazelor cerebrale într-un subcohortă de 55 de pacienți cu melanom a fost analizat.

Imunohistochimie:

Imunohistochimia pentru toți anticorpii a fost efectuată folosind lame de 3 μm grosime și protocoale standard pe sistemul automat de colorare IHC Discovery XT (Roche/Ventana, Tucson, Arizona, SUA). Următorii anticorpi au fost utilizați: anti GDF-15 (HPA011191, diluție 1:50, Sigma/Atlas, protocol #730), CD3 (clona A0452, diluție 1:500, DAKO, Glostrup, Danemarca), CD8 (clona C8/144B, diluție 1:100, DAKO, Glostrup, Danemarca), PD-1 (clona NAT105; diluție 1:50; Abcam, Cambridge, Marea Britanie), PD-L1 (E1L3N; diluție 1:200; Cell Signaling, Boston, S.U.A.), FOXP3 (clona 236A/E7; diluție 1:100; eBioscience, San Diego, U.S.A.). Lamele au fost contra-colorate cu hematoxilină și montate.

Analize statistice:

Toate probele au fost scorate în conformitate cu frecvența celulelor pozitive legate de toate celulele (ca procent) pe nucleul TMA colorat. Pentru expresia hGDF-15, un scor așa cum a fost descris anterior în detaliu [21,22] a fost utilizat: frecvență 0 - 1% scor 0; 1 - 10% scor 1; 10 - 25% scor 2; 25 - 50% scor 3; >50% scor 4; în plus, scorul de frecvență a fost multiplicat cu intensitatea colorării (1 colorare slabă, 2 colorare moderată, 3 colorare puternică), în final având ca rezultat scorul hGDF-15 scalat ordinal (0, 1, 2, 3, 4,

6, 8, 9, 12). Variabilele scalate ordinale au fost comparate cu testul non-parametric Wilcoxon/Kruskal-Wallis și metoda lui Dunn pentru a corecta analizele multiple. Pentru variabilele continue, mediile au fost comparate între diferite entități cu metastaze cerebrale folosind ANOVA, urmată de Testul post-hoc Tukey-Kramer HSD. Pentru analizele de corelare a dimensiunii metastazelor cerebrale și a expresiei markerului, o potrivire liniară a fost efectuată, urmată de ANOVA, în cazul variabilelor scalate ordinale, analiza de corelație rho Spearman a fost utilizată. Un nivel de semnificație de $p < 0,05$ a fost stabilit pentru toate analizele statistice.

Toate analizele statistice au fost efectuate folosind JMP8 și JMP11 (SAS, Cary, U.S.A.), grafice adiționale au fost create cu Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, U.S.A.).

Rezultate:

Figura 6 prezintă secțiuni de țesut exemplificative din metastazele cerebrale de melanom care nu prezintă imunoreactivitate GDF-15 (panoul superior) sau imunoreactivitate GDF-15 ridicată (panoul inferior), care au fost colorate prin imunohistochimie pentru GDF-15 și, respectiv, pentru proteinele marker de celule T CD3 și, respectiv, CD8, așa cum a fost indicat în Figură. În secțiunea fără expresie GDF-15, numeroasele celule imune de infiltrare sunt văzute ca pete întunecate. În imaginea care prezintă metastazele care exprimă niveluri ridicate de GDF-15, celulele imune care se infiltrează rare sunt descrise prin săgeți (celulele CD3 și CD8 pozitive sunt indicate prin săgeți). Așa cum se poate observa din Figură, s-a descoperit în mod surprinzător faptul că în secțiunea de țesut cu imunoreactivitate hGDF-15 ridicată (panoul inferior), numărul de celule CD3⁺ și CD8⁺ a fost puternic redus în comparație cu secțiunea de țesut fără imunoreactivitate hGDF-15 (panoul superior). De notat, alți markeri colorați, cum ar fi PD-L1, PD-1 au prezentat toți o corelație pozitivă cu numărul de celule T CD3⁺ și CD8⁺ care se infiltrează în tumoră.

Prin urmare, s-a analizat în continuare dacă există o corelație inversă între nivelurile de hGDF-15 și procentul de celule T CD3⁺ în diferite metastaze cerebrale de melanom. Figura 7A prezintă un grafic al procentului de celule CD3⁺ față de scorul GDF-15 (obținut așa cum a fost descris mai sus în secțiunea „analize statistice”). Așa cum a fost indicat în Figura 7A, a existat o corelație inversă semnificativă din punct de vedere statistic între procentul de celule CD3⁺ și scorul GDF-15 ($p=0,0015$).

În mod asemănător, s-a analizat de asemenea, dacă există o corelație inversă între nivelurile de hGDF-15 și procentul de celule T CD8⁺ în diferite metastaze cerebrale de melanom. Figura 7B prezintă un grafic al procentului de celule CD8⁺ față de scorul GDF-15 (obținut așa cum a fost descris mai sus în secțiunea „analize statistice”). Așa cum a fost indicat în Figura 7B, a existat o corelație inversă semnificativă din punct de vedere statistic între procentul de celule CD8⁺ și scorul GDF-15 ($p=0,0038$).

Corelarea GDF-15 cu FOXP3, în schimb, nu a oferit niciun rezultat semnificativ din punct de vedere statistic în conformitate cu coeficientul de corelare a rangului (rho) Spearman ($p = 0,8495$ în diferite entități tumorale; $p = 0,2455$ atunci când se evaluează doar metastazele de melanom).

În final, s-a analizat de asemenea, dacă există o corelație inversă între nivelurile de hGDF-15 și procentele de celule T CD8⁺ și CD3⁺ din metastazele cerebrale din diferite entități tumorale. Figura 8 prezintă un grafic al scorului GDF-15 în raport cu procentul de celule T CD8⁺ și, respectiv, CD3⁺, în 168 (pentru CD3) sau, respectiv, 169 (pentru CD8)

metastaze cerebrale din diferite entități tumorale (melanom, CRC, RCC, cancer de sân, NSCLC și SCLC). Graficul a fost obținut așa cum a fost descris mai sus în secțiunea „analize statistice”. Așa cum a fost indicat în Figura 8, a existat o corelație inversă semnificativă din punct de vedere statistic între procentul de celule CD8⁺ și scorul GDF-15 ($p=0,0311$), precum și o corelație inversă semnificativă din punct de vedere statistic între procentul de celule CD3⁺ și scorul GDF-15 ($p=0,0093$). Alți markeri (PD-L1, PD-1, FOXP3) au arătat din nou corelații pozitive cu infiltrarea celulelor T CD3 și CD8.

Rezumat:

Rezultatele de mai sus prezintă faptul că nu există doar o corelație inversă a hGDF-15 cu procentul de celule T care exprimă proteina marker generală a celulelor T CD3 în metastaze, dar de asemenea, o corelație inversă cu procentul de limfocite T CD8⁺ în metastaze. Acest aspect este de remarcat, deoarece prezența limfocitelor T CD8⁺ a fost prezentată anterior că este necesară în mod specific pentru regresia tumorii după inhibarea punctului de control imunitar cu un anticorp anti-PD-1 (Tumeh și colab., Nature. 27 noiembrie 2014; 515(7528):568-71.).

