

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044887**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.10.09

(21) Номер заявки

201890850

(22) Дата подачи заявки

2016.09.30(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)**A61K 31/00** (2006.01)**C07K 16/22** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**G01N 33/574** (2006.01)**G01N 33/50** (2006.01)

**(54) КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНГИБИТОРОВ
ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ФАКТОРА РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ 15 (GDF-15) И
БЛОКАТОРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУННОГО ОТВЕТА**

(31) **1517531.8; 1607801.6**(32) **2015.10.02; 2016.04.29**(33) **GB**(43) **2018.09.28**(86) **PCT/EP2016/073520**(87) **WO 2017/055613 2017.04.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЮЛИУС-МАКСИМИЛИАНС-
УНИВЕРЗИТЕТ ВЮРЦБУРГ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Вишхузен Йорг, Хаакс Маркус (DE),
Думмер Райнхард, Мелинг Маттиас
(CH), Шефер Тина, Зелле Мартина
(DE)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2015144855**

TSUI KE-HUNG ET AL.: "Growth differentiation factor-15: a p53- and demethylation-upregulating gene represses cell proliferation, invasion, and tumorigenesis in bladder carcinoma cells.", SCIENTIFIC REPORTS 2015, vol. 5, 7 August 2015 (2015-08-07), page 12870, XP002765093, ISSN: 2045-2322 page 154, right-hand column

ARTZ ANNETTE ET AL.: "GDF-15 inhibits integrin activation and mouse neutrophil recruitment through the ALK-5/TGF-[beta]RII heterodimer.", BLOOD 28 JUL 2016, vol. 128, no. 4, 28 July 2016 (2016-07-28), pages 529-541, XP002765094, ISSN: 1528-0020 abstract

NEUZILLET CINDY ET AL.: "Targeting the TGF[beta] pathway for cancer therapy.", PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS MAR 2015, vol. 147, March 2015 (2015-03), pages 22-31, XP002765095, ISSN: 1879-016X page 25, right-hand column, last

paragraph page 28, right-hand column, line 11 - page 29, left-hand column, paragraph 3

HERBERTZ STEPHAN ET AL.: "Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway.", DRUG DESIGN, DEVELOPMENT AND THERAPY 2015, vol. 9, 10 August 2015 (2015-08-10), pages 4479-4499, XP002765096, ISSN: 1177-8881 abstract

ADKINS CHRIS E ET AL.: "A novel preclinical method to quantitatively evaluate early-stage metastatic events at the murine blood-brain barrier.", CANCER PREVENTION RESEARCH (PHILADELPHIA, PA.) JAN 2015, vol. 8, no. 1, January 2015 (2015-01), pages 68-76, XP002765097, ISSN: 1940-6215 abstract

YOON J-H ET AL.: "Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes", EMBO MOLECULAR MEDICINE 2013 WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD GBR, vol. 5, no. 11, November 2013 (2013-11), pages 1720-1739, XP002765098, ISSN: 1757-4676 abstract

S. L. TOPALIAN ET AL.: "Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 32, no. 10, 3 March 2014 (2014-03-03), pages 1020-1030, XP055218601, US ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2013.53.0105, the whole document

SUCHARD SUZANNE J ET AL.: "A monovalent anti-human CD28 domain antibody antagonist: preclinical efficacy and safety.", JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 NOV 2013, vol. 191, no. 9, 1 November 2013 (2013-11-01), pages 4599-4610, XP002765099, ISSN: 1550-6606, the whole document

KEMPF TIBOR ET AL.: "GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice.", NATURE MEDICINE MAY 2011, vol. 17, no. 5, May 2011 (2011-05), pages 581-588, XP002770366, ISSN: 1546-170X page 583, right-hand column page 586, left-hand column

(57) Изобретение относится к применению ингибиторов человеческого фактора роста и дифференцировки 15 (GDF-15), и к комбинированному применению таких ингибиторов с блокаторами контрольных точек иммунного ответа для лечения солидных злокачественных опухолей.

**044887
B1**

**044887
B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к применению ингибиторов человеческого фактора роста и дифференцировки 15 (GDF-15), и к комбинированному применению таких ингибиторов с блокаторами контрольных точек иммунного ответа при лечении солидных злокачественных опухолей.

Предшествующий уровень техники

В настоящее время многие злокачественные опухоли по-прежнему остаются областями неудовлетворенных медицинских потребностей, и, таким образом, необходимы способы для более эффективного лечения злокачественных опухолей.

Известно, что многие типы злокачественных опухолей экспрессируют факторы роста, в том числе такие факторы, как VEGF, PDGF, TGF- β и GDF-15.

GDF-15, фактор роста и дифференцировки-15, является отличающимся членом суперсемейства TGF- β . Это белок, который экспрессируется внутриклеточно в виде предшественника, затем процессируется и, наконец, секретируется из клетки в окружающую ее среду. Обе формы, активную, полностью процессированную, (зрелую) форму и предшественник GDF-15 можно найти вне клеток. Предшественник ковалентно связывается при помощи COOH-конца своей аминокислотной последовательности с внеклеточным матриксом (Bauskin AR et al., *Cancer Research* 2005) и, таким образом, располагается на внешней стороне клетки. Активная, полностью процессированная (зрелая) форма GDF-15 является растворимой и встречается в сыворотке крови. Таким образом, процессированная форма GDF-15 может потенциально воздействовать на любую клетку-мишень в организме, которая соединена с системным кровотоком, при условии, что потенциальная клетка-мишень экспрессирует рецептор для растворимого лиганда GDF-15.

Во время беременности, GDF-15 в физиологических условиях встречается в плаценте. Однако, многие злокачественные опухоли (особенно агрессивные злокачественные опухоли головного мозга, меланомы, рак легких, желудочно-кишечные опухоли, рак толстого кишечника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак молочной железы (Mimeault M и Vatra SK, *J. Cell Physiol* 2 010)) демонстрируют повышенные уровни GDF-15 в опухоли, а также в сыворотке крови. Также были описаны корреляции между высокой экспрессией GDF-15 и устойчивостью к химиотерапии (Huang CY et al., *Clin. Cancer Res.* 2009) и между высокой экспрессией GDF-15 и неблагоприятным прогнозом, соответственно (Brown DA et al., *Clin. Cancer Res.* 2009).

GDF-15 экспрессируется в глиомах различной степени дифференцировки по критериям ВОЗ при оценке при помощи иммуногистохимии (Roth et al., *Clin. Cancer Res.* 2010). Дополнительно, Roth et al. получили стабильно экспрессирующиеся конструкции ДНК, которые экспрессировали или короткошпилечную РНК, нацеленную на эндогенный GDF-15, или контрольные конструкции в клетках глиомы SMA560. При использовании этих заранее созданных стабильных клеточных линий они наблюдали, что образование опухолей у мышей с клетками SMA560 с нокаутом GDF-15 было замедлено по сравнению с мышами с контрольными конструкциями.

Патентные заявки WO 2005/099746 и WO 2009/021293 относятся к антителу к человеческому GDF-15 (Mab26), способному проявлять эффекты антагониста человеческого GDF-15 (hGDF-15) по отношению к потере массы, вызванной опухолью, у мышей *in vivo*. Аналогично, Johnen H et al. (*Nature Medicine*, 2007) описали воздействие моноклонального антитела к человеческому GDF-15 на анорексию и потерю массы, вызванные злокачественной опухолью, но не наблюдали никаких воздействий антитела к человеческому GDF-15 на размер опухоли, сформированной злокачественной опухолью.

WO 2014/049087 и PCT/EP2015/056654 относятся к моноклональным антителам к hGDF-15 и их применению в медицине.

Недавно разработанный подход к терапии злокачественных опухолей представляет собой применение блокаторов контрольных точек иммунного ответа, таких как ингибиторы человеческого PD-1 и ингибиторы человеческого PD-L1. Обоснованием использования этих блокаторов контрольных точек иммунного ответа является то, что при блокировании контрольных точек иммунного ответа, которые предотвращают нацеливание иммунной системы на антигены злокачественных опухолей и соответствующие злокачественные клетки, иммунный ответ на злокачественную опухоль может быть более эффективным. Хотя было показано, что блокаторы контрольных точек иммунного ответа, а также определенные сочетания блокаторов контрольных точек иммунного ответа улучшают выживаемость у пациентов с меланомой (Cully M, "Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy", *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Jun;14(6):374-5), не все пациенты с меланомой демонстрируют полный ответ, и еще не описаны результаты для многих других злокачественных опухолей, а также есть причины (например, такие как мутационная нагрузка), которые позволяют предположить, что результаты при других показаниях к применению будут менее благоприятными.

Таким образом, на сегодняшний день в данной области все еще существует потребность в способах для более эффективного лечения злокачественной опухоли. Более конкретно, все еще существует недостаток средств, которые можно использовать для более эффективной иммунотерапии злокачественных опухолей.

Описание изобретения

Настоящее изобретение удовлетворяет вышеуказанным потребностям и решает вышеуказанные проблемы в данной области, предоставляя варианты осуществления, описанные далее.

В частности, с целью выявления способов для эффективного лечения злокачественной опухоли, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что вероятность ответа на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа значительно снижается с увеличением уровней hGDF-15 в сыворотке пациента. Таким образом, по изобретению, можно использовать ингибитор hGDF-15 для ингибирования негативных воздействий hGDF-15 на ответы пациентов на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа, и для улучшения ответов пациентов на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа.

Неожиданно, авторы изобретения также обнаружили, что существует обратная корреляция hGDF-15 с процентным содержанием CD8⁺ Т-лимфоцитов в метастазах злокачественной опухоли. Это заслуживает внимания, поскольку присутствие CD8⁺ Т-лимфоцитов, в частности, необходимо для регрессии опухоли после ингибирования контрольной точки иммунного ответа антителом к PD-1. Таким образом, по изобретению, терапевтическое ингибирование hGDF-15 можно использовать для повышения процентного содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов в солидных злокачественных опухолях, в том числе в опухолевых метастазах. Это увеличение числа CD8⁺ Т-лимфоцитов в солидных злокачественных опухолях может быть благоприятно использовано для терапии, в частности, иммунотерапии, солидных злокачественных опухолей. Таким образом, в неограничивающем аспекте изобретения, в частности, благоприятная терапевтическая комбинация представляет собой комбинацию ингибитора hGDF-15 с блокатором контрольных точек иммунного ответа. Преимущественным эффектом этой комбинации является то, что ингибирование hGDF-15 будет повышать процентное содержание CD8⁺ Т-лимфоцитов в солидных злокачественных опухолях и, таким образом, приводить к синергическому терапевтическому эффекту с ингибированием контрольной точки иммунного ответа.

Чтобы дополнительно прояснить, как ингибиторы hGDF-15 могут повышать процентное содержание CD8⁺ Т-лимфоцитов в солидных злокачественных опухолях, авторы изобретения обнаружили, что hGDF-15 снижает адгезию Т-клеток к эндотелиальным клеткам. Таким образом, по изобретению, лечение ингибиторами hGDF-15 можно использовать для повышения адгезии Т-клеток, в том числе CD8⁺ Т-клеток, к эндотелиальным клеткам. Такое лечение по изобретению будет увеличивать проникновение CD8⁺ Т-клеток из кровотока в солидные злокачественные опухоли. Повышенное процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в солидных злокачественных опухолях, которое является результатом такого лечения ингибиторами hGDF-15, является выгодным и может использоваться для терапии злокачественных опухолей, например, иммунотерапии злокачественных опухолей. Поскольку проникновение CD8⁺ Т-клеток в солидные злокачественные опухоли и присутствие этих CD8⁺ Т-клеток в солидных злокачественных опухолях особенно благоприятно для терапевтического применения с использованием блокаторов контрольных точек иммунного ответа, особенно предпочтительным применением ингибиторов hGDF-15 по изобретению является их применение в комбинации с блокаторами контрольных точек иммунного ответа.

Таким образом, настоящее изобретение относится к улучшенным способам для терапии злокачественных опухолей, обеспечивая предпочтительные варианты осуществления, описанные далее:

1. Ингибитор hGDF-15 для применения в способе для повышения процентного содержания CD8⁺ Т-клеток в солидной злокачественной опухоли у пациента-человека, где ингибитор hGDF-15 предназначен для введения пациенту-человеку.

2. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 1, где пациент представляет собой пациента, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,2 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15, где пациент предпочтительно представляет собой пациента, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,5 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15, и где пациент более предпочтительно представляет собой пациента, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,8 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15.

3. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из пунктов от 1 до 2, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичек, рака яичников, рака эндометрия, рака шейки матки, рака головного мозга, рака молочной железы, рака желудка, почечноклеточной карциномы, саркомы Юинга, немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких, где злокачественная опухоль предпочтительно выбрана из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичек, рака яичников, рака эндометрия и рака шейки матки, и где злокачественная опухоль более предпочтительно выбрана из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака и рака желудка.

4. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из предшествующих пунктов, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из меланомы, плоскоклеточной карциномы полости рта, ко-

лоректального рака и рака предстательной железы.

5. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из предшествующих пунктов, где злокачественная опухоль является меланомой.

6. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из предшествующих пунктов, где ингибитор представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с hGDF-15, или его антигенсвязывающую часть.

7. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 6, где связывание представляет собой связывание с конформационным или прерывистым эпитопом на hGDF-15, и где конформационный или прерывистый эпитоп состоит из аминокислотных последовательностей SEQ ID No: 25 и SEQ ID No: 26.

8. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 6 или 7, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит переменный домен тяжелой цепи, который включает область CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, область CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и область CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит переменный домен легкой цепи, который включает область CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, область CDR2, содержащую аминокислотную последовательность ser-ala-ser, и область CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

9. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из пунктов от 1 до 5, где ингибитор представляет собой малую интерферирующую РНК или шпилечную конструкцию мРНК.

10. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из предшествующих пунктов, где способ представляет собой способ для лечения злокачественной опухоли.

11. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 10, где способ для лечения злокачественной опухоли представляет собой способ для лечения злокачественной опухоли путем иммунотерапии злокачественной опухоли.

12. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из предшествующих пунктов, где способ представляет собой способ для лечения метастазов злокачественной опухоли.

13. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из предшествующих пунктов, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание CD8⁺T-клеток в злокачественной опухоли за счет повышения адгезии CD8⁺T-клеток к эндотелиальным клеткам и, таким образом, повышения проникновения CD8⁺T-клеток из кровотока в злокачественную опухоль.

14. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из предшествующих пунктов, где применение представляет собой применение в комбинации с блокатором контрольных точек иммунного ответа.

15. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из предшествующих пунктов, где блокатор контрольных точек иммунного ответа выбран из одной или нескольких следующих групп, состоящих из:

i) ингибитора человеческого PD-1, ингибитор предпочтительно является моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью, способными связываться с человеческим PD-1; и

ii) ингибитора человеческого PD-L1, ингибитор предпочтительно является моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью, способными связываться с человеческим PD-L1.

16. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 15, где блокатор контрольных точек иммунного ответа включает моноклональное антитело, способное связываться с человеческим PD-1, или его антигенсвязывающую часть.

17. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 15 или 16, где блокатор контрольных точек иммунного ответа включает моноклональное антитело, способное связываться с человеческим PD-L1, или его антигенсвязывающую часть.

18. Композиция, которая содержит ингибитор hGDF-15 и блокатор контрольных точек иммунного ответа.

19. Композиция по пункту 18, где ингибитор hGDF-15 представляет собой ингибитор в соответствии с определением по любому из пунктов от 6 до 9.

20. Композиция по пункту 18 или 19, где блокатор контрольных точек иммунного ответа представляет собой блокатор в соответствии с определением по любому из пунктов от 15 до 17.

21. Композиция по любому из пунктов от 18 до 20 для применения в медицине.

22. Набор, который содержит ингибитор hGDF-15 и, по меньшей мере, один блокатор контрольных точек иммунного ответа.

23. Набор по пункту 22, где ингибитор hGDF-15 представляет собой ингибитор по любому из пунктов от 6 до 9.

24. Набор по пункту 22 или 23, где блокатор контрольных точек иммунного ответа представляет собой блокатор в соответствии с определением по любому из пунктов от 15 до 17.

25. Набор по любому из предшествующих пунктов, где ингибитор hGDF-15 и один, или несколько, или все из блокаторов контрольных точек иммунного ответа содержатся в отдельных контейнерах или в одном контейнере.

26. Набор или композиция для применения в медицине по любому из пунктов от 21 до 25 для применения в способе лечения солидной злокачественной опухоли.

27. Набор или композиция для применения в медицине по пункту 26, где способ представляет собой способ для иммунотерапии злокачественной опухоли.

28. Набор или композиция для применения в медицине по пункту 27, где злокачественная опухоль представляет собой опухоль в соответствии с определением по пункту 3, 4 или 5.

29. Ингибитор hGDF-15 для применения в способе лечения солидной злокачественной опухоли при помощи блокатора контрольных точек иммунного ответа у пациента-человека, где ингибитор hGDF-15 предназначен для введения пациенту-человеку.

30. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 29, где способ представляет собой способ для иммунотерапии злокачественной опухоли.

31. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 29 или 30, где пациент представляет собой пациента в соответствии с определением по пункту 2.

32. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из пунктов от 29 до 31, где злокачественная опухоль представляет собой опухоль в соответствии с определением по пункту 3, 4 или 5.

33. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из пунктов от 29 до 32, где ингибитор hGDF-15 представляет собой ингибитор в соответствии с определением по любому из пунктов от 6 до 9.

34. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из пунктов от 29 до 33, где блокатор контрольных точек иммунного ответа представляет собой блокатор в соответствии с определением по любому из пунктов от 15 до 17.

35. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из пунктов от 29 до 34, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание $CD8^+$ Т-клеток в злокачественной опухоли.

36. Ингибитор hGDF-15 для применения по пункту 35, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание $CD8^+$ Т-клеток в злокачественной опухоли за счет повышения адгезии $CD8^+$ Т-клеток к эндотелиальным клеткам или "прокатывания" $CD8^+$ Т-клеток на эндотелиальных клетках и, таким образом, повышения проникновения $CD8^+$ Т-клеток из кровотока в злокачественную опухоль.

37. Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения в способе лечения солидной злокачественной опухоли у пациента-человека, где ингибитор hGDF-15 и блокатор контрольных точек иммунного ответа предназначены для введения пациенту-человеку.

38. Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения по пункту 36, где способ представляет собой способ для иммунотерапии злокачественной опухоли.

39. Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения по любому из предшествующих пунктов, где пациент представляет собой пациента в соответствии с определением по пункту 2.

40. Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения по любому из предшествующих пунктов, где злокачественная опухоль представляет собой опухоль в соответствии с определением по пункту 3, 4 или 5.

41. Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения по любому из предшествующих пунктов, где ингибитор hGDF-15 представляет собой ингибитор в соответствии с определением по любому из пунктов от 6 до 9.

42. Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения по любому из предшествующих пунктов, где блокатор контрольных точек иммунного ответа представляет собой блокатор в соответствии с определением по любому из пунктов от 15 до 17.

43. Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения по любому из предшествующих пунктов, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание $CD8^+$ Т-клеток в злокачественной опухоли.

44. Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения по пункту 43, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание $CD8^+$ Т-клеток в злокачественной опухоли за счет повышения адгезии $CD8^+$ Т-клеток к эндотелиальным клеткам, и, таким образом, повышения проникновения $CD8^+$ Т-клеток из кровотока в злокачественную опухоль,

и где предпочтительно, указанное повышение адгезии $CD8^+$ Т-клеток к эндотелиальным клеткам повышает "прокатывание" $CD8^+$ Т-клеток на эндотелиальных клетках таким образом, что повышается указанное проникновение $CD8^+$ Т-клеток из кровотока в солидную злокачественную опухоль.

45. Способ *in vitro* для определения того, является ли вещество, представляющее интерес, ингибитором hGDF-15; способ, включающий:

а) активацию эндотелиальных клеток;

б) инкубацию первого образца, содержащего Т-клетки, в присутствии раствора, содержащего hGDF-15, и в присутствии вещества, представляющего интерес;

в) измерение адгезии эндотелиальных клеток, активированных на этапе а) к указанным Т-клеткам из указанного первого образца для получения первого результата измерения адгезии; и

д) на основании первого результата измерения адгезии на этапе в) определение того, является ли вещество, представляющее интерес, ингибитором hGDF-15.

46. Способ по пункту 45, где эндотелиальные клетки представляют собой эндотелиальные клетки пупочной вены человека.

47. Способ по любому из предшествующих пунктов, где эндотелиальные клетки представляют собой эндотелиальные клетки человека.

48. Способ по любому из предшествующих пунктов, где эндотелиальные клетки активированы посредством TNF- α и IFN- γ , и где на этапе активации, TNF- α и IFN- γ предпочтительно присутствуют в среде в конечной концентрации 5-20 нг/мл TNF- α и 5-20 нг/мл IFN- γ , более предпочтительно в среде в конечной концентрации 10 нг/мл TNF- α и 10 нг/мл IFN- γ .

49. Способ по любому из предшествующих пунктов, где вещество, представляющее интерес, является веществом, способным связываться с hGDF-15, предпочтительно антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, способным связываться с hGDF-15.

50. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на этапе с) указанные эндотелиальные клетки и указанные Т-клетки применяют в числовом соотношении от 1:2 до 2:1, предпочтительно в числовом соотношении 1:1.

51. Способ по любому из предшествующих пунктов, где во время этапа с) эндотелиальные клетки присутствуют на покрытой поверхности для культивирования клеток, предпочтительно на поверхности для культивирования клеток, покрытой фибронектином.

52. Способ по любому из предшествующих пунктов, где во время этапа с), hGDF-15 присутствует в концентрации от 50 до 200 нг/мл, предпочтительно в концентрации 100 нг/мл.

53. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на этапе с) адгезию измеряют путем подсчета числа "прокатывающихся" Т-клеток.

54. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на этапе с) адгезию измеряют путем подсчета числа "прикрепившихся" Т-клеток.

55. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на этапе с) адгезию измеряют путем измерения скорости "прокатывания" Т-клеток.

56. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на этапе d) вещество, представляющее интерес, определяют как ингибитор hGDF-15, если оно повышает указанную адгезию.

57. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на этапе d) вещество, представляющее интерес, определяют как не ингибитор hGDF-15, если оно не повышает указанную адгезию.

58. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на этапе b), второй образец инкубируют в присутствии указанного раствора, содержащего hGDF-15 и в отсутствие указанного вещества, представляющего интерес, при этом второй образец содержит Т-клетки,

где этап с) дополнительно содержит измерение адгезии эндотелиальных клеток, активированных на этапе a), к указанным Т-клеткам из указанного второго образца для получения второго результата измерения адгезии, и

где на этапе d), вещество, представляющее интерес, определяют как ингибитор hGDF-15, если указанный первый результат измерения адгезии повышен по сравнению с указанным вторым результатом измерения адгезии.

59. Способ по любому из предшествующих пунктов,

где на этапе b), третий образец инкубируют в отсутствие указанного раствора, содержащего hGDF-15 и в отсутствие указанного вещества, представляющего интерес, при этом третий образец содержит Т-клетки,

где этап с) дополнительно содержит измерение адгезии эндотелиальных клеток, активированных на этапе a), к указанным Т-клеткам из третьего образца для получения третьего результата измерения адгезии, и

где на этапе d), третий результат измерения адгезии применяют в качестве референтного результата измерения адгезии, указывающего на полное ингибирование hGDF-15.

60. Способ по любому из предшествующих пунктов, где Т-клетки представляют собой CD8⁺ Т-клетки.

61. Способ по любому из пунктов 45-59, где Т-клетки представляют собой пан-Т-клетки.

62. Способ по любому из предшествующих пунктов, где Т-клетки представляют собой человеческие Т-клетки.

63. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из пунктов 1-17, где применение представляет собой применение в комбинации с полиинозиновой:полицитидиловой кислотой, или комбинацию ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения по любому из пунктов 37-44, где комбинация представляет собой комбинацию с полиинозиновой:полицитидиловой кислотой.

64. Ингибитор hGDF-15 для применения по любому из пунктов 1-17 и 63, где применение представляет собой применение в комбинации с антителом к человеческому CD40, предпочтительно моноклональным антителом к человеческому CD40, или комбинацию для применения по любому из пунктов

37-44 и 63, где комбинация представляет собой комбинацию с антителом к человеческому CD40, предпочтительно моноклональным антителом к человеческому CD40.

65. Комбинация ингибитора hGDF-15 и любого одного из следующих:

а) полиинозиновая:полицитидиловая кислота;

б) антитело к человеческому CD40, предпочтительно моноклональное антитело к человеческому CD40; или

с) полиинозиновая:полицитидиловая кислота и антитело к человеческому CD40, предпочтительно моноклональное антитело к человеческому CD40,

для применения в способе лечения солидной злокачественной опухоли у пациента-человека, где комбинация необязательно включает блокатор контрольных точек иммунного ответа.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Эта фигура показывает сывороточные уровни GDF-15 для пациентов, ответивших и не ответивших на схему лечения.

Фиг. 2. Эта фигура показывает число ответивших и не ответивших на лечение в группах пациентов с сывороточными уровнями hGDF-15 <1,8 нг/мл, 1,8-4,2 нг/мл, и >4,2 нг/мл, соответственно.

Фиг. 3. Вероятность ответа на лечение (ответивший на лечение 1), предсказанная обобщенной линейной моделью с использованием GDF-15 в качестве непрерывного предиктора. Круги показывают данные, кривая показывает модель. Вертикальная линия указывает на концентрацию GDF-15, где вероятность ответа на лечение составляет 0,5.

Фиг. 4. Кривые Каплана-Мейера для выживаемости в трех группах, определенных по сывороточному уровню GDF-15 (<1,8, 1,8-4,2, >4,2 нг/мл).

Фиг. 5: фиг. 5A. Вероятность ответа на лечение (ответивший на лечение 1), предсказанная обобщенной линейной моделью с использованием ЛДГ в качестве непрерывного предиктора. Круги показывают данные, кривая показывает модель. Вертикальная линия указывает на концентрацию ЛДГ, где вероятность ответа на лечение составляет 0,5. Когорта пациентов была идентичной. Однако не удалось надежно определить уровни ЛДГ у четырех пациентов из-за гемолиза. Фиг. 5B. Графическое представление пациентов, отвечающих и не отвечающих на лечение, и их соответствующие уровни hGDF-15 и ЛДГ. Когда пороговые значения были выбраны для того чтобы включать всех отвечающих на лечение, тестирование на основании GDF-15 позволило выявить 6 (из 9) не отвечающих на лечение, в то время как анализ на основе уровней ЛДГ может выявить только 4 (из 9) не отвечающих на лечение. Для тестирования ЛДГ, 4 гемолитических образца были исключены, что вызвало потерю данных.

Фиг. 6. Эта фигура показывает примеры тканевых срезов из метастазов меланомы в головной мозг без иммунореактивности (верхняя панель) или с высокой иммунореактивностью (нижняя панель) GDF-15, которые окрашивали при помощи иммуногистохимии для GDF-15 и для маркерных белков Т-клеток CD3 и CD8, соответственно, как показано на фигуре. CD3- и CD8-положительные клетки показаны стрелками в образцах с высоким GDF-15. Окрашивания CD3 и CD8 производили из той же самой области серийных срезов (однако не из идентичного среза).

Фиг. 7. Эта фигура показывает график процентного содержания CD3⁺ клеток по сравнению с оценкой GDF-15 в различных метастазах меланомы в головной мозг (7A) и график процентного содержания CD8⁺ клеток по сравнению с оценкой GDF-15 в различных метастазах меланомы в головной мозг (7B).

Фиг. 8. Эта фигура показывает график оценки GDF-15 по сравнению с процентным содержанием CD8⁺ и CD3⁺ Т-клеток, соответственно, в метастазах в головном мозге из различных опухолей (меланома, колоректальный рак (CRC), почечноклеточная карцинома (RCC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) и мелкоклеточный рак легкого (SCLC)).

