

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102021000009926</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>20/04/2021</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>20/10/2022</b>

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	41

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	39	395

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	16	28

Titolo

UNA COMBINAZIONE COMPRENDENTE UN INIBITORE DI HDAC6 SPECIFICO E ALMENO UN INIBITORE DEL CHECKPOINT CTLA4

Descrizione dell'invenzione dal titolo "UNA COMBINAZIONE COMPRENDENTE UN INIBITORE DI HDAC6 SPECIFICO E ALMENO UN INIBITORE DEL CHECKPOINT CTLA4" a nome ITALFARMACO SPA, Viale Fulvio Testi 330 – 20126 Milano – Italia

\*\*\*\*

### **CAMPO TECNICO**

La presente invenzione riguarda una combinazione comprendente N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide o un suo sale farmaceuticamente accettabile e almeno un inibitore del checkpoint CTLA4, utile nell'immunoterapia di tumori e nel trattamento di una o più malattie mediate da HDAC6.

### **STATO DELLA TECNICA**

La N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide (indicata nel presente documento anche come ITF3756) è il composto 8 divulgato in WO2018/189340, che ne descrive anche metodo di sintesi e la sua attività come inibitore di HDAC6 e nel trattamento di rigetto del trapianto, GVHD, miosite, malattie associate a funzionalità linfocitaria anormale, mieloma multiplo, linfoma non-Hodgkin, neuropatia periferica, malattie autoimmuni, malattie infiammatorie, cancro e patologie neurodegenerative.

La classe di HDAC umana consiste di 18 enzimi, divisi in due gruppi: HDAC zinco-dipendenti e HDAC NAD-dipendenti, note anche come sirtuine (classe III). Le HDAC zinco-dipendenti sono ulteriormente distribuite in quattro classi: 1) Classe I, comprendente HDAC1, 2, 3 e 8, isoenzimi ubiquitari principalmente localizzati nel nucleo; 2) Classe IIa, comprendente HDAC4, 5, 7 e 9, isoenzimi localizzati sia nel nucleo che nel citoplasma; 3)

Classe IIb, comprendente HDAC6 e HDAC10, localizzate principalmente nel citoplasma e 4) Classe IV, comprendente solo HDAC11. A differenza delle HDAC di Classe I, le Classi IIa e IIb hanno un'espressione tessuto-specifica.

Gli inibitori selettivi per una famiglia di HDAC o per una specifica isoforma, specialmente HDAC6, possono essere particolarmente utili per trattare patologie correlate a disturbi proliferativi e accumulo di proteine, disturbi del sistema immunitario e malattie neurologiche e neurodegenerative, come ictus, malattia di Huntington, SLA e morbo di Alzheimer.

In particolare per l'isoforma HDAC6 sono stati identificati diversi substrati, quali  $\alpha$ -tubulina, Hsp90 (Heat Shock Protein 90), cortactina,  $\beta$ -catenina. La modulazione dell'acetilazione di queste proteine da parte di HDAC6 è stata correlata con diversi processi importanti, come la risposta immunitaria (J. Med. Chem. (2012), 55, 639-651; Mol. Cell. Biol. (2011), 31(10) , 2066-2078), la regolazione della dinamica dei microtubuli, compresa la migrazione cellulare e l'interazione cellula-cellula (Aldana-Masangkay et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 2011, 875824) e la degradazione delle proteine degenerate.

Inoltre, l'HDAC6 è coinvolta nel processo di catabolismo delle proteine degradate attraverso il complesso noto come aggresoma: l'HDAC6 è in grado di legare proteine poliubiquitinate e dineina, attivando così una sorta di veicolazione di proteine denaturate lungo i microtubuli all'aggresoma (Kawaguchi et al., Cell (2003) 115 (6), 727-738).

L'alterazione di questa attività citoprotettiva dell'HDAC6 è stata correlata con diverse patologie neurodegenerative come il morbo di Parkinson

(Outerio et al., *Science* (2007), 317 (5837), 516-519) e la malattia di Huntington (Dompierre et al., *J. Neurosci.* (2007), 27(13), 3571-3583), in cui l'accumulo di proteine degradate è una caratteristica patologica comune.

Inoltre, l'HDAC6 è coinvolta nella regolazione di molte proteine oncologiche, specialmente in tumori ematologici, come vari tipi di leucemia (Fiskus et al., *Blood* (2008), 112(7), 2896-2905) e mieloma multiplo (Hideshima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005), 102(24), 8567-8572).

La regolazione dell'acetilazione dell' $\alpha$ -tubulina da parte dell'HDAC6 può essere implicata nell'insorgenza di metastasi, in cui la motilità cellulare svolge un ruolo importante (Sakamoto et al., *J. Biomed. Biotechnol.* (2011), 2011, 875824). Recentemente, l'HDAC6 ha attirato l'interesse come nuovo bersaglio immuno-oncologico, poiché questo enzima ha dimostrato di essere un regolatore obbligato dell'espressione della proteina del checkpoint immunitario PD-L1 (Lienlaf et al. *Mol Oncol* 2016 May; 10(5):735-750). Gli inibitori dell'HDAC6 hanno dimostrato di essere efficaci in modelli di immuno-oncologia preclinica e di migliorare l'attività degli anticorpi anti PD-1 (Ray et al., *Leukemia* 2018 Mar;32(3):843-846. Keremu et al *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019 Feb; 83(2):255-264. Knox et al. *Sci Rep.* 2019 Apr 16; 9(1):6136).

Il CTLA4 o CTLA-4 (proteina 4 associata ai linfociti T citotossici) è un recettore proteico che funziona come checkpoint immunitario e sottoregola le risposte immunitarie. Il CTLA4 è costitutivamente espresso nelle cellule T regolatorie, ma è sovraregolato solo nelle cellule T convenzionali dopo attivazione - un fenomeno che è particolarmente evidente nei cancri.

Agisce come interruttore “off” quando è legato a CD80 o CD86 sulla superficie delle cellule che presentano l'antigene.

C'è un crescente interesse per i possibili benefici terapeutici di bloccare il CTLA4 (usando anticorpi antagonisti contro il CTLA4). Ipilimumab è stato il primo anticorpo anti-CTLA4 approvato dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA) nel marzo 2011, per il trattamento del melanoma. La FDA ha anche approvato la terapia anti-CTLA4 con ipilimumab 3 mg/kg più terapia anti-PD-1 con nivolumab 1 mg/kg per i pazienti con melanoma avanzato. È stato dimostrato che questo regime aumenta la sopravvivenza, ritarda la progressione e aumenta la percentuale di pazienti che ottengono una risposta obiettiva rispetto al solo ipilimumab (Larkin J et al. *n engl j med* 381;16 2019). Tuttavia, questi benefici sono giunti con una maggiore tossicità, inclusa un'alta percentuale di eventi avversi di grado 3/4 correlati al trattamento. Ad esempio, il trattamento con nivolumab è associato ai seguenti eventi avversi: nefrite, epatite, pancreatite e polmonite (Kang JH et al. *Trends in Immunology* 42, 293, 2021).

È stato mostrato molto interesse nella combinazione di inibitori del checkpoint con altri agenti. L'obiettivo, ovviamente, è trovare l'altro agente giusto. Nel mondo del cancro ai polmoni e ora del cancro al seno e di altre malattie in cui la chemioterapia è efficace, i ricercatori stanno esaminando la combinazione della chemioterapia con la terapia con inibitori del checkpoint immunitario, che ha prodotto un certo successo.

Tuttavia, si sono verificati alcuni fallimenti come lo studio di Fase III su pembrolizumab (anti PD-1) e l'inibitore dell'indoleammina 2,3-diossigenasi 1 (IDO1) epacadostat in soggetti con melanoma che è stato interrotto

nell'aprile 2018 poiché la terapia di combinazione ha mancato il primo endpoint primario di migliorare la sopravvivenza senza progressione rispetto al solo pembrolizumab.

Da un punto di vista meccanicistico, era logico che questa combinazione avrebbe prodotto buoni risultati, tuttavia, il fallimento spettacolare di questa combinazione fornisce un'eccellente lezione su come i ricercatori necessitino di fare un lavoro migliore nel vagliare le combinazioni che avanzano nello sviluppo.

### **SOMMARIO DELL'INVENZIONE**

Uno scopo della presente invenzione è quindi quello di fornire una nuova combinazione che mantenga o migliori l'efficacia terapeutica delle combinazioni note e approvate e/o dei farmaci somministrati singolarmente ma che abbia, al tempo stesso, un migliore profilo tossicologico.

I presenti inventori hanno sorprendentemente trovato che la combinazione comprendente ITF3756 e anticorpo anti-CTLA4 mostra un effetto antitumorale superiore alla somministrazione dei singoli farmaci e detta combinazione mostra un effetto terapeutico sinergico. In particolare, l'effetto antitumorale più potente è stato ottenuto con la somministrazione di ITF3756 50 mg/kg tre volte al giorno in combinazione con anti-CTLA4 10 mg/kg, che impedirebbe anche lo sviluppo di tumori secondari.

I presenti inventori hanno anche sorprendentemente trovato che il trattamento di combinazione secondo la presente invenzione potrebbe avere un profilo di sicurezza migliore rispetto alla combinazione di anti-CTLA4 e anti-PD1 o alla combinazione di anti-CTLA4 e anti-PD-L1, pur mantenendo la stessa efficacia sull'inibizione della crescita tumorale.

Di conseguenza, un primo scopo della presente invenzione è una combinazione comprendente N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide o un suo sale farmaceuticamente accettabile, e almeno un inibitore del checkpoint CTLA4.

Il secondo scopo della presente invenzione è detta combinazione per l'uso come medicamento.

### **DESCRIZIONE DELLE FIGURE**

- La **Figura 1** mostra l'effetto del trattamento con ITF3756 sulla crescita del tumore CT26 nel topo.

- La **Figura 2** mostra l'effetto del Mab anti-CTLA4 sulla crescita del tumore CT26 nel topo.

- La **Figura 3** mostra gli effetti ITF3756, alla dose di 25 mg/kg in combinazione con Mab anti-CTLA4, sulla crescita del tumore CT26 nel topo.

- La **Figura 4** mostra l'effetto di ITF3756, alla dose di 50 mg/kg in combinazione con Mab anti-CTLA4, sulla crescita del tumore CT26 nel topo.

- La **Figura 5** mostra l'effetto di ITF3756, alla dose di 50 mg/kg x3 in combinazione con Mab anti-CTLA4, sulla crescita del tumore CT26 nel topo.

- La **Figura 6** mostra l'effetto della somministrazione prolungata di ITF3756, alla dose di 50 mg/kg, tre volte al giorno e una volta al giorno, in combinazione con Mab anti-CTLA4, sulla crescita del tumore CT26 nel topo.

- La **Figura 7** mostra l'effetto della precedente somministrazione di ITF3756

in combinazione con anti-CTLA4 sulla crescita di tumori secondari (tumor challenge) nel modello murino CT26.

- Le **Figure 8A-8B** mostrano l'effetto della precedente somministrazione di ITF3756 (50 mg/kg una volta al giorno) in combinazione con anti-CTLA4 (10 mg/kg) sulla crescita di tumori secondari (tumor challenge) nel modello murino CT26.

- Le **Figure 9A-9B** mostrano l'effetto della precedente somministrazione di ITF3756 (50 mg/kg tre volte al giorno) in combinazione con anti-CTLA4 (10 mg/kg) sulla crescita di tumori secondari nel modello murino CT26.

- La **Figura 10** mostra l'effetto di ITF3756 in combinazione con anti-CTLA4 per prevenire la crescita del tumore rispetto alla combinazione anti PD-1 + anti-CTLA4.

- La **Figura 11** mostra l'effetto di ITF3756 da solo o in combinazione con anti-CTLA4 sul diabete in topi NOD femmina.

## **DEFINIZIONI**

Se non diversamente definito, tutti i termini del settore, le notazioni e l'altra terminologia scientifica utilizzati nel presente documento sono destinati ad avere i significati comunemente compresi dagli esperti del settore a cui si riferisce questa divulgazione. In alcuni casi, termini con significati comunemente intesi sono definiti nel presente documento per chiarezza e/o per riferimento immediato; pertanto, l'inclusione di tali definizioni nel presente documento non deve essere interpretata a rappresentare una differenza sostanziale rispetto a quanto generalmente inteso nel settore.

