

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391446** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.19

(22) Дата подачи заявки
2021.11.10

(51) Int. Cl. *A61P 3/04* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

**(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ GDF15 И РЕЖИМ ДОЗИРОВАНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ**

(31) 20206801.1; 21175107.8; 21196910.0

(32) 2020.11.10; 2021.05.20; 2021.09.15

(33) EP

(86) PCT/EP2021/081236

(87) WO 2022/101263 2022.05.19

(71) Заявитель:
**КАТАЛИМ ГМБХ; ЮЛИУС-
МАКСИМИЛИАНС-УНИВЕРЗИТЕТ
ВЮРЦБУРГ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Лео Ойген, Хааке Маркус, Вишхузен
Йорг (DE), Ле Брен Виржини, Йорг
Зузанне (CH)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителу против GDF15 и к режиму дозирования для лечения злокачественного новообразования у пациента-человека с использованием антитела против GDF15. Авторы настоящего изобретения идентифицировали механизм, с помощью которого GDF15 блокирует адгезию и трансгрессию преимущественно Т-лимфоцитов в ткани. Таким образом, согласно настоящему изобретению был разработан новый подход к лечению, который облегчает проникновение эффекторных Т-клеток в опухолевую ткань при блокировании GDF15 с использованием антитела по настоящему изобретению, что позволяет проводить лечение злокачественного новообразования у пациентов-людей.

A1

202391446

202391446

A1

**АНТИТЕЛО ПРОТИВ GDF15 И РЕЖИМ ДОЗИРОВАНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ****Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к антителу против GDF15 и к режиму дозирования для лечения злокачественного новообразования у людей с онкологическими заболеваниями с использованием антитела против GDF15.

Уровень техники

GDF-15 является дивергентным членом суперсемейства TGF-бета, для которого описаны функции в регуляции аппетита, метаболизме, выживании клеток и тканей и иммунной толерантности. GDF-15 представляет собой гомодимер, который образуется в виде пробелка, который расщепляется до 25 кДа (2×112 а.о.) димерного зрелого GDF-15 и 2×18 кДа (2×167 а.о.) пропептидов, которые находятся в ткани (Tsai 2018).

На сегодняшний день описаны две основные категории активности GDF-15. Первая категория относится к метаболическому эффекту, то есть GDF-15 опосредует кахексию посредством изменения поведения при приеме пищи, вызывая анорексию. (Johnen 2007) Этот эффект опосредуется специфическим рецептором ствола мозга, названным GFRAL, который был описан в конце 2017 года (Emmerson 2017). Напротив, вторая категория относится к иммуномодулирующему эффекту, то есть было показано, что GDF-15 является медиатором иммунной толерантности при беременности (Tong et al. 2004), повреждении тканей (Chung et al. 2017) и воспалении (Abulizi 2016), аутоиммунных заболеваниях и при уклонении опухоли от иммунного надзора. GDF-15 ингибирует активацию интегрин лейкоцитов и тем самым предотвращает их инфильтрацию (Kempf 2011).

В последние годы появилось все больше доказательств того, что GDF-15, по-видимому, играет критическую иммунорегуляторную роль в физиологических и патофизиологических ситуациях и, в частности, при злокачественном новообразовании. Для опухолевых клеток, естественно, было бы очень привлекательно использовать и «захватить» такой механизм отталкивания иммунных клеток, блокируя проникновение иммунных клеток в микроокружение опухоли и, следовательно, предотвращая удаление опухолевых клеток иммунной системой. В соответствии с этим в последние годы появилось множество публикаций, указывающих на то, что высокий уровень GDF-15 в сыворотке крови при различных типах рака коррелирует с более короткой общей выживаемостью и что GDF-15 является независимым фактором выживания пациентов при различных типах опухолей (Wischhusen et al., 2020).

О повышенных уровнях GDF-15 часто сообщают у онкологических пациентов. В исследовании на основе микрочипов, сравнивающем 150 карцином из 10 анатомических областей происхождения с 46 нормальными тканями, GDF-15 показал самый высокий уровень опухолеассоциированной (сверх)экспрессии (Welsh 2003), а несколько

исследований коррелируют уровень GDF-15 в сыворотке и ответ/прогноз при злокачественном новообразовании.

Кроме того, два собственных анализа с участием двух разных академических групп по изучению меланомы показывают, что уровень GDF-15, по-видимому, также коррелирует с ответом на антагонисты PD-1.

Как выявлено, опухолевые ткани, нормальные ткани органов в состоянии дистресса и плацента, как известно, сверхэкспрессируют GDF-15, что, скорее всего, во всех случаях предотвращает чрезмерную инфильтрацию иммунных клеток в соответствующие ткани. Следовательно, авторы изобретения считают, что GDF-15, продуцируемый вышеуказанными тканями, действительно существенно снижает адгезию Т-клеток сосудов и трансмиграцию эндотелия, предотвращая проникновение Т-клеток в соответствующую ткань или в ее непосредственную близость.

В то время как антитело против GDF-15 обычно демонстрирует благоприятный и вполне приемлемый профиль безопасности на животных моделях, этот способ действия, естественно, несет в себе различные потенциальные риски при разработке подходящего режима дозирования для лечения людей.

Рациональными партнерами по комбинации для антитела против GDF-15 будут соединения, активирующие Т-клетки, такие как ингибиторы контрольной точки против PD-1/PD-L1. Эффективность таких соединений может быть существенно повышена. Тем не менее, потенциально их токсичность также может усиливаться при сочетании их с определенными режимами дозирования нейтрализующего антитела против GDF-15.

Второй потенциальной проблемой является физиологическая роль GDF-15 в защите органов, находящихся в состоянии дистресса. Если GDF-15 подавляется с помощью антитела против GDF-15 и возникает поражение органов (например, инфаркт миокарда, инфекция, другое серьезное повреждение органов), может возникнуть чрезмерная инфильтрация органов иммунными клетками и нежелательное повреждение/разрушение тканей.

Третьей потенциальной областью беспокойства являются редкие данные, полученные на отдельных моделях мышей с нокаутом GDF-15 (Wischhusen 2020).

Кроме того, двумя важными механизмами, поддерживающими цитотоксическое действие препаратов антител на опухолевые клетки, являются антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Оба механизма могут быть ответственны за нежелательные эффекты в отношении эндогенных здоровых клеток, экспрессирующих антитела-мишени или неспецифические связывающие антитела.

В этом отношении ADCC является важным механизмом уничтожения опухолевых клеток-мишеней и основан на связывании определенных препаратов антител с человеческим рецептором FcγRIIIa на иммунных клетках (в основном натуральных клетках-киллерах), что приводит к активации связанной клетки-киллера. Таким образом, распознавание и связывание антигена-мишени с опухолевыми клетками, а также связь

между клетками-мишенями и иммунными клетками с помощью антитела необходимы для индукции ADCC. Перекрестное связывание клеток-мишеней и иммунных клеток приводит к активации пути ADCC MOA (механизм действия) и, наконец, к лизису клеток.

Кроме того, важно обеспечить стабильный состав указанного антитела, который можно безопасно вводить пациенту и который отвечает всем критериям долгосрочной стабильности.

Описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на преодоление неудовлетворенных клинических потребностей в обеспечении безопасной и эффективной композиции для применения в терапевтическом лечении пациентов-людей.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает безопасный и стабильный состав указанного антитела.

Основываясь на обширных экспериментальных тестах, авторы настоящей заявки обнаружили, что неожиданно ни антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), ни комплементзависимая цитотоксичность (CDC) не вносят существенного вклада в противоопухолевый эффект антитела против GDF15 по изобретению.

GDF-15 блокирует адгезию и трансгрессию Т-лимфоцитов в ткани. С антителами против GDF15 по изобретению, блокирующими GDF-15, был создан подход к лечению, который облегчает проникновение эффекторных Т-клеток в опухолевую ткань без какого-либо вклада ADCC или CDC в противоопухолевый эффект. Это должно существенно повысить эффективность любого агента, активирующего Т-клетки, например, ингибиторов контрольных точек и, таким образом, позволяют обеспечить эффективную иммунотерапию либо отдельно, либо в комбинации с ингибиторами контрольных точек.

В то же время обнаружение авторами изобретения того, что ни ADCC, ни CDC не способствуют противоопухолевому эффекту, позволяет эффективно использовать против злокачественного новообразования антитела против GDF-15, которые не индуцируют ADCC и/или CDC, повышая общую безопасность.

Следовательно, антитела против GDF-15 по изобретению особенно безопасны и, таким образом, неожиданно объединяют полную эффективность против злокачественного новообразования с безопасностью.

Более того, авторы настоящего изобретения также предлагают первую схему дозирования антитела против GDF15, позволяющую успешно лечить пациентов-людей.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает следующие предпочтительные варианты осуществления:

Пункт 1 Композиция, содержащая антитело против GDF-15, для применения в способе лечения злокачественного новообразования и/или раковой кахексии у пациента-человека.

Пункт 2 Композиция для применения по пункту 1, где антитело против GDF-15 вводят в дозе 0,3, 1, 3, 10 или 20 мг/кг, предпочтительно 3, 10 или 20 мг/кг, более

предпочтительно 10 мг/кг, и в режиме дозирования, представляющем собой по меньшей мере один цикл введения, где цикл представляет собой период в две недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.

Пункт 3 Композиция для применения по пункту 1, где антитело против GDF-15 вводят в дозе от 10 до 20 мг/кг, предпочтительно 20 мг/кг, и в режиме дозирования, представляющем собой по меньшей мере один цикл введения, где цикл представляет собой период в четыре недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.

Пункт 4 Композиция для применения по пункту 1, где антитело против GDF-15 вводят в дозе от 10 до 20 мг/кг и в режиме дозирования, представляющем собой по меньшей мере один цикл введения, где цикл представляет собой период в три недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.

Пункт 5 Композиция для применения по любому из пунктов 1-4, где указанное антитело не индуцирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или не индуцирует комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

Пункт 6 Композиция для применения по любому из пунктов 1-5, где указанное антитело против GDF-15 представляет собой антитело изотипа IgG4.

Пункт 7 Композиция для применения по пункту 6, где указанное антитело содержит мутацию, стабилизирующую шарнир.

Пункт 8 Композиция для применения по пункту 7, где указанная мутация, стабилизирующая шарнир, представляет собой мутацию S228P.

Пункт 9 Композиция для применения по любому из пунктов 1-8, где указанное антитело против GDF-15 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий область CDR1, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1, область CDR2, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 2, и область CDR3, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 3, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий область CDR1, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4, область CDR2, представленную аминокислотной последовательностью ser-ala-ser, и область CDR3, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 5.

Пункт 10 Композиция для применения по любому из пунктов 1-9, где вариабельный домен тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, и вариабельный домен легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

Пункт 11 Композиция для применения по любому из пунктов 1-10, где тяжелая цепь указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и легкая цепь указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9.

Пункт 12 Композиция для применения по любому из пунктов 1-11, где указанное антитело против GDF-15 можно получить путем экспрессии в клетках CHO.

Пункт 13 Композиция для применения по любому из пунктов 1-12, где концентрация GDF-15 в сыворотке/плазме указанного пациента составляет менее 10 нг/мл в конце цикла введения.

Пункт 14 Композиция для применения по пункту 13, где концентрация GDF-15 в сыворотке указанного пациента составляет менее 2 нг/мл в конце цикла введения.

Пункт 15 Композиция для применения по пункту 13, где концентрация GDF-15 в сыворотке указанного пациента составляет менее 0,5 нг/мл в конце цикла введения.

Пункт 16 Композиция для применения по любому из пунктов 1-15, где цикл введения составляет период в три недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.

Пункт 17 Композиция для применения по любому из пунктов 1-15, где цикл введения составляет период в четыре недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.

Пункт 18 Композиция для применения по любому из пунктов 1-15, где указанный режим дозирования включает множество циклов и необязательно до 52 циклов введения.

Пункт 19 Композиция для применения по пункту 18, где указанный режим дозирования включает 26-52 циклов введения.

Пункт 20 Композиция для применения по пункту 16, где указанный режим дозирования включает до 34 циклов введения.

Пункт 21 Композиция для применения по п. 20, где указанный режим дозирования включает 17-34 циклов введения.

Пункт 22 Композиция для применения по п. 17, где указанный режим дозирования включает до 26 циклов введения.

Пункт 23 Композиция для применения по п. 22, где указанный режим дозирования включает 12-26 циклов введения.

Пункт 24 Композиция для применения по любому из пунктов 1-23, где указанное антитело против GDF-15 следует вводить в комбинации с ингибитором контрольной точки.

Пункт 25 Композиция для применения по пункту 24, где указанный ингибитор контрольной точки выбран из групп, состоящих из антитела против PD-1, антитела против PD-L1 или антитела против CD40.

Пункт 26 Композиция для применения по пунктам 24 или 25, где указанный ингибитор контрольной точки следует вводить в том же режиме дозирования, что и антитело против GDF-15.

Пункт 27 Композиция для применения по любому из пунктов 24-26, где указанный ингибитор контрольной точки следует вводить до введения антитела против GDF-15.

Пункт 28 Композиция для применения по пункту 27, где указанный ингибитор контрольной точки следует вводить в течение 120 мин до введения антитела против GDF-15.

Пункт 29 Композиция для применения по п. 28, где указанный ингибитор контрольной точки следует вводить в течение 30 минут до введения антитела против GDF-15.

Пункт 30 Композиция для применения по любому из пунктов 1-29, где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из всех видов рака головного мозга (включая глиому), всех видов рака нервной системы, меланомы, рака легких, рака печени, рака эндометрия, рака шейки матки, рака яичников, рака молочной железы, почечно-клеточного рака, опухоли костей и мягких тканей (включая, например, саркому Юинга), немелкоклеточного рака легкого и мелкоклеточного рака легкого, рака губы и полости рта, рака носоглотки, рака гортани, рака глотки, любого типа рака головы и шеи, лейкоза, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака мочевого пузыря, любого типа рака уротелиального тракта, рака яичка, рака щитовидной железы, рака почки, рака желчного пузыря и желчных протоков, множественной миеломы, рака пищевода, опухоли желудочно-кишечного тракта, включая рак желудка, колоректальный, ректальный и анальный рак, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака яичников, карциномы молочной железы и рака неизвестной первичной формы, а также любого другого типа рака человека, и где применение необязательно также является применением для лечения раковой кахексии.

Пункт 31 Композиция для применения по любому из пунктов 1-30, где указанную дозу антитела против GDF-15 вводят внутривенно.

Пункт 32 Антитело против GDF-15, где указанное антитело представляет собой антитело изотипа IgG4, имеющее мутацию, стабилизирующую шарнир, и где переменный домен тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, и переменный домен легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

Пункт 33 Антитело против GDF-15 по пункту 32, где тяжелая цепь указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности,

предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и легкая цепь указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9.

Пункт 34 Антитело против GDF-15 по пунктам 32 или 33, где указанная мутация, стабилизирующая шарнир, представляет собой мутацию S228P.

Пункт 35 Антитело по любому из пунктов 32-34, где указанное антитело не индуцирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или не индуцирует комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

Пункт 36 Антитело по любому из пунктов 32-35, где указанное антитело можно получить путем экспрессии в клетках CHO.

Пункт 37 Антитело по любому из пунктов 32-36, где указанное антитело против GDF-15 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий область CDR1, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1, область CDR2, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 2, и область CDR3, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, содержащий область CDR1, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4, область CDR2, представленную аминокислотной последовательностью ser-ala-ser, и область CDR3, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 5.

Пункт 38 Состав, содержащий антитело против GDF-15, как определено выше, или композиция для применения, содержащая указанное антитело, как определено выше, где указанный состав содержит 10-50 мг/мл антитела против GDF-15.

Пункт 39 Состав по пункту 38, где указанный состав содержит гистидин/гистидин HCl, сахарозу, аргинин-HCl и полисорбат при pH от 5 до 6.

Пункт 40 Состав по пункту 38 или 39, где указанный состав содержит 10-50 мг/мл CTL-002, 10-50 мг/мл гистидин/гистидин HCl, 100-200 mM сахарозы, 20-80 mM аргинин-HCl и 0,01-0,05% мас./об. полисорбата 20 или полисорбата 80 при pH от 5 до 6, предпочтительно при pH от 5,3 до 5,7.

Пункт 41 Состав по любому из пунктов 38-40, который содержит 25 мг/мл CTL-002, 20 mM гистидин/гистидин HCl, 150 mM сахарозы, 50 mM аргинин-HCl, 0,02% мас./об. полисорбата 20, при pH 5,5.

Пункт 42 Состав по пункту 41, который состоит из 25 мг/мл CTL-002, 20 mM гистидин/гистидин HCl, 150 mM сахарозы, 50 mM аргинин-HCl, 0,02% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,5.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Лечение опухолей, продуцирующих GDF-15, с использованием антитела

против GDF-15 B1-23 (мышинный предшественник Ab CTL-002) существенно улучшает ответ на антитела против PD1.

Антитело против GDF-15 B1-23 само по себе оказывало лишь минимальный эффект, тогда как комбинация с антителом против PD-1 была способна существенно обратить вспять нарушение лечения антителом против PD-1.

Фигура 2: Исходный уровень GDF-15 в сыворотке коррелирует с ответом на лечение антителом против PD1/-L1.

(A+B) Исследование пациентов с меланомой на поздних стадиях. Исходный уровень GDF-15 связан с (A) исходом ответа и (B) общей выживаемостью (C+D) при меланоме на поздних стадиях. Исходный уровень GDF-15 связан с (C) исходом ответа и (D) общей выживаемостью.

Фигура 3: Определение аффинности человеческого антитела CTL-002 (=H1L5 IgG4)

Кинетику связывания анализировали с использованием Biacore T3000. Различные концентрации GDF-15 применяли к проточной кювете с CTL-002. Регистрировали фазы ассоциации и диссоциации для расчета константы диссоциации антитела. Кинетические данные оценивали путем глобальной аппроксимации с использованием программного обеспечения BIAevaluation 4.1. Показано одно репрезентативное измерение из трех.

Фигура 4: GDF-15 имеет IC₅₀ от 7 до 14 нг/мл в анализе адгезии потока *in vitro*.

HUVEC культивируют в течение 3 дней перед ночной активацией. Т-клетки выделяют от здоровых доноров и очищают в день эксперимента. Физиологический поток создается через установленные направляющие канала HUVEC с помощью калиброванного насоса. Первичные Т-клетки предварительно обрабатывают титрованием дозы от 0,4 до 100 нг/мл GDF-15 в течение 20 мин. Монослой HUVEC уравнивается в течение 20 минут промывочным буфером, содержащим 1 мкМ CXCL12, затем в течение 6 минут перфузируется предварительно обработанными Т-клетками, после чего следует стадия совместного культивирования с промывочным буфером в течение 40 минут. Индивидуальные изображения записывают каждые 30 секунд на 1 фиксированном поле, а события адгезии регистрируют как общее количество клеток на единицу поля. Из-за технической и биологической изменчивости анализа IC₅₀ обычно составляет от 7 до 14 нг/мл.

Система анализа	Эксперимент	IC ₅₀ GDF-15
Адгезия потока на основе клеток	Исследование 1 (n=3)	13,8нг/мл
	Исследование 2 (n=3)	7,47нг/мл

Фигура 5: CTL-002 восстанавливает ингибирование адгезии GDF-15 в зависимости от концентрации с EC₅₀ от 690 до 725 нг/мл.

HUVEC культивируют в течение 3 дней перед ночной активацией. Т-клетки выделяют от здоровых доноров и очищают в день эксперимента. 50 нг/мл GDF-15

предварительно инкубировали с CTL-002 в различных концентрациях в течение 20 минут, чтобы обеспечить связывание. Первичные Т-клетки и монослой HUVEC предварительно обрабатывали комплексом CTL-002/GDF-15 в течение 20 минут. Монослой HUVEC перфузировали после инкубации CTL-002/GDF-15 с промывочным буфером, содержащим 1 мкМ CXCL12, в течение 5 минут с последующим 15-минутным состоянием покоя. После промывания предварительно обработанные Т-клетки подвергают перфузии в течение 6 минут с последующим 50-минутным промыванием. Первую временную точку записывали через 10 минут, а затем записывали отдельные изображения каждые 30 секунд в 1 фиксированном поле, а случаи адгезии регистрировали как общее количество клеток на единицу поля в течение 50 минут. Строили графики значений AUC для определения EC50. Показаны три индивидуальных донора. Из-за технической и биологической изменчивости анализа IC50 обычно составляет от 690 до 725 нг/мл.

Фигура 6: У животных, получавших CTL-002, наблюдается более высокая инфильтрация иммунных клеток, обогащенных CD3+клетками.

Фигура 7: MC38-hGDF-15 демонстрирует преимущество в росте только у иммунокомпетентных мышей.

Фигура 8: Экспрессия GDF-15 препятствует успешной терапии с использованием антитела против PD-1.

Пустые опухоли MC38 реагируют на лечение с использованием антитела против PD-1 (Фиг. 8А), тогда как опухоли, секретирующие GDF-15, демонстрируют сильно нарушенный ответ на антитело против PD-1 (Фиг. 8В).

Фигура 9: Терапия опухолей с высоким уровнем GDF-15 с использованием антител против GDF-15 и антител против PD-1 может восстановить успех терапии ингибирования контрольных точек.

Антитело против GDF-15 B1-23 само по себе (сплошная линия, Фиг. 9А) имело лишь минимальный эффект, тогда как комбинация с антителом против PD-1 (пунктирная линия, Фиг. 9В) была способна частично обратить вспять нарушение лечения антителом против PD-1.

Фигура 10: Комбинация B1-23 с анти-CD40/Poly(IC:LC) иммунотерапией уничтожала MC38, экспрессирующую GDF-15 человека, в отличие от анти-CD40/Poly(IC:LC)-монотерапии.

Фигура 11: Комбинация B1-23 с анти-CD40/Poly(IC:LC)-иммунотерапией уничтожала MC38 в отличие от анти-CD40/Poly(IC:LC)-монотерапии.

Фигура 12: Индукция ADCC в UACC-257 с помощью тестируемых антител CTL-001, вариантов CTL-001 IgG1* PG LALA и CTL-002.

Клетки-мишени инкубировали с эффекторными клетками и различными концентрациями тестируемого или контрольного антитела в течение 6 ч при 37°C в трех экземплярах. Затем измеряли сигнал люминесценции. Здесь кратность индукции люминесцентного сигнала или полученных относительных световых единиц (RLU) наносили на график в зависимости от концентрации антител.

Фигура 13: Связывание человеческого белка комплемента C1q с CTL-001, различными изотипическими вариантами CTL-001, CTL-002 и контрольным антителом ритуксимаб в различных концентрациях.

Взаимодействие белка C1q и терапевтического антитела определяли методом ИФА с использованием 10 мкг/мл человеческого белка C1q с использованием для детектирования HRP-конъюгированного антитела против C1q. Здесь CTL-001 и варианты различных изотипов инкубировали с предварительно нанесенным в виде покрытия человеческим белком GDF-15 до того, как было получено связывание C1q. Эксперимент проводили в трех экземплярах, и среднее значение поглощения (A450 нм) строили в зависимости от концентрации антитела.

Фигура 14: Комплементзависимая цитотоксичность (CDC), индуцированная тестируемыми антителами и различными контрольными антителами в отношении клеток, экспрессирующих GDF-15.

Клетки инкубировали с указанными концентрациями тестируемых или контрольных антител в присутствии 10% сыворотки, содержащей активные белки комплемента крольчат. Для определения жизнеспособности клеток добавляли краситель аламаровый синий. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) измеряли после инкубации в течение 6 часов, соответственно, 24 часов при 37°C и 5% CO₂. Показана расчетная жизнеспособность через 6 часов [A] и через 24 часа [B] инкубации. На графике всегда отображается самая высокая использованная концентрация антител.

Фигура 15: Профили зависимости концентрации CTL-001 и CTL-002 от времени в сыворотке у яванских макаков.

Фигура 16: Наблюдаемая CTL-002 PK и общее исследование GDF-15 NHP DRF

Примечание: фармакокинетика CTL-002 линейна и приблизительно пропорциональна дозе в диапазоне 1-100 мг/кг. Плато в захвате GDF-15 как при дозе 10, так и при 100 мг/кг указывает на то, что весь доступный GDF-15 был захвачен, и увеличение дозы просто увеличивает продолжительность полного захвата мишени.

Фигура 17: Наблюдаемая фармакокинетика CTL-002 и 4нед GLP исследование токсичности обшей GDF-15 - NHP

Наблюдаемые значения (символы) для отдельных животных в 4-недельном исследовании токсичности GLP. Сплошные линии - модель фармакокинетики-фармакодинамики, аппроксимированная к наблюдаемым данным: данные, показанные сплошным кругом, были включены в модель фармакокинетики-фармакодинамики, данные, показанные крестиком, - это выпадающие показатели, которые были исключены из моделирования фармакокинетики-фармакодинамики.

Фигура 18: Прогнозируемая CTL-002 PK человека (концентрация в сыворотке)

Фигура 19: Прогнозируемый человеческий свободный и обшей GDF-15 (концентрация в сыворотке)

Прогнозируемое подавление GDF-15 в системном кровотоке Рассматриваются три исходных уровня GDF-15 в сыворотке; 0,5 нг/мл (средний уровень у здоровых людей и

приблизительно 15-й процентиль в когорте онкологических пациентов), 2 нг/мл (средний уровень в когорте онкологических пациентов; 50-й процентиль) и 10 нг/мл (98-й процентиль в когорте онкологических пациентов)

Фигура 20: Прогнозируемое подавление GDF-15 в микрососудистой сети опухоли

Прогнозируемое подавление GDF-15 в микрососудистой сети опухоли

Предположение: три исходных уровня системного GDF-15; 0,5, 2 и 10 нг/мл; что приводит к концентрации GDF-15 в микрососудистом русле опухоли 0,5, 25 и 161 нг/мл, соответственно.

Фигура 21: Прогнозируемое ингибирование GDF-15 в сыворотке при запланированных клинических дозах и диапазоне исходных уровней.

Нормальный уровень GDF-15 в сыворотке здоровых людей (0,5 нг/мл) показан пунктирной линией.

Фигура 22: Последовательность области связывания CTL-002 у различных видов

Последовательности областей связывания CTL-002 показаны для человека, яванского макака, мыши и крысы (первые четыре строки сверху вниз).

Фигура 23: Уровни GDF-15 в сыворотке у самок обезьян после первой дозы CTL-002

Фигура 24: Карта уязвимости последовательности легкой цепи H1L5

Карта последовательностей показывает в виде диаграмм расположение всех идентифицированных уязвимостей последовательности в легкой цепи H1L5. Расположение границ доменов и CDR, а также тип уязвимости представлены в данном положении по отношению к общей последовательности. Тип уязвимости указывается следующим образом: (I) N-связанное гликозилирование Asn, (II) O-связанное гликозилирование Ser/Thr, (III) дезамидирование Asn, (IV) изомеризация/фрагментация Asp, (V) пироглутамат, (VI) C-концевой лизин, (VII) окисление Met/Trp, (VIII) свободный тиол.

Фигура 25: Карта уязвимости последовательности тяжелой цепи H1L5

Карта последовательностей показывает в виде диаграмм расположение всех идентифицированных уязвимостей последовательностей в тяжелой цепи H1L5. Расположение границ доменов и CDR, а также тип уязвимости представлены в данном положении по отношению к общей последовательности. Тип уязвимости указывается следующим образом: (I) N-связанное гликозилирование Asn, (II) O-связанное гликозилирование Ser/Thr, (III) дезамидирование Asn, (IV) изомеризация/фрагментация Asp, (V) пироглутамат, (VI) C-концевой лизин, (VII) окисление Met/Trp, (VIII) свободный тиол.

Подробное описание изобретения

Если иное не указано в настоящем описании, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области генной терапии, иммунологии, биохимии, генетики и молекулярной биологии.

Все способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, где подходящие способы и материалы описаны в настоящем документе.

При использовании в настоящем описании, каждое появление таких терминов, как «содержащий» или «содержит», может быть необязательно заменено на «состоящий из» или «состоит из».

Настоящее изобретение относится к антителу против GDF15, которое можно использовать для лечения злокачественного новообразования у пациентов-людей.

В одном варианте осуществления изобретения антитело против GDF15 не индуцирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Репортерный анализ ADCC для определения того, индуцирует ли антитело антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность, конкретно не ограничен и может представлять собой любой репортерный анализ ADCC, известный в данной области. Типовым репортерным анализом ADCC может быть биоанализ ADCC Reporter Bioassay, набор Core (Техническое руководство TM383, Promega Corporation), и его проводят в соответствии с протоколом производителя. В этом отношении тестируемые и контрольные антитела могут быть нанесены в различных концентрациях на клетки-мишени и могут быть инкубированы с эффекторными клетками, экспрессирующими FcγRIIIa, в течение 6 часов при 37°C. После этого можно добавить субстрат люциферазы и определить сигнал люминесценции с помощью люминесцентного ридера после 30 мин инкубации при комнатной температуре.

GDF-15 можно измерить с помощью ИФА. ИФА, которые можно использовать для измерения GDF-15, включают, но не ограничиваются ими, системы R&D Quantikine ELISA, иммунорадиометрический анализ, сэндвич-анализ luminexTM и сэндвич-анализ электрохемилюминесценции, например, анализ ELECSYS® GDF15 (Roche Diagnostics), который был обобщен Wollert et al. (Wollert KC, Kempf T, Giannitsis E, et al. An Automated Assay for Growth Differentiation Factor 15. J Appl Lab Med An AACC Publ. 2018;1(5):510-521. doi:10.1373/jalm.2016.022376). Все упомянутые анализы основаны на принципе иммуносэндвича с использованием моноклональных или поликлональных антител для захвата и количественного определения GDF-15. В зависимости от используемых реагентов и их комбинации измеряют свободный GDF-15 или общий GDF-15 (свободный GDF-15 и GDF-15, связанный с CTL-002).