Astfel, în conformitate cu invenția, inhibarea terapeutică a hGDF-15 poate fi utilizată pentru a crește procentul de limfocitele T CD8⁺ în tumorile solide, incluzând metastazele tumorale. Această creștere a limfocitelor T CD8⁺ în tumorile solide poate fi utilizată pentru terapia tumorilor solide. Dintr-un punct de vedere non-limitativ conform invenției, o combinație terapeutică în special favorabilă este combinația unui inhibitor de hGDF-15 cu un agent de blocare a punctului de control imunitar. Un efect avantajos al acestei combinații este faptul că inhibarea hGDF-15 va crește procentul de limfocite T CD8⁺ în tumorile solide și, astfel, duce a un efect terapeutic sinergic cu inhibarea punctului de control imunitar. Invenția poate fi astfel aplicată tuturor tumorilor solide la care s-a făcut referire în realizările preferate.

Exemplul 3: GDF-15 scade aderența celulelor T la celulele endoteliale.

Inventatorii au început, în continuare, să determine modul cum hGDF-15 afectează procentul de celule T din tumorile solide.

O etapă care este necesară pentru invazia celulelor T din fluxul sanguin în țesutul tumoral este faptul că celulele T trebuie să adere mai întâi la endoteliu înainte ca acestea să intre în tumoră. Pentru a simula această etapă și pentru a evalua dacă această etapă ar putea fi afectată de hGDF-15, inventatorii au folosit un sistem de model care măsoară aderența celulelor T la Celulele Endoteliale din Vena Ombilicală Umană (HUVEC):

Experiment de flux/aderență cu celule T (pe HUVEC):

Ziua 1:

- a. Lamele μ VI 0,4 (ibidi GmbH, Germania) au fost acoperite cu fibronectină (100 μ g/mL): 30 μ L per port de încărcare. Acestea au fost incubate timp de 1 oră la 37°C (sau o lamelă pre-acoperită a fost utilizată).
- b. Fibronectina a fost aspirată, urmată de o spălare cu mediu HUVEC.
- c. HUVEC-urile au fost tripsinizate dintr-o placă cu 6 godeuri (număr: 2×10^5 /mL (2 mL total))
- d. Acestea au fost spălate și diluate la 1×10^6 celule/ml
- e. 30 μ L de HUVEC-uri au fost aplicate în porturile de încărcare ale lamelei μ VI și verificate la microscop
- f. Lamela μ VI a fost acoperită cu un capac și incubată la 37°C, 5% CO₂

Ziua 2:

- a. HUVEC-urile au fost activate cu TNF α (10 ng/mL) și IFN γ (10 ng/mL) în canalele 2-5 (vezi tabelul de mai jos): Toate mediile au fost aspirate din canale și înlocuite cu medii preîncălzite care conțin citokine.

Ziua 3:

- a. Celulele T au fost izolate (izolarea negativă a celulelor T pan).
 b. Celulele T au fost pre-incubate în godeul 1 (1×10^6 celule/mL) cu sau fără GDF-15 (100 ng/mL) timp de 1 oră.
 c. HUVEC-urile au fost pre-incubate în canalele 4 și 5 cu GDF-15 (100 ng/mL) timp de 1 oră: Tot mediul din porturile de încărcare a fost aspirat și ambele porturi de încărcare au fost umplute cu mediu preîncălzit care conține GDF15.
 d. Un incubator de stadiu superior de lângă microscop a fost preîncălzit și un amestec de gaz (5% CO $_2$, 16% O $_2$, 79% N $_2$) a fost conectat.
 e. 3 seringi x 50 mL au fost preparate:
 i. celule T (1×10^6 celule/ml): 1 ml
 ii. celule T GDF15 (1×10^6 celule/ml): 1 ml
 iii. Mediu
 f. Seringa 1 a fost conectată la canalul 1 (vezi tabelul de mai jos) și fluxul a fost inițiat (0,5 dyn/cm 2 : 0,38 mL/min = 22,8 mL/h).
 g. Celulele T au curs timp de 3 minute și, între timp, 10 câmpuri vizuale au fost predefinite la microscop.
 h. Fiecare câmp vizual a fost filmat timp de 5 secunde.
 i. Canalele rămase au fost evaluate în analogie cu canalul 1 (f-h) cu probele de celule T, așa cum a fost indicat în tabelul de mai jos.

Canal #	celule endoteliale	celule T în flux	comentarii
1	HUVEC nestimulat	celulele T	[control negativ]
2	HUVEC stimulat	celulele T	[control pozitiv]
3	HUVEC stimulat	celule T GDF-15	
4	HUVEC stimulat GDF-15	celulele T	
5	GDF-15 stimulat HUVEC	celule T GDF-15	

Canal #	celule endoteliale	celule T în flux	comentarii
GDF-15 recombinant a fost obținut de la Invigate GmbH, Jena, Germania.			

Analize statistice:

Toate datele au fost comparate folosind testul Mann-Whitney pentru testarea datelor distribuite în mod non-normal. Valorile $p < 0,05$ au fost considerate a fi semnificative din punct de vedere statistic.

Rezultate:

Rezultatele experimentului sunt prezentate în Figura 9. Această figură prezintă analize ale mai multor parametri de aderență, și anume

- numărul de celule T rulante per câmp vizual pe secundă (9A; datele au fost obținute din canalul #3 ("GDF-15") și canalul #2 ("control"), ceea ce reflectă o formă de aderență moderată a celulele T către celulele endoteliale,
- viteza de rulare a celulelor T (măsurată în pixeli per 0,2 secunde) (9B; datele au fost obținute din canalul #3 ("GDF-15") și canalul #2 ("control"), care crește odată cu scăderea aderenței între celulele T și celulele endoteliale și
- numărul de celule aderente per câmp de vedere (9C; datele au fost obținute de la canalul #3 ("GDF-15") și canalul #2 ("control"); și 9D).

Așa cum se poate vedea din Figura 9C, s-a descoperit faptul că tratamentul celulelor T cu hGDF-15 scade în mod semnificativ aderența la celulele endoteliale, așa cum a fost reflectat în numărul de celule aderente per câmp vizual. Rezultate asemănătoare au fost obținute la analizarea aderenței prin numărarea numerelor de celule T rulante (Figura 9A). În plus, și în concordanță cu rezultatele de mai sus, s-a descoperit faptul că tratamentul celulelor T cu hGDF-15 crește în mod semnificativ viteza de rulare, indicând o scădere a timpului de interacțiune între celulele T și celulele endoteliale și indicând, de asemenea, o aderență redusă. între celulele T și celulele endoteliale (Figura 9B).

