

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192975** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.02.01

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.04.30

(54) **АЛЛОГЕННАЯ КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ В-КЛЕТОЧНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ
Т-КЛЕТОК, НАЦЕЛИВАЮЩИХСЯ НА CD19**

(31) **62/840,913**

(32) **2019.04.30**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2020/054118**

(87) **WO 2020/222176 2020.11.05**

(71) Заявитель:

КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (СН)

(72) Изобретатель:

**Бентон Марк, Хо Тони, Калаицидис
Деметриос, Морава Эвелина, Терретт
Джонатан Александр (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Популяция генетически сконструированных иммунных клеток (например, Т-клеток), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении CD19, и содержат нарушенный ген TRAC, нарушенный ген B2M или оба из них, для применения в лечении В-клеточного злокачественного новообразования.

A1

202192975

202192975

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571566EA/055

АЛЛОГЕННАЯ КЛЕТочНАЯ ТЕРАПИЯ В-КЛЕТочНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК, НАЦЕЛИВАЮЩИХСЯ НА CD19 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет дат подачи на основании предварительной заявки на патент США № 62/840913, поданной 30 апреля 2019 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Виды терапии с применением Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) представляют собой терапевтические средства на основе адоптивных Т-клеток, используемые для лечения злокачественных новообразований у человека. Несмотря на то, что терапия с применением CAR-Т-клеток привела к большому клиническому успеху, включая длительную ремиссию при рецидивирующей/рефрактерной неходжкинской лимфоме (NHL) и остром лимфобластном лейкозе у детей (ALL), одобренные продукты являются аутологичными и требуют сбора и получения клеток для конкретного пациента. В связи с этим у некоторых пациентов в ожидании лечения наблюдалось прогрессирование заболевания или смерть. Поэтому сохраняется потребность в улучшенных терапевтических средствах на основе CAR Т-клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на разработке аллогенной клеточной терапии В-клеточных злокачественных новообразований, таких как трансформированная FL или DLBCL, с применением генетически сконструированных Т-клеток (например клеток CTX110, также известных как клетки TC1), экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) к CD19 и содержащих нарушенный ген *TRAC* и ген *B2M*. Терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR, раскрытая в данном документе, продемонстрировала эффективность лечения у пациентов-людей, имеющих В-клеточные злокачественные новообразования, раскрытые в данном документе, включая полные ответы у определенных пациентов и длительную устойчивость ответов. Кроме того, терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR, раскрытая в данном документе, проявляла желаемые фармакокинетические характеристики у пациентов-людей, включая пролонгированную экспансию и персистентность Т-клеток с CAR после инфузии.

Соответственно, в некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрен способ лечения В-клеточного злокачественного новообразования у пациента-человека, при этом способ включает: (i) подвергание пациента-человека, имеющего В-клеточное злокачественное новообразование, лимфодеплеционному лечению, и (ii) введение пациенту-человеку популяции генетически сконструированных Т-клеток после стадии (i). В некоторых вариантах осуществления стадию (i) можно выполнять за приблизительно 2-7 дней до стадии (ii). В некоторых вариантах осуществления популяция генетически

сконструированных Т-клеток является аллогенной.

Популяция генетически сконструированных Т-клеток может содержать Т-клетки, которые содержат: (а) нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*), (b) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (*CAR*), который связывает CD19, где *CAR* содержит одноцепочечный переменный фрагмент к CD19 (scFv), который содержит переменную область тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 51, и переменную область легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 52, и где нуклеиновая кислота вставлена в нарушенный ген *TRAC*, и (c) нарушенный ген бета-2-микроглобулина (*β2M*). В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген *TRAC* характеризуется делецией фрагмента, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления популяция генетически сконструированных Т-клеток вводится пациенту-человеку в дозе, составляющей от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^9 *CAR*⁺ Т-клеток. В некоторых примерах популяция генетически сконструированных Т-клеток вводится пациенту-человеку в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 *CAR*⁺ Т-клеток. В некоторых примерах популяция генетически сконструированных Т-клеток вводится пациенту-человеку в дозе, составляющей приблизительно 3×10^7 *CAR*⁺ Т-клеток. В некоторых примерах популяция генетически сконструированных Т-клеток вводится пациенту-человеку в дозе, составляющей приблизительно 1×10^8 *CAR*⁺ Т-клеток. В некоторых примерах популяция генетически сконструированных Т-клеток вводится пациенту-человеку в дозе, составляющей приблизительно 3×10^8 *CAR*⁺ Т-клеток. В некоторых примерах популяция генетически сконструированных Т-клеток вводится пациенту-человеку в дозе, составляющей приблизительно 1×10^9 *CAR*⁺ Т-клеток. В любом случае популяция генетически сконструированных Т-клеток, вводимых пациенту-человеку на дозу, содержит не более чем 7×10^4 *TCR*⁺ Т-клеток/кг.

В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционное лечение на стадии (i) включает совместное введение пациенту-человеку флударабина при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфида при приблизительно 500-750 мг/м² в день в течение трех дней. Например, лимфодеплеционное лечение на стадии (i) включает совместное введение пациенту-человеку флударабина при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфида при приблизительно 500 мг/м² в день в течение трех дней. В других примерах лимфодеплеционное лечение на стадии (i) включает совместное введение пациенту-человеку флударабина при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфида при приблизительно 750 мг/м² в день в течение трех дней.

В некоторых вариантах осуществления до стадии (i) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков: (а) значительное ухудшение клинического статуса, (b) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 91%, (c) неконтролируемая сердечная аритмия, (d)

гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (е) активная инфекция и (е) острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

В некоторых вариантах осуществления после стадии (i) и до стадии (ii) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков: (а) активная неконтролируемая инфекция; (b) ухудшение клинического статуса по сравнению с клиническим статусом до стадии (i); и (с) острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

Любой из способов, раскрытых в данном документе, может дополнительно включать (iii) мониторинг пациента-человека в отношении развития острой токсичности после стадии (ii) и (iv) контроль острой токсичности в случае ее возникновения. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) может выполняться в течение по меньшей мере 28 дней после введения популяции генетически сконструированных Т-клеток. Иллюстративная острая токсичность может включать синдром лизиса опухоли (TLS), синдром высвобождения цитокинов (CRS), синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (ICANS), аплазию В-клеток, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), цитопению, реакцию "трансплантат против хозяина" (GvHD), гипертонию, почечную недостаточность или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой неходжкинскую лимфому. Примеры включают без ограничения диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с перегруппировкой *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*, трансформированную фолликулярную лимфому (FL) или FL степени 3b. В некоторых случаях DLBCL представляет собой неуточненную DLBCL (NOS). В некоторых примерах В-клеточное злокачественное новообразование является рефрактерным и/или рецидивирующим.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек может иметь по меньшей мере один поддающийся измерению патологический очаг, который является положительным по результатам позитронно-эмиссионной томографии (PET) с применением фтордезоксиглюкозы. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек прошел одну или несколько линий предшествующей противораковой терапии. В некоторых примерах пациент-человек прошел две или более линий предшествующей противораковой терапии. Иллюстративные виды предшествующей противораковой терапии могут включать антитело к CD20, схему, предусматривающую антрациклин, или их комбинацию.

В некоторых примерах пациент-человек страдает рефрактерной или рецидивирующей трансформированной FL и прошел по меньшей мере одну линию химиотерапии для лечения заболевания после трансформации в DLBCL. В других примерах В-клеточное злокачественное новообразование является рефрактерным, и пациент-человек страдает прогрессирующим заболеванием в ходе последней терапии или страдает стабильным заболеванием после по меньшей мере двух циклов терапии с

продолжительностью стабильного заболевания, составляющей до 6 месяцев. В еще одних примерах пациент-человек не прошел предшествующую трансплантацию аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) или не соответствовал требованиям предшествующей аутологичной HSCT. В качестве альтернативы или в дополнение, пациент-человек является субъектом для дополнительной противораковой терапии после лечения с применением популяции генетически сконструированных Т-клеток.