Il termine "**eccipiente fisiologicamente accettabile**" nel presente documento si riferisce a una sostanza priva di un qualsiasi effetto

farmacologico proprio e che non produce reazioni avverse quando somministrata a un mammifero, preferibilmente un essere umano. Gli eccipienti fisiologicamente accettabili sono ben noti nella tecnica e sono divulgati, ad esempio, in *Handbook of Pharmaceutical Excipients, sixth edition 2009*, qui incorporato per riferimento.

Il termine “**sali farmaceuticamente accettabili**” nel presente documento si riferisce a quei sali che possiedono l'efficacia e le proprietà biologiche del composto salificato e che non producono reazioni avverse quando somministrati a un mammifero, preferibilmente un essere umano. I sali farmaceuticamente accettabili possono essere sali inorganici o organici; esempi di sali farmaceuticamente accettabili includono ma non sono limitati a: carbonato, cloridrato, bromidrato, solfato, idrogeno solfato, citrato, maleato, fumarato, trifluoroacetato, 2-naftalensolfonato e para-toluensolfonato. Ulteriori informazioni sui sali farmaceuticamente accettabili possono essere trovate in *Handbook of pharmaceutical salts*, P. Stahl, C. Wermuth, WILEY-VCH, 127-133, 2008, qui incorporato per riferimento.

Il termine “**somministrazione simultanea, separata o sequenziale**” nel presente documento si riferisce alla somministrazione del primo e del secondo composto nello stesso momento o in modo tale che i due composti agiscano nell'organismo del paziente nello stesso momento o alla somministrazione di un composto dopo l'altro composto in modo tale da fornire un effetto terapeutico. In alcune forme di realizzazione i composti vengono assunti con un pasto. In altre forme di realizzazione, i composti vengono assunti dopo un pasto, come 30 minuti o 60 minuti dopo un pasto. In alcune forme di realizzazione, un composto viene somministrato a un

paziente per un periodo di tempo seguito dalla somministrazione dell'altro composto.

Il termine **“inibitore del checkpoint CTLA4”** o **“Anti-CTLA4”** o **“anticorpo Anti-CTLA4”** secondo la presente domanda si riferisce a un qualsiasi composto in grado di inibire, parzialmente o totalmente, l'attività biologica del checkpoint immunitario CTLA4 (proteina 4 associata ai linfociti T citotossici).

I termini **“approssimativamente”** e **“circa”** nel presente documento si riferiscono all'intervallo dell'errore sperimentale, che può verificarsi in una misurazione.

I termini **“comprendente”**, **“avente”**, **“includente”** e **“contenente”** devono essere interpretati come termini aperti (ossia che significano “includente, ma non limitato a”) e devono essere considerati come supporto anche per i termini come “consiste essenzialmente di”, “consistente essenzialmente di”, “consiste di” o “consistente di”.

I termini **“consiste essenzialmente di”**, **“consistente essenzialmente di”** sono da intendersi come termini semi-chiusi, nel senso che non sono inclusi altri ingredienti che influenzino materialmente le caratteristiche di base e nuove dell'invenzione (possono quindi essere inclusi eccipienti opzionali).

I termini **“consiste di”**, **“consistente di”** sono da intendersi come termini chiusi.

## **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

Come verrà descritto in dettaglio nella Sezione Sperimentale, i presenti inventori hanno trovato che la combinazione di trattamento di ITF3756 (25

mg/kg e 50 mg/kg) + anti-CTLA (10 mg/kg) è risultata più attiva della somministrazione dei singoli farmaci.

In particolare, i dati ottenuti dimostrano l'effetto sinergico di ITF3756 e anti-CTLA4 combinati rispetto a ITF3756 e anti-CTLA4 somministrati da soli.

Inoltre, i presenti inventori hanno anche trovato che l'effetto antitumorale più potente è stato ottenuto con la somministrazione di ITF3756 (50 mg/kg tre volte al giorno) in combinazione con anti-CTLA4 (10 mg/kg).

I risultati ottenuti suggeriscono un'attivazione del sistema immunitario indotta dalla combinazione di trattamento. Infatti, la combinazione della presente invenzione impedirebbe lo sviluppo di tumori secondari.

Gli inventori hanno inoltre trovato che ITF3756 riduce l'espressione di PD-L1 indotta da citochine in monociti umani stimolati *in vitro* e che la somministrazione di ITF3756 (50 mg/kg tre volte al giorno) riduce l'espressione di PD-L1 in cellule immunitarie di topo *in vivo*. Il trattamento di topi NOD con anticorpi anti PD-1, anti PD-L1 o con la combinazione di anticorpi anti PD-1 o anti PD-L1 con un anticorpo anti CTLA4 accelera potentemente l'induzione di diabete autoimmune, un noto effetto collaterale di rilevanza clinica. Sorprendentemente, gli inventori hanno trovato che il trattamento di topi NOD con ITF3756 (50 mg/kg tre volte al giorno) da solo o in combinazione con un anticorpo anti CTLA4 non accelera l'induzione di diabete autoimmune, suggerendo che questo trattamento di combinazione è tollerato molto meglio e darà luogo a meno eventi avversi autoimmuni rispetto alla combinazione di anticorpi anti PD(L)1 e anti CTLA4.

Di conseguenza, un primo scopo della presente invenzione è una combinazione comprendente N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-

il)metil)benzammide o un suo sale farmaceuticamente accettabile, e almeno un inibitore del checkpoint CTLA4.

Secondo una forma di realizzazione preferita, detto almeno un inibitore del checkpoint CTLA4 è selezionato tra ipilimumab o tremelimumab.

Il secondo scopo della presente invenzione è la combinazione secondo l'invenzione per l'uso come medicamento.

Preferibilmente, la combinazione è utile nel trattamento di una qualsiasi malattia o condizione suscettibile a essere migliorata o prevenuta mediante il trattamento con anticorpi anti CTLA4, anti PD1 e/o anti PD-L1.

Secondo una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, la combinazione è utile nel trattamento di un paziente che ha interrotto il trattamento con anticorpi anti CTLA4, anti PD1 e/o anti PDL1. In particolare, il paziente ha interrotto il trattamento con anticorpi anti CTLA4, anti PD1 e/o anti PDL1 a causa della tossicità.

Secondo una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, la combinazione è utile nel trattamento di un paziente che non è trattato con anticorpi anti CTLA4, anti PD1 e/o anti PDL1. In particolare, il paziente non è trattato con anticorpi anti CTLA4, anti PD1 e/o anti PDL1 a causa della tossicità attesa.

La combinazione dell'invenzione è preferibilmente utile per l'immunoterapia dei tumori e il trattamento delle malattie mediate da HDAC6.

Secondo una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, la combinazione è utile nel trattamento di una o più malattie selezionate dal gruppo: carcinoma corticosurrenale, cancro anale, astrocitomi, carcinoma basocellulare della pelle, cancro della vescica, tumori cerebrali, cancro al

seno, carcinoma di origine primaria sconosciuta, tumori cardiaci, cancro cervicale, colangiocarcinoma, cancro del colon-retto, cancro dell'endometrio, cancro esofageo, melanoma intraoculare, cancro della tuba di Falloppio, cancro della cistifellea, cancro gastrico, tumore carcinoide gastrointestinale, tumori stromali gastrointestinali (GIST), tumori delle cellule germinali, cancro ai testicoli, cancro della testa e del collo, carcinoma epatocellulare, tumori delle cellule delle isole, tumori neuroendocrini del pancreas, istiocitosi a cellule di Langerhans, leucemie, cancro del polmone (non a piccole cellule, a piccole cellule, blastoma pleuropolmonare e tumore tracheobronchiale), melanoma, carcinoma a cellule di Merkel, mesotelioma, carcinoma del tratto mediano con alterazioni del gene NUT, sindromi da neoplasia endocrina multipla, mieloma multiplo/neoplasie plasmacellulari, sindromi mielodisplastiche, neoplasie mielodisplastiche/mieloproliferative, neuroblastoma, cancro ovarico, cancro al pancreas, paraganglioma, cancro paratiroideo, cancro del pene, feocromocitoma, tumore ipofisario, cancro peritoneale primario, cancro alla prostata, cancro a cellule renali, retinoblastoma, sarcomi, carcinoma a cellule squamose della pelle, timoma e carcinoma timico, cancro alla tiroide, cancro a cellule di transizione della pelvi renale e dell'uretere, cancro uterino, cancro vaginale, tumori vascolari, cancro vulvare, tumore di Wilms. Preferibilmente, la combinazione è utile nel trattamento di melanoma, carcinoma a cellule renali, cancro del polmone non a piccole cellule e cancro del colon-retto.

Secondo una forma di realizzazione preferita, la combinazione per l'uso secondo la presente invenzione è caratterizzata dal fatto che la N-idrossi-4-

((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazolo-1-il)metil)benzammide o una suo sale farmaceuticamente accettabile e detto almeno un inibitore del checkpoint CTLA4 sono per somministrazione simultanea, separata o sequenziale.

Preferibilmente, la N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide o un suo sale farmaceuticamente accettabile viene somministrata a un paziente su base giornaliera, preferibilmente da 2 a tre volte al giorno e detto almeno un inibitore del checkpoint CTLA4 viene somministrato a un paziente ogni da 2 a 4 settimane, preferibilmente per un massimo di 4 dosi.

Preferibilmente, la N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide o un suo sale farmaceuticamente accettabile viene somministrata a un paziente per via orale.

Preferibilmente, l'inibitore del checkpoint CTLA4 viene somministrato mediante infusione endovenosa.

Più preferibilmente, la N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide o un suo sale farmaceuticamente accettabile viene somministrata a un paziente in una quantità che varia da 200 mg a 1000 mg BID o da 100 mg a 1000 mg TID e detto almeno un inibitore del checkpoint CTLA4 viene somministrato a un paziente in una quantità che varia da 0,5 e 10 mg/kg ogni da 2 a 4 settimane, preferibilmente da 1 a 3 mg/kg ogni da 2 a 4 settimane.

Le dosi umane per ITF3756 sono state previste utilizzando un modello farmacocinetico su base fisiologica (PBPK), attraverso l'uso del software GastroPlus™ (Simulation Plus, Lancaster, CA). La  $C_{media}$  target per le dosi previste era di 200 ng/ml, livello medio in 24 ore trovato dopo lo schema di

somministrazione che aveva mostrato efficacia nel topo.

La strategia di modellazione consisteva nello stabilire e valutare prima i modelli per le specie animali per le quali erano disponibili dati farmacocinetici sperimentali in vivo (topo, ratto, cane e scimmia *Cynomolgus*) e successivamente utilizzare input e dati fisiologici specie-specifici con approcci di scalatura coerente da in vitro a in vivo per la proiezione della farmacocinetica umana. Lo stesso lavoro è stato svolto su ITF2357 (givinostat), un composto con dati clinici esistenti, con somiglianze nel meccanismo di eliminazione con ITF3756, per supportare le ipotesi fatte per l'eliminazione di ITF3756.

Il modello è stato costruito utilizzando caratteristiche fisico-chimiche e dati *in vitro* di ITF3756, come LogD, pK<sub>A</sub>, solubilità in acqua e in fluidi biorilevanti, permeabilità, legame proteico e ripartizione sangue-plasma generati per ciascuna specie.

Il metabolismo epatico è stato studiato a partire dai dati generati *in vitro* dopo incubazione di ITF3756 con epatociti crioconservati specie-specifici. Il metabolismo renale e intestinale è stato dedotto dai dati *in vitro* raccolti dopo incubazione dell'elemento di test con microsomi renali e intestinali specie-specifici con NADPH e UDPGA come cofattori. Sono state quindi effettuate estrapolazioni da *in vitro* a *in vivo* utilizzando opportuni fattori di scala. La clearance del sangue intero è stata utilizzata come surrogato del metabolismo extraepatico.

Le concentrazioni tissutali sono state previste assumendo che tutti i tessuti si comportassero come compartimenti ben agitati con una distribuzione limitata dalla velocità di perfusione e coefficiente di ripartizione tessuto

rispetto al plasma  $K_p$  di farmaco e tessuto specifico. I valori di  $K_p$  sono stati generalmente previsti dalle proprietà fisico-chimiche del farmaco e dalla composizione dei tessuti.