Inventatorii au analizat în continuare care celule au fost țintite de hGDF-15 (Figura 9D). În proba în care doar HUVEC au fost tratate cu hGDF-15, o scădere moderată a aderenței celulelor T la celulele endoteliale (HUVEC-uri) a fost observată. În schimb, o scădere puternică a aderenței celulelor T la celulele endoteliale (HUVEC-uri) a fost observată atunci când, fie doar celulele T au fost tratate cu hGDF-15, fie când atât celulele T, cât și celulele endoteliale (HUVEC-uri) au fost tratate cu hGDF-15. Aceste rezultate indică faptul că hGDF-15 acționează atât asupra celulelor T, cât și asupra celulelor endoteliale, dar acestea indică, de asemenea, faptul că principalul efect de aderență al hGDF-15 este un efect asupra celulelor T.

În continuare, inventatorii au testat dacă efectele hGDF-15, care este secretat de celulele tumorale, asupra aderenței celulelor T, ar putea fi inhibitate cu un inhibitor de hGDF-15. Pentru a testa acest fapt, inventatorii au folosit o linie celulară de melanom care secretă hGDF-15, UACC257:

Experimentul de flux/aderență cu celule T (pe HUVEC) în prezența sau absența de GDF-15 în supernatant de celulă tumorală:

Ziua 1:

- a. O lamelă μ VI 0,4 (ibidi GmbH, Germania; la care se face referire de acum înainte ca lamelă μ) a fost acoperită cu fibronectină (100 $\mu\text{g/mL}$): 30 μL per port de încărcare. A fost incubată timp de 1 oră la 37°C (sau o lamelă pre-acoperită a fost utilizată).
- b. Fibronectina a fost aspirată, urmată de o spălare cu mediu HUVEC.
- c. HUVEC-urile au fost tripsinizate dintr-o placă cu 6 godeuri (număr: $2 \times 10^5/\text{mL}$ (2 mL total))
- d. Acestea au fost spălate și diluate la 1×10^6 celule/ml
- e. 30 μL de HUVEC-uri au fost aplicate în porturile de încărcare ale lamelei μ și verificate la microscop
- f. Lamela μ a fost acoperită cu un capac și incubată la 37°C, 5% CO_2 .

Ziua 2:

- a. HUVEC-urile au fost activate cu $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) și IFN γ (10 ng/mL) în canalele 2-5 ale lamelei μ (vezi tabelul de mai jos): Toate mediile au fost aspirate din canale și înlocuite cu medii pre-încălzite care conțin citokine.

Ziua 3:

- a. Celulele T au fost izolate (izolarea negativă a celulelor T pan).
- b. În paralel, 24 de godeuri dintr-o placă ELISA cu 96 de godeuri (Nunc maxisorb) au fost acoperite cu 200 μL de anti-GDF-15 (10 $\mu\text{g/mL}$ diluate în PBS), incubate timp de 45 minute și apoi spălate cu PBS.
- c. Pentru a depletiza supernatantul din linia celulară de melanom UACC257 care secretă GDF-15 (datele nu sunt prezentate) din GDF-15, supernatantul a fost incubat în godeurile plăcii ELISA (vezi b.) care au fost pre-acoperite cu anti-GDF-15.
- d. Ca supernatant de control al liniei celulare de melanom, UACC257 a fost incubat în godeurile plăcii ELISA (vezi b.) care nu au fost pre-acoperite cu anti-GDF-15.
- e. Celulele T au fost pre-incubate într-o placă de cultură celulară cu 12 godeuri (1×10^6 celule/mL) cu GDF-15 (100 $\mu\text{g/mL}$), fără GDF-15, în supernatantul liniei celulare de melanom UACC257 depletizat din GDF-15 (vezi c.) sau în supernatantul liniei celulare de melanom UACC257 care conține GDF-15 (vezi d.) timp de 1 oră.
- f. Un incubator de stadiu superior lângă microscop a fost preîncălzit și un amestec de gaz (5% CO_2 , 16% O_2 , 79% N_2) a fost conectat.
- g. 4 tuburi x 2 mL într-un sistem de flux microfluidic au fost preparate:
 - i. celule T (1×10^6 celule/ml): 1 ml
 - ii. celule T GDF15 (1×10^6 celule/ml): 1 ml
 - iii. celule T UACC 257 (care conțin GDF-15)
 - iv. Celulele T UACC 257 depletizate din GDF-15
- h. Tubul 1 a fost conectat la canalul 1 (vezi tabelul de mai jos) și fluxul a fost pornit (0,4 mL/min = 24 mL/h).
- i. Celulele T au curs timp de 3 minute și, între timp, 5 câmpuri vizuale au fost predefinite la microscop.
- j. Fiecare câmp vizual a fost filmat timp de 5 secunde
- k. Canalele rămase au fost evaluate în analogie cu canalul 1 (f-h) cu probele de celule T, așa cum a fost indicat în tabelul de mai jos.

canal #	celule endoteliale	celule T în flux	comentarii
1	HUVEC nestimulat	celulele T	[control negativ]
2	HUVEC stimulat	celulele T	[control pozitiv]
3	HUVEC stimulat	celule T GDF-15	
4	HUVEC stimulat	celule T UACC 257	
5	HUVEC stimulat	UACC 257 depletizat din GDF-15 cu anti GDF-15	

GDF-15 recombinant a fost obținut de la Invigate GmbH, Jena, Germania.

Rezultate:

Rezultatele experimentului sunt prezentate în Figura 10A. Această figură prezintă analize ale numărului de celule T rulante per câmp vizual pe secundă. Datele au fost obținute din canalul # 1 (celule T de control pe HUVEC nestimulate ca „control negativ”), canalul # 2 (celule T de control pe HUVEC stimulat ca „control pozitiv”), canalul # 3 („GDF-15”) canalul #4 ("UACC 257": celule T cultivate în supernatantul celulelor de melanom UACC 257 care conțin GDF-15 secretat) și canalul #5 ("UACC257 + anti-hGDF-15": celule T cultivate în supernatantul UACC 257 celule de melanom depletizate din GDF-15 secretat cu anti GDF-15 B1-23)

În comparație cu celulele T care au curs peste HUVEC nestimulat („control negativ”; mediana= 28 de celule rulante per câmp vizual pe secundă) fluxul de celule T peste HUVEC stimulat („control pozitiv”) a crescut numărul de celule rulante per câmp vizual per secundă (mediană= 46). Tratamentul celulelor T cu hGDF-15 scade în mod substanțial numărul de celule rulante per câmp vizual per secundă (mediană = 29). De asemenea, pre-incubarea celulelor T cu supernatant al liniei celulare de melanom UACC257 care secretă GDF-15 scade în mod substanțial numărul de celule rulante per câmp vizual per secundă (mediana = 36) în comparație cu celulele T care curg peste HUVEC stimulat („control pozitiv”). Spre deosebire de acest aspect, pre-incubarea celulelor T cu supernatantul liniei celulare de melanom UACC257 depletizat din GDF-15 secretat cu anti GDF-15 B1-23 a avut ca rezultat un număr de celule rulante per câmp vizual per secundă (mediană = 45) care a fost comparabil cu celulele T care curg peste HUVEC stimulat ("control pozitiv").

Astfel, în conformitate cu invenția, inhibitorii de hGDF-15 pot fi utilizați pentru a crește aderența celulelor T, incluzând celulele CD8+ la celulele endoteliale, de exemplu, în tratamentul cancerelor solide.