В предпочтительном варианте осуществления в соответствии со всеми другими вариантами осуществления изобретения злокачественное новообразование представляет собой «солидное злокачественное новообразование». «Солидное злокачественное новообразование» представляет собой злокачественное новообразование, которое образует одну или более солидных опухолей. Такие солидные злокачественные новообразования, образующие солидные опухоли, обычно известны в данной области. Термин «солидное злокачественное новообразование» охватывает как первичную

опухоль, образованную злокачественным новообразованием, так и возможные вторичные опухоли, которые также известны как метастазы. Предпочтительные солидные злокачественные новообразования, подлежащие лечению согласно изобретению, выбирают 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, почечно-клеточного рака, саркомы Юинга, немелкоклеточного рака легкого и мелкоклеточного рака легкого, рака неизвестной первичной формы, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичка, рака яичников, рака эндометрия и рака шейки матки, более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака головы и шеи, уротелиального рака и рака желудка, и наиболее предпочтительно выбранного из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака и рака предстательной железы.

В настоящем описании термины «CTL-002», «CTL-001 IgG4*», «CTL-001 IgG4» и «H1L5 IgG4*» используются как синонимы. Они относятся к антителу, имеющему аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 9.

В предпочтительном варианте осуществления в соответствии со всеми другими вариантами осуществления изобретения GDF-15 представляет собой GDF-15 человека (также упоминаемый в настоящем документе как «hGDF-15»), а антитело против GDF-15 представляет собой антитело против GDF-15 человека (также называемое в данном документе «антитело против hGDF-15»).

Предоставление стабильного состава

Терапевтические белки сложны и очень гетерогенны из-за посттрансляционных модификаций (PTM) и химических модификаций. Эти модификации включают гликозилирование, дезамидирование, окисление и варианты N- и C-концов. Модификации, которые приводят к соответствующим вариантам, связанным с продуктом, классифицируются регулирующими органами как критические атрибуты качества (CQA). CQA имеют узкие критерии приемлемости, и их изменения отслеживаются соответствующими качественными и количественными методами. Таким образом, получение стабильного состава антител во многих случаях является простым.

В качестве первой стадии, направленной на достижение цели создания стабильной композиции антитела по изобретению, авторы изобретения решили определить, какие части и последовательности антител потенциально подвержены риску при разработке составов в будущем. Для этого было проведено определение *in silico*. Гуманизированное антитело против GDF-15 H1L5 подвергали скринингу с помощью инструментов оценки технологичности *in silico*. Аминокислотную последовательность H1L5, состоящую из

полноразмерной легкой цепи каппа-изотипа и полноразмерной тяжелой цепи IgG1, подвергали скринингу на мотивы последовательности и признаки возможности развития ряда потенциальных проблем и на риск агрегации, как указано в подробно в примерах ниже. Авторы изобретения обнаружили, что H1L5 имеет потенциальный сайт дезамидирования CDR и сайт окисления, который необходимо дополнительно оценить. Антитело также имеет другие потенциальные проблемы со стабильностью в виде потенциальных участков окисления и кислоточувствительных сайтов, а также с отсечением С-конца. Таким образом, было ясно, что данное антитело потенциально будет нелегко стабилизировать.

Как видно из начального раунда экспериментальных данных, было выявлено несколько факторов риска, которые потенциально могут дестабилизировать антитело во время дальнейших усилий по приготовлению состава.

Таким образом, на второй стадии антитело H1L5 было сконструировано для каркаса IgG4, как описано в настоящем документе в другом месте, и затем было обозначено как CTL-002. С помощью каркаса IgG4 можно устранить три из указанных выше факторов риска, а именно

- 1) K448 IgG1 удаляли
- 2) N в положении 204 IgG1 заменяли на D в антителе IgG4.
- 3) S в положении 132 IgG1 заменяли на C в антителе IgG4.

Таким образом, замена IgG1 на IgG4 устранила три потенциальных фактора риска для получения стабильного состава антител.

Авторы изобретения предлагают - на основе этого изменения и дальнейших исследований стабильности, как показано ниже, - стабильный состав антител. Состав предпочтительно включает гистидин/гистидин HCl, аргинин-HCl, полисорбат и сахарозу при pH 5-6. Дополнительные предпочтительные составы описаны в вариантах осуществления выше и в формуле изобретения.

Примеры

Лекарственное вещество (DS)

CTL-002 представляет собой гуманизированное шарнирно-стабилизированное моноклональное антитело IgG4, нацеленное на фактор дифференцировки роста-15 (GDF-15), и относится к антителу по настоящему изобретению.

В приведенном в качестве примера жидком составе лекарственного вещества в виде CTL-002 антитело CTL-002 представлено в концентрации примерно 25 мг/мл, дополнительно содержит 20 mM гистидин/гистидин HCl, 150 mM сахарозу, 50 mM аргинин-HCl и 0,02% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,5.

Производство и контроль

Лекарственное вещество CTL-002 может быть получено в клетках CHO, таких как клетки CHOK1SV GS KO™. Последующий процесс включает 2 стадии хроматографии; одна аффинная хроматография на основе протеина А (например, MabSelect SuRe) с последующей анионообменной мембранной хроматографией (например, Sartobind Q).

Инактивация вируса достигается, например, с помощью обработки Тритоном-Х 100.

Аналитическое тестирование выполняется регулярно в процессе и до конечного получения.

Стабильность

Исследования стабильности лекарственного препарата в настоящее время продолжаются следующим образом:

Пилотное репрезентативное исследование стабильности без соблюдения cGMP (партия № DPS026) в течение (до) 3 лет для предполагаемых условий длительного хранения при +2-8°C, 12 месяцев при +25°C и 6 месяцев при +40 °C, чтобы обеспечить репрезентативные данные о стабильности для установления предварительного срока годности партии (партий) лекарственного препарата в соответствии с GMP.

GMP (партия № F19235) исследование стабильности в течение (до) 3 лет для предполагаемых условий длительного хранения при +2-8°C, а также в течение 12 месяцев при +25°C и в течение 6 месяцев при +40°C в чтобы подтвердить стабильность предлагаемого IMP.

Хранение

Флаконы с лекарственным препаратом CTL-002 следует хранить при температуре +2-8°C в оригинальной вторичной упаковке в безопасном месте, защищенном от света и отдельно от других лекарственных средств или исследуемого продукта. Продукт не должен быть заморожен.

Приготовление и введение

Чтобы приготовить CTL-002 для внутривенного введения, раствор CTL-002 добавляют в инфузионный пакет, содержащий 0,9% NaCl. Раствор CTL-002 для инфузий можно вводить с помощью пакетов для внутривенных инфузий, изготовленных из полиэтилена (без ПВХ, ДЭГФ и латекса) или поливинилхлорида (без латекса) и инфузионных линий из ПЭ (без ПВХ, ДЭГФ и латекса) или ПВХ (без ДЭГФ и латекса). Использование встроенного фильтра 0,2 мкм (положительно заряженная/незаряженная мембрана PES) является обязательным.

После приготовления раствор CTL-002 для инфузий в инфузионных пакетах можно использовать немедленно и вводить при температуре окружающей среды. Инфузионный пакет можно хранить до 6 часов при комнатной температуре и до 24 часов при температуре +2-8°C, но использовать его следует не более чем через 24 часов после приготовления.

Неклиническая фармакология

Авторы настоящего изобретения идентифицировали механизм, с помощью которого GDF-15 блокирует адгезию и трансгрессию преимущественно CD8+-Т-лимфоцитов в ткани. С CTL-002, блокирующим GDF-15, был установлен новый подход к лечению, который облегчает проникновение эффекторных Т-клеток в опухолевую ткань. Это может существенно повысить эффективность любого агента, активирующего Т-

клетки, например, ингибиторов контрольных точек.

В частности, в анализе проточной адгезии различные субпопуляции иммунных клеток, предварительно обработанные +/- GDF-15, перфузировали над активированным слоем эндотелиальных клеток или рекомбинантных молекул адгезии. Процессы адгезии и трансмиграции контролировали с помощью микроскопии с визуализацией живых клеток. Адгезия Т-клеток к слою эндотелиальных клеток значительно ухудшалась при добавлении GDF-15. Среди субпопуляций Т-клеток больше всего пострадали CD8⁺ Т-клетки, в то время как адгезия других иммунных клеток не была снижена. Ингибирующее действие GDF-15 на адгезию CD8⁺ Т-клеток было сравнимо с мощной блокадой LFA-1 с помощью антитела TS1/18 и могло быть снято с помощью антитела CTL-002 против GDF-15 с EC50 ~700 нг/мл.

Этот первоначальный вывод был дополнительно подтвержден данными соответствующих моделей животных, в которых антитело против GDF-15 CTL-002 или мышинный суррогат вызывали сильное увеличение количества инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и повышали ответ на терапию, активирующую Т-клетки. Нейтрализация GDF-15 у гуманизированных мышей, несущих меланому HV18-МК, с помощью CTL-002 приводила к сильному увеличению количества инфильтрирующих опухоль лейкоцитов. Анализ субпопуляции выявил чрезмерное пропорциональное обогащение Т-клеток, особенно CD8⁺Т-клеток (см. Фигуру 6).

Кроме того, сингенные мышинные модели опухолей с генетически модифицированными клетками MC38 опухоли толстой кишки мыши, экспрессирующими GDF-15 человека (MC38-GDF15), показали повышенный ответ на ослабленный в противном случае ответ на анти-PD-1-терапию или на анти-CD40/поли(IC:LC)-комбинированную терапию. Никаких побочных эффектов не наблюдалось ни у одного из животных (Фигура 1, 13, 14).

Следовательно, CTL-002 разработано для нейтрализации патологических эффектов, опосредованных GDF-15. Биологическую активность процессов адгезии и трансмиграции GDF-15 контролировали с помощью микроскопии с визуализацией живых клеток в системе адгезии потока *in vitro* с первичными иммунными клетками, и в этой системе определяли ключевой параметр ингибирования эффектов GDF-15 с помощью CTL-002.

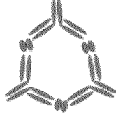
Более того, вторичные фармакологические исследования изучали способность CTL-002 вызывать CDC и ADCC, связывание на мишени/вне ткани, а также связывание вне мишени. Оценка фармакологической безопасности была включена в стандартные исследования токсичности повторных доз.

В целом, эти исследования обеспечивают тщательную характеристику механизма действия CTL-002, а также хорошо подкрепленное обоснование его клинического исследования у пациентов с злокачественным новообразованием и повышением уровня GDF-15 в микроокружении опухоли.

Связывание лекарственного средства CTL-002 с мишенью GDF-15

Как показано в Таблице 1, GDF-15 и CTL-002 образуют основной комплекс из двух антител CTL-002 и двух димерных молекул GDF-15 в растворе. Другие комплексы кажутся менее благоприятными, и достоверно обнаружен только один дополнительный комплекс из трех CTL-002 и трех GDF-15. Этот комплекс был максимальным при эквимольной инкубации CTL-002 и GDF-15, но все еще был ниже 8% и уменьшался при изменении соотношения в любую сторону. При превышении трехкратного молярного избытка антитела весь GDF-15 образует комплекс с молекулами CTL-002, и не наблюдается тенденции к образованию агрегатов с высокой молекулярной массой.

Таблица 1: Обзор образованных комплексов CTL-002 и GDF-15

Упрощенная визуализация					
Оценочн. MW	506 кДа	337 кДа	169/193 кДа	144 кДа	24.6 кДа
Соотношение CTL-002/GDF-15	[CTL-002] ₃ - [GDF-15] ₃	[CTL-002] ₂ - [GDF-15] ₂	[CTL-002] ₁ - [GDF-15] _{1/2}	CTL-002	GDF-15
1:30	1.1%	15.7%	4.2%	0%	79.1%
1:3	4.9%	70.3%	4.3%	0%	20.6%
1:1	8.0%	74.3%	4.0%	13.0%	0.6%
3:1	2.9%	27.5%	0%	69.6%	0%
30:1	0.4%	2.9%	0%	96.7%	0%

Аффинность CTL-002 к рекомбинантному GDF-15 человека определяли путем измерения поверхностного плазмонного резонанса на Biacore T3000. Кроме того, измеряли аффинность к крысиному и мышинному GDF-15 яванского макака (см. Таблицу 2).

Все эксперименты проводили в 10 mM буфере HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM ЭДТА и 0,05% Tween. Антитело, специфическое против IgG Fc человека (Jackson, заказ № 109-005-008, партия № 111148) ковалентно иммобилизовали с помощью реакций EDC/NHS на чипах Biacore CM5 (GE Healthcare, заказ № 61144275, партия № 10236645). Для кинетической характеристики взаимодействия антиген-антитело вводили импульсы возрастающих концентраций GDF-15 (например, 156,3 пМ, 312 пМ, 625 пМ, 1250 пМ) со скоростью потока 30 мкл/мин. После каждого цикла измерения (8 мин ассоциации с последующим 30 мин диссоциации) комплекс антитело-антиген разделяли путем регенерации поверхности с помощью 10 mM глицин-HCl при pH 2. Для расчета константы

диссоциации CTL-002 фазы ассоциации и диссоциации регистрировали и оценивали путем глобальной аппроксимации с использованием программного обеспечения VIAevaluation 4.1. Эти концентрации антигена учитывались только для анализа глобальной аппроксимации, что позволяло проводить анализ в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1:1 или связыванием 1:1 с дрейфующей базовой линией.

Значения K_D для GDF-15 человека показаны в Таблице 2.

Таблица 2: Обзор видовой аффинности CTL-002

	CTL-002
K_D (человека)	38,3 пМ
K_D (яванского макака)	107,7 пМ
K_D (крысы)	449 пМ
K_D (мышь)	9.76 нМ

Обзор и сравнение трех антител, использованных в группе неклинических исследований, приведены в Таблице 3.

Таблица 3: Обзор сведений об антителах, использованных в экспериментах in vitro и in vivo

	B1-23	CTL-001	CTL-002
Связывающий домен	Прерывистый эпитоп (EVQVTMCIGACPSQFR---38 аминокислот --- TDTGVSLQTYDDLAKDCHCI)		
Виды	мышь	гуманизированное	гуманизированное
Изотип	IgG2a (rec IgG1)	IgG1	IgG4S228P
Альтернативные названия		H1L5, B1-23-H1L5	CTL-001 IgG4*, CTL-001 IgG4, H1L5 IgG4*
Исследования характеристик	Картирование эпитопов путем протеолитического вырезания		
	ADCC, C1q и CDC	ADCC, C1q связывание и CDC	ADCC, C1q связывание и CDC
	Иммуноблоттинг и ИФА GDF-15 человека	Иммуноблоттинг и ИФА GDF-15 человека и мыши	ИФА GDF-15 человека
	Окрашивание проточной цитометрии ассоциированного с поверхностью GDF-15	Окрашивание проточной цитометрии ассоциированного с поверхностью GDF-15	
		Иммуноблоттинг и ИФА различных белков TGF-бета	
		Ингибирование активации LFA-1 по данным D-Storm микроскопии	
		Ингибирование	

	B1-23	CTL-001	CTL-002
		адгезии проточных Т-клеток с преактивированными HUVEC	
	In vivo комбинация с анти-PD-1 для обработки трансгенных MC38, секретирующих hGDF-15, у мышей		
	In vivo комбинация с анти-CD40/Poly(IC:LC) для обработки трансгенных опухолей MC38, секретирующих hGDF-15, у мышей		
	In vivo нейтрализация кахексии у мышей	In vivo нейтрализация кахексии у мышей	
		In vivo предварительное исследование РК у яванских макак	In vivo предварительное исследование РК у яванских макак
			In vivo обработка с использованием CTL-002 гуманизированной мышинной модели меланомы человека
			Не связанное с GLP исследование по поиску однократной дозы на яванских макаках
			РК и поиск диапазона доз на крысах
			РК на мышах
			4-недельное исследование токсичности повторных доз CTL-002 на яванских макаках

Таким образом, CTL-002 представляет собой гуманизированное антитело IgG4, полученное из мышинного антитела B1-23, с высокой специфичностью в отношении GDF-15 человека. CTL-002 связывается с пикомолярной аффинностью к GDF-15 человека,

яванского макака и крысы (38,3, 108 и 449 пМ, соответственно) и с низкой наномолярной аффинностью к GDF-15 мыши (9,76 нМ). CTL-002 связывается с прерывистым конформационным эпитопом на С-конце зрелого GDF-15 и специфически распознает физиологическую димерную конформацию.

Биологическая активность CTL-002 *in vitro* в отношении опосредованного GDF-15 ингибирования адгезии Т-клеток

Кроме того, два собственных анализа показали, что уровни GDF-15, по-видимому, также коррелируют с отсутствием ответа на антагонисты PD-1. Это снова согласуется с концепцией, согласно которой GDF15 действует как репеллент иммунных и Т-клеток и удерживает CD8⁺/CD4⁺Т-клетки вне опухоли, предотвращая активность на основе антагонизма PD-1 (Фигура 2).

Систему анализа адгезии потока использовали для имитации динамики стенки кровеносного сосуда, отделяющей иммунные клетки от опухолевой ткани, и для анализа эффекта нейтрализации GDF-15 с помощью CTL-002. Чтобы оценить эффективность ингибирования адгезии GDF-15 и чувствительность системы, IC₅₀ GDF-15 в системе анализа определили на уровне $13,8 \pm 2,3$ нг/мл (Фигура 4).

Чтобы оценить эффективность CTL-002 в предотвращении опосредованного GDF-15 ингибирования адгезии Т-клеток, определяли EC₅₀ CTL-002 в анализе адгезии потока с Т-клетками. В результате в среднем концентрация 707 ± 17 нг/мл CTL-002 была эффективной для увеличения адгезии Т-клеток на 50%, как это было показано у разных доноров (см. Фигуру 5).

Фармакология *in vivo*

Среди всех членов суперсемейства TGF-бета ортологичные молекулы GDF-15 демонстрируют наименьшую консервативность последовательности. В то время как зрелые крысиные, мышинные и человеческие белки TGF-бета 1 и BMP-2 имеют 99-100%-идентичную последовательность между людьми и мышами, гомология GDF-15 составляет менее 70% (Böttner 1999). Таким образом, нельзя исключать биологические различия между разными видами. GDF-15 мыши демонстрирует довольно низкую идентичность последовательности, составляющую 67,9%, с его человеческим аналогом, что также отражается в том факте, что антитела против GDF-15 проявляют меньшую аффинность к мышинному гомологу. Для исследования фармакодинамических эффектов использовали два различных подхода *in vivo*.

Во-первых, была использована модель гуманизированных мышей, в которой мышам с иммунодефицитом трансплантируют кроветворные стволовые CD34⁺клетки, полученные из пуповинной крови человека.

Через три месяца после восстановления у этих мышей развилась функциональная человеческая иммунная система, содержащая все основные субпопуляции иммунных клеток человека (Wang 2018). Этим мышам затем инокулировали клеточную линию меланомы человека, полученную от пациентов, HV-18МК, которая, как было показано, секретирует GDF-15 на высоком уровне. Мышей обрабатывали через три дня

изотипическим контролем или CTL-002 два раза в неделю, а через четыре недели опухоли собирали и анализировали на инфильтрацию иммунными клетками с помощью проточной цитометрии.

Хотя размер опухоли не изменился, в группах, получавших CTL-002, наблюдалось 9-кратное увеличение CD45+клеток человека, инфильтрирующих опухоль (Фигура 6). В популяции инфильтрирующих клеток количество Т-клеток было увеличено в 4 раза. В последующем исследовании, более детально проанализировав популяцию инфильтрирующих иммунных клеток, было подтверждено увеличение инфильтрации CD45+ и обогащение CD3+, хотя и менее выраженное с 3-кратным увеличением CD45+ и 4-кратным обогащением CD3+ Т-клеток.

В качестве второй экспериментальной модели была создана генетически модифицированная клеточная линия мыши, сверхэкспрессирующая GDF-15 человека, для тестирования терапевтической эффективности антител против GDF-15.

В этом отношении клетки аденокарциномы толстой кишки MC38 являются предпочтительными опухолевыми клетками мыши для анализа активности блокаторов иммунных контрольных точек (Selby 2016) и использовались для получения данных *in vivo* для поддержки разработки одобренного антитела против PD-1. Сверхэкспрессию осуществляли путем стабильной трансфекции и не влияли на пролиферацию *in vitro* по сравнению с контрольными обработанными MC38.

Подходящим по возрасту иммунокомпетентным мышам C57BL/6 и иммунодефицитным мышам NCI nu/nu подкожно вводили суспензию 5×10^5 пустых клеток опухоли толстой кишки MC38 или их трансгенных производных MC38GDF-15, экспрессирующих рекомбинантный GDF-15 человека. В отличие от пролиферации *in vitro* и *in vivo* у иммунодефицитных мышей NCI nu/nu, экспрессия GDF-15 опосредовала преимущество в росте у иммунокомпетентных мышей C57BL/6, подтверждая идею о том, что GDF-15 влияет на иммунную систему хозяин опухоли (Фигура 7).

Кроме того, экспрессия GDF-15 человека превращала анти-PD-1-чувствительные опухоли карциномы толстой кишки MC38 в анти-PD-1-устойчивые опухоли. Это было частично устранено комбинированной обработкой анти-GDF-15 (B1-23)/анти-PD-1, но не монотерапией анти-GDF-15 и частично монотерапией анти-PD-1. (данные также показаны на Фигуре 1)

Точно так же монотерапия с использованием антитела против GDF-15 показала лишь минимальное улучшение, тогда как опухоли, секретирующие GDF-15 (сплошная линия, Фигура 9B), показали лучшую выживаемость при обработке комбинацией анти-GDF-15 B1-23 и анти-PD-1 (Фигура 9). Эта комбинированная обработка была незначительно лучше, чем монотерапия анти-PD-1 (Фигура 8).

Поскольку предполагается, что лечение анти-GDF-15 увеличивает инфильтрацию Т-клеток, другие иммунотерапевтические методы лечения злокачественного новообразования, зависящие от присутствия Т-клеток в опухоли, должны получать пользу от нейтрализации GDF-15.

Другая иммунотерапия, обработка опухоли анти-CD40 и поли(IC:LC), которая, как было показано ранее, зависит от иммунных ответов Т-клеток (van den Boorn 2013), была протестирована на мышинной модели с клетками MC38, экспрессирующими GDF-15 человека. Комбинированная обработка с использованием нейтрализации GDF-15 и анти-CD40/поли(IC:LC) приводила к полному отторжению опухолей у 8 из 10 животных, тогда как только 3 из 10 опухолей были удалены с помощью индивидуальной обработки анти-CD40/поли(IC:LC) (Фигура 10).

Хотя GDF-15 мыши не мог быть обнаружен в клетках MC38 дикого типа, что может быть связано с недостаточностью аналитических тестов, аналогичный эксперимент, сравнивающий изотипическое контрольное антитело с обработкой анти-GDF-15 в комбинации с анти-CD40/Poly(IC:LC) был сделан с клетками MC38, которые не подвергались манипуляциям для секреции GDF-15 человека. Как и в эксперименте с генетически модифицированным MC38, анти-GDF-15 может улучшить эффективность обработки анти-CD40/Poly(IC:LC), хотя и в меньшей степени (Фигура 11).

Вторичная фармакология (ADCC, CDC)

GDF-15 представляет собой растворимый фактор с временным присутствием в клетках во время их созревания. Способность CTL-002 связывать GDF-15, связанный с клеточной поверхностью, *in vitro* подразумевает возможность того, что CTL-002 может потенциально опосредовать цитотоксичность, опосредованную клетками и комплементом, в отношении здоровой ткани с ассоциированным GDF-15.

Индукцию ADCC анализировали с помощью репортерного анализа ADCC (Promega). Тестовые и контрольные антитела наносили в разных концентрациях на клетки-мишени и инкубировали с эффекторными клетками, экспрессирующими FcγRIIIa, в течение 6 ч при 37°C. Затем добавляли субстрат люциферазы и определяли люминесцентный сигнал с помощью люминесцентного ридера после 30 мин инкубации при комнатной температуре.

В результате было обнаружено, что CTL-002 не индуцировал какой-либо измеримой ADCC, в то время как трастузумаб в качестве положительного контроля действовал, как и ожидалось, на обеих клеточных линиях (Фигура 12).

Кроме того, способность CTL-002 опосредовать CDC также анализировали путем измерения связывания C1q с помощью ИФА и клеточного репортерного анализа. В результате CTL-002 не продемонстрировал связывания с белком комплемента человека C1q, в отличие от контрольного антитела ритуксимаба (Фигура 13).

Во втором подходе способность опосредовать CDC тестировали в клеточном анализе. CDC анализировали на клетках Raji с ритуксимабом в качестве положительного контроля и на экспрессирующих GDF-15 клетках UACC-257. В качестве положительного контроля были выбраны антитела против CD55 и против CD59, поскольку нейтрализации молекул, ингибирующих комплемент, было достаточно для индукции CDC, но не было доступных антител, непосредственно индуцирующих CDC на UACC-257. В результате было обнаружено, что CTL-002 не индуцирует CDC в комбинации с антителами против

CD55 и против CD59, хотя высокие уровни целевого белка GDF-15 могут быть обнаружены с помощью проточной цитометрии (Фигура 14).

В заключение, на основании экспериментальных данных было неожиданно обнаружено, что антитело CTL-002 не индуцирует ни ADCC, ни CDC.

Фармакокинетика и метаболизм продуктов у животных

Фармакокинетика CTL-002 была проанализирована на приматах, отличных от человека, и была создана PK-модель CTL-002 для прогнозирования фармакокинетики у людей. Фармакодинамические данные были получены в том же исследовании (и в последующем исследовании повторных доз на обезьянах) путем измерения ингибирования GDF-15 в сыворотке. Эти наборы данных были объединены в модель PK/PD и использованы для прогнозирования фармакодинамической активности CTL-002 у людей.

Данные модели PK/PD также предоставили важную информацию для оценки безопасной начальной дозы в первом исследовании CTL-002 на людях.

Абсорбция

Предварительное исследование было проведено на яванских макаках для сравнения фармакокинетики антител против GDF-15 на основе IgG1 и IgG4 (CTL-001 и CTL-002, соответственно). В этом исследовании каждый самец и одна самка обезьяны получили однократную внутривенную инъекцию 25 мг/кг либо CTL-001, либо CTL-002. Образцы крови были взяты в течение шестидесяти дней.

Профили зависимости концентрации в сыворотке от времени показаны на Фигуре 15, а основные фармакокинетические параметры приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Фармакокинетические параметры CTL-001 (IgG1) и CTL-002 (IgG4) у обезьян

Обезьяна	Пол	Изотип	Уровень дозы (мг/кг)	$t_{1/2}$ (дни)	C_{max} (мкг/мл)	AUC_{inf} (мкг·день/мл)
1	Самец	IgG1	25	9,1	710,9	4514
2	Самка	IgG1	25	10,6	827,8	5756
3	Самец	IgG4	25	12,9	949,2	7931
4	Самка	IgG4	25	14,3	615,2	7980

Таким образом, CTL-002 (изотип IgG4) продемонстрировал несколько более длительный период полужизни и немного более высокую AUC у тестируемых обезьян по сравнению с CTL-001 (изотип IgG1), в то время как никаких побочных эффектов не наблюдалось ни у одного из животных.

Информация доза-ответ и моделирование терапевтических доз для человека

Двухкомпонентная популяционная фармакокинетическая (PK) модель, описывающая системное воздействие CTL-002, была построена на основе данных фармакокинетики приматов, отличных от человека, (NHP) после однократной дозы и включая минимальную концентрацию до третьей еженедельной дозы.

Наблюдается накопление неактивного GDF-15 после введения CTL-002, и PK-

модель была расширена за счет включения модели связывания PD, описывающей подавление GDF-15 (Фигура 16 и Фигура 17). Эта модель описывает наблюдаемые данные PK-PD при однократной дозе у NHP и прогнозирует наблюдаемые данные в течение 14 дней после повторного еженедельного введения (2 дозы) в исследовании токсичности GLP в течение 4 недель. Нет никаких доказательств того, что в клиренсе CTL-002 присутствует значительный насыщаемый компонент, и максимальный захват мишени может быть достигнут при дозах ≥ 10 мг/кг/неделю.

Следует отметить, что наблюдаемый клиренс IgG для CTL-002 у NHP типичен для IgG-подобной молекулы человека у NHP. Возможным объяснением наблюдаемого сверхпропорционального увеличения воздействия и потери захвата GDF-15 у некоторых животных после повторного введения CTL-002 является ответ ADA, хотя это не было подтверждено экспериментально (недоступность анализа обнаружения ADA у этих видов).

Модель PK-PD NHP была аллометрически масштабирована для прогнозирования PK CTL-002 человека с использованием показателей степени 0,75 для клиренса, 0,67 для межкомпарментного обмена и 1 для объема. Связывание мишени с GDF-15 NHP и человека также было включено в модель, чтобы предсказать степень и продолжительность подавления мишени (таблица 5).