В любом из способов, раскрытых в данном документе, пациент-человек характеризуется одним или несколькими из следующих признаков:

(a) характеризуется функциональным статусом 0 или 1 согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG);

(b) приемлемая функция почек, печени, сердца и/или легких;

(c) не проходил предшествующей генной терапии или терапии с применением модифицированных клеток;

(d) не проходил предшествующего лечения, предусматривающего антитело к CD19;

(e) не проходил предшествующей аллогенной HSCT;

(f) не имеет выявляемых злокачественных клеток в спинномозговой жидкости;

(g) не имеет метастазов в головной мозг;

(h) не страдает предшествующими нарушениями центральной нервной системы;

(i) не страдает нестабильной стенокардией, аритмией и/или инфарктом миокарда;

(j) не характеризуется неконтролируемой инфекцией;

(k) не страдает иммунодефицитными нарушениями или аутоиммунными нарушениями, требующими иммуносупрессивной терапии, и

(l) не характеризуется инфекцией вирусом иммунодефицита человека, вирусом гепатита В или вирусом гепатита С.

В любом из способов, раскрытых в данном документе, CAR к CD19, экспрессируемый генетически сконструированными Т-клетками, может содержать внеклеточный антигенсвязывающий домен, который представляет собой scFv к CD19, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления CAR к CD19 может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к CD19, вставлена в сайт делеции в нарушенном гене *TRAC*. В некоторых примерах нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 54. В качестве альтернативы или в дополнение, нарушенный ген $\beta 2M$ в популяции генетически сконструированных Т-клеток содержит по меньшей мере одну из нуклеотидных последовательностей, изложенных под SEQ ID NO: 9-14.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на выявляемом уровне. Например,

по меньшей мере 70% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на выявляемом уровне; по меньшей мере 50% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок В2М на выявляемом уровне, и/или по меньшей мере 30% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на выявляемом уровне. В некоторых примерах по меньшей мере 99,5% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на выявляемом уровне. В некоторых примерах по меньшей мере 70% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок В2М на выявляемом уровне. В конкретных примерах по меньшей мере 85% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок В2М на выявляемом уровне. В некоторых примерах по меньшей мере 50% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на выявляемом уровне. В конкретных примерах по меньшей мере 70% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на выявляемом уровне.

В конкретном примере популяция генетически сконструированных Т-клеток для применения в любом из способов, раскрытых в данном документе, представляет собой клетки СТХ110.

В любом из способов, описанных в данном документе, популяцию генетически сконструированных Т-клеток вводят пациенту-человеку посредством внутривенной инфузии. В некоторых примерах популяция генетически сконструированных Т-клеток может быть суспендирована в растворе для криоконсервации.

Также в объем настоящего изобретения включены фармацевтические композиции для применения в лечении В-клеточного злокачественного новообразования, при этом фармацевтическая композиция содержит любую популяцию генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе (например клеток СТХ110), а также применение генетически сконструированных Т-клеток для изготовления лекарственного препарата для применения в лечении В-клеточного злокачественного новообразования, как раскрыто в данном документе.

Подробности одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения изложены в описании ниже. Другие особенности или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующих графических материалов и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** представлен ряд графиков проточной цитометрии первичных Т-клеток человека, TRAC-/B2M-CD19CAR+Т-клеток (ТС1) через 8 дней после редактирования. На графиках показано снижение поверхностной экспрессии TRAC и B2M. Клетки с двойным нокаутом TCR/MHCI экспрессируют трансген CAR на высоких уровнях (нижняя панель).

Отрицательная селекция клеток TC1 с помощью шариков для очистки приводит к снижению количества TCR-положительных клеток (правая панель).

На **фиг. 2** представлен график, изображающий высокие показатели редактирования, достигнутые в локусах TRAC и B2M у TRAC-/B2M-CD19CAR+T-клеток (TC1). Поверхностную экспрессию TCR и MHC1, которая является функциональным результатом редактирования генов, измеряли и наносили на график в качестве процента редактирования на оси y. Была выявлена высокая эффективность (например более 50%) сайт-специфической интеграции и экспрессии CAR с локуса TRAC. Эти данные демонстрируют эффективность получения TRAC-/B2M-/CAR к CD19+ T-клеток, составляющую более чем 50%.

На **фиг. 3** представлен график, изображающий статистически значимое уменьшение объема опухоли (мм³) ($p=0,007$) у мышей NOG с клетками Raji после обработки TRAC-/β2M-/CD19 CAR+ T-клетками (TC1).

На **фиг. 4** представлен график кривой выживаемости, демонстрирующий повышение выживаемости мышей NOG с клетками Raji, обработанных клетками TC1, по сравнению с мышами NOG с клетками Raji, не прошедшими обработку.

На **фиг. 5** представлен график кривой выживаемости, демонстрирующий повышение выживаемости мышей NOG с клетками Raji, обработанных клетками TC1 в день 4, по сравнению с контрольными мышами, не прошедшими обработку в день 1.

Фиг. 6A и **6B** включают диаграммы, демонстрирующие персистенцию и противоопухолевую активность клеток TC1 у мышей. **6A**: ряд графиков проточной цитометрии, демонстрирующих, что клетки TC1 сохраняются у мышей NOG с клетками Raji. **6B**: график, демонстрирующий, что клетки TC1 селективно уничтожают клетки Raji в селезенке у мышей NOG с клетками Raji, обработанных TC1, по сравнению с контролями (мыши NOG с клетками Raji без обработки или мыши NOG). Эффект изображен в виде уменьшения массы селезенки у мышей NOG с клетками Raji, обработанных с помощью TC1, по сравнению с контролями.

На **фиг. 7** представлен ряд графиков проточной цитометрии, демонстрирующих, что персистирующие клетки TC1 в селезенке отредактированы у двух независимых мышей NOG с клетками Raji с обработкой с помощью TC1.

На **фиг. 8** представлен график выживаемости Каплана-Мейера, демонстрирующий повышение выживаемости мышей NOG с клетками Nalm6, обработанных клетками TC1 в день 4, по сравнению с контрольными мышами, не прошедшими обработку в день 1.

На **фиг. 9** представлен график выживаемости Каплана-Мейера, демонстрирующий повышение выживаемости мышей, страдающих В-клеточным острым лимфобластным лейкозом с диссеминацией (B-ALL) с клетками Nalm6, после обработки различными концентрациями TC1 по сравнению с контрольными мышами, не прошедшими обработку.

На **фиг. 10** представлен график, изображающий статистически значимое подавление экспансии опухолевых клеток в модели В-клеточного острого

лимфобластного лейкоза с диссеминацией (B-ALL) с клетками Nalm6 после обработки клетками TC1.

На **фиг. 11** представлен график выживаемости Каплана-Мейера здоровых мышей, обработанных клетками TC1 или различными контрольными клетками (PBMC или электропорированными (EP) T-клетками) после облучения, или мышей, которые прошли только облучение ("только RT").

На **фиг. 12** представлен график, демонстрирующий процент изменения веса тела мышей, обработанных на фиг. 18.

На **фиг. 13** представлен график выживаемости Каплана-Мейера здоровых мышей, обработанных низкой дозой (2×10^7) или высокой дозой (4×10^7) клеток TC1 или неотредактированных T-клеток после облучения, или мышей, которые прошли только облучение ("среда-носитель-RT").

На **фиг. 14** представлен график, демонстрирующий процент изменения веса тела мышей, обработанных на фиг. 20, в дополнение к мышам, которых не облучали и которым не вводили дозу клеток ("среда-носитель - без RT").

На **фиг. 15** представлена гистограмма, демонстрирующая процент CD27+CD45RO-клеток в неотредактированной подгруппе CD8+ T-клеток периферических клеток крови от шести разных доноров.

На **фиг. 16** представлены результаты проточной цитометрии экспрессии TCR $\alpha\beta$ и B2M на клетках TC1 до и после деплеции TCR $\alpha\beta$ + клеток.

На **фиг. 17** представлен график процента потери белка для TCR- и MHC I- (B2M) после редактирования генов и процент клеток, экспрессирующих CAR к CD19, в отредактированных клетках TC1 из отдельных партий получения TC1.

На **фиг. 18** представлены графики, демонстрирующие процент PD1+ (вверху слева), LAG3+ (вверху справа), TIM3+ (внизу слева) или CD57+ (внизу справа) в популяции T-клеток от шести разных доноров до и после редактирования.