Mai mult, testul de mai sus asigură un simplu sistem *in vitro* care poate fi utilizat pentru a determina dacă o substanță de interes este un inhibitor de hGDF-15.

Rezumat:

Acest exemplu prezintă faptul că GDF-15, incluzând GDF-15 secretat de celulele tumorale, scade aderența celulelor T la celulele endoteliale. Prin urmare, în conformitate cu invenția, un tratament cu inhibitori de hGDF-15 poate fi utilizat pentru a crește aderența celulelor T, incluzând celulele T CD8⁺ la celulele endoteliale. Un astfel de tratament va crește intrarea celulelor T, incluzând celulele T CD8⁺ din fluxul sanguin în cancere solide. Procentul crescut de celule T CD8⁺ în cancerurile solide, care vor rezulta dintr-un astfel de tratament cu inhibitori de hGDF-15, este avantajos pentru, și poate fi utilizat în, terapia împotriva cancerului, de exemplu, imunoterapia împotriva cancerului. Din moment ce intrarea celulelor T CD8⁺ în cancerurile solide și prezența acestor celule T CD8⁺ în cancerurile solide sunt particular de avantajoase pentru abordări terapeutice care utilizează agenți de blocare a punctelor de control imune, o utilizare particular de avantajoasă a inhibitorilor de hGDF-15 în conformitate cu invenția este utilizarea lor în combinație cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare.

Analiză de aderență în flux, incluzând Neutralizarea Anticorpului cu Anticorpi H1L5 (B1-23 umanizat) și 01G06 și 03G05 (Anticorpi anti-GDF-15 umanizați structurați pe calea ingineriei în conformitate cu secvențele în conformitate cu WO 2014/100689)

Acest experiment a fost efectuat pentru a confirma în continuare efectele observate mai sus, incluzând descoperirea că inhibitorii de hGDF-15 pot fi utilizați pentru a crește aderența celulelor T la celulele endoteliale sau rularea celulelor T.

Proceduri experimentale:

Analiza de curgere/aderență a fost efectuată așa cum a fost descris mai sus în prezentul exemplu. Celulele T au fost pre-incubate cu 100 ng/ml de GDF-15 timp de 1 oră sau cu 100 ng/ml de GDF-15, care au fost pre-incubate cu 10 μg/ml anticorp timp de 1 oră. Următorii anticorpi Anti-GDF-15 au fost utilizați: H1L5 (B1-23 umanizat), 01G06 și 03G05 (Anticorpi anti-GDF-15 umanizați structurați pe calea ingineriei în conformitate cu secvențele din WO 2014/100689).

Rezultate:

Rezultatele sunt prezentate în Figura 10B. În comparație cu celulele T care au curs peste HUVEC nestimulat (control negativ), curgerea celulelor T peste HUVEC stimulat (control pozitiv) a crescut numărul de celule rulante per câmp vizual per 20 de secunde. Tratamentul celulelor T cu hGDF-15 a scăzut în mod substanțial numărul de celule rulante per câmp de vedere per 20 de secunde. Spre deosebire de aceasta, pre-incubarea celulelor T cu hGDF-15, care a fost pre-incubat cu anticorpii anti GDF-15 H1L5 (B1-23 umanizat), 01G06 sau 03G05, a avut ca rezultat un număr de celule rulante per câmp vizual per 20 de secunde care a fost crescut în mod substanțial în comparație cu proba în care niciun anticorp anti-GDF-15 nu a fost adăugat. Acest efect a fost prezent pentru toți anticorpii anti-GDF-15 testați și a fost cel mai pronunțat pentru anticorpii H1L5 (B1-23 umanizat), care a inversat aproape în mod complet efectul hGDF-15 asupra rulării celulelor T.

Concluzii

Astfel, în conformitate cu invenția, inhibitorii de hGDF-15 pot fi utilizați pentru a crește aderența celulelor T, incluzând celulele CD8⁺ la celulele endoteliale, sau rularea celulelor T menționate incluzând celulele CD8⁺. În conformitate cu invenția, inhibitorii de

hGDF-15 vor crește procentul de celule CD8⁺ în cancerile solide și pot fi utilizați pentru tratamentul acestor cancere. Acești inhibitori de hGDF-15 pot fi - dar nu sunt limitați la - orice anticorpi anti-GDF-15 cunoscuți, cum ar fi anticorpii H1L5 (B1-23 umanizat), 01G06 și 03G05.

Exemplu 4: Evaluarea eficacității antitumorale a anticorpului de test în combinație cu imunizarea adjuvantă la șoareci singenici MC38^{tg hGDF-15+} cre prezintă tumoră.

Pentru a evalua dacă inhibarea factorului uman de creștere și diferențiere (GDF)-15 poate îmbunătăți răspunsul față de o imunoterapie și în special, un răspuns față de o imunoterapie care necesită celule T CD8⁺ în tumoră, celulele de cancer de colon murinic MC38 au fost transfectate pentru a exprima GDF-15 uman la niveluri asemănătoare cu cele găsite în liniile de celule canceroase umane. Așa cum a fost evaluat prin analiza imunoabsorbantului legat de enzime (ELISA, R&D Systems, Mouse GDF-15 DuoSet ELISA), celulele MC38 nu au exprimat niveluri detectabile de GDF-15 murinic (limită de detecție: 7,81 pg/ml).

În ziua 0, șoareci femele C57BL/6J în vârstă de 9 săptămâni (asigurați de Charles River Laboratories, BP 0109, F 69592 L'Arbresle, Cedex) au fost anesteziați și inoculați pe cale subcutanată cu 2x10⁵ celule de colon MC38^{tg hGDF-15}. Tratamentul cu anticorp anti GDF-15 (20 mg/kg greutate corporală, adică aproximativ 400 μg per șoarece în 100 μl de soluție salină tamponată cu fosfat cu 0,5% albumină serică bovină) a fost inițiat în ziua 0 (la aproximativ 6 ore după inocularea celulelor tumorale) și repetat în zilele 3, 7, 10, 14, 17 și 21. În ziua 13, atunci când tumorile au atins un volum între 100 și 150 mm³, animalele au fost randomizate în diferite grupuri de tratament, și animalele respective au fost injectate pe cale intraperitoneală cu adjuvant (100 μg de acid poliinozinic:policitidilic (Poly-ICLC (Hiltonol)[®], Oncovir, Washington D.C., SUA)) și 50 μg de anticorp InVivoMAb anti-murin(m)CD40 (clona FGK4.5/FGK45)) într-un volum total de 50 μl soluție salină tamponată cu fosfat.

Datorită asemănării sale structurale cu ARN-ul dublu catenar, care este prezent în anumiți viruși și stimulează TLR3, Poli-ICLC simulează o infecție. Anticorpul agonist anti-CD40 asigra un semnal suplimentar celulelor care prezintă de antigen. „Licensing” of dendritic cells via stimulation of CD40 supports the activation of antigen-specific CD8⁺ T cells. Adjuvant treatment thus serves to induce tumor-specific immune cells in mice kept under specific pathogen-free conditions (Yadav M și colab., Nature. 2014 Nov 27;515(7528):572-6).