Фиг. 9. Фиг. 9A показывает число "кающихся" Т-клеток на поле зрения в су. Данные получали из канала # 3 ("GDF-15") и канала #2 ("контроль"). Фиг. 9B показывает скорость качения Т-клеток (измеренную в пикселях за 0,2 сы). Данные получали из канала # 3 ("GDF-15") и канала #2 ("контроль"). Фиг. 9C показывает число прикрепленных клеток в поле зрения. Данные получали из канала # 3 ("GDF-15") и канала #2 ("контроль"). Фиг. 9D показывает число прикрепленных клеток в поле зрения. Данные получали из канала # 3 ("GDF-15") и канала #2 ("контроль").

Фиг. 10. Фиг. 10A показывает число "кающихся" Т-клеток в поле зрения в су. Данные получали из канала # 1 (контрольные Т-клетки на нестимулированных HUVEC в качестве "отрицательного контроля"), канала # 2 (контрольные Т-клетки на стимулированных HUVEC в качестве "положительного контроля"), канала # 3 ("GDF-15"), канала # 4 ("UACC 257": Т-клетки, культивируемые в супернатанте клеток меланомы UACC 257, содержащем секретиремый GDF-15) и канала # 5 ("UACC257+анти-hGDF-15": Т-клетки, культивируемые в супернатанте клеток меланомы UACC 257, очищенном от секретиремого GDF-15 при помощи антитела к hGDF-15 B1-23 в качестве ингибитора hGDF-15). Фиг. 10B. Анализ потока/адгезии проводили, как описано в примере 3. Т-клетки предварительно инкубировали с 100 нг/мл GDF-15 в течение 1 ч или с 100 нг/мл GDF-15, который был предварительно инкубирован с 10 мкг/мл антитела в течение 1 ч, как указано. Применяли следующие антитела к GDF-15: H1L5 (Гуманизированное B1-23), 01G06 и 03G05 (Гуманизированные антитела к GDF-15, сконструированные с соответствием с последовательностями из WO 2014/100689). Результаты показаны на фигуре, которая изображает число

"котящихся" клеток в поле зрения за 20 с.

Фиг. 11. Мышам C57BL/6J подкожно вводили 2×10^5 клеток толстой кишки MC38^{tghGDF-15}. Лечение антителом к GDF-15 (20 мг/кг of масса тела) начинали на сутки 0 и повторяли на сутки 3, 7, 10, 14, 17 и 21. На сутки 13, у животных с опухолями примерно одинакового размера (100-150 мм³) либо лечили, либо не лечили Поли-ICLC (также сокращается как "Поли-IC") и антителом к CD40. Мыши, у которых не развились ранее пересаженные опухоли, находились под наблюдением в течение 57 суток. Мышей с опухолями умерщвляли в соответствии с критериями гуманного обращения с животными.

Фиг. 12. Суммарная выживаемость в группах пациентов с уровнями GDF-15 <1,5 нг/мл и >1,5 нг/мл, соответственно.

Фиг. 13. Суммарная выживаемость в группах пациентов с высокими уровнями GDF-15 (т.е. 50 пациентов с наиболее высокими уровнями GDF-15) и низкими уровнями GDF-15 (т.е. 49 пациентов с наиболее низкими уровнями GDF-15), соответственно (разделение медианы общей когорты исследования).

Фиг. 14. Сывороточные уровни hGDF-15 не коррелируют значимо с мутационной нагрузкой опухолей.

Уровни мРНК hGDF-15 в образцах от пациентов со злокачественными опухолями нанесли на график вместе с числом соматических мутаций, которые были выявлены в злокачественных опухолях. Соматические мутации определяли путем секвенирования экзонов. Данные анализировали с использованием веб-приложения UZH от Университетского госпиталя Цюриха (Cheng PF et al. : Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly*. 2015 Sep 16;145:w14183). Фиг. 14А показывает график данных пациентов со злокачественной опухолью, полученными из Атласа ракового генома (TCGA), учитывая только пациентов с высокодифференцированной злокачественной меланомой (Атлас ракового генома описан в ссылке Cheng PF et al. : Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly*. 2015 Sep 16;145:w14183). Экспрессию GDF-15 оценивали путем нормализации с использованием пакета программного обеспечения RSEM ("RNA-Seq путем максимизации ожидания") (Li B и 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.). Фиг. 14В показывает график данных пациентов со злокачественной опухолью от 40 дополнительных пациентов с метастатической злокачественной меланомой из Университетского госпиталя Цюриха, которых анализировали отдельно.

Фиг. 15. Показаны изображения для иммуногистохимии для CD8a у мышей, несущих опухоли дикого типа или опухоли со сверхэкспрессией трансгенного (tg) hGDF15. Тканевые срезы окрашивали антителом к CD8a (разведение 1:100; антитело 4SM15, приобретенное у eBioscience).

Подробное описание изобретения

Определения и общие способы.

Если далее не определено иначе, термины, используемые в настоящем изобретении, следует понимать в соответствии с их обычным значением, известным специалисту в данной области.

Как применяют в настоящем документе термин "антитело" относится к любому функциональному антителу, которое способно к специфическому связыванию с антигеном, представляющим, как, в основном, изложено в главе 7 в Paul, W.E. (Ed.): *Fundamental Immunology* 2nd Ed. Raven Press, Ltd., New York 1989, включенной в настоящий документ в качестве ссылки. Без конкретного ограничения, термин "антитело" включает в себя антитела из любых подходящих видов-источников, включая курицу и млекопитающее, такое как мышь, коза, не являющийся человеком примат и человек. Предпочтительно, антитело представляет собой гуманизированное антитело. Антитело предпочтительно представляет собой моноклональное антитело, которое можно получать способами, хорошо известными в данной области. Термин "антитело" включает в себя изотипы антитела IgG-1, -2, -3, или -4, IgE, IgA, IgM или IgD. Термин "антитело" включает в себя мономерные антитела (такие как IgD, IgE, IgG) или олигомерные антитела (такие как IgA или IgM). Термин "антитело" также включает в себя, без конкретных ограничений, выделенные антитела и модифицированные антитела, такие как генетически сконструированные антитела, например, химерные антитела.

Номенклатура доменов антител придерживается терминов, известных в данной области. Каждый мономер антитела содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, как, в основном, известно в данной области. Каждая из этих легкой и тяжелой цепи содержит вариабельный домен (обозначаемый V_H для тяжелой цепи и V_L для легкой цепи), который важен для связывания с антигеном. Эти вариабельные домены легких и тяжелых цепей содержат (в направлении от N-конца к C-концу) области FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4 (FR, каркасная область; CDR, определяющая комплементарность область, которая также известна как гипервариабельная область). Идентификация и обозначение вышеуказанных областей антител в пределах последовательности антитела происходит, в основном, при помощи Kabat et al. (*Sequences of proteins of immunological interest*, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983), или Chothia et al. (*Conformations of immunoglobulin hypervariable regions*. *Nature*. 1989 Dec 21-28;342(6252):877-83) или ее можно проводить с использованием программного обеспечения IMGT/V-QUEST, описанного в Giudicelli et al. (IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nu-

cleic Acids Res. 2004 Jul 1;32 (Web Server issue):W435-40), включенной в настоящий документ в качестве ссылки. Предпочтительно, вышеуказанные области антител выявлены и обозначены с использованием программного обеспечения IMG/V-QUEST.

"Моноклональное антитело" представляет собой антитело из популяции антител, которая является по существу гомогенной, где антитела по существу идентичны по последовательности (т.е. идентичны за исключением небольшой фракции антител, содержащих модификации природной последовательности, такие как аминокислотные модификации на N- и C-концах). В отличие от поликлональных антител, которые содержат смесь различных антител, направленных на множество эпитопов, моноклональные антитела направлены на один и тот же эпитоп и, таким образом, являются высокоспецифичными. Термин "моноклональное антитело" включает (в качестве неограничивающих примеров) антитела, которые получают из моноклональной клеточной популяции, полученной из клона одной клетки, как, например, антитела, полученные гибридомным способом generated, описанным в Kohler и Milstein (Nature, 1975 Aug 7;256(5517):495-7) или Harlow и Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988). Моноклональное антитело можно также получать любыми другими подходящими способами, включая способы фагового дисплея, такие как описанные в Clackson et al. (Nature. 1991 Aug 15; 352 (6336) : 624-8) или Marks et al. (J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222 (3) : 581-97). Моноклональное антитело может быть антителом, которое было оптимизировано известными в данной области способами по антигенсвязывающим свойствам, таким как сниженные величины Kd, оптимизированные кинетики ассоциации и диссоциации. Например, значения Kd можно оптимизировать при помощи способов дисплея, в том числе фагового дисплея, с получением аффинно зрелых моноклональных антител. Термин "моноклональное антитело" не ограничен последовательностями антитела из конкретного вида происхождения или из одного вида происхождения. Таким образом, значение термина "моноклональное антитело" включает химерные моноклональные антитела, такие как гуманизированные моноклональные антитела.

"Гуманизированные антитела" представляют собой антитела, которые содержат человеческие последовательности и и небольшую часть последовательностей, не принадлежащих человеку, которые придают специфичность связывания к антигену, представляющему интерес (например, человеческому GDF-15). Как правило, гуманизированные антитела получают путем замещения последовательностей гипервариабельной области из акцепторного антитела человека последовательностями гипервариабельной области из не принадлежащего человеку донорного антитела (например, донорного антитела мыши, кролика, крысы), которые связываются с антигеном, представляющим интерес (например, человеческим GDF-15). В некоторых случаях, последовательности каркасной области акцепторного антитела можно также замещать соответствующими последовательностями донорного антитела. В дополнение к последовательностям, полученным из донорного и акцепторного антител, "гуманизированное антитело" может также содержать или не содержать другие (дополнительные или замещающие) остатки или последовательности. Такие другие остатки или последовательности могут служить для дополнительного улучшения свойств антитела, таких как связывающие свойства (например, для снижения величины Kd) и/или иммуногенные свойства (например, для снижения антигенности у людей). Неограничивающие примеры способов получения гуманизированных антител известны в данной области, например, из Riechmann et al. (Nature. 1988 Mar 24; 332 (6162):323-7) или Jones et al. (Nature. 1986 May 29-Jun 4; 321 (6069):522-5).

Термин "антитело человека" относится к антителу, содержащему человеческие последовательности вариабельного и константного доменов. Это определение включает в себя антитела с человеческими последовательностями, несущими единичные замены аминокислот или модификации, которые могут служить для дополнительного улучшения свойств антитела, таких как связывающие свойства (например, для снижения величин Kd) и/или иммуногенные свойства (например, для снижения антигенности у людей). Термин "антитело человека" не включает гуманизированные антитела, в которых часть последовательностей, не принадлежащих человеку, придает специфичность связывания с интересующим антигеном.

"Антигенсвязывающая часть" антитела, как применяют в настоящем документе, относится к части антитела, которая сохраняет способность антитела специфически связываться с антигеном (например, hGDF-15, PD-1 или PD-L1). Эту способность можно определять, например, при помощи известных в данной области способов путем определения способности антигенсвязывающей части конкурировать с антителом за специфическое связывание с антигеном. Антигенсвязывающая часть может содержать один или несколько фрагментов антитела. Без конкретного ограничения, антигенсвязывающую часть можно получать любым подходящим известным в данной области способом, включая способы рекомбинантной ДНК и получение путем химической или ферментативной фрагментации антител. Антигенсвязывающие части могут представлять собой Fab-фрагменты, F(ab')⁻фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, одноцепочечные антитела (scFv), однодоменные антитела, диатела или любую другую часть/части антитела, которые сохраняют способность антитела специфически связываться с антигеном.

"Антитело" (например, моноклональное антитело) или "антигенсвязывающая часть" могут быть производными другой молекулы или связаны с другой молекулой. Например, молекулы, которые могут быть связаны с антителом, представляют собой другие белки (например, другие антитела), молекуляр-

ную метку (например, флуоресцентную, люминисцентную, окрашенную или радиоактивную молекулу), фармацевтический и/или токсичный агент. Антитело или антигенсвязывающая часть может быть связана напрямую (например, в форме слияния между двумя белками), или через линкерную молекулу (например, любой подходящий тип химического линкера, известный в данной области).

Как применяют в настоящем документе, термины "связывание" или "связываться" относятся к специфическому связыванию с антигеном, представляющим интерес (например, человеческим GDF-15). Предпочтительно, величина K_d составляет менее чем 100 нМ, более предпочтительно менее чем 50 нМ, еще более предпочтительно менее чем 10 нМ, еще более предпочтительно менее чем 5 нМ и наиболее предпочтительно менее чем 2 нМ.

Как применяют в настоящем документе, антитело или его антигенсвязывающая часть, которое "способно конкурировать" со вторым антителом, способным связываться с человеческим GDF-15, означает, что указанное (первое) антитело или его антигенсвязывающая часть, которое "способно конкурировать", способно снизить связывание 10 нМ референсного раствора второго антитела с человеческим или рекомбинантным человеческим GDF-15 на 50%. В основном, "способно конкурировать" означает, что концентрация (первого) антитела или его антигенсвязывающей части, которая необходима для того чтобы уменьшить связывание 10 нМ референсного раствора второго антитела с человеческим или рекомбинантным человеческим GDF-15 на 50%, составляет менее чем 1000 нМ, предпочтительно менее чем 100 нМ и более предпочтительно менее чем 10 нМ. Связывание измеряют при помощи измерений поверхностного плазмонного резонанса или при помощи измерений твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA), предпочтительно при помощи измерений поверхностного плазмонного резонанса.

Как применяют в настоящем документе термин "эпитоп" относится к небольшой части антигена, которая образует участок связывания для антитела.

В контексте настоящего изобретения, связывание или конкурентное связывание антител или их антигенсвязывающих частей с антигеном, представляющим интерес (например, человеческим GDF-15), предпочтительно измеряют с использованием измерений поверхностного плазмонного резонанса в качестве референсного стандартного анализа, как описано ниже.

Термины " K_D " или "величина K_D " относятся к равновесной константе диссоциации, известной в данной области. В контексте настоящего изобретения, эти термины относятся к равновесной константе диссоциации антитела в отношении конкретного антигена, представляющего интерес (например, человеческого GDF-15).

Равновесная константа диссоциации является мерой склонности комплекса (например, комплекса антиген-антитело) к обратимой диссоциации на его компоненты (например, антиген и антитело). Для антител по изобретению, значения K_D (такие, как значения для антигена человеческого GDF-15) предпочтительно определяют с использованием измерений поверхностного плазмонного резонанса, как описано ниже.

"Выделенное антитело", как применяют в настоящем документе, представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено от большинства компонентов (по массе) его исходного окружения, например, от компонентов клеточной культуры гибридомы или другой клеточной культуры, которую применяли для его выработки (например, клетки-продуценты, такие как клетки CHO, которые экспрессируют антитело рекомбинантным образом). Выделение проводят таким образом, что оно в достаточной мере удаляет компоненты, которые в ином случае могли бы препятствовать пригодности антитела для желаемых применений (например, терапевтического применения антитела по изобретению против человеческого GDF-15). Способы для получения выделенных антител известны в данной области и включают хроматографию с белком А, анионообменную хроматографию, катионообменную хроматографию, фильтрацию с удержанием вирусов и ультрафильтрацию. Предпочтительно, препарат выделенного антитела имеет, по меньшей мере, 70% чистоты (мас./мас.), более предпочтительно, по меньшей мере, 80% чистоты (мас./мас.), еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90% чистоты (мас./мас.), еще более предпочтительно, по меньшей мере, 95% чистоты (мас./мас.), и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99% чистоты (мас./мас.), при измерении с использованием анализа белков по Лоури.

"Диатело", как применяют в настоящем документе, представляет собой небольшую бивалентную антигенсвязывающую часть антитела, которая содержит варибельный домен тяжелой цепи, связанный с варибельным доменом легкой цепи на той же самой полипептидной цепи, соединенные пептидным линкером, который слишком короткий, чтобы позволять соединение между двумя доменами той же самой цепи. Это в результате приводит к соединению комплементарных доменов с другой цепи и к сборке димерной молекулы с двумя антигенсвязывающими участками. Диатела могут быть бивалентными и моноспецифическими (такими как диатела с двумя антигенсвязывающими участками для человеческого GDF-15), или могут быть бивалентными и биспецифическими (например, диатела с двумя антигенсвязывающими участками, одним участком связывания для человеческого GDF-15, и другим участком связывания для другого антигена). Подробное описание диател можно найти в Holliger P et al. ("Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments." Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Jul 15;90(14):6444-8).

"Однодоменное антитело" (которое также обозначают как "NanobodyTM"), как применяют в настоящем документе, представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного варибельно-

го домена антитела. Структуры однодоменных антител и способы для получения однодоменных антител известны в данной области, например, из Holt LJ et al. ("Domain antibodies: proteins for therapy." Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11):484-90.), Saerens D et al. ("Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics." Curr Opin Pharmacol. 2008 Oct; 8 (5) : 600-8. Epub 2008 Aug 22.) и Arbabi Ghahroudi M et al. ("Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies." FEBS Lett. 1997 Sep 15; 414(3):521-6).

Термины "злокачественная опухоль" и "злокачественная клетка" применяют в настоящем документе в соответствии с их обычным значением в данной области (см., например, Weinberg R. et al. : The Biology of Cancer. Garland Science: New York 2006. 850p).

Злокачественные опухоли для лечения по настоящему изобретению представляют собой солидные злокачественные опухоли. "Солидная злокачественная опухоль" представляет собой злокачественную опухоль, которая формирует одну или несколько солидных опухолей. Такие солидные злокачественные опухоли, образующие солидные опухоли, в основном, известны в данной области. Термин "солидная злокачественная опухоль" включает в себя и первичную опухоль, сформированную злокачественной опухолью, и возможные вторичные опухоли, которые также известны как метастазы. Предпочтительные солидные злокачественные опухоли для лечения по изобретению выбраны из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичек, рака яичников, рака эндометрия, рака шейки матки, рака головного мозга, рака молочной железы, рака желудка, почечноклеточной карциномы, саркомы Юинга, немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких, предпочтительно выбраны из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичек, рака яичников, рака эндометрия и рака шейки матки, более предпочтительно выбраны из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака и рака желудка, и наиболее предпочтительно выбраны из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака и рака предстательной железы.

Как упоминают в настоящем документе, термин "рак головного мозга" относится ко всем злокачественным опухолям головного мозга, известным в данной области. В качестве неограничивающих примеров термин включает глиому (дифференцированность по ВОЗ от I до IV), астроцитому, менингиому и медуллобластому.

Как упоминается в настоящем документе, термин "рак головы и шеи" относится ко всем ракам головы и шеи, известным в данной области. В качестве неограничивающих примеров термин включает карциному пищевода, плоскоклеточную карциному полости рта и гипофарингеальный рак. Особенно предпочтительный рак головы и шеи для лечения по изобретению представляет собой плоскоклеточную карциному полости рта.

Как применяют в настоящем документе термин "рост злокачественной опухоли" относится к любому измеримому росту злокачественной опухоли. Для злокачественных опухолей, формирующих солидные опухоли, "рост злокачественной опухоли" относится к измеримому увеличению объема опухоли с течением времени. Если злокачественная опухоль образует только одну опухоль, "рост злокачественной опухоли" относится только к увеличению объема одной опухоли. Если злокачественная опухоль формирует множественные опухоли, такие как метастазы, "рост злокачественной опухоли" относится к увеличению объема всех измеримых опухолей. Для солидных опухолей, объем опухоли можно измерять любым известным в данной области способом, включая магнитно-резонансную визуализацию и компьютерную томографию (КТ-сканирование).

Термины, такие как "лечение злокачественной опухоли" или "лечить злокачественную опухоль" по настоящему изобретению относятся к терапевтическому лечению. Оценку того, работает ли терапевтическое лечение или нет, можно, например, производить путем оценки того, ингибирует ли лечение рост злокачественной опухоли у пациента или пациентов, которых лечат.

Предпочтительно, ингибирование является статистически значимым по оценке с помощью подходящих статистических тестов, которые известны в данной области. Ингибирование роста злокачественной опухоли можно оценивать, сравнивая рост злокачественной опухоли в группе пациентов, которых лечат в соответствии с настоящим изобретением, с контрольной группой нелеченных пациентов, или сравнивая группу пациентов, которая получала стандартное лечение злокачественных опухолей, принятое в данной области, плюс лечение по изобретению, с контрольной группой пациентов, которая получала только стандартное лечение злокачественных опухолей, принятое в данной области. Такие исследования по оценке ингибирования роста злокачественных опухолей разрабатывают в соответствии с принятыми стандартами для клинических исследований, например, двойных слепых, рандомизированных исследований с достаточной статистической мощностью. Термин "лечение злокачественной опухоли" включает ингибирование роста злокачественной опухоли, когда рост злокачественной опухоли ингибируется частично (т.е. когда рост злокачественной опухоли у пациента замедляется по сравнению с контрольной группой пациентов), ингибирование, когда рост злокачественной опухоли ингибируется полностью (т.е. когда рост злокачественной опухоли у пациента останавливается), и ингибирование, когда рост

злокачественной опухоли является обратимым (т.е. злокачественная опухоль уменьшается в объеме). Предпочтительно, оценку того, работает ли терапевтическое лечение или нет, можно проводить на основании классификации на отвечающих и не отвечающих на лечение с использованием критериев оценки ответа при солидных опухолях, версия 1.1 (RECIST v1.1) (Eisenhauer et al.: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: Eur. J. Cancer. 45, No. 2, January 2009, pp. 228-47). Альтернативно, или дополнительно, оценку того, работает ли терапевтическое лечение или нет, можно проводить на основании известных клинических показателей прогрессирования злокачественных опухолей.

Лечение злокачественной опухоли по изобретению может быть терапией первой линии, терапией второй линии или терапией третьей линии, или терапией после терапии третьей. Значение этих терминов известно в данной области и находится в соответствии с терминологией, которая широко используется Национальным институтом рака США.

Лечение злокачественной опухоли по настоящему изобретению не исключает также возникновения у пациентов дополнительных или вторичных терапевтических выгод. Например, дополнительной или вторичной выгодой может быть воздействие на потерю массы, индуцированную злокачественной опухолью. Однако следует понимать, что первичное лечение, за чьей защитой обращаются, предназначено для лечения злокачественной опухоли самой по себе, любые вторичные или дополнительные эффекты только отражают необязательные дополнительные преимущества лечения роста злокачественной опухоли.

Термин "иммунотерапия злокачественной опухоли" известен в данной области и, в основном, относится к лечению злокачественной опухоли, при котором используют иммунную систему пациента для лечения злокачественной опухоли. Злокачественные клетки несут геномные мутации, которые приводят к образованию антигенов злокачественных клеток, которые являются специфичными для злокачественных клеток и отличаются от антигенов незлокачественных клеток. Таким образом, в предпочтительном аспекте иммунотерапии злокачественной опухоли в соответствии с настоящим изобретением, иммунотерапия злокачественной опухоли представляет собой иммунотерапию злокачественной опухоли, где такие антигены злокачественных клеток распознаются иммунной системой, и где злокачественные клетки, экспрессирующие эти антигены, уничтожаются иммунной системой. В неограничивающем аспекте изобретения, такие злокачественные клетки, экспрессирующие эти антигены злокачественных клеток, могут уничтожаться CD8⁺ Т-клетками иммунной системы. Иммунотерапию злокачественной опухоли можно оценивать путем иммуномониторинга известными в данной области способами, например, измеряя внутриклеточную экспрессию IFN- γ (например, в CD8⁺ Т-клетках и/или NK-клетках) в образцах крови, измеряя экспрессию CD107a на клеточной поверхности (например, CD8⁺ Т-клеток и/или NK-клеток) в образцах крови, измеряя внутриклеточную экспрессию TNF- α (например, на лейкоцитах) в образцах крови, внутриклеточную экспрессию интерлейкина-2 (например, в CD8⁺ Т-клетках и/или в CD4⁺ Т-клетках) в образцах крови, экспрессию CD154 на клеточной поверхности (например, на CD8⁺ Т-клетках и/или на CD4⁺ Т-клетках) в образцах крови, окрашивая тетрамеры или декстрамеры для Т-клеток, специфических для опухолевых антигенов, в образцах крови, по активности ЦТЛ против аутологичных опухолевых клеток или по присутствию Т-клеток против опухолевых антигенов, полученных из опухолеспецифичных мутаций. Предпочтительными способами для оценки иммунотерапии злокачественной опухоли являются способы в соответствии с Gouttefangeas C et al. : "Flow Cytometry in Cancer Immunotherapy: Applications, Quality Assurance and Future." (2015) In: Cancer Immunology: Translational Medicine from Bench to Bedside (N. Rezaei editor). Springer. Chapter 25: pages 471-486; и способы, согласно 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.

Как применяют в настоящем документе, "иммунотерапия злокачественной опухоли" необязательно включает в себя лечение, при котором в дополнение к иммунной системе, которую используют для лечения злокачественной опухоли, применяют дополнительные механизмы лечения злокачественных опухолей. Например, ранее было показано, что ингибитор hGDF-15 можно использовать для лечения злокачественных опухолей на мышинной модельной системе, у которой иммунная система была значительно ослаблена (WO 2014/049087). Таким образом, по настоящему изобретению, иммунотерапия злокачественной опухоли ингибиторами hGDF-15 у пациентов-людей может также включать в себя дополнительные эффекты лечения ингибиторами hGDF-15, которые независимы от иммунной системы. Другим примером иммунотерапии злокачественной опухоли, где можно использовать дополнительные механизмы лечения злокачественных опухолей, является комбинированное лечение с известным химиотерапевтическим средством/средствами. Такое комбинированное лечение с известным химиотерапевтическим средством/средствами может, например, не только включать лечение злокачественной опухоли, при котором используют иммунную систему для лечения злокачественной опухоли, но может также включать лечение злокачественной опухоли, при котором злокачественные клетки непосредственно уничтожаются указанным химиотерапевтическим средством/средствами.

Как применяют в настоящем документе, термин "повышение процентного содержания CD8⁺ Т-

клеток в солидной злокачественной опухоли" относится к любому измеримому повышению в процентном содержании CD8⁺ Т-клеток (т.е. процентному содержанию CD8⁺ Т-клеток, рассчитанному в отношении всех клеток) в опухоли или опухолях, образованных солидной злокачественной опухолью. Предпочтительно, повышение является статистически значимым по оценке подходящими статистическими тестами, которые известны в данной области. Повышение процентного содержания CD8⁺ Т-клеток в опухоли или опухолях, образованных солидной злокачественной опухолью, можно определять известными способами для анализа CD8⁺ Т-клеток в солидных опухолях. Такие способы включают анализ биоптатов опухоли на CD8⁺ Т-клетки, например, анализ таких опухолевых биоптатов путем иммуногистохимии с использованием антител против CD8 и использование окрашивания для общего числа клеток. Повышение можно оценивать, сравнивая процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в опухолях в группе пациентов, которых лечили в соответствии с настоящим изобретением, с контрольной группой нелеченных пациентов или сравнивая группу пациентов, которая получала стандартное лечение злокачественных опухолей, принятое в данной области, плюс лечение по изобретению, с контрольной группой пациентов, которая получала только стандартное лечение злокачественных опухолей, принятое в данной области.

Как применяют в настоящем документе, "CD8⁺ Т-клетки" предпочтительно являются клетками, которые эндогенно встречаются у пациента-человека.

Сывороточные уровни hGDF-15 можно измерять любыми известными в данной области способами. Например, предпочтительным способом измерения сывороточных уровней hGDF-15 является измерение сывороточных уровней hGDF-15 путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием антител к GDF-15. Такие способы ELISA представлены в примере 1. Альтернативно, сывороточные уровни hGDF-15 можно определять известными иммунологическими анализами с электрохемилюминисценцией с использованием антител к GDF-15. Например, можно использовать технологию Roche Elecsys® для таких иммунологических анализов с электрохемилюминисценцией.