На **фиг. 19** представлен график, демонстрирующий процент лизиса клеток CD19-положительных линий клеток (Nalm6; Raji и K562-CD19) и CD19-отрицательных клеток (K562) при совместном культивировании в различных соотношениях с клетками TC1 или неотредактированными T-клетками.

На **фиг. 20** представлен график, демонстрирующий количество жизнеспособных клеток TC1 при культивировании в присутствии среды для T-клеток (сыворотка крови+IL2+IL7; полная среда), среды, содержащей сыворотку крови, но не цитокины IL2 или IL7 (5% сыворотка крови, без цитокинов), или без сыворотки крови или цитокинов (без сыворотки крови, без цитокинов). Клетки подсчитывали в указанные дни после редактирования генов. Показаны средние значения из трех партий \pm SD.

На **фиг. 21** представлена схема, изображающая схему клинического исследования для оценки клеток CTX110 (также известных как клетки TC1), введенных после лимфодеплеции субъектам-людям, имеющим CD19+ злокачественные новообразования.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Кластер дифференцировки 19 (CD19) представляет собой антигенную детерминанту, выявляемую на клетках-предшественниках лейкоза. Человеческие и мышьи аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот можно найти в общедоступной базе данных, такой как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность CD19 человека может быть найдена в UniProt/Swiss-Prot под номером доступа P15391, а нуклеотидная последовательность, кодирующая CD19 человека, может быть найдена под номером доступа NM_001178098. CD19 экспрессируется на клетках линии В-клеток при большинстве видов рака, включая, например, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и неходжкинскую лимфому. Он также является ранним маркером предшественников В-клеток. См., например, Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997).

Настоящее изобретение предусматривает терапию с применением аллогенных Т-клеток с CAR для лечения В-клеточных злокачественных новообразований. Терапия с применением Т-клеток с CAR предусматривает популяцию генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD19 и содержащих нарушенный ген *TRAC* и ген B2M, при этом нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к CD19, вставляется в локус гена *TRAC*, за счет чего нарушается экспрессия гена *TRAC*. Аллогенные Т-клетки с CAR к CD19 получают с применением исходных Т-клеток, полученных от здоровых доноров. Таким образом, терапия с применением Т-клеток с CAR доступна пациенту, имеющему целевое В-клеточное злокачественное новообразование, незамедлительно после постановки диагноза, в отличие от по меньшей мере трех недель между постановкой диагноза и лечением при терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR, необходимой для получения Т-клеток с CAR из собственных Т-клеток пациента. Средство терапии на основе аллогенных Т-клеток с CAR можно хранить и применять в месте оказания помощи для облегчения лечения незамедлительно после постановки диагноза. Непосредственная доступность терапии с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19 устраняет необходимость в промежуточной химиотерапии, которая может потребоваться, если аутологичные Т-клетки с CAR получают из собственных клеток пациента. Терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19, раскрытая в данном документе, продемонстрировала эффективность лечения у пациентов-людей, имеющих В-клеточные злокачественные новообразования, раскрытые в данном документе, включая полные ответы у определенных пациентов и длительную устойчивость ответов. Кроме того, терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR, раскрытая в данном документе, проявляла желаемые фармакокинетические характеристики у пациентов-людей, включая пролонгированную экспансию и персистенцию Т-клеток с CAR после инфузии.

Соответственно, в данном документе предусмотрены способы лечения В-клеточного злокачественного новообразования у пациента-человека с применением популяции генетически сконструированных иммунных клеток, таких как Т-клетки, которые в совокупности содержат нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген B2M и

нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR к CD19 (например SEQ ID NO: 40, кодируемую SEQ ID NO: 39). Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к CD19 и необязательно содержащая промоторную последовательность и один или несколько регуляторных элементов, может быть вставлена в локус нарушенного гена *TRAC*, например посредством замены сегмента под SEQ ID NO: 26 в гене *TRAC*. Пациент-человек является субъектом для лимфодеплеционного лечения до введения популяции генетически сконструированных Т-клеток.

I. Т-клетки с CAR к CD19

В данном документе раскрыты Т-клетки с CAR к CD19 (например клетки СТХ110) для применения в лечении В-клеточных злокачественных новообразований. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки с CAR к CD19 представляют собой Т-клетки человека, экспрессирующие CAR к CD19 и содержащие нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген *B2M* или их комбинацию. В конкретных примерах Т-клетки с CAR к CD19 экспрессируют CAR к CD19 и содержат нарушенные эндогенные гены *TRAC* и *B2M*.

(i) Химерный антигенный рецептор к CD19 (CAR)

Генетически сконструированные иммунные клетки, такие как Т-клетки, раскрытые в данном документе, экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD19 (CAR к CD19). Химерный антигенный рецептор (CAR) относится к искусственному рецептору иммунных клеток, который сконструирован для распознавания и связывания антигена, экспрессируемого нежелательными клетками, например патологическими клетками, такими как раковые клетки. Т-клетка, которая экспрессирует полипептид CAR, называется Т-клеткой с CAR. CAR обладают способностью перенаправлять специфичность и реактивность Т-клеток в направлении выбранной мишени без рестриктирования по МНС. Распознавание антигена без рестриктирования по МНС придает Т-клеткам с CAR способность распознавать антиген независимо от процессирования антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли. Более того, при экспрессии на Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

Существуют различные поколения CAR, каждое из которых содержит различные компоненты. В CAR первого поколения соединены scFv, полученный из антитела, и внутриклеточный сигнальный домен CD3зета (ζ или z) Т-клеточного рецептора посредством шарнирного и трансмембранного доменов. В CAR второго поколения включен дополнительный костимулирующий домен, например, CD28, 4-1BB (41BB) или ICOS, для обеспечения костимулирующего сигнала. CAR третьего поколения содержат два костимулирующих домена (например комбинацию CD27, CD28, 4-1BB, ICOS или OX40), слитых с цепью CD3 ζ TCR. Maude *et al.*, *Blood*. 2015; 125(26):4017-4023; Kakarla and Gottschalk, *Cancer J.* 2014; 20(2):151-155). Любое из различных поколений конструкций CAR входит в объем настоящего изобретения.

Обычно CAR представляет собой слитый полипептид, содержащий внеклеточный домен, который распознает целевой антиген (например одноцепочечный фрагмент (scFv)

антитела или фрагмент другого антитела), и внутриклеточный домен, содержащий сигнальный домен комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) (например CD3 ζ), и, в большинстве случаев, костимулирующий домен. (Enblad *et al.*, Human Gene Therapy. 2015; 26(8):498-505). Конструкция CAR может дополнительно содержать шарнирный и трансмембранный домен между внеклеточным доменом и внутриклеточным доменом, а также сигнальный пептид на N-конце для поверхностной экспрессии. Примеры сигнальных пептидов включают MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 30) и MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 31). Можно использовать другие сигнальные пептиды.

CAR к CD19 может содержать одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к CD19, специфический в отношении CD19, за которым следуют шарнирный домен и трансмембранный домен (например шарнирный и трансмембранный домены CD8), которые слиты с внутриклеточным косигнальным доменом (например костимулирующим доменом CD28), и сигнальный домен CD3 ζ . Иллюстративные компоненты для применения в конструировании CAR к CD19, раскрытого в данном документе, можно найти в таблице последовательностей, представленной ниже.

(а) Антигенсвязывающий внеклеточный домен

Антигенсвязывающий внеклеточный домен представляет собой область полипептида CAR, которая подвергается воздействию внеклеточной жидкости, когда CAR экспрессируется на клеточной поверхности. В некоторых случаях сигнальный пептид может располагаться на N-конце для облегчения экспрессии на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может представлять собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv, который может содержать вариабельную область тяжелой цепи антитела (V_H) и вариабельную область легкой цепи антитела (V_L) (в любой ориентации). В некоторых случаях фрагменты V_H и V_L могут быть связаны посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидрофильные остатки с фрагментами из глицина и серина для гибкости, а также фрагментами из глутамата и лизина для дополнительной растворимости. scFv-фрагмент сохраняет антигенсвязывающую специфичность исходного антитела, из которого получен scFv-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления scFv может содержать гуманизированные домены V_H и/или V_L . В других вариантах осуществления домены V_H и/или V_L scFv являются полностью человеческими.