Prin urmare, acest tratament adjuvant reprezintă un sistem de model pentru o imunoterapie împotriva cancerului care necesită celule imune în tumoră, și în special celule T CD8⁺ în tumoră. Astfel, acesta este un sistem de model care este potrivit pentru a confirma în continuare faptul că un tratament cu un inhibitor de hGDF-15, cum ar fi un anticorp anti-hGDF-15, sinergizează cu imunoterapia împotriva cancerului, incluzând o imunoterapie împotriva cancerului care necesită celule T CD8⁺ din tumoră.

Pentru a rezuma, următoarele grupuri de animale (10 șoareci per grup) au fost investigate:

- grup cu agent purtător fără imunizare adjuvantă
- grup tratat cu anticorp anti hGDF-15 B1-23 fără imunizare adjuvantă
- grup cu agent purtător cu imunizare adjuvantă
- grup tratat cu anticorp anti hGDF-15 B1-23 cu imunizare adjuvantă

Dimensiunea tumorii a fost măsurată de 3 ori pe săptămână prin măsurarea pe bază de șubler a lungimii și lățimii tumorii.

Șoarecii au fost sacrificați odată ce volumul tumorii lor a depășit 2.000 mm³, așa cum a fost calculat prin formula $V = \text{lungime} \times \text{lățime}^2 / 2$. De asemenea, șoarecii au fost sacrificați atunci când starea lor a fost descoperită că se deteriorează dincolo de limitele acceptate în mod obișnuit pentru bunăstarea animalelor (pierdere în greutate $\geq 15\%$, pierderea mobilității, comportament prostrat, stare proastă a blăni).

Pentru șoarecii supraviețuitori, prezența tumorilor a fost determinată prin examinare fizică până în ziua 57 după inocularea tumorii. Rezultatele sunt prezentate în Figura 11.

Într-un studiu anterior realizat de inventatori, a fost prezentat faptul că un tratament cu un anticorp anti-GDF-15 singur poate fi utilizat în mod avantajos pentru a trata cancerul, dar nu a eradicat în mod complet tumorile, adică nu a vindecat cancerul. În mod asemănător, în Figura 11, nici șoarecii tratați cu agent purtător, nici șoarecii care au fost tratați doar cu anti-hGDF-15 nu au fost vindecați. Tratamentul cu adjuvant (adică cu poli ICLC și anticorpul anti-CD40) a vindecat 3 din 10 șoareci. În special, atunci când tratamentul cu adjuvantul a fost combinat cu tratamentul cu anticorpul anti-hGDF-15, 8 din 10 șoareci au fost vindecați. Astfel, tratamentul cu anticorpul anti-hGDF-15 a fost puternic sinergizat cu tratamentul cu adjuvantul.

Concluzii:

Rezultatele obținute în acest sistem de model confirmă suplimentar faptul că inhibitorii de hGDF-15 sinergizează cu imunoterapia împotriva cancerului și în special cu imunoterapia împotriva cancerului care necesită activarea celulelor imune, cum ar fi celulele T CD8⁺ care exercită apoi activitate citotoxică în țesutul tumoral. Rezultatele confirmă, de asemenea, faptul că creșterea procentului de celule T CD8⁺ din cancer, care este cauzată de utilizările inhibitorilor de hGDF-15 în conformitate cu invenția, poate fi utilizată în mod avantajos în terapia împotriva cancerului.

În condițiile experimentale alese, sistemul de model imunitar murinic prezintă foarte puțin timp pentru a construi un răspuns al celulelor T CD8⁺ specific pentru antigen față de un cancer rapid în creștere. Astfel, un adjuvant a fost utilizat pentru a susține în continuare răspunsul imunitar spontan în sistemul murinic. În schimb, la pacienții umani, unde cancerul se dezvoltă pe o perioadă mai lungă de timp (de exemplu, câțiva ani), celulele T specifice antigenului orientate împotriva antigenelor canceroase sunt de obicei deja prezente la diagnostic, adică, inițierea unui răspuns imunitar are loc de obicei chiar înainte de diagnosticarea cancerului. Aceste celule T CD8⁺ specifice antigenului cancerului există deja la om, dar într-un grad mult mai mic în sistemul de model murinic. Prin urmare, în conformitate cu invenția, utilizările inhibitorilor de hGDF-15 în conformitate cu invenția vor fi chiar mai eficiente la oameni decât în prezentul sistem de model murinic. În consecință, inhibitorii de hGDF-15 pot fi utilizați eficient pentru tratamentul pacienților cu cancer uman în conformitate cu invenția, de exemplu, să crească procentul de celule T CD8⁺ într-un cancer solid și vor sinergiza cu alte terapii imune împotriva cancerului la oameni și, în special, cu terapiile imune împotriva cancerului care necesită celule T CD8⁺ în cancer, incluzând imunoterapii împotriva cancerului cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare, cum ar fi anticorpii anti-PD-1 și anti-PD-L1.

Exemplul 5: Niveluri serice de GDF-15 definesc supraviețuirea pacienților cu melanom tratați cu anti PD-1

Studiul din acest Exemplu a fost realizat pentru a valida în continuare rezultatele obținute în studiul Exemplului 1, de exemplu, descoperirea potrivit căreia hGDF-15 influențează răspunsul pacienților la agenții de blocare a punctelor de control imunitare, printr-un studiu adițional independent.

Următorii termeni au fost folosiți în legătură cu acest studiu:

"Cenzurat"	= Pacientul a fost eliminat din cohorta de studiu atunci când nu au fost disponibile alte date de urmărire.
"Eveniment"	= Pacientul a murit.
"Supraviețuire"	= Pacientul era în viață la urmărire.