Пациент для лечения по изобретению предпочтительно является пациентом с повышенными сывороточными уровнями hGDF-15. Как применяют в настоящем документе термин "повышенные сывороточные уровни hGDF-15" означает, что пациент-человек имеет более высокие уровни hGDF-15 в сыворотке крови до введения ингибитора hGDF-15 по изобретению, по сравнению со средними уровнями hGDF-15 в сыворотке крови у контрольных здоровых человеческих индивидуумов в качестве референса.

Средний уровень в сыворотке hGDF-15 у контрольных здоровых человеческих индивидуумов составляет <0,8 нг/мл. Ожидаемый диапазон находится в пределах от 0,2 нг/мл до 1,2 нг/мл у здорового человеческого контроля (ссылка: Tanno T et al.: "Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease" *Curr Opin Hematol.* 2010 May; 17(3): 184-190).

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения, пациент для лечения по изобретению является пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,2 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15, предпочтительно, пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,5 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15, и более предпочтительно, пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,8 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления изобретения, пациент для лечения по изобретению является пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,2 нг/мл и не более чем 12 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15, предпочтительно, пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,5 нг/мл и не более чем 12 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15, и более предпочтительно, пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,8 нг/мл и не более чем 12 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15.

В дополнительном варианте осуществления изобретения в соответствии со всеми вышеописанными вариантами осуществления, пациент для лечения по изобретению является пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,2 нг/мл и не более чем 10 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15, предпочтительно, пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,5 нг/мл и не более чем 10 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15, и более предпочтительно, пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,8 нг/мл и не более чем 10 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15.

В дополнительном варианте осуществления изобретения в соответствии со всеми вышеописанными вариантами осуществления, пациент для лечения по изобретению является пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,2 нг/мл и не более чем 8 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15, предпочтительно, пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,5 нг/мл и не более чем 8 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15, и более предпочтительно, пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,8 нг/мл и не более чем 8 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15.

В другом варианте осуществления пациент для лечения по изобретению является пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 2 нг/мл, по меньшей мере, 2,2 нг/мл, по меньшей мере, 2,4 нг/мл, по меньшей мере, 2,6 нг/мл, по меньшей мере, 2,8 нг/мл, по меньшей мере, 3,0 нг/мл, по меньшей мере, 3,2 нг/мл, по меньшей мере, 3,4 нг/мл, по меньшей мере, 3,6 нг/мл, по меньшей мере,

мере, 3,8 нг/мл, по меньшей мере, 4,0 нг/мл, или, по меньшей мере, 4,2 нг/ до начала введения ингибитора hGDF-15. В этом варианте осуществления пациент предпочтительно является пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке не более чем 12 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15. Более предпочтительно, в этом варианте осуществления пациент является пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке не более чем 10 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15. Наиболее предпочтительно, в этом варианте осуществления пациент является пациентом, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке не более чем 8 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15.

Как применяют в настоящем документе термин "до начала введения" означает период времени непосредственно перед введением ингибитора hGDF-15 по изобретению. Предпочтительно, термин "до начала введения" означает период в 30 суток непосредственно перед введением; наиболее предпочтительно период в одну неделю непосредственно перед введением.

Термины "значимый", "значимо", и т.д., как применяют в настоящем документе, относятся к статистически значимому отличию между величинами по оценкам соответствующими, известными в данной области способами.

Ингибиторы hGDF-15 и блокаторы контрольных точек иммунного ответа, применяемые по изобретению, можно вводить при помощи известных в данной области способов. Такие способы будет выбирать специалист на основании хорошо известных факторов (например, в зависимости от того является ли ингибитор малой интерферирующей РНК или антителом). Введение известных блокаторов контрольных точек иммунного ответа можно производить на основании известных схем введения этих блокаторов контрольных точек иммунного ответа. Например, введение блокаторов контрольных точек иммунного ответа можно производить на основании схем введения, применяемых в исследовании KEYNOTE-006 (C. Robert et al. *N Engl J Med* 2015; 372:2521-2532).

В соответствии с настоящим изобретением, любое появление термина "содержащий" необязательно можно замещать термином "состоящий из".

Ингибиторы hGDF-15 для применения в соответствии с изобретением.

"Ингибитор hGDF-15" по изобретению может быть любой молекулой, которая способна ингибировать функцию человеческого GDF-15 (hGDF-15).

Неограничивающий пример такого ингибитора hGDF-15 представляет собой молекулу, которая специфически снижает экспрессию hGDF-15 и, таким образом, ингибирует функцию hGDF-15. Например, можно использовать малую интерферирующую РНК или шпилечную конструкцию миРНК для специфического снижения экспрессии hGDF-15 и ингибирования функции hGDF-15. Правила для конструирования и отбора последовательностей малой интерферирующей РНК и шпилечной конструкции миРНК известны в данной области и, например, рассматриваются у 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. Малые интерферирующие РНК и шпилечные конструкции миРНК можно доставлять пациентам-людям любыми подходящими способами, включая способы вирусной доставки (как, например, описанные у Knoepfel SA et al., "Selection of RNAi-based inhibitors for anti-HIV gene therapy." *World J Virol.* 2012 Jun 12;1(3):79-90) и другие способы доставки, такие как способы с использованием конъюгированных групп, которые облегчают доставку внутрь клеток (как, например, описанные в Kanasty R et al., "Delivery materials for siRNA therapeutics.", *Nat Mater.* 2013 Nov; 12 (11):967-77).

Является ли вещество, представляющее интерес, "ингибитором hGDF-15" или нет, можно определять при помощи способов, описываемых в настоящем документе, как указано в предпочтительных вариантах осуществления. Предпочтительным способом в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления является способ, использованный в примере 3.

Ранее было показано, что на человеческий белок GDF-15 можно успешно нацеливать моноклональное антитело (WO 2014/049087), и что такое антитело имеет благоприятные свойства, в том числе высокую аффинность связывания с человеческим GDF-15, как показано равновесной константой диссоциации приблизительно 790рМ для рекомбинантного человеческого GDF-15 (см. эталонный пример 1). Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления в соответствии с изобретением, ингибитор hGDF-15 для использования представляет собой антитело, способное связываться с hGDF-15, или его антигенсвязывающую часть. Предпочтительно, антитело представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с hGDF-15, или его антигенсвязывающую часть.

Таким образом, в более предпочтительном варианте осуществления ингибитор hGDF-15 в соответствии с изобретением представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающую часть, где переменный домен тяжелой цепи содержит область CDR3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную этой последовательности, и где переменный домен легкой цепи содержит область CDR3, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичную этой последовательности. В этом варианте осуществления предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающая часть содержит переменный домен тяжелой цепи, который содержит область CDR1, включающую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3, и область CDR2, включающую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4.

следовательность из SEQ ID NO: 7. В предпочтительном аспекте этого варианта осуществления, антитело может иметь последовательности CDR3, как определено в любом из вышеописанных вариантов осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления в соответствии с моноклональным антителом, способным связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающей частью, антигенсвязывающая часть представляет собой однодоменное антитело (также обозначаемое как "Nanobody™"). В одном из аспектов этого варианта осуществления, однодоменное антитело содержит аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, и SEQ ID NO: 5, соответственно. В другом аспекте этого варианта осуществления, однодоменное антитело содержит аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 из SEQ ID NO: 6, ser-ala-ser, и SEQ ID NO: 7, соответственно. В предпочтительном аспекте этого варианта осуществления, однодоменное антитело представляет собой гуманизованное антитело.

Предпочтительно, антитела, способные связываться с человеческим GDF-15 или их антигенсвязывающие части имеют равновесную константу диссоциации для человеческого GDF-15, которая равна или составляет менее чем 100 нМ, менее чем 20 нМ, предпочтительно, менее чем 10 нМ, более предпочтительно, менее чем 5 нМ и наиболее предпочтительно в пределах от 0,1 нМ до 2 нМ.

В другом варианте осуществления в соответствии с вышеописанными вариантами осуществления моноклонального антитела, способного связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающей частью, антитело, способное связываться с человеческим GDF-15 или его антигенсвязывающая часть связывается с тем же самым эпитопом человеческого GDF-15, что и антитело к человеческому GDF-15, полученное из клеточной линии B1-23, депонированной Немецким собранием микроорганизмов и клеточных культур GmbH (DMSZ) с номером доступа DSM ACC3142. Как описано в настоящем документе, связывание антитела с человеческим GDF-15 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно оценивают путем измерений поверхностного плазмонного резонанса в качестве референсного стандартного способа, в соответствии с процедурами, описанными в эталонном примере 1. Связывание с тем же самым эпитопом на человеческом GDF-15 можно оценивать аналогично при помощи поверхностного плазмонного резонанса для экспериментов конкурентного связывания для антитела к человеческому GDF-15, полученному из клеточной линии B1-23 и антитела, которое, как ожидают, будет связываться с тем же самым эпитопом на человеческом GDF-15, что и антитело к человеческому GDF-15, полученное из клеточной линии B1-23.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, способное связываться с человеческим GDF-15 или его антигенсвязывающая часть, представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающую часть, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 39 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 91%, по меньшей мере, на 92%, по меньшей мере, на 93%, по меньшей мере, на 94%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 40 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 91%, по меньшей мере, на 92%, по меньшей мере, на 93%, по меньшей мере, на 94%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, способное связываться с человеческим GDF-15 или его антигенсвязывающая часть, представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающую часть, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 41 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 91%, по меньшей мере, на 92%, по меньшей мере, на 93%, по меньшей мере, на 94%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 42 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 91%, по меньшей мере, на 92%, по меньшей мере, на 93%, по меньшей мере, на 94%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело способное связываться с человеческим GDF-15 или его антигенсвязывающая часть представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающую часть, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 43 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 91%, по меньшей мере, на 92%, по меньшей мере, на 93%, по меньшей мере, на 94%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична этой последовательности, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последо-

связывающие части можно получать в соответствии со способами, известными в данной области, как описано выше.

В более предпочтительном варианте осуществления, антитело способное связываться с человеческим GDF-15 или его антигенсвязывающая часть представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающую часть, где связывание представляет собой связывание с конформационным или прерывистым эпитопом на человеческом GDF-15, состоящем из аминокислотных последовательностей из SEQ ID No: 25 и SEQ ID No: 26. В предпочтительном аспекте этого варианта осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, как определено последовательностями по любому из вышеизложенных вариантов осуществления.

Антитело, способное связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающая часть может быть связана с лекарственным средством. В неограничивающих аспектах этого варианта осуществления, лекарственное средство может быть известным средством против злокачественных опухолей и/или иммуностимулирующей молекулой. Известные средства против злокачественных опухолей включают алкилирующие средства, такие как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, мехлоретамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, и ифосфамид; антимаболиты, такие как азатиоприн и меркаптопурин; алкалоиды, такие как алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, винорелбин, и виндезин), таксаны (например, паклитаксел, доцетаксел) этопозид и тенипозид; ингибиторы топоизомеразы, такие как камптотецины (например, иринотекан и топотекан); цитотоксические антибиотики, такие как актиномицин, антрациклины, доксорубин, даунорубин, валрубин, идарубин, эпирубин, блеомицин, пликамицин и митомицин; и радиоактивные изотопы.

В дополнительном варианте осуществления в соответствии с вышеописанными вариантами осуществления, антитело, способное связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающая часть модифицированы аминокислотной меткой. Неограничивающие примеры таких меток включают полигистидиновые (His-) метки, FLAG-метку, гемагглютининовую (HA) метку, метку с гликопротеином D (gD), и метку с с-тус. Метки можно использовать для различных целей. Например, их можно использовать для облегчения очистки антитела, способного связываться с человеческим GDF-15 или его антигенсвязывающей части. Предпочтительно, такие метки присутствуют на С-конце или N-конце антитела, способного связываться с человеческим GDF-15, или его антигенсвязывающей части.

Блокаторы контрольных точек иммунного ответа для использования в соответствии с изобретением.

Злокачественные клетки несут геномные мутации, которые приводят к образованию антигенов злокачественных клеток, которые являются специфичными для злокачественных клеток и отличаются от антигенов незлокачественных клеток. Таким образом, интактная иммунная система, которая не ингибирована, будет распознавать эти антигены злокачественных клеток, таким образом, будет возникать иммунный ответ против этих антигенов. Однако, большинство злокачественных опухолей выработали механизмы иммунологической толерантности против этих антигенов. Одним из классов таких механизмов, посредством которого злокачественные клетки достигают такой иммунологической толерантности, является использование контрольных точек иммунного ответа. "Контрольная точка иммунного ответа", как применяют в настоящем документе, в основном, означает иммунологический механизм, путем которого подавляется иммунный ответ. Более конкретно, контрольная точка иммунного ответа представляет собой механизм, который характеризуется тем, что молекула иммунной системы (или группа молекул иммунной системы) подавляет иммунный ответ за счет ингибирования активации клеток иммунной системы. Такая молекула (или группа молекул) иммунной системы, которая подавляет (подавляют) иммунный ответ за счет ингибирования активации клеток иммунной системы также известна/известны как молекула/молекулы контрольных точек.

Как применяют в настоящем документе, "блокатор контрольных точек иммунного ответа" представляет собой молекулу, которая способна блокировать контрольную точку иммунного ответа. Хотя следует понимать, что ингибитор hGDF-15, как применяют по изобретению, оказывает воздействие на иммунную систему, включая воздействия на CD8+ Т-клетки, как применяют в настоящем документе термин "блокатор контрольных точек иммунного ответа" не относится к ингибитору hGDF-15, но означает молекулу, которая отличается от ингибитора hGDF-15.

Наиболее распространенные блокаторы контрольных точек иммунного ответа, известные на сегодняшний день, представляют собой молекулы-ингибиторы контрольной точки иммунного ответа, такие как ингибиторы человеческого PD-1 и ингибиторы человеческого PD-L1. Дополнительные блокаторы контрольных точек иммунного ответа представляют собой анти-LAG-3, анти-B7H3, анти-TIM3, анти-VISTA, анти-TIGIT, анти-KIR, анти-CD27, анти-CD137, а также ингибиторы IDO. Таким образом, как применяют в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительной формой блокатора контрольных точек иммунного ответа является молекула-ингибитор контрольной точки иммунного ответа. Альтернативно, блокатор контрольных точек иммунного ответа может быть активатором ко-стимулирующего сигнала, который подавляет контрольную точку иммунного ответа.

Способы для измерения активности блокаторов контрольных точек иммунного ответа включают

анализы связывания *in vitro*, первичные анализы высвобождения цитокинов на основе Т-клеток, и модельные системы *in vivo*. Дополнительно, Promega сейчас разработала коммерчески доступную биолюминисцентную репортерную систему для PD-1/PD-L1, которая, например, описана в Mei Cong, Ph.D. et al.: Advertorial: Novel Bioassay to Assess PD-1/PD-L1 Therapeutic Antibodies in Development for Immunotherapy Bioluminescent Reporter-Based PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay. (<http://www.genengnews.com/gen-articles/advertorial-novel-bioassay-to-assess-pd-1-pd-l1-therapeutic-antibodies-in-development-for-immun/5511/>).

Предпочтительные блокаторы контрольных точек иммунного ответа представляют собой ингибиторы человеческого PD-1 и ингибиторы человеческого PD-L1. В одном из предпочтительных вариантов осуществления в соответствии со всеми вариантами осуществления изобретения, блокатор контрольных точек иммунного ответа не является ингибитором человеческого CTLA4.

Как применяют в настоящем документе, "ингибитор человеческого PD-1" может быть любой молекулой, которая способна специфически ингибировать функцию человеческого PD-1.

Неограничивающие примеры таких молекул представляют собой антитела, способные связываться с человеческим PD-1, и DARPins (сконструированные белки с анкириновыми повторами), способные связываться с человеческим PD-1. Предпочтительно, ингибитор PD-1 для применения в соответствии с изобретением, представляет собой антитело, способное связываться с человеческим PD-1, более предпочтительно, моноклональное антитело, способное связываться с человеческим PD-1. Наиболее предпочтительно, моноклональное антитело, способное связываться с человеческим PD-1, выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, пидилизумаба и АМФ-224.

Как применяют в настоящем документе, "ингибитор человеческого PD-L1" может быть любой молекулой, которая способна специфически ингибировать функцию человеческого PD-L1. Неограничивающие примеры таких молекул представляют собой антитела, способные связываться с человеческим PD-L1, и DARPins (сконструированные белки с анкириновыми повторами), способные связываться с человеческим PD-L1. Предпочтительно, ингибитор человеческого PD-L1 для применения в соответствии с изобретением, представляет собой антитело, способное связываться с человеческим PD-L1, более предпочтительно, моноклональное антитело, способное связываться с человеческим PD-L1. Наиболее предпочтительно, моноклональное антитело, способное связываться с человеческим PD-L1, выбрано из группы, состоящей из BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 и MSB0010718C.

Способы и технологии.

В основном, если не определено иначе в настоящем документе, способы, применяемые в настоящем изобретении (например, способы клонирования или способы, относящиеся к антителам), проводят в соответствии со способами, известными в данной области, например, способами, описанными в Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989), Ausubel et al. ("Current Protocols in Molecular Biology" Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; New York 1992), и Harlow and Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1988), все содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Связывание антител с их соответствующими белками можно оценивать при помощи способов, известных в данной области. Связывание моноклональных антител с их соответствующими мишенями предпочтительно оценивают путем измерений поверхностного плазмонного резонанса. Эти измерения предпочтительно проводят с использованием системы Biorad ProteOn XPR36 и сенсорных чипов Biorad GLC, как показано в качестве примера для антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23 в эталонном примере 1.

Выравнивания последовательностей из последовательностей по изобретению проводят с использованием алгоритма BLAST (см. Altschul et al.(1990) "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology* 215. p. 403-410.; Altschul et al.: (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.). Предпочтительно, используют следующие параметры: максимальные последовательности-мишени 10; размер "слова" 3; матрица BLOSUM 62; штрафы за пропуск: штраф за открытие 11, расширение 1; условная композиционная корректировка оценки матрицы. Таким образом, при использовании по отношению к последовательностям, термины, такие как "идентичность" или "идентичный" относятся к величине идентичности, полученной с использованием алгоритма BLAST.

Моноклональные антитела по изобретению можно получать любым известным в данной области способом, включая в качестве неограничивающих примеров, способы, упомянутые в Siegel DL DL ("Recombinant monoclonal antibody technology" *Transfus Clin Biol.* 2002 Jan;9(1):15-22). В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению производится гибридомной клеточной линией B1-23, хранящейся в Немецком собрании микроорганизмов и клеточных культур GmbH (DMSZ) под номером доступа DSM ACC3142, в соответствии с Будапештским договором. Депонирование было произведено 29 сентября 2011 года.

Клеточную пролиферацию можно измерять подходящими известными в данной области способами, включая (но не ограничиваясь) световую микроскопию, метаболические анализы, такие как измерение

митохондриального восстановительного потенциала (например, анализ с МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид); окрашивание резацурином, которое также известно как анализ Alamar Blue®), окрашивание известных маркеров эндогенной пролиферации (например, Ki-67), и способы, измеряющие синтез клеточной ДНК (например, анализы включения BrdU и [³H]-тимидина).

Уровни человеческого GDF-15 (hGDF-15) можно измерять любым известным в данной области способом, включая измерения уровней белка hGDF-15 способами, включающими (но не ограничиваясь ими) масс-спектрометрию для белков или пептидов, полученных из человеческого GDF-15, вестерн-блоттинг с использованием антител, специфичных к человеческому GDF-15, проточную цитометрию с использованием антител, специфичных к человеческому GDF-15, тестовые полоски с использованием антител, специфичных к человеческому GDF-15, или иммуноцитохимию с использованием антител, специфичных к человеческому GDF-15. Предпочтительным способом измерения сывороточных уровней hGDF-15 является измерение сывороточных уровней hGDF-15 путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием антител к GDF-15. Такие способы с ELISA приведены в Примере 1. Альтернативно, сывороточные уровни hGDF-15 можно определять известными иммунологическими анализами с электрохемолюминисценцией с использованием антител к GDF-15. Например, можно использовать технологию Roche Elecsys® для таких иммунологических анализов с электрохемолюминисценцией.

Получение композиций по изобретению.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением получают в соответствии с известными стандартами для получения фармацевтических композиций.

Например, композиции получают путем, при котором они могут храниться и вводиться соответствующим образом, например, с использованием фармацевтически приемлемых компонентов, таких как носители, эксципиенты или стабилизаторы.

Такие фармацевтически приемлемые компоненты не являются токсичными в количествах, используемых при введении фармацевтической композиции пациенту. Фармацевтически приемлемые компоненты, добавляемые к фармацевтическим композициям, могут зависеть от химической природы ингибиторов, присутствующих в композиции (например, зависят от того, являются ли ингибиторы антителами, шпильчатыми конструкциями миРНК или малыми интерферирующими РНК), конкретного назначаемого применения фармацевтических композиций и пути введения.

В основном, фармацевтически приемлемые компоненты, используемые в связи с настоящим изобретением, применяют в соответствии со знанием, доступным в данной области, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20th edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA.

Терапевтические способы и продукты для применения в этих способах.

Настоящее изобретение относится к ингибиторам hGDF-15 для применения, как определено выше.

Дополнительно, и в соответствии с этими ингибиторами hGDF-15 и их применением, настоящее изобретение также относится к соответствующим терапевтическим способам.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу для повышения процентного содержания CD8⁺ Т-клеток в солидной злокачественной опухоли у пациента-человека, к способу, включающему этап введения ингибитора hGDF-15 пациенту-человеку.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения солидной злокачественной опухоли блокатором контрольных точек иммунного ответа у пациента-человека, к способу, включающему этап введения ингибитора hGDF-15 пациенту-человеку и этап введения блокатора контрольных точек иммунного ответа пациенту-человеку.

Предпочтительные варианты осуществления этих способов являются вариантами, определенными выше для ингибиторов hGDF-15 для применения по изобретению.

В другом варианте осуществления вышеуказанных способов, ингибиторов hGDF-15 для применения, наборов, композиций, или композиций для применения, ингибитор hGDF-15 является единственным ингредиентом, который фармацевтически активен против злокачественной опухоли.

В альтернативном варианте осуществления вышеуказанных способов, ингибиторов hGDF-15 для применения, наборов, композиций, или композиций для применения, ингибитор hGDF-15 и блокатор контрольных точек иммунного ответа являются единственными ингредиентами, которые фармацевтически активны против злокачественной опухоли.

В альтернативном варианте осуществления вышеуказанных способов, ингибиторов hGDF-15 для применения, наборов, композиций, или композиций для применения, ингибитор hGDF-15 применяют в комбинации с одним или несколькими дополнительными ингредиентами, фармацевтически активными против злокачественной опухоли. В одном из аспектов этого варианта осуществления, один или несколько дополнительных ингредиентов, фармацевтически активных против злокачественной опухоли, представляют собой известное средство против злокачественных опухолей и/или иммуностимулирующую молекулу. Известные средства против злокачественных опухолей в качестве неограничивающих примеров включают алкилирующие средства, такие как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, мехлоретамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, и ифосфамид; антимаетаболиты, такие как азатиоприн и меркаптопурин;

алкалоиды, так как алкалоиды барвинка (например, винкрестин, винбластин, винорелбин, и виндезин), таксаны (например, паклитаксел, доцетаксел) этопозид и тенипозид; ингибиторы топоизомеразы, такие как камптотецины (например, иринотекан и топотекан); цитотоксические антибиотики, такие как актиномицин, антрациклины, доксорубин, даунорубин, валрубин, идарубин, эпирубин, блеомицин, пликамицин и митомин; и радиоактивные изотопы. Следующие ингредиенты, фармацевтически активные против злокачественной опухоли, являются особенно предпочтительными для использования в комбинации с ингибитором hGDF-15: иммуностимулирующие молекулы включают анти-LAG-3, анти-V7H3, анти-TIM3, анти-VISTA, анти-TIGIT, анти-KIR, анти-CD27, анти-CD137, анти-Ox40, анти-4-1BB, анти-GITR, анти-CD28, анти-CD40 или IDO-ингибиторы. Кроме того, другая терапия антителами, такими как анти-HER2, анти-EGFR, анти-клаудин, или их гликооптимизированными преемниками также является особенно предпочтительной, поскольку они будут полезны в комбинации с ингибитором hGDF-15, например, в связи с повышенной инфильтрацией иммунных клеток в солидной злокачественной опухоли, вызванной ингибитором hGDF-15.

Аналогично, подходы с вакцинацией (например, при помощи пептидов или дендритных клеток) или адоптивной клеточной терапией, опухоль-реактивными Т-клетками или дендритными клетками также являются особенно предпочтительными, поскольку они будут полезны в комбинации с ингибитором hGDF-15. Кроме того, следующее:

лечение будет также особенно предпочтительным, поскольку оно оказывает синергистичное действие с ингибитором hGDF-15:

лечение антителами или антителоподобными молекулами, имеющих одну или несколько специфичностей для опухолевых и иммунных клеток (например, Bites, DARTS, DARPINS, катумаксамаб);

лечение иммунотерапией на основе вакцин против опухоль-ассоциированных пептидов, например при помощи мультипептидных вакцин, таких как IMA901, ISA203 или при помощи вакцин на основе РНК (например, CV9104), и/или

лечение веществами, активирующими иммунные клетки (например, производные FAA для активации макрофагов, или лиганды для толл-подобных рецепторов, такие как конъюгаты SLP-AMPLIVANT).

Комбинации для применения по изобретению.

Настоящее изобретение относится к комбинациям ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для применения в способе лечения солидной злокачественной опухоли у пациента-человека, где ингибитор hGDF-15 и блокатор контрольных точек иммунного ответа предназначены для введения пациенту-человеку. Эти комбинации и их предпочтительные варианты осуществления определены выше.

Комбинация ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа может вводиться совместно или по отдельности.

Например, в одном из предпочтительных вариантов осуществления, введение ингибитора hGDF-15 начинают до начала введения блокатора контрольных точек иммунного ответа. Этот параметр позволяет выгодно увеличить процентное содержание Т-клеток, и, в частности, процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в солидной злокачественной опухоли, таким образом, что последующее лечение блокатором контрольных точек иммунного ответа может быть более эффективным из-за повышенного начального процентного содержания CD8⁺ Т-клеток в солидной злокачественной опухоли.

Наборы.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему ингибитор hGDF-15 и, по меньшей мере, один блокатор контрольных точек иммунного ответа, как определено выше.

Ингибитор hGDF-15 и один или несколько, или все из блокаторов контрольных точек иммунного ответа могут содержаться в отдельных контейнерах или в одном контейнере.

Используемый контейнер может быть любым типом контейнера, который подходит для хранения ингибитора hGDF-15 и/или, по меньшей мере, одного блокатора контрольных точек иммунного ответа. Неограничивающими примерами таких контейнеров являются флаконы и заполненные шприцы.

В дополнение к ингибитору hGDF-15 и, по меньшей мере, одному блокатору контрольных точек иммунного ответа, набор может содержать дополнительные терапевтические средства. Например, набор может содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, которые являются фармацевтически активными против злокачественной опухоли. Один или несколько дополнительных ингредиентов, которые являются фармацевтически активными против злокачественной опухоли, могут быть такими, как определено выше. Такие дополнительные ингредиенты, фармацевтически активные против злокачественной опухоли, можно использовать в способах по изобретению вместе с ингибитором hGDF-15 и, по меньшей мере, одним блокатором контрольных точек иммунного ответа.

Предпочтительно, набор по изобретению дополнительно содержит инструкции по применению.

Последовательности.