L'assorbimento e il transito attraverso la parete intestinale sono stati previsti utilizzando il modello ACAT (Advanced Compartmental Absorption and Transit), integrato nel modello PBPK dell'intero corpo.

Nella primo passaggio i parametri farmacocinetici dopo somministrazione endovenosa sono stati previsti in ciascuna specie animale. Sono stati utilizzati fattori di scala empirici per il metabolismo extraepatico per catturare la clearance corporea e per  $\text{LogD}$  per catturare il volume di distribuzione. Sulla base di fattori di scala empirici, sono stati trovati scenari di bassa e alta clearance.

E' stata quindi modellizzata la farmacocinetica dopo somministrazione orale, trovando incertezza nella permeabilità, solubilità e dissoluzione, a causa della variabilità interspecie. Sono stati quindi delineati otto scenari, tra i quali si potevano trovare scenari di assorbimento orale del caso peggiore e migliore.

Sono state quindi effettuate proiezioni delle farmacocinetiche umane utilizzando gli 8 scenari, derivati dalla combinazione del caso migliore e peggiore di biodisponibilità, clearance alta e bassa e volume di distribuzione alto e basso. A seconda di quale degli scenari simulati cattura meglio le farmacocinetiche umane, il regime di dosaggio, previsto per raggiungere l'esposizione target, varia da 200 mg a 1000 mg BID o da 100 mg a 1000 mg TID come menzionato sopra.

L'invenzione verrà ulteriormente illustrata in maggior dettaglio nella

seguinte sezione sperimentale.

## SEZIONE SPERIMENTALE

### ESEMPIO 1

#### EFFETTO ANTI-TUMORALE DI ITF3756 SOMMINISTRATO IN COMBINAZIONE CON ANTICORPO ANTI-CTLA4 NEL MODELLO MURINO CT26

L'efficacia anti-tumorale di ITF3756, somministrato in combinazione con anticorpo anti-CTLA4, è stata determinata utilizzando un modello murino basato sull'uso della linea cellulare di carcinoma del colon di topo CT26. In questo modello, le cellule CT26 vengono impiantate per via sottocutanea in topi singenici e l'efficacia viene determinata come inibizione della crescita tumorale sulla base del volume del nodulo tumorale.

#### **Materiali e metodi**

##### ***ITF3756 (N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazolo-1-il)metil)benzammide)***

ITF3756 è stato sintetizzato dal Dipartimento di Chimica Farmaceutica di Italfarmaco SpA. ITF3756, lotto 5, come polvere è stato solubilizzato in DMSO e conservato a -20 °C. In ogni giorno di somministrazione, la soluzione è stata diluita con H<sub>2</sub>O/PEG 400 1:1 per ottenere una soluzione finale di H<sub>2</sub>O/PEG 400 1:1 in DMSO 0,5% a 2,5 e 5,0 mg/ml.

Le soluzioni sono state somministrate per via orale utilizzando aghi sonda per topi, in un volume di 200 µl (dosi finali da 25 e 50 mg/kg).

La somministrazione di ITF3756 è iniziata quando i noduli tumorali erano palpabili (intorno al giorno 10 dall'inoculazione delle cellule). ITF3756 è stato somministrato per via orale (os) una volta al giorno o tre volte al giorno, come riportato nella Tabella 1.

***Anticorpo anti-CTLA4***

L'anti-CTLA4 di topo Mab IgG di criceto siriano è stato acquistato da BioXell (cat. BE0131, clone 9H10), diluito con PBS a concentrazione finale di 1; 0,3 e 0,1 mg/ml e conservato a +4 °C. Ciascun topo è stato trattato con 200 µl della rispettiva soluzione (dosi finali da 10,0; 3,0 e 1,0 mg/kg).

La somministrazione di Mab anti-CTLA4 è iniziata quando i noduli tumorali erano palpabili (intorno al giorno 10 dall'inoculazione delle cellule). L'anti-CTLA4 è stato somministrato per via intraperitoneale (ip) una volta al giorno a giorni alterni per un totale di 4 trattamenti, seguiti da 7 giorni di wash-out, come riportato nella Tabella 1. Questo ciclo di trattamento è continuato fino alla fine dello studio.

***Studio in vivo***

Topi BALB/c femmine di 6 settimane sono stati acquistati da Charles River Italia e mantenuti con cibo e acqua ad libitum, con un ciclo luce-buio di 12 ore.

Dopo 5 giorni di acclimatazione, i topi sono stati sottoposti a iniezione di cellule tumorali.

Le cellule CT26 (carcinoma del colon murino BALB/c, CT26.WT ATCC CRL-2638) sono state coltivate in terreno di coltura cellulare RPMI 1640 + 10% di siero fetale di vitello (FCS).

Le cellule sono state staccate, durante la fase esponenziale, con tripsina, lavate con il terreno di coltura senza FCS e sospese alla concentrazione finale di  $5 \times 10^6$  cellule/ml. Le cellule ( $1 \times 10^6$  cellule/topo) sono state iniettate s.c. nella regione inguinale del fianco destro dei topi in un volume di 200 µl.

Quando il nodulo tumorale era palpabile in almeno l'80% degli animali, i

topi sono stati randomizzati nei seguenti gruppi sperimentali ed è stata avviata la somministrazione del farmaco.

**Tabella 1. Gruppi sperimentali e schemi di trattamento.**

<b>Numero Gruppo (animali/gruppo)</b>	<b>Gruppo sperimentale</b>	<b>Schema trattamento</b>
1 (n=6)	<b>Controllo, Veicoli*</b>	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash-out
2 (n=3)	<b>Controllo, Veicoli *</b>	<b>Per via orale</b> , 3 volte al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash-out
3 (n=3)	<b>Controllo</b> , non trattato	-
4 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 25 mg/kg	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno.
5 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 50 mg/kg	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno.
6 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 50 mg/kg	<b>Per via orale</b> , 3 volte al giorno.
7 (n=6)	<b>Anti-CTLA4</b> , 1 mg/kg	<b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash-out
8 (n=6)	<b>Anti-CTLA4</b> , 3 mg/kg	<b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash-out
9 (n=6)	<b>Anti-CTLA4</b> , 10 mg/kg	<b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash-out
10 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 25 mg/kg + <b>anti-CTLA4</b> , 1 mg/kg	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash-out
11 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 25 mg/kg + <b>anti-CTLA4</b> , 3 mg/kg	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash-out
12 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 25 mg/kg + <b>anti-CTLA4</b> , 10 mg/kg	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash-out

13 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 50 mg/kg + <b>anti-CTLA4</b> , 1 mg/kg	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash- out
14 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 50 mg/kg + <b>anti-CTLA4</b> , 3 mg/kg	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash- out
15 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 50 mg/kg + <b>anti-CTLA4</b> , 10 mg/kg	<b>Per via orale</b> , una volta al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash- out
16 (n=6)	<b>ITF3756</b> , 50 mg/kg + <b>anti-CTLA4</b> , 10 mg/kg	<b>Per via orale</b> , 3 volte al giorno. <b>ip</b> , 4 somministr. totali a giorni alterni, seguite da 7 giorni di wash- out

\*Gli animali di controllo sono stati trattati per via orale con il veicolo di ITF3756 (H<sub>2</sub>O/PEG 400 1:1+DMSO 0,5%) e ip con il veicolo di anti-CTLA4 (PBS).

Il peso corporeo è stato misurato a giorni alterni, a partire dal primo giorno di somministrazione del farmaco.

Il volume dei noduli tumorali sottocutanei è stato determinato a giorni alterni, secondo la seguente formula (Papagiannoros A. et al. *in vivo* 20:129-136, 2006):

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = (D \times d^2)/2$$

dove D = diametro maggiore del nodulo e d = diametro minore del nodulo.

Il peso del nodulo tumorale è stato determinato dal volume del tumore considerando una densità del tumore di 1,05 g/ml (Jensen M.M. et al. *BMC Medical Imaging* 8(16), 2008).

Gli animali sono stati sottoposti a eutanasia quando il peso del tumore era pari al 10% del peso corporeo o i noduli tumorali si erano ulcerati (end-point umano).

L'analisi statistica dell'effetto dei farmaci è stata effettuata mediante ANOVA a 2 vie con il test di confronti multipli di Dunnett utilizzando il software GraphPad Prism 8.

## Risultati

L'effetto di ITF3756 sulla crescita del tumore CT26 è riassunto nella **Figura 1**.

La dose da 25 mg/kg (una volta al giorno) non ha mostrato una significativa inibizione della crescita tumorale durante l'intero periodo sperimentale. La dose più alta (50 mg/kg, una volta al giorno) ha esercitato un effetto significativo al giorno 21 con un'inibizione del 34% (0,88 g vs 1,34 g) della crescita del tumore che non è stata più rilevata al giorno 24 (inibizione del 9%).

Al contrario, gli animali trattati con ITF3756 50 mg/kg 3 volte al giorno, hanno mostrato una significativa riduzione del tumore a partire dal giorno 19 fino al giorno 24 (30% di inibizione, 1,32 g vs 1,89 g) indicando che questo schema di trattamento esercitava un effetto farmacologico superiore alla singola somministrazione giornaliera.

<i>Gruppo</i>	<b>Significatività statistica vs Gruppo di controllo nel giorno</b>						
	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>24</b>
<b>ITF3756, 25 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>ITF3756, 50 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
<b>ITF3756, 50 mg/kg x3</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	**

n.s. = non significativo, \* p<0,05, \*\*p<0,01

L'effetto dell'anticorpo anti-CTLA4 è riassunto nella **Figura 2**. Tutte e 3 le dosi di anticorpo sono risultate attive in modo simile con un effetto massimo di inibizione del tumore al giorno 24 (66 – 57%).

<b>Gruppo</b>	<b>Significatività statistica vs Gruppo di controllo nel giorno</b>						
	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>24</b>
<b>αCTLA4 1 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	***	***
<b>αCTLA4 3 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	***
<b>αCTLA4 10 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***

n.s. = non significativo, \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

L'effetto di ITF3756 somministrato a 25 mg/kg in combinazione con la dose più alta dell'anticorpo anti-CTLA4 (10 mg/kg) è riportato nella **Figura 3**.

<b>Gruppo</b>	<b>Significatività statistica vs Gruppo di controllo nel giorno</b>						
	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>24</b>
<b>ITF3756 25 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>αCTLA4 10 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	***
<b>ITF3756 25 mg/kg + αCTLA4 10 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***

n.s. = non significativo, \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

La combinazione di trattamento di ITF3756 (25 mg/kg) + anti-CTLA (10 mg/kg) secondo la presente invenzione è risultata più attiva della somministrazione dei singoli farmaci. Inoltre, detta combinazione mostra un effetto terapeutico sinergico.

Infatti, al giorno 24, la combinazione di farmaci ha indotto un'inibizione dell'82% (0,34 g vs 1,89 g) della crescita del tumore, mentre ITF3756 e anti-CTLA4 da soli hanno indotto un'inibizione del 7% (1,76 vs 1,89 g) e del 57% (0,82 vs 1,89). g), rispettivamente.

L'effetto di ITF3756 somministrato a 50 mg/kg in combinazione con la dose più alta (10 mg/kg) dell'anticorpo anti-CTLA4 è riportato nella **Figura 4**.

<b>Gruppo</b>	<b>Significatività statistica vs Gruppo di controllo nel giorno</b>						
	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>24</b>
<b>ITF3756 50 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
<b>αCTLA4 10 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***
<b>ITF3756 50 mg/kg + αCTLA4 10 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	**	***	***	***

n.s. = non significativo, \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

La combinazione di trattamento ITF3756 (50 mg/kg) + anti-CTLA (10 mg/kg) è risultata più attiva rispetto alla somministrazione dei singoli farmaci. Inoltre, detta combinazione mostra un effetto terapeutico sinergico. Infatti, al giorno 24, la combinazione di farmaci ha indotto un'inibizione dell'83% (0,32 vs 1,89 g) della crescita del tumore, mentre ITF3756 e anti-

CTLA4 da soli hanno indotto il 9% (1,72 vs 1,89 g) e il 57% (0,82 vs 1,89 g) di inibizione, rispettivamente.

L'effetto di ITF3756 somministrato a 50 mg/kg 3 volte al giorno, in combinazione con la dose più alta (10 mg/kg) dell'anticorpo anti-CTLA4 è riportato nella **Figura 5**.