Pacienții de la Departamentul de Dermatologie, Universitatea din Tübingen, Germania, cu melanom confirmat pe cale histologică au fost identificați în baza de date din Registrul Central al Melanomului Malign (CMMR), care înregistrează prospectiv pacienții din peste 60 de centre dermatologice din Germania. 99 de pacienți, cu (a) probe de ser arhivate, (b) date de urmărire disponibile, (c) antecedente sau prezență de metastaze loco-regionale sau distante la momentul prelevării sângelui și (d) tratament experimental cu anticorp anti PD-1 au fost selectați. Obiectivele și metodele de colectare a datelor de către CMMR au fost publicate anterior în detaliu (Lasithiotakis, KG și colab., Cancer / 107 / 1331-9. 2006). Datele obținute pentru fiecare pacient au inclus vârsta, sexul, data ultimei urmăririi și data și cauza decesului, dacă este aplicabil. Toți pacienții și-au dat consimțământul informat în scris pentru ca datele clinice să fie înregistrate de registrul CMMR. Comitetul de etică instituțional Tübingen a aprobat studiul (votul etic 125/2015BO2). Pacienții eligibili au fost cu vârsta de 18 ani sau mai mari și au prezentat melanom de stadiul III sau stadiul IV nerezecabil confirmat histologic sau citologic, care nu poate fi supus terapiei locale și au prezentat progresie a bolii, în ciuda faptului că au primit anterior terapii în conformitate cu ghidurile actuale. Pacienții cu tumori mutante BRAFV600 au primit tratamentul de primă linie recomandat sau un tratament experimental, incluzând terapia cu inhibitor BRAF sau MEK sau ambii. Tratamentul anterior cu ipilimumab, dacă a fost cazul, a fost considerat ca eșuat atunci când pacienții au primit cel puțin două doze, 3 mg/kg o dată la 3 săptămâni, dar au prezentat progresie confirmată a bolii în 24 de săptămâni de la ultima doză de ipilimumab. Înainte de administrarea de anti-PD-1, rezolvarea sau îmbunătățirea evenimentelor adverse asociate cu ipilimumab la gradul 0-1 și doză de prednison de 10 mg/zi sau mai puțin a fost cerută timp de cel puțin 2 săptămâni înainte de prima doză de medicament de studiu. Pacienții eligibili au prezentat starea de performanță a Grupului Ocolologic de Cooperare Estică (ECOG) 0 sau 1; boala măsurabilă pe Criterii de Evaluare a Răspunsului în Tumorile Solide, versiunea 1.1 (RECIST v1.1); și valori în intervalul prestabilit pentru numărul absolut de neutrofile (≥ 1500 celule per ml), trombocite ($\geq 100\ 000$ celule per ml), hemoglobină (≥ 90 g/L), creatinină serică ($\leq 1,5$ limită superioară a normalului [ULN]), bilirubină totală serică ($\leq 1,5$ LSN sau bilirubină directă \leq LSN pentru pacienții cu concentrații totale de bilirubină $> 1,5$ LSN), aspartat și alanin aminotransferaze ($\leq 2,5$ LSN sau ≤ 5 LSN pentru pacienții cu metastaze hepatice), raportul internațional normalizat sau timpul de protrombină ($\leq 1,5$ LSN dacă nu se utilizează anticoagulante) și timpul de tromboplastină parțială activată ($\leq 1,5$ LSN dacă nu se utilizează anticoagulante). Pacienții

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	s1	s2										s12
D	s13	s14										s24
E	s13	s14										s24
F	Dil	uți	e					st	an	dar	D	
G					se	rie						
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- i. Fiecare godeu a fost aspirat și spălat de trei ori cu PBS-Tween (0,05%).
- j. Anticorpul de detectare a fost diluat la o concentrație finală de 50 ng/ml (56 μ l + 10 ml tampon de blocare). 50 μ l de anticorp de detectare diluat au fost adăugați în fiecare godeu, urmat de incubare timp de 1 oră la temperatura camerei.
- k. Fiecare godeu a fost aspirat și spălat de trei ori cu PBS-Tween (0,05%).
- l. Streptavidină-HRP a fost diluată 1:200 (50 μ l + 10 ml de tampon de blocare). 50 μ L din diluția de lucru de Streptavidină-HRP au fost adăugați la fiecare godeu, urmat de incubare timp de 20 de minute la RT.
- m. Fiecare godeu a fost aspirat și spălat de trei ori cu PBS-Tween (0,05%).
- n. Soluția de substrat a fost preparată. 50 μ L de soluție de substrat au fost adăugați în fiecare godeu, urmat de incubare timp de 20 de minute la RT.
- o. 50 μ L de soluție de oprire au fost adăugați la fiecare godeu.
- p. Densitatea optică a fiecărui godeu a fost determinată imediat, utilizând un cititor de microplacă setat la 450 nm.

3. Calculul titrului seric GDF-15:

- d. Fiecare probă/diluție standard GDF-15 a fost aplicată în duplicat. Pentru a determina titrul GDF-15, media duplicatelor a fost calculată și fundalul (probă fără GDF-15) a fost scăzut.
- e. Pentru a crea o curbă standard, valorile din domeniul liniar au fost reprezentate grafic pe o diagramă X-Y (axa X: concentrația GDF-15, axa Y: OD450) și o potrivire a curbei liniare a fost aplicată. Titrul de ser GDF-15 al probelor de testat a fost calculat prin interpolarea valorilor OD450 ale diluțiilor standard cu concentrație cunoscută.
- f. Pentru a calcula concentrația finală de GDF-15 a probelor, factorul de diluție distinct a fost luat în considerare. Probele care au dus la obținerea valorilor OD sub sau peste intervalul standard au fost reanalizate la diluții corespunzătoare.

Comparația nivelurilor serice de hGDF-15 cu datele pacientului:

În continuare, nivelurile serice măsurate de hGDF-15 au fost comparate cu datele de răspuns ale pacientului obținute din studiu.

Corelația statistică a nivelurilor serice de hGDF-15 cu datele pacientului:

Date:

Analiza datelor s-a bazat pe un fișier de date care conține date din probe de la 99 de pacienți, care conține coloanele (variabilele) Denumirea probei, GDF-15 (ng/ml), zile (până la moarte sau cenzurare) și În viață (o variabilă indice pentru viața în curs).

Variabile de rezultat (puncte finale):

A. Supraviețuirea generală (timpul până la moarte). Acest punct final este compus din indicatorul de eveniment pentru deces (1 = mort/0 = în viață), care a fost derivat din fișierul de date și timpul până la moarte sau cenzurare (ultimul moment când s-a cunoscut că pacientul este în viață), corespunzător variabilei „zile”.

Răspunsul la tratament, de exemplu, dacă un pacient a răspuns sau nu (codificat ca 1=r)

Analiza datelor:

Timpul de urmărire pentru analiza de supraviețuire a fost definit de la data prelevării probei de sânge până la ultima urmărire (adică, ultima informație obținută de la pacient) sau deces. Toate probele de sânge au fost prelevate cu câteva zile anterior tratamentului cu anticorp anti-PD1. Pentru analiza OS, pacienții care au fost în viață la ultima urmărire au fost cenzurați, în timp ce pacienții care au murit au fost considerați un „eveniment”. Probabilitățile cumulate de supraviețuire în conformitate cu Kaplan-Meier au fost calculate împreună cu intervale de încredere de 95% (CI-uri) și comparate folosind statistica testului log-rank cu două fețe. Valorile p pentru supraviețuirea generală au fost calculate prin statistica de rang log cu două fețe. Un model a fost dotat cu o variabilă de grupare bazată pe GDF-15 ca factor predictiv categoric (grupurile au fost: <1,5 ng/ml (n=62), ≥1,5 ng/ml (n=37) sau GDF-15^{scăzut} (n=49), GDF-15^{înalt} (n=50), pe baza unei împărțiri mediene). Curbele Kaplan-Meier rezultate sunt prezentate în Figurile 12 și 13, unde cenzurarea este indicată prin linii verticale. În plus, următoarele tabele conțin un rezumat al cazurilor (Tabelul 9), date de supraviețuire a pacienților pentru grupurile de pacienți care prezintă niveluri de GDF-15 <1,5 ng/ml și ≥1,5 ng/ml (Tabelele 10 și 11) și comparații statistice totale ale grupurilor de pacienți care prezintă niveluri de GDF-15 <1,5 ng/ml și ≥1,5 ng/ml (Tabelul 12).