Аминокислотные последовательности, упомянутые в настоящем изобретении, являются следующими (в направлении от N-конца до C-конца; представлены в виде однобуквенного аминокислотного кода):

SEQ ID No: 1 (область переменного домена тяжелой цепи, включающая области FR1, CDR1, FR2,

CDR2 и FR3 из полипептидной последовательности моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSLTCFSFGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDK

RYNPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYC

SEQ ID No: 2 (область варибельного домена легкой цепи, включающая области FR1, CDR1, FR2, CDR2 и FR3 из полипептидной последовательности моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSQV

DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC

SEQ ID No: 3 (область CDR1 тяжелой цепи пептидной последовательности моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23):

GFSLSTSGMG

SEQ ID No: 4 (область CDR2 тяжелой цепи пептидной последовательности моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23):

IYWDDDK

SEQ ID No: 5 (область CDR3 тяжелой цепи пептидной последовательности моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23):

ARSSYGAMDY

SEQ ID No: 6 (область CDR1 легкой цепи пептидной последовательности моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23):

QNVGTN

область CDR2 легкой цепи пептидной последовательности моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23):

SAS

SEQ ID No: 7 (область CDR3 легкой цепи пептидной последовательности моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23):

QQYNNFPYT

SEQ ID No: 8 (рекомбинантный зрелый белок человеческого GDF-15):

GSARNGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM

HAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLAKDCHCI

SEQ ID No: 9 (белок-предшественник человеческого GDF-15):

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALS LAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKR

YEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHRA

LFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELHLRPQ

AARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA

NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLAKDCHCI

SEQ ID No: 10 (белок-предшественник человеческого GDF-15+N-концевой и C-концевой линкер GSGS):

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALS LAEASRASFPGPSELHSEDSR

FRELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLPE

ASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQL

ELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLWADWVLSPREVQVTMCIGAC

PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYDDLAKDCHCI

GSGSGSG

SEQ ID No: 11 (Flag-пептид): DYKDDDDKGG

SEQ ID No: 12 (HA-пептид): YPYDVPDYAG

SEQ ID No: 13 (пептид, полученный из человеческого GDF-15): ELHLRPQAARGRR

SEQ ID No: 14 (пептид, полученный из человеческого GDF-15): LHLRPQAARGRRR

SEQ ID No: 15 (пептид, полученный из человеческого GDF-15): HLRPQAARGRRRA

SEQ ID No: 16 (пептид, полученный из человеческого GDF-15): LRPQAARGRRRAR

SEQ ID No: 17 (пептид, полученный из человеческого GDF-15): RPQAARGRRRARAR

SEQ ID No: 18 (пептид, полученный из человеческого GDF-15): PQAARGRRRARAR

SEQ ID No: 19 (пептид, полученный из человеческого GDF-15): QAARGRRRARARN

SEQ ID No: 20 (пептид, полученный из человеческого GDF-15) : MHAQIKTSLHRLK

SEQ ID No: 25 (пептид GDF-15, включающий часть эпитопа GDF-15, которая связывается с B1-23):
EVQVTMCIGACPSQFR

SEQ ID No: 26 (пептид GDF-15, включающий часть эпитопа GDF-15, которая связывается с B1-23):
TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI.

Последовательности нуклеиновой кислоты, упомянутые в настоящем изобретении, являются следующими (в направлении от 5' to 3'; представлены в соответствии со стандартным кодом нуклеиновых кислот):

SEQ ID No: 21 (нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID No: 1):

CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCCTCAGTCT
GACTTGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGTACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTACAG
CCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACC
CAACCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATCCCTCCAGAAACCAGGTATTCTCAAGAT
CACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGT

SEQ ID No: 22 (нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID No: 2):

GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAG
CGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTAATGTGGCCTGGTTTCTACAGAAACCAGGG
CAATCTCCTAAAGCACTTATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCA
CAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACGTGCAGTCTGAAGACTTGGC
AGAGTATTTCTGT

SEQ ID No: 23 (нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID No: 5):

GCTCGAAGTTCCTACGGGGCAATGGACTAC

SEQ ID No: 24 (нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID No: 7):

CAGCAATATAACAACCTTCCGTACACG

Дополнительные аминокислотные последовательности являются следующими (в направлении от N-конца до C-конца; представлены в виде однобуквенного аминокислотного кода):

SEQ ID No: 27 (аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизованного антитела B1-23 к GDF-15 H1L5):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDK
RYNPTLKSRLTITKDPSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSSYGAMDYWGQGLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

SEQ ID No: 28 (аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи гуманизованного антитела B1-23 к GDF-15 H1L5):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDK
RYNPTLKSRLTITKDPSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSSYGAMDYWGQGLVTVSS

SEQ ID No: 29 (аминокислотная последовательность константного домена тяжелой цепи гуманизованного антитела B1-23 к GDF-15 H1L5):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No: 30 (аминокислотная последовательность легкой цепи гуманизованного антитела B1-23 к GDF-15 H1L5):

DIVLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSQV
 DRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKRAPSFIIPPSSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID No: 31 (аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи гуманизованного антитела B1-23 к GDF-15 H1L5):

DIVLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSQV
 DRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID No: 32 (аминокислотная последовательность константного домена легкой цепи гуманизованного антитела B1-23 к GDF-15 H1L5):

APSVFIIPPSSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID No: 33 (аминокислотная последовательность тяжелой цепи химерного антитела B1-23 к GDF-15):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDK
 RYNPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMYWGQTSVTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

SEQ ID No: 34 (аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи химерного антитела B1-23 к GDF-15):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDK
 RYNPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMYWGQTSVTVSS

SEQ ID No: 35 (аминокислотная последовательность константного домена тяжелой цепи химерного антитела B1-23 к GDF-15):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No: 36 (аминокислотная последовательность легкой цепи химерного антитела B1-23 к GDF-15):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID No: 37 (аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи химерного антитела B1-23 к GDF-15) :

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGKLEIKRTVA

SEQ ID No: 38 (аминокислотная последовательность константного домена легкой цепи химерного антитела B1-23 к GDF-15):

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID No: 39 (аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 01G06):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFDYNMDWVRQAPGQSLWMMGQINPNNGLI F
 FNQKFQGRVTLTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGTLLVTVSS

SEQ ID No: 40 (аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 01G06):

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRTSENHNYLAWYQQKPGKSPKLLIYDAKTLADGVP
 SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWSDPYTFGGGKLEIK

SEQ ID No: 41 (аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 03G05):

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVNQRPGQGLEWIGDINPSNGRSK
 YNEKFKNKATMTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVLDGAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID No: 42 (аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 03G05):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQG
 SGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGSKLEIK

SEQ ID No: 43 (аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 04F08):

QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTYGMGVTVIRQPSGKLEWLAHIYWDDDK
 RYNPSLKSRLTISKDTSNNQVFLKITSVDTADTATYYCAQTGYSNLFAIYWGQGTLLVTVSA

SEQ ID No: 44 (аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 04F08):

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKLGQSPKTLIYSASYRYSGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGGKLEIK

SEQ ID No: 45 (аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 06C11):

QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLNTYGMGVSWIRQPSGKLEWLAHIYWDDDK
 RYNPSLKSRLTISKDASNNRVFLKITSVDTADTATYYCAQRYDDYWGQGTLLVTVSA

SEQ ID No: 46 (аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 06C11):

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVP
 DRFTGSGSGTDFILTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELK

SEQ ID No: 47 (аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 08G01):

EVLQQSGPEVVKPGASVKIPCKASGYTFDYNMDWVKQSHGKSLEWIGEINPNNGGTF
 YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCAREAITTVGAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID No: 48 (аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 08G01):

DIQMTQSPASLSASVGETVTVITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVP

SRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYYCQHFWSPPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID No: 49 (аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 14F11):

QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTYGMGVGWIRQPSGKGLEWLADIWDDDK

YYNPSLKSRLTISKDTSSNEVFLKIAIVDTADTATYYCARRGHYSAMDYWGQTSVTVSS

SEQ ID No: 50 (аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 14F11):

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSPSYRYSQV

DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPHTFGGGTKLEMK

SEQ ID No: 51 (аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела 17B11):

QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHNDWDDDK

RYKSSLKSRLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARRVGGLEGYFDYWGQTTLVSS

SEQ ID No: 52 (аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела 17B11):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSRFSYMHWFQQKPGQAPKLLIKYASNLE

SGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEGEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

Примеры.

Эталонные примеры 1 до 3 иллюстрируют ингибитор hGDF-15, который можно использовать в композициях, наборах, способах и применениях по изобретению. Этот ингибитор hGDF-15 представляет собой моноклональное антитело, которое известно из WO 2014/049087, включенного в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Эталонный пример 1. Получение и характеристика антитела B1-23 к GDF-15.

Антитело B1-23 получали у мыши с нокаутом GDF-15. В качестве иммуногена использовали рекомбинантный человеческий GDF-15 (SEQ ID No: 8).

Гибридомная клеточная линия B1-23, производящая mAb-B1-23, была депонирована Вюрцбургским университетом Юлиуса-Максимилиана, Sanderring 2, 97070 Вюрцбург, Германия, при помощи Немецкого собрания микроорганизмов и клеточных культур GmbH (DMSZ) под номером доступа DSM ACC3142, в соответствии с Будапештским договором.

При помощи коммерчески доступной системы тест-полосок изотип B1-23 был идентифицирован как IgG2a (цепь каппа). С использованием измерений поверхностного плазмонного резонанса константу диссоциации (Kd) определяли следующим образом:

связывание моноклонального антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23 по изобретению измеряли с использованием измерений поверхностного плазмонного резонанса при помощи системы Biorad ProteOn XPR36 и сенсорных чипов Biorad GLC.

Для подготовки биосенсоров рекомбинантный зрелый человеческий белок GDF-15 иммобилизовали в проточной ячейке 1 и 2. В одной проточной ячейке использовали рекомбинантный GDF-15, полученный из клеток насекомых, трансфицированных бакуловирусом (клетки насекомых HighFive), а в другой - использовали рекомбинантный белок, полученный при экспрессии в *E. coli*. Сенсорный чип GLC активировали с использованием Sulfo-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) и EDC (1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид гидрохлорида) (Biorad ProteOn Амин Coupling Набор) в соответствии с рекомендациями производителя, поверхность сенсора потом нагружали белками до плотности приблизительно 600RU ($1\text{RU}=1\text{пг}\cdot\text{мм}^{-2}$). Не прореагировавшие связывающие группы затем гасили промыванием 1М этаноламином pH 8,5, и уравнивали биосенсор, промывая чип электродным буфером (10М HEPES, 150 мМ NaCl, 3,4 мМ ЭДТА, 0,005% Tween-20, pH 7,4, обозначаемый как HBS150В качестве контроля использовали две проточных ячейки, одну пустую без связанного белка и одну, связанную нефизиологическим белковым партнером (человеческим интерлейкином-5), который был иммобилизован с использованием такой же химии связывания и такой же плотности связывания. Для измерения взаимодействия антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23 растворяли в HBS150 и использовали в шести различных концентрациях в качестве анализируемого вещества (концентрация: 0,4, 0,8, 3, 12, 49 и 98 нМ). Анализируемое вещество наливали на биосенсор с использованием установки для однократной кинетики для того чтобы избежать промежуточной регенерации, все измерения проводили при 25°C и скорости потока 100 мкл·мин⁻¹. Для обработки эффекта поверхности и неспецифического связывания с матрицей сенсора вычитали данные SPR из пустой проточной ячейки (проточная ячейка 3) из всех остальных данных SPR. Полученную сенсограмму анализировали при помощи программного обеспечения ProteOn Manager версии 3.0. Для анализа кинетики связывания предполагали взаимодействие 1:1 по типу

модели Лэнгмюра. Могут быть определены значения для константы скорости ассоциации $5,4 \pm 0,06 \times 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ (k_{on}) и для константы скорости диссоциации $4,3 \pm 0,03 \times 10^{-4} \cdot \text{с}^{-1}$ (k_{off}) (значения приведены для взаимодействия mAb-B1-23 против GDF-15 с GDF-15, полученным при экспрессии в клетках насекомых). Равновесную константу диссоциации рассчитывали из уравнения $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ и получали значение приблизительно 790 пМ. Значения аффинности для взаимодействия GDF-15, полученного при экспрессии *E. Coli*, и антитела к человеческому GDF-15 mAb-B1-23 различались менее чем в два раза, константы скорости для GDF-15, полученного из клеток насекомых и *E. coli* отклоняются приблизительно на 45% и, таким образом, находятся в пределах точности измерений SPR, и, по всей видимости, не отражают действительного различия в аффинности. При использованных условиях mAb-B1-23 к человеческому GDF-15 не связывалось с человеческим интерлейкином-5 и, таким образом, подтвердило специфичность данных взаимодействия и специфичность mAb-B1-23 к человеческому GDF-15.

Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого GDF-15 (экспрессировавшегося в клетках насекомых, трансфицированных бакуловирусом) была:

GSARNGDHCP L G P G R C C R L H T V R A S L E D L G W A D W V L S P R E V Q V T M C I G A C P S Q F R A A N M

HA Q I K T S L H R L K P D T V P A P C C V P A S Y N P M V L I Q K T D T G V S L Q T Y D D L L A K D C H C I

(SEQ ID No: 8)

Таким образом, с использованием измерений поверхностного плазмонного резонанса, определяли константу диссоциации (K_d) как 790 пМ. В качестве сравнения: терапевтически применяемое антитело Ритуксимаб имеет значительно более низкую аффинность ($K_d=8$ нМ).

Ранее было показано, что mAb B1-23 ингибирует пролиферацию злокачественных клеток *in vitro*, и что mAb B1-23 ингибирует рост опухолей *in vivo* (WO 2014/049087).

Эталонный пример 2. mAb B1-23 распознает конформационный или прерывистый эпитоп человеческого GDF-15.

Картирование эпитопа: моноклональное мышинное антитело к GDF-15 против 13-мерных линейных пептидов, полученных из GDF-15.

Антиген: GDF-15:

G S G S G S G M P G Q E L R T V N G S Q M L L V L L V L S W L P H G G A L S L A E A S R A S F P G P S E L H S E D S R

F R E L R K R Y E D L L T R L R A N Q S W E D S N T D L V P A P A V R I L T P E V R L G S G G H L H L R I S R A A L P E G L P E

A S R L H R A L F R L S P T A S R S W D V T R P L R R Q L S L A R P Q A P A L H L R L S P P P S Q S D Q L L A E S S A R P Q L

E L H L R P Q A A R G R R R A R A R N G D H C P L G P G R C C R L H T V R A S L E D L G W A D W V L S P R E V Q V T M C I G A C

P S Q F R A A N M H A Q I K T S L H R L K P D T V P A P C C V P A S Y N P M V L I Q K T D T G V S L Q T Y D D L L A K D C H C I

G S G S G S G (322 аминокислоты с линкером) (SEQ ID No: 10)

Последовательность белка была транслирована в 13-мерные пептиды со сдвигом на одну аминокислоту. С- и N-концы были удлинены нейтральным линкером GSGS для того чтобы избежать получения укороченных пептидов (буквы жирным шрифтом).

Контрольные пептиды:

Flag: DYKDDDDKGG (SEQ ID No:13), 78 точек; HA: YPYDVPDYAG (SEQ ID No:14), 78 точек (каждая копия анализа).

Идентификатор пептидного чипа:

000264_01 (10/90, линкер Ala2Asp).

Условия окрашивания.

Стандартный буфер: PBS, pH 7,4+0,05% Tween 20.

Блокирующий буфер: блокирующий буфер Rockland MB-070.

Буфер для инкубации: стандартный буфер с 10% блокирующим буфером Rockland MB-070.

Первичный образец: моноклональное мышинное антитело к GDF-15 (1 мкг/мкл): окрашивание в буфере для инкубации в течение 16 ч при 4°C с разведением 1:100 и легким покачиванием при 500 об./мин.

Вторичное антитело: Козлиный анти-мышинный IgG (H+L) IRDye680, окрашивание в буфере для инкубации с разведением 1:5000 в течение 30 мин при комнатной температуре (RT).

Контрольные антитела: моноклональное анти-HA (12CA5)-LL-Atto 680 (1:1000), моноклональное анти-FLAG(M2)-FluoProbes752 (1:1000); окрашивание в буфере для инкубации в течение 1 ч при RT

Сканер.

Система визуализации Odyssey, LI-COR Biosciences.

Настройки: смещение: 1 мм; разрешение: 21 мкм; интенсивность зеленый/красный: 7/7.

Результаты.

После 30 мин предварительного набухания в стандартном буфере и 30 мин в блокирующем буфере, пептидный чип с 10-, 12-и 15-мерными линейными пептидами, полученными из B7H3 инкубировали со вторичным козлиным антимышиным антителом IgG (H+L) IRDye680 только в разведении 1:5000 в тече-

ние 1 ч при комнатной температуре для анализа фоновых взаимодействий со вторичным антителом. PEPperCHIP® отмывали 2 раза по 1 минуте стандартным буфером, промывали дистиллированной водой и сушили в потоке воздуха. Чтение проводили при помощи системы визуализации Odyssey с разрешением 21 мкм и интенсивностями зеленый/красный 7/7. Мы наблюдали слабое взаимодействие пептидов, богатых аргинином (ELHLPQAARGRR (SEQ ID No:15), LHLRPQAARGRRR (SEQ ID No:16), HLRPQAARGRRRA (SEQ ID No:17), LRPQAARGRRRAR (SEQ ID No:18), RPQAARGRRRARA (SEQ ID No:19), PQAARGRRRARAR (SEQ ID No:20) и QAARGRRRARARN (SEQ ID No:21)), которые известны как часто связывающиеся вещества, и с основным пептидом MHAQIKTSLHRLK (SEQ ID No:22) из-за ионных взаимодействий с заряженной краской антитела.

После предварительного набухания в течение 10 мин в стандартном буфере, пептидный микрочип инкубировали в течение ночи при 4°C с моноклональным мышинным антителом к GDF-15 в разведении 1:100. После повторного промывания стандартным буфером (2 раза по 1 минуте) проводили инкубацию в течение 30 мин со вторичным антителом в разведении 1:5000 при комнатной температуре. После промывания в стандартном буфере 2 раза по 10 с и короткого ополаскивания дистиллированной водой, PEPperCHIP® сушили в потоке воздуха. Чтение проводили при помощи системы визуализации Odyssey с разрешением 21 мкм и интенсивностями зеленый/красный 7/7 до и после окрашивания контрольных пептидов антителами к HA и антителами к FLAG(M2).

Показано, что ни один из линейных 13-мерных пептидов, полученных из GDF-15, не взаимодействовал с моноклональным мышинным антителом к GDF-15 даже при чрезмерно высокой интенсивности. Окрашивание контрольных пептидов с Flag и HA, которые заключали чип в рамку, однако, привело к хорошим и гомогенным интенсивностям пятен.

Подведение итогов.

Картирование эпитопов для моноклонального мышинового антитела против GDF-15 не выявило ни одного эпитопа из 13-мерных пептидов, полученных из антигена. Согласно этому открытию, весьма вероятно, что моноклональное мышинное антитело к GDF-15 распознает конформационный или прерывистый эпитоп с низкой аффинностью для частичных эпитопов. Из-за полного отсутствия какого-либо сигнала GDF-15 выше фонового окрашивания только со вторичным антителом, количественная оценка интенсивности пятен при помощи PepSlide® Analyzer и последующая аннотация пептидов были опущены.

Эталонный пример 3: Структурная идентификация пептидных лигандных эпитопов путем масс-спектрометрического вырезания эпитопа и выделения эпитопа.

Эпитоп рекомбинантного человеческого GDF-15, который связывается с антителом B1-23, был идентифицирован путем способа вырезания эпитопов и способа выделения эпитопов (Suckau et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1990 December; 87(24): 9848-9852.; R.Stefanescu et al., Eur.J.Mass Spectrom. 13, 69-75 (2007)).

Для получения колонки с антителом, антитело B1-23 добавляли к сефарозе, активированной NHS и соединенной с 6-аминогексановой кислотой. Соединенное с сефарозой антитело B1-23 затем загружали в 0,8 мл микроколону и промывали блокирующим и отмывающим буферами.

Эксперимент по выделению эпитопов.

Рекомбинантный человеческий GDF-15 расщепляли трипсином в течение 2 ч при 37°C (в растворе), получая различные пептиды, в соответствии с участками расщепления трипсина в белке. После полного расщепления, пептиды загружали на аффинную колонку, содержащую иммобилизованное антитело B1-23. Несвязавшиеся, а также потенциально связавшиеся пептиды GDF-15 использовали для масс-спектрометрического анализа. Идентификация пептидов способами масс-спектрометрии была невозможна. Это был еще один показатель того, что связывающая область GDF-15 в иммунном комплексе B1-23 содержит прерывистый или конформационный эпитоп. В случае непрерывного линейного эпитопа, пептиды после расщепления должны были связываться со своим партнером по взаимодействию, если только участок расщепления пептида не располагался в эпитопном пептиде. Прерывистый или конформационный эпитоп можно подтверждать способом вырезания эпитопов, описанным в следующей части.

Эксперимент по вырезанию эпитопов.

Иммобилизованное антитело B1-23 на аффинной колонке затем инкубировали с рекомбинантным GDF-15 в течение 2 ч. Образовавшийся иммунный комплекс на аффинной колонке затем инкубировали с трипсином в течение 2 ч при 37°C. Расщепление привело к различным пептидам, полученным из рекомбинантного GDF-15. Само по себе иммобилизованное антитело является протеолитически стабильным. Полученные пептиды из расщепленного белка GDF-15, которые были закрыты антителом и, таким образом, защищены от протеолитического расщепления, элюировали при кислых условиях (ТФУ, pH=2), собирали и идентифицировали путем масс-спектрометрии.

Способ вырезания эпитопов с использованием MS/MS идентификации привел к следующим пептидам:

Пептид	Положение в последовательности	Масса	Ион/заряд
EVQVTMCIGACPSQ FR	40-55	1769,91	590,50 (3+)
(SEQ ID No: 25)			
TDTGVSLSQTYDDL AKDCHCI	94-114	2310,96	771:33 (3+)
(SEQ ID No: 26)			

Часть человеческого GDF-15, которая связывается с антителом B1-23, содержит прерывистый или конформационный эпитоп. Масс-спектрометрия выявила 2 пептида в белке GDF-15, которые отвечают за формирование иммунного комплекса. Эти пептиды ограничены положениями 40-55 (EVQVTMCIGACPSQFR) и 94-114 (TDTGVSLSQTYDDLAKDCHCI) в аминокислотной последовательности GDF-15. Таким образом, эти два пептида содержат эпитоп белка GDF-15, который связывается с антителом B1-23.

Настоящее изобретение иллюстрируется следующими неограничивающими примерами:

Пример 1. У людей-пациентов с меланомой, которые получали предварительное лечение ипилимумабом (моноклональным антителом к CTLA4) и не показали полного ответа на лечение, и которые получали лечение пембролизумабом (моноклональным антителом к PD-1), сывороточные уровни hGDF-15 коррелируют с плохим ответом на лечение во временной точке через четыре месяца после начала лечения пембролизумабом.

Авторы настоящего изобретения решили исследовать, могут ли пациенты со злокачественной опухолью, получающие блокаторы контрольных точек иммунного ответа, получить пользу от ингибирования hGDF-15. Для того чтобы исследовать эту возможность, сыворотку от пациентов с меланомой, которые получали предварительное лечение ипилимумабом (моноклональным антителом к CTLA4) и получали лечение пембролизумабом (моноклональным антителом к PD-1) в клиническом исследовании, анализировали на сывороточные уровни hGDF-15. Для того чтобы исследовать, влияет ли hGDF-15 на ответ пациентов на блокаторы контрольных точек иммунного ответа, полученные сывороточные уровни hGDF-15 затем коррелировали с ответами пациентов на лечение. Сыворотку брали у пациентов до начала лечения пембролизумабом.

Исследование и последующий анализ проводили следующим образом.

Критерии включения в клиническое исследование: Приемлемые пациенты были в возрасте 18 лет и старше и имели гистологически или цитологически подтвержденную неоперабельную меланому стадии III или IV, не поддающуюся местной терапии; подтвержденное прогрессирующее заболевание в пределах 24 недель с последней дозы ипилимумаба (минимум две дозы, 3 мг/кг раз в 3 недели); предшествующая терапия ингибитором BRAF или MEK или обоими (если положительный по мутации BRAFV600); разрешение или улучшение побочных явлений, связанных с ипилимумабом до степени 0-1 и доза преднизона 10 мг/сутки или меньше в течение, по меньшей мере, 2 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства; общее состояние по шкале Восточной объединенной группы онкологов (ECOG) 0 или 1; измеряемое заболевание по Критериям оценки ответа при солидных опухолях, версия 1.1 (RECIST v1.1); и значения в пределах заданного диапазона для абсолютного числа нейтрофилов (≥ 1500 клеток на мл), тромбоцитов (≥ 100000 клеток на мл), гемоглобина (≥ 90 г/л), сывороточного креатинина ($\leq 1-5$ верхней границы нормы [ULN]), общий билирубин сыворотки ($\leq 1-5$ ULN или прямой билирубин $\leq 1-5$ ULN для пациентов с общей концентрацией билирубина $> 1-5$ ULN), аспартат и аланин аминотрансферазы ($\leq 2-5$ ULN или ≤ 5 ULN для пациентов метастазами в печени), международное нормализованное соотношение или протромбиновое время ($\leq 1-5$ ULN без использования антикоагулянтов), и активированное частичное тромбoplastиновое время ($\leq 1-5$ ULN без использования антикоагулянтов). У пациентов был отмывочный период, по меньшей мере, 4 недели между последней дозой самой последней терапии и первой дозой пембролизумаба. Пациенты с известными метастазами головного мозга или карциноматозным менингитом в стадии обострения, аутоиммунным заболеванием в стадии обострения, инфекцией в стадии обострения, требующей системной терапии, инфекцией ВИЧ в анамнезе, инфекцией вируса гепатита В или вируса гепатита С в стадии обострения, с побочными эффектами степени 4, связанными с ипилимумабом, или побочными эффектами степени 3, связанными с ипилимумабом в анамнезе, длящимися дольше 12 недель, или предшествующим лечением любой другой терапией против PD-1 или против PD-L1 были исключены из исследования.

Лечение пациентов.

Пациенты-люди с меланомой, которые удовлетворяли критериям включения, определенным выше (с двумя исключениями) уже получали лечение ипилимумабом (моноклональным антителом к CTLA4) и не показали полного ответа на лечение. Пембролизумаб (моноклональное антитело к PD-1) давали или по 2 мг/кг массы тела или по 10 мг/кг массы тела. Поскольку не наблюдали никаких дозозависимых эффектов между двумя группами лечения, пациентов, получавших лечение, оценивали совместно.

Критерии ответа.

Отвечающие и не отвечающие на лечение, а также текущие ответы классифицировали при помощи Критериев оценки ответа при солидных опухолях, версия 1.1 (RECIST v1.1) (Eisenhauer et al. : New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). In: Eur. J. Cancer. 45, No. 2, January 2009, pp 228-47).

Анализ сывороточных уровней hGDF-15 путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Сывороточные уровни человеческого GDF-15 измеряли путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Буферы и реагенты.

Забуференный блокирующий раствор: 1% BSA (фракция V pH 7,0, PAA) в PBS.

Отмывающий раствор: PBS-Tween (0,05%).

Стандарт: человеческий GDF-15 (стоковая концентрация 120 мкг/мл, от R&D Systems).

Захватывающее антитело: MAb к человеческому GDF-15 (клон 147627) от R&D Systems, мышинный IgG2B (каталожный #MAB957, от R&D Systems, стоковая концентрация 360 мкг/мл).

Детектирующее антитело: биотинилированное, аффинно очищенное Раb к человеческому GDF-15, козий IgG (каталожный #BAF940, от R&D Systems, стоковая концентрация 9 мкл/мл).

Стрептавидин-HRP (каталожный #DY998, из R&D Systems).