Таблица 5: CTL-002 - параметры модели PK-PD

PK параметр	Единицы	NHP	Эксонента*	Человек
Центральный объем	л	0,136	1	3,182
Периферический объем	л	0,0866	1	2,021
Коэффициент обмена	л/день	0,0404	0,67	0,330
CTL-002 клиренс	л/день	0,0121	0,75	0,128
Скорость элиминации свободного GDF-15	1/день	121	-0,25	55,2
Исходный GDF-15	нг/мл	1,25	-	0,5-10
K _D (из модели PK-PD)	нМ	0,019	**	0,007

*Показатель массы тела, используемый для масштабирования от NHP до человека (NHP 3 кг; Человек 70 кг)

** In vitro K_D, умноженная на 0,18 (наблюдаемая разница in vitro/in vivo у NHP)

С учетом этих предположений воздействие CTL-002 на человека было спрогнозировано для различных режимов дозирования (Фигура 18), а результирующие пределы безопасности для C_{max} и AUC сравнивались с воздействием, достигнутым в 4-недельном исследовании токсичности GLP при дозе 100 мг/кг/нед. (Таблица 6).

Таблица 6: Предполагаемые границы воздействия: первое исследование на людях (FII)

Доза (мг/кг/1 раз в 2 недели)	C _{max}	AUC
0,3	683	487
1	186	131
3	54	40
10	14	11
20	6	5

Прогнозируемый предел воздействия по сравнению с 100 мг/кг CTL-002 в 4-недельном исследовании токсичности GLP (NOEL):

C_{max} первой дозы у человека по сравнению с C_{max} первой дозы у NHP

AUC (стабильное состояние 2 раза в неделю) у человека по сравнению с AUC (стабильное состояние 1 раз в неделю x 2) у NHP из популяционной модели PK; предполагая линейное поведение PK

Наблюдаемые исходные уровни GDF-15 в целевой популяции пациентов были проанализированы в когорте из 34 пациентов, ранее получавших лечение, и у которых наблюдалась рефрактерность или рецидив после лечения антителом против PD-1. В этой когорте исходный уровень GDF-15 варьировался от 0,35 до 12 нг/мл. Степень и продолжительность подавления системного GDF-15, вероятно, зависят от исходного уровня GDF-15, где более высокие уровни продукции GDF-15 требуют более высокой дозы для достижения подавления (Фигура 19).

Оценочная доза FII является консервативным подходом, поскольку она будет подавлять уровни GDF-15 ниже физиологических уровней в течение длительных периодов времени, но еще не в течение всего периода дозирования даже у пациентов с более низким уровнем GDF-15. Это было сделано для выполнения запросов консультационного агентства (PEI, Германия) в отношении дозы FII. Взаимосвязь между исходным уровнем GDF-15 и степенью и продолжительностью подавления мишени будет изучена в ходе I фазы клинического исследования.

Вышеупомянутая модель PK-PD была разработана для описания подавления системного GDF-15 для различных уровней исходного GDF-15. Однако целевой мишенью является микроокружение опухоли. Если опухоль в значительной степени ответственна за увеличение системного GDF-15, то следует также учитывать количество GDF-15 в сосудистой сети опухоли. Следовательно, оценка подавления GDF-15 в микроокружении опухоли была включена в качестве расширения модели PK-PD человека.

Предполагается, что период полужизни GDF-15 в сыворотке крови человека составляет 18 минут (аллометрическое масштабирование из NHP). Исходя из этой скорости элиминации, GDF-15 необходимо будет вырабатывать в количестве 1,67 мг/день, чтобы обеспечить стационарную концентрацию GDF-15 в сыворотке крови 10 нг/мл. Для размера опухоли 36 г и средней скорости кровотока 0,2 мл/мин/г опухолевой ткани (диапазон 0,01-2 мл/мин/г - Vaupel 2004) результирующая концентрация гомодимера GDF-15 в сосудистой сети опухоли будет 161 нг/мл (6,5 нМ), т. е. примерно в 16 раз выше, чем системная концентрация GDF-15.

На основании этих предположений прогноз подавления GDF-15 опухоли в микрососудистой сети опухоли показаны на Фигуре 20 для различных уровней GDF-15 опухоли. Следует подчеркнуть, что прогнозируемый уровень опухолевого GDF-15 критически зависит от скорости кровотока в опухоли.

Для пациента с исходным уровнем GDF-15 в сыворотке 2 нг/мл прогнозируется снижение концентрации GDF-15 в микрососудистой сети опухоли до <0,5 нг/мл (средний уровень у здоровых людей) в течение примерно 5 дней при предлагаемой начальной дозе 0,3 мг/кг. Прогнозируемая продолжительность подавления намного меньше у пациентов с более высоким исходным уровнем GDF-15 в сыворотке (таблица 7).

Примечание: подавление sGDF-15 в интерстициальном пространстве опухоли, за пределами сосудистой сети, не было включено в модель PK-PD, поскольку это потребовало бы дополнительных предположений относительно проникновения CTL-002 в окружение опухоли и относительно уровней GDF-15 в интерстициальном пространстве.

Таблица 7: Прогнозируемая продолжительность подавления GDF-15

GDF-15 исходный		Доза	Подавление GDF-15		Подавление GDF-15	
Сыворотка	Опухоль		Сыворотка		Опухоль	
		CTL-002	Min*	Продолжительность*	Min*	Продолжительность*
(нг/мл)	(нг/мл)	(мг/кг)	(нг/мл)	(дни)	(нг/мл)	(дни)
0.5	0.5	0.3	0.006	>14	0.001	>14
		1	0.002	>14	0.000	>14
		3	0.000	>14	0.000	>14
		10	0.000	>14	0.000	>14
		20	0.000	>14	0.000	>14
2	25	0.3	0.024	5.2	4.02	0
		1	0.006	>14	0.017	4.2
		3	0.002	>14	0.000	>14
		10	0.000	>14	0.000	>14
		20	0.000	>14	0.000	>14
10	161	0.3	0.123	0.8	30.964	0
		1	0.031	3.8	0.148	0.6
		3	0.009	11.8	0.003	8
		10	0.002	>14	0.001	>14
		20	0.001	>14	0.000	>14

* - Прогнозируемое подавление (самая низкая концентрация) GDF-15 либо в сыворотке, либо в сосудистой сети опухоли.

** - Прогнозируемая продолжительность подавления GDF-15 ниже 0,5 нг/мл (среднее значение GDF-15 в сыворотке здоровых людей)

Более того, как наблюдалось у пациентов с прогрессирующей меланомой (10 нг/мл), предлагаемая начальная доза 0,3 мг/кг CTL-002 будет снижать лишь немного ниже нормального уровня GDF-15 в сыворотке (0,5 нг/мл) при C_{max}, при высокой границе

диапазона исходного уровня GDF-15, так что его эндогенные функции не должны быть нарушены (Фигура 21).

В заключение, CTL-002 описывается линейной моделью РК. Другими словами, CTL-002 не проявляет насыщаемого кинетического поведения, опосредованного мишенью, как это иногда наблюдается с IgG-подобными молекулами, нацеленными на мембранный рецептор.

В GLP исследовании токсичности у NHP в течение 4 недель было показано, что CTL-002 безопасен и хорошо переносится в дозах, которые обеспечивают адекватные пределы воздействия для клинических испытаний.

Предполагается, что предлагаемая начальная доза FIH 0,3 мг/кг/1 раз в 2 недели обеспечивает максимальную концентрацию в плазме (C_{max}) в конце 1-часовой инфузии 6 мкг/мл, что в 683 раза ниже, чем C_{max} при воздействии CTL-002 на уровне при отсутствии наблюдаемого эффекта (NOEL) у NHP. Эта доза может обеспечить только временное подавление GDF-15 в микроокружении опухоли и считается минимально приемлемым уровнем биологического эффекта (MABEL).

Было показано, что общий GDF-15 в сыворотке является полезным биомаркером вовлечения мишени GDF-15 у NHP, а дозы CTL-002 ≥ 10 мг/кг связаны с поддержанием захвата GDF-15 (и, как следствие, подавления GDF-15). Следовательно, общий GDF-15 человека может быть потенциальным клиническим биомаркером взаимодействия с мишенью GDF-15, и клиническое исследование FIH предназначено для изучения как максимального подавления GDF-15 в течение ограниченного периода времени, так и непрерывного подавления GDF-15 в течение каждого цикла дозирования.

Токсикология

CTL-002 тестируется для лечения пациентов с прогрессирующим злокачественным новообразованием.

Чтобы идентифицировать соответствующие виды для доклинических испытаний, гомология последовательностей GDF-15 сравнивалась между видами. Гомология последовательностей людей и яванских макаков, мышей и крыс составляет 94,6%, 67,9% и 66,1%, соответственно.

CTL-002 связывается с нелинейным конформационным эпитопом в GDF-15, что показано в виде двух прямоугольников на Фигуре 22. Последовательности областей связывания CTL-002 показаны для яванских макаков, людей, мышей и крыс (первые четыре строки сверху вниз).

Яванские макаки демонстрируют 100% гомологии последовательности с человеческим эпитопом, связывающим CTL-002, в GDF-15. Поэтому он считается подходящим видом для тестирования на токсичность. Аффинность связывания CTL-002 с GDF-15 человека и яванского макака составляет 38,3 пМ и 108 пМ, соответственно.

Исследование зависимости доза-ответ (DRF) CTL-002 было проведено на крысах, поскольку ожидалось, что продукт будет достаточно фармакологически активным для достижения устойчивого полного целевого ингибирования при разумных уровнях

внутривенной дозы (аффинность связывания с крысиным GDF-15: 449 пМ). Однако данные PK/PD, полученные в исследовании, показали, что CTL-002 даже при самом высоком уровне дозы 100 мг/кг не был способен насытить связывание GDF-15. Таким образом, основную токсикологию оценивали только у яванских макаков в 4-недельном исследовании с внутривенным введением CTL-002 один раз в неделю. Никакой токсичности не наблюдалось вплоть до самой высокой испытанной дозы 100 мг/кг.

Было проведено исследование перекрестной реактивности тканей в соответствии с надлежащей лабораторной практикой (GLP) с использованием тканей человека и яванского макака. Окрашивание CTL-002 на исследованных тканевых панелях было ограничено цитоплазмой трофобластов в плаценте человека и обезьяны, что согласуется с сообщениями об экспрессии его белка-мишени, GDF-15, в плаценте. Непредвиденной перекрестной реактивности не наблюдалось.

Токсикология: небазовые исследования

Было проведено не связанное с GLP исследование по поиску однократной дозы на яванских макаках. Основная цель этого исследования состояла в том, чтобы поддержать выбор дозы для последующего 28-дневного исследования токсичности повторных доз в соответствии с GLP. Кроме того, была охарактеризована фармакокинетика CTL-002 при различных уровнях доз.

Одному самцу и одной самке животного на уровень дозы (0,1; 1; 10 или 100 мг/кг) вводили однократную 30-минутную внутривенную инфузию, и фармакокинетические профили регистрировали в течение 14 недель. В дополнение к фармакокинетическому анализу оценивали появление антилекарственных антител перед введением, а также через 6 и 12 недель после введения дозы. Количественно определяли уровни GDF-15 и CTL-002 в сыворотке, фармакокинетические данные рассчитывали как общее количество CTL-002 (общая PK) и как свободный CTL-002 (независимо от PK) отдельно.

В качестве индикаторов токсичности ежедневно проверяли смертность и клинические признаки. Еженедельно анализировали массу тела и потребление пищи и воды, температуру тела, ЭКГ, артериальное давление, гематологию, в т. ч. коагуляцию, а также клинический анализ, включая цитокины, оценивали несколько раз в ходе исследования.

Ни одно из животных не умерло преждевременно, и не было никаких признаков токсичности, связанных с CTL-002, при любом из испытанных уровней доз.

Однократное введение 0,1, 1, 10 или 100 мг/кг CTL-002 в 1-й день испытаний приводило к дозозависимому повышению уровня общего GDF-15 в сыворотке крови у всех самцов и самок. На целевое насыщение CTL-002 при уровнях доз 10 и 100 мг/кг указывает перекрытие кривых GDF-15 при этих двух уровнях доз.

Измерение общего и свободного CTL-002 в образцах сыворотки, полученных до 43-го дня тестирования (группы 1 и 2; обработка 0,1 или 1 мг/кг CTL-002) или 99-го дня тестирования (группы 3 и 4; обработка 10 или 100 мг/кг CTL-002) выявило дозозависимое воздействие CTL-002 на животных.

Основные фармакокинетические данные приведены в Таблице 8 в виде средних значений для одного самца и одной самки животного на группу.

Таблица 8: Основные фармакокинетические данные, полученные в исследовании DRF на обезьянах CTL-002-TOX-01

Группа	Уровень дозы [мг/кг массы тела]	C_{max} [мкг/мл]	$t_{1/2}$ [ч]	AUC_{0-t} [мкг ч/мл]	AUC_{inf} [мкг ч/мл]
Общий CTL-002					
1	0,1	0,92	383,4	344,8	412,5
2	1	21,6	230,3	4631	4855
3	10	235,8	275,7	77692	78661
4	100	2751	352,6	666861	673354

На основании результатов этого исследования уровни доз 10, 30 и 100 мг/кг были рекомендованы для базового 4-недельного исследования токсичности повторных доз.

Токсикология: базовые исследования

Дополнительным базовым исследованием было 4-недельное исследование токсичности повторных доз CTL-002 на яванских макаках (возраст: 3-4 года) с 4-недельным периодом восстановления.

В этом исследовании CTL-002 вводили в виде 30-минутных внутривенных инфузий один раз в неделю, то есть в дни испытаний 1, 8, 15, 22 и 29. Восстановительный период закончился на 58-е сутки. Уровни дозы 0; 10; 30 или 100 мг/кг вводили 3 самцам и 3 самкам обезьян на группу плюс 2 самцам и 2 самкам выздоравливающих животных в контрольной группе и группе с высокой дозой.

Ни одно из животных не погибло и не было преждевременно умерщвлено, и не было отмечено никаких признаков местной непереносимости, связанных с тестируемым продуктом.

Не отмечено никаких эффектов, связанных с тестируемым продуктом, в отношении поведения и внешнего вида, массы тела и прироста массы тела, потребления пищи и питьевой воды, электрокардиографических показателей и частоты сердечных сокращений, функции кровообращения, гематологических, в том числе коагуляционных показателей, уровня D-димера, клинических химических параметров, уровня цитокинов, параметров мочи, офтальмологических и слуховых функций, массы органов и миелоидного:эритроидного соотношения у любого из животных при любом уровне дозы. Никаких макроскопических изменений органов не было отмечено ни у одного из животных, исследованных при любом испытанном уровне дозы.

Гистопатология не выявила каких-либо местных или системных поражений, связанных с тестируемым продуктом. Во время или в конце 4-недельного периода восстановления без обработок не было отмечено никаких изменений, связанных с тестируемым продуктом.

На основании приведенных выше результатов уровень отсутствия наблюдаемого эффекта (NOEL) составлял 100 мг CTL-002/кг путем повторной внутривенной 30-минутной инфузии один раз в неделю в течение 4 недель, т. е. 5 введений на животное.

Уровни C_{max} и площади AUC для общего CTL-002 выявили приблизительно линейную дозозависимое системное экспонирование животных. Различий, связанных с половой принадлежностью, не отмечено. Было отмечено накопление общего CTL-002 со временем в пределах от прикл. 2 до 6 раз. Рассчитанный средний конечный период полужизни в сыворотке ($t_{1/2}$) общего CTL-002 варьировался от 119 до 651 часов.

Основные фармакокинетические данные после первого (дни 1-8) и четвертого (дни 22-29) введения CTL-002 приведены в Таблице 9 для самцов и самок животных.

Таблица 9: Основные фармакокинетические данные для общего CTL-002, полученные в исследовании токсичности GLP на обезьянах CTL-002-TOX-03 после первого и четвертого введения

Группа	Уровень дозы [мг/кг массы тела]	C_{max} [мкг/мл]	$t_{1/2}$ [ч]	AUC _{0-t} [мкг ч/мл]	AUC _{inf} [мкг ч/мл]
Дни 1-8					
2	10	M: 237 F: 686	M: 197 F: 165	M: 21500 F: 36901	M: 47505 F: 67303
3	30	M: 804 F: 2292	M: 292 F: 212	M: 65026 F: 103114	M: 193062 F: 233692
4	100	M: 2725 F: 5428	M: 312 F: 458	M: 227335 F: 533272	M: 717624 F: 2981268
Дни 22-29					
2	10	M: 1520 F: 1030	M: 486 F: 119	M: 135788 F: 89266	M: 503693 F: 149202
3	30	M: 4363 F: 4935	M: 308 F: 169	M: 149037 F: 360184	M: 450025 F: 697479
4	100	M: 12553 F: 13624	M: 651 F: 234	M: 1388031 F: 1329769	M: 9257432 F: 3233365

После инфузии CTL-002 уровни GDF-15 в сыворотке у всех животных при всех уровнях доз увеличивались в 100-1000 раз и оставались повышенными на протяжении всего интервала дозирования. Как показано на Фигуре 23, показывающей в качестве примера уровни GDF-15 у самок обезьян в течение первой недели после введения дозы, увеличение было сравнимым для разных групп дозирования.

Следовательно, можно сделать вывод, что полное целевое ингибирование было достигнуто при всех уровнях доз и на протяжении всего интервала дозирования в базовом исследовании на обезьянах.

Общий дизайн исследования

С использованием антитела CTL-002 будет проведено многоцентровое открытое исследование фазы 1, впервые проводимое на людях (F1H), состоящее из части А (повышение дозы), за которой следует часть В (расширение). Основная цель исследования состоит в том, чтобы (а) продемонстрировать безопасность CTL-002 и комбинации CTL-002+анти-PD1/PD-L1 и (b) продемонстрировать, что пациенты с рецидивом после анти-PD1/PD-L1-терапии/резистентные к анти-PD1/PD-L1-терапии из-за повышенного уровня GDF-15 снова ответят и продемонстрируют уменьшение опухоли при введении комбинации CTL-002+анти-PD1/PD-L1.

Часть А (повышение дозы)

По меньшей мере, 21 объект будет получать в когортах «3+3» возрастающие дозы CTL-002 внутривенно в качестве монотерапии и в комбинации с ингибитором контрольной точки анти-PD-1 у объектов с солидными опухолями на поздних стадиях, которые рецидивировали после или были резистентны к ранее проводившейся анти-PD-1/PD-L1-терапии и исчерпавшие все доступные утвержденные стандартные методы лечения или больше не соответствующие требованиям. «Когорты пополнения» будут набирать дополнительных пациентов с самыми высокими дозами.

Часть В (расширение)

Включает до 5 расширенных когорт до 25 объектов в каждой когорте в определенных опухолевых образованиях, которые рецидивировали после предшествующей терапии анти-PD-1/PD-L1 или были резистентны к ней, для дальнейшей оценки безопасности и эффективности CTL-002 в качестве монотерапии (необходимо изучить одну когорту монотерапии) или в комбинации с ингибитором контрольной точки анти-PD-1 (необходимо изучить до 4 комбинированных когорт) и для подтверждения RP2D. Специальная когорта монотерапии будет служить для установления профиля безопасности CTL-002 при длительной монотерапии в дозе, которая считается терапевтической (без добавления анти-PD-1/PD-L1). Включение во все 5 когорт может происходить параллельно.

Период лечения

Часть А (Повышение дозы)

В этом исследовании будет использоваться стандартный план повышения дозы «3+3», в котором от 3 до 6 объектов будут участвовать в каждом назначенном уровне дозы в каждой когорте, в зависимости от возникновения DLT.

Запланированные дозы CTL-002 для тестирования приведены ниже:

Когорта 1: 0,3 мг/кг

Когорта 2: 1 мг/кг

Когорта 3: 3 мг/кг

Когорта 4: 10 мг/кг

Когорта 5: 20 мг/кг

Начальная доза 0,3 мг/кг для когорты 1 является фиксированной. Дозы, изученные в когортах 2-5 (как указано выше), могут быть изменены Комитетом по рассмотрению вопросов безопасности (SRC) на основе новых данных (т. е. доступная безопасность, PK/фармакодинамика, другие биомаркерные данные)

Периодом наблюдения DLT будут первые два цикла лечения (т. е. первые 4 недели) для каждой когорты дозирования. Все циклы лечения первоначально определяли продолжительностью 2 недели. CTL-002 будет вводиться один раз каждые две недели в виде внутривенной инфузии. Объекты сначала получают одну дозу CTL002 в качестве монотерапии в течение одного цикла, а затем комбинацию CTL-002, вводимую вместе с определенным ингибитором контрольной точки, в течение одного цикла, где указанный

ингибитор контрольной точки будет вводиться в дозе 240 мг внутривенно один раз в 2 недели.

Для комбинации CTL-002 и ингибитор определенной контрольной точки будут вводиться в один и тот же день одновременно, где CTL-002 будет вводиться первым, а для первой комбинированной инфузии будет 30-минутный период наблюдения для оценки безопасности, за которым затем следует инфузия определенного ингибитора контрольной точки. Период наблюдения может быть изменен (т. е. укорочен или удлинен) на основании новых данных о безопасности.

Первые два цикла лечения (т. е. первые 4 недели) представляют период наблюдения DLT.

После этого объекты будут продолжать комбинированное лечение до прогрессирования или до выхода из исследования по любым другим причинам (например, токсичность или отзыв согласия объекта).

Дополнительные когорты со средними дозами могут быть изучены на основе новых данных и по запросу Комитета по рассмотрению вопросов безопасности (SRC). Максимальная доза CTL-002, которая будет тестироваться в этом исследовании, не будет превышать 20 мг/кг.

Все объекты будут госпитализированы на ночь после получения первой дозы CTL-002, а также после получения первой комбинированной дозы CTL-002 и ингибитора определенной контрольной точки в целях наблюдения за безопасностью и для обеспечения логистического сбора временных точек отбора проб (например, PK).

Повышение дозы у пациента при расширенном периоде лечения

Если какие-либо объекты когорты 1 все еще получают лечение дозой 0,3 мг/кг, когда когорта 2 завершена и рассмотрена SRC, то объектам могут быть увеличены дозы до дозы когорты 2 1 мг/кг.

Если какие-либо объекты когорты 1 или 2 все еще получают лечение дозой 1 мг/кг, когда когорта 3 завершена и рассмотрена SRC, объектам могут быть увеличены дозы до дозы когорты 3, равной 3 мг/кг.

Примечание. Любые объекты, все еще получающие лечение в дозе 0,3 мг/кг, должны получать лечение в дозе 1 мг/кг до перехода на дозу 3 мг/кг по согласованию с медицинским монитором спонсора.

Максимальная доза у объекта, которую можно увеличить за счет внутреннего повышения дозы, будет составлять 3 мг/кг.

Имеющиеся данные о безопасности, фармакокинетика/фармакодинамические данные, а также предварительные данные об эффективности будут способствовать принятию решения относительно MTD/дозы, которые будут дополнительно изучены в части В исследования.

MTD определяется как самый высокий уровень дозы CTL-002, при котором не более чем у 1 из 6 объектов наблюдалась DLT в течение первых 2 циклов лечения (т. е. первые 4 недели, когда CTL-002 вводят в виде монотерапии [недели 1 и 2] и в комбинации

с определенным ингибитором контрольной точки [недели 3 и 4]).

Кроме того, для когорт 3-5, при отсутствии какой-либо DLT, в каждую из этих когорт можно набрать еще 3 объекта (всего до 6 объектов в когорте), чтобы улучшить понимание фармакокинетических и фармакодинамических данных. Это происходит, пока продолжается повышение дозы. Эти дополнительные объекты «пополнения» будут получать комбинированное лечение CTL-002 и определенного ингибитора контрольной точки один раз каждые две недели, начиная с 1-го дня цикла 1, причем CTL-002 всегда вводится первым, а определенный ингибитор контрольной точки вводится после этого, как указано выше.

Для объектов части А (за исключением объектов пополнения) должны быть взяты три последовательных биопсии опухоли; одна биопсия на исходном уровне, вторая биопсия до начала комбинированной терапии (через 2 недели) и третья после первого цикла комбинированной терапии (либо в конце лечения, либо, если комбинированное лечение продолжается, в конце Цикла 2/в начале Цикла 3).

Для пациентов пополнения обязательны только две биопсии; одна исходно, а вторая через 4 недели комбинированного лечения (либо в конце лечения, либо, если комбинированное лечение продолжается, в конце цикла 2/начале цикла 3).

Эти биопсии являются обязательными для оценки инфильтрации иммунных клеток в опухоли. Если биопсия не может быть взята из соображений безопасности, это необходимо обсудить с медицинским монитором.

Лечение CTL-002 в виде монотерапии (один цикл), а также в комбинации с ингибитором контрольной точки (ниволумаб) безопасно переносилось вплоть до уровня дозы 5 CTL-002 (20 мг/кг). Ни у одного пациента, получавшего лечение, не было ни DLT, ни нежелательных явлений 4-й степени тяжести. Комбинированное лечение можно начинать одновременно, как показано в так называемых когортах пополнения с немедленной комбинацией лечения CTL-002 и анти-PD1/PD-L1.

Анализы биомаркеров показывают селективный одновременный приток к опухоли клеток CD8⁺ и CD4⁺ из DL1-4. Предварительный анализ показывает, что у нескольких пациентов в опухоли повышена пролиферация Т-клеток, о чем свидетельствует окрашивание CD3/ki-67⁺. Опухоли, которые на исходном уровне имели «холодные опухоли», характеризующиеся довольно низким количеством CD8 и CD4, превращаются в горячие опухоли за счет увеличения количества CD8 и CD4.

Первые сокращения опухоли наблюдались при различных уровнях доз. Наиболее примечательным является пациент с неизвестной первичной карциномой (плоскоклеточный тип), получавший лечение в когорте пополнения уровня дозы 3, у которого был рецидив на предшествующем лечении ниволумабом и просто сохранялось медленное прогрессирование заболевания (со стабильным диапазоном заболевания в соответствии с RECIST) при эскалации до ипилимумаба+ниволумаб. При лечении CTL-002/ниволумаб пациенту удалось добиться сокращения опухоли на -49%, что соответствует подтвержденной частичной ремиссии. Лечение продолжается. У другого

пациента на уровне дозы 4 с гепатоцеллюлярным раком опухоль уменьшилась на -11%, лечение продолжается.

Часть В (Расширение)

В части В исследования может быть включено до 6 когорт (до 20 объектов в когорте), каждая из которых включает объектов с определенным типом опухоли.

В этой расширенной части исследования может быть создана специальная когорта монотерапии CTL-002 для изучения профиля безопасности CTL-002, применяемого в качестве монотерапии (например, у объектов с меланомой на поздних стадиях). Кроме того, для этой когорты монотерапии требуются обязательные последовательные биопсии опухоли, чтобы расширить понимание фармакодинамических эффектов CTL-002 в опухолевой ткани.

В этой когорте монотерапии обязательными являются две серийные биопсии опухоли; одна биопсия должна быть взята на исходном уровне, а вторая биопсия должна быть взята через 2 недели (в конце цикла 1/начале цикла 2). Все объекты будут подвергнуты лечению до прогрессирования.

Затем до 5 других расширенных когорт определенных популяций опухолей можно лечить комбинацией CTL-002 и определенного ингибитора контрольной точки. Показания для опухолей будут состоять из типов опухолей, одобренных для лечения PD-1/PD-L1, и объектов, у которых возник рецидив/прогрессирование во время или после лечения антиPD-1/PD-L1. Включение в когорты расширения может происходить параллельно. Все объекты будут подвергнуты лечению до прогрессирования.

В целях наблюдения за безопасностью и для обеспечения логистического сбора временных точек отбора проб (т. е. отбор проб РК) все объекты будут госпитализированы на ночь после получения первой дозы CTL002 (когорта монотерапии) или после получения первой комбинированной дозы с CTL-002 и определенного ингибитора контрольной точки (когорта комбинированной терапии), соответственно.

Оценки исследования

Биопсия опухоли

Сроки биопсии следующие:

Часть А (все объекты, кроме объектов пополнения): обязательны три последовательные биопсии опухоли; одна биопсия на исходном уровне, вторая биопсия до начала комбинированной терапии (через 2 недели) и третья биопсия после первого цикла комбинированного лечения (либо во время визита в конце лечения, либо, если комбинированное лечение продолжается, во время конца цикла 2/начала цикла 3). Эти биопсии являются обязательными для оценки инфильтрации иммунных клеток в опухоли.

Часть А (объекты пополнения): обязательны две серийные биопсии опухоли; одна биопсия на исходном уровне и вторая биопсия через 4 недели (либо во время визита в конце лечения, либо, если комбинированное лечение продолжается, в конце цикла 2/начале цикла 3)

Часть В (объекты, включенные в когорту монотерапии): обязательны две серийные

биопсии опухоли; одна биопсия в начале исследования и вторая биопсия после первого цикла монотерапии (т. е. через 2 недели).

Должно быть поражение, поддающееся последовательной биопсии, если это возможно, или поражение в непосредственной близости, но это поражение не должно быть единственным целевым поражением, которое будет оцениваться радиологически в ходе исследования.

Биомаркеры могут быть проанализированы из биоптатов опухолевой ткани. Могут быть включены дополнительные маркеры иммунных клеток и/или опухолевые маркеры, специфичные для любого типа опухоли.

Биопсия опухолевой ткани будет зафиксирована формалином и помещена в парафин (FFPE) для определения вызванных лечением изменений количества, частоты и пространственного расположения инфильтрирующих иммунных клеток, включая, помимо прочего, лейкоциты, различные лимфоциты (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, В-клетки, NK-клетки) по гистологии до и после обработки CTL-002 или в комбинации с определенным ингибитором контрольной точки. Кроме того, будет определяться экспрессия лекарственной мишени CTL-002, белка и мРНК GDF-15.