<b>Gruppo</b>	<b>Significatività statistica vs Gruppo di controllo nel giorno</b>						
	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>24</b>
<b>ITF3756 50 mg/kg x3</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	**
<b>αCTLA4 10 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***
<b>ITF3756 50 mg/kg x3 + αCTLA4 10 mg/kg</b>	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***	***

n.s. = non significativo, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

La combinazione di trattamento ITF3756 (50 mg/kg x3) + anti-CTLA (10 mg/kg) è risultata più attiva della somministrazione dei singoli farmaci. Inoltre, detta combinazione mostra un effetto terapeutico sinergico.

Infatti, al giorno 24, la combinazione di farmaci ha indotto l'89% (0,2 vs 1,89 g) di inibizione della crescita tumorale, mentre ITF3756 e anti-CTLA4 da soli hanno indotto il 30% (1,32 vs 1,89 g) e il 57% (0,82 vs 1,89 g) di inibizione, rispettivamente. Inoltre, l'efficacia del trattamento di combinazione al giorno 24 è risultata significativamente superiore a quella esercitata dal solo anticorpo anti-CTLA4 ( $p < 0,001$ ).

Poiché la crescita tumorale degli animali trattati con entrambe le

combinazioni di farmaci (anti-CTLA4 + ITF3756 50 mg/kg una volta al giorno e 3 volte al giorno) è stata quasi completamente abolita al giorno 24 (ultimo giorno sperimentale del gruppo di controllo), la somministrazione del farmaco a questi due gruppi è stata prolungata fino al giorno 42.

I risultati ottenuti sono riportati nella **Figura 6**. Nel grafico è riportato il volume medio dei tumori che erano misurabili.

Entrambe le combinazioni di farmaci secondo la presente invenzione hanno indotto una inibizione della crescita tumorale sovrapponibile e potente fino al giorno 35. Da questo giorno in poi i tumori degli animali trattati con ITF 3756 una volta al giorno + anti-CTLA4 continuano a crescere fino al giorno 48, mentre quelli degli animali trattati con ITF3756 tre volte al giorno + anti-CTLA4 sono rimasti costanti fino al giorno 42 e, poi, hanno diminuito i loro volumi.

Inaspettatamente, al giorno 48, 2 topi su 5 nel gruppo trattato con ITF3756 una volta al giorno + anti-CTLA4 e 2 topi su 4 nel gruppo trattato con ITF3756 tre volte al giorno + anti-CTLA4, erano privi di tumori.

Inoltre, i topi dei due gruppi di combinazione di farmaci (anti-CTLA4 + ITF3756 50 mg/kg una volta al giorno e 3 volte al giorno) sono stati sottoposti a una seconda iniezione tumorale (tumor challenge) per monitorare la crescita dei tumori secondari.

La seconda iniezione ( $1 \times 10^6$  cellule CT26/topo sc) è stata eseguita nella regione inguinale sinistra al giorno 49 e gli animali sono rimasti non trattati fino al giorno 73. Come controllo della crescita ottimale delle cellule CT26 utilizzate per la seconda iniezione, 5 topi naïve sono stati iniettati lo stesso giorno.

I risultati ottenuti sono riportati nella **Figura 7**.

Le cellule CT26 iniettate nel fianco sinistro di animali naive (Gruppo di controllo) hanno mostrato la crescita prevista.

I tumori secondari crescono leggermente (al giorno 63) in 3 topi su 5 (#3, 5 e 6) trattati con ITF3756 (50 mg/kg una volta al giorno) + anti-CTLA4 (10 mg/kg), come riportato nella **Figura 8 (A-B)**.

Da notare che, in questo gruppo (ITF3756 50 mg/kg una volta al giorno + anti-CTLA4 10 mg/kg), i tumori secondari si sono sviluppati solo negli animali portatori di tumore al giorno 48, mentre non sono cresciuti negli animali privi di tumore (topi #2 e 4).

I tumori secondari non si sono sviluppati in alcuno dei topi trattati con ITF3756 (50 mg/kg tre volte al giorno) + anti-CTLA4 (10 mg/kg), indipendentemente dalla presenza (come nel topo #6) o dall'assenza (come nei topi #2, 4 e 5) di tumori primari al giorno 48, come riportato nella **Figura 9 (A-B)**.

### **Conclusioni**

I risultati ottenuti possono essere riassunti come segue:

1. ITF3756 somministrato a 25 e 50 mg/kg una volta al giorno in combinazione con l'anticorpo anti-CTLA4 mostra un effetto anti-tumorale superiore alla somministrazione dei singoli farmaci e tale effetto terapeutico è sinergico.
2. L'effetto anti-tumorale più potente è stato ottenuto con la somministrazione di ITF3756 (50 mg/kg tre volte al giorno) in combinazione con anti-CTLA4 (10 mg/kg).
3. Le combinazioni di ITF3756 50 mg/kg una volta al giorno o tre volte al giorno con anti-CTLA4 10 mg/kg hanno causato un significativo ritardo nella crescita del tumore e, dopo 73 giorni di trattamento, rispettivamente 2 topi su 5 e 4 topi su 4 erano privi di tumori.
4. I tumori secondari non si sono sviluppati (come nel gruppo trattato con ITF3756 50 mg/kg tre volte al giorno + anti-CTLA4 10 mg/kg) o si sono sviluppati lentamente solo in 3 topi su 5 (come nel gruppo trattato con

ITF3756 50 mg/kg una volta al giorno + anti-CTLA4 10 mg/kg). Poiché sia l'ITF3756 che l'anti-CTLA4 necessitano di un sistema immunitario competente per esercitare il loro effetto antitumorale, questo risultato indica che negli animali trattati è stata indotta un'efficace risposta immunitaria antitumorale, una risposta che ha impedito la crescita del tumore secondario.

## **ESEMPIO 2**

### *EFFETTO DI ITF3756 IN COMBINAZIONE CON ANTI CTLA4 PER PREVENIRE LA CRESCITA TUMORALE VS. LA COMBINAZIONE ANTI PD-1 + ANTI CTLA4*

Balb/c femmine di 6 settimane sono state sottoposte a iniezione di cellule tumorali CT26.WT nel fianco destro. Dopo circa 10 giorni, ogni volta che i tumori erano rilevabili, sono iniziati i trattamenti secondo il seguente schema:

- 1) ITF3756 50 mg/kg, per os, tre volte al giorno (Q3x5) +  $\alpha$ CTLA4 10 mg/kg ip 4 volte a giorni alterni, seguiti da 6 giorni di washout (invenzione);
- 2)  $\alpha$ PD1 3 mg/kg, ip, eod +  $\alpha$ CTLA4 10 mg/kg ip 4 volte a giorni alterni seguiti da 6 giorni di washout (riferimento).

Ogni volta che i noduli tumorali sono rilevabili in almeno l'80-85% degli animali, i trattamenti iniziano e l'esperimento si interrompe quando i pesi del tumore del gruppo di controllo sono pari al 10% del peso corporeo dell'animale o (endpoint umano) qualche nodulo si è ulcerato. Gli animali sono stati pesati due volte a settimana e i tumori misurati tre volte a settimana.

La misura del nodulo tumorale è calcolata dalla seguente formula:

Volume (mm<sup>3</sup>) = (D x d<sup>2</sup>)/2, dove D = diametro maggiore del nodulo e d = diametro minore del nodulo.

I risultati riportati nella **Figura 10** mostrano che non ci sono differenze statistiche tra i due trattamenti combinati sull'inibizione della crescita del tumore.

La combinazione ITF3756 più anti CTLA4 secondo la presente invenzione ha la stessa attività antitumorale della combinazione approvata anti PD-1 + anti CTLA4 utilizzata come riferimento.

### **ESEMPIO 3**

#### *EFFETTO DI ITF3756 DA SOLO O IN COMBINAZIONE CON ANTI CTLA4 SUL DIABETE IN TOPI NOD FEMMINE*

I topi NOD hanno sviluppato spontaneamente diabete e rappresentano un modello spontaneo ampiamente accettato di diabete mellito di Tipo 1 (Pearson et al., 2016, Journal of Autoimmunity 66, 76-88).

La via Programmed Death-1 (PD-1) regola il diabete autoimmune in topi NOD. Il blocco di PD-1 o PD-L1 rapidamente, in meno di una settimana, ha fatto precipitare il diabete in topi femmine prediabetiche di 10 settimane (Ansari et al., 2003, The Journal of Experimental Medicine 198, 63-69).

Il blocco dell'asse PD-1/PD-L1 è dannoso anche in altri modelli autoimmuni. Ad esempio, topi PD-1<sup>-/-</sup> hanno dimostrato sia una maggiore incidenza che una maggiore gravità dell'artrite indotta da collagene (CIA) rispetto ai topi di tipo wild-type (Raptopoulou et al., 2010, Arthritis & Rheumatism 62, 1870-1880). Il PD-L1 espresso sui macrofagi protegge dalla CIA e bloccare il PD-L1 durante l'artrite indotta da collagene ha provocato un'artrite più grave (Wood et al., 2020, The Journal of Immunology 204, 73.12). Nel modello sperimentale di encefalomielite autoimmune (EAE) di sclerosi multipla, il PD-1 svolge un ruolo critico e la delezione di PD-1 aggrava il decorso della patologia (Zhang e Braun, 2014, International Immunology 26, 407-415).

L'inibizione di HDAC6 può ridurre l'espressione di PD-L1 in un certo numero di tipi di cellule sottoposti a diversi stimoli, influenzando così l'asse PD-1/PD-L1 con potenziale attivazione del sistema immunitario.

Tuttavia, l'inibizione di HDAC6 è efficace in modelli di patologie autoimmuni come CIA ed EAE. Inoltre, nelle nostre mani, i topi HDAC6 KO hanno sviluppato un EAE più lieve rispetto al controllo HDAC6 di tipo wild-type abbinato per età e sesso.

Collettivamente, questi dati indicano che l'inibizione di HDAC6 nel contesto delle reazioni autoimmuni è protettiva nonostante il ruolo ampiamente descritto degli inibitori di HDAC6 nella sottoregolazione dell'espressione di PD-L1.

Considerando l'effetto di HDAC6i su PD-L1, i presenti inventori si sono chiesti se topi NOD trattati con ITF3756 potessero avere una rapida induzione di diabete, come nei topi trattati con anti PD-(L)1 o invece l'induzione di diabete non venisse influenzata.

Il trattamento di topi di 10-12 settimane di età con anti CTLA-4 non ha alcun effetto sull'induzione di diabete, tuttavia, i presenti inventori prevedono che un co-trattamento anti PD-(L)1/anti CTLA-4 generi un effetto comparabile all'anti PD-(L)1 da solo.

La nostra ipotesi era che topi NOD trattati con l'inibitore selettivo di HDAC6 ITF3756 da solo o in combinazione con anti CTLA-4 non avrebbero modificato il decorso del diabete o che sarebbe stato indotto solo un effetto limitato.

### **Materiali e metodi**

***ITF3756*** (*N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazolo-1-il)metil)benzammide*)

ITF3756 è stato sintetizzato dal Dipartimento di Chimica Farmaceutica di Italfarmaco SpA. ITF3756, lotto 9, come polvere è stato solubilizzato in DMSO e conservato a -20 °C.

Identificazione	<b>ITF3756 lotto 9</b>
Tipo di Formulazione	Soluzione nel veicolo
Concentrazione Dose	5 mg/ml
Istruzioni di Preparazione	Pesare una quantità appropriata di composto di test e preparare una soluzione a 100 mg/ml in DMSO. Diluire questa soluzione con H <sub>2</sub> O/PEG 1:1 per raggiungere il dosaggio richiesto dell'articolo di test (soluzione 5 mg/ml). Tenere sotto agitazione magnetica.
Frequenza di Preparazione	Le formulazioni di test sono state preparate il giorno del dosaggio
Condizioni di Conservazione	Temperatura ambiente
Origine e Produzione	Italfarmaco SpA
Metodo e Via	Orale, mediante sonda gastrica, utilizzando una sonda gastrica in metallo e una siringa graduata in plastica.
Durata	5 giorni consecutivi x 2 cicli (Ciclo 1: Giorni 0-4; Ciclo 2: Giorni 6-8,11)
Frequenza	3 x giorno a 4 ore di distanza
Volume	10 ml/kg. Il volume della dose individuale è stato calcolato in base al peso corporeo registrato il giorno della somministrazione.