Раствор субстрата: 10 мл 0,1 М NaOAc pH6,0+100 мкл TMB+2 мкл H₂O₂.

Останавливающий раствор: 1 М H₂SO₄.

Процедура анализа.

1. Получение планшета.

a. Захватывающее антитело разбавляли до рабочей концентрации 2 мкг/мл в PBS. 96-луночный микропланшет (Nunc maxisorp®) сразу же покрывали разведенным захватывающим антителом по 50 мкл на лунку, за исключением внешних рядов (A и H). Ряды A и H заполняли буфером, чтобы избежать испарения образцов во время эксперимента. По планшету легонько постукивали, чтобы убедиться, что дно каждой лунки полностью покрыто. Планшет помещали во влажную камеру и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре (RT).

b. Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).

c. Добавляли к каждой лунке 150 мкл блокирующего раствора, с последующей инкубацией при RT в течение 1 ч.

d. Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).

2. Процедура анализа.

a. Готовили стандарты. GDF-15 разбавляли в забуференном блокирующем растворе до конечной концентрации 1 нг/мл (4,17 мкл GDF+496 мкл забуференного блокирующего раствора). Готовили серийные разведения 1:2.

b. Получали дублирующие образцы 1:20 (6 мкл+114 мкл забуференного блокирующего раствора).

c. Добавляли на лунку 50 мкл разведенных образцов или стандартов, с последующей инкубацией при RT в течение 1 ч.

	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	Серийные разведения стандартов											
G												
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a. Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).

b. Детектирующее антитело разбавляли до конечной концентрации 50 нг/мл (56 мкл+10 мл блокирующего буфера). 50 мкл разведенного детектирующего антитела добавляли к каждой лунке, с последующей инкубацией при RT в течение 1 ч.

c. Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).

d. Стрептавидин-HRP разбавляли 1:200 (50 мкл+10 мл блокирующего буфера). 50 мкл рабочего рас-

творя Стрептавидин-HRP добавляли к каждой лунке, с последующей инкубацией при RT в течение 20 мин.

e. Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).

f. Получали раствор субстрата. 50 мкл раствора субстрата добавляли к каждой лунке, с последующей инкубацией при RT в течение 20 мин.

g. К каждой лунке добавляли 50 мкл останавливающего раствора.

h. Сразу же определяли оптическую плотность каждой лунки с использованием микроспектрофотометра для чтения планшетов, установленного на 450 нм.

3. Расчет титра GDF-15 в сыворотке.

a. Каждый образец/разведение стандарта GDF-15 наносили в двух повторениях. Для определения титра GDF-15, рассчитывали среднее двух повторов и вычитали фон (образец без GDF-15).

b. Для получения стандартной кривой значения из линейного диапазона наносили на диаграмму X-Y (ось X: концентрация GDF-15, ось Y: OD450), и делали подгонку линейной кривой. Титр GDF-15 в сыворотке тестируемых образцов рассчитывали путем интерполяции значений OD450 стандартных разведений с известной концентрацией.

c. Для расчета конечной концентрации GDF-15 в образцах учитывали определенный коэффициент разведения. Образцы, показывающие значения OD ниже или выше стандартного диапазона анализировали заново при соответствующих разведениях.

Сравнение сывороточных уровней hGDF-15 с данными пациентов.:

Затем, измеренные сывороточные уровни hGDF-15 сравнивали с данными ответов пациентов на лечение, полученными в исследовании.

На фиг. 1 представлены сывороточные уровни GDF-15 для отвечающих и не-отвечающих на схему лечения. Как можно видеть на фигуре, большинство из неответающих имеют более высокие сывороточные уровни GDF-15, чем все отвечающие.

Этот результат также отражен на фиг. 2, которая показывает число отвечающих и не-отвечающих среди пациентов с сывороточными уровнями hGDF-15 <1,8 нг/мл, 1,8-4,2 нг/мл, и >4,2 нг/мл, соответственно.

Эти данные свидетельствуют о том, что высокие уровни GDF-15 связаны с плохим ответом на лечение. Поэтому, эти данные тестировали по статистической значимости:

Статистическая корреляция сывороточных уровней hGDF-15 с данными пациентов.

Данные.

Анализ данных проводили на основании файла с данными, содержащего данные из образцов для 35 пациентов, включающие колонки (переменные) обозначение образца, GDF-15 (нг/мл), отвечающие/не отвечающие, суток (до смерти или цензурирования), и продолжение (индексная переменная для текущей жизни). Классификация этих данных на отвечающих/не отвечающих проводили в одной временной точке через четыре месяца после начала лечения пембролизумабом. Поскольку некоторые образцы сыворотки были получены только незадолго перед анализом, ответ можно было оценить только у 29 пациентов. Один частично ответивший (>30% уменьшения размера опухоли) рассматривался как ответивший. Для определения ЛДГ, 4 образца были исключены из-за гемолиза. Выходные параметры (конечные точки):

a. Общая выживаемость (время до смерти). Эта конечная точка состояла из индикатора события смерти (1=умер/0=жив), который получали из файла с данными, и времени до смерти или цензурирования (последняя точка времени, когда было известно, что пациент жив), соответствующего переменной "сутки".

b. Ответ на лечение, например, отвечал ли пациент на лечение или нет (кодировали как 1=отвечал, 0=не отвечал). Частично отвечающие рассматривались как отвечающие.

Обозначение образца	GDF-15 (нг/мл)	ЛДГ [Е д/л]	Отвечающие (R) / не отвечающие (NR)	Сутки с начала лечения против PD-1	Предшествующее лечение ипилимумабом	Продолжающийся ответ
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	гемол из	R	176	x	
HG13.516	0,641	342	R	264	x	
HG13.578	2,841	1143	R	266	x	
HG13.596	1,085	гемол из	R	772	x	x
HG13.757	3,310	гемол из	NR	117	x	
HG13.811	4,029	763	R	596	x	x
HG14.1080	5,979	1359	NR	43	x	
HG14.1108	0,979	555	R	206	x	x
HG14.1147	2,084	227	R	154	x	x
HG14.1159	2,150	333	R	227	x	x
HG14.161	0,889	343		108	x	x
HG14.557	2,014	368	R	317	x	x
HG14.707	2,783	442	NR	71	x	
HG14.853	0,846	343	NR	71	x	
HG14.885	0,874	гемол из	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	гемол из		23	x	x
HG15.560	2,389	768		21	x	x
HG15.59	8,122	588	NR	23	x	

Анализ данных.

Общую выживаемость анализировали путем моделей выживаемости Кокса с пропорциональными рисками. Одна модель была снабжена GDF-15 (нг/мл) в качестве непрерывного предиктора, и другая модель была с группирующей переменной на основании GDF-15 в качестве категориального предиктора (группы были: <1,8 нг/мл, 1,8-4,2 нг/мл, >4,2 нг/мл GDF-15). Всего данные о выживании были доступны у 35 пациентов.

Ответ на лечение (бинарная переменная) анализировали при помощи обобщенных линейных моделей (GLM) с биномиальным распределением ошибки и функцией логит-связи (логистическая регрессия). Для ответов на лечение по оценке критериев RECIST1.1 через 4 месяца модель была снабжена GDF-15 (нг/мл) в качестве непрерывного предиктора. Поскольку никто из пациентов в группе с GDF-15 >4,2 нг/мл не ответил на лечение, оценка отношения шансов для этой группы по сравнению с группой с GDF-15 <1,8 нг/мл была бы очень большой, с очень широким доверительным интервалом. Вместо использования другой модели с группирующей переменной на основании GDF-15 в качестве категориального предиктора, для сравнения групп применяли тест хи-квадрат (χ^2) (проверка равенства доли отвечающих). Поскольку число отвечающих / не отвечающих было иногда довольно маленьким (<5), кроме этого проводили анализ чувствительности при помощи точного теста Фишера. Пациентов, которые получали только терапию против PD-1 в течение последних 4 месяцев, еще нельзя было классифицировать как отвечающих или не-отвечающих. Таким образом, только у 29 пациентов можно было оценить ответ на терапию.

Анализ данных проводили с использованием статистического программного обеспечения R (R Core Team, 2014, версия 3.1.0).

Результаты.

Табл. 1-2 показывают результаты моделей с GDF-15 в качестве непрерывного предиктора. Риск смерти был значимо повышен для более высоких концентраций GDF-15 (HR >1, табл. 1) в то время как вероятность ответа на лечение значительно снижена, на что указывает отношение шансов (OR) (OR <1, табл. 2). На фиг. 3 представлены соответствующие данные по отвечающим/не-отвечающим, а также вероятность ответа на лечение, предсказанная при помощи модели.

Табл. 3 показывает результат по модели пропорциональных рисков Кокса с группой на основании GDF-15 в качестве категориального предиктора. Группа с GDF-15 <1,8 нг/мл используют в качестве референсной группы (не показана в таблице). Два отношения рисков в таблице 3 представляют сравнение группы с GDF-15 между 1,8 и 4,2 и группы с GDF-15 >4,2 с референсной группой. Риск смерти повышен в обеих этих группах (по сравнению с референсной группой), но в большей степени в группе с GDF-15 >4,2. На фиг. 4 представлены кривые Каплана-Мейера для выживаемости в трех группах.

Доля отвечающих значимо различалась между группами (отвечающий 1: $\chi^2_{df=2}=16,04$, P=0,0003). Этот результат был подтвержден результатами точного теста Фишера (P=0,0003). Число смертей и отвечающих на группу приведено в табл. 4. Кроме того, табл. 5 показывает некоторую описательную статистику GDF-15 для каждой группы.

Таблица 1

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

Табл. 1 показывает оценки отношения рисков (HR) из модели пропорциональных рисков Кокса с общей выживаемостью (время до смерти) в качестве выходного параметра и GDF-15 в качестве непрерывного предиктора. Анализ включал образцы от 35 пациентов.

Таблица 2

	Оценка (OR)	95% CI	z	p
Постоянное (слагаемое)	25.281	[4.219,364.950]	2.94	0.00324
GDF-15	0.389	[0.159,0.698]	-2.54	0.01120

Табл. 2 показывает оценки отношения шансов (OR) из обобщенных линейных моделей с ответом на лечение (ответивший 1) в качестве выходного параметра и GDF-15 в качестве непрерывного предиктора. Анализ включал образцы от 29 пациентов.

Таблица 3

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

Табл. 3 показывает оценки отношения рисков (HR) из модели пропорциональных рисков Кокса (время до смерти) в качестве выходного параметра и группы на основании GDF-15 в качестве непрерывного предиктора. Анализ включал образцы от 35 пациентов.

Таблица 4

Переменные	Уровни	[0,1.8]		(1.8,4.2]		(4.2,13]		П_все	%_all
		П	%	П	%	П	%		
смерть	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
	всего	18	100.0	11	100.0	6	100.0	35	100.0
отвечающий 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
	всего	14	100.0	9	100.0	6	100.0	29	100.0

Табл. 4 показывает число смертей и отвечающих (отвечающий¹) в трех группах, определенных по GDF-15 (<1,8, 1,8-4,2, >4,2 нг/мл).

Таблица 5

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

Табл. 5: непрерывная предикторная переменная GDF-15 (нг/мл) в трех группах, определенных по GDF-15 (<1,8, 1,8-4,2, >4,2 нг/мл). Показаны число пациентов (n), медиана (\tilde{x}), среднее (\bar{x}), стандартное отклонение (s), минимум (Min) и максимум (Max).

Далее, для того чтобы сравнить статистические результаты, полученные для уровней GDF-15, также проводили статистический анализ для уровней известного прогностического фактора лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке пациентов.

Лактатдегидрогеназа считается прогностически значимым маркером для солидных опухолей. Это было недавно подтверждено комплексным метаанализом, основанным на большой совокупности клинических исследований (31857 пациентов). Постоянное влияние повышенной ЛДГ на общую выживаемость (HR=1,48, 95% ДИ=от 1,43 до 1,53) был обнаружено во всех подгруппах и стадиях заболевания. Кроме того, наблюдалась тенденция к более сильной прогностической ценности ЛДГ при метастатическом заболевании по сравнению с неметастатическим заболеванием, которое, как полагали, отражает большую опухолевую нагрузку. Хотя точный механизм остается неизвестным и может также быть связан с гипоксией и метаболическим перепрограммированием через эффект Варбурга, ЛДГ можно интерпретировать как отражение высокой опухолевой нагрузки или агрессивности опухоли (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). Поскольку сывороточные уровни ЛДГ были включены в хему определения стадии меланомы, этот показатель обычно измеряется во время клинической диагностики в экспертной лаборатории университета.

Таблица 6

	GDF-15 (нг/мл)		LDH (Ед/л)	
	Отвечающие (n=19)	Не отвечающие (n=10)	Отвечающие (n=9)	Не отвечающие (n=16)
Медиана	1, 2	4, 6	371	591
Среднее	1, 7	5, 6	455	1312
Стандартное отклонение	1, 2	3, 6	218	1108
t-тест (2- сторонний, тип 3)	0, 012		0, 061	

Табл. 6: GDF-15 и ЛДГ у отвечающих по сравнению с не отвечающими.

Определение ЛДГ было невозможно в четырех образцах крови из-за гемолиза.

Табл. 7 является аналогом табл. 2, за исключением того, что в качестве непрерывного предиктора ответа на лечение (ответивший¹) применяли ЛДГ вместо GDF-15. Вероятность ответа на лечение минимально значимо снизилась с повышением уровней ЛДГ (OR <1, p <0,1). На фиг. 5 представлены соответствующие данные на отвечающих/не отвечающих, а также вероятность ответа на лечение, предсказанная

по модели.

Для того чтобы определить, является ли GDF-15 лучшим прогностическим фактором ответа на лечение (ответивший 1), чем ЛДГ, были использованы две дополнительные модели: модель, включающая оба маркера в качестве предикторов (которая автоматически включала только пациентов с измерениями обоих маркеров), и модель с GDF-15 в качестве единственного предиктора, которая также использовала пациентов с измерениями ЛДГ. Затем для всех трех моделей рассчитывали информационный критерий Акаике (AIC) (табл. 8). Наименьший AIC указывает на более эффективную модель. Фактически, AIC модели с GDF-15 был меньше, чем AIC модели с ЛДГ в качестве предиктора. Модель с GDF-15 имеет даже меньший AIC, чем модель с обоими предикторами, что указывает на то, что ЛДГ как дополнительный предиктор не улучшает модель. Разумеется, модель с обоими предикторами не может хуже объяснять ответ на лечение, но как мера "эффективности модели", AIC "штрафует" модели с предикторами, которые не улучшают модель значительно и отдает предпочтение более простым моделям. Альтернативное сравнение моделей проводилось путем анализа отклонения (аналогично анализу дисперсии, но для обобщенных линейных моделей), т.е. сравнение разницы в объясненных отклонениях, между более сложной моделью с обоими предикторами и обеими более простыми моделями только с одним из предикторов (соответствующее упрощенной модели либо с ЛДГ, либо с GDF-15). Удаление GDF-15 из более сложной модели привело к значимому уменьшению объясненного отклонения ($P=0,02$), тогда как удаление LDH не привело ($P=0,41$).

Таблица 7

	Оценка (OR)	95% CI	z	p
(Постоянное слагаемое)	9.741	[2.055, 89.308]	2.44	0.0146
ЛДГ	0.997	[0.994, 0.999]	-1.79	0.0727

Табл. 7: оценки отношения шансов (OR) из обобщенных линейных моделей с ответом на лечение (ответивший 1, как определено в файле A) в качестве выходного параметра и ЛДГ в качестве непрерывного предиктора. Анализ включал образцы от 25 пациентов.

Таблица 8

	df	AIC
Модель с ЛДГ и GDF-15	3.00	25.10
Модель только с ЛДГ	2.00	28.55
Модель только с GDF-15	2.00	23.77

Таблица 8: Сравнение моделей на основании информационного критерия Акаике (AIC), в котором более малые величины указывают на более эффективную модель, df: степени свободы. Все модели включали образцы от 25 пациентов.

Фиг. 5А показывает вероятность ответа на лечение (ответивший 1), как предсказано обобщенной линейной моделью с использованием ЛДГ в качестве непрерывного предиктора. Круги показывают данные, кривые показывают модель. Вертикальная линия указывает концентрацию ЛДГ, при которой вероятность ответа на лечение составляет 0,5. Когорта пациентов была идентичной. Однако не удалось надежно определить уровни ЛДГ у четырех пациентов из-за гемолиза. Фиг. 5В показывает графическое представление пациентов, отвечающих и не отвечающих на лечение, и их соответствующие уровни hGDF-15 и ЛДГ. Когда пороговые значения выбраны для того чтобы включить всех отвечающих, тестирование на основании GDF-15 позволило выявить 6 (из 9) не отвечающих на лечение, в то время как анализ на основе уровней ЛДГ может выявить только 4 (из 9) не отвечающих на лечение. Для тестирования ЛДГ, 4 гемолитических образца были исключены, что вызвало потерю данных.

Подведение итогов.

В совокупности приведенные выше статистические результаты примера 1 показали, что вероятность ответа на лечение значимо снижается с увеличением уровней hGDF-15 в сыворотках пациентов. Например, отношение шансов 0,389, показанное в табл. 2, показывает, что если сывороточные уровни hGDF-15 увеличиваются на 1 нг/мл, вероятность ответа на лечение уменьшается до 0,389-кратного значения исходной величины, т.е. она уменьшается примерно на 60%. Если сывороточные уровни hGDF-15 увеличиваются на 2 нг/мл, вероятность ответа на лечение снижается до $0,389 \times 0,389$ -кратное=0,151-кратное значение исходной величины, т.е. она уменьшается примерно на 85%.

Результаты примера 1 позволяют предположить, что hGDF-15 отрицательно влияет на ответы пациентов на лечение с блокаторами контрольных точек иммунного ответа. Таким образом, по изобретению, ингибитор hGDF-15 будет полезен для ингибирования отрицательных эффектов hGDF-15 на ответы пациентов на лечение с блокаторами контрольных точек иммунного ответа, и для улучшения ответов пациентов на лечение с блокаторами контрольных точек иммунного ответа не только при меланоме, но и при всех солидных злокачественных опухолях, упоминаемых в настоящем документе.

Пример 2. Уровни GDF-15 обратно коррелируют с CD8⁺ лимфоцитами, инфильтрирующими опу-

холь (TIL), в метастазах из различных форм опухолей.

Для выявления механизма hGDF-15, который способствует отрицательному воздействию hGDF-15 на ответы пациентов, анализировали метастазы в головной мозг из разных солидных опухолей на экспрессию hGDF-15 и на наличие клеток иммунной системы.

Образцы и обработка ткани.

Анализировали фиксированную формалином и погруженную в парафин (FFPE) ткань из архивных метастазов головного мозга, которую собирали и обрабатывали как матричные мультитканевые блоки (ТМА). Все образцы получали или из банка опухолей УСТ (Университет Гете, Франкфурт-на-Майне, Германия, член Немецкого консорциума по раку (DKTK), Гейдельберг, Германия, и Немецкий исследовательский центр рака (DKFZ), Гейдельберг, Германия) или из ракового регистра банка опухолей "Blut- und Gewebebank zur Erforschung des malignen Melanoms" (Отделение дерматоонкологии, Университетский госпиталь Тюбингена, Германия). Это исследование было одобрено двумя независимыми этическими комитетами (Этический комитет УСТ Франкфурта/ Университет Гете, Франкфурт-на-Майне, Германия: номера проектов: GS 4/09; SNO_01-12; номер проекта в этическом комитете университета Тюбингена: 408/2013BO2). Всего было исследовано 190 пациентов с метастазами в головной мозг, в том числе: меланома (n=98), NSCLC (n=33), карцинома молочной железы (n=18), RCC (n=10), SCLC (n=7), колоректальная карцинома (n=7), карциномы без дополнительных уточнений (карцинома NOS n=11) и образцы редких опухолей, обобщенные, как прочие (n=6). Собирали данные выживаемости у 155 пациентов (время выживания после удаления опухоли), дополнительно анализировали число метастазов в головной мозг у 169 пациентов и размер метастазов в головной мозг в субкогорте из 55 пациентов с меланомой.

Иммуногистохимия.

Иммуногистохимию для всех антител проводили с использованием предметных стекол толщиной 3 мм и стандартных протоколов на автоматической окрашивающей системе для ИГХ Discovery XT (Roche/Ventana, Tucson, Arizona, USA). Использовали следующие антитела: к GDF-15 (HPA011191, разведение 1:50, Sigma/Atlas, протокол #730), к CD3 (клон A0452, разведение 1:500, DAKO, Glostrup, Denmark), к CD8 (клон C8/144B, разведение 1:100, DAKO, Glostrup, Denmark), к PD-1 (клон NAT105; разведение 1:50; Abcam, Cambridge, United Kingdom), к PD-L1 (E1L3N; разведение 1:200; Cell Signaling, Boston, U.S.A.), к FOXP3 (клон 236A/E7; разведение 1:100; eBioscience, San Diego, U.S.A.). Предметные стекла контрастно окрашивали гематоксилином и готовили препараты.

Статистические анализы.

Все образцы оценивали по частоте положительных клеток, по отношению ко всем клеткам (как процентное содержание) на окрашенном ядре ТМА. Для экспрессии hGDF-15 использовали оценку, описанную ранее подробно [21,22]: частота 0-1%, 0 баллов; 1-10%, 1 балл; 10-25%, 2 балла; 25-50%, 3 балла; >50%, 4 балла; кроме того, оценку частоты умножали на интенсивность окрашивания (1 слабое окрашивание, 2 умеренное окрашивание, 3 сильное окрашивание), что в итоге привело к порядковой оценочной шкале hGDF-15 (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12). Порядковые масштабированные переменные сравнивались непараметрическим методом Вилкоксона/Крускал-Уоллис и Данна для поправки на множественное тестирование. Для непрерывных переменных сравнивали средние между метастазами в головной мозг различного происхождения, используя ANOVA, а затем ретроспективный анализ с HSD критерием Тьюки-Крамера. Для корреляционного анализа размеров метастазов в головной мозг и экспрессии маркеров проводилась линейная корреляция, за которой следовал ANOVA, в случае порядковых масштабированных переменных применялся корреляционный анализ с коэффициентом Спирмана. Для всех статистических анализов был установлен уровень значимости $p < 0,05$.

Все статистические анализы проводили с использованием JMP8 и JMP11 (SAS, Cary, U.S.A.), дополнительные графики получали при помощи Prism 6 (программное обеспечение GraphPad, La Jolla, U.S.A.).

Результаты.

На фиг. 6 представлены примеры тканевых срезов из метастазов меланомы в головной мозг без высокой (верхняя панель) или с высокой (нижняя панель) иммунореактивностью GDF-15, которые окрашивали посредством иммуногистохимии на GDF-15 и маркерные белки Т-клеток - CD3 и CD8, соответственно, как указано на фигуре. В разделе без экспрессии GDF-15, многочисленные инфильтрирующие иммунные клетки видны в виде темных пятен. На снимке, показывающем метастазы, экспрессирующие высокие уровни GDF-15, немногочисленные инфильтрирующие иммунные клетки обозначены стрелками (CD3- и CD8-позитивные клетки обозначены стрелками). Как можно видеть на фигуре, было неожиданно установлено, что в тканевом срезе с высокой иммунореактивностью hGDF-15 (нижняя панель) количество CD3+ и CD8+ клеток было сильно снижено по сравнению с тканевым срезом без иммунореактивности hGDF-15 (верхняя панель). Следует отметить, что другие окрашенные маркеры, такие как PD-L1, PD-1, все показали положительную корреляцию с количеством CD3+ и CD8+ Т-клеток, инфильтрирующих опухоль.

Таким образом, затем было проанализировано, существует ли обратная корреляция между уровнями hGDF-15 и процентным содержанием CD3+ Т-клеток в разных метастазах меланомы в головной мозг.

Фиг. 7А показывает график процентного содержания CD3+ клеток по сравнению с оценкой GDF-15 (полученной, как описано выше, в разделе "статистические анализы"). Как указано на фиг. 7А, была статистически значимая обратная корреляция между процентным содержанием CD3+ клеток и оценкой GDF-15 ($p=0,0015$).

Аналогичным образом было также проанализировано, существует ли обратная корреляция между уровнями hGDF-15 и процентным содержанием CD8+ Т-клеток в разных метастазах меланомы в головной мозг. Фиг. 7В показывает график процентного содержания клеток CD8+ по сравнению с оценкой GDF-15 (полученной, как описано выше, в разделе "статистические анализы"). Как показано на фиг. 7В, была статистически значимая обратная корреляция между процентным содержанием CD8+ клеток и оценкой GDF-15 ($p=0,0038$).

Корреляция GDF-15 с FOXP3, напротив, не дала статистически значимого результата согласно тесту коэффициентов корреляции рангов Спирмена (ρ) ($p=0,8495$ среди различных форм опухолей; $p=0,2455$ при оценке метастазов только меланомы).

Наконец, было также проанализировано, существует ли обратная корреляция между уровнями hGDF-15 и процентным содержанием CD8+ и CD3+ Т-клеток в метастазах в головной мозг из различных форм опухолей. На фиг. 8 представлен график оценки GDF-15 против процентного содержания CD8+ и CD3+ Т-клеток, соответственно, в 168 (для CD3) или, соответственно, 169 (для CD8) метастазах в головной мозг из разных опухолевых образований (меланома, CRC, RCC, рак молочной железы, NSCLC и SCLC). График получали, как описано выше, в разделе "статистические анализы". Как указано на фиг. 8, была статистически значимая обратная корреляция между процентным содержанием CD8+ клеток и оценкой GDF-15 ($p=0,0311$), а также статистически значимая обратная корреляция между процентным содержанием CD3+ клеток и оценкой GDF-15 ($p=0,0093$). Другие маркеры (PD-L1, PD-1, FOXP3) снова показали положительные корреляции с инфильтрацией CD3 и CD8 Т-клетками.

Подведение итогов.

Вышеприведенные результаты показывают, что существует не только обратная корреляция hGDF-15 с процентным содержанием Т-клеток, экспрессирующих общий Т-клеточный маркерный белок CD3, в метастазах, но и обратная корреляция с процентным содержанием CD8+Т- лимфоцитов в метастазах. Это следует отметить, поскольку ранее было показано, что присутствие CD8+ Т-лимфоцитов особенно необходимо для регрессии опухоли после ингибирования контрольной точки иммунного ответа антителом к PD-1 (Tumeh et al., Nature. 2014 November 27; 515 (7528):568-71.).

Таким образом, по изобретению, терапевтическое ингибирование hGDF-15 можно использовать для увеличения процентного содержания CD8+ Т-лимфоцитов в солидных опухолях, включая опухолевые метастазы. Это увеличение CD8+ Т-лимфоцитов в солидных опухолях можно использовать для терапии солидных опухолей. В неограничивающем аспекте изобретения особенно благоприятной терапевтической комбинацией является комбинация ингибитора hGDF-15 с блокатором контрольных точек иммунного ответа. Преимущественным эффектом этой комбинации является то, что ингибирование hGDF-15 увеличит процентное содержание CD8+ Т-лимфоцитов в солидных опухолях и тем самым приведет к синергическому терапевтическому эффекту с ингибированием контрольной точки иммунного ответа. Изобретение может таким образом быть применено ко всем солидным опухолям, упомянутым в предпочтительных вариантах осуществления.

Пример 3. GDF-15 снижает адгезию Т-клеток к эндотелиальным клеткам.

Авторы изобретения далее определили, как hGDF-15 влияет на процентное содержание Т-клеток в солидных опухолях.

Шаг, необходимый для вторжения Т-клеток из потока крови в ткань опухоли, заключается в том, что Т-клетки должны сначала прикрепиться к эндотелию, прежде чем они смогут проникнуть в опухоль. Чтобы смоделировать этот шаг и оценить, может ли на этот шаг повлиять hGDF-15, авторы изобретения использовали модельную систему, которая измеряет адгезию Т-клеток к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека (HUVEC).