Tabelul 9: Rezumatul cazurilor

	Număr	Numărul de evenimente	Cenzurat	
			H*	% Supraviețuire
GDF-15 <1,5 ng/ml	62	11	51	82,3%
GDF-15 ≥ 1,5 ng/ml	37	18	19	51,4%
Total	99	29	70	70,7%
*H = fără evenimente				

Tabelul 10: Media și mediana pentru Supraviețuire (numărul de zile de supraviețuire)

	Medie ^A				Mediana	
	Estimare	Eroare standard	Interval de încredere 95%		Estimare	Eroare standard
			Limită inferioara	Limită superioară		
<1,5 ng/ml	701,928	44,172	615,350	788,506	n/d.	n/d.
≥1,5 ng/ml	381,683	48,882	285,875	477,491	309.000	127.570
Total	569,056	44,477	481,882	656,231	n/d.	n/d.

A. După cenzurare, estimarea este limitată la cea mai lungă supraviețuire cunoscută.
n/d: Niciun fel de date privind supraviețuirea mediană nu a putut fi calculat din cauza prezenței a >50% supraviețuitori în grup.

Tabelul 11: Media și mediana pentru Durata de Supraviețuire (numărul de zile de supraviețuire)

	Mediana ^A	
	Interval de încredere de 95%.	
	limită inferioara	limită superioară
<1,5 ng/ml	n/d.	n/d.
≥1,5 ng/ml	58,963	559,037
Total	n/d.	n/d.

A. După cenzură, estimarea este limitată la cea mai lungă supraviețuire cunoscută.
n/d: Niciun fel de date privind supraviețuirea mediană nu a putut fi calculat din cauza prezenței a >50% supraviețuitori în grup

Tabelul 12: Comparații totale

	Chi-pătrat	df*	Semnificație
Rang Log (Mantel-Cox)	8,129	1	.004
*df = grade de libertate Test asupra distribuției egale a supraviețuirii pentru diferite niveluri de GDF-15 (<1,5 ng/ml, ≥1,5 ng/ml)			

Rezultate și concluzii:

Rezultatele statistice de mai sus ale acestui Exemplu au confirmat în continuare rezultatele Exemplului 1. De exemplu, s-a confirmat faptul că probabilitatea unui răspuns

la tratament, așa cum a fost indicat de supraviețuirea pacienților, scade în mod semnificativ odată cu nivelurile în creștere de hGDF-15 în serurile pacientului. De exemplu, Tabelul 12 prezintă faptul că supraviețuirea între cele două grupuri de pacienți care prezintă niveluri de GDF-15 <1,5 ng/ml și, respectiv, ≥1,5 ng/ml, a fost în mod semnificativ diferită, așa cum a fost evidențiat de un nivel de semnificație de 0,004. În mod asemănător, Tabelul 9 demonstrează faptul că un procent mai mare de pacienți (82,3%) a supraviețuit în grupul care prezintă niveluri de GDF-15 <1,5 ng/ml, și Tabelele 10 și 11 și figurile 12 și 13 demonstrează faptul că pentru pacienții care prezintă niveluri de GDF-15 de <1,5 ng/ml, timpii de supraviețuire au fost în mod remarcabil mai lungi decât la pacienții care prezintă niveluri de GDF-15 ≥1,5 ng/ml.

Astfel, rezultatele acestui Exemplu confirmă în continuare faptul că hGDF-15 acționează pentru a afecta negativ răspunsurile pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare. Astfel, în conformitate cu invenția, un inhibitor de hGDF-15 va fi util pentru a inhiba efectele negative ale hGDF-15 asupra răspunsurilor pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare și pentru a îmbunătăți răspunsurile pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare nu numai în melanom, ci și în toate cancerurile solide la care s-a făcut referire aici.

Exemplul 6: La pacienții umani cu cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) tratați cu un anticorp anti-PD1, nivelurile serice medii de hGDF-15 la pacienții cu boală progresivă sunt mai mari decât la pacienții care prezintă un răspuns parțial.

Acest exemplu a fost realizat pentru a valida în continuare rezultatele obținute în studiul Exemplului 1, de exemplu, descoperirea potrivit căreia hGDF-15 influențează răspunsul pacienților la agenții de blocare a punctelor de control imunitare, într-un studiu adițional independent, într-un cancer solid diferit.

Pacienți:

Pacienții cu NSCLC au fost tratați cu anticorpi anti-PD1 în conformitate cu markerul de medicament aprobat al anticorpilor anti-PD1. Pacienții au inclus pacienți care au fost pre-tratați în prealabil cu alte terapii împotriva cancerului. Datorită faptului că un răspuns complet este rar observat la pacienții cu NSCLC, grupul de pacienți a inclus pacienți care prezintă boală progresivă și care prezintă un răspuns parțial la tratamentul cu PD-1, dar niciun pacient care a prezentat un răspuns complet la tratamentul cu PD-1.

Probele serice:

Probele serice au fost prelevate de la pacienți înainte de tratamentul cu anticorpi anti-PD1.

Analiza nivelurilor serice de hGDF-15 prin Analiza Imunosorbentului Legat de Enzime (ELISA):

Nivelurile serice de hGDF-15 din probele de ser au fost analizate prin Analiza Imunosorbentului Legat de Enzime (ELISA), așa cum a fost descris în Exemplul 1.

Rezultate:

Niveluri serice de hGDF-15 de la 5 pacienți care prezintă un răspuns parțial la tratamentul cu anti-PD-1 și de la 5 pacienți care prezintă boală progresivă la tratamentul cu anti-PD-1 au fost obținute. În special, nivelul seric median de hGDF-15 la pacienții care prezintă un răspuns parțial a fost de 0,55 ng/ml, în timp ce nivelul seric median de hGDF-15 la pacienții care prezintă boală progresivă a fost de 1,56 ng/ml. Astfel, nivelul

seric median de hGDF-15 la pacienții care prezintă o boală progresivă a fost de aproximativ 2,8 ori mai mare decât la pacienții care prezintă un răspuns parțial.

Concluzii:

Rezultatele acestui Exemplu confirmă în continuare faptul că nivelurile de hGDF-15 se corelează în mod negativ cu răspunsul pacienților la agenții de blocare a punctelor de control imunitare. Rezultatele acestui Exemplu confirmă, de asemenea, faptul că hGDF-15 acționează pentru a afecta negativ răspunsurile pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare, cum ar fi PD-1. Astfel, în conformitate cu invenția, un inhibitor de hGDF-15 va fi util pentru a inhiba efectele negative ale hGDF-15 asupra răspunsurilor pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare și pentru a îmbunătăți răspunsurile pacienților la tratamentul cu agenți de blocare a punctelor de control imunitare nu numai în melanom, ci și în cancerul pulmonar, cum ar fi NSCLC și în toate celelalte cancere solide la care s-a făcut referire aici.