Опухолевые поражения

Для объектов в части А исследования целевые кожные поражения, выбранные для оценки RECIST, будут измерены штангенциркулем и сфотографированы. Кроме того, будет зарегистрировано количество кожных поражений. Для клинических измерений кожных поражений в Части А, документирование с помощью цветной фотографии (включая измерение размера) и измерение поражений штангенциркулем будут выполняться на исходном уровне в пределах -7 дней до инфузии CTL-002, каждые 4 недели в течение расширенного периода лечения, в конце Визита для лечения и во время последующего наблюдения.

Оценка безопасности

Безопасность и переносимость внутривенных инфузий монотерапии CTL-002 и CTL-002 в комбинации с определенным ингибитором контрольной точки будут оцениваться в зависимости от частоты НЯ (все НЯ будут оцениваться в соответствии с NCI CTCAE v5.0), СНЯ, DLT, и использования сопутствующих препаратов. Оценки безопасности будут включать: ЭКГ, медицинский осмотр, включая неврологическое обследование для исключения двигательной нейропатии, состояние работоспособности по шкале ECOG, основные показатели жизнедеятельности и клинические лабораторные образцы (гематология, клиническая биохимия, коагуляция, функция щитовидной железы (тиреотропный гормон [ТТГ] и свободный Т3), цитокины, оценка гемоглобина A1c [HbA1c], N-концевого натрийуретического пептида В-типа [NT proBNP] и анализ мочи).

Объектов оценивают для безопасности при скрининге, а также во время лечения до последующего контрольного визита по вопросам безопасности. После этого безопасность, связанная с исследованием, дополнительно фиксируется в течение 12 месяцев (часть А)/24 месяцев (часть В) после лечения.

Показатели жизненно-важных функций

Необходимо оценить основные показатели жизненно-важных функций, включая систолическое и диастолическое АД (сидя), частоту пульса, температуру, частоту дыхания и насыщение кислородом. Дополнительные измерения основных показателей жизненно-важных функций могут быть выполнены, если это клинически оправдано.

Медицинское и неврологическое обследование

Во время скрининга будет проводиться медицинское обследование, которое будет включать обследование головы, глаз, ушей, носа, горла, шеи, сердечно-сосудистой системы, грудной клетки/легких, брюшной полости (включая размер печени и селезенки), конечностей, кожи и лимфатических узлов, а также краткое неврологическое обследование для оценки моторной невропатии.

Дополнительные временные точки оценки медицинского обследования указаны ниже и в SoA в Таблице 5, Таблице 6 и Таблице 7.

Общее состояние

Общее состояние будет оцениваться при скрининге в соответствии с критериями ECOG следующим образом:

0=полностью активен, способен выполнять все действия, предшествующие заболеванию, без ограничений

1=Ограничен в физических нагрузках, но амбулаторный и способный выполнять легкую или сидячую работу (например, легкая работа по дому, работа в офисе)

2=Подвижный и способный к самообслуживанию, но неспособный выполнять какую-либо работу. До и примерно более чем 50% часов бодрствования.

3=Способен лишь к ограниченному самообслуживанию, прикован к постели или стулу более 50% времени бодрствования

4=Полностью инвалид, не может заниматься самообслуживанием, полностью прикован к кровати или стулу.

5=Смерть

Мониторинг сердечной функции

Объекты будут подвергнуты тщательному мониторингу сердечно-сосудистых НЯ, и будут приняты защитные меры для исключения объектов, подверженных риску, от участия в испытаниях.

На исходном уровне объекты проходят ЭКГ, эхокардиографию (или MUGA, если ЭХО не может быть выполнено) и тестирование на уровне N-концевого про-b-типа натрийуретического пептида (NTproBNP, скрининг сердечной недостаточности). Тестирование на NT-proBNP будет повторяться каждые 2 недели в течение 3 месяцев, а затем ежемесячно или в случае любого подозрения на повреждение сердца/сосудов любого типа (затем снова в сочетании с ЭКГ и эхокардиографией).

Будет выполнена однократная ЭКГ в 12 отведениях.

Весь мониторинг ЭКГ должен выполняться локально в исследовательском центре.

Объект должен быть расслаблен и находиться в лежачем или полужаком

положении не менее чем за 5 минут до записи ЭКГ.

Дополнительное тестирование ЭКГ может быть выполнено по усмотрению исследователя, если оно будет сочтено клинически оправданным.

Клиническая лабораторная оценка

Будут собраны образцы для лабораторных испытаний, перечисленные ниже. Все тесты проводятся локально.

Перед введением CTL002/PD1/PD-L1 результаты гематологии/коагуляции, клинический анализ должны быть доступны, проверены и признаны приемлемыми исследователем или уполномоченным представителем.

Клинически значимые аномальные тесты должны быть повторены, чтобы подтвердить характер и степень аномалии. При необходимости следует инициировать соответствующие дополнительные исследования. Если аномалия не проходит или не может быть объяснена событиями или состояниями, не связанными с исследуемым лекарством или его введением, необходимо проконсультироваться с медицинским монитором.

Клиническая значимость аномального значения теста в контексте изучаемого заболевания должна быть определена исследователем, включая значительные отклонения от исходного уровня в пределах диапазона нормы, которые исследователь считает клинически важными.

Таблица 10 Лабораторное тестирование на безопасность

Гематология	Гемоглобин, гематокрит, эритроциты, лейкоциты с дифференциалом, ANC, AMC, количество тромбоцитов
Клинический анализ	CRP, креатинин, LDH, кальций, электролиты (натрий и калий), общий билирубин, GGT, альбумин, щелочная фосфатаза, AST, ALT, и глюкоза
Коагуляция	Включает: αPTT, PT/INR INR/PT следует измерять ежедневно у любого объекта, у которого наблюдается повышение уровня ALT или AST в $\geq 3 \times \text{ULN}$ с сопутствующим повышением уровня билирубина в $\geq 2 \times \text{ULN}$, до разрешения отклонений от нормы показателей функции печени до исходного уровня. АТ III D-димер
Серология	Анализ на HIV1 и HIV2, HBV, HCV, TBC, SARS-CoV-2
Анализ мочи	pH, кетоны, относительная плотность, билирубин, белок, кровь и глюкоза будут оцениваться тест-полоской.

αPTT=активированное частичное протромбиновое время; AMC=абсолютное количество моноцитов; ALT=аланин аминотрансфераза; ANC=абсолютное количество нейтрофилов; AST=аспартат аминотрансфераза; АТ III=анти тромбин III; CRP=C-реактивный белок; GGT=гамма-глутаминотрансфераза; HBV=вирус гепатита В; HCV=вирус гепатита С; HIV1=вирус иммунодефицита человека 1; HIV2=вирус иммунодефицита человека 2; INR=международное нормализованное отношение; LDH=лактат дегидрогеназа; PT=протромбиновое время; RBC=количество эритроцитов; TB=туберкулез; ULN=верхняя граница нормы; WBC=количество лейкоцитов

Фармакокинетика

РК CTL-002, вводимого в виде монотерапии и/или в комбинации с определенным

ингибитором контрольной точки, будет измеряться в образцах крови, собранных в начале лечения и в различные последующие моменты времени (Часть А). Дополнительные данные РК могут быть оценены в расширенных когортах (Часть В).

Образцы крови будут взяты в начале лечения и в различные последующие моменты времени, чтобы определить, могли ли развиться антитела, направленные против CTL-002.

Мониторинг системных цитокинов/хемокинов (фармакодинамика)

Образцы сыворотки будут собраны для измерения цитокинов, хемокинов и других циркулирующих биомаркеров для оценки фармакодинамических эффектов, а также безопасности. Анализируемые цитокины и хемокины могут включать, но не ограничиваются ими: фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), интерферон (IFN)- γ , интерлейкин (IL)1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL10, IL-12p70, IL-13, CXCL9 (монокин, индуцированный гамма-излучением [MIG]) и CXCL10 (IP-10).

Исследовательские оценки

Тестирование биомаркеров сыворотки на образцах, специально собранных для будущих биомедицинских исследований во время этого клинического испытания (сохраненные аликвоты), может быть проведено для выявления сывороточных факторов (например, но не ограничиваясь ими, метаболитов, растворимых факторов роста, цитокинов, хемокинов), важных для анти-GDF-15 (CTL-002)-терапии. Ретроспективные исследования биомаркеров будут проводиться с соответствующим биостатистическим дизайном и анализом и сравниваться с РК/фармакодинамическими результатами, ранее оцененными биомаркерами или клиническими результатами.

Оценка эффективности: оценка изображений (локальное тестирование)

Ответ опухоли оценивается в соответствии с институциональными стандартами с использованием критериев RECIST V1.1, а также критериев imRECIST. В целях этого исследования объекты будут проходить оценку при скрининге для исходного сканирования и должны повторно оцениваться каждые 8 недель, начиная с цикла 3 и/или с визита в конце лечения, а затем по истечении этого времени оценки реакции могут выполняться в соответствии с местными институциональными руководствами до окончания последующего наблюдения за эффективностью и выживаемостью.

Все поражения, выявленные при скрининге/на исходном уровне, будут последовательно отслеживаться с использованием уникального номера поражения, присвоенного при скрининге/исходном уровне, и должны быть задокументированы в файле объекта и в eCRF.

Один и тот же метод оценки (модальность визуализации, например, МРТ, КТ) должен использоваться для характеристики каждого выявленного и зарегистрированного поражения на исходном уровне и во время всех последующих обследований отдельного объекта. В случае изменения модальности исследовательский центр может попросить объяснить причину изменения eCRF. Изменение модальности может рассматриваться как отклонение от протокола.

Каждая точка времени эффективности/визита может быть завершена до окна ± 7 дней.

Центральное чтение изображений центром чтения будет выполняться ретроспективно в дополнение к локальному чтению исследователем во время исследования.

Определение прогрессирующего заболевания согласно RECIST V1.1 и imRECIST:

Оценки RECIST будут использоваться для выявления объектов с возможным прогрессированием заболевания (Eisenhaug et al, 2009). Как определено модифицированными критериями RECIST V1.1 для иммунных терапевтических средств или критериями imRECIST (Hodi et al, 2018), дата начального потенциального прогрессирования с помощью сканирования RECIST будет определяться как дата иммунного неподтвержденного прогрессирующего заболевания (iUPD). Объекты со стабильной датой iUPD будут продолжать участвовать в исследовании, как и планировалось, и будут повторно оцениваться на предмет прогрессирования через 4-8 недель после первоначальной оценки. Если подтверждающая оценка подтверждает болезнь Паркинсона, дата прогрессирования заболевания будет датой iUPD. Если подтверждающая оценка не подтверждает PD, у объекта нет прогрессирования заболевания и дата iUPD игнорируется; такие объекты останутся в исследовании, как и планировалось, и продолжат следующую оценку изображений, как запланировано в соответствии с протоколом.

Противоопухолевую активность оценивают в соответствии с оценкой исследователя с использованием RECIST V1.1 и критериев иммунного ответа в соответствии с imRECIST, как описано ниже.

Контрастные КТ органов грудной клетки, брюшной полости и таза, МРТ или позитронно-эмиссионная томография-компьютерная томография (ПЭТ-КТ).

В этом исследовании ответ заболевания и прогрессирование заболевания будут оцениваться с использованием критериев RECIST и imRECIST.

Объекты с метастазами в головной мозг и/или лептоменингеальными метастазами, которые являются симптоматическими или нелеченными, или которым требуется текущая терапия, не будут иметь права на участие в исследовании. Снимки головного мозга не должны быть старше 12 недель. Результаты с аномальными/неожиданными результатами МРТ головного мозга следует обсудить с медицинским монитором в рамках процесса скрининга.

Один и тот же метод оценки и одну и ту же технику следует использовать для характеристики каждого выявленного и зарегистрированного поражения на исходном уровне и во время последующего наблюдения. В случае изменения модальности исследовательский центр может попросить объяснить причину изменения eCRF. Изменение модальности может рассматриваться как отклонение от протокола.

Результаты

Исследование было начато в декабре 2020 г., и первый пациент был

зарегистрирован 9 декабря 2020 г. Когорты 1-4 были завершены без дозолимитирующей токсичности (DLT), и продолжается повышение дозы. Примечание: промежуточные данные.

Пациенты и лечение CTL-002:

Этот промежуточный отчет включает демографические данные и предварительные данные о безопасности первых 16 пациентов, получавших лечение в исследовании CTL-002-001.

Таблица 11: Демографические данные пациентов по когортам доз

	Уровень дозы 1 (0,3 мг/кг) N=3	Уровень дозы 2 (1 мг/кг) N=4*	Уровень дозы 3 (3 мг/кг) N=6	Уровень дозы 4 (10 мг/кг) N=6	Уровень дозы 5 (20 мг/кг) N=3	Всего N=22
Возраст, лет, медиана (диапазон)	72 (66-77)	56 (54-61)	59 (54-65)	66 (34-79)	62 (61-65)	61.5 (34-79)
Пол						
Муж., количество (%)	2 (67)	1 (25)	1 (17)	6 (100)	2 (67)	12 (55)
Жен., количество (%)	1 (33)	3 (75)	5 (83)	0 (0)	1 (33)	10 (45)
ЕСОГ исходный уровень						
0	0 (0)	3 (75)	4 (67)	3 (50)	2 (67)	8 (50)
1	3 (100)	1 (25)	2 (33)	3 (50)	1 (33)	8 (50)
Тип опухоли	Плевральная мезотелиома	Орофарингеальный рак	Меланома	Почечный рак	Меланома	
	Меланома	Рак Шейки матки	Меланома	Меланома	Меланома	
	Колоректальный рак	Рак TN-молочной железы	Рак Яичников	Печеночноклеточный рак	увеальная Меланома	
		Меланома	Плоскоклеточный рак	NSCLC	Tbd.	
			NSCLC	Меланома	Tbd.	
			Окулярная Меланома	Холангиоцеллюлярный рак	Tbd.	
Предыдущие линии терапии						

Количество во (среднее %)	11 (3,7) 2 (67)	15 (3,8) 2 (50)	28 (4,7) 3 (50)	23 (3,8) 4 (67)	13 (4,3) 1 (33,3)	91 (4,1) 12 (54,5)
1-3						
4-5	0 (0)	2(50)	1 (17)	1 (16,5)	1 (33,3)	5 (22,7)
≥ 6	1 (33)	0 (0)	2 (33)	1 (16,5)	1 (33,3)	5 (22,7)

* 1 пациент заменен в связи с задержкой начала комбинированного лечения

Предварительная безопасность и переносимость CTL-002:

До настоящего времени монотерапия, а также комбинация с ниволумабом показали отличную переносимость. До настоящего времени не наблюдалось дозолимитирующей токсичности (DLT) и не наблюдалось никаких событий, вызывающих озабоченность по поводу безопасности. В целом, на сегодняшний день было зарегистрировано в общей сложности 111 побочных эффектов для уровней доз 1-5. Три НЯ были классифицированы как СНЯ и, по меньшей мере, возможно, связаны с CTL-002 (два из-за длительной госпитализации, одно объявлено важным медицинским событием по оценке исследователя; все общепринятые терминологические критерии нежелательных явлений (СТСАЕ) класс 1-2).

СТСАЕ класса ≥ 4 не наблюдалось.

Таким образом, профиль побочных эффектов очень мягкий.

Стратегия и анализ биомаркеров

В этом клиническом исследовании исследуются биомаркеры на основе сыворотки и тканей. Помимо классических маркеров активации иммунной системы, таких как сывороточные цитокины, проводятся специальные анализы для оценки иммуномодулирующего действия GDF-15 в микроокружении опухоли. Среди других параметров анализируют исходные уровни GDF-15, внутриопухолевые уровни GDF-15, а также количество и профили инфильтрирующих опухоль лейкоцитов до и после нейтрализации GDF-15 с помощью CTL-002. Значительная опухолеселективная экспрессия GDF-15 была подтверждена для большинства проанализированных опухолей. Избирательный приток опухоли и стромой опухоли преимущественно CD8+ и CD4+ Т-клеток при дозировании CTL-002 наблюдался у большинства пациентов, где эффект наблюдался, начиная с уровня дозы 1. Предварительный анализ показывает, что у нескольких пациентов в опухоли повышена пролиферация Т-клеток, о чем свидетельствует окрашивание CD3/ki-67+. Опухоли, которые на исходном уровне имели «холодные опухоли», характеризующиеся довольно низким количеством CD8 и CD4, превращаются в горячие опухоли за счет увеличения количества CD8 и CD4.

Кроме того, в некоторых опухолях наблюдалась реактивная активация PD-L1, что является косвенным признаком высвобождения IFN-гамма.

Таблица 12: Список анализов в крови, опухоли и моче для моделирования PD/PK, иммунологической оценки и идентификации биомаркеров.

Методы/Материалы	Кровь	Сыворотка	Опухоль	Моча
GDF-15 белок (ИФА, ECL)	-	+	-	+
PK общий CTL-002 (ECL)	-	+	-	-
ADA (ECL)	-	+	-	-
Цитокины/Хемокины (ИФА, ECL) IFN-g/IL-1b/IL-2/IL-4/IL-6/IL-8/IL-10/IL-12p70/IL13 CXCL9/CXCL10	-	+	-	-
Опухоль инфильтрующие иммунные клетки /ткань (ИHC) CD3/CD4/CD8/Foxp3/Ki67/ GranzB/CD11c/CD29/CD68/MHCII/ CKSox10 PD-L1 GDF-15 (ИHC до проформы) Другие необязательные маркеры	-	-	+	-
мРНК GDF-15 опухоли (FISH) (необязательно)	-	-	+	-
Молекулярные биомаркеры Панель Nanostring nCounter PanCancer IO 360 TM Мутационная нагрузка (необязательно) Другие необязательные молекулярные биомаркеры (MSI, мутации)	(+)	-	+	-
Консервация образцов для необязательных анализов (по запросу)	+	+	+	+

Предварительная оценка ответа

Первые сокращения опухоли наблюдались при различных уровнях доз. Наиболее примечательным является пациент с неизвестной первичной карциномой (плоскоклеточный тип), получавший лечение в когорте пополнения уровня дозы 3, у которого был рецидив на предшествующем лечении ниволумабом и просто сохранялось медленное прогрессирование заболевания (со стабильным диапазоном заболевания в соответствии с RECIST) при эскалации до ипилимумаба+ниволумаб. При лечении CTL-002/ниволумаб пациенту удалось добиться сокращения опухоли на -49%, что соответствует подтвержденной частичной ремиссии. Лечение продолжается. У другого пациента на уровне дозы 4 с гепатоцеллюлярным раком опухоль уменьшилась на -11%, лечение продолжается.

Выводы

Недавние доклинические данные, полученные нами и другими, показывают, что GDF-15 сильно (1) предотвращает инфильтрацию Т-клеток в микроокружение опухоли

(TME) и что он (2) подавляет мощный иммунный ответ внутри (TME) также с помощью других механизмов. Таким образом, GDF-15 играет ключевую роль в подавлении эффективных противоопухолевых иммунных ответов.

Исследование фазы 1 GDFATHER (GDF-15 антитело-опосредованная релокация эффекторных клеток) исследует безопасность, PK и PD и предварительную противоопухолевую активность нейтрализующего GDF-15 антитела CTL-002 в монотерапии и в комбинации с ингибитором контрольной точки (CPI) в Популяции пациентов с рецидивом/резистентностью к CPI. Также исследуются антикахе克斯ические эффекты.

Уровень дозы 1-5 был успешно завершён с отличной переносимостью и отсутствием DLT.

Предварительные фармакодинамические анализы последовательных биопсий опухоли (уровень дозы 1-4) указывают на опосредованный CTL-002 селективный сдвиг T-клеток в микроокружение опухоли.

Предпочтительные дозы и режимы дозирования антител по изобретению, включая CTL-002, составляют 3, 10 или 20 мг/кг/1 раз в 2 недели; более предпочтительная доза и режим дозирования составляют 10 мг/кг/1 раз в 2 недели. Как отражено вышеописанными благоприятными клиническими эффектами, которые до сих пор наблюдались у пациентов при уровнях доз 3 и 4, ожидается, что эти уровни доз являются высокоэффективными. Кроме того, выбор дозы и режима дозирования основан на обширных исследованиях, проведенных авторами изобретения, включая фармакологическое моделирование и полученные фармакокинетические/фармакодинамические данные из Части А, указывающие на полную нейтрализацию GDF-15 при этой дозе у пациентов со всеми диапазонами исходного уровня GDF-15 в сыворотке. Обзор всех лечебных доз и их нежелательных явлений, фармакокинетика/фармакодинамика, наблюдаемая до сих пор, и проведенное тщательное фармакологическое моделирование указывают на полное подавление GDF-15 в микроокружении опухоли при 10 мг/кг CTL-002 даже при повышенном исходном уровне сывороточных концентраций GDF-15 до 10 нг/мл GDF-15 в сыворотке, что соответствует примерно 160 нг/мл GDF-15 в непосредственной близости от опухоли. До сих пор при этой дозе не наблюдалось никаких явлений, вызывающих беспокойство, и не было DLT при этой дозе, и все еще существует более чем 10-кратный запас безопасности по сравнению с NOAEL у приматов, отличных от человека (NHP). Таким образом, ожидается, что указанные выше предпочтительные дозы особенно эффективны и безопасны.

Приведенные выше наблюдения в отношении эффективности, безопасности и фармакокинетических/фармакодинамических данных также показывают, что будет возможно успешно вводить антитело против GDF-15 в предпочтительной дозе от 10 до 20 мг/кг, более предпочтительно 20 мг/кг, и в режиме дозирования по меньшей мере одного цикла введения, где цикл представляет собой период в четыре недели и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз (т. е. предпочтительно один раз) в каждом

из по меньшей мере одного цикла. Этот режим дозирования имеет более длительный цикл введения, составляющий четыре недели, но предпочтительная доза от 10 до 20 мг/кг, более предпочтительно 20 мг/кг, позволит получить благоприятный профиль безопасности и эффективности, аналогичный предпочтительному 10 мг/кг/1 раз в 2 недели и совместим с наблюдаемым РК/фармакодинамическим профилем.

Аналогичным образом, приведенные выше наблюдения в отношении эффективности, безопасности и фармакокинетических/фармакодинамических данных также показывают, что будет возможно с успехом вводить антитело против GDF-15 в предпочтительной дозе от 10 до 20 мг/кг и при режим дозирования по меньшей мере одного цикла введения, где цикл представляет собой период в три недели и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз (т. е. предпочтительно один раз) в каждом из по меньшей мере одного цикла. Этот режим дозирования имеет более длительный цикл введения, составляющий три недели, но предпочтительная доза от 10 до 20 мг/кг позволит получить благоприятный профиль безопасности и эффективности, аналогичный предпочтительному режиму 10 мг/кг/1 раз в 2 недели, и совместим с наблюдаемым ФК/фармакодинамическим профилем.

Приведенные выше данные показывают, что лечение антителами против GDF-15 по изобретению может обеспечить значительную клиническую пользу для пациентов с злокачественным новообразованием. Важно отметить, что это преимущество также наблюдается у пациентов, которые ранее были невосприимчивы к некоторым из наиболее продвинутых вариантов лечения, таких как терапия антагонистами оси PD-1/PD-L1 (например, ниволумаб).

In silico определение потенциального риска стабильности в антителе с каркасом IgG1 «H1L5»

В качестве первой стадии, направленной на достижение цели создания стабильной композиции антитела по изобретению, авторы изобретения решили определить, какие части и последовательности антител потенциально подвержены риску при разработке составов в будущем. Для этого было проведено определение *in silico*. Гуманизированное антитело против GDF-15 H1L5 подвергали скринингу с помощью инструментов оценки технологичности *in silico*. Аминокислотную последовательность H1L5, состоящую из полноразмерной легкой цепи каппа-изотипа и полноразмерной тяжелой цепи IgG1, подвергали скринингу на мотивы последовательности и признаки потенциальной возможности развития ряда проблем, и на риск агрегации. Было показано, что H1L5 имеет потенциальный сайт дезамидирования CDR и сайт окисления, которые могут оказаться полезными при оценке *in vitro*. Антитело также имеет другие проблемы в виде потенциального сайта окисления и кислоточувствительных сайтов, а также отсечения С-конца.

Терапевтические белки сложны и очень гетерогенны из-за посттрансляционных модификаций (PTM) и химических модификаций. Эти модификации включают гликозилирование, дезамидирование, окисление и варианты N- и С-концов.

Модификации, которые приводят к соответствующим вариантам, связанным с продуктом, классифицируются регулирующими органами как критические атрибуты качества (CQA). CQA имеют узкие критерии приемлемости, и их изменения отслеживаются соответствующими качественными и количественными методами.

Модификации могут быть связаны с системой клеток-хозяев, производственными процессами и условиями хранения. Они могут относиться либо к химической стабильности молекулы, либо к внутренней физической стабильности в виде потенциала агрегации. Агрегация - это проблема, которая оказывает такое потенциальное влияние на безопасность, качество и эффективность, что для нее обычно определяется один или более CQA.

Агрегация белков является часто встречающейся проблемой при разработке биофармацевтических препаратов. Это может произойти на нескольких различных стадиях производства, таких как ферментация, очистка, приготовление и хранение. Потенциальное влияние агрегации распространяется не только на производственный процесс, но и на профиль целевого продукта, доставку и, что особенно важно, на безопасность пациентов.

Агрегация зависит от самого белка (внутренняя склонность к агрегации) и от факторов окружающей среды, таких как pH, концентрация, буферы, вспомогательные вещества и силы сдвига. Однако фундаментальная разница в том, почему одни антитела агрегируют на стадии процесса или во время производства, а другие нет, закодирована в аминокислотных последовательностях антител и их внутренней склонности к агрегации. Агрегация представляет риск для безопасности, качества и эффективности антител.

Дезамидирование аспарагина представляет собой неферментативную реакцию, которая со временем приводит к образованию гетерогенной смеси аспарагина, изоаспарагиновой кислоты и аспарагиновой кислоты в пораженном месте. Дезамидирование вызывается гидролизом амидной группы на боковых цепях аспарагина и глутамина. В то время как дезамидирование глутамина может происходить в терапевтических белках, основное внимание при производстве уделяется дезамидированию аспарагина. На скорость дезамидирования пептидов влияют три основных фактора: pH, высокая температура и первичная последовательность. Вторичная и третичная структуры белка могут значительно изменить скорость дезамидирования. В дополнение к гетерогенности заряда дезамидирование аспарагина может повлиять на функцию белка, если оно происходит на поверхности связывания, такой как CDR антитела. Сообщалось также, что дезамидирование вызывает агрегацию.

Изомеризация аспарагиновой кислоты представляет собой неферментативное взаимопревращение остатков аспарагиновой кислоты и изоаспарагиновой кислоты. Пептидная связь на С-конце аспарагиновой кислоты может подвергаться фрагментации в кислых условиях. Поскольку эти реакции протекают через промежуточные продукты, подобные промежуточным продуктам реакции дезамидирования аспарагина; скорость изомеризации и фрагментации аспарагиновой кислоты зависит от pH, температуры и

первичной последовательности. Изомеризация аспарагиновой кислоты может влиять на функцию белка, когда она происходит на поверхностях связывания, таких как CDR антител. Изомеризация также вызывает неоднородность заряда и может привести к фрагментации, вызванной расщеплением пептидного остова. Реакция фрагментации в основном происходит при pH ниже 5, а пептидные связи Asp-Pro более лабильны, чем другие пептидные связи. Изомеризация аспарагиновой кислоты потенциально может повышать иммуногенность, и этот риск еще больше возрастает, поскольку фрагментация способствует образованию агрегатов.

C-концевой процессинг лизина представляет собой модификацию антител и других белков, происходящую во время биопроцессинга, вероятно, из-за действия основных карбоксипептидаз. Процессинг C-концевого лизина является основным источником гетерогенности заряда и массы в продуктах антител, поскольку могут образовываться виды с двумя, одним лизином или без лизина.

Изоэлектрическая точка (pI) белка - это pH, при котором белок имеет нулевой суммарный электрический заряд. Изоэлектрическая точка зависит от количества и типа заряженных остатков в белке, их пространственного расположения и степени доступности растворителя. Прогнозирование изоэлектрической точки по аминокислотной последовательности предполагает денатурированный белок. Хотя известно, что спрогнозированные и измеренные изоэлектрические точки различаются, можно увидеть взаимосвязь между этими двумя значениями. Когда белковый раствор имеет pH, равный pI белка, отталкивающие электростатические силы между зарядами белковых молекул минимизируются. Отсутствие отталкивающих электростатических сил может увеличить риск того, что гидрофобные участки поверхности станут горячими точками агрегации.

N- и O-гликозилирование представляет собой посттрансляционную модификацию, появляющуюся в терапевтических белках, таких как антитела, факторы крови, ЕРО, гормоны и интерфероны]. Присоединение углевода к аминокислотным остаткам происходит у атома азота боковой цепи аспарагина при N-гликозилировании и у атома кислорода боковой цепи серина и треонина при O-связанном гликозилировании. Некоторые V-гены иммуноглобулинов содержат остатки аспарагина в CDR, что может привести к образованию мотива N-гликозилирования во время селекции, где приблизительно 20% всех антител гликозилируются в переменных областях *in vivo*. Надлежащее гликозилирование важно не только для фолдинга белка, но также для стабильности, растворимости, активности, фармакокинетики и иммуногенности. Непреднамеренные гликановые структуры в интерфейсах связывания или рядом с ними, такие как CDR, могут закупоривать область связывания или создавать стерические затруднения, тем самым снижая аффинность связывания. Структуры гликанов могут различаться по разветвлению и составу, тем самым внося дополнительную гетерогенность, которую, возможно, придется характеризовать и контролировать.