Антигенсвязывающий внеклеточный домен в полипептиде CAR, раскрытом в данном документе, является специфическим в отношении CD19 (например CD19 человека). В некоторых примерах антигенсвязывающий внеклеточный домен может содержать внеклеточный домен scFv, способный к связыванию с CD19. scFv к CD19 может содержать вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий такие же определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDR), что и в SEQ ID NO: 51, и вариабельный домен легкой цепи (V_L), содержащий такие же CDR легкой цепи, что и в SEQ ID NO: 52. Если два антитела содержат одинаковые CDR V_H и/или V_L , это означает,

что их CDR являются идентичными при определении посредством одного и того же подхода (например, подхода согласно Kabat, подхода согласно Chothia, подхода AbM, подхода Contact или подхода IMGT, известных из уровня техники. См., например, bioinf.org.uk/abs/). В некоторых примерах scFv к CD19 содержит V_H под SEQ ID NO: 51 и/или V_L под SEQ ID NO: 52. В конкретных примерах scFv к CD19 может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47.

(b) Трансмембранный домен

Полипептид CAR к CD19, раскрытый в данном документе, может содержать трансмембранный домен, который может представлять собой гидрофобную альфа-спираль, которая пронизывает мембрану. Используемый в данном документе термин "трансмембранный домен" относится к любой белковой структуре, которая термодинамически стабильна в клеточной мембране, предпочтительно в мембране эукариотической клетки. Трансмембранный домен может обеспечивать стабильность CAR, содержащему его.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR, предусмотренный в данном документе, может представлять собой трансмембранный домен CD8. В других вариантах осуществления трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD28. В еще одних вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой химеру из трансмембранного домена CD8 и CD28. Можно использовать другие трансмембранные домены, предусмотренные в данном документе. В одном конкретном примере трансмембранный домен в CAR к CD19 представляет собой трансмембранный домен CD8 α , содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32.

(c) Шарнирный домен

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может быть расположен между внеклеточным доменом (содержащим антигенсвязывающий домен) и трансмембранным доменом CAR или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR. Шарнирный домен может представлять собой любой олигопептид или полипептид, функции которого заключаются в связывании трансмембранного домена с внеклеточным доменом и/или цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Шарнирный домен может функционировать для обеспечения гибкости CAR или его доменов или для предотвращения стерических затруднений CAR или его доменов.

В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может содержать до 300 аминокислот (например от 10 до 100 аминокислот или от 5 до 20 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления один или несколько шарнирных доменов могут быть включены в другие участки CAR. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может представлять собой шарнирный домен CD8. Можно использовать другие шарнирные домены.

(d) Внутриклеточные сигнальные домены

Любая из конструкций CAR к CD19 содержит один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов (например CD3 ζ и необязательно один или несколько костимулирующих доменов), которые представляют собой функциональный конец рецептора. После распознавания антигена рецепторы образуют кластер и сигнал передается в клетку.

CD3 ζ представляет собой цитоплазматический сигнальный домен Т-клеточного рецепторного комплекса. CD3 ζ содержит три (3) иммунорецепторных активирующих мотива на основе тирозина (ITAM), которые передают сигнал активации Т-клетке после того, как Т-клетка взаимодействует с когнатным антигеном. Во многих случаях CD3 ζ обеспечивает первичный сигнал активации Т-клеток, но не полностью компетентный сигнал активации, который требует костимулирующей передачи сигнала. В некоторых примерах конструкция CAR к CD19, раскрытая в данном документе, содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ , который может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды CAR к CD19, раскрытые в данном документе, могут дополнительно содержать один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. Например, костимулирующие домены CD28 и/или 4-1BB можно использовать для передачи полного сигнала пролиферации/выживания вместе с первичной передачей сигнала, опосредованной CD3 ζ . В некоторых примерах CAR, раскрытый в данном документе, содержит костимулирующую молекулу CD28, например костимулирующий сигнальный домен CD28, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36. В других примерах CAR, раскрытый в данном документе, содержит костимулирующую молекулу 4-1BB, например костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

В конкретных примерах CAR к CD19, раскрытый в данном документе, может содержать сигнальный домен CD3 ζ (например SEQ ID NO: 38) и костимулирующий домен CD28 (например SEQ ID NO: 36).

Следует понимать, что способы, описанные в данном документе, охватывают более одного подходящего CAR, который можно использовать для получения генетически сконструированных Т-клеток, экспрессирующих CAR, например клеток, которые известны из уровня техники или раскрыты в данном документе. Примеры можно найти, например, в международной заявке под номером PCT/IB2018/001619, поданной 11 мая 2018 г., которая опубликована как WO 2019/097305A2, и в международной заявке под номером PCT/IB2019/000500, поданной 10 мая 2019 г., соответствующие раскрытия каждой из предшествующих заявок включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявляемого объекта, упомянутых в данном документе.

В конкретных примерах CAR к CD19, раскрытый в данном документе, может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40, которая может

кодироваться нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 39. См. таблицу последовательностей, представленную ниже.

В генетически сконструированных Т-клетках, раскрытых в данном документе, нуклеиновая кислота, содержащая кодирующую последовательность CAR к CD19, и необязательно регуляторные последовательности для экспрессии CAR к CD19 (например промотор, такой как промотор EF1a, приведенный в таблице последовательностей) могут быть вставлены в геномный локус, представляющий интерес. В некоторых примерах нуклеиновая кислота вставлена в локус эндогенного гена *TRAC*, за счет чего нарушается экспрессия гена *TRAC*. В конкретных примерах нуклеиновая кислота может заменять фрагмент в гене *TRAC*, например фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26.

(ii) Нокаут генов TRAC и B2M

Т-клетки с CAR к CD19, раскрытые в данном документе, могут дополнительно содержать нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген *B2M* или их комбинацию. Нарушение локуса *TRAC* приводит к потере экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) и предназначено для снижения вероятности реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD), в то время как нарушение локуса *β2M* приводит к отсутствию экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC I) и предназначено для улучшения персистенции за счет снижения вероятности отторжения хозяином. Добавление CAR к CD19 направляет модифицированные Т-клетки к CD19-экспрессирующим опухолевым клеткам.

Используемый в данном документе термин "нарушенный ген" относится к гену, содержащему одну или несколько мутаций (например, вставку, делецию или нуклеотидную замену и т. д.) относительно аналога дикого типа для того, чтобы существенно снизить или полностью устранить активность продукта, кодируемого геном. Одна или несколько мутаций могут находиться в некодирующей области, например, в промоторной области, регуляторной области, которая регулирует транскрипцию или трансляцию, или в интронной области. В качестве альтернативы, одна или несколько мутаций могут находиться в кодирующей области (например в экзоне). В некоторых случаях нарушенный ген не экспрессирует или экспрессирует кодируемый белок на существенно сниженном уровне. В других случаях нарушенный ген экспрессирует кодируемый белок в мутированной форме, которая либо нефункциональна, либо характеризуется существенно сниженной активностью. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген представляет собой ген, который не кодирует функциональный белок. В некоторых вариантах осуществления клетка, которая содержит нарушенный ген, не экспрессирует (например на клеточной поверхности) на выявляемом уровне (например с помощью антитела, например посредством проточной цитометрии) белок, кодируемый геном. Клетка, которая не экспрессирует белок на выявляемом уровне, может называться нокаутной клеткой. Например, клетка с отредактированным геном *β2M* может считаться клеткой, нокаутной по *β2M*, если белок *β2M* не может быть выявлен на

клеточной поверхности с применением антитела, которое специфически связывает белок $\beta 2M$.

В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген может быть описан как содержащий мутированный фрагмент относительно аналога дикого типа. Мутированный фрагмент может содержать делецию, нуклеотидную замену, добавление или их комбинацию. В других вариантах осуществления нарушенный ген может быть описан как содержащий делецию фрагмента, который присутствует в аналоге дикого типа. В некоторых случаях 5'-конец делетированного фрагмента может быть расположен в пределах области гена, на которую нацеливается разработанная направляющая РНК, такая как РНК, раскрытые в данном документе (известной как целевая последовательность), а 3'-конец делетированного фрагмента может выходить за пределы целевой области. В качестве альтернативы, 3'-конец делетированного фрагмента может находиться в пределах целевой области, а 5'-конец делетированного фрагмента может выходить за пределы целевой области.