## Anticorpi

Il trattamento con anticorpi era secondo Ansari (Ansari et al., 2003, The Journal of Experimental Medicine 198, 63-69)

Identificazione	<b>Anti PD-1 di topo</b>
Numero di Lotto/Batch	735019O1 e 786520N1B
Tipo di Formulazione	Preparazione farmaceutica
Concentrazione Dose	500 µg (giorno 0)/200 µl; 250 µg (giorno 2, 4, 6, 8, 11)/200 µl
Istruzioni di Preparazione	Soluzione pronta all'uso a 7,7 mg/ml (lotto 735019O1) o 8,31 mg/ml (lotto 786520N1B). Quindi diluita in PBS alle concentrazioni target
Frequenza di Preparazione	Le formulazioni di test sono state preparate il giorno del dosaggio
Condizioni di Conservazione	+ 4 °C, protetta dalla luce
Origine e Produzione	BioXCell

Identificazione	<b>Anti PD-L1 di topo</b>
Numero di Lotto/Batch	720620A2
Tipo di Formulazione	Preparazione farmaceutica

Concentrazione Dose	500 µg (giorno 0)/200 µl; 250 µg (giorno 2, 4, 6, 8, 11)/200 µl
Istruzioni di Preparazione	Soluzione pronta all'uso a 8,29 mg/ml. Quindi diluita in PBS alle concentrazioni target
Frequenza di Preparazione	Le formulazioni di test sono state preparate il giorno del dosaggio
Condizioni di Conservazione	+ 4 °C, protetta dalla luce
Origine e Produzione	BioXCell

Identification	<b>Anti CTLA-4 di topo</b>
Numero di Lotto/Batch	755620A2
Tipo di Formulazione	Preparazione farmaceutica
Concentrazione Dose	500 µg (giorno 0)/200 µl; 250 µg (giorno 2, 4, 6, 8, 11)/200 µl
Istruzioni di Preparazione	Soluzione pronta all'uso a 8,35 mg/ml. Quindi diluita in PBS alle concentrazioni target
Frequenza di Preparazione	Le formulazioni di test sono state preparate il giorno del dosaggio
Condizioni di Conservazione	+ 4 °C, protetta dalla luce
Origine e Produzione	BioXCell

Identification	<b>Controllo Isotipo IgG2b di ratto</b>
Numero di Lotto/Batch	707119D1
Tipo di Formulazione	Preparazione farmaceutica
Concentrazione Dose	500 µg (giorno 0)/200 µl; 250 µg (giorno 2, 4, 6, 8, 11)/200 µl
Istruzioni di Preparazione	Soluzione pronta all'uso a 9,16 mg/ml. Quindi diluita in PBS alle concentrazioni target
Frequenza di Preparazione	Le formulazioni di test sono state preparate il giorno del dosaggio
Condizioni di Conservazione	+ 4 °C, protetta dalla luce
Origine e Produzione	BioXCell

## Animali

Specie/ceppo o razza	<b>Topo NOD (diabetico non-obeso) Femmina</b>
Origine	Charles River Laboratories, Italia S.p.A. Via Indipendenza 11, Calco (Italy)
Età	Ca. 11-12 settimane all'inizio del periodo di trattamento (fase prediabetica di topi diabetici non obesi femmine)
Peso	Intervallo: 19-27 grammi al Giorno 0
Acclimatazione	Almeno 4 giorni
Criteri di Selezione	Gli animali sono stati randomizzati sulla base di settimane di età, peso corporeo e osservazioni cliniche
Identificazione	Targhette metalliche numerate sull'orecchio destro
Animali nello studio	90 femmine

Naïve allo stato della procedura sperimentale	Si
Destino dell'animale	Gli animali sono stati sacrificati alla fine dello studio

I topi NOD sono stati trattati secondo il seguente schema:

Gruppo di Test	Elemento di test	Dose Elemento	Via	Volume	Frequenza	Numero di Animali
1	Controllo/Näive	-	-	-	-	10
2	Veicolo <sup>b</sup> + controllo isotipo	0 500(d0)+250µg/topo	OS IP	10 ml/kg 200 µl/topo	3x/giorno <sup>a</sup> (Giorno 0-4,6-8,11) <sup>c</sup> Giorno 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
3	ITF3756	50 mg/kg	OS	10 ml/kg	3x/Giorno <sup>a</sup> (Giorno 0-4,6-8,11) <sup>c</sup>	10
4	Anti-PD-1	500(d0)+250µg/topo	IP	200 µl/topo	Giorno 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
5	Anti-PD-L1	500(d0)+250µg/topo	IP	200 µl/topo	Giorno 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
6	Anti-CTLA-4	500(d0)+250µg/topo	IP	200 µl/topo	Giorno 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
7	ITF3756 + anti-CTLA-4	50 mg/kg 500(d0)+250µg/topo	OS IP	10 ml/kg IP	3x/giorno <sup>a</sup> (Giorno 0-4,6-8,11) <sup>c</sup> Giorno 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
8	Anti-PD1 + anti-CTLA-4	500(d0)+250µg/topo	IP IP	200 µl/topo 200 µl/topo	Giorno 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
9	Anti-PD-L1 + anti-CTLA-4	500(d0)+250µg/topo	IP IP	200 µl/topo 200 µl/topo	Giorno 0, 2, 4, 6, 8, 11	10

Gruppo di Test	Elemento di test	Dose Elemento	Via	Volume	Frequenza	Numero di Animali
a= seconda e terza dose giornaliera a distanza di circa 4 ore dalla precedente somministrazione b= PEG 400/H <sub>2</sub> O (1:1) contenente DMSO (max 5%) c= Ciclo 1: Giorno 0-4; Ciclo 2: Giorno 6-8, 11						

### Misurazioni del Livello di Glucosio

La glicemia è stata valutata in tutti i topi per 3 settimane dal giorno 0 (inizio del trattamento) fino al giorno 21 (fine dello studio). I livelli di glucosio nel sangue sono stati misurati mediante glucometro OneTouch® Verio. I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena della coda mediante puntura con un ago. Una goccia di sangue è stata inserita in una striscia reattiva e il glucometro ha calcolato automaticamente il livello di glucosio. I risultati sono stati visualizzati sul display dello strumento. Lo strumento misura da 20 a 600 mg/dl. I risultati inferiori a 20 o superiori a 600 mg/dl vengono visualizzati dallo strumento come “sotto 20” o “sopra 600”.

Il diabete è stato definito da una lettura della glicemia  $\geq 250$  mg/dl per due giorni consecutivi.

I topi sono stati monitorati per 3 settimane; durante questo periodo, il peso corporeo è stato misurato 7 volte.

### **Risultati**

I trattamenti con ICI sono dotati della possibilità intrinseca di generare reazioni autoimmuni, il che è stato confermato dalla pratica clinica. La combinazione di due ICI, come anti CTLA4 e anti PD-1, ha una efficacia migliore con una maggiore incidenza di eventi avversi. L'obiettivo dell'immunoterapia del tumore è quindi migliorare l'efficacia e ridurre gli effetti collaterali a un livello gestibile. La combinazione dell'inibitore di

HDAC6 selettivo ITF3756 con l'anti CTLA4 ha un'efficacia antitumorale paragonabile a anti CTLA4 + anti PD-1 e i nostri dati su topi NOD dimostrano che ha un eccellente profilo di sicurezza.

I risultati ottenuti nel modello NOD mostrano una drastica induzione di diabete nei topi trattati con anti PD-L1 e con la combinazione (anti PD-L1 + anti CTLA-4). Questi risultati sono in accordo rispettivamente con i dati della letteratura e la previsione degli inventori (**Figura 11**).

Gli altri due gruppi che hanno mostrato un aumento dell'incidenza di diabete erano l'anti PD-1 e (anti PD-1 + anti CTLA-4) con un'incidenza del diabete del 60% e del 50% rispettivamente al giorno 21.

In netto contrasto, solo un topo nel gruppo (ITF3756 + anti CTLA-4) ha avuto un aumento transitorio del livello di glucosio tra il giorno 11 e il giorno 14. Tuttavia, detto topo si è parzialmente ripreso, poiché tutte le misurazioni dopo il giorno 15 erano inferiori a 250 mg/dl, sebbene superiori al valore medio del gruppo di controllo.

Nessuna induzione di diabete è stata rilevata negli altri gruppi.

I risultati ottenuti nei gruppi trattati con gli anticorpi, sono in accordo con i dati di letteratura che descrivono un ruolo critico dell'asse PD-1/PD-L1 in topi NOD.

I risultati indicano chiaramente che l'inibizione di HDAC6 non aumenta l'incidenza di diabete e in particolare che la combinazione dell'inibitore selettivo di HDAC6 ITF3756 con un anticorpo anti CTLA-4 ha un effetto molto marginale sull'induzione di diabete.

D'altra parte, la combinazione di anticorpi anti CTLA-4 con anticorpi sia anti PD-1 che anti PD-L1 aggrava fortemente il diabete.

Questi risultati suggeriscono che il trattamento (anti CTLA-4 + ITF3756) potrebbe avere un profilo di sicurezza migliore rispetto all'anti CTLA-4 + anti PD-(L)1.

Il Mandatario

Elena Viganò

  
della DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL

(Iscr. Albo No. 1345 B)

## **RIVENDICAZIONI**

- 1.** Una combinazione comprendente N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide o un suo sale farmaceuticamente accettabile, e almeno un inibitore del checkpoint CTLA4.
- 2.** La combinazione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto che detto almeno un inibitore del checkpoint CTLA4 è ipilimumab o tremelimumab.
- 3.** La combinazione secondo la rivendicazione 1 o 2, per l'uso come medicamento.
- 4.** La combinazione per l'uso secondo la rivendicazione 3, nel trattamento di una qualsiasi malattia o condizione suscettibile a essere migliorata o prevenuta mediante trattamento con anticorpi anti CTLA4, anti PD1 e/o anti PD-L1.
- 5.** La combinazione per l'uso secondo la rivendicazione 3 o 4, nel trattamento di un paziente che ha interrotto il trattamento con anticorpi anti CTLA4, anti PD1 e/o anti PDL1.
- 6.** La combinazione per l'uso secondo le rivendicazioni da 3 a 5, nell'immunoterapia dei tumori o nel trattamento di una o più malattie mediate da HDAC6.
- 7.** La combinazione per l'uso secondo la rivendicazione 6, nel trattamento di un paziente che non è trattato con anticorpi anti CTLA4, anti PD1 e/o anti PDL1.
- 8.** La combinazione per l'uso secondo la rivendicazione 6 o 7, nel trattamento di una o più malattie scelte dal gruppo costituito da: melanoma, carcinoma a cellule renali, cancro del polmone non a piccole cellule e

cancro del colon-retto.

**9.** La combinazione per l'uso secondo le rivendicazioni da 3 a 8, caratterizzata dal fatto che la N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide o un suo sale farmaceuticamente accettabile e detto almeno un inibitore del checkpoint CTLA4 sono per somministrazione simultanea, separata o sequenziale.

**10.** La combinazione per l'uso secondo la rivendicazione 9, caratterizzata dal fatto che la N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide viene somministrata a un paziente su base giornaliera, preferibilmente da 2 a tre volte al giorno, più preferibilmente per via orale, e detto almeno un inibitore dei checkpoint CTLA4 viene somministrato a un paziente ogni da 2 a 4 settimane, preferibilmente per infusione endovenosa.

**11.** La combinazione per l'uso secondo la rivendicazione 9 o 10, caratterizzata dal fatto che la N-idrossi-4-((5-(tiofen-2-il)-1H-tetrazol-1-il)metil)benzammide viene somministrata a un paziente in una quantità che varia da 200 mg a 1000 mg BID o da 100 mg a 1000 mg TID e detto almeno un inibitore dei checkpoint CTLA4 viene somministrato a un paziente in una quantità che varia da 0,5 a 10 mg/kg ogni da 2 a 4 settimane, preferibilmente da 1 a 3 mg/kg ogni da 2 a 4 settimane.