Окисление: Некоторые аминокислоты подвержены повреждению в результате окисления, вызванного активными формами кислорода (ROS), среди них гистидин,

метионин, цистеин, тирозин и триптофан. Окисление обычно делится на две категории: сайт-специфическое окисление, катализируемое металлом, и неспецифическое окисление. Метионин и, в меньшей степени, триптофан более чувствительны к неспецифическому окислению. В то время как метионин в первую очередь чувствителен к свободным ROS, триптофан более чувствителен к индуцированному светом окислению. Степень чувствительности частично определяется доступностью боковой цепи для растворителя; скрытые остатки менее чувствительны или реагируют дольше.

Образование пироглутамата представляет собой модификацию, происходящую в белках с N-концевым остатком глутамина или глутаминовой кислоты, когда боковая цепь циклизуется с N-концевой аминогруппой с образованием пятичленной кольцевой структуры. Поскольку многие легкие и тяжелые цепи антител имеют N-концевой остаток глутамина или глутаминовой кислоты, образование пироглутамата является обычной модификацией, особенно для последовательностей с N-концевым глутамином. N-концевая циклизация вызывает неоднородность массы и заряда, которую необходимо контролировать и отслеживать. Образование пироглутамата обычно обнаруживается в антителах с N-концевым глутамином. Превращение глутаминовой кислоты в пироглутамат вряд ли представляет угрозу для безопасности, однако N-концы в антителах расположены проксимально относительно CDR, и изменение заряда может влиять на аффинность связывания.

Сокращения

CDR Область, определяющая комплементарность

Fc Кристаллизуемый фрагмент антитела

FR Каркасная область

FRx Каркасная область x (FR1, FR2, FR3, FR4)

Hx CDRx, тяжелая цепь (H1, H2, H3)

H:Ala11 Аланин тяжелой цепи в порядковом положении 11

IgG Иммуноглобулин G антитела

Lx CDRx, легкая цепь (L1, L2, L3)

L:Ala11 Аланин легкой цепи в порядковом положении 11

pI Изoeлектрическая точка

VH Вариabельный домен, тяжелая цепь

VL Вариabельный домен, легкая цепь

РЕЗУЛЬТАТЫ

Карта уязвимости последовательности

Две карты последовательности, показанные на Фигуре 24 и на Фигуре 25, показывают схематическое представление местоположений всех идентифицированных уязвимостей последовательности. На этих диаграммах положения границ доменов и CDR указаны относительно общей последовательности. Схема используется для обозначения вида уязвимости, обнаруженной на данном положении. Остатки аспарагина, предположительно участвующие как в дезамидировании, так и в N-гликозилировании,

указаны с использованием обеих схем. Все указанные остатки как на Фигуре 24, так и на Фигуре 25 представляют потенциальные проблемы для разработки стабильного состава для настоящего антитела.

В этом разделе основное внимание уделяется прогнозируемой агрегации и наиболее важным проблемам разработки для H1L5.

Результат прогнозирования риска агрегации антител представлен в Таблице 13.

Потенциальные проблемы, связанные с разработкой, обобщены в Таблице 14, в которой представлены сайты, которые могут быть особенно проблематичными для дизайна состава в процессе разработки.

Таблица 13 Прогноз агрегации

Результаты	Комментарий
Низкий риск	Прогнозируется, что антитело имеет некоторый риск агрегации

Таблица 14 Потенциальные проблемы при разработке

Цепь	Аминокислота и положение	Комментарий
L (легкая)	L: Asn92	CDR L3 аспарагин с потенциалом дезамидирования
H (тяжелая)	H: Met34	CDR H1 Метионин с потенциалом окисления
H	H: Trp55	Скрытый CDR H2 триптофан с потенциалом окисления
H	H: Asp74	Кислоточувствительная пептидная связь аспартил-пролин, потенциальный сайт расщепления цепи остова. Сайт модификации расположен в FR3 (каркасная область 3) и является необычным.
H	H: Asp88	Кислоточувствительная пептидная связь аспартил-пролин, потенциальный сайт расщепления цепи остова. Сайт модификации находится в FR3 и является необычным
H	H: Met105	CDR H3 метионин с потенциалом окисления
H	H: Lys448	Цепь, подверженная гетерогенности из-за С-концевого расщепления

Ясно, что существовало несколько факторов риска, которые потенциально могли дестабилизировать антитело во время дальнейших усилий по разработке состава.

На второй стадии антитело H1L5 было сконструировано для каркаса IgG4, как описано в настоящем описании в другом месте, и затем было обозначено как CTL-002. С помощью каркаса IgG4 можно устранить три из указанных выше факторов риска, а именно

- 1) K448 IgG1 удаляли
- 2) N в положении 204 IgG1 заменяли на D в антителе IgG4.
- 3) S в положении 132 IgG1 заменяли на C в антителе IgG4.

Таким образом, переход от IgG1 к IgG4 устранил три потенциальных фактора риска для получения стабильного состава антител.

Тестирование термической и коллоидной стабильности

На основе знаний, полученных в ходе эксперимента *in silico*, проведенного выше, авторы изобретения выбрали первые основные составы, которые могли бы подойти для стабилизации структуры специфического антитела с проблемами, обнаруженными в эксперименте *in silico*, проведенном выше.

Хотя считалось, что иметь стабильную жидкую композицию явно предпочтительнее, было решено, что будет необходимо также включить потенциальную лиофилизированную композицию ввиду возможных проблем со стабильностью этого антитела в жидкой среде. На основании этого было принято решение о необходимости проведения теста.

- Четыре жидких состава
- Одна лиофилизированная форма
- Две разные точки pH, обе из которых были выбраны намного ниже изоэлектрической точки антитела.
- Две разные буферные системы
- Несколько разных вспомогательных веществ в разных концентрациях

Точки pH были выбраны после конкретных размышлений об определении pI антитела и с учетом потенциально наилучшего окружения для уменьшения агрегации и увеличения электростатических сил отталкивания между белковыми молекулами для данного конкретного антитела.

Это привело к следующему дизайну исследования:

Скрининг pH и ионной силы проводили в микролитровом масштабе с селективным анализом. Термическую и коллоидную стабильность изучали с помощью анализа динамического рассеяния света и собственной флуоресценции, анализа светорассеяния и микрокалориметрии, соответственно.

Таблица 15-1 Условия состава, касающиеся скрининга pH и ионной силы

Состав ID	Буфер	pH	Вспомогательные вещества
F1	20 mM гистидин	6	240 mM сахара
F2	20 mM гистидин	5,5	240 mM сахара
F3	20 mM гистидин	6	150 mM сахара, 50 mM аргинин-HCl
F4	20 mM гистидин	6	150 mM NaCl
F5	20 mM Na-цитрат	6	240 mM сахара

Таблица 15-2 Аналитическое тестирование

Параметр	Аналитический метод	Концентрация образца
Температура плавления	Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия	5 мг/мл
Температура разворачивания	Собственная флуоресценция	10 мг/мл
Проявление агрегации	Статическое светорассеяние	10 мг/мл

Константа диссоциации	Динамическое светорассеяние	1-10 мг/мл
-----------------------	-----------------------------	------------

Материалы

Лекарственное вещество (DS) CTL-002 процессировали и предоставили Lonza Biologics Plc, Slough (UK). Партию DS отправляли и хранили при температуре 2-8°C с даты прибытия до даты разделения материала на аликвоты и использования для различных исследований.

Таблица 16-1 Информация о лекарственном веществе, предоставленная производственной площадкой

Лекарственное вещество	Подробности
Название	CTL-002
Номер партии	L35404/H27 (пул из клона СТ08)
Концентрация	24,9 мг/мл
Буфер	20 мМ гистидин, pH 6
Условия хранения	2-8°C
Коэффициент экстинкции	1,428 мл.мг ⁻¹ .см ⁻¹ при 280 нм
Молекулярная масса	144539 Да

Таблица 16-2 Список химических соединений

Название материала (поставщик)	Название поставщика	Но материала (поставщика)
L-Гистидин	J.T. Baker	2080-06
L-Гистидин, Моногидрохлорид,	J.T. Baker	2081-06
Сахароза	Pfanstiehl	S-124-2-MC
Аргинин-HCl	Sigma	A5131-500G
Sodium Chloride	Sigma	S7653-1KG
Тринатрий цитрат дигидрат	Merck	1.37042.1000
Моногидрат лимонной кислоты	Sigma	C1909-500g
Раствор гидроксида натрия 50%	Honeywell Fluka	71686-1L
Очищенная вода	Собственная	n/a

Таблица 16-3 Основные расходные материалы

Название материала	Название поставщика	Кол-во материала (поставщика)
Вивапсин 6 10000 MWCO PES	Sartorius	VS0602

Таблица 16-4 Основное оборудование

Название оборудования	Модель	Производитель
Аналитические весы	XPE206 BR	Mettler Toledo
Центрифуга	5810R	Eppendorf
pH-метр	780	Metrohm
УФ/видимая область спектрофотометр	SoloVPE	C Technologies Inc
Капиллярная дифференциальная калориметрия Scanning	MicroCal VP	Malvern
Динамическое светорассеяние	DynaPro Plate Reader II	Wyatt Technology
Флуоресценция и статическое светорассеяние Ридер	UNit	Unchained Labs

Методы

Подготовка тестируемого материала

DS подвергали замене буфера в составах F2 и F3 с использованием центробежных концентраторов. Концентрацию белка контролировали в конце обработки.

Во всех составах концентрацию белка регулировали добавлением буфера для конкретного состава.

Результаты

Термостабильность

Термическую структурную стабильность белка можно оценить по температуре, при которой белок агрегирует (температура начала агрегации (T_{agr})), а также по температуре, при которой он разворачивается из нативного (свернутого) состояния в денатурированное (развернутое). Средняя точка перехода к разворачиванию, которая определяется как температура, при которой в растворе имеется равная популяция свернутых и развернутых белков, называется температурой плавления (T_{пл}) при оценке с помощью традиционных измерений DSC и температурой разворачивания (T_{разворач.}) при оценке по собственной флуоресценции. Развертывание молекул IgG представляет собой два или три перехода, отражающих развертывание Fab- и Fc-фрагментов (CH2 и CH3).

Начало агрегации определяли по светорассеянию при бл. 61-68°C для пяти образцов. Значения T_{agr} можно ранжировать следующим образом: F5 > F1-F4 > F3 > F2.

Температуры разворачивания наблюдались при температурах при бл. 64-68°C и температуры плавления при температуре при бл. 65-69°C. Оба метода дали аналогичный состав ранжирования: F5 > F1-F3 > F4 > F2.

В целом термостабильность выше при pH 6, чем при pH 5,5. NaCl снижал ее, тогда как Na-цитратный буфер улучшал.

Таблица 17-1 Результаты термостабильности

ID	Состав	Т _{агр.} [°C]	Т _{разв.} [°C] ¹	Т _{пл.} [°C]
F1	20 мМ гистидин 240 мМ сахара рН 6	65,2	66,8; 83,6	66,4; 70,3; 86,3
F2	20 мМ гистидин 240 мМ сахара рН 5,5	60,5	64,2; 80,4	63,8; 70,3; 84,4
F3	20 мМ гистидин 150 мМ сахара 50 мМ аргинин-НCl рН 6	64,5	66,6; 83,3	66,2; 70,7; 86,2
F4	20 мМ гистидин 150 мМ NaCl рН 6	65,3	64,9; 79,2	64,6; 70,3; 84,7
F5	20 мМ цитрат 240 мМ сахара рН 6	67,5	68,0; 80,8	68,9; 72,5; 85,9

Коллоидная стабильность

Постоянная диссоциации (kD) и осмотический второй вириальный коэффициент (A2) являются показателями коллоидной стабильности, которые измеряют взаимодействие из-за нековалентных сил между различными молекулами в растворе. Высокие значения kD и A2 указывают на сильные чистые отталкивающие взаимодействия, тогда как низкие значения указывают на чистые силы притяжения. В то время как можно различать чистые силы притяжения и чистые силы отталкивания по знаку для A2, это невозможно для kD. Составы, обладающие средней хорошей коллоидной стабильностью, имеют значение A2 выше $1 \cdot 10^{-4}$ моль.мл.г².

Отрицательные константы диссоциации были измерены во всех тестируемых условиях, что коррелирует со слабоотрицательными или нейтральными значениями осмотического второго вириального коэффициента и отражает склонность к слабым аттрактивным белок-белковым взаимодействиям.

Значения kD можно ранжировать следующим образом: F2 > F4 > F3 > F5 > F1.

Таким образом, коллоидная стабильность улучшается за счет снижения значения рН до 5,5.

Увеличение ионной силы с помощью NaCl, аргинин-НCl или Na-цитрата также улучшает коллоидную стабильность.

Таблица 17-2 Результаты коллоидной стабильности

ID	Состав	kD [мл/г]	A2 [моль.мл.г ²]
----	--------	-----------	------------------------------

F1	20 мМ гистидин 240 мМ сахараза рН 6	-18,2	$-6,9 \cdot 10^{-5}$
F2	20 мМ гистидин 240 мМ сахараза рН 5,5	-2,47	$2,2 \cdot 10^{-5}$
F3	20 мМ гистидин 150 мМ сахараза 50 мМ аргинин-НСl рН 6	-10,8	$-2,6 \cdot 10^{-5}$
F4	20 мМ гистидин 150 мМ NaCl рН 6	-5,03	$7,3 \cdot 10^{-6}$
F5	20 мМ цитрат 240 мМ сахараза рН 6	-11,6	$-3,1 \cdot 10^{-5}$

Таким образом, результаты определения коллоидной и термической стабильности указывают на разные направления, когда речь заходит о том, какое рН выбрать для конечного состава. В то время как рН 6 обеспечивает улучшенную термостабильность, коллоидная стабильность может ухудшиться при этом рН по сравнению с рН 5,5.

Потенциально это может оказать негативное влияние на стабильность окончательного состава, если только негативное влияние на любой из двух факторов (термическую и коллоидную стабильность, соответственно) при выборе одного значения рН, а не другого, не удастся перевесить путем тщательного выбора других компонентов состава.

Разработка состава на ранней стадии

Еще раз, принимая во внимание результаты, полученные в ходе проведенных до сих пор экспериментов, было решено продолжить использование жидких и лиофилизированных составов.

В этом дополнительном наборе составов авторы изобретения, наконец, пришли к трем составам (двум жидким и одному лиофилизированному), которые должны были быть испытаны в определенных стрессовых условиях. Целевая концентрация антитела была установлена на уровне 25 мг/мл.

Антитело для стабилизации согласно настоящему описанию, представляет собой CTL-002, как определено в другом месте настоящего описания.

Таблица 18-1 Композиции оцениваемых составов

CTL-002_S6_FOR_F1	25 мг/мл	20 мМ His/HCl	рН 5,5	150 мМ Сахароза	50 мМ L-Аргинин-HCl	0,02% масс./об. PS20	2,4 мл	Жидкость
-------------------	----------	---------------	--------	-----------------	---------------------	----------------------	--------	----------

CTL-002_S6_FOR_F2	25 мг/мл	20 mM Na-цитрат	pH 6,4	240 mM Сахароза	-	0,02% масс./об. PS80	2,4 мл	Жидкость
CTL-002_S6_FOR_F3	25 мг/мл	20 mM His/HCl	pH 5,5	150 mM Сахароза	50 mM L-Аргинин HCl	0,02% масс./об. PS20	2,4 мл	Лиофизат
CTL-002_S6_FOR_F4	25 мг/мл	20 mM Na-Цитрат	pH 6	240 mM Сахароза	-	0,02% масс./об. PS80	2,4 мл	Жидкость

Таблица 18-2 Распределение по флаконам и план тестирования для каждого состава

Жидкость	Исходная	-65°C или ниже	5°C ± 3°C	25°C ± 2°C/60% RH ± 5% RH	40°C ± 2°C/75% RH ± 5% RH
Исходная/T0	1				
Замораживание оттаивание: от 25°C до -65°C, 5 циклов		1			
5 дней нагрузки со встряхиванием [@]			1	1	
4 недели				1	1
8 недель			1	1	1
Резерв		1	2	2	2
Флаконы/Темп	1	2	4	5	4
Целевые флаконы	16				
лиофилизация	Исходная	-65°C или ниже	5°C ± 3°C	25°C ± 2°C/60% RH ± 5% RH	40°C ± 2°C/75% RH ± 5% RH
Исходная/T0	3				
4 недели					1
8 недель			1	1	2
Резерв		1	3	2	3
Флаконы/Темп	3	1	4	3	6
Целевые флаконы	17				

@ нагрузка на тряску, выполненная при температуре окружающей среды и низкой температуре, как описано в разделе «Методы»

Таблица 18-3 План аналитического тестирования для каждого состава

[illegible]

Появление и цвет Лиофилизата²		×							×	×	×
Содержание остаточной влаги Лиофилизата		×							×	х	×

1: только для лиофилизированного состава

2: только для лиофилизированного состава

Материалы

Нерасфасованное очищенное лекарственное вещество (BPDS) CTL-002 поставлялось в концентрации примерно 25 г/л.

Таблица 19-1 Вспомогательные вещества и первичные упаковочные материалы

Название материала (поставщик)	Название поставщика	Кол-во материала (поставщик)
L-Гистидин, USP, мультикомпендиальный	SAFC	H3911
L-Гистидин, моногидрохлорид, FCC, мультикомпендиальный	SAFC	H4036
Сахароза, NF, мультикомпендиальная, Высокой степени чистоты (Низкое содержание эндотоксинов)	Pfanstiehl	S-124-2-MC
Тринатрий цитрат дигидрат, мультикомпендиальный	Merck	1.37042.1000
Моногидрат лимонной кислоты, мультикомпендиальный	Merck	1.00243.1000
L-Аргинин гидрохлорид	Sigma Aldrich	A5131
Полисорбат 20, N.F., мультикомпендиальный. TWEEN 20 HP-LQ-(MH)	J.T. Baker	4116-04
Полисорбат 80, NF, мультикомпендиальный, (полиоксиэтилен (80) сорбитанмоноолеат) CRILLET 4HP	J.T. Baker	4117-04
Хлороводородная кислота, NF, мультикомпендиальная	Sigma Aldrich	320331
Гидроксид натрия 1N	Fluka	71686.00
6R Schott Флаконы SL/NBE трубчатый Fiolax® Чистоты Типа I	SCHOTT France Pharmaceutical Systems или Adelphi Healthcare	AC1063

	Packaging	
20мм Flurotec® Заглушка с инъекционной мембраной	West pharmaceutical service или Adelphi Healthcare Packaging	7001-8022 or INJ20TB3WRS
20мм Flurotec® заглушка при лиофилизации		7001-9820 or FD20TT3WRS
20мм True Edge® колпачок с отрывной накладкой (No text) Royal Blue	West pharmaceutical service	AC1072

Таблица 19-2 Основные расходные материалы

Название материала	Название поставщика	Кол-во материала (поставщик)
Белковый концентратор 30000 MWCO, PES мембрана	Pierce	88536
Filter Stericup 0,22 мкм, PVDF мембрана	Millipore	SCGVU05RE/ScGVU02RE

Условные обозначения: поливинилиденфторид PVDF, полиэфирсульфон PES.

Таблица 19-3 Основное оборудование

Название оборудования	Модель	Производитель
Центрифуга	5810R	Eppendorf
Лиофилизатор	LyoStar 3 FTS system	SP Scientific
Шейкер/s	KS 15B Control	Edmund Buhler
Морозильник -65°C и ниже	Ultralow Dual, MDFU700VX-PE	Panasonic
Стабильность 5°C ± 3°C	n/a	cold room A7-47
Камера для исследования стабильности 25°C ± 2°C/60% RH ± 5% RH	KBF 720	Binder
Камера для исследования стабильности 40°C ± 2°C/75% RH ± 5% RH	KBF 720	Binder

Образцы всех составов маркировали и хранили при температуре 5±3°C до распределения для исследований стабильности.

Тестируемый образец жидкого состава подвергали в горизонтальном положении встряхиванию в течение примерно 5 дней при комнатной температуре и в условиях

низкой температуры в возвратно-поступательном (горизонтальном) шейкере с заданной скоростью 200 об/мин.

Тестируемый образец жидкого состава подвергали в вертикальном положении пяти циклам замораживания/оттаивания при температуре от -65°C или ниже до комнатной температуры.

Флаконы с лиофилизированным составом восстанавливали с использованием 2,3 мл очищенной воды. Объем для восстановления рассчитывали с учетом вытеснения объема твердыми веществами. После восстановления флаконы осторожно перемещали для обеспечения завершения восстановления и использовали для дальнейшего анализа.

Результаты

Составы после смешивания

Определяли pH, концентрацию белка и осмоляльность смешанных растворов для жидких (F1, F2 и F4) и лиофилизированного (F3) составов после смешивания и фильтрации. Результаты представлены в Таблице 20. Для завершения также включена концентрация белка, определенная с помощью УФ-спектрофотометра (A280) в начальный момент времени во время краткосрочного исследования стабильности.

Все результаты близки к целевым значениям pH

Смешанные растворы были бесцветными (BY7) и практически не содержали видимых частиц после смешивания и фильтрации.

Таблица 20. Результаты характеристики составов после смешивания

Тест	Составы CTL-002_S6_FOR_			
	F1	F2	F3	F4
pH ^a	5,5	6,4	5,6	6
Осмоляльность по температуре заморзания [мОсм/кг] ^a	328	337	306	367
Концентрация белка ^a [мг/мл]	25,5	25,5	26,2	23,1

^aзначения взяты из результатов T0

Исследования замораживания-оттаивания и встряхивания

Все составы, кроме F3, подвергнутые 5 циклам замораживания-оттаивания (от -65°C до комнатной температуры) или встряхиванию при температуре окружающей среды и при низкой температуре, не показали каких-либо существенных изменений ни в одном из аналитических методов по сравнению с исходными ненагруженными образцами, что указывает на то, что составы эффективно стабилизировали молекулу CTL-002 как против замораживания-оттаивания, так и против стресса при встряхивании.

Для всех жидких составов существенных различий в агрегации и фрагментации не наблюдалось с помощью SE-HPLC. Кроме того, с помощью iCE не наблюдали серьезной

химической деградации, а общее количество видимых и невидимых частиц было низким при встряхивании и нагрузке F/T. Данные свидетельствуют о том, что оба поверхностно-активных вещества, полисорбат 20 и 80, защищают составы при встряхивании, замораживании и оттаивании.

Исследования краткосрочной стабильности

В целом pH и концентрация белка оставались стабильными во всех четырех протестированных составах в течение краткосрочного тестирования стабильности до 8 недель. Тестирование стабильности выявило начальное низкое количество невидимых частиц для всех составов. Лиофилизированный состав F3 продемонстрировал тенденцию к более высокому уровню невидимых частиц по сравнению с жидкими составами F1, F2 и F4, что присуще восстановлению лиофилизата. Никаких существенных изменений в количестве невидимых частиц не было обнаружено во всех протестированных составах после 8-недельного хранения при любых испытанных условиях хранения. Более того, все образцы были практически свободны от видимых частиц при T0, что оценивалось при визуальном осмотре на черно-белом фоне. Только состав F4 продемонстрировал увеличение количества видимых частиц, где наблюдалось небольшое количество частиц, белых волокон, после 8-недельного хранения при 25°C. Однако это увеличение не было подтверждено при 40°C. В целом уровень видимых частиц не изменился в ходе исследований краткосрочной стабильности.

Лиофилизированный состав F3 продемонстрировал высокую стабильность. Никаких изменений в чистоте с помощью SE-HPLC, iCIEF, RP-HPLC и CE-SDS не наблюдалось в течение 8-недельного стресса на стабильность при всех испытанных условиях хранения. Однако результаты для жидких составов, в частности для состава F1, показали, что можно надлежащим образом стабилизировать антитело даже в жидкой композиции.

Молекула CTL-002 имела низкую склонность к агрегации и фрагментации во всех трех испытанных жидких составах при воздействии стресса при 40°C. Потеря мономера в результате агрегации, а также фрагментации была более выраженной в составе F1, чем в составах F2 и F4. После 8-недельного хранения при 40°C в F1 (pH 5,5) было измерено 1,2% агрегатов и 0,3% продуктов деградации, тогда как составы F2 (pH 6,4) и F4 (pH 6,0) содержали примерно 1,0-0,9% агрегатов и 0,1-0,1% 0,2% продуктов деградации. Таким образом, считается, что образование высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений зависит от pH.

Низкая мутность раствора, низкий уровень невидимых частиц и отсутствие видимых частиц, измеренные во всех испытанных составах в течение всего исследования стабильности, подчеркивали низкую склонность к агрегации. Более того, с помощью CE-SDS на основе чипов не удалось обнаружить тенденции к агрегации или фрагментации, где не наблюдалось никаких изменений в нормальных и восстанавливающих условиях.

Химическая чистота CTL-002 была изменена термическим стрессом при 40°C и в меньшей степени при 25°C, как было измерено с помощью iCIEF. Потеря основного пика

чистоты была более выраженной для составов F2 и F4, чем для состава F1, и в основном была связана с образованием кислых соединений. Только состав F1 при pH 5,5 показал, кроме того, значительное поглощение основных веществ.

Анализ RP-HPLC в не восстанавливающих условиях показал во всех жидких составах потерю основного пика с последующим увеличением количества частиц после пика при 40°C, когда при использовании RP-HPLC в восстанавливающих условиях не было замечено никаких изменений. Изменения RP-HPLC были, как и в icIEF, менее выраженными в составе F1, чем в составах F2 и F4. Состав F1, имеющий более низкое pH 5,5, продемонстрировал в целом более высокую химическую стабильность, чем составы F2 и F4.

Никаких существенных изменений в содержании полисорбата не наблюдалось во всех составах в течение всего исследования краткосрочной стабильности. Оба поверхностно-активных вещества, полисорбат 20 и полисорбат 80 подходят для состава CTL-002.

Заключения:

Лиофилизированный препарат F3 был стабилен в течение всего исследования краткосрочной стабильности.

Все жидкие составы были стабильны при замораживании/оттаивании и встряхивании, а также при хранении в течение 8 недель при 5°C. Составы F2 и F4 продемонстрировали сходные профили стабильности во всех испытанных стрессовых условиях.

Состав F1 с самым низким pH был более склонен к агрегации и фрагментации в ускоренных условиях хранения при 40°C.

Состав с самым низким pH, F1, продемонстрировал более высокую химическую стабильность, чем составы F2 и F4, при 40°C и в меньшей степени при 25°C по данным icIEF, где в стрессовых условиях, в основном, увеличивалась склонность к кислым формам, а также при 40°C. С с помощью RP-HPLC, где количество веществ в хвостовом пике увеличилось.

На основе результатов всех экспериментальных данных, собранных вместе, которые выполнялись для этого проекта состава до настоящего момента, для CTL-002 был предоставлен следующий жидкий состав:

25 мг/мл CTL-002, 20 mM гистидин/гистидин HCl, 150 mM сахароза, 50 mM аргинин-HCl, 0,02% масс./об. полисорбата 20, при pH 5,5

На данной стадии было очень трудно принять такое решение, так как данные (см. выше) казались несколько противоречивыми для химической стабильности, с одной стороны, и физической стабильности, с другой стороны. Однако авторы изобретения, собрав воедино все данные, полученные к настоящему моменту, обнаружили, что химическая стабильность будет особенно важна в контексте усилий по стабилизации этого антитела.

Долгосрочные данные

С вышеописанным составом для антитела IgG4 CTL-002 были проведены два исследования долгосрочной стабильности.

Были протестированы образцы стабильности продукта CTL-002 (при концентрации 250 мг/10 мл), хранившиеся в условиях длительного хранения при температуре $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в перевернутом и вертикальном положении.

После восемнадцати месяцев при длительном хранении при температуре $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в перевернутом и вертикальном положении продукт CTL-002 не проявляет деградации с помощью методов, выявляющих стабильность:

SE-HPLC (основной пик, фрагменты, агрегаты) и

CE-DSD (восстановленная сумма LC+HC, не восстановленный интактный IgG).

Только небольшое смещение основного пика в сторону кислых соединений показано результатами icIEF. Также может быть обнаружено снижение содержания полисорбата.

Как видно из результатов, антитело было в высокой степени стабилизировано не только в отношении параметров химической стабильности, определенных в ходе этого исследования, но, что весьма неожиданно, также в отношении его агрегационных свойств.

Последовательности

SEQ ID No: 1 (Пептидная последовательность области CDR1 тяжелой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека):

GFSLSTSGMG

SEQ ID No: 2 (Пептидная последовательность области CDR2 тяжелой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека):

IYWDDDK

SEQ ID No: 3 (Пептидная последовательность области CDR3 тяжелой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека):

ARSSYGAMDY

SEQ ID No: 4 (Пептидная последовательность области CDR1 легкой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека):

QNVGTN

Пептидная последовательность области CDR2 легкой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека:

SAS

SEQ ID No: 5 (Пептидная последовательность области CDR3 легкой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека):

QQYNNFPYT

SEQ ID No: 6 (вариабельный домен тяжелой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYW
DDDKRYNPTLKSRLTITKDPSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSSYGAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGP

SEQ ID No: 7 (вариабельный домен легкой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека):

DIVLTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRY
SGVPDRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGGTKLEIKRT

SEQ ID No: 8 (тяжелая цепь моноклонального антитела против GDF-15 человека CTL-002 без последовательности лидерного пептида):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYW
DDDKRYNPTLKSRLTITKDPSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSSYGAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID No: 9 (легкая цепь моноклонального антитела против GDF-15 человека CTL-002 без последовательности лидерного пептида):

DIVLTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRY
SGVPDRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 10 (вариабельный домен тяжелой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека H1L5):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYW
DDDKRYNPTLKSRLTITKDPSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSSYGAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 11 (вариабельный домен легкой цепи моноклонального антитела против GDF-15 человека H1L5):

DIVLTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRY
SGVPDRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Ссылки

Abulizi P, Loganathan N, Zhao D, et al. Growth Differentiation Factor-15 Deficiency Augments Inflammatory Response and Exacerbates Septic Heart and Renal Injury Induced by Lipopolysaccharide Sci Rep. 2017;7(1):1-10.