В некоторых случаях нарушенный ген *TRAC* в Т-клетках с CAR к CD19, раскрытых в данном документе, может содержать делецию, например делецию фрагмента в экзоне 1 локуса гена *TRAC*. В некоторых примерах нарушенный ген *TRAC* характеризуется делецией фрагмента, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26, которая представляет собой целевой сайт направляющей РНК *TRAC* TA-1. См. таблицу последовательностей ниже. В некоторых примерах фрагмент под SEQ ID NO: 26 может быть заменен нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR к CD19. Такой нарушенный ген *TRAC* может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Нарушенный ген *B2M* в Т-клетках с CAR к CD19, раскрытых в данном документе, может быть получен с применением технологии CRISPR/Cas. В некоторых примерах может использоваться gRNA для *B2M*, представленная в таблице последовательностей ниже. Нарушенный ген *B2M* может содержать нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 9-14.

(iii) Иллюстративная популяция Т-клеток с CAR к CD19 для аллогенной терапии

В данном документе также предусмотрена популяция генетически сконструированных иммунных клеток (например Т-клеток, таких как Т-клетки человека), содержащая Т-клетки с CAR к CD19, которые экспрессируют любой из CAR к CD19, раскрытых в данном документе (например CAR к CD19, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40), и нарушенный ген *TRAC* и/или нарушенный ген *B2M*, как также раскрыто в данном документе. В некоторых примерах популяция генетически сконструированных Т-клеток представляет собой клетки CTX110, которые представляют собой Т-клетки, направленные на CD19, содержащие нарушенный ген *TRAC* и ген *B2M*. Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к CD19, может быть вставлена в нарушенный ген *TRAC* в сайте из SEQ ID NO: 26, который заменен нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR к CD19, за счет чего нарушается экспрессия гена *TRAC*. Нарушенный

ген *TRAC* в клетках CTX110 может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 39.

Клетки CTX110 могут быть получены посредством генетической модификации *ex vivo* с применением технологии CRISPR/Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9) для нарушения целевых генов (гены *TRAC* и *B2M*), и трансдукции аденоассоциированным вирусом (AAV) для доставки конструкции CAR к CD19. Редактирование генов, опосредованное CRISPR-Cas9, предусматривает две направляющие РНК (sgRNA): sgRNA TA-1 (SEQ ID NO: 18), которая нацеливается на локус *TRAC*, и sgRNA B2M-1 (SEQ ID NO: 20), которая нацеливается на локус $\beta 2M$. Для любой из последовательностей gRNA, предусмотренных в данном документе, подразумевается, что последовательности, для которых явно не указано, что они содержат модификации, охватывают как немодифицированные последовательности, так и последовательности, содержащие любые подходящие модификации.

CAR к CD19 клеток CTX110 состоит из одноцепочечного фрагмента антитела к CD19 (scFv, который может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47), за которым следуют шарнир CD8 и трансмембранный домен (например, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32), который слит с внутриклеточным косигнальным доменом CD28 (например SEQ ID NO: 36), и сигнальный домен CD3 ζ (например SEQ ID NO: 38). В конкретных примерах CAR к CD19 в клетках CTX110 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30% популяции клеток CTX110 экспрессируют CAR к CD19 на выявляемом уровне. Например, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток CTX110 экспрессируют CAR к CD19 на выявляемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% популяции клеток CTX110 могут не экспрессировать поверхностный белок $\beta 2M$ на выявляемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток CTX110 могут не экспрессировать поверхностный белок $\beta 2M$ на выявляемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50-100%, 50-90%, 50-80%, 50-70%, 50-60%, 60-100%, 60-90%, 60-80%, 60-70%, 70-100%, 70-90%, 70-80%, 80-100%, 80-90% или 90-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок $\beta 2M$ на выявляемом уровне.

В качестве альтернативы или в дополнение, по меньшей мере 50% популяции клеток CTX110 могут не экспрессировать поверхностный белок TCR на выявляемом уровне. Например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток CTX110 могут не экспрессировать поверхностный

белок TCR на выявляемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50-100%, 50-90%, 50-80%, 50-70%, 50-60%, 60-100%, 60-90%, 60-80%, 60-70%, 70-100%, 70-90%, 70-80%, 80-100%, 80-90% или 90-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок TRAC на выявляемом уровне. В конкретных примерах более чем 90% (например более чем 99,5%) клеток CTX110 не экспрессируют выявляемый поверхностный белок TCR.

В некоторых вариантах осуществления значительный процент популяции Т-клеток CTX110 может содержать более одного редактирования гена, что приводит к появлению определенного процента клеток, не экспрессирующих более чем один ген и/или белок.

Например, по меньшей мере 50% популяции клеток CTX110 могут не экспрессировать два поверхностных белка на выявляемом уровне, например не экспрессировать белки $\beta 2M$ и TRAC на выявляемом уровне. В некоторых вариантах осуществления 50-100%, 50-90%, 50-80%, 50-70%, 50-60%, 60-100%, 60-90%, 60-80%, 60-70%, 70-100%, 70-90%, 70-80%, 80-100%, 80-90% или 90-100% Т-клеток CTX110 не экспрессируют поверхностные белки *TRAC* и *B2M* на выявляемом уровне. В другом примере по меньшей мере 50% популяции клеток CTX110 не экспрессируют поверхностные белки *TRAC* и *B2M* на выявляемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток CTX110 может содержать более одного редактирования гена (например в более чем одном гене), которое может представлять собой редактирование, описанное в данном документе. Например, популяция Т-клеток CTX110 может содержать нарушенный посредством технологии CRISPR/Cas ген *TRAC* с применением gRNA TA-1 для *TRAC*. В некоторых примерах клетки CTX110 могут содержать делецию в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. Например, Т-клетки CTX110 могут содержать делецию фрагмента AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (SEQ ID NO: 26) в гене *TRAC*. Этот фрагмент может быть заменен нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR к CD19 (например SEQ ID NO: 39). В качестве альтернативы или в дополнение, популяция клеток CTX110 может содержать нарушенный посредством технологии CRISPR/Cas9 ген $\beta 2M$ с применением gRNA B2M-1. Такие клетки CTX110 могут содержать вставки/делеции в гене $\beta 2M$, которые содержат одну или несколько нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 9-14. В конкретных примерах клетки CTX110 включают $\geq 30\%$ CAR⁺ Т-клеток, $\leq 50\%$ B2M⁺ клеток и $\leq 30\%$ TCR $\alpha\beta$ ⁺ клеток. В дополнительных конкретных примерах клетки CTX110 включают $\geq 30\%$ CAR⁺ Т-клеток, $\leq 30\%$ B2M⁺ клеток и $\leq 0,5\%$ TCR $\alpha\beta$ ⁺ клеток.

См. также WO 2019/097305A2 и WO2019215500, соответствующие раскрытия каждой из которых включены посредством ссылки для заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе.

(iv) *Фармацевтические композиции*

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие любую из популяций генетически сконструированных Т-клеток

с CAR к CD19, как раскрыто в данном документе, например клеток CTX110, и фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции можно использовать в лечении рака у пациентов-людей, что также раскрыто в данном документе.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые с медицинской точки зрения являются подходящими для применения в контакте с тканями, органами и/или жидкостями организма субъекта без избыточной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к растворителям, дисперсионным средам, покрытиям, антибактериальным средствам, противогрибковым средствам, изотоническим средствам и средствам, замедляющим абсорбцию, или т. п., которые являются физиологически совместимыми. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемую соль, например соль присоединения кислоты или соль присоединения основания. См., например, Verge *et al.*, (1977) *J Pharm Sci* 66:1-19.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемую соль. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают соли присоединения кислоты (образованные посредством реакции свободной аминогруппы полипептида с неорганической кислотой (например хлористоводородной или фосфорной кислотами) или органической кислотой, такой как уксусная, винная, миндальная или т. п.). В некоторых вариантах осуществления соль, образованная с помощью свободных карбоксильных групп, получена из неорганического основания (например, гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция или железа) или органического основания, такого как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин или т. п.).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, раскрытая в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток с CAR к CD19 (например клеток CTX110), суспендированных в растворе для криоконсервации (например CryoStor[®] C55). Раствор для криоконсервации для применения в настоящем изобретении может также содержать аденозин, декстрозу, декстран-40, лактобионовую кислоту, сахарозу, маннит, буферное средство, такое как N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) (HEPES), одну или несколько солей (например, хлорид кальция, хлорид магния, хлорид калия, бикарбонат калия, фосфат калия и т. п.), одно или несколько оснований (например, гидроксид натрия, гидроксид калия и т. п.) или их комбинацию. Компоненты раствора для криоконсервации можно растворять в стерильной воде (пригодной для инъекций). Любой раствор для криоконсервации может практически не содержать сыворотки крови (не выявляется посредством стандартных способов).