Эксперимент с потоком/адгезией Т-клеток (на HUVEC).

Сутки 1.

a. μ -стекла VI 0,4 (ibidi GmbH, Germany) покрывали фибронектином (100 мкг/мл): 30 мкл через загрузочное отверстие. Их инкубировали в течение 1 ч при 37°C (или использовали предварительно покрытые стекла).

b. Фибронектин удаляли, с последующей промывкой средой для HUVEC.

c. HUVEC трипсинизировали с 6-луночного планшета (количество: 2×10^5 /мл (всего 2 мл)).

d. Их отмывали и разводили до 1×10^6 клеток/мл.

e. 30 мкл HUVEC наносили через загрузочное отверстие на μ -стекло VI и проверяли под микроскопом.

f. μ -стекло VI накрывали крышкой и инкубировали при 37°C, 5%CO₂.

Сутки 2.

a. HUVEC активировали TNF α (10 нг/мл) и IFN γ (10 нг/мл) в каналах 2-5 (см. табл. ниже): Всю сре-

ду отбирали из каналов и замещали цитокин-содержащей предварительно прогретой средой.

Сутки 3.

а. Выделяли Т-клетки (негативное изолирование из пан-Т-клеток).

б. Т-клетки предварительно инкубировали в лунке 1 (1×10^6 клеток/мл) в присутствии или в отсутствие GDF-15 (100 нг/мл) в течение 1 ч.

с. HUVEC предварительно инкубировали в каналах 4 и 5 с GDF-15 (100 нг/мл) в течение 1 ч: всю среду в загрузочных отверстиях удаляли, и оба загрузочных отверстия заполняли предварительно прогретой средой, содержащей GDF15.

д. Инкубатор для предметного столика микроскопа предварительно прогревали, и присоединяли газовую смесь (5% CO₂, 16% O₂, 79% N₂).

е. Получали 3 шприца по 50 мл.

i. Т-клетки (1×10^6 клеток/мл): 1 мл.

ii. Т-клетки с GDF15 (1×10^6 клеток/мл): 1 мл.

iii. Среда.

а. Шприц 1 соединяли с каналом 1 (см. таблицу ниже) и запускали поток (0,5 дин/см²: 0,38 мл/мин=22,8 мл/ч).

б. Т-клетки протекали в течение 3 мин и за это время, 10 полей зрения были predeterminedены под микроскопом.

с. Каждое поле зрения видеорегистрировалось в течение 5 с.

д. Остальные каналы оценивали по аналогии с каналом 1 (f-h) с образцами Т-клеток, как указано ниже в таблице.

Номер канала	Эндотелиальные клетки	Т-клетки в потоке	Комментарии
1	Нестимулированные HUVEC	Т-клетки	[отрицательный контроль]
2	Стимулированные HUVEC	Т-клетки	[положительный контроль]
3	Стимулированные HUVEC	Т-клетки с GDF-15	
4	HUVEC, стимулированные GDF-15	Т-клетки	
5	HUVEC, стимулированные GDF-15	Т-клетки с GDF-15	

Рекомбинантный GDF-15 получали от Invigate GmbH, Jena, Germany.

Статистический анализ.

Все данные сравнивали с использованием теста Манна-Уитни для тестирования данных без нормального распределения. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 9. Эта фигура показывает анализ нескольких параметров адгезии, а именно:

а) число "катящихся" Т-клеток в поле зрения в су (9A; данные получали из канала # 3 ("GDF-15") и канала #2 ("контроль")), которое отражает форму умеренной адгезии Т-клеток к эндотелиальным клеткам,

б) скорость качения Т-клеток (измеренную в пикселях за 0,2 с) (9B; данные получали из канала # 3 ("GDF-15") и из канала #2 ("контроль")), которая повышается с уменьшением адгезии между Т-клетками и эндотелиальными клетками, и

с). число прикрепленных клеток в поле зрения (9C; данные получали из канала # 3 ("GDF-15") и канала #2 ("контроль")); и 9D).

Как видно на фиг. 9C, выявлено, что обработка Т-клеток hGDF-15 значительно снижает адгезию к эндотелиальным клеткам, что отражается в количестве прикрепленных клеток на поле зрения. Аналогичные результаты получали при анализе адгезии путем подсчета числа катящихся Т-клеток (фиг. 9A). Кроме того, и в соответствии с приведенными выше результатами, выявлено, что обработка Т-клеток с hGDF-15 значительно увеличивает скорость качения, что указывает на уменьшение времени взаимодействия между Т-клетками и эндотелиальными клетками, а также указывает на снижение адгезии между Т-клетками и эндотелиальными клетками (фиг. 9B).

Далее авторы изобретения проанализировали, на какие клетки был нацелен hGDF-15 (фиг. 9D). В образце, где только HUVEC обрабатывали hGDF-15, наблюдали умеренное снижение адгезии Т-клеток к эндотелиальным клеткам (HUVEC). Напротив, сильное снижение адгезии Т-клеток к эндотелиальным

клеткам (HUVEC) наблюдали, когда либо только Т-клетки обрабатывали hGDF-15, либо когда и Т-клетки, и эндотелиальные клетки (HUVEC) обрабатывали hGDF-15. Эти результаты показывают, что hGDF-15 действует как на Т-клетки, так и на эндотелиальные клетки, но они также указывают на то, что основной адгезионный эффект hGDF-15 представляет собой воздействие на Т-клетки.

Далее авторы изобретения проверили, может ли влияние hGDF-15, который секретируется опухолевыми клетками, на адгезию Т-клеток ингибироваться ингибиторами hGDF-15. Чтобы проверить это, авторы изобретения использовали hGDF-15-секретирующую клеточную линию меланомы, UACC257.

Эксперимент с потоком/адгезией Т-клеток (на HUVEC) в присутствии или отсутствии GDF-15 в супернатанте опухолевых клеток.

Сутки 1.

a. Одно μ -стекло VI 0,4 (ibidi GmbH, Germany, с этого момента обозначаемое как μ -стекло) покрывали фибронектином (100 мкг/мл): 30 мкл через загрузочное отверстие. Их инкубировали в течение 1 ч при 37°C (или использовали предварительно покрытое стекло).

b. Фибронектин удаляли, с последующей промывкой средой для HUVEC.

c. HUVEC трипсинизировали с 6-луночного планшета (количество: 2×10^5 /мл (всего 2 мл)).

d. Их отмывали и разводили до 1×10^6 клеток/мл.

e. 30 мкл HUVECs наносили через загрузочные отверстия на μ -стекло и проверяли под микроскопом.

f. μ -стекло накрывали крышкой и инкубировали при 37°C, 5%CO₂.

Сутки 2.

a. HUVEC активировали TNF α (10 нг/мл) и IFN γ (10 нг/мл) в каналах 2-5 μ -стекла (см. таблицу ниже): всю среду отбирали из каналов и замещали цитокин-содержащей предварительно прогретой средой.

Сутки 3.

a. Выделяли Т-клетки (негативное изолирование из пан-Т-клеток).

b. В параллельном режиме 2 4 лунки на 96-луночном планшете для ELISA (Nunc maxisorb) покрывали 200 мкл антитела к GDF-15 (10 мкг/мл, разведенного в PBS), инкубировали в течение 45 мин, а затем промывали PBS.

c. Для истощения супернатанта из клеточной линии меланомы UACC257, которая секретирует GDF-15 (данные не показаны), по GDF-15, супернатант инкубировали в лунках планшета для ELISA

(см. b), которые были предварительно покрыты антителом к GDF-15.

d. В качестве контроля супернатант из клеточной линии меланомы UACC257 инкубировали в лунках планшета для ELISA (см. b), которые не были предварительно покрыты антителом к GDF-15

e. Т-клетки предварительно инкубировали в 12-луночном планшете для клеточных культур (1×10^6 клеток/мл) с GDF-15 (100 нг/мл), без GDF-15, в супернатанте из клеточной линии меланомы UACC257, истощенном по GDF-15 (см. c) или в супернатанте из клеточной линии меланомы UACC257, содержащем GDF-15 (см. d) в течение 1 ч.

f. Инкубатор для предметного столика микроскопа предварительно прогревали, и присоединяли газовую смесь (5% CO₂, 16% O₂, 79% N₂).

g. Получали 4 пробирки по 2 мл для микрофлюидной проточной системы.

i. Т-клетки (1×10^6 клеток/мл): 1 мл ii. Т-клетки с GDF15 (1×10^6 клеток/мл): 1 мл iii. Т-клетки с UACC 257 (содержащие GDF-15) iv. Т-клетки UACC 257, истощенные по GDF-15.

a. Пробирку 1 соединяли с каналом 1 (см. таблицу ниже) и запускали поток (0,4 мл/мин=24 мл/ч).

b. Т-клетки протекали в течение 3 мин и за это время, 5 полей зрения были предопределены под микроскопом.

c. Каждое поле зрения видеорегистрировалось в течение 5 с.

d. Остальные каналы оценивали по аналогии с каналом 1 (f-h) с образцами Т-клеток, как указано ниже в таблице.

Номер канала	Эндотелиальные клетки	T-клетки в потоке	Комментарии
1	Нестимулированные HUVEC	T-клетки	[отрицательный контроль]
2	Стимулированные HUVEC	T-клетки	[положительный контроль]
3	Стимулированные HUVEC	T-клетки с GDF-15	
4	Стимулированные HUVEC	T-клетки с UACC 257	
5	Стимулированные HUVEC	T-клетки с UACC 257, истощенными по GDF-15 при помощи	
		антитела к GDF-15	

Рекомбинантные GDF-15 получали от Invigat GmbH, Jena, Germany.

Результаты.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 10А. Эта фигура показывает анализ числа "катящихся" Т-клеток на поле зрения в су. Данные получали из канала # 1 (контрольные Т-клетки на нестимулированных HUVEC в качестве "отрицательного контроля"), канала # 2 (контрольные Т-клетки на стимулированных HUVEC в качестве "положительного контроля"), канала # 3 ("GDF-15"), канала # 4 ("UACC 257": Т-клетки, культивируемые в супернатанте клеток меланомы UACC 2 57, содержащем секретиремый GDF-15) и канала # 5 ("UACC257+анти-hGDF-15": Т-клетки, культивируемые в супернатанте клеток меланомы UACC 257, очищенном от секретиремого GDF-15 при помощи антитела к hGDF-15 B1-23).

По сравнению с Т-клетками, протекавшими над нестимулированными HUVEC ("отрицательный контроль", медиана=28 катящихся клеток в поле зрения за су), протекание Т-клеток по стимулированным HUVEC ("положительный контроль") увеличило количество катящихся клеток в поле зрения за су (медиана=46). Обработка Т-клеток hGDF-15 по существу уменьшает количество катящихся клеток в поле зрения за су (медиана=29). Кроме того, предварительная инкубация Т-клеток с супернатантом клеточной линии меланомы UACC257, которая секретирует GDF-15, по существу, уменьшает количество катящихся клеток в поле зрения за су (медиана=36) по сравнению с Т-клетками, протекающими по стимулированным HUVEC ("положительный контроль"). В отличие от этого, предварительная инкубация Т-клеток с супернатантом клеточной линии меланомы UACC257, обедненным секретиремым GDF-15 при помощи антитела к GDF-15 B1-23, привела к количеству катящихся клеток в поле зрения за су (медиана=45), которые были сопоставимы с Т-клетками, протекающими по стимулированным HUVEC ("положительный контроль").

Таким образом, по изобретению, ингибиторы hGDF-15 можно использовать для повышения адгезии Т-клеток, включая CD8+ клетки, к эндотелиальным клеткам, например, при лечении солидных злокачественных опухолей.

Кроме того, вышеописанный анализ обеспечивает простую систему *in vitro*, которую можно использовать для определения того является ли вещество, представляющее интерес ингибитором hGDF-15.

Подведение итогов.

Этот пример показывает, что GDF-15, включая GDF-15, секретиремый опухолевыми клетками, снижает адгезию Т-клеток к эндотелиальным клеткам. Таким образом, по изобретению, лечение с ингибиторами hGDF-15 можно использовать для увеличения адгезии Т-клеток, включая CD8+ Т-клетки, к эндотелиальным клеткам. Такое лечение увеличит проникновение Т-клеток, включая CD8+ Т-клетки, из потока крови в солидные злокачественные опухоли. Повышенное процентное содержание CD8+ Т-клеток в солидных злокачественных опухолях, которое будет являться результатом такого лечения с ингибиторами hGDF-15, является преимуществом, и его можно использовать в терапии злокачественной опухоли, например, иммунотерапии злокачественной опухоли. Поскольку введение CD8+ Т-клеток в солидные злокачественные опухоли и наличие этих CD8+ Т-клеток в солидных злокачественных опухолях особенно выгодно для терапевтических подходов с использованием блокаторов контрольных точек иммунного ответа, особенно выгодное использование ингибиторов hGDF-15 по изобретению представляет собой их использование в комбинации с блокаторами контрольных точек иммунного ответа.

Анализ потока/адгезии, включающий нейтрализацию антителами посредством антитела H1L5 (гуманизированное B1-23) и 01G06, и 03G05 (гуманизированные антитела к GDF-15, сконструированные согласно последовательностям из WO 2014/100689).

Этот эксперимент проводили для дальнейшего подтверждения наблюдаемых выше эффектов, включая обнаружение того, что ингибиторы hGDF-15 можно использовать для увеличения адгезии Т-

клеток к эндотелиальным клеткам или "качания" Т-клеток.

Экспериментальные процедуры.

Анализ потока/адгезии проводили, как описано выше в настоящем примере. Т-клетки предварительно инкубировали с 100 нг/мл GDF-15 в течение 1 ч или с 100 нг/мл GDF-15, который был предварительно инкубирован с 10 мкг/мл антитела в течение 1 ч. Применяли следующие антитела к GDF-15: H1L5 (гуманизированное B1-23), 01G06 и 03G05 (гуманизированные антитела к GDF-15, сконструированные согласно последовательностям из WO 2014/100689).

Результаты.

Результаты показаны на фиг. 10B. По сравнению с Т-клетками, протекавшими над нестимулированными HUVEC ("отрицательный контроль"), протекание Т-клеток по стимулированным HUVEC (положительный контроль) увеличило количество катящихся клеток в поле зрения за 20 с. Обработка Т-клеток hGDF-15 по существу уменьшила количество катящихся клеток в поле зрения за 20 с. В отличие от этого, предварительная инкубация Т-клеток с hGDF-15, который была предварительно инкубирован с антителами к GDF-15 H1L5 (гуманизированное B1-23), 01G06 или 03G05, привела к количеству катящихся клеток в поле зрения за 20 с, которое были по существу повышено по сравнению с образцом, где не добавляли антитело к GDF-15. Этот эффект присутствовал для всех исследуемых антител к GDF-15 и был наиболее выражен для антитела H1L5 (гуманизированное B1-23), которое почти полностью обратило вспять влияние hGDF-15 на качение Т-клеток.

Выводы.

Таким образом, по изобретению, ингибиторы hGDF-15 можно использовать для увеличения адгезии Т-клеток, включая CD8⁺ клетки, к эндотелиальным клеткам, или качения указанных Т-клеток, включая CD8⁺ клетки. В соответствии с изобретением ингибиторы hGDF-15 будут увеличивать процентное содержание CD8⁺ клеток в солидных злокачественных опухолях и их можно использовать для лечения этих злокачественных опухолей. Эти ингибиторы hGDF-15 могут быть (но не ограничиваются ими) любыми известными антителами к GDF-15, такими как антитела H1L5 (гуманизированное B1-23), 01G06 и 03G05.

Пример 4. Оценка противоопухолевой эффективности исследуемого антитела в комбинации с адъювантной иммунизацией у сингенных MC38^{tg hGDF-15+} мышей с опухолями.

Для того чтобы оценить, может ли ингибирование человеческого фактора роста дифференцировки (GDF)-15 улучшить ответ на иммунотерапию, и, в частности, ответ на иммунотерапию, которая требует присутствия CD8⁺ Т-клеток в опухоли, мышинные клетки рака толстого кишечника MC38 трансфицировали для экспрессии человеческого GDF-15 на уровнях, подобных тем, которые были найдены в человеческих линиях злокачественных клеток. По оценке твердофазного иммуноферментного анализа

(ELISA, R&D Systems, Mouse GDF-15 DuoSet ELISA), клетки MC38 не экспрессировали детектируемые уровни мышинового GDF-15 (предел детекции: 7,81 пг/мл).

На сутки 0, 9-недельных самок мышей C57BL/6J (предоставленных Charles River Laboratories, BP 0109, F 69592 L'Arbresle, Cedex) анестезировали и подкожно вводили 2×10^5 клеток MC38^{tg hGDF-15}. Лечение антителом к GDF-15 (20 мг/кг массы тела, т.е. примерно 400 мкг на мышь в 100 мкл фосфатно-солевого буфера с 0,5% бычьего сывороточного альбумина) было начато на сутки 0 (приблизительно через 6 ч после внесения опухолевых клеток) и повторено на сутки 3, 7, 10, 14, 17 и 21. В сутки 13, когда опухоли достигли объема в пределах 100-150 мм³, животные были рандомизированы по различным группам лечения, и соответствующим животным вводили внутрибрюшинную инъекцию с адъювантом (100 мкг полиинозиновой:полицитидиловой кислоты (полиомиелиновой кислоты) (поли-ICLC (Hiltonol®, Oncovir, Washington D.C., USA)), и 50 мкг антитела к мышинному (m)CD40 InVivoMAb (клон FGK4.5/FGK45)) в общем объеме 50 мкл фосфатно-солевого буфера.

Из-за своего структурного сходства с двухцепочечной РНК, которая присутствует в некоторых вирусах и стимулирует TLR3, поли-ICLC имитирует инфекцию. Антитело-агонист к CD40 предоставляет дополнительный сигнал антигенпредставляющим клеткам. "Лицензирование" дендритных клеток посредством стимуляции CD40 поддерживает активацию антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток. Адъювантное лечение, таким образом, служит для индуцирования опухолеспецифических иммунных клеток у мышей, содержащихся в особых условиях без патогенов (Yadav M et al., Nature. 2014 Nov 27; 515 (7528):572-6).

Это адъювантное лечение, таким образом, представляет собой модельную систему для иммунотерапии злокачественной опухоли, которая требует присутствия иммунных клеток в опухоли, и, в частности, CD8⁺Т-клеток в опухоли. Таким образом, это модельная система, которая подходит для дополнительного подтверждения того, что лечение с ингибитором hGDF-15, так как антитело к hGDF-15 синергично с иммунотерапией злокачественной опухоли, в том числе, иммунотерапией злокачественной опухоли, которая требует присутствия CD8⁺ Т-клеток в опухоли.

Резюмируя, были исследованы следующие группы животных (10 мыши на группу):

группа, принимавшая носитель без иммунизации адъювантом;

группа, которую лечили антителом к hGDF-15 без иммунизации адъювантом;

группа, принимавшая носитель с иммунизацией адьювантом;
группа, которую лечили антителом к hGDF-15 с иммунизацией адьювантом.

Размер опухоли измеряли 3 раза в неделю путем измерения циркулем длины и ширины опухоли.

Мышей умерщвляли, когда их объем опухоли превышал 2000 мм³, при расчете по формуле $V = \text{длина} \times \text{ширина}^2 / 2$. Аналогично, мышей умерщвляли, когда их ухудшение их состояния выходило за пределы общепринятые для благосостояния животных (потеря массы $\geq 15\%$, потеря подвижности, обессиленное поведение, плохое состояние меха).

Для выживших мышей наличие опухолей определялось медицинским осмотром до 57 суток после инокуляции опухоли. Результаты показаны на фиг. 11.

В предыдущем исследовании, проведенном авторами изобретения, было показано, что лечение антителом к GDF-15 само по себе может быть выгодно использовано для лечения злокачественной опухоли, но не полностью уничтожает опухоли, т.е. не вылечивает злокачественную опухоль. Аналогичным образом, на фиг. 11 не были вылечены ни мыши, обработанные носителем, ни мыши, которых обрабатывали только антителом к hGDF-15. Лечение с помощью адьюванта (т.е. с поли-ICLC и антителом к CD40) вылечило 3 из 10 мышей. Примечательно, что когда лечение с адьювантом объединялось с лечением антителом к hGDF-15, 8 из 10 мышей были вылечены. Таким образом, лечение с антителом к hGDF-15 сильно синергично с лечением с адьювантом.

Выводы.

Результаты, полученные на этой модельной системе, еще раз подтверждают, что ингибиторы hGDF-15 синергичны с иммунотерапией злокачественной опухоли, и, в частности, с иммунотерапией злокачественной опухоли, которая требует активации иммунных клеток, таких как CD8+ Т-клетки, которые затем оказывают цитотоксическую активность в ткани опухоли. Результаты также дополнительно подтверждают, что увеличение процентного содержания CD8+ Т-клеток в злокачественной опухоли, которое вызвано использованием ингибиторов hGDF-15 по изобретению, может благоприятно использоваться в терапии злокачественной опухоли.

В выбранных экспериментальных условиях мышьяная модель иммунной системы имеет очень мало времени для накопления антигенспецифического ответа CD8+ Т-клеток на быстрорастущую злокачественную опухоль. Таким образом, адьювант применяли для дополнительной поддержки спонтанного иммунного ответа в мышьяной системе. Напротив, у пациентов-людей, у которых злокачественные опухоли развиваются в течение более длительного периода времени (например, несколько лет), антигенспецифические Т-клетки, направленные против антигенов злокачественных опухолей, как правило, уже присутствуют при постановке диагноза, т.е. праймирование иммунного ответа, как правило, происходит даже до того, как диагностируется злокачественная опухоль. Эти специфические по отношению к опухолевым антигенам CD8+ Т-клетки уже существуют у людей, но в гораздо меньшей степени в мышьяной модельной системе. Таким образом, по изобретению, использование ингибиторов hGDF-15 будет еще более эффективным у людей, чем в нынешней модельной мышьяной системе. Таким образом, ингибиторы hGDF-15 могут эффективно использоваться для лечения пациентов-людей со злокачественными опухолями по изобретению, например, для увеличения процентного содержания CD8+ Т-клеток в солидной злокачественной опухоли, и они будут действовать синергически с другой иммунотерапией злокачественных опухолей у людей, и, в частности, с иммунотерапией злокачественных опухолей, которая требует присутствия CD8+ Т-клеток в злокачественной опухоли, в том числе с иммунотерапией злокачественных опухолей с блокаторами контрольных точек иммунного ответа, такими как антитела к PD-1 и антитела к PD-L1.

Пример 5. Сывороточные уровни GDF-15 определяют выживаемость пациентов с меланомой, которых лечат антителом к PD-1.

Исследование в этом примере проводили для дальнейшей проверки результатов, полученных в исследовании примера 1, например, подтверждение того, что hGDF-15 влияет на ответ пациентов на блокаторы контрольных точек иммунного ответа, путем дополнительного независимого исследования.

Следующие термины применяли в связи с этим исследованием.

"Цензурированный"=пациента удаляли из исследуемой когорты, когда при наблюдении не были доступны дополнительные данные.

"Событие"=пациент умер.

"Выживание"=пациент был жив при наблюдении.

Пациенты из отделения дерматологии университета Тюбингена, Германия, с гистологически подтвержденной меланомой были идентифицированы в базе данных центрального реестра по злокачественной меланоме (СММР), который проспективно регистрирует пациентов из более чем 60 дерматологических центров в Германии. Выбрали 99 пациентов, с (а) архивированными образцами сыворотки, (b) доступными последующими данными, (с) историей или наличием локального регионального или отдаленного метастаза в момент забора крови и (d) экспериментальным лечением антителом к PD-1. Цели и способы сбора данных СММР были ранее опубликованы в деталях (Lasithiotakis, KG et al., Cancer/107/1331-9, 2006). Данные, полученные для каждого пациента, включали возраст, пол, дату последнего наблюдения,

и дату и причину смерти, при наличии. Все пациенты дали письменное информированное согласие на запись клинических данных в реестр CMMR. Институциональный комитет по этике Тюбингена одобрил исследование (этическая резолюция 125/2015BO2). Приемлемые пациенты были в возрасте 18 лет и старше и имели гистологически или цитологически подтвержденную неоперабельную меланому стадии III или IV, не поддающуюся местной терапии; и показали прогрессирование заболевания, несмотря на то, что они получали предшествующую терапию в соответствии с современными рекомендациями. Пациенты с опухолями с мутацией BRAFV600 получали рекомендованную терапию первой линии или экспериментальное лечение, включающее ингибитор BRAF или MEK, или оба. Предшествующее лечение ипилимумабом, при наличии, считалось неудачным, если пациенты получили минимум две дозы, 3 мг/кг раз в 3 недели, но продемонстрировали подтвержденное прогрессирование заболевания в течение 24 недель от последней дозы ипилимумаба. Перед введением антитела к PD-1 требовалось разрешение или улучшение побочных явлений, связанных с ипилимумабом до степени 0-1 и доза преднизона 10 мг/сутки или меньше в течение, по меньшей мере, 2 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства. Приемлемые пациенты имели общее состояние по шкале Восточной объединенной группы онкологов (ECOG) 0 или 1; измеряемое заболевание по Критериям оценки ответа при солидных опухолях, версия 1.1 (RECIST v1.1); и значения в пределах заданного диапазона для абсолютного числа нейтрофилов (≥ 1500 клеток на мл), тромбоцитов (≥ 100000 клеток на мл), гемоглобина (≥ 90 г/л), сывороточного креатинина ($\leq 1-5$ верхней границы нормы [ULN]), общий билирубин сыворотки ($\leq 1-5$ ULN или прямой билирубин \leq ULN для пациентов с общей концентрацией билирубина $> 1-5$ ULN), аспартат и аланин аминотрансферазы ($\leq 2-5$ ULN или ≤ 5 ULN для пациентов метастазами в печени), международное нормализованное соотношение или протромбиновое время ($\leq 1-5$ ULN без использования антикоагулянтов), и активированное частичное тромбопластиновое время ($\leq 1-5$ ULN без использования антикоагулянтов). У пациентов был отмывочный период, по меньшей мере, 4 недели между последней дозой самой последней терапии и первой дозой пембролизумаба или ниволумаба.

Анализ сывороточных уровней hGDF-15 путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Сывороточные уровни человеческого GDF-15 измеряли путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Буферы и реагенты.

Забуференный блокирующий раствор: 1% BSA (фракция V pH 7,0, PAA, Pasching, Austria) в PBS

Отмывающий раствор: PBS-Tween (0,05%).

Стандарт: человеческий GDF-15 (стоковая концентрация 120 мкг/мл, от R&D Systems).

Захватывающее антитело: MAb к человеческому GDF-15 (клон 147627) от R&D Systems, мышинный IgG2B (каталожный #MAB957, от R&D Systems, стоковая концентрация 360 мкг/мл).

Детектирующее антитело: Биотинилированное, аффинно очищенное Pab к человеческому GDF-15, козий IgG (каталожный #BAF940, от R&D Systems, стоковая концентрация 9 мкл/мл).

Стрептавидин-HRP (каталожный #DY998, из R&D Systems).

Раствор субстрата: 10 мл 0,1 М NaOAc pH6,0+100 мкл TMB+2 мкл H₂O₂.

Останавливающий раствор: 1 М H₂SO₄.

Процедура анализа.

1. Получение планшета.

a. Захватывающее антитело разбавляли до рабочей концентрации 2 мкг/мл в PBS. 96-луночный микропланшет (Nunc maxisorp®) сразу же покрывали разведенным захватывающим антителом по 50 мкл на лунку, за исключением внешних рядов (A и H). Ряды A и H заполняли буфером, чтобы избежать испарения образцов во время эксперимента. По планшету легонько постукивали, чтобы убедиться, что дно каждой лунки полностью покрыто. Планшет помещали во влажную камеру и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре (RT).

b. Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).

c. Добавляли к каждой лунке 150 мкл блокирующего раствора, с последующей инкубацией при RT в течение 1 ч.

d. Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).