Böttner, Martina, Martin Laaff, Birgit Schechinger, Gudrun Rappold, Klaus Unsicker, and Clemens Suter-Crazzolara. 1999. «Characterization of the Rat, Mouse, and Human Genes of Growth/Differentiation Factor-15/Macrophage Inhibiting Cytokine-1 (GDF-15/MIC-1).» *Gene* 237 (1): 105-11.

Chung HK, Kim JT, Kim HW, et al. GDF15 deficiency exacerbates chronic alcohol- and carbon tetrachloride-induced liver injury. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/s41598-017-17574-w

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009 Jan;45(2):228-47.

Emmerson, Paul J., Feng Wang, Yong Du, Qian Liu, Richard T. Pickard, Malgorzata D. Gonciarz, Tamer Coskun, et al. 2017. «The Metabolic Effects of GDF15 Are Mediated by the Orphan Receptor GFRAL.» *Nature Medicine* 23 (10): 1215-19. <https://doi.org/10.1038/nm.4393>.

Hodi FS, Ballinger M, Lyons B, et al. Immune-Modified Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (imRECIST): Refining Guidelines to Assess the Clinical Benefit of Cancer Immunotherapy. *J Clin Oncol.* 2018 Mar 20;36(9):850-858.

Johnen H, Lin S, Kuffner T, et al. Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- β superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med.* 2007;13(11):1333-1340. doi:10.1038/nm1677

Kempf, Tibor, Alexander Zarbock, Christian Widera, Stefan Butz, Anika Stadtmann, Jan Rossaint, Matteo Bolomini-Vittori, et al. 2011. «GDF-15 Is an Inhibitor of Leukocyte Integrin Activation Required for Survival after Myocardial Infarction in Mice.» *Nature Medicine* 17 (5): 581-88. <https://doi.org/10.1038/nm.2354>.

Selby, Mark J., John J. Engelhardt, Robert J. Johnston, Li-Sheng Lu, Minhua Han, Kent Thudium, Dapeng Yao, et al. 2016. «Preclinical Development of Ipilimumab and Nivolumab Combination Immunotherapy: Mouse Tumor Models, In Vitro Functional Studies, and Cynomolgus Macaque Toxicology.» Edited by Aamir Ahmad. *PLOS ONE* 11 (9): e0161779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161779>.

Tong S, Marjono B, Brown DA, et al. Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage. *Lancet.* 2004;363(9403):129-130. doi:10.1016/S0140-6736(03)15265-8

Tsai, Vicky W.W., Yasmin Husaini, Amanda Sainsbury, David A. Brown, and Samuel N. Breit. 2018. «The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases.» *Cell Metabolism* 28 (3): 353-68. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.018>.

van den Boorn, Jasper G., and Gunther Hartmann. 2013. «Turning Tumors into Vaccines: Co-Opting the Innate Immune System.» *Immunity* 39 (1): 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.011>.

Vaupel, Peter. 2004. «Tumor Microenvironmental Physiology and Its Implications for Radiation Oncology.» *Seminars in Radiation Oncology* 14 (3): 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2004.04.008>.

Wang M, Yao LC, Cheng M, Cai D, Martinek J, Pan CX, et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J.* 2018;32(3):1537-49.

Welsh, John B., Lisa M. Sapinoso, Suzanne G. Kern, David A. Brown, Tao Liu, Asne R. Bauskin, Robyn L. Ward, et al. 2003. «Large-Scale Delineation of Secreted Protein Biomarkers Overexpressed in Cancer Tissue and Serum.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (6): 3410-15. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0530278100>.

Wischhusen J, Melero I, and Fridman W. GDF-15: From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Front. Immunol.* Accepted 23 Apr 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.00951.

Wollert KC, Kempf T, Giannitsis E, et al. An Automated Assay for Growth Differentiation Factor 15. *J Appl Lab Med An AACC Publ.* 2018;1(5):510-521. doi:10.1373/jalm.2016.022376

Промышленная применимость

Антитело против GDF-15 может быть использовано в способах лечения злокачественного новообразования у пациентов-людей, может быть промышленно изготовлено и продано в качестве продуктов для указанных способов и применений в соответствии с известными стандартами производства фармацевтических продуктов. Соответственно, настоящее изобретение применимо в промышленности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая антитело против GDF-15, для применения в способе лечения злокачественного новообразования и/или раковой кахексии у пациента-человека.
2. Композиция для применения по п. 1, где антитело против GDF-15 следует вводить в дозе 0,3, 1, 3, 10 или 20 мг/кг, предпочтительно 3, 10 или 20 мг/кг, более предпочтительно 10 мг/кг, и в режиме дозирования, представляющем собой по меньшей мере один цикл введения, где цикл представляет собой период в две недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.
3. Композиция для применения по п. 1, где антитело против GDF-15 вводят в дозе от 10 до 20 мг/кг, предпочтительно 20 мг/кг, и в режиме дозирования, представляющем собой по меньшей мере один цикл введения, где цикл представляет собой период в четыре недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.
4. Композиция для применения по п. 1, где антитело против GDF-15 вводят в дозе от 10 до 20 мг/кг и в режиме дозирования, представляющем собой по меньшей мере один цикл введения, где цикл представляет собой период в три недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.
5. Композиция для применения по любому из пп. 1-4, где указанное антитело не индуцирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или не индуцирует комплементзависимую цитотоксичность (CDC).
6. Композиция для применения по любому из пп. 1-5, где указанное антитело против GDF-15 представляет собой антитело изотипа IgG4.
7. Композиция для применения по п. 6, где указанное антитело содержит мутацию, стабилизирующую шарнир.
8. Композиция для применения по п. 7, где указанная мутация, стабилизирующая шарнир, представляет собой мутацию S228P.
9. Композиция для применения по любому из пп. 1-8, где указанное антитело против GDF-15 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий область CDR1, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1, область CDR2, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 2, и область CDR3, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, содержащий область CDR1, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4, область CDR2, представленную аминокислотной последовательностью ser-ala-ser, и область CDR3, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 5.
10. Композиция для применения по любому из пп. 1-9, где переменный домен тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, и переменный

домен легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

11. Композиция для применения по любому из пп. 1-10, где тяжелая цепь указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и легкая цепь указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9.

12. Композиция для применения по любому из пп. 1-11, где указанное антитело против GDF-15 можно получить путем экспрессии в клетках CHO.

13. Композиция для применения по любому из пп. 1-12, где концентрация GDF-15 в сыворотке/плазме указанного пациента составляет менее 10 нг/мл в конце цикла введения.

14. Композиция для применения по п. 13, где концентрация GDF-15 в сыворотке указанного пациента составляет менее 2 нг/мл в конце цикла введения.

15. Композиция для применения по п. 13, где концентрация GDF-15 в сыворотке указанного пациента составляет менее 0,5 нг/мл в конце цикла введения.

16. Композиция для применения по любому из пп. 1-15, где цикл представляет собой период в три недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.

17. Композиция для применения по любому из пп. 1-15, где цикл представляет собой период в четыре недели, и где указанную дозу следует вводить по меньшей мере один раз в каждом из по меньшей мере одного цикла.

18. Композиция для применения по любому из пп. 1-15, где указанный режим дозирования включает множество циклов и необязательно до 52 циклов введения.

19. Композиция для применения по п. 18, где указанный режим дозирования включает от 26 до 52 циклов введения.

20. Композиция для применения по п. 16, где указанный режим дозирования включает до 34 циклов введения.

21. Композиция для применения по п. 20, где указанный режим дозирования включает от 17 до 34 циклов введения.

22. Композиция для применения по п. 17, где указанный режим дозирования включает до 24 циклов введения.

23. Композиция для применения по п. 22, где указанный режим дозирования включает от 12 до 24 циклов введения.

24. Композиция для применения по любому из пп. 1-23, где указанное антитело против GDF-15 следует вводить в комбинации с ингибитором контрольной точки.

25. Композиция для применения по п. 24, где указанный ингибитор контрольной

точки выбран из групп, состоящих из антитела против PD-1, антитела против PD-L1 или антитела против CD40.

26. Композиция для применения по пп. 24 или 25, где указанный ингибитор контрольной точки следует вводить в том же режиме дозирования, что и антитело против GDF-15.

27. Композиция для применения по любому из пп. 24-26, где указанный ингибитор контрольной точки следует вводить до введения антитела против GDF-15.

28. Композиция для применения по п. 27, где указанный ингибитор контрольной точки следует вводить в течение 120 мин до введения антитела против GDF-15.

29. Композиция для применения по п. 28, где указанный ингибитор контрольной точки следует вводить в течение 30 минут до введения антитела против GDF-15.

30. Композиция для применения по любому из пп. 1-29, где указанное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из рака головного мозга, включая глиому, злокачественные новообразования нервной системы, меланомы, рака легких, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака печени, рака эндометрия, рака шейки матки, рака желудка, почечно-клеточной карциномы, саркомы Юинга, немелкоклеточного рака легкого и мелкоклеточного рака легкого, рака губы и полости рта, карциномы печени, лейкоза, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака тела матки, рака яичка, рака щитовидной железы, рака почки, рака желчного пузыря, множественной миеломы, рака носоглотки, рака гортани, рака глотки, рака пищевода, опухоли желудочно-кишечного тракта, включая рак желудка и колоректальный рак, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака яичников, карциномы молочной железы и карциномы неизвестного первичного происхождения, и где применение необязательно также представляет собой применение для лечения раковой кахексии.

31. Композиция для применения по любому из пп. 1-30, где указанную дозу антитела против GDF-15 следует вводить внутривенно.

32. Антитело против GDF-15, где указанное антитело представляет собой антитело изотипа IgG4, имеющее мутацию, стабилизирующую шарнир, и где переменный домен тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, и переменный домен легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

33. Антитело против GDF-15 по п. 32, где тяжелая цепь указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и легкая цепь

указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности, предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9.

34. Антитело против GDF-15 по пп. 32 или 33, где указанная мутация, стабилизирующая шарнир, представляет собой мутацию S228P.

35. Антитело по любому из пп. 32-34, где указанное антитело не индуцирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или не индуцирует комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

36. Антитело по любому из пп. 32-35, где указанное антитело можно получить путем экспрессии в клетках CHO.

37. Антитело по любому из пп. 32-36, где указанное антитело против GDF-15 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий область CDR1, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1, область CDR2, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 2, и область CDR3, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, содержащий область CDR1, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4, область CDR2, представленную аминокислотной последовательностью ser-ala-ser, и область CDR3, представленную аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 5.

38. Состав, содержащий антитело против GDF-15, как определено выше, или композиция для применения, содержащая указанное антитело, как определено выше, где указанный состав содержит 10-50 мг/мл антитела против GDF-15.

39. Состав по п. 38, где указанный состав содержит гистидин/гистидин HCl, сахарозу, аргинин-HCl и полисорбат при pH от 5 до 6.

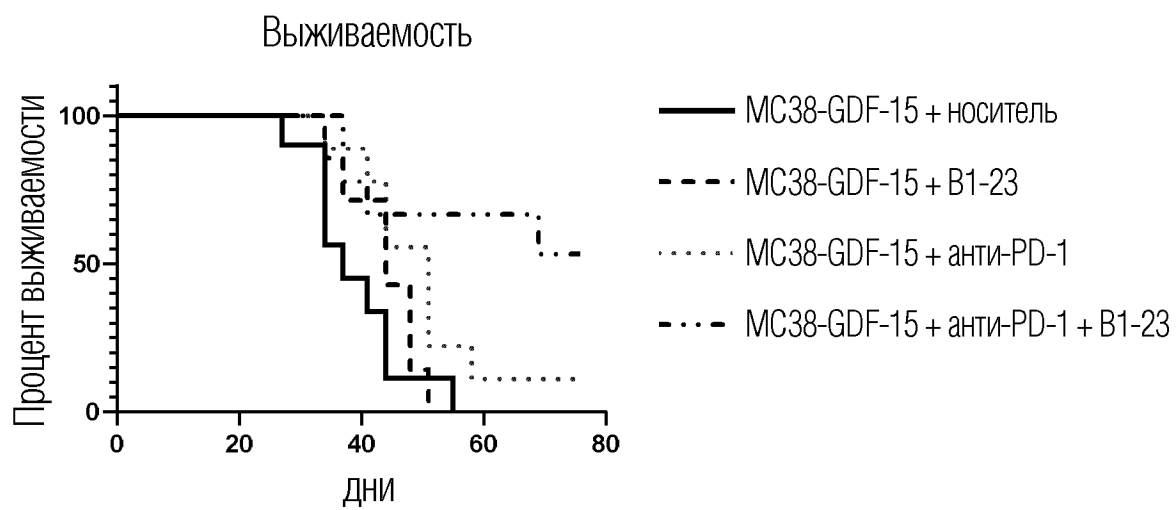
40. Состав по п. 38 или 39, где указанный состав содержит 10-50 мг/мл CTL-002, 10-50 мг/мл гистидин/гистидин HCl, 100-200 мМ сахарозы, 20-80 мМ аргинин-HCl и 0,01-0,05% мас./об. полисорбата 20 или полисорбата 80 при pH от 5 до 6, предпочтительно при pH от 5,3 до 5,7.

41. Состав по любому из пп. 38-40, который содержит 25 мг/мл CTL-002, 20 мМ гистидин/гистидин HCl, 150 мМ сахарозы, 50 мМ аргинин-HCl, 0,02% мас./об. полисорбата 20, при pH 5,5.

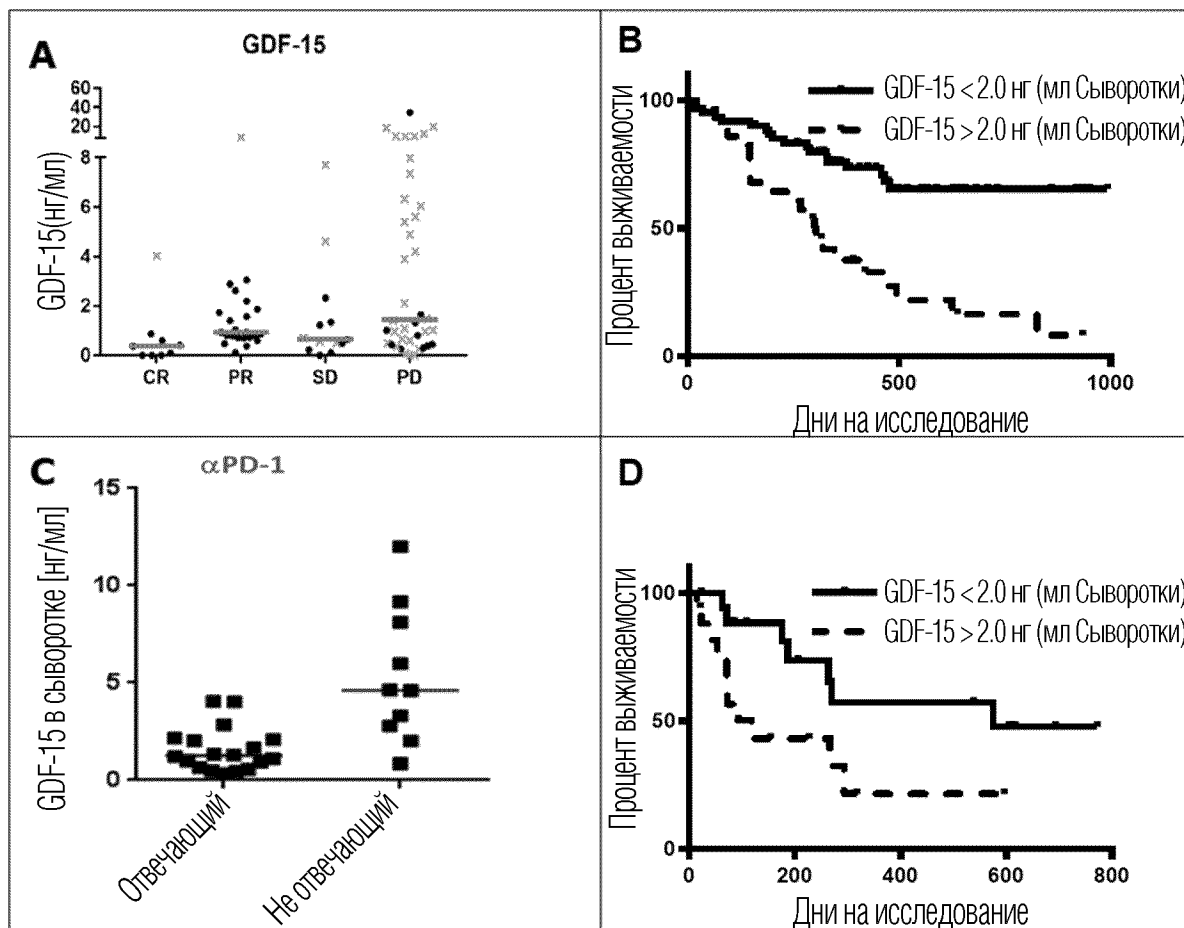
42. Состав по п. 41, который состоит из 25 мг/мл CTL-002, 20 мМ гистидин/гистидин HCl, 150 мМ сахарозы, 50 мМ аргинин-HCl, 0,02% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,5.

По доверенности

ФИГ. 1

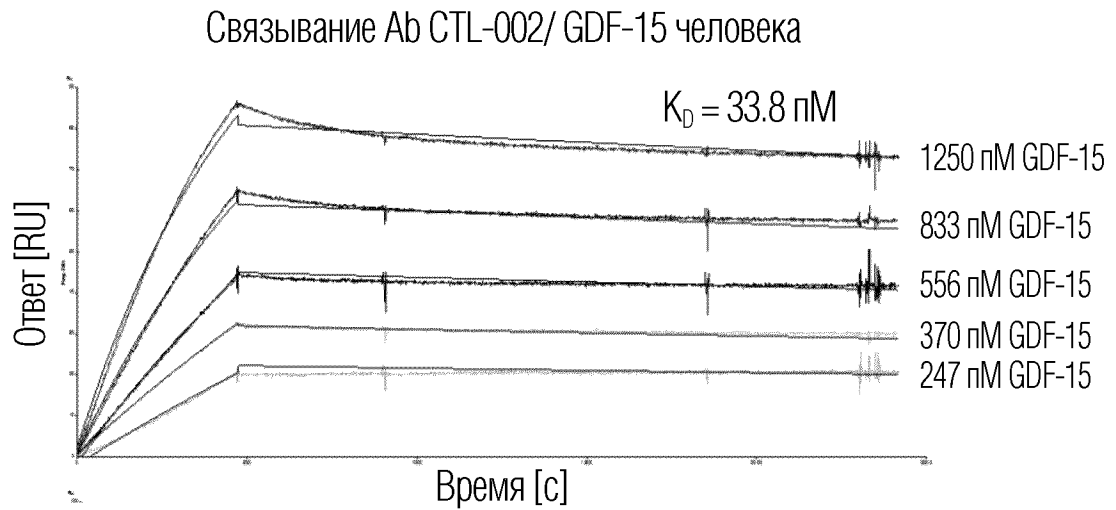


ФИГ. 2



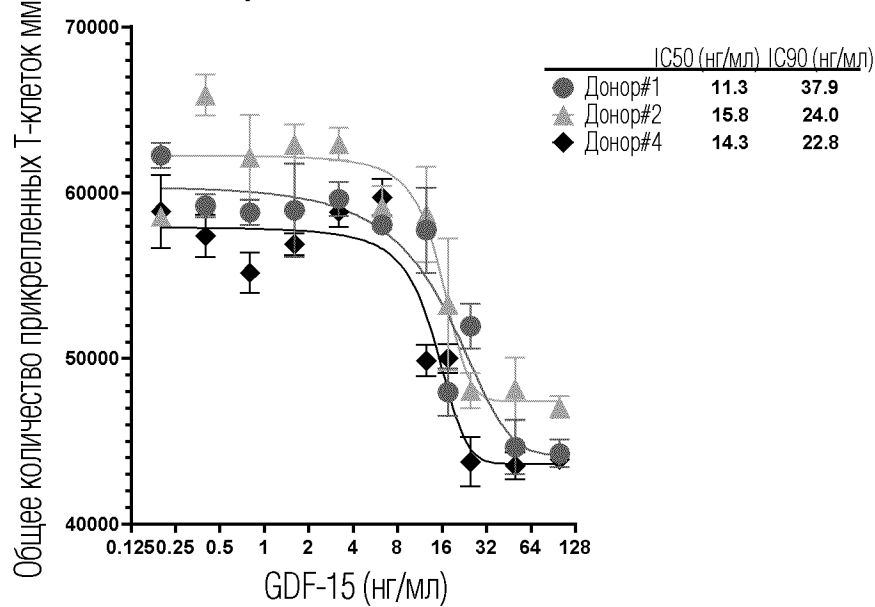
ФИГ. 3

Антиген: GDF-15 человека



ФИГ. 4

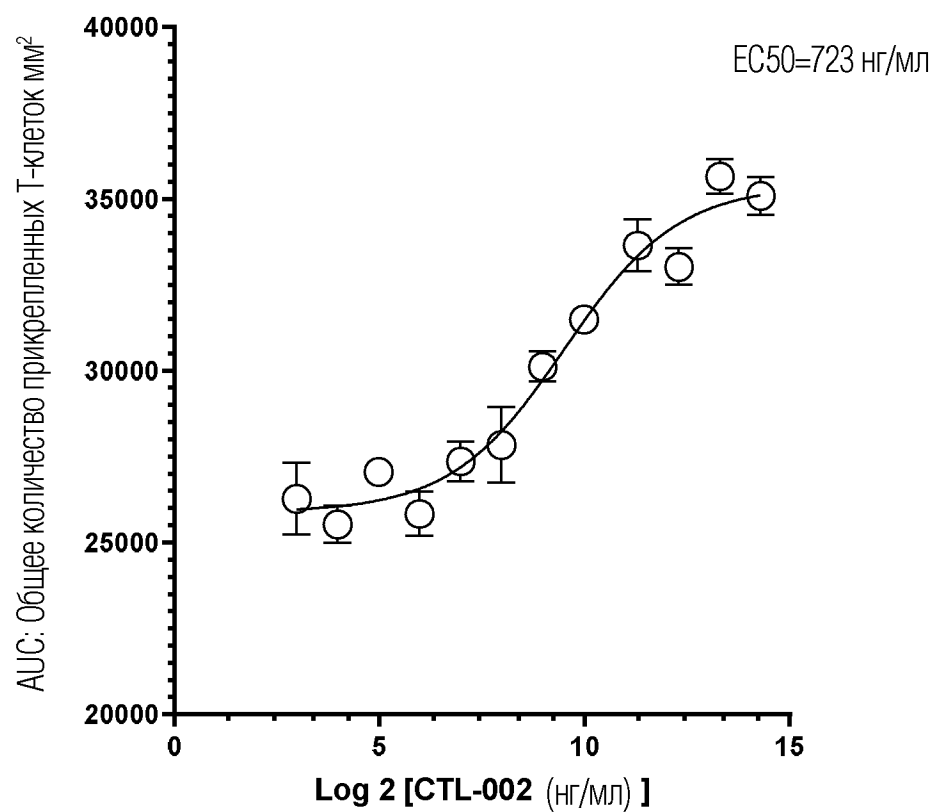
Связь между GDF-15 и Т-клеточной адгезией



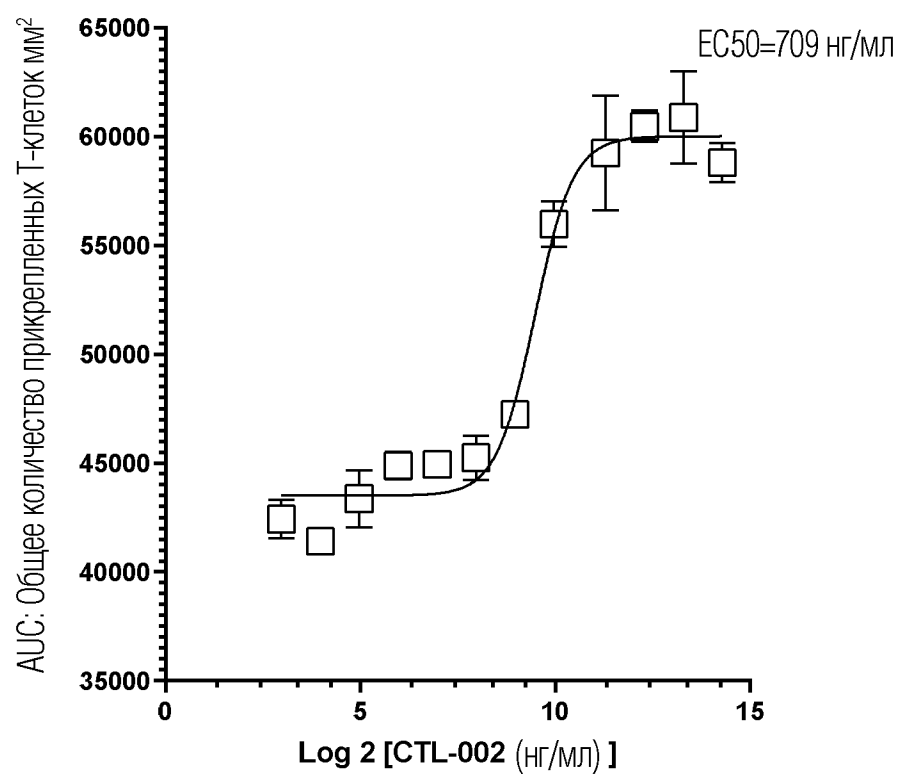
ФИГ. 5

[1/2]

MT-21-001A.3



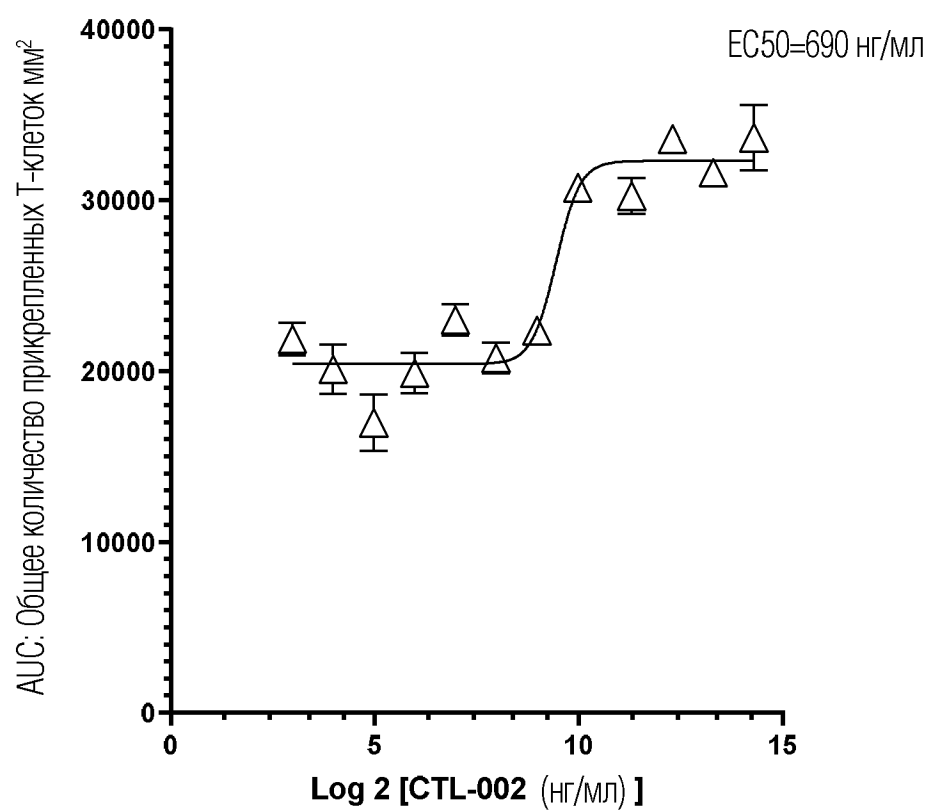
MT-21-001A.4



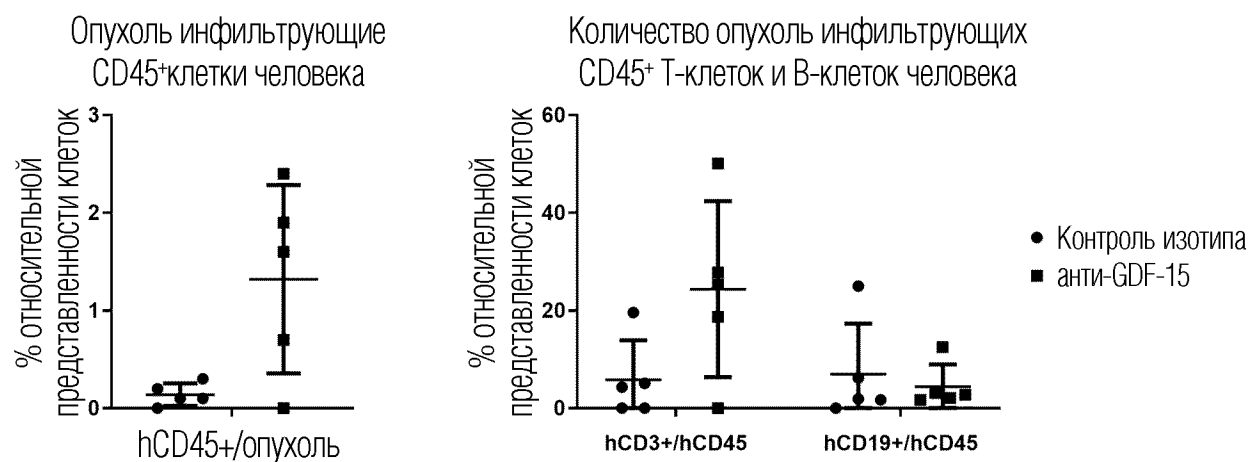
ФИГ. 5

[2/2]