В некоторых случаях фармацевтическая композиция, содержащая популяцию генетически сконструированных Т-клеток с CAR к CD19, таких как клетки CTX110,

суспендированные в растворе для криоконсервации (например, практически не содержащем сыворотки крови), может быть помещена во флаконы для хранения.

Любую из фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, содержащих популяцию генетически сконструированных Т-клеток с CAR к CD19, также раскрытых в данном документе (например клеток СТХ110), которые необязательно могут быть суспендированы в растворе для криоконсервации, раскрытом в данном документе, можно хранить в среде, которая практически не оказывает влияния на жизнеспособность и биоактивность Т-клеток, для будущего применения, например, в условиях, обычно применяемых для хранения клеток и тканей. В некоторых примерах фармацевтическую композицию можно хранить в паровой фазе жидкого азота при $\leq -135^{\circ}\text{C}$. Значимых изменений в отношении внешнего вида, количества клеток, жизнеспособности, % CAR⁺ Т-клеток, % TCR⁺ Т-клеток и % В2М⁺-клеток после того, как клетки хранились в таких условиях в течение определенного периода времени, не наблюдали.

II. Получение генетически сконструированных иммунных клеток

Любые подходящие способы редактирования генов, известные из уровня техники, можно использовать для получения генетически сконструированных иммунных клеток (например Т-клеток, таких как клетки СТХ110), раскрытых в данном документе, например нуклеозависимое целевое редактирование с применением нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффлекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), или нуклеаз CRISPR-Cas9, направляемых с помощью РНК (CRISPR/Cas9; белок 9, ассоциированный с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами). В конкретных примерах генетически сконструированные иммунные клетки, такие как клетки СТХ110, получают посредством технологии CRISPR в комбинации с гомологичной рекомбинацией с применением аденоассоциированного вирусного вектора (AAV) в качестве донорной матрицы.

(i) Система редактирования генов, опосредованная CRISPR-Cas9

Система CRISPR-Cas9 представляет собой встречающийся в природе защитный механизм прокариот, который был переориентирован в направляемую с помощью РНК платформу для нацеливания на ДНК, используемую для редактирования генов. Она основана на ДНК-нуклеазе Cas9 и двух некодирующих РНК, crisprRNA (crRNA) и трансактивирующей РНК (tracrRNA), для нацеливания на расщепление ДНК. CRISPR является сокращением от коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, семейства последовательностей ДНК, обнаруженных в геномах бактерий и архей, которые содержат фрагменты ДНК (спейсерную ДНК), сходные с чужеродной ДНК, воздействию которой подвергалась клетка, например, вирусов, которые инфицировали или атаковали прокариот. Эти фрагменты ДНК используются прокариотами для выявления и разрушения сходной чужеродной ДНК при повторном введении, например, из сходных вирусов во время последующих атак. Транскрипция локуса CRISPR приводит к образованию молекулы РНК, содержащей спейсерную последовательность, которая связывается с белками Cas (ассоциированными с CRISPR), способными распознавать и

разрезать чужеродную экзогенную ДНК, и нацеливается на них. Были описаны многочисленные типы и классы систем CRISPR/Cas (см., например, Koonin *et al.*, (2017) *Curr Opin Microbiol* 37:67-78).

CrRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-Cas9 посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, как правило, с 20-нуклеотидной (нукл.) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности из 20 нуклеотидов на 5'-конце в crRNA позволяет нацеливать комплекс CRISPR-Cas9 на конкретные локусы. Комплекс CRISPR-Cas9 связывает только последовательности ДНК, которые содержат последовательность, соответствующую первым 20 нуклеотидам crRNA, если за целевой последовательностью следует конкретный короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый мотивом, примыкающим к протоспейсеру (PAM).

TracrRNA гибридизуется с 3'-концом crRNA с образованием структуры РНК-дуплекса, которая связывается эндонуклеазой Cas9 с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-Cas9, который затем может расщеплять целевую ДНК.

Как только комплекс CRISPR-Cas9 связывается с ДНК в целевом сайте, каждый из двух независимых нуклеазных доменов в ферменте Cas9 расщепляет одну из нитей ДНК выше сайта PAM, оставляя двухнитевый разрыв (DSB), при этом обе нити ДНК заканчиваются парой оснований (тупым концом).

После связывания комплекса CRISPR-Cas9 с ДНК в конкретном целевом сайте и образования сайт-специфического DSB следующим ключевым шагом является репарация DSB. Клетки используют два основных пути репарации ДНК для репарации DSB: негомологичное соединение концов (NHEJ) и направляемая гомологией репарация (HDR).

NHEJ представляет собой надежный механизм репарации, который проявляет высокую активность в большинстве типов клеток, включая неделящиеся клетки. NHEJ подвержен ошибкам и часто может приводить к удалению или добавлению от одного до нескольких сотен нуклеотидов в сайте DSB, хотя такие модификации обычно составляют < 20 нуклеотидов. Полученные в результате вставки и делеции (вставки/делеции) могут нарушать кодирующие или некодирующие области генов. В качестве альтернативы, при HDR используется длинный отрезок гомологичной донорной ДНК, представленной эндогенно или экзогенно, для репарации DSB с высокой точностью. HDR активна только в делящихся клетках и происходит с относительно низкой частотой в большинстве типов клеток. Во многих вариантах осуществления настоящего изобретения NHEJ используется в качестве операнта репарации.

(a) Cas9

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9) используют в способе CRISPR для получения генетически сконструированных Т-клеток, раскрытых в данном документе. Фермент Cas9 может представлять собой фермент из *Streptococcus pyogenes*, хотя также можно использовать другие гомологи Cas9. Следует учитывать, что могут быть использованы Cas9 дикого типа

или могут быть использованы модифицированные версии Cas9 (например, развитые версии Cas9, или ортологи, или варианты Cas9), представленные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит белок нуклеазу Cas9, полученную из *Streptococcus pyogenes*, которая была сконструирована таким образом, что содержит С- и N-концевые последовательности ядерной локализации (NLS) большого Т-антигена SV40. Полученная нуклеаза Cas9 (sNLS-spCas9-sNLS) представляет собой белок с молекулярной массой 162 кДа, который продуцируется посредством ферментации с применением рекомбинантной бактерии *E. coli* и очищается посредством хроматографии. Аминокислотная последовательность spCas9 может быть найдена в UniProt под номером доступа Q99ZW2, которая представлена в данном документе как SEQ ID NO: 55.

(b) Направляющие РНК (gRNA)

Опосредованное CRISPR-Cas9 редактирование генов, описанное в данном документе, предусматривает применение направляющей РНК или gRNA. Используемый в данном документе термин "gRNA" относится к нуклеиновой кислоте, нацеливающейся на геном, которая способна направлять Cas9 к конкретной целевой последовательности в пределах гена *TRAC* или гена $\beta 2M$ для редактирования гена в конкретной целевой последовательности. Направляющая РНК содержит по меньшей мере спейсерную последовательность, которая гибридизуется с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты в пределах целевого гена для редактирования и с последовательностью повтора CRISPR.

Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, представлена под SEQ ID NO: 18 или 22. См. таблицу последовательностей ниже. См. также WO 2019/097305A2, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки для заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с применением последовательности гена *TRAC*, расположенной на хромосоме 14 (GRCh38: хромосома 14: 22,547,506-22,552,154; Ensembl; ENSG00000277734). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область *TRAC*, и Cas9 создают разрывы в геномной области *TRAC*, что приводит к вставкам/делециям в гене *TRAC* с нарушением экспрессии мРНК или белка.

Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, представлена под SEQ ID NO: 20 или 24. См. таблицу последовательностей ниже. См. также WO 2019/097305A2, соответствующие раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе. Другие последовательности gRNA могут быть разработаны с применением последовательности гена $\beta 2M$, расположенной на хромосоме 15 (координаты GRCh38: хромосома 15: 44,711,477-44,718,877; Ensembl: ENSG00000166710). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область $\beta 2M$, и РНК-направляемая нуклеаза создают разрывы в геномной области $\beta 2M$, что приводит к вставкам/делециям в гене $\beta 2M$ с нарушением экспрессии мРНК или белка.

В системах типа II gRNA также содержит вторую РНК, называемую последовательностью tracrRNA. В gRNA типа II последовательность повтора CRISPR и последовательность tracrRNA гибридизуются друг с другом с образованием дуплекса. В gRNA типа V crRNA образует дуплекс. В обеих системах дуплекс связывает сайт-направленный полипептид таким образом, что направляющая РНК и сайт-направленный полипептид образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, обеспечивает специфичность комплекса в отношении мишени посредством его ассоциации с сайт-направленным полипептидом. Таким образом, нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном, направляет активность сайт-направленного полипептида.

Как понятно специалисту в данной области техники, каждая направляющая РНК сконструирована таким образом, что она содержит спейсерную последовательность, которая комплементарна ее геномной целевой последовательности. См. Jinek *et al.*, *Science*, 337, 816-821 (2012) и Deltcheva *et al.*, *Nature*, 471, 602-607 (2011).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном (например gRNA), представляет собой направляющую РНК, состоящую из двух молекул. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, нацеливающаяся на геном (например gRNA), представляет собой направляющую РНК, состоящую из одной молекулы.

Направляющая РНК, состоящая из двух молекул, содержит две нити молекул РНК. Первая нить содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность и минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая нить содержит минимальную последовательность tracrRNA (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA.

Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (называемая "sgRNA"), в системе типа II содержит в направлении 5'-3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повтора CRISPR, линкер направляющей молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, минимальную последовательность tracrRNA, 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительные функциональные свойства (например стабильность). Линкер направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной молекулы, связывает минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность tracrRNA с образованием шпилечной структуры. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, содержит одну или несколько шпилек. Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы, в системе типа V содержит в

направлении 5'-3' минимальную последовательность повтора CRISPR и спейсерную последовательность.

"Целевая последовательность" находится в целевом гене, который примыкает к последовательности PAM и представляет собой последовательность для модификации с помощью Cas9. "Целевая последовательность" находится на так называемой PAM-нити в "целевой нуклеиновой кислоте", которая представляет собой двухнитевую молекулу, содержащую PAM-нить и комплементарную нить, отличную от PAM. Специалист в данной области техники поймет, что спейсерная последовательность gRNA гибридизуется с комплементарной последовательностью, расположенной в нити, отличной от PAM, целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Таким образом, спейсерная последовательность gRNA представляет собой РНК-эквивалент целевой последовательности.

Например, если целевая последовательность TRAC представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 26), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 19). В другом примере, если целевая последовательность β 2M представляет собой 5'-GCTACTCTCTTTCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 27), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-GCUACUCUCUCUUCUGGCC-3' (SEQ ID NO: 21). Спейсер gRNA взаимодействует с целевой нуклеиновой кислотой, представляющей интерес, специфическим в отношении последовательности образом посредством гибридизации (т. е. спаривания оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность спейсера варьируется в зависимости от целевой последовательности целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

В системе CRISPR/Cas, описанной в данном документе, спейсерная последовательность предназначена для гибридизации с областью целевой нуклеиновой кислоты, которая расположена в 5'-направлении от PAM, распознаваемого ферментом Cas9, используемым в системе. Спейсер может полностью соответствовать целевой последовательности или может иметь несоответствия. Для каждого фермента Cas9 имеется конкретная последовательность PAM, которую он распознает в целевой ДНК. Например, *S. pyogenes* распознает в целевой нуклеиновой кислоте PAM, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R представляет собой A либо G, где N представляет собой любой нуклеотид, и при этом N находится непосредственно рядом с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацеливается спейсерная последовательность, в 3'-направлении от нее.

В некоторых вариантах осуществления длина последовательности целевой нуклеиновой кислоты составляет 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой нуклеиновой кислоты составляет менее чем 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой нуклеиновой кислоты составляет более чем 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше

нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой нуклеиновой кислоты составляет не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20 оснований непосредственно рядом с первым нуклеотидом PAM в 5'-направлении от него. Например, в последовательности, содержащей 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', целевая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность, которая соответствует множеству N, где N может представлять собой любой нуклеотид, а подчеркнутая последовательность NRG представляет собой PAM *S. pyogenes*. Примеры представлены в виде SEQ ID NO: 15-17.

Направляющая РНК, раскрытая в данном документе, может нацеливаться на любую последовательность, представляющую интерес, посредством спейсерной последовательности в crRNA. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между спейсерной последовательностью направляющей РНК и целевой последовательностью в целевом гене может составлять приблизительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевом гене являются на 100% комплементарными. В других вариантах осуществления спейсерная последовательность направляющей РНК и целевая последовательность в целевом гене могут содержать до 10 ошибочно спаренных оснований, например, до 9, до 8, до 7, до 6, до 5, до 4, до 3, до 2 или до 1 ошибочно спаренного основания.

Неограничивающие примеры gRNA, которые можно использовать, как предусмотрено в данном документе, представлены в WO 2019/097305A2 и WO2019/215500, соответствующие раскрытия каждой из которых включены в данный документ посредством ссылки для целей и заявляемого объекта, упомянутых в данном документе. Для любой из последовательностей gRNA, предусмотренных в данном документе, подразумевается, что последовательности, для которых явно не указано, что они содержат модификации, охватывают как немодифицированные последовательности, так и последовательности, содержащие любые подходящие модификации.

Длина спейсерной последовательности в любой из gRNA, раскрытых в данном документе, может зависеть от системы CRISPR/Cas9 и компонентов, используемых для редактирования любого из целевых генов, также раскрытых в данном документе. Например, разные белки Cas9 из разных видов бактерий характеризуются варьирующими значениями длины оптимальной спейсерной последовательности. Соответственно, длина спейсерной последовательности может составлять 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более чем 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности может составлять 18-24 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления длина нацеливаемой последовательности может составлять 19-21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления длина спейсерной последовательности может составлять 20

нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления gRNA может представлять собой sgRNA, которая может содержать спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA может содержать спейсерную последовательность из менее чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA может содержать спейсерную последовательность из более чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность варьирующей длины из 17-30 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA.

В некоторых вариантах осуществления sgRNA не содержит урацил на 3'-конце последовательности sgRNA. В других вариантах осуществления sgRNA может содержать один или несколько остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA. Например, sgRNA может содержать 1-8 остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков урацила на 3'-конце последовательности sgRNA.

Любая из gRNA, раскрытых в данном документе, включая любую из sgRNA, может быть немодифицированной. В качестве альтернативы, она может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов и/или модифицированных каркасов. Например, модифицированная gRNA, такая как sgRNA, может содержать один или несколько нуклеотидов с 2'-О-метилфосфороатными связями, которые могут располагаться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах.

В определенных вариантах осуществления более чем одна направляющая РНК может быть использована с нуклеазной системой CRISPR/Cas. Каждая направляющая РНК может содержать отличающуюся нацеливающуюся последовательность, так что система CRISPR/Cas расщепляет более чем одну целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько направляющих РНК могут обладать одинаковыми или различающимися свойствами, такими как активность или стабильность в комплексе Cas9 RNP. При использовании более чем одной направляющей РНК направляющая РНК может быть кодирована на одном и том же или на разных векторах. Промоторы, используемые для управления экспрессией более чем одной направляющей РНК, являются одинаковыми или разными.