2. Процедура анализа:

a. Готовили стандарты. GDF-15 разбавляли в забуференном блокирующем растворе до конечной концентрации 1 нг/мл (4,17 мкл GDF+496 мкл забуференного блокирующего раствора). Готовили серийные разведения 1:2.

b. Получали дублирующие образцы 1:20 (6 мкл+114 мкл забуференного блокирующего раствора).

c. Добавляли на лунку 50 мкл разведенных образцов или стандартов, с последующей инкубацией при RT в течение 1 ч.

	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	Серийные разведения стандартов											
G												
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).
- Детектирующее антитело разбавляли до конечной концентрации 50 нг/мл (56 мкл+10 мл блокирующего буфера). 50 мкл разведенного детектирующего антитела добавляли к каждой лунке, с последующей инкубацией при RT в течение 1 ч.
- Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).
- Стрептавидин-HRP разбавляли 1:200 (50 мкл+10 мл блокирующего буфера). 50 мкл рабочего раствора Стрептавидин-HRP добавляли к каждой лунке, с последующей инкубацией при RT в течение 20 мин.
- Отбирали содержимое каждой лунки и промывали ее три раза PBS-Tween (0,05%).
- Получали раствор субстрата. 50 мкл раствора субстрата добавляли к каждой лунке, с последующей инкубацией при RT в течение 20 мин.
- К каждой лунке добавляли 50 мкл останавливающего раствора.
- Сразу же определяли оптическую плотность каждой лунки с использованием микроспектрофотометра для чтения планшетов, установленного на 450 нм.

3. Расчет титра GDF-15 в сыворотке:

- Каждый образец/разведение стандарта GDF-15 наносили в двух повторениях. Для определения титра GDF-15, рассчитывали среднее двух повторов и вычитали фон (образец без GDF-15).
- Для получения стандартной кривой значения из линейного диапазона наносили на диаграмму X-Y (ось X: концентрация GDF-15, ось Y: OD450), и делали подгонку линейной кривой. Титр GDF-15 в сыворотке тестируемых образцов рассчитывали путем интерполяции значений OD450 стандартных разведений с известной концентрацией.
- Для расчета конечной концентрации GDF-15 в образцах учитывали определенный коэффициент разведения. Образцы, показывающие значения OD ниже или выше стандартного диапазона анализировали заново при соответствующих разведениях.

Сравнение сывороточных уровней hGDF-15 с данными пациентов.

Затем измеренные сывороточные уровни hGDF-15 сравнивали с данными ответов пациентов на лечение, полученными в исследовании.

Статистическая корреляция сывороточных уровней hGDF-15 с данными пациентов:

Данные.

Анализ данных проводили на основании файла с данными, содержащего данные из образцов для 99 пациентов, включающие колонки (переменные) обозначение образца, GDF-15 (нг/мл), отвечающие/не отвечающие, суток (до смерти или цензурирования), и продолжение (индексная переменная для текущей жизни).

Выходные параметры (конечные точки):

a. Общая выживаемость (время до смерти). Эта конечная точка состояла из индикатора события смерти (1=умер/0=жив), который получали из файла с данными, и времени до смерти или цензурирования (последняя точка времени, когда было известно, что пациент жив), соответствующего переменной "сутки".

b. Ответ на лечение, например, отвечал ли пациент на лечение или нет (кодировали как 1=отвечал).

Анализ данных.

Период последующего наблюдения для анализа выживаемости определяли с даты отбора проб крови до последнего наблюдения (т.е. последней информации, полученной от пациента) или смерти. Все образцы крови брали в течение суток до лечения антителом к PD1. Для анализа общей выживаемости пациенты, которые были живы при последнем наблюдении, подвергались цензурированию, а пациенты, которые умерли, считались "событием". Кумулятивные вероятности выживания по Каплану-Мейеру рассчитывали вместе с 95% доверительными интервалами (CI) и сравнивали с использованием двухсторонних логарифмических ранговых критериев, р-значения для общей выживаемости рассчитываются по двухсторонним логарифмическим ранговым критериям. Одна модель была с групповой переменной на основе GDF-15 как категориального предиктора (группы: <1,5 нг/мл (n=62), ≥1,5 нг/мл (n=37) или GDF-15^{низкий} (n=49), GDF-15^{высокий} (n=50), на основании расщепления медианы). Полученные кривые Каплана-Мейера показаны на фигурах 12 и 13, где цензурирование обозначено вертикальными линиями. Дополнительно, следующие таблицы содержат краткое изложение случаев (табл. 9), данные о выживании па-

циентов для групп пациентов, имеющих уровни GDF-15 <1,5 нг/мл и ≥1,5 нг/мл (табл. 10 и 11) и общие статистические сравнения групп пациентов, имеющих уровни GDF-15 <1,5 нг/мл и ≥1,5 нг/мл (табл. 12).

Таблица 9

Краткое изложение случаев

	Число	Число событий	Цензурированные	
			Н*	% выживания
GDF-15 <1,5 нг/мл	62	11	51	82,3%
GDF-15 ≥1,5 нг/мл	37	18	19	51,4%
Всего	99	29	70	70,7%

*Н=без события.

Таблица 10

Среднее и медиана для выживаемости (число суток выживания)

	Среднее ^а				Медиана	
	Оценка	Стандартная ошибка	95%-доверительный интервал		Оценка	Стандартная ошибка
			Нижний предел	Верхний предел		
<1,5 нг/мл	701,928	44,172	615,350	788,506	n/d.	n/d.
≥1,5 нг/мл	381,683	48,882	285,875	477,491	309,000	127,570
Всего	569,056	44,477	481,882	656,231	n/d.	n/d.

а. После цензурирования оценка ограничена наиболее долгим известным выживанием.

n/d: невозможно рассчитать медиану данных выживаемости из-за наличия менее >50% выживших в группе.

Таблица 11

Среднее и медиана для длительности выживания (число суток выживания)

	Медиана ^а	
	95%-доверительный интервал	
	Нижний предел	Верхний предел
<1,5 нг/мл	n/d.	n/d.
≥1,5 нг/мл	58,963	559,037
Всего	n/d.	n/d.

а. После цензурирования оценка ограничена наиболее долгим известным выживанием.

n/d: невозможно рассчитать медиану данных выживаемости из-за наличия менее >50% выживших в группе.

Таблица 12

Общие сравнения

	Chi-квадрат	df*	Значимость
Логарифмический критерий (Кокса-Мантеля)	8,129	1	.004

*df=степени свободы.

Тест на равное распределение выживаемости для различных уровней GDF-15 <1,5 нг/мл, ≥1,5 нг/мл).
Результаты и выводы.

Вышеуказанные статистические результаты этого примера дополнительно подтвердили результаты примера 1. Например, они подтверждают, что вероятность ответа на лечение, на что указывает выживаемость пациентов, значительно снижается с увеличением уровней hGDF-15 в сыворотках пациентов. Например, табл. 12 показывает, что выживаемость между двумя группами пациентов, имеющими уровни GDF-15 <1,5нг/мл и ≥1,5нг/мл, соответственно, значимо различалась, о чем свидетельствует уровень значимости 0,004. Аналогичным образом, табл. 9 демонстрирует, что в группе, имеющей уровни GDF-15 <1,5нг/мл, выжило более высокое процентное содержание пациентов (82,3%), и табл. 10 и 11, и фиг. 12 и 13 демонстрируют, что для пациентов с уровнями GDF-15 <1,5нг/мл, время выживания было заметно длиннее, чем у пациентов с уровнями GDF-15 ≥1,5нг/мл.

Таким образом, результаты этого примера дополнительно подтверждают, что hGDF-15 оказывает негативное влияние на ответы пациентов на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа. Таким образом, по изобретению, ингибитор hGDF-15 будет полезен для ингибирования отрицательных эффектов hGDF-15 на ответы пациентов на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа, и для улучшения ответов пациентов на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа не только при меланоме, но и при всех солидных злокачественных опухолях, упоминаемых в настоящем документе.

Пример 6. При немелкоклеточном раке легкого человека (NSCLC).

пациентов лечили антителом к PD1; медианы сывороточных уровней hGDF-15 у пациентов с прогрессирующим заболеванием были выше, чем у пациентов, демонстрирующих частичный ответ.

Этот пример проводили с целью дальнейшей проверки результатов, полученных в исследовании из примера 1, например, подтверждение того, что hGDF-15 влияет на реакцию пациентов на блокаторы контрольных точек иммунного ответа, в дополнительном самостоятельном исследовании при другой солидной злокачественной опухоли.

Пациенты.

Пациентов с NSCLC лечили антителами к PD1 в соответствии с одобренной инструкцией по применению антител к PD1. Пациенты включали пациентов, которых ранее лечили другой терапией против злокачественной опухоли. В связи с тем фактом, что у пациентов с NSCLC редко наблюдается полный ответ, группа пациентов включала пациентов, демонстрирующих прогрессирующее заболевание и показывающих частичный ответ при лечении против PD-1, но не пациентов, показывающих полный ответ при лечении против PD-1.

Образцы сыворотки.

Образцы сыворотки брали у пациентов перед лечением антителами к PD1.

Анализ сывороточных уровней hGDF-15 путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Сывороточные уровни hGDF-15 в образцах сыворотки анализировали путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), как описано в примере 1.

Результаты.

Получали сывороточные уровни hGDF-15 у 5 пациентов, показывающих частичный ответ при лечении с анти-PD-1, и у 5 пациентов, показывающих прогрессирующее заболевание при лечении с помощью анти-PD-1. Примечательно, что средний уровень hGDF-15 в сыворотке у пациентов с частичным ответом составлял 0,55 нг/мл, тогда как средний уровень hGDF-15 в сыворотке у пациентов с прогрессирующим заболеванием составлял 1,56 нг/мл. Таким образом, средний уровень hGDF-15 в сыворотке у пациентов, демонстрирующих прогрессирующее заболевание, был приблизительно в 2,8 раза выше, чем у пациентов, проявляющих частичный ответ.

Выводы.

Результаты этого примера дополнительно подтверждают, что уровни hGDF-15 отрицательно коррелируют с ответом пациентов на блокаторы контрольных точек иммунного ответа. Результаты этого примера также подтверждают, что hGDF-15 оказывает отрицательное влияние на ответы пациентов на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа, таких как PD-1. Таким образом, по изобретению, ингибитор hGDF-15 будет полезен для ингибирования отрицательных эффектов hGDF-15 на ответы пациентов на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа, и для улучшения ответов пациентов на лечение блокаторами контрольных точек иммунного ответа не только при меланоме, но и при раке легкого, таком как NSCLC, и при всех других солидных злокачественных опухолях, упоминаемых в настоящем документе.

Пример 7. Сывороточные уровни hGDF-15 не коррелируют значимо с мутационной нагрузкой опухолей.

Мутационная нагрузка является известным положительным прогностическим фактором для ответа пациентов со злокачественной опухолью на блокаторы контрольных точек иммунного ответа. Как правило, злокачественные клетки несут геномные мутации, которые приводят к образованию антигенов злокачественных клеток, которые являются специфичными для злокачественных клеток и отличаются от антигенов незлокачественных клеток. Высокая мутационная нагрузка приводит к большому числу таких

опухолеспецифических антигенов. В злокачественных опухолях, несущих такое большое количество антигенов, специфических для злокачественных клеток, стимуляция иммунного ответа блокаторами контрольных точек иммунного ответа считается особенно эффективной, поскольку больше антигенов, специфических для злокачественных клеток, доступны в качестве целевых антигенов для иммунного ответа.

Чтобы еще раз подтвердить, что hGDF-15 не только является суррогатным маркером мутационной нагрузки опухолей, и для того, чтобы еще раз подтвердить, что лечение ингибиторами hGDF-15 действует через механизм, который не зависит от мутационной нагрузки опухоли, уровни мРНК hGDF-15 в образцах злокачественной опухоли от пациентов со злокачественной опухолью были сопоставлены с количеством соматических мутаций, выявленных в злокачественных опухолях. Соматические мутации определяли путем использования секвенирования экзонов. Данные анализировали с использованием веб-инструмента UZH из университетской больницы Цюриха (Cheng PF et al. : Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly.* 2015 Sep 16;145:w14183.). Результаты показаны на фиг. 14. Фиг. 14А показывает график данных пациентов со злокачественной опухолью, полученными из Атласа ракового генома (TCGA), учитывая только пациентов с высокодифференцированной злокачественной меланомой (Атлас ракового генома описан в ссылке Cheng PF et al. : Data mining The Cancer Genome Atlas in the era of precision cancer medicine. *Swiss Med Wkly.* 2015 Sep 16;145:w14183). Экспрессию GDF-15 оценивали путем нормализации с использованием пакета программного обеспечения RSEM ("RNA-Seq путем максимизации ожидания") (Li B и Dewey CN: RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics.* 2011 Aug 4; 12:323. doi: 10,118 6/1471-2105-12-323.). Фиг. 14В показывает график данных пациентов со злокачественной опухолью от 40 дополнительных пациентов с метастатической злокачественной меланомой из Университетского госпиталя Цюриха, которых анализировали отдельно.

Примечательно, что обе фиг. 14А и 14В показывают значение $p < 0,5$, что указывает на отсутствие значимой корреляции между мутационной нагрузкой в злокачественных опухолях и уровнями hGDF-15. Эти результаты еще раз подтверждают, что hGDF-15 не только является суррогатным маркером мутационной нагрузки опухолей, а что лечение с ингибиторами hGDF-15 действует через механизм, который не зависит от мутационной нагрузки опухоли.

Пример 8. Инфильтрация CD8⁺ Т-клетками опухолей дикого типа или опухолей, (сверх)экспрессирующих человеческий GDF-15.

В пилотном исследовании с использованием клеток рака толстого кишечника MC38 или дикого типа, или (сверх)экспрессирующих человеческий GDF-15, имплантированных в

правый бок иммунокомпетентных сингенных мышей C57BL/6, сверхэкспрессия GDF-15 была ассоциирована со сниженной инфильтрацией иммунными клетками. Изображения иммуноцитохимии для CD8a у мышей, умерщвленных через 29 суток носительства опухолей дикого типа или опухолей, сверхэкспрессирующих трансгенный (tg) hGDF15, показаны на фиг. 15. Как видно на фигуре, опухоли дикого типа содержат больше CD8a-положительных клеток, чем опухоли, сверхэкспрессирующие трансгенный (tg) hGDF15.

Эти результаты дополнительно подтверждают данные о том, что по настоящему изобретению, hGDF-15 уменьшает процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в солидных злокачественных опухолях, и что наоборот, ингибиторы hGDF-15, такие как антитела к GDF-15, можно использовать для увеличения процентного содержания CD8⁺ Т-клеток в солидной злокачественной опухоли у пациента-человека.

Промышленная применимость.

Комбинации ингибиторов, композиции и наборы по настоящему человека могут быть промышленно произведены и проданы как продукты для заявленных способов и применений (например, для лечения злокачественной опухоли, как определено в настоящем документе), в соответствии с известными стандартами для получения фармацевтических препаратов. Таким образом, настоящее изобретение имеет промышленную применимость.

Ссылки.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Eisenhauer et al.: 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 et al.: IMGIT/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 et al.: "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; и способы в соответствии с

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

Holliger P et al.: ""Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments." Proc Natl Acad Sci U S A. 1993

Jul 15;90(14):6444-8.

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

Huang CY et al.: "Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15." Clin Cancer Res. 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 et al.: "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 et al.: "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 et al.: Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983.

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

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

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

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

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

Sambrook et al.: "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. et al., Eur.J.Mass Spectrom. 13, 69-75 (2007)

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

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

Van der Burg SH, et al.: "Immunoguiding, the final frontier in the immunotherapy of cancer." (2014) In Cancer Immunotherapy

meets oncology (CM Britten, S Kreiter, M. Diken & HG Rammensee eds). Springer International Publishing Switzerland p37-51 ISBN: 978-3-319-05103-1.

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

Yadav M et al.: Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. Nature. 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 et al. 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

WO 2014/100689

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение ингибитора hGDF-15 для повышения процентного содержания CD8⁺ Т-клеток в солидной злокачественной опухоли у пациента-человека, где применение представляет собой применение для лечения злокачественной опухоли путем иммунотерапии злокачественной опухоли, где ингибитор представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с hGDF-15, или его hGDF-15-связывающую часть,

где применение представляет собой применение в комбинации с блокатором контрольных точек иммунного ответа, и где блокатор контрольных точек иммунного ответа выбирают из одной или более следующих групп, состоящих из:

- i) ингибитора человеческого PD-1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-1; и
- ii) ингибитора человеческого PD-L1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-L1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-L1.

2. Применение по п.1, где пациент представляет собой пациента, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,2 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15, где пациент предпочтительно представляет собой пациента, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,5 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15, и где пациент более предпочтительно представляет собой пациента, который имеет уровень hGDF-15 в сыворотке, по меньшей мере, 1,8 нг/мл до начала введения ингибитора hGDF-15.

3. Применение по п.1 или 2, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из мelanомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичек, рака яичников, рака эндометрия, рака шейки матки, рака головного мозга, рака молочной железы, рака желудка, почечноклеточной карциномы, саркомы Юинга, немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких, где злокачественная опухоль предпочтительно выбрана из группы, состоящей из мelanомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичек, рака яичников, рака эндометрия и рака шейки матки, и где злокачественная опухоль более предпочтительно выбрана из группы, состоящей из мelanомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака и рака желудка.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из мelanомы, плоскоклеточной карциномы полости рта, колоректального рака и рака предстательной железы.

5. Применение по любому из предшествующих пунктов, где злокачественная опухоль является мelanомой.

6. Применение по любому из предшествующих пунктов, где связывание представляет собой связывание

вание с конформационным или прерывистым эпитопом на hGDF-15, и где конформационный или прерывистый эпитоп состоит из аминокислотных последовательностей SEQ ID No: 25 и SEQ ID No: 26.

7. Применение по п. 5 или 6, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит варибельный домен тяжелой цепи, который включает область CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, область CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и область CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит варибельный домен легкой цепи, который включает область CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, область CDR2, содержащую аминокислотную последовательность ser-ala-ser, и область CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

8. Применение по любому из предшествующих пунктов, где применение представляет собой применение для лечения метастазов злокачественной опухоли.

9. Применение по любому из предшествующих пунктов, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в злокачественной опухоли за счет повышения адгезии CD8⁺ Т-клеток к эндотелиальным клеткам и, таким образом, повышения проникновения CD8⁺ Т-клеток из кровотока в злокачественную опухоль.

10. Применение по любому из предшествующих пунктов, где блокатор контрольных точек иммунного ответа содержит моноклональное антитело, способное связываться с человеческим PD-1, или его антигенсвязывающую часть.

11. Применение по любому из предшествующих пунктов, где блокатор контрольных точек иммунного ответа содержит моноклональное антитело, способное связываться с человеческим PD-L1, или его антигенсвязывающую часть.

12. Композиция для лечения солидной злокачественной опухоли, где композиция содержит ингибитор hGDF-15 и блокатор контрольных точек иммунного ответа, где ингибитор представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с hGDF-15, или его hGDF-15-связывающую часть, где блокатор контрольных точек иммунного ответа выбирают из одной или более следующих групп, состоящих из:

i) ингибитора человеческого PD-1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-1; и

ii) ингибитора человеческого PD-L1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-L1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-L1.

13. Композиция по п.12, где ингибитор hGDF-15 такой, как определено в п.6 или 7.

14. Композиция по п.12 или 13, где блокатор контрольных точек иммунного ответа такой, как определено в п.10 или 11.

15. Применение композиции по любому из пп.12-14 для лечения солидной злокачественной опухоли.

16. Набор для лечения солидной злокачественной опухоли, где набор содержит ингибитор hGDF-15 и по меньшей мере один блокатор контрольных точек иммунного ответа, где ингибитор представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с hGDF-15, или его hGDF-15-связывающую часть, где блокатор контрольных точек иммунного ответа выбирают из одной или более следующих групп, состоящих из:

i) ингибитора человеческого PD-1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-1; и

ii) ингибитора человеческого PD-L1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-L1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-L1.

17. Набор по п.16, где ингибитор hGDF-15 такой, как определено в п.6 или 7.

18. Набор по п.16 или 17, где блокатор контрольных точек иммунного ответа такой, как определено в п.10 или 11.

19. Набор по любому из пп.16-18, где ингибитор hGDF-15 и один, или несколько, или все из блокаторов контрольных точек иммунного ответа содержатся в отдельных контейнерах или в одном контейнере.

20. Применение набора или композиции по любому из пп.15-19 для лечения солидной злокачественной опухоли.

21. Применение по п.20, где применение представляет собой применение для иммунотерапии злокачественной опухоли.

22. Применение по п.21, где злокачественная опухоль такая, как определено в п.3, 4 или 5.

23. Применение ингибитора hGDF-15 для иммунотерапии злокачественной опухоли, при этом применение представляет собой применение для лечения солидной злокачественной опухоли при помощи блокатора контрольных точек иммунного ответа у пациента-человека, где ингибитор представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с hGDF-15, или его hGDF-15-связывающую часть, где блокатор контрольных точек иммунного ответа выбирают из одной или более следующих групп, состоящих из:

- i) ингибитора человеческого PD-1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-1; и
- ii) ингибитора человеческого PD-L1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-L1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-L1.

24. Применение по п.23, где пациент такой, как определено в п.2.

25. Применение по п.23 или 24, где злокачественная опухоль такая как определено в п.3, 4 или 5.

26. Применение по любому из пп.23-25, где ингибитор hGDF-15 такой как определено в п.6 или 7.

27. Применение по любому из пп.23-26, где блокатор контрольных точек иммунного ответа такой, как определено в п.10 или 11.

28. Применение по любому из пп.23-27, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в злокачественной опухоли.

29. Применение по п.28, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в злокачественной опухоли за счет повышения адгезии CD8⁺ Т-клеток к эндотелиальным клеткам или "прокатывания" CD8⁺ Т-клеток на эндотелиальных клетках и, таким образом, повышения проникновения CD8⁺ Т-клеток из кровотока в злокачественную опухоль.

30. Применение комбинации ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа для лечения солидной злокачественной опухоли у пациента-человека, где применение представляет собой применение для иммунотерапии злокачественной опухоли, где ингибитор представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с hGDF-15, или его hGDF-15-связывающую часть, где блокатор контрольных точек иммунного ответа выбирают из одной или более следующих групп, состоящих из:

- i) ингибитора человеческого PD-1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-1; и
- ii) ингибитора человеческого PD-L1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-L1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-L1.

31. Применение комбинации ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа по п.30, где пациент такой, как определено в п.2.

32. Применение комбинации ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа по п.30 или 31, где злокачественная опухоль такая, как определено в п.3, 4 или 5.

33. Применение комбинации ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа по любому из пп.30-32, где ингибитор hGDF-15 такой, как определено в п.6 или 7.

34. Применение комбинации ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа по любому из пп.30-33, где блокатор контрольных точек иммунного ответа такой, как определено в п.10 или 11.

35. Применение комбинации ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа по любому из пп.30-34, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в злокачественной опухоли.

36. Применение комбинации ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа по п.35, где ингибитор hGDF-15 повышает процентное содержание CD8⁺ Т-клеток в злокачественной опухоли за счет повышения адгезии CD8⁺Т-клеток к эндотелиальным клеткам, и, таким образом, повышения проникновения CD8⁺ Т-клеток из кровотока в злокачественную опухоль,

и где предпочтительно, указанное повышение адгезии CD8⁺ Т-клеток к эндотелиальным клеткам повышает "прокатывание" CD8⁺ Т-клеток на эндотелиальных клетках таким образом, что повышается указанное проникновение CD8⁺ Т-клеток из кровотока в солидную злокачественную опухоль.

37. Применение по любому из пп.1-11, которое представляет собой применение в комбинации с полиинозиновой:полицитидиловой кислотой, или применение комбинации ингибитора hGDF-15 и блокатора контрольных точек иммунного ответа по любому из пп.30-36, где комбинация представляет собой комбинацию с полиинозиновой:полицитидиловой кислотой.

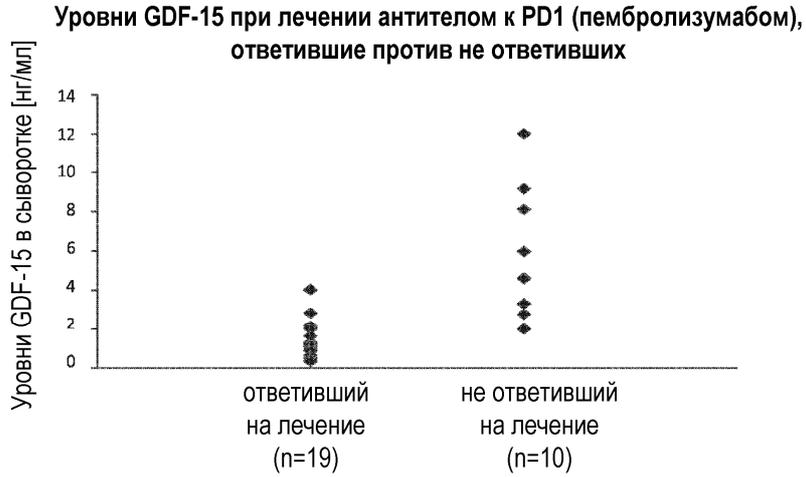
38. Применение по любому из пп.1-11 и 37, которое представляет собой применение в комбинации с иммуностимулирующим антителом к человеческому CD40, предпочтительно иммуностимулирующим моноклональным антителом к человеческому CD40, или применение комбинации по любому из пунктов 30-37, где комбинация представляет собой комбинацию с иммуностимулирующим антителом к человеческому CD40, предпочтительно иммуностимулирующим моноклональным антителом к человеческому CD40.

39. Применение комбинации ингибитора hGDF-15 и любого одного из следующих:

- a) полиинозиновая:полицитидиловая кислота;
- b) иммуностимулирующее антитело к человеческому CD40, предпочтительно иммуностимулирующее моноклональное антитело к человеческому CD40; или
- c) полиинозиновая:полицитидиловая кислота и иммуностимулирующее антитело к человеческому CD40, предпочтительно иммуностимулирующее моноклональное антитело к человеческому CD40, для лечения солидной злокачественной опухоли у пациента-человека, где комбинация включает блокатор контрольных точек иммунного ответа, выбранный из одной или более следующих групп, со-

стоящих из:

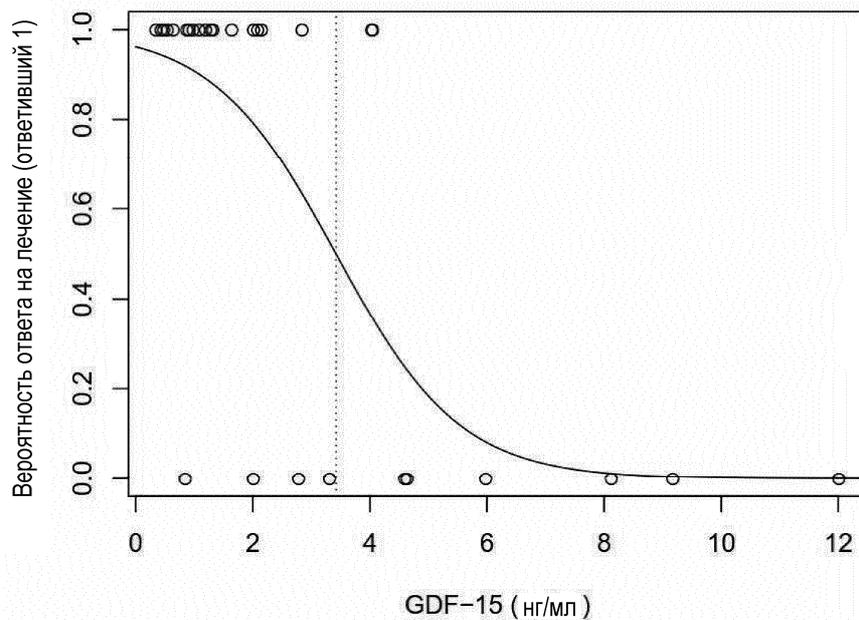
- i) ингибитора человеческого PD-1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-1; и
 - ii) ингибитора человеческого PD-L1, причем ингибитор является моноклональным антителом, способным связываться с человеческим PD-L1, или его частью, связывающейся с человеческим PD-L1,
- и где ингибитор представляет собой моноклональное антитело, способное связываться с hGDF-15, или его hGDF-15-связывающую часть.