Exemplul 7: Nivelurile serice ale hGDF-15 nu se corelează în mod semnificativ cu sarcina mutațională a tumorilor

Sarcina mutațională este un factor de prognostic pozitiv cunoscut pentru un răspuns al pacienților cu cancer față de agenții de blocare a punctelor de control imunitare. În general, celulele canceroase prezintă mutații genomice care dau naștere la antigene ale celulelor canceroase care sunt specifice celulelor canceroase și diferite de antigenele celulelor non-canceroase. O sarcină mutațională mare duce la un număr mare de astfel de antigene specifice celulelor canceroase. În cancerul care prezintă un astfel de număr mare de antigene specifice celulei canceroase, stimularea răspunsului imunitar de către agenții de blocare a punctelor de control imunitare este considerată a fi deosebit de eficientă, deoarece mai multe antigene specifice celulei canceroase sunt disponibile ca antigene țintă pentru răspunsul imunitar.

Pentru a confirma în continuare faptul că hGDF-15 nu este doar un marker surrogat pentru sarcina mutațională a tumorilor și pentru a confirma în continuare faptul că un tratament cu inhibitori de hGDF-15 acționează prin intermediul unui mecanism care este independent de sarcina mutațională a tumorilor, nivelurile de ARNm de hGDF-15 din probele de cancer de la pacienții cu cancer au fost reprezentate grafic în funcție de numărul de mutații somatice care au fost identificate în cancer. Mutațiile somatice au fost determinate prin utilizarea secvențierii exomului. Datele au fost analizate prin utilizarea instrumentului web UZH de la Spitalul Universitar din Zurich (Cheng PF și colab.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly.* 2015 Sep 16;145:w14183.) Rezultatele sunt prezentate în Figura 14. Figura 14A prezintă un grafic pentru datele pacienților cu cancer, obținute din Atlasul Genomului Cancerului (TCGA) luând în considerare doar pacienții cu melanom malign de grad înalt (Atlasul Genomului de Cancer este descris în referința din Cheng PF și colab.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly.* 2015 Sep 16;145:w14183.). Expresia GDF-15 a fost evaluată prin normalizare, folosind pachetul software RSEM ("Secvențierea ARN-ului prin maximizarea expectației") (Li B și Dewey CN: RSEM: cuantificare precisă a transcripției din datele ARN-Seq cu sau fără genom de referință. *BMC Bioinformatics.* 4 august 2011;12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323.). Figura 14B prezintă un grafic pentru datele pacienților

cu cancer de la 40 de pacienți adiționali cu melanom malign metastatic de la Spitalul Universitar din Zurich, care au fost analizați separat.

În mod remarcabil, ambele figuri 14A și 14B prezintă o valoare p de 0,5, care indică faptul că nu există o corelație semnificativă între sarcina mutațională în cancere și nivelurile de hGDF-15. Aceste rezultate confirmă în continuare faptul că hGDF-15 nu este doar un marker surrogat pentru sarcina mutațională a tumorilor și faptul că un tratament cu inhibitori de hGDF-15 acționează prin intermediul unui mecanism care este independent de sarcina mutațională a tumorilor.

Exemplul 8: Infiltrarea celulelor T CD8⁺ în tumorile de tip sălbatic sau în tumorile care (supra)exprimă GDF-15 uman

Într-un studiu pilot care folosește celule de cancer de colon MC38 care (supra)exprimă GDF-15 de tip sălbatic sau uman implantate în flancul drept al șoarecilor singenici imunocompetenți C57BL/6, supraexpresia GDF-15 a fost asociată cu infiltrarea redusă a celulelor imune. Imaginile de imunocitochimie pentru CD8a la șoarecii sacrificați după 29 de zile care prezintă tumori de tip sălbatic sau tumori care supraexprimă transgenic (tg) hGDF15 sunt prezentate în Figura 15. Așa cum se poate observa din figură, tumorile de tip sălbatic au conținut mai multe celule CD8a pozitive decât tumorile care supraexprimă hGDF15 transgenic (tg).

Aceste rezultate susțin în continuare descoperirea potrivit căreia, în conformitate cu prezenta invenție, hGDF-15 scade procentul de Celulele T CD8⁺ în cancerurile solide și, pe cale de consecință, inhibitorii hGDF-15, cum ar fi anticorpii anti-GDF-15, pot fi utilizați pentru a crește procentul de celule T CD8⁺ într-un cancer solid la un pacient uman.

Aplicabilitate industrială

Comparațiile de inhibitori, compozițiile și kiturile în conformitate cu prezenta invenție pot fi fabricate industrial și vândute ca produse pentru metodele și utilizările revendicate (de exemplu, pentru tratarea unui cancer, așa cum a fost definit aici), în conformitate cu standardele cunoscute pentru fabricarea produselor farmaceutice. În consecință, prezenta invenție este aplicabilă la scară industrială.

Referințe

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

Ausubel și colab.: "Current Protocols in Molecular Biology." Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992,

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

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

Cheng PF și colab.: Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. Swiss Med Wkly. 2015 Sep 16; 145:w14183,

Chothia C și colab.: Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 1989 Dec 21-28;342(6252):877-83,

Clackson T și colab.: "Making antibody fragments using phage display libraries." *Nature*. 1991 Aug 15;352(6336):624-8,

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

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

Eisenhauer și colab.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1,1). *Eur. J. Cancer*. 45, No. 2, January 2009, pp 228-47,

Giudicelli V și colab.: IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W435-40,

Gouttefangeas C și colab.: "Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality Assurance and Future." (2015) In: *Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside* (N. Rezaei editor). Springer. Chapter 25: pages 471-486; and the methods according to

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

Holliger P și colab.: "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 15;90(14):6444-8,

Holt LJ și colab.: "Domain antibodies: proteins for therapy." *Trends Biotechnol*. 2003 Nov;21(11):484-90,

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

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

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

Jones PT și colab.: "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." *Nature*. 1986 May 29-Jun 4;321(6069):522-5,

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

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

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

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

Lasithiotakis, KG și colab., *Cancer* / 107 / 1331-9. 2006,

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

Marks JD și colab.: "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." *J Mol Biol.* 1991 Dec 5;222(3):581-97,

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

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

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

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

Riechmann L și colab.: "Reshaping human antibodies for therapy." *Nature.* 1988 Mar 24;332(6162):323-7, C. Robert și colab. *N Engl J Med* 2015; 372:2521-2532,

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

Saerens D și colab.: "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics." *Curr Opin Pharmacol.* 2008 Oct;8(5):600-8, Epub 2008 Aug 22,

Sambrook și colab.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989.

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

Stefanescu R. și colab., *Eur.J.Mass Spectrom.* 13, 69-75 (2007)

Suckau și colab. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 December; 87(24): 9848-9852,

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

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

Weinberg R. și colab.: *The Biology of Cancer.* Garland Science: New York 2006, 850p.

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

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

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

WO 2005/099746

WO 2009/021293

WO 2014/049087

PCT/EP2015/056654 (corresponding to WO 2015/144855)

WO 2014/100689