Следует понимать, что более чем один подходящий Cas9 и более чем одну подходящую gRNA можно использовать в способах, описанных в данном документе, например в способах, известных из уровня техники или раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы включают фермент Cas9 и/или gRNA, известные из уровня техники. Примеры можно найти, например, в WO 2019/097305A2 и WO2019/215500, соответствующие раскрытия каждой из которых включены в настоящий документ посредством ссылки для целей и заявленного объекта, упомянутых в данном документе.

(ii) Векторы на основе AAV для доставки конструкций CAR к T-клеткам

Нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию CAR к CD19, раскрытую в данном документе, может быть доставлена в клетку с применением аденоассоциированного вируса (AAV). AAV представляют собой небольшие вирусы, которые сайтспецифическим образом интегрируются в геном хозяина и поэтому могут доставлять трансген, такой как CAR. Инвертированные концевые повторы (ITR) присутствуют, фланкируя геном AAV и/или представляющий интерес трансген, и служат точками начала репликации. В геноме AAV также присутствуют белки *gP* и *gC*, которые при транскрипции образуют капсиды, которые инкапсулируют геном AAV для доставки в целевые клетки. Поверхностные рецепторы на этих капсидах обеспечивают серотип AAV, который определяет, с какими целевыми органами капсиды будут в первую очередь связываться, и, таким образом, какие клетки будут наиболее эффективно заражаться AAV. В настоящее время известно двенадцать серотипов AAV человека. В некоторых вариантах осуществления AAV для применения для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, представляет собой AAV серотипа 6 (AAV6).

Аденоассоциированные вирусы входят в число наиболее часто используемых вирусов для генной терапии по нескольким причинам. Во-первых, AAV не вызывают иммунного ответа при введении млекопитающим, включая людей. Во-вторых, AAV эффективно доставляют в целевые клетки, особенно при рассмотрении выбора подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Эта особенность делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к CD19, может быть сконструирована для вставки в геномный сайт, представляющий интерес, в Т-клетках хозяина. В некоторых вариантах осуществления целевой геномный сайт может находиться в локусе типа "safe harbor".

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к CD19 (например, посредством донорной матрицы, которая может переноситься вирусным вектором, таким как аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор), может быть сконструирована таким образом, что она может быть вставлена в участок в пределах гена *TRAC* с нарушением гена *TRAC* в генетически сконструированных Т-клетках и экспрессии полипептида CAR. Нарушение *TRAC* приводит к потере функции эндогенного TCR. Например, нарушение в гене *TRAC* может быть создано с помощью эндонуклеазы, такой как описанная в данном документе, и одной или нескольких gRNA, нацеливающих на одну или несколько геномных областей *TRAC*. Для этой цели можно использовать любую из gRNA, специфических в отношении гена *TRAC* и целевых областей, например gRNA, раскрытые в данном документе.

В некоторых примерах геномная делеция в гене *TRAC* и замена кодирующим сегментом CAR могут быть созданы посредством репарации, направляемой гомологией, или HDR (например с применением донорной матрицы, которая может представлять

собой часть вирусного вектора, такого как аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор). В некоторых вариантах осуществления нарушение в гене *TRAC* может быть создано с помощью эндонуклеазы, раскрытой в данном документе, и одной или нескольких gRNA, нацеливающих на одну или несколько геномных областей *TRAC*, и вставки сегмента, кодирующего *CAR*, в ген *TRAC*.

Донорная матрица, раскрытая в данном документе, может содержать кодирующую последовательность *CAR*. В некоторых примерах последовательность, кодирующая *CAR*, может быть фланкирована двумя областями гомологии для обеспечения эффективной HDR в участке генома, представляющем интерес, например в гене *TRAC*, с применением технологии редактирования генов CRISPR-Cas9. В этом случае обе нити ДНК в целевом локусе могут быть разрезаны ферментом Cas9 CRISPR, направляемым с помощью gRNA, специфических в отношении целевого локуса. Затем происходит HDR для репарации двухнитевого разрыва (DSB) и вставки донорной ДНК, кодирующей *CAR*. Для того чтобы это происходило корректно, донорная последовательность конструируется с фланкирующими остатками, которые комплементарны последовательности, окружающей сайт DSB в целевом гене (далее "плечи гомологии"), таком как ген *TRAC*. Эти плечи гомологии служат матрицей для репарации DSB и позволяют HDR быть практически безошибочным механизмом. Скорость репарации, направляемой гомологией (HDR), зависит от расстояния между мутацией и сайтом разрезания, поэтому важно выбрать перекрывающиеся или близлежащие целевые сайты. Матрицы могут содержать дополнительные последовательности, фланкированные гомологичными областями, или могут содержать последовательность, которая отличается от геномной последовательности, таким образом обеспечивая редактирование последовательности.

В качестве альтернативы, донорная матрица может не содержать областей гомологии с целевым участком в ДНК и может быть интегрирована посредством NHEJ-зависимого соединения концов после расщепления в целевом сайте.

Донорная матрица может представлять собой ДНК или РНК, быть одонитевой и/или двухнитевой, и может быть введена в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности можно защитить (например от экзонуклеолитической деградации) посредством способов, известных специалистам в данной области техники. Например, один или несколько дидезоксинуклеотидных остатков добавляются к 3'-концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируются с одним или обоими концами. См., например, Chang *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls *et al.*, (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают без ограничения добавление концевой аминокислотной группы(аминокислот) и применение модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфороксиатные, фосфорамидатные, и остатки O-метилрибозы или дезоксирибозы.

Донорная матрица может быть введена в клетку как часть векторной молекулы, содержащей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала

репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Более того, донорная матрица может быть введена в клетку в виде депротенинизированной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты со средством, таким как липосома или полксамер, или может быть доставлена вирусами (например, аденовирусом, AAV, вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с дефектной интегразой (IDLV)).

В некоторых вариантах осуществления донорная матрица может быть вставлена в сайт рядом с эндогенным промотором (например ниже или выше) таким образом, что ее экспрессия может управляться эндогенным промотором. В других вариантах осуществления донорная матрица может содержать экзогенный промотор и/или энхансер, например, конститутивный промотор, индуцируемый промотор или тканеспецифический промотор для контроля экспрессии гена CAR. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор EF1 α . Можно использовать другие промоторы.

Кроме того, экзогенные последовательности также могут включать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренние участки посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды 2A и/или сигналы полиаденилирования.

Для получения генетически сконструированных иммунных клеток (например Т-клеток, раскрытых в данном документе), иммунные клетки, такие как Т-клетки, могут быть получены из подходящего источника, например клеток крови от донора-человека, который может представлять собой здорового донора или пациента, нуждающегося в терапии с применением Т-клеток с CAR. Клетки CTX110 можно получить с применением клеток крови от одного или нескольких здоровых доноров-людей. Получение из клеток здорового донора минимизирует риск непреднамеренной трансдукции злокачественных клеток лимфомы/лейкоза и потенциально может улучшить функциональность Т-клеток с CAR. Компоненты системы CRISPR (например белок Cas9 и gRNA), необязательно донорная матрица AAV, могут быть доставлены в иммунные клетки хозяина посредством общепринятых подходов. В некоторых примерах Cas9 и gRNA могут образовывать рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP), который может быть доставлен в иммунные клетки хозяина посредством электропорации. Необязательно донорная матрица AAV может быть доставлена в иммунные клетки одновременно с комплексом RNP. В качестве альтернативы, доставка RNP и донорной матрицы AAV может осуществляться последовательно. В некоторых примерах Т-клетки могут быть активированы до доставки компонентов для редактирования генов.

После доставки компонентов для редактирования генов и необязательно донорной матрицы клетки могут быть выделены и размножены *in vitro*. Эффективность редактирования генов можно оценить с применением стандартных способов для подтверждения нокаута CAR к CD19 и нокаута целевых генов (например, *TRAC*, *B2M* или обоих). В некоторых примерах TCR $\alpha\beta^+$ Т-клетки могут быть удалены. Дополнительную

информацию о получении генетически сконструированных иммунных клеток, раскрытых в данном документе, таких как клетки СТХ110, можно найти в заявке на патент США № 62/934991, соответствующие раскрытия которой включены посредством ссылки для цели и рассматриваемого предмета, упомянутых в данном документе.

III. Терапия В-клеточных злокачественных новообразований с