Il Mandatario

Elena Viganò

  
della DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL

(Iscr. Albo No. 1345 B)

Figura 1

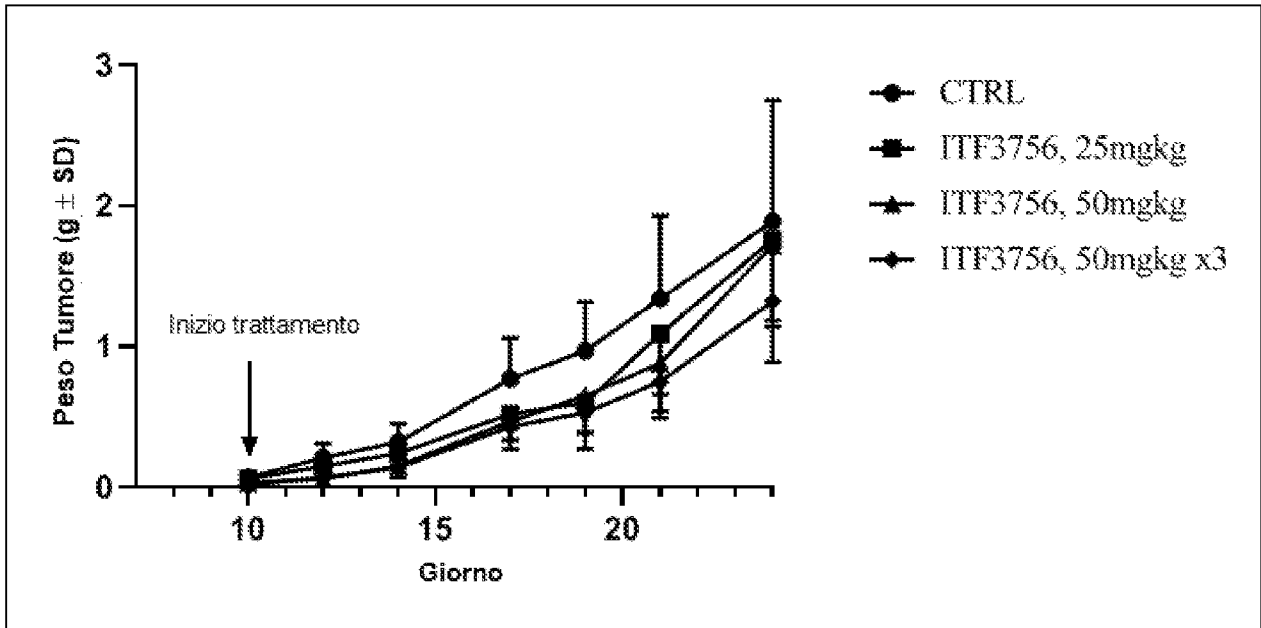


Figura 2

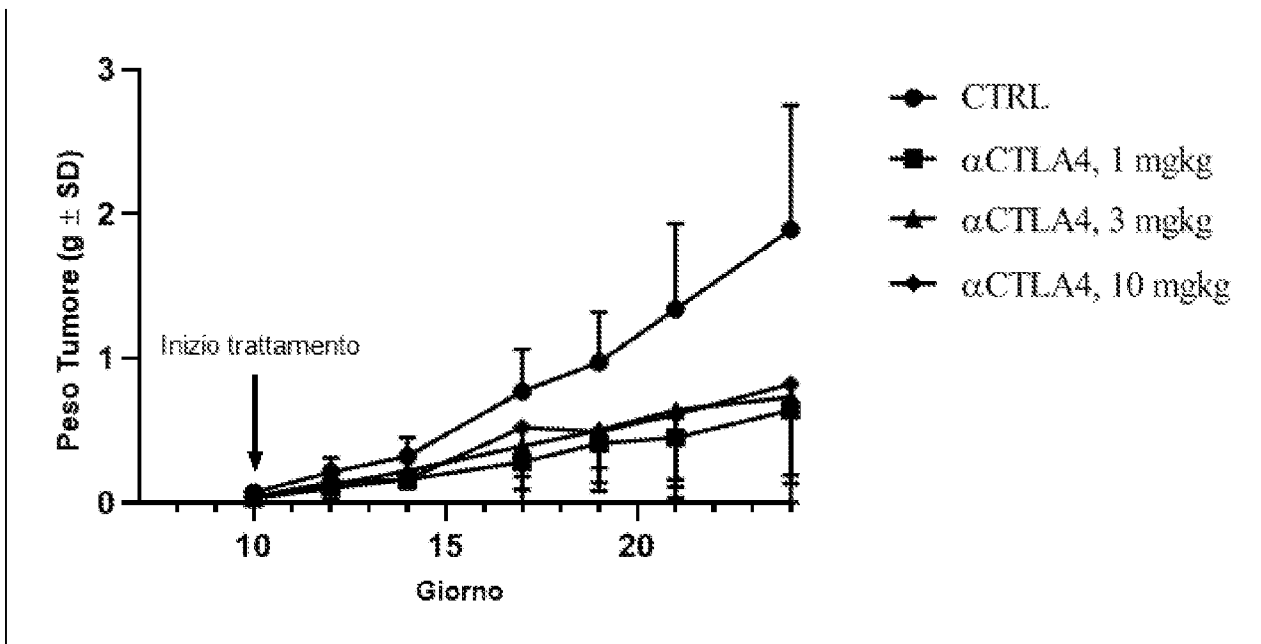


Figura 3

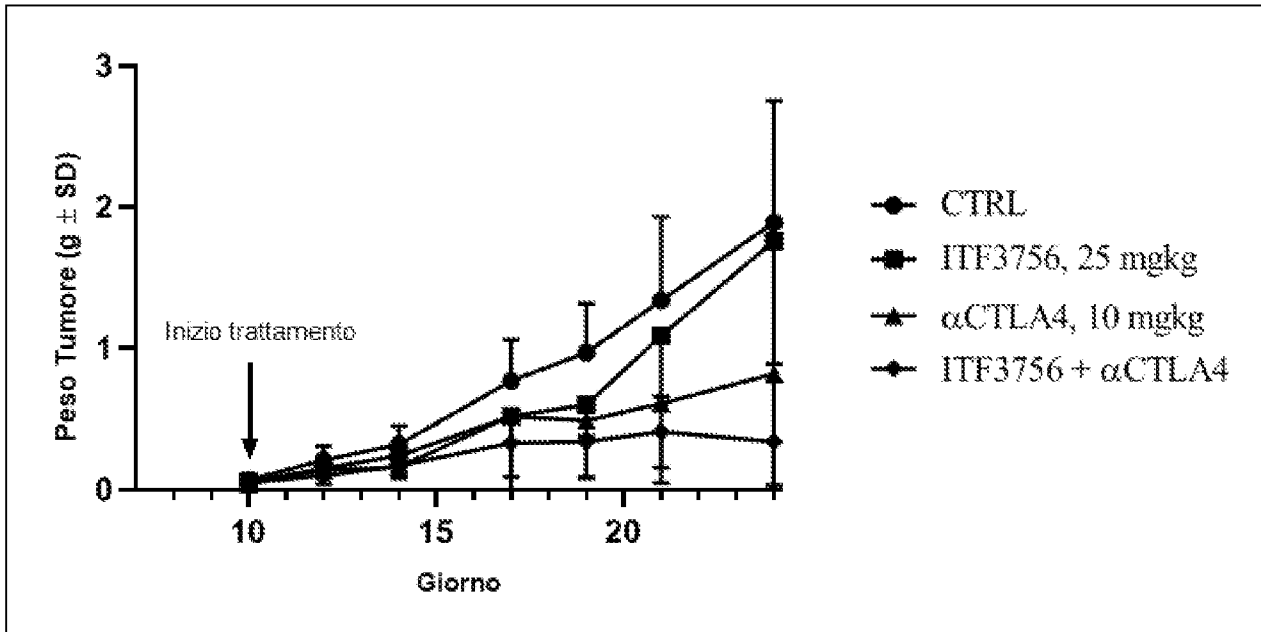