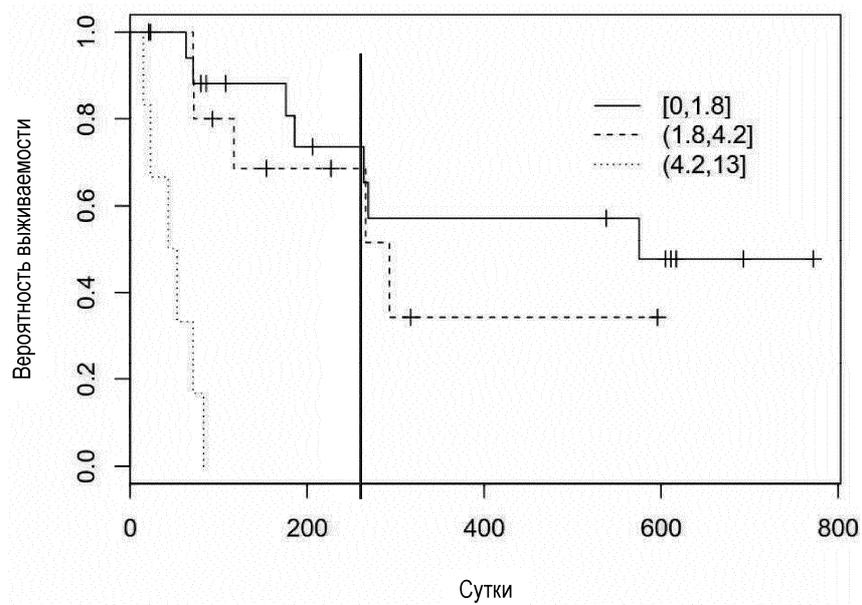
Фиг. 1



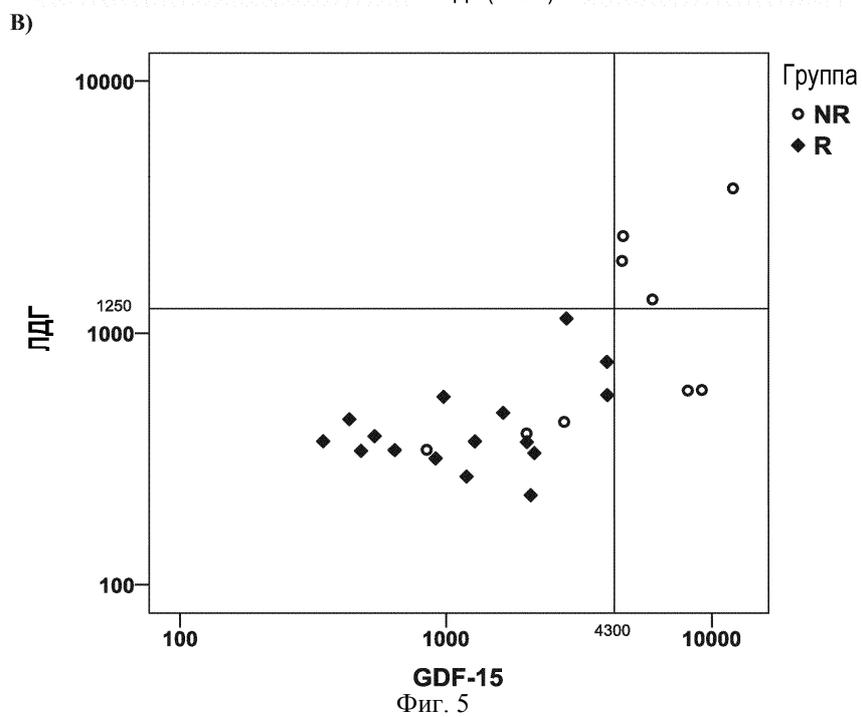
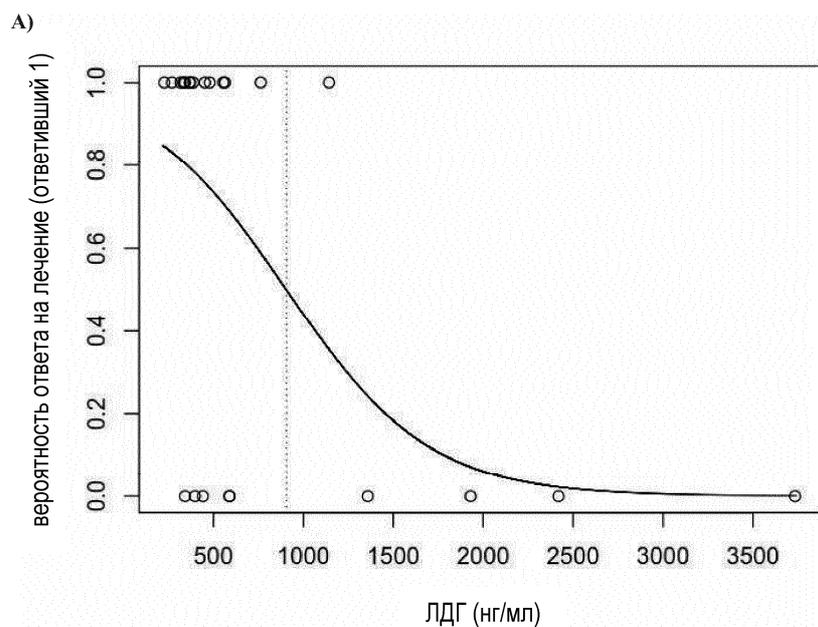
Фиг. 2



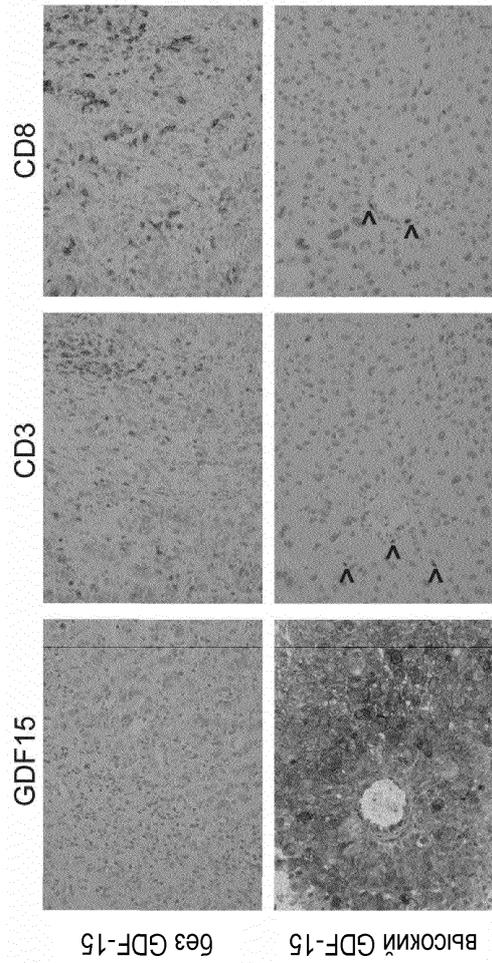
Фиг. 3



Фиг. 4

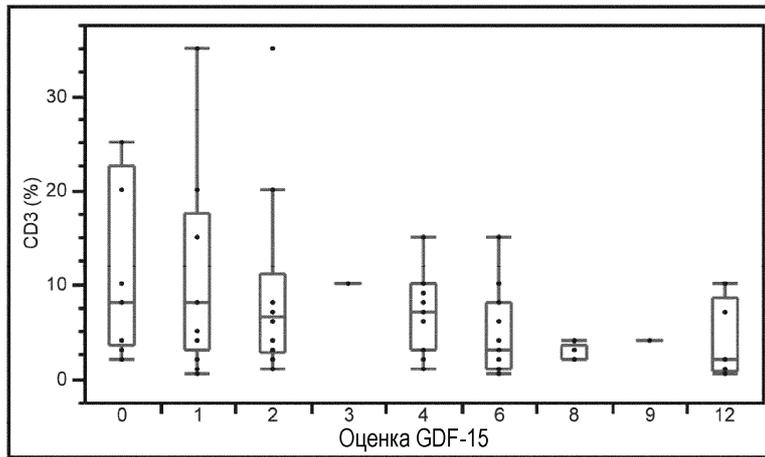


Фиг. 5



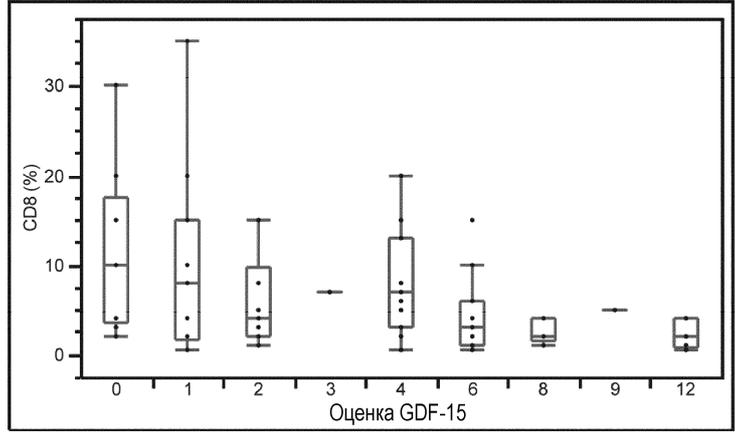
Фиг. 6

А)



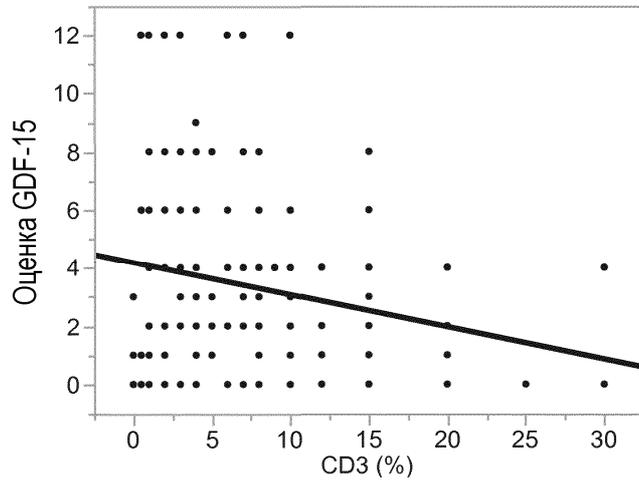
Ранговая корреляция Спирмана
 Коэффициент Спирмана: -0,3717
 $p=0,0015$

В)

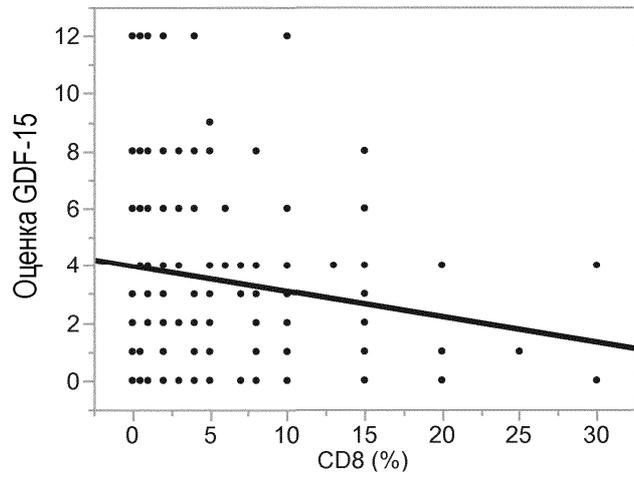


Ранговая корреляция Спирмана
Коэффициент Спирмана: -0,3390
 $p=0,0038$

Фиг. 7



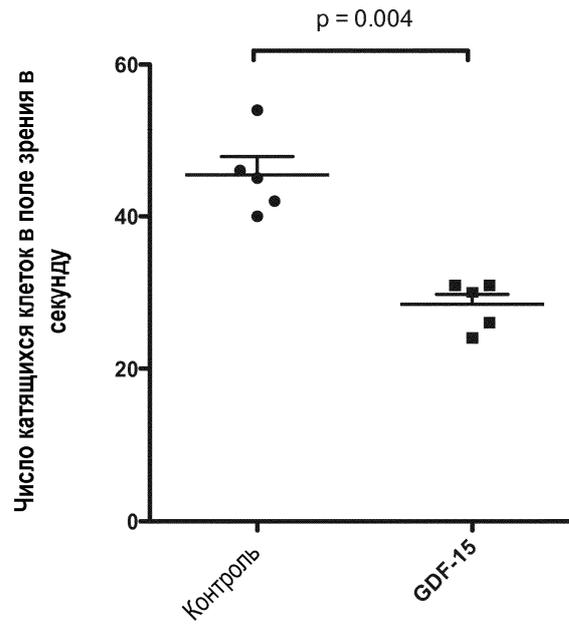
$p=0.0093$



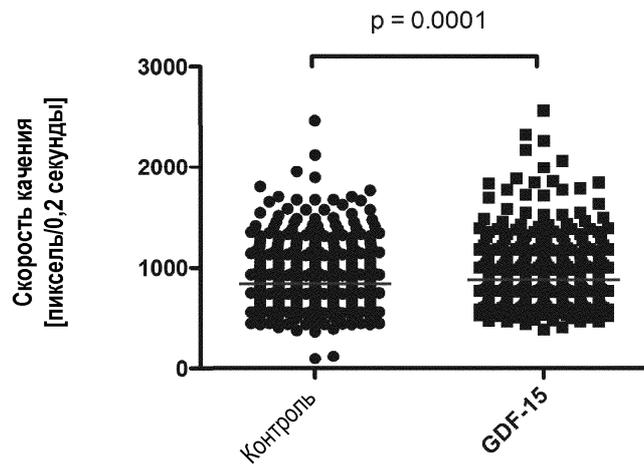
$p=0.0311$

Фиг. 8

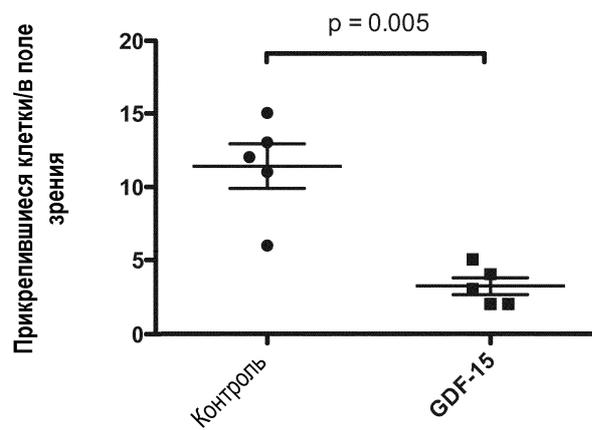
A)



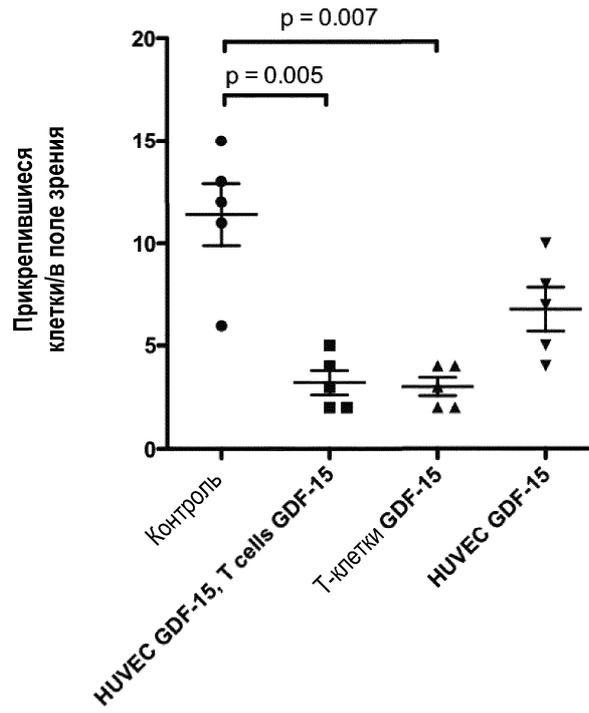
B)



C)

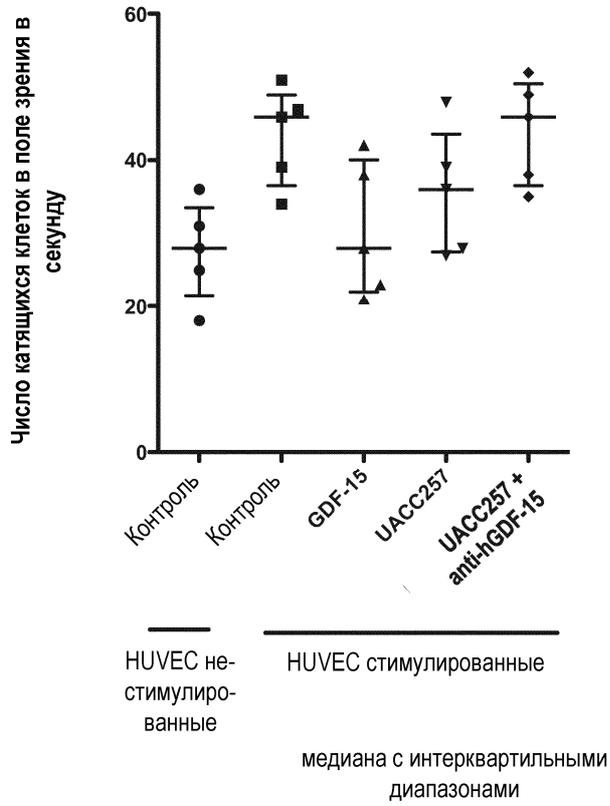


D)

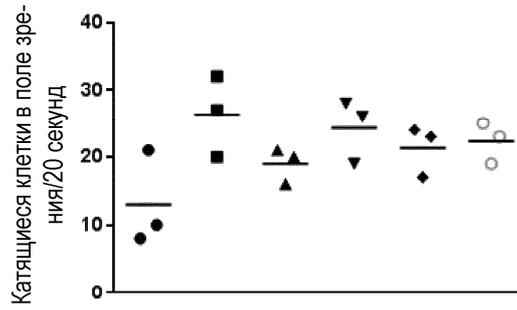


Фиг. 9

A)

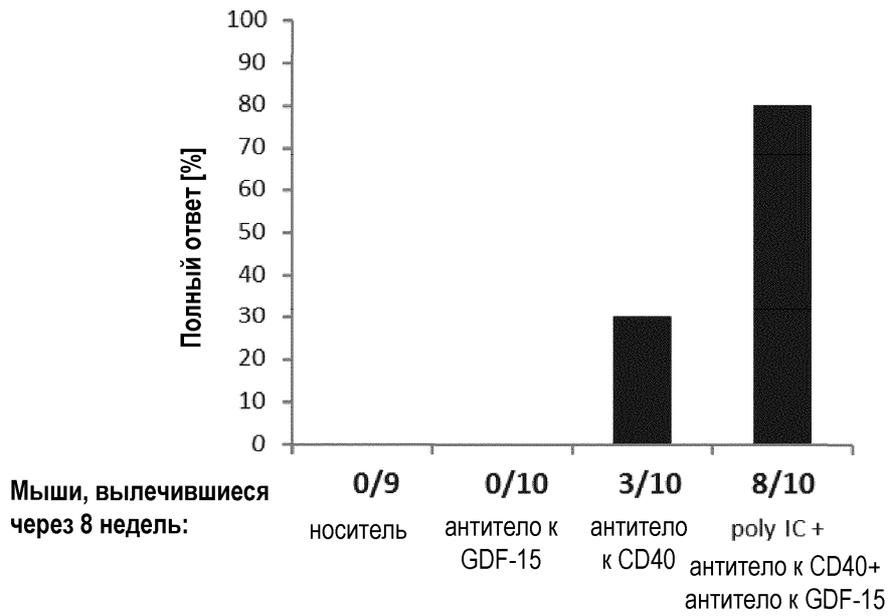


В)

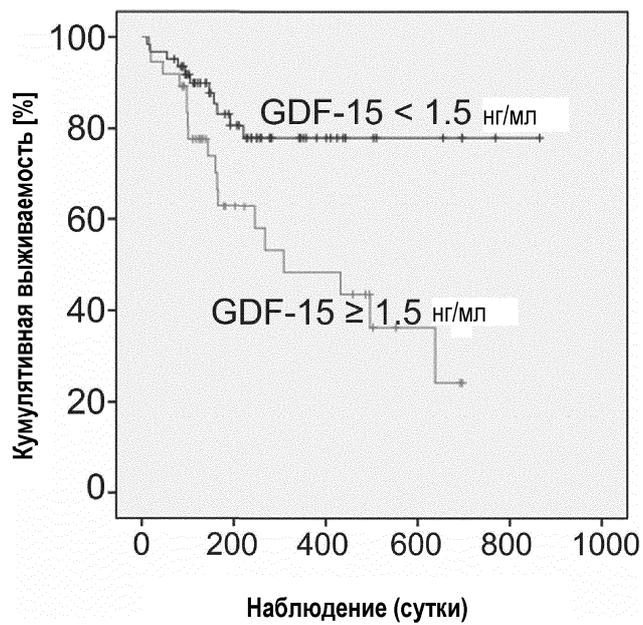


Стимуляция HUVEC TNF-α	отсутствует	+	+	+	+	+
Предварительная инкубация Т-клеток с GDF-15	отсутствует	отсутствует	+	+	+	+
Предварительная инкубация GDF-15 с антителом	отсутствует	отсутствует	отсутствует	+	+	+
Антитело:				H1 L5	01 G06	03 G05

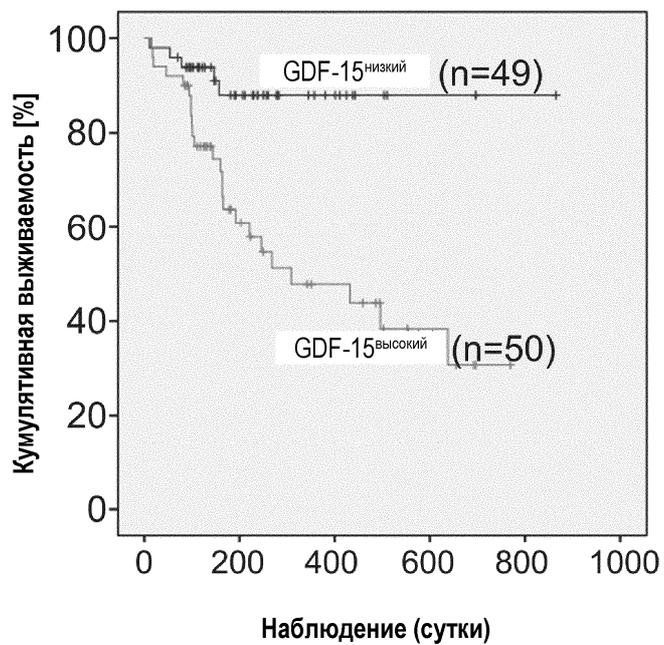
Фиг. 10



Фиг. 11

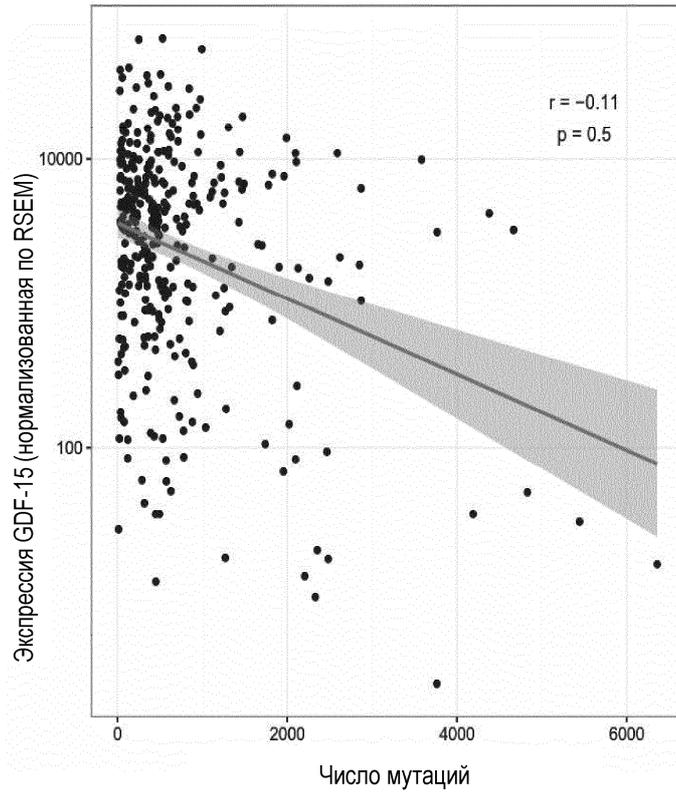


Фиг. 12

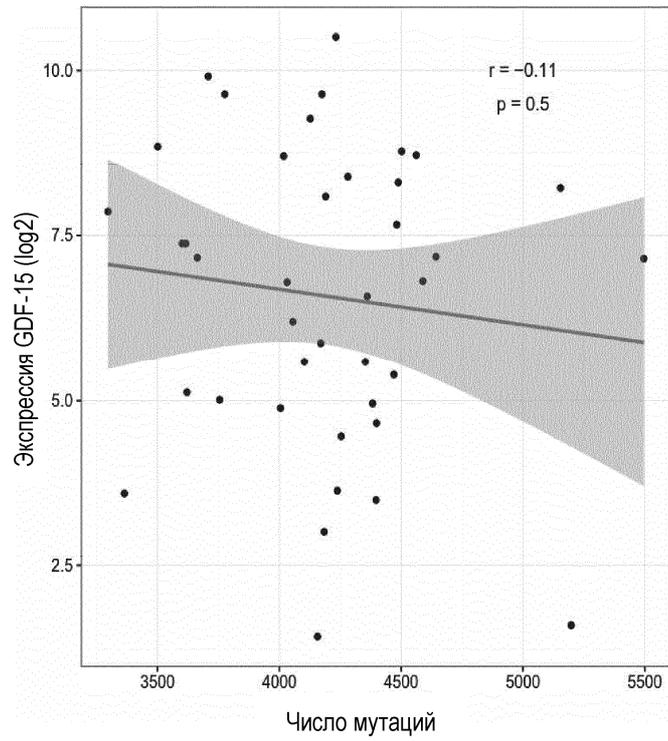


Фиг. 13

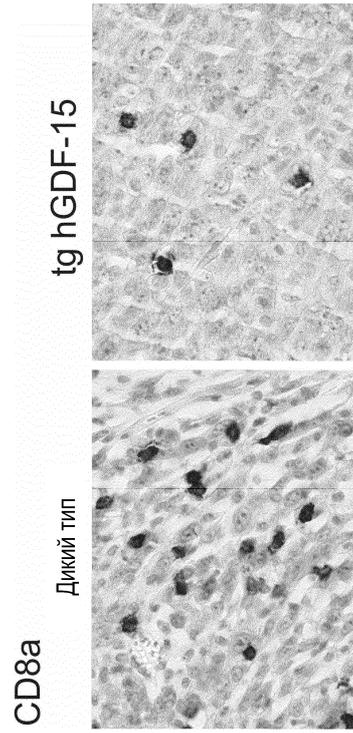
А)



В)



Фиг. 14



Фиг. 15