MT-21-001A.2

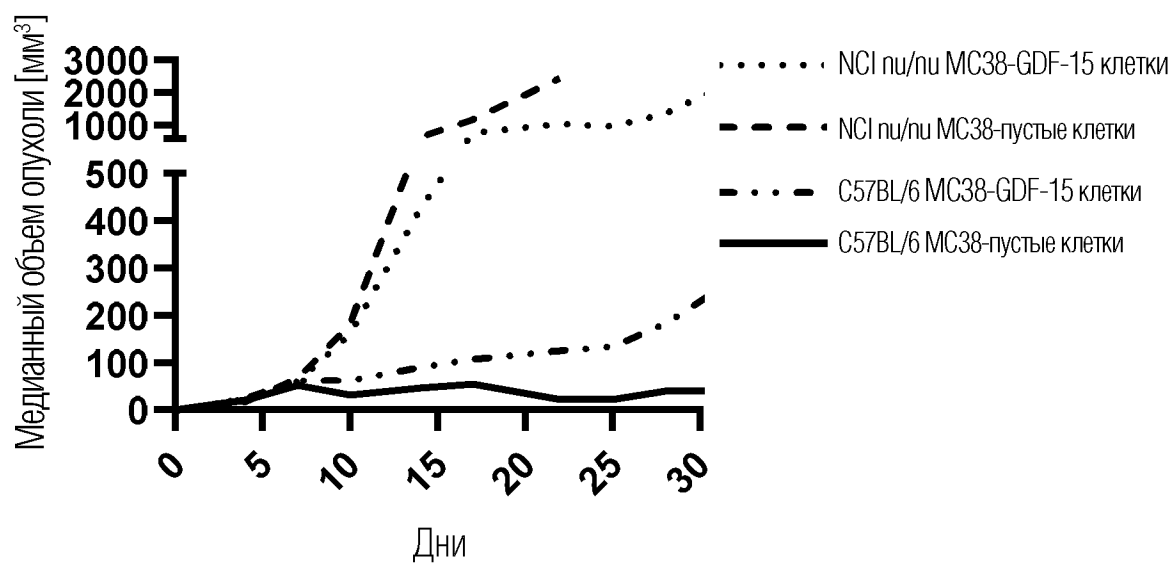


ФИГ. 6

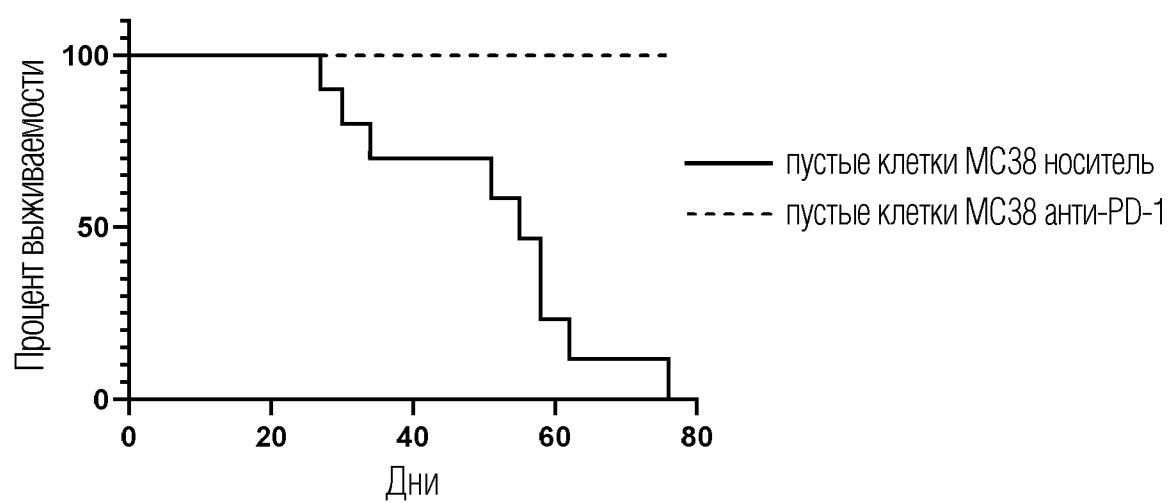


ФИГ. 7

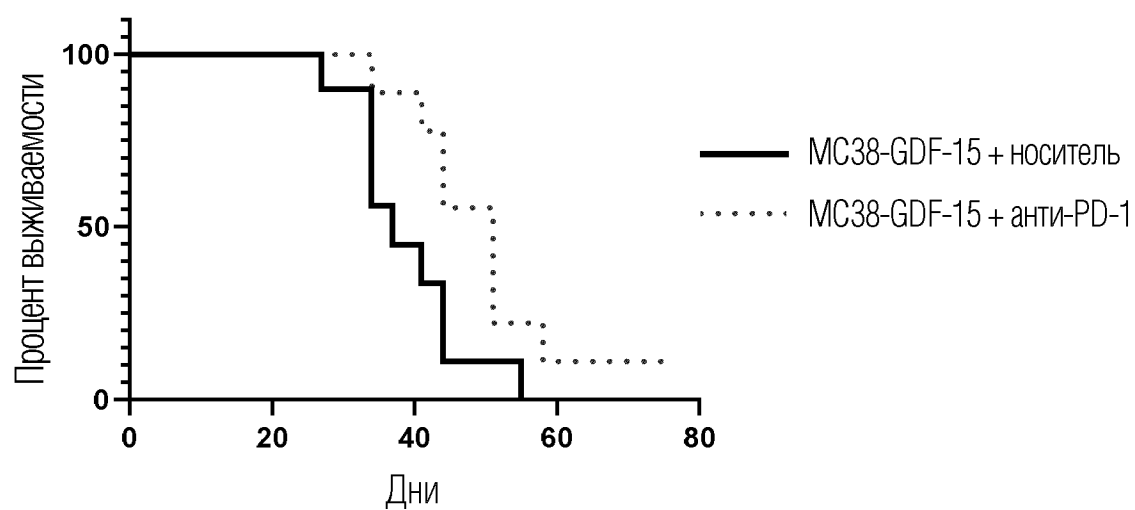
MC38 пустые и MC38-hGDF15 у иммунокомпетентных и иммунодефицитных мышей



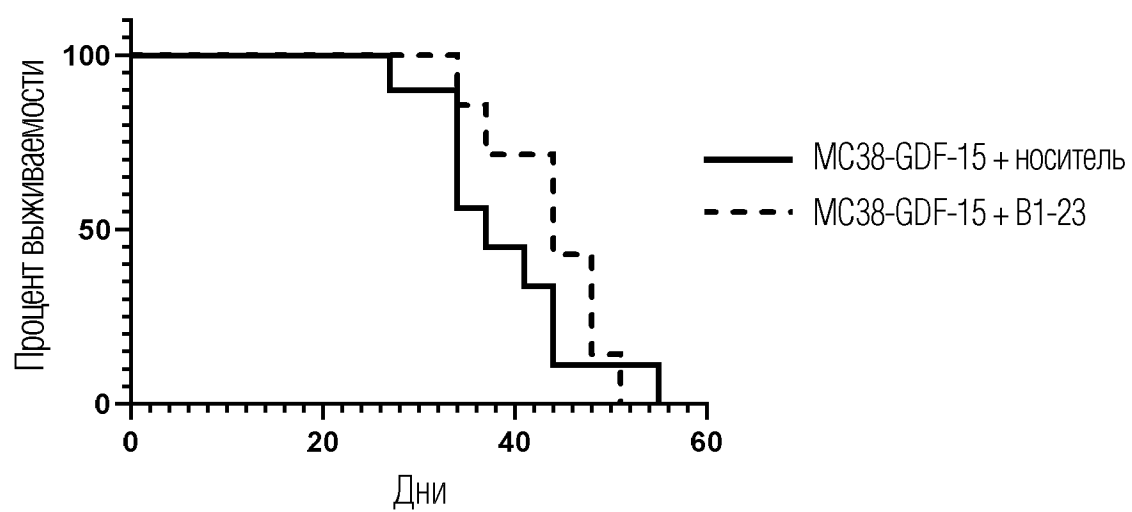
ФИГ. 8А



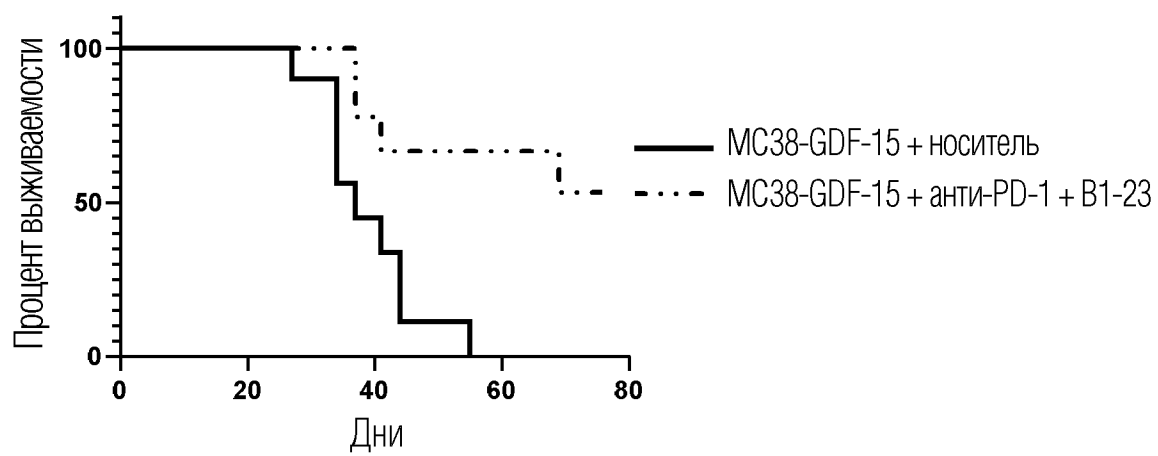
ФИГ. 8В



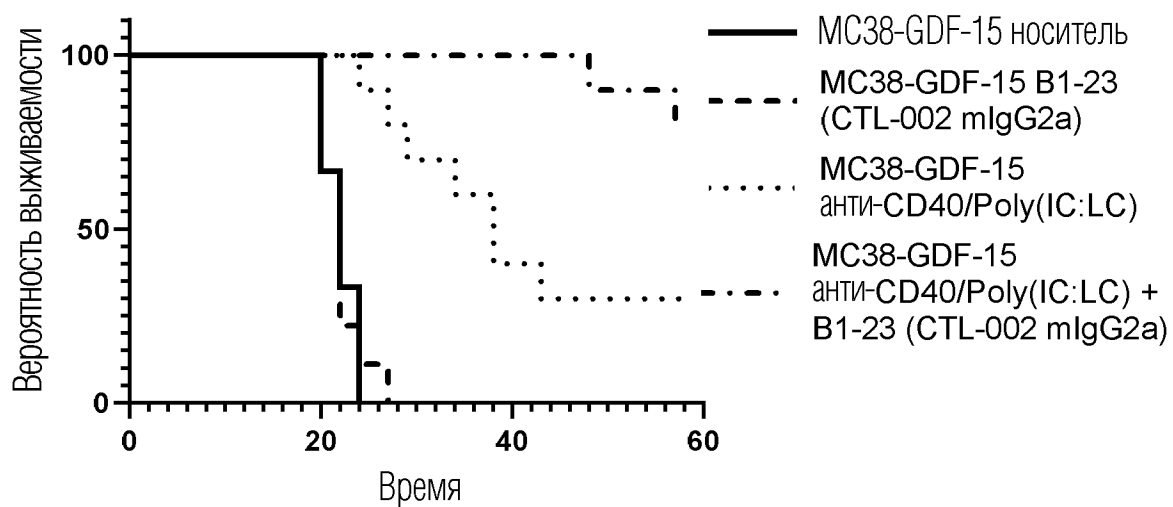
ФИГ. 9А



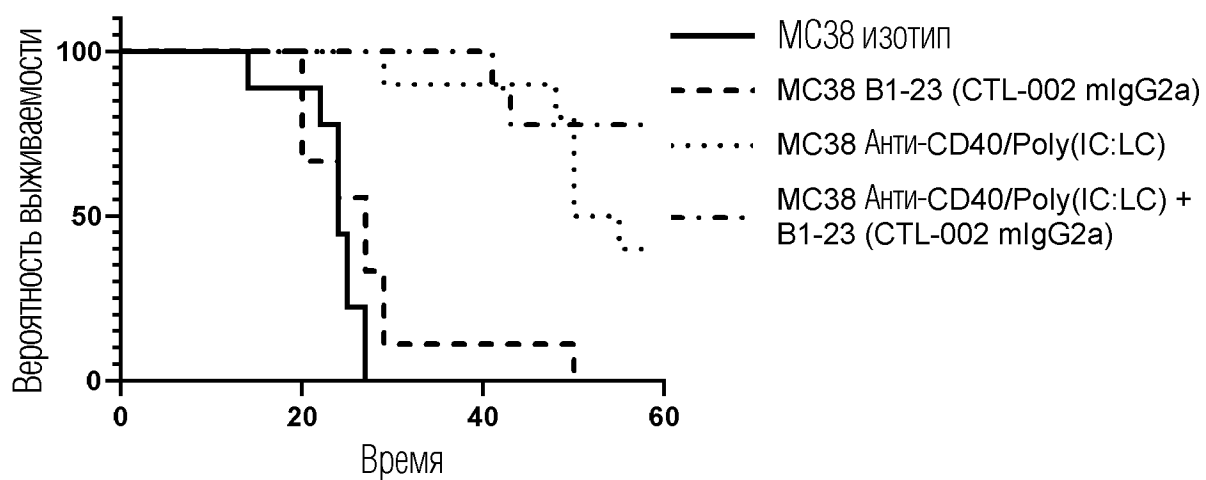
ФИГ. 9В



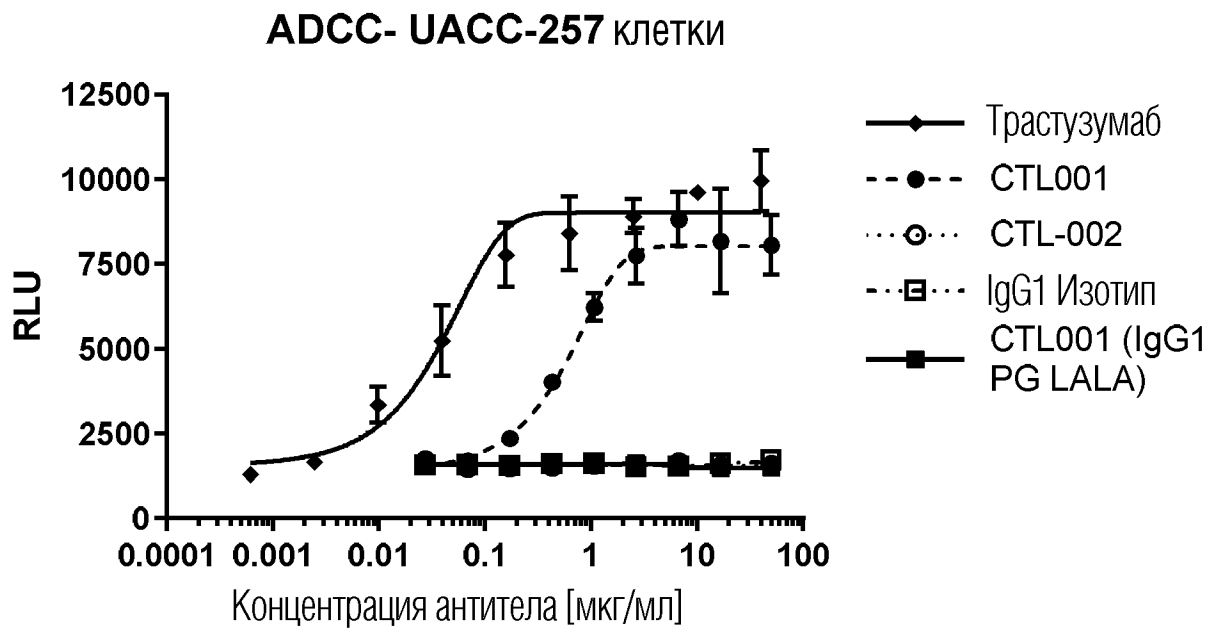
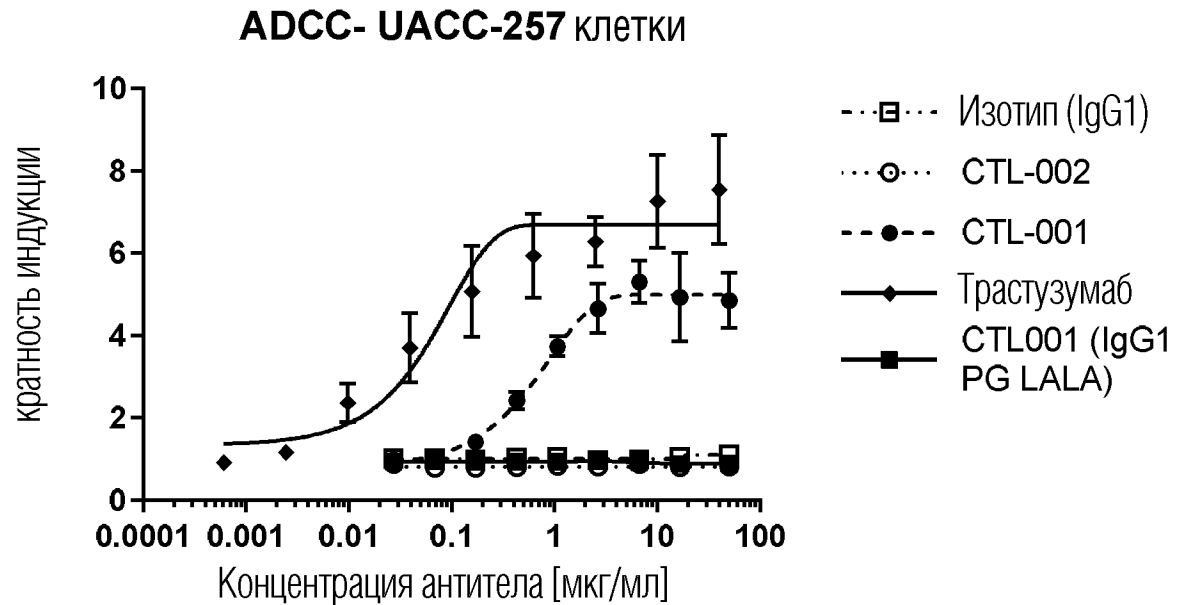
ФИГ. 10



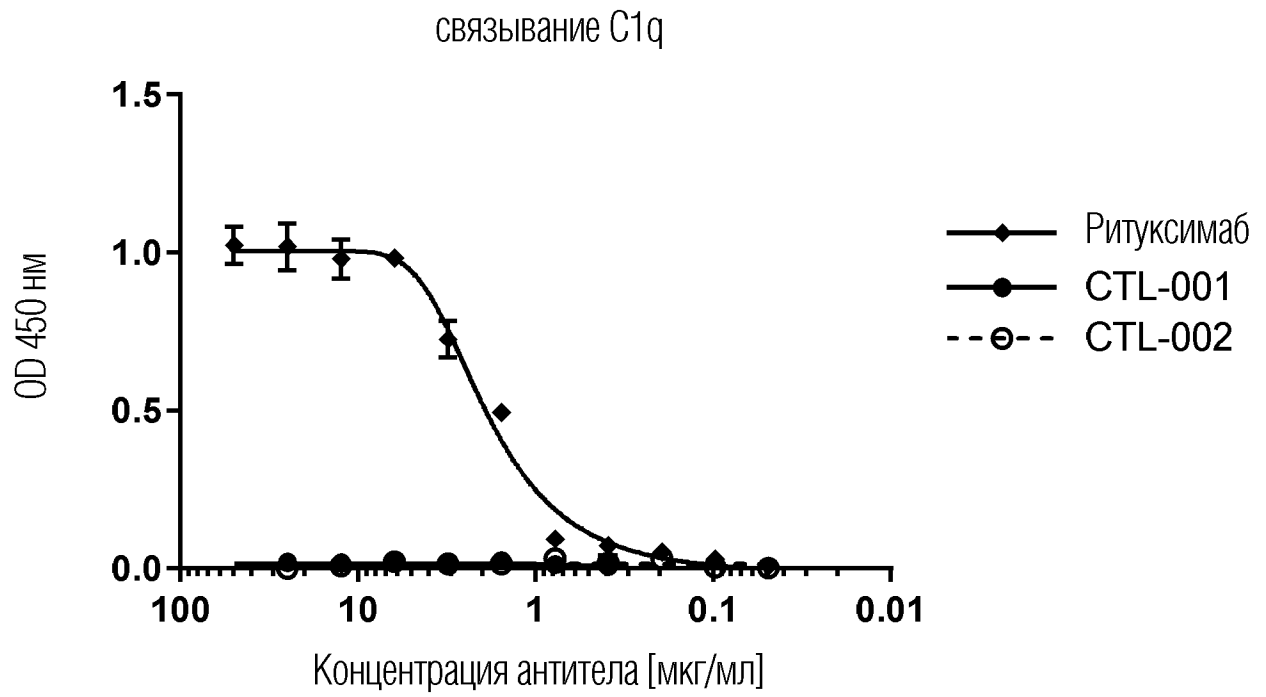
ФИГ. 11



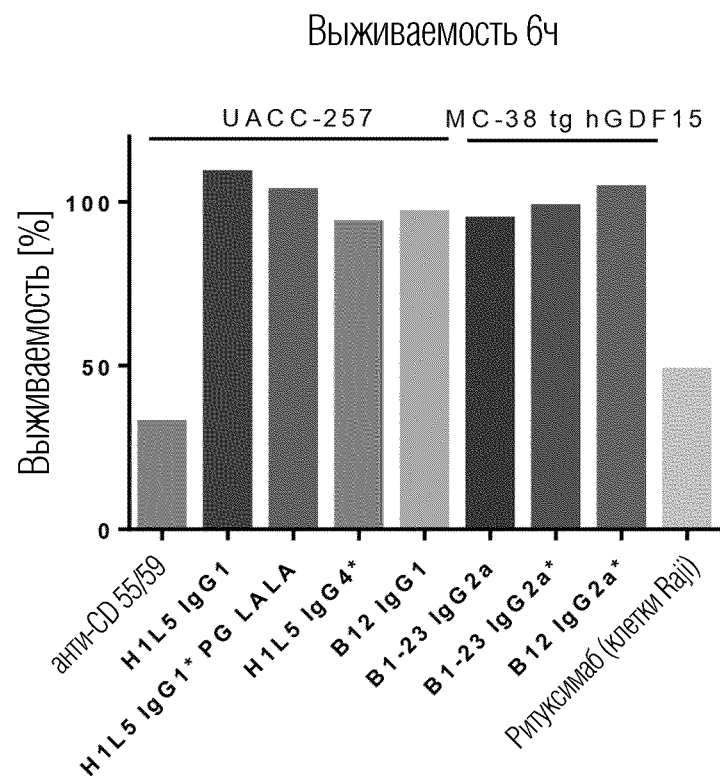
ФИГ. 12



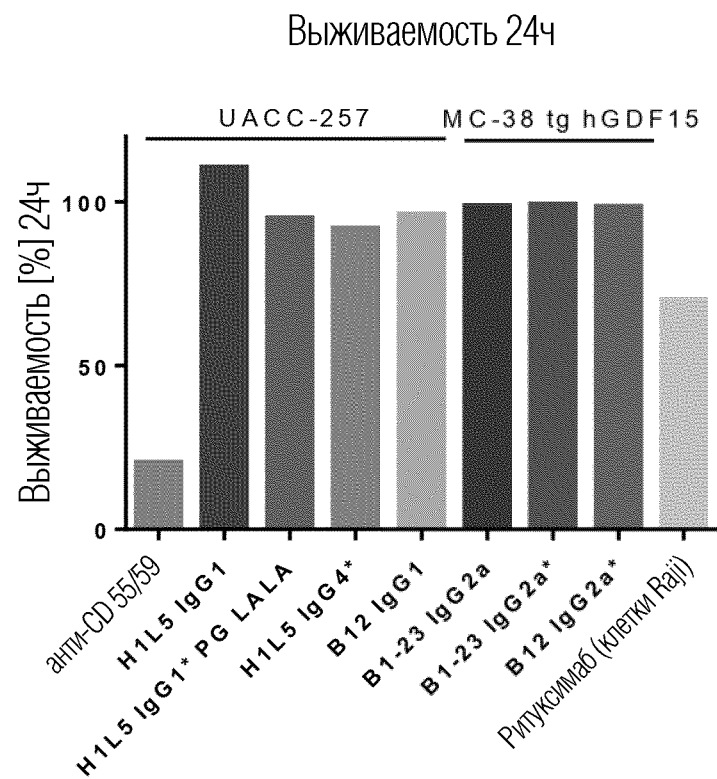
ФИГ. 13



A

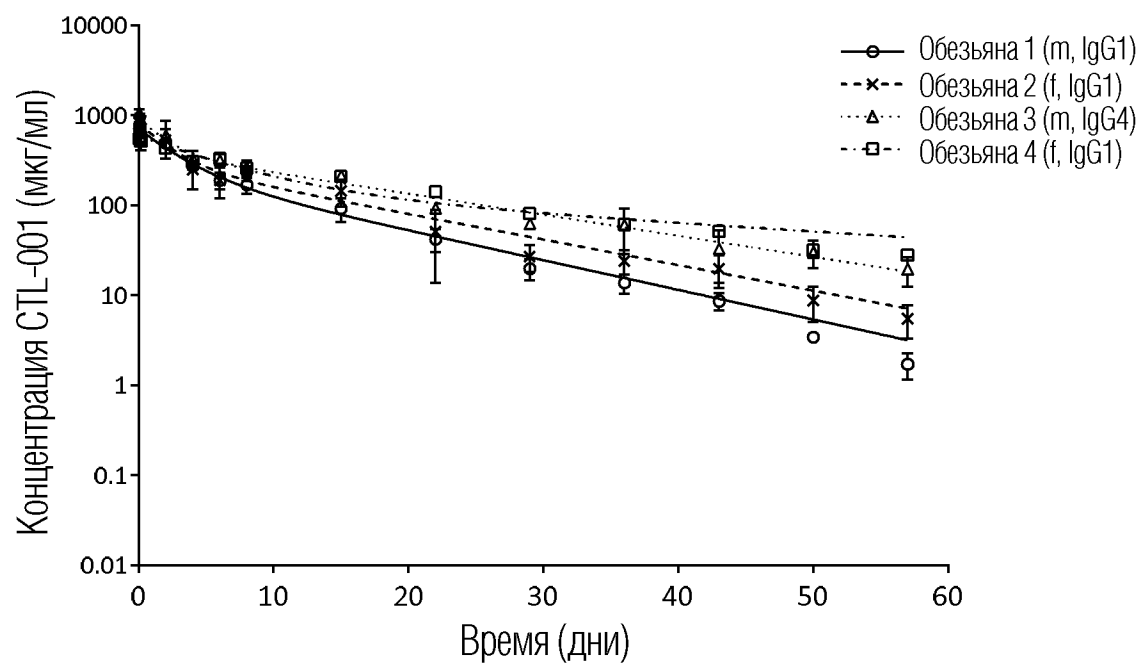


B

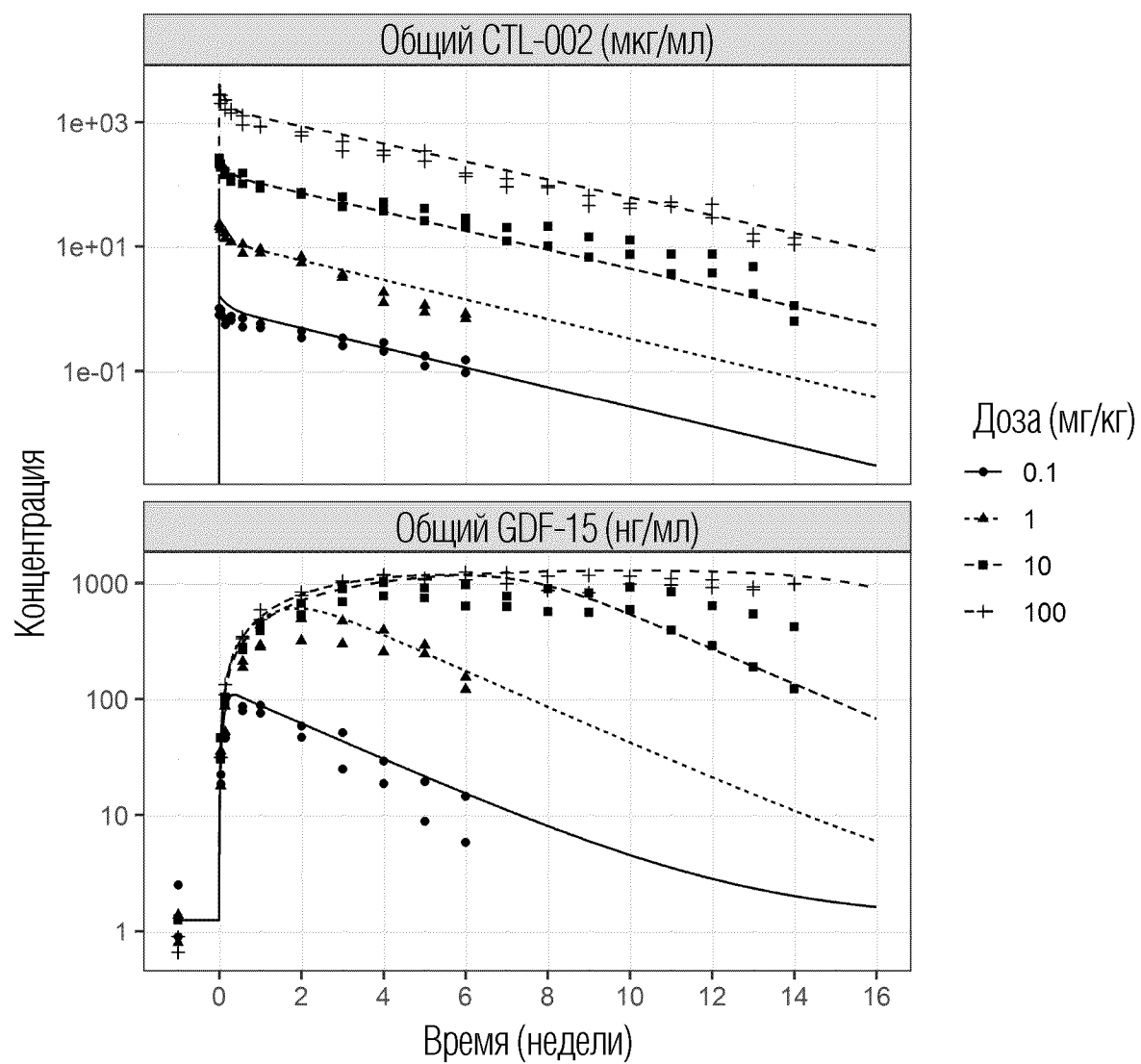


ФИГ. 14

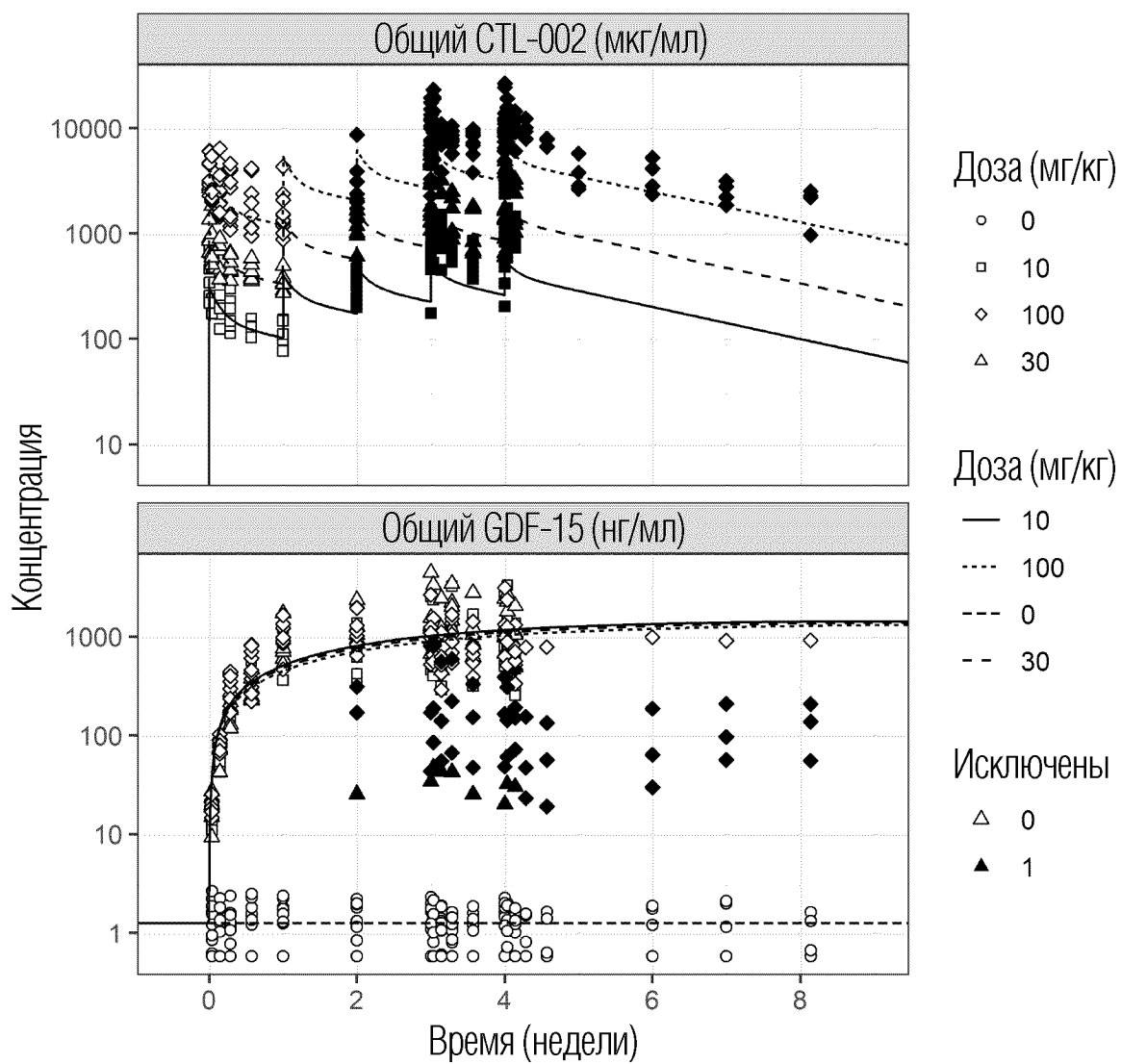
ФИГ. 15



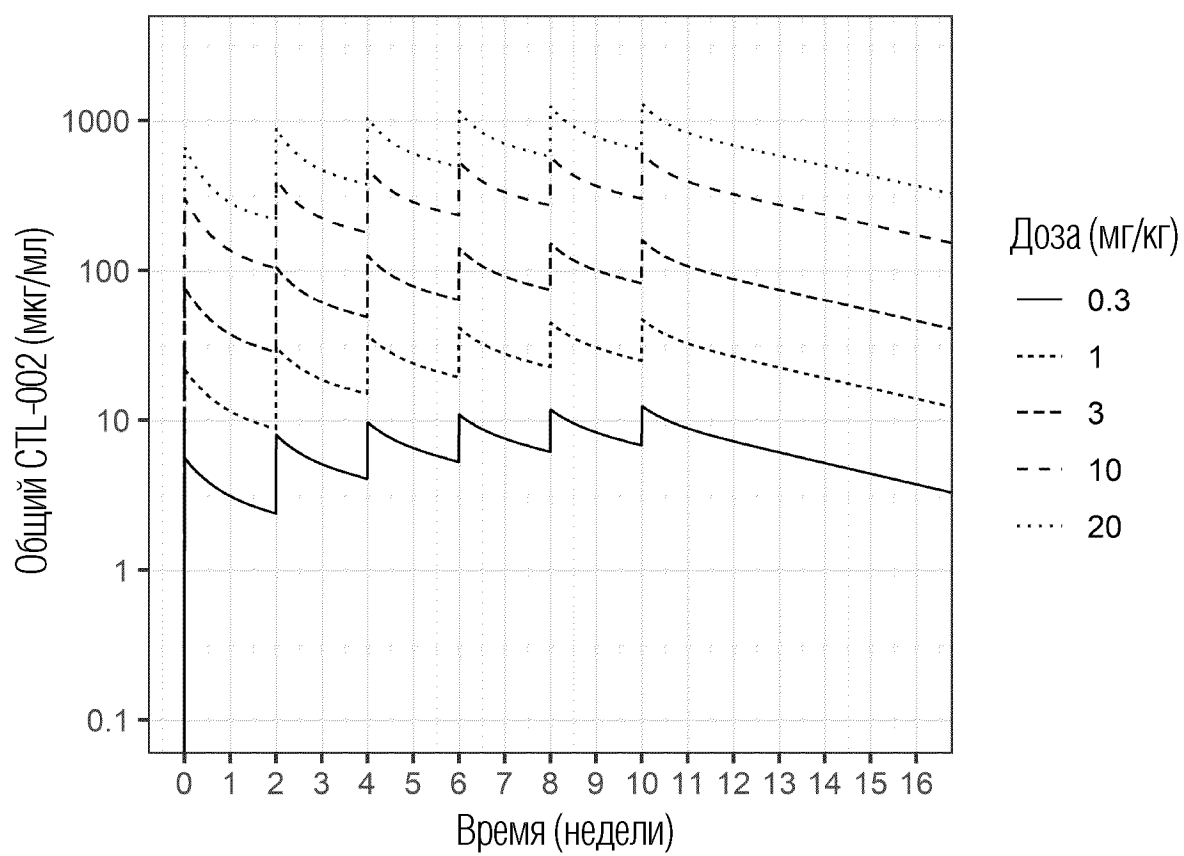
ФИГ. 16



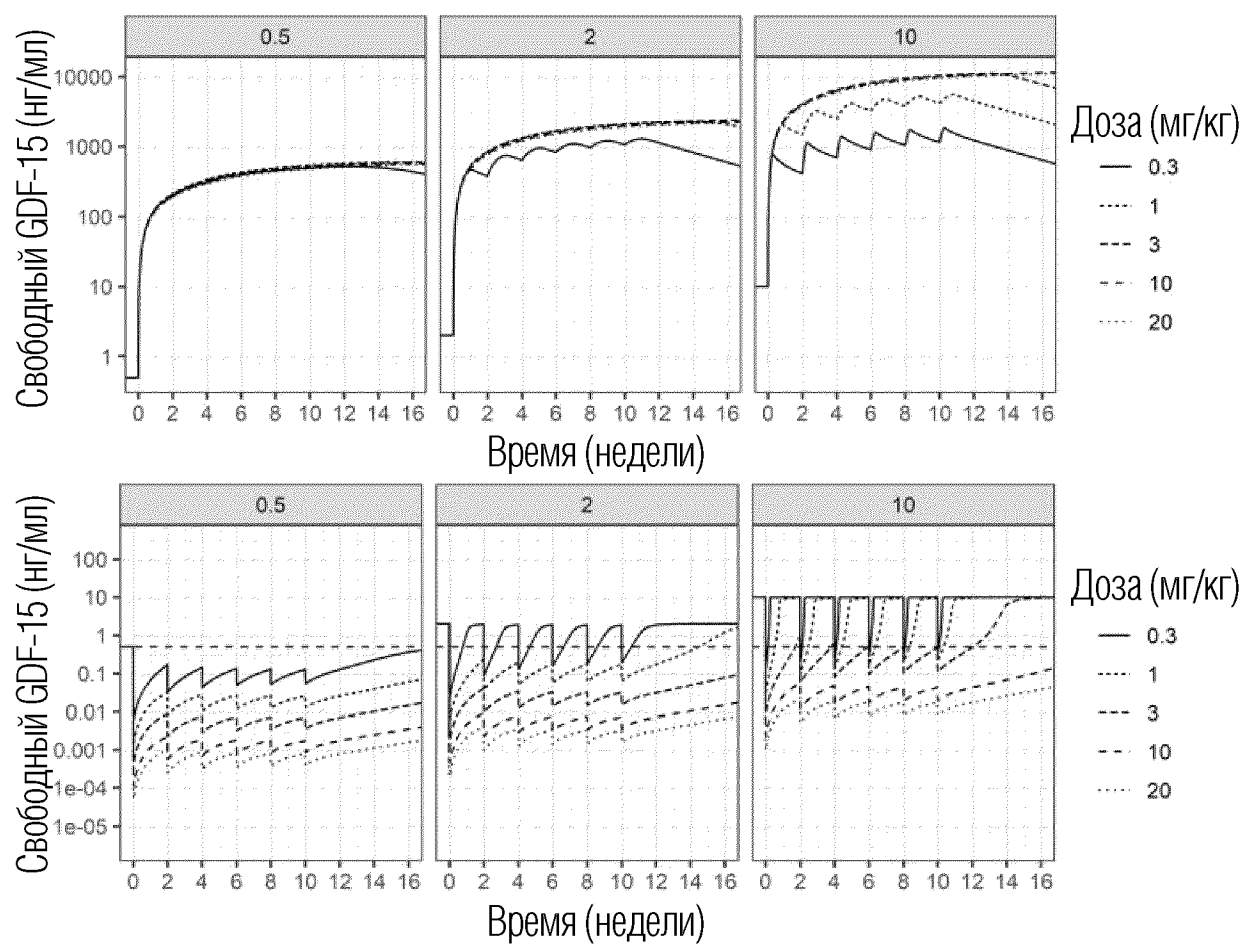
ФИГ. 17



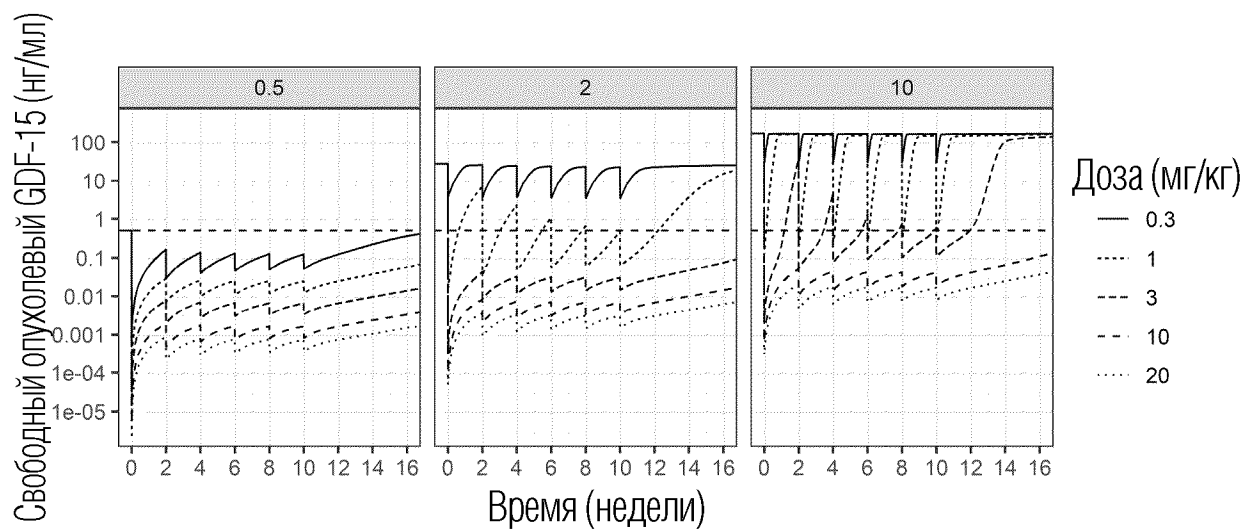
ФИГ. 18



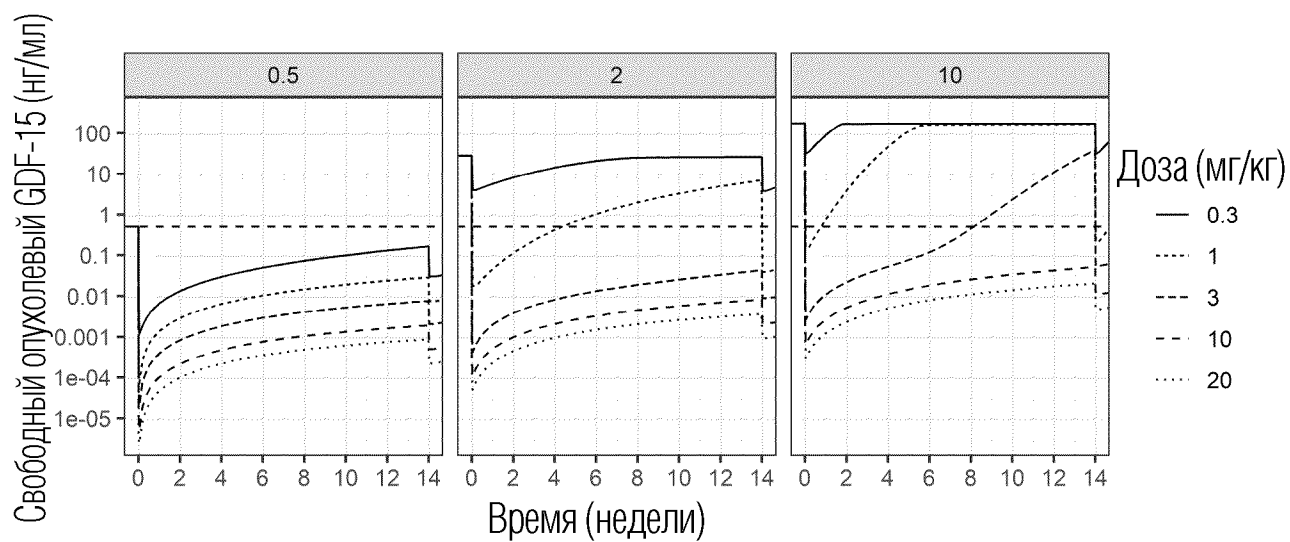
ФИГ. 19



ФИГ. 20

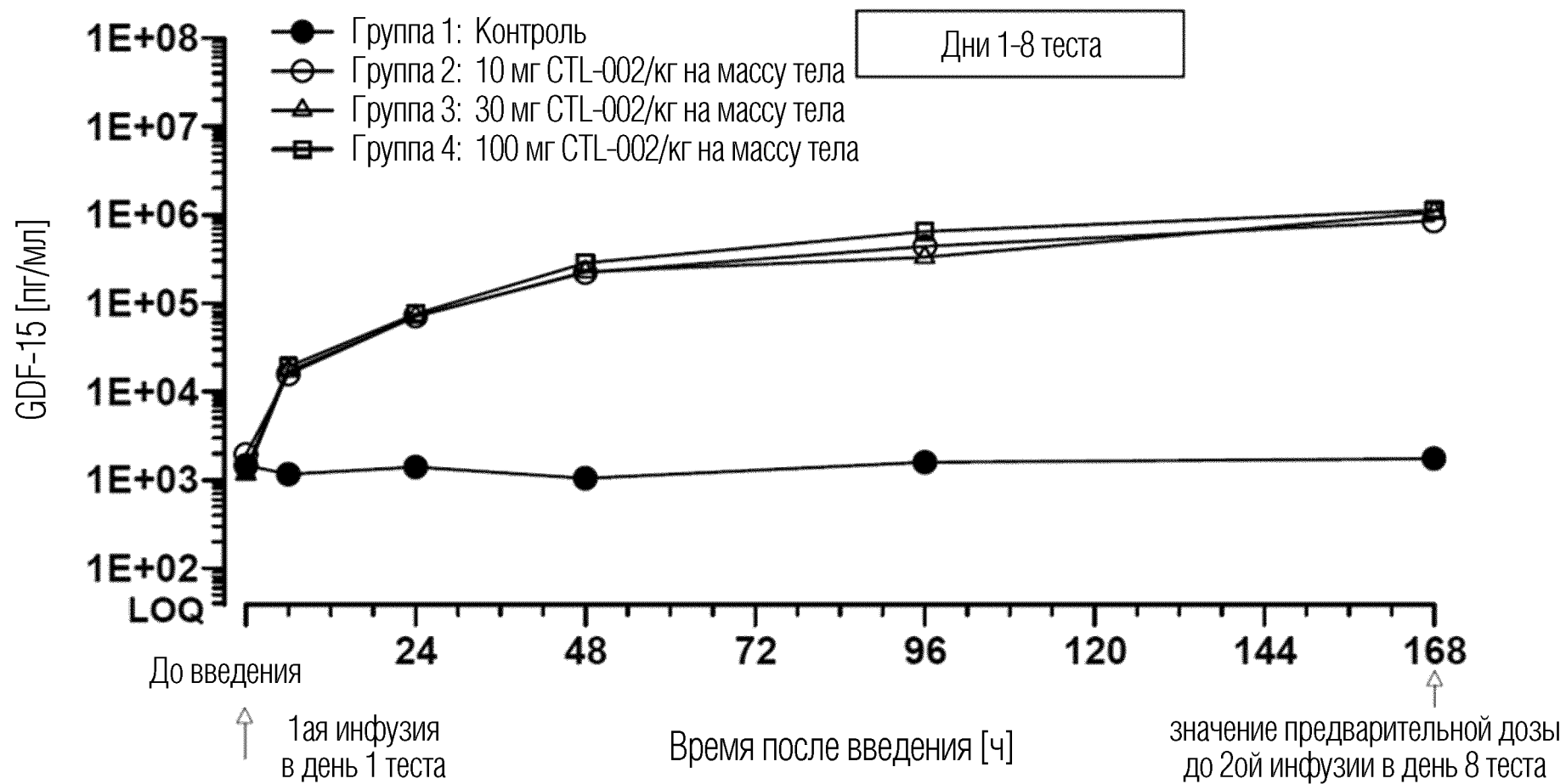


ФИГ. 21



			ЭПИТОП CTL-002 (a)		ЭПИТОП CTL-002 (b)	
>GDF-15_человек	220	LEDLGWADWVLSPR	EVQVTMCIGACPSQFR	AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQK	TDTGVSLQTYDDLLAKDCHC	I
>GDF-15_макак	220	LEDLGWADWVLSPR	EVQVTMCIGACPSQFR	EANMHAQIKMNLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQK	TDTGVSLQTYDDLLAKDCHC	V
>GDF-15_мышь	220	LEDLGWSDWVLSPR	QLQLSMCVGECPHLYR	SANTHAQIKARLHGLQPDKVPAPCCVPSSYTPVVLNHR	TDSGVSLQTYDDLVARGCHC	A--
>GDF-15_крыса	220	LEDLGWSDWVLSPR	QLQLSMCVGECPHLYR	SANTHALIKARLHGLQPDVPAAPCCVPSSYTPVVLNHR	TDSGVSLQTYDDLVAQGCHC	A---
Консенсус			++Q++MC+G+CP+++R		TD+GVSLQTYDDL+AK+CHC	

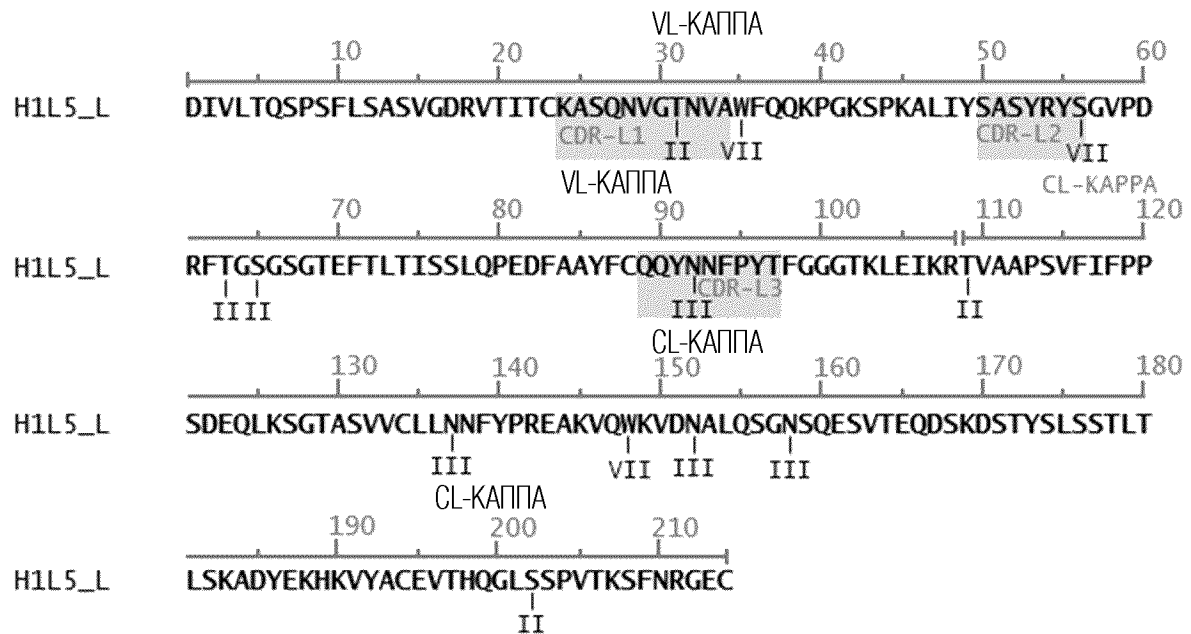
ФИГ. 22



ФИГ. 23

ФИГ. 24

Карта уязвимости последовательности легкой цепи H1L5

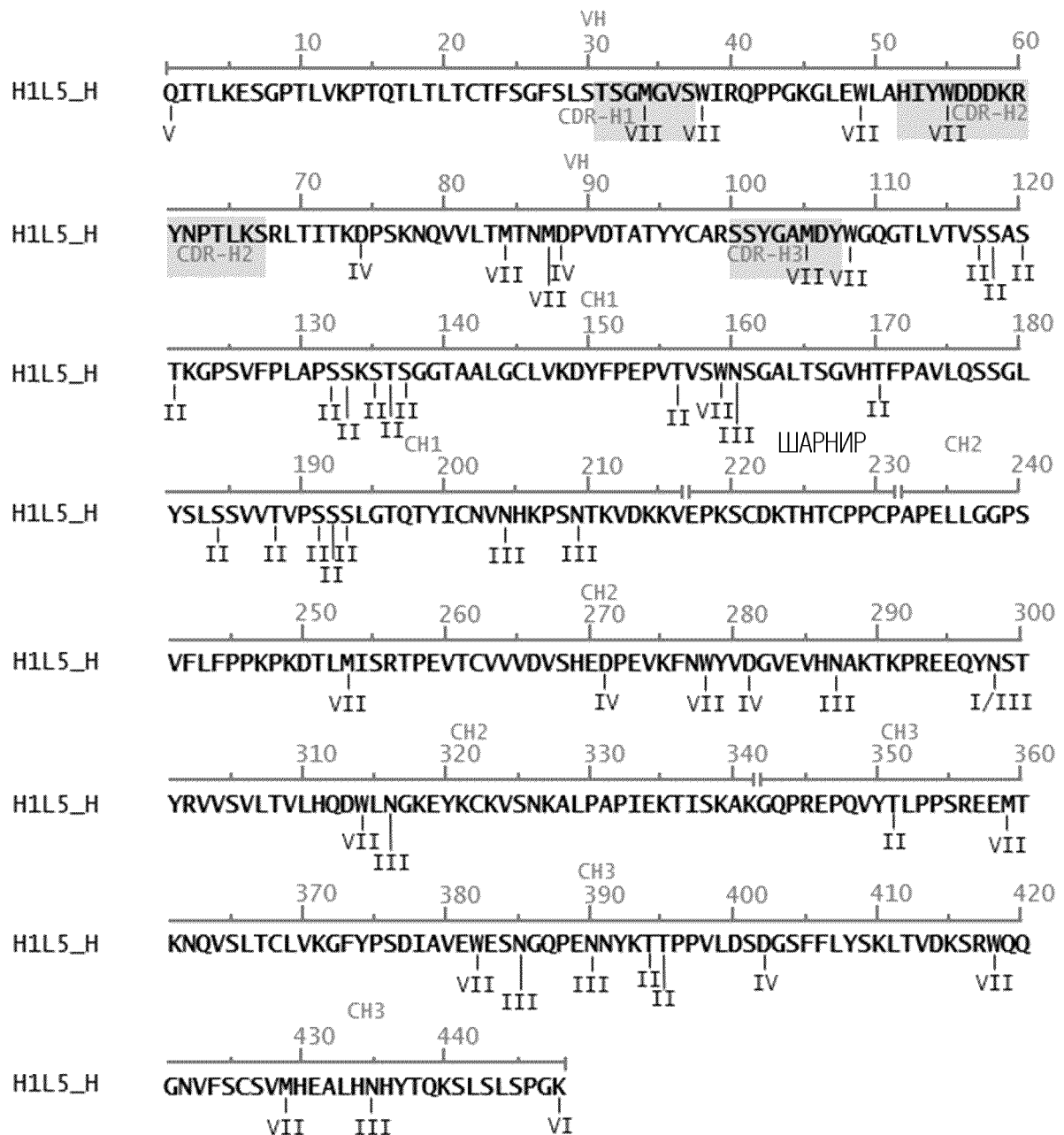


Обозначения:

- | | |
|---|-------------------------|
| I - Asn N-связанное гликозилирование | V - Пиро-глутамат |
| II - Ser/Thr O-связанное гликозилирование | VI - C-концевой Lys |
| III - Asn дезамидирование | VII - Met/Trp окисление |
| IV - Asp изомеризация/фрагментация | VIII - свободный тиол |

ФИГ. 25

Карта уязвимости последовательности тяжелой цепи H1L5



Обозначения:

- | | |
|---|-------------------------|
| I - Asn N-связанное гликозирование | V - Пиро-глутамат |
| II - Ser/Thr O-связанное гликозирование | VI - C-концевой Lys |
| III - Asn дезамидирование | VII - Met/Trp окисление |
| IV - Asp изомеризация/фрагментация | VIII - свободный тиол |