Figura 4

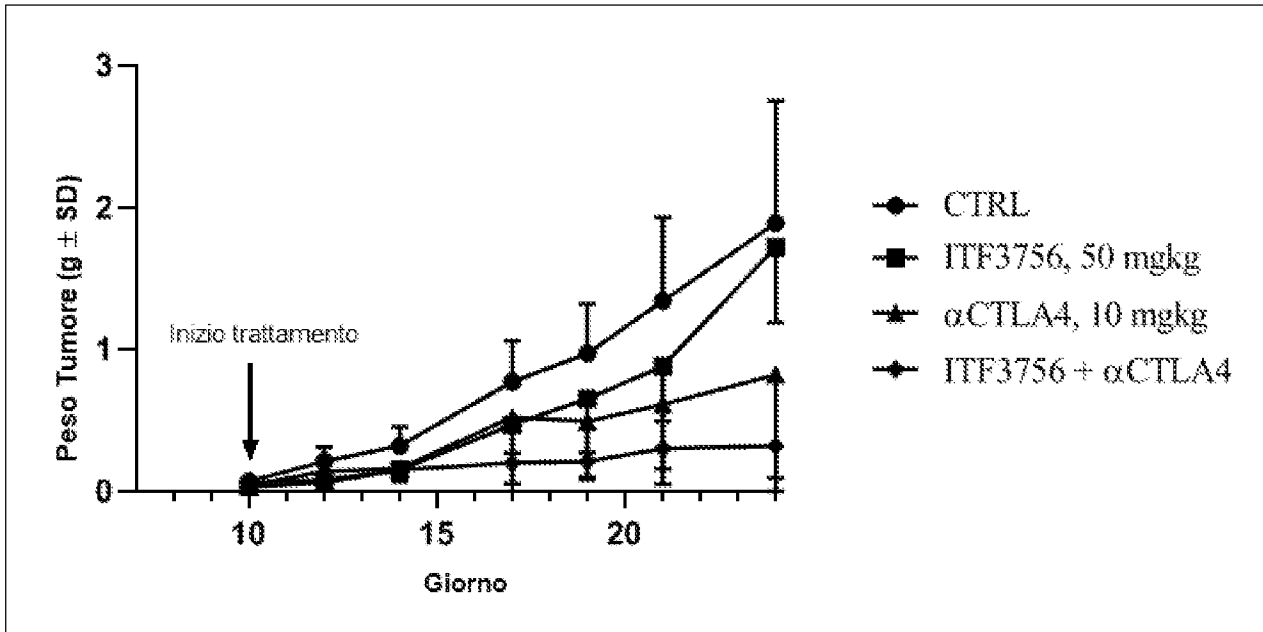


Figura 5

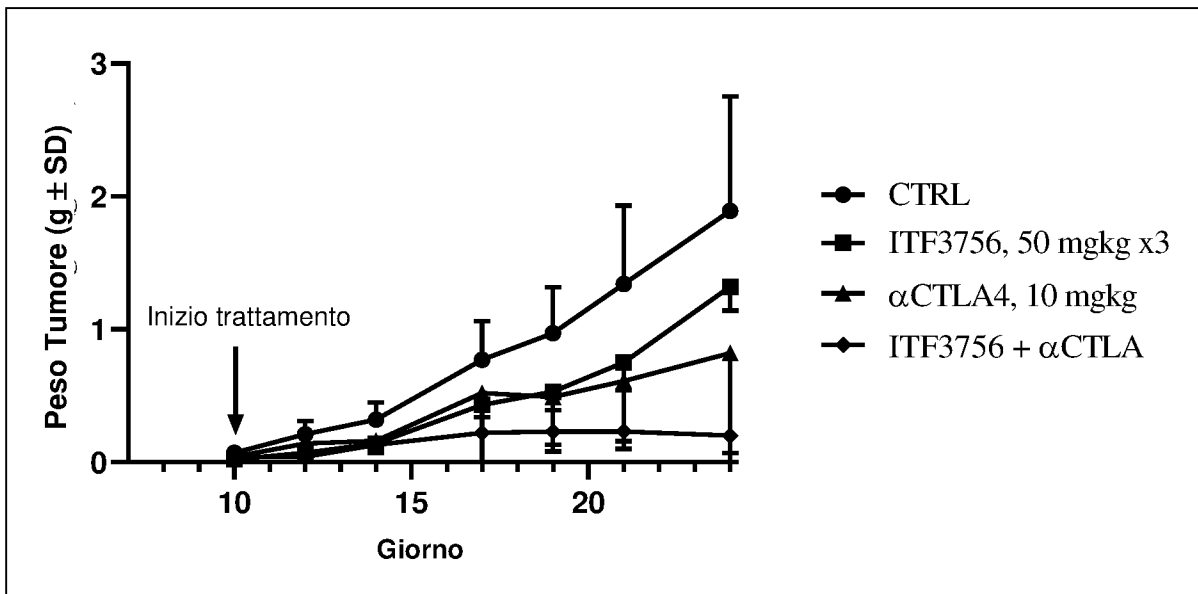


Figura 6

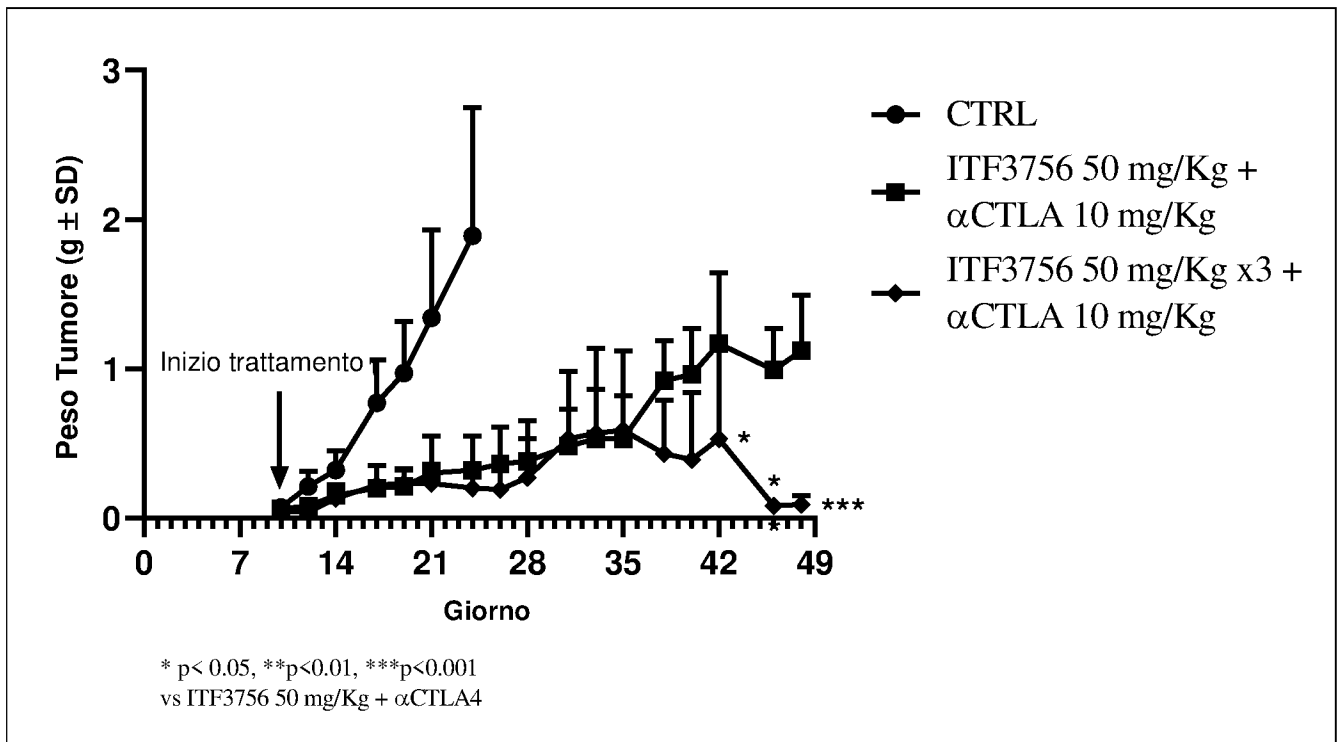


Figura 7

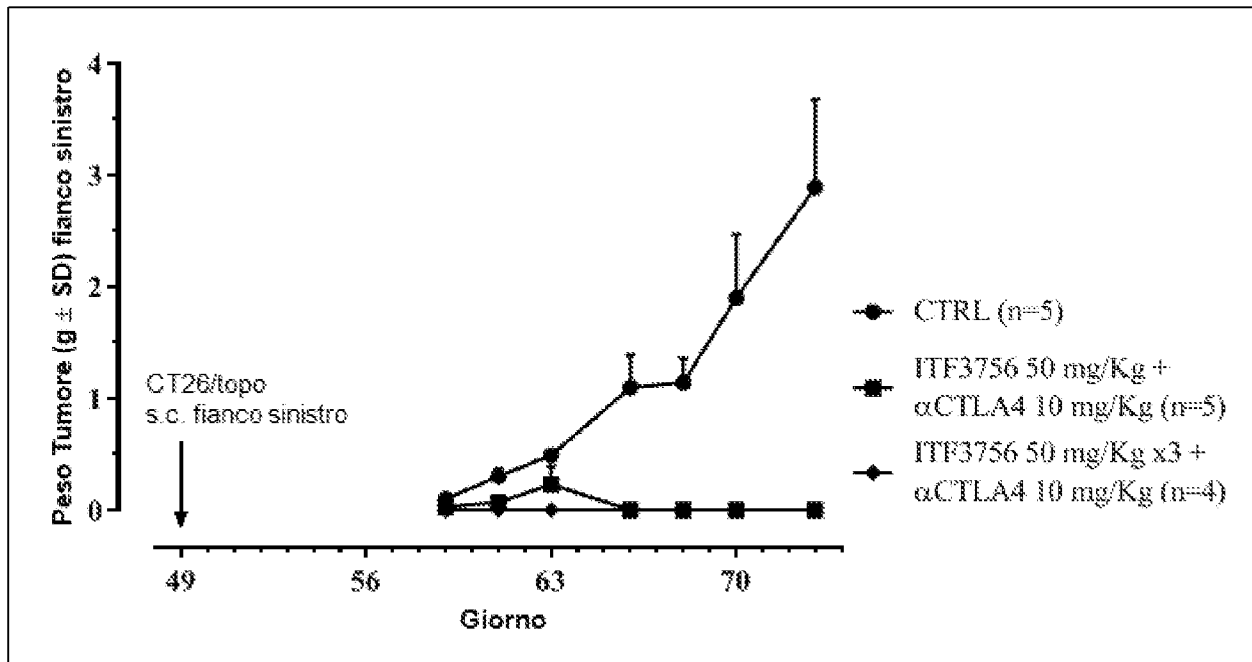


Figura 8A

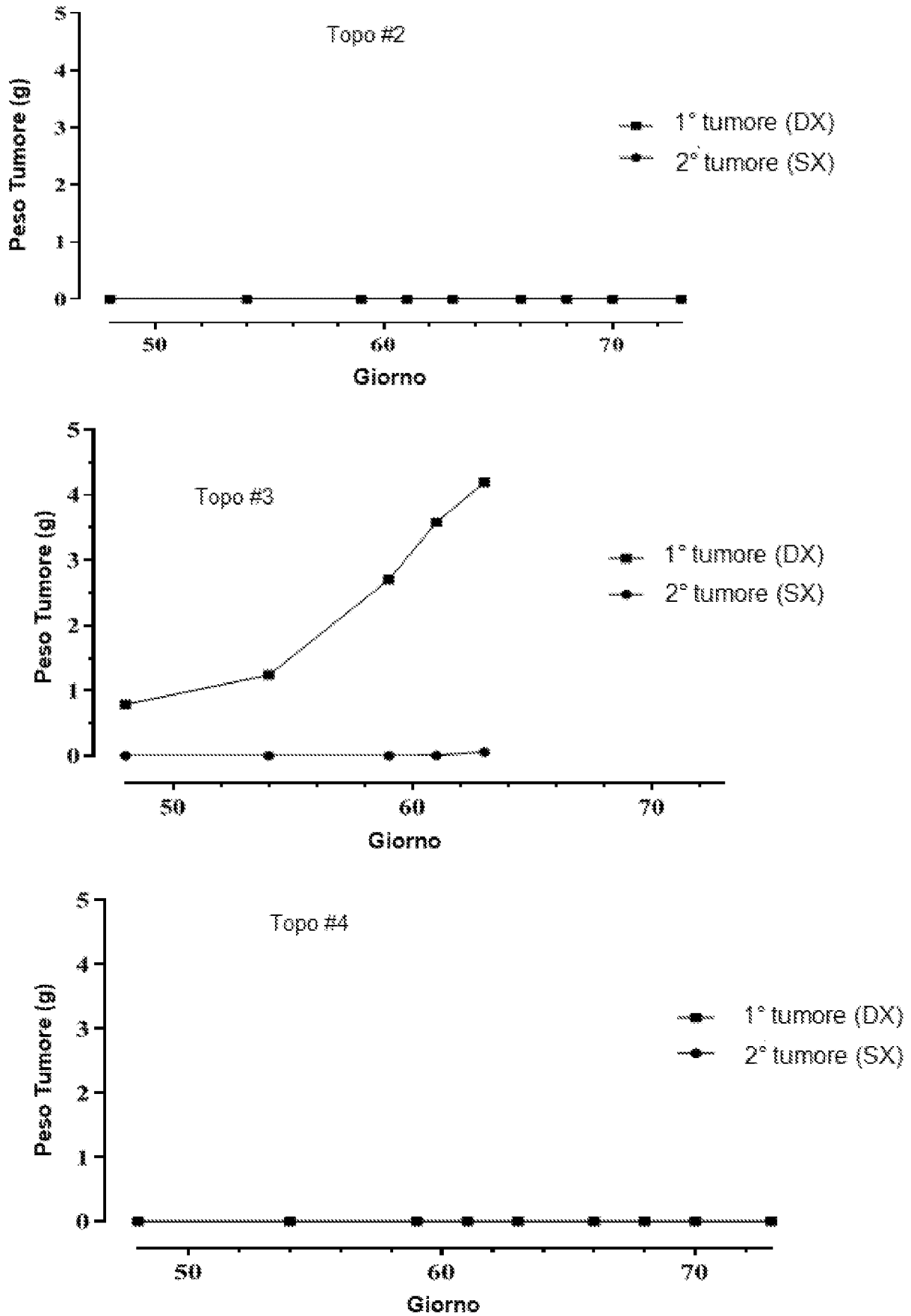


Figura 8B

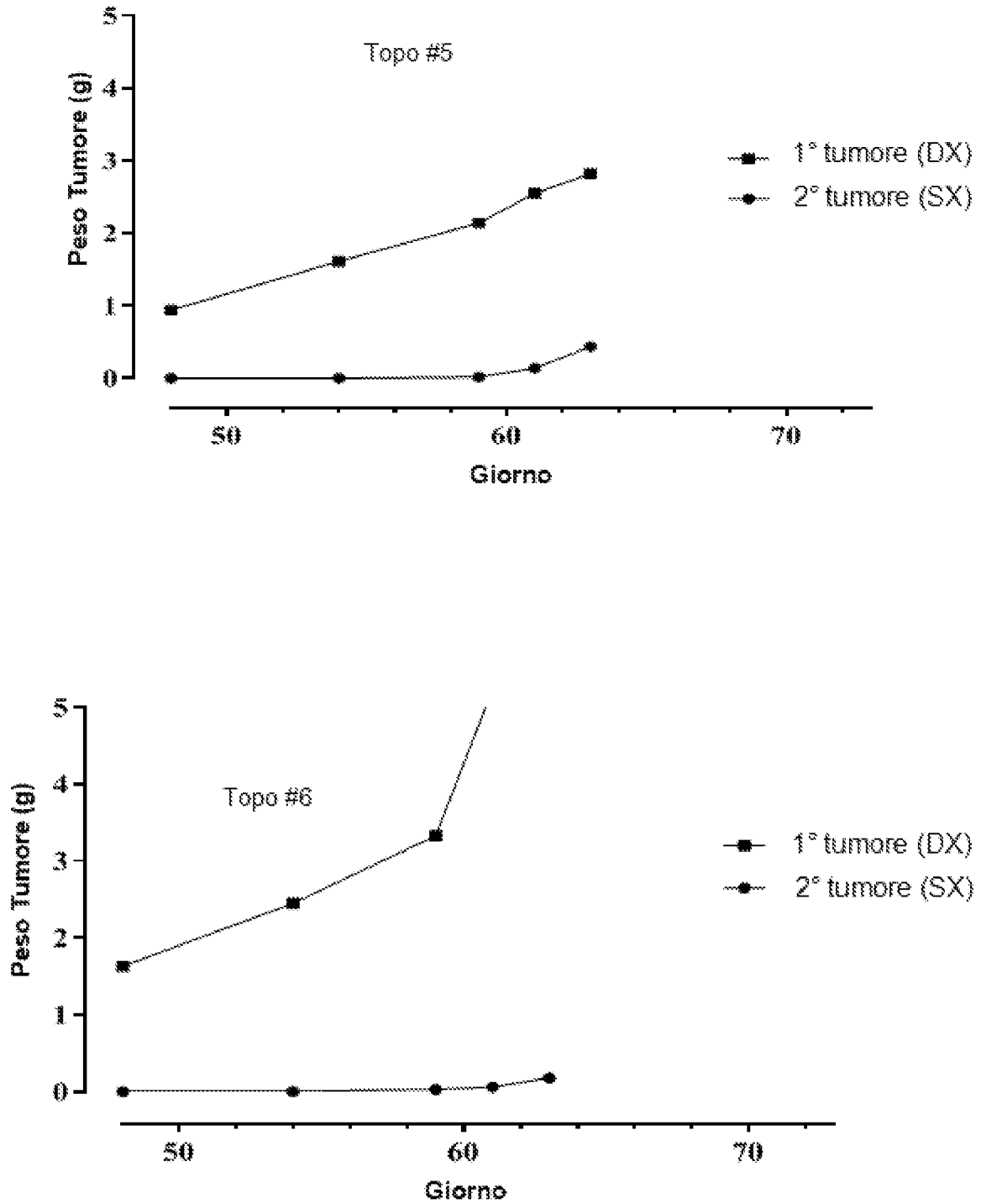


Figura 9A

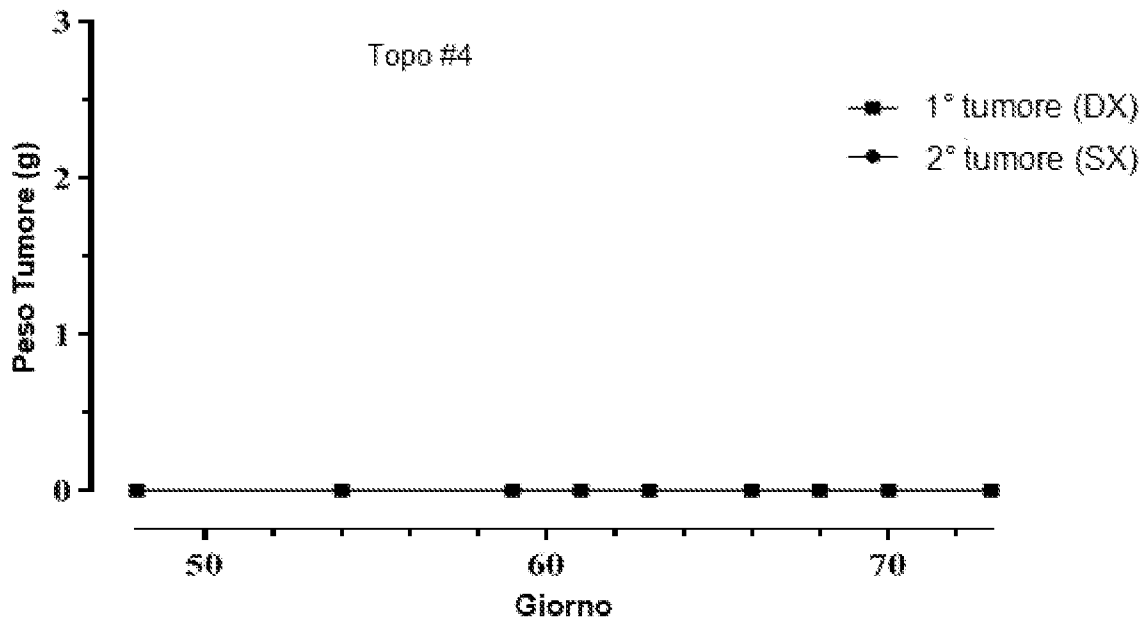
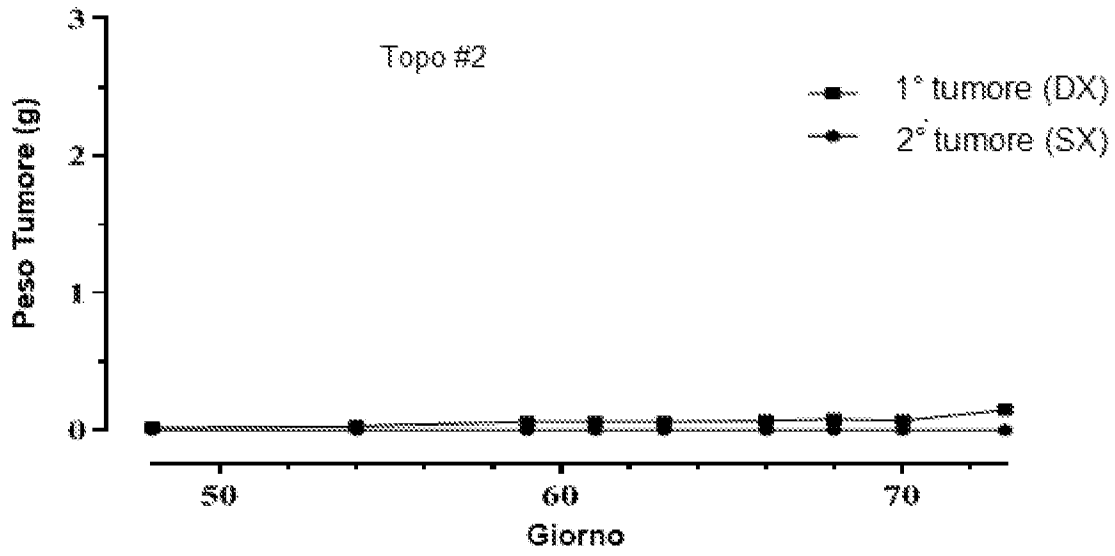


Figura 9B

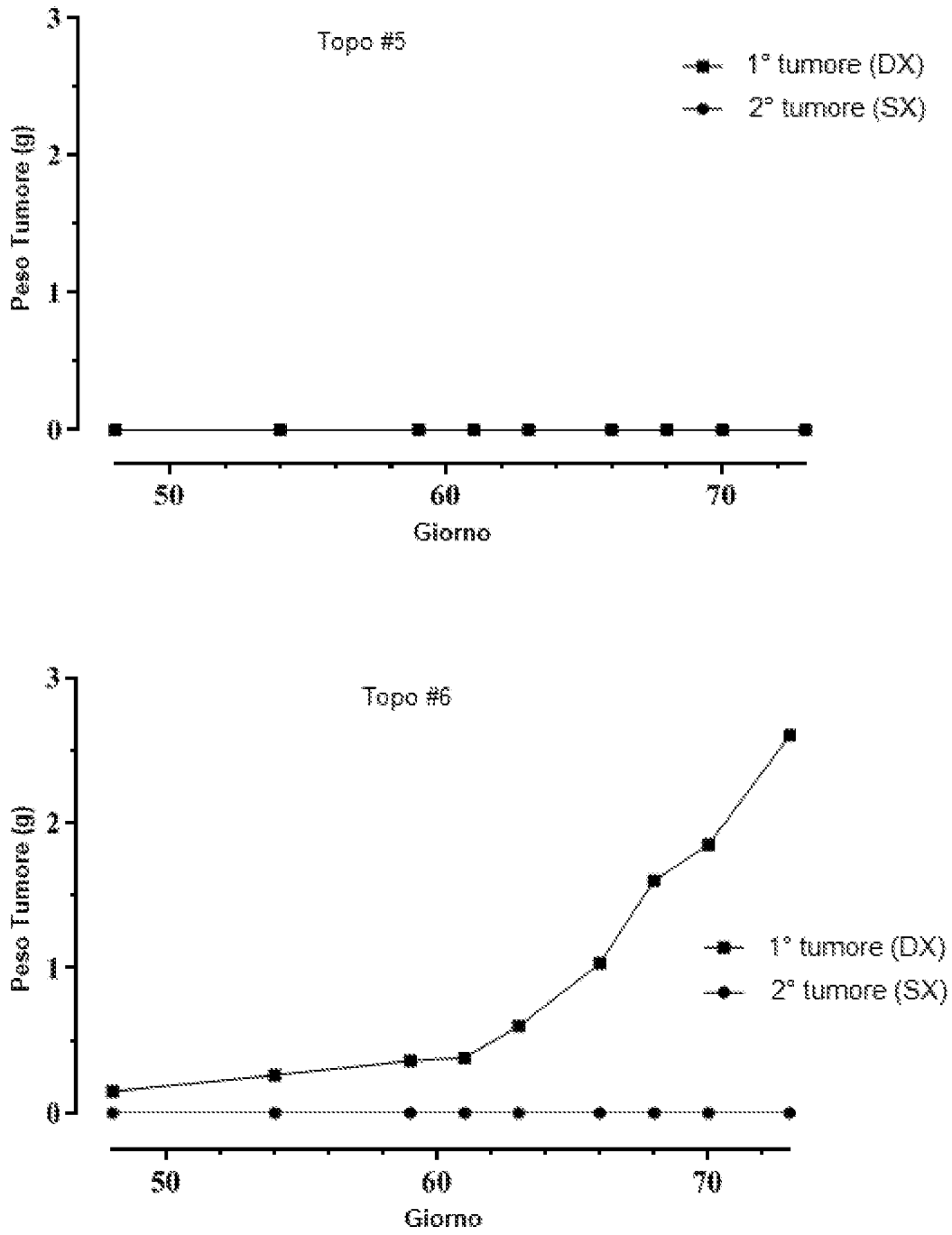


Figura 10

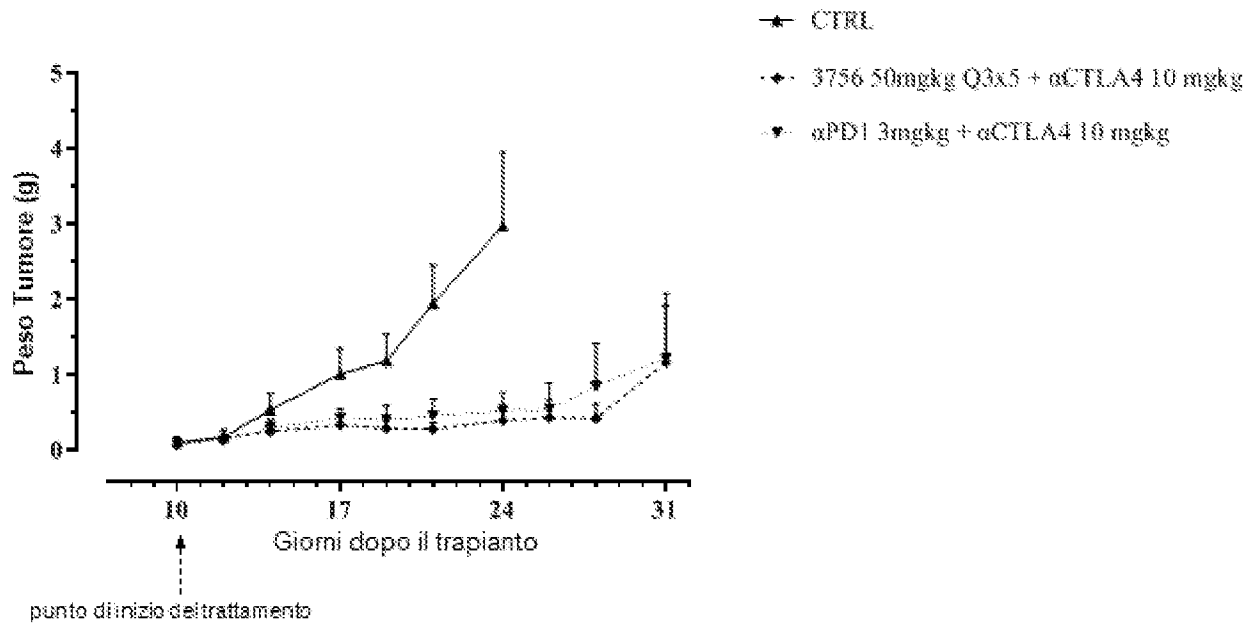


Figura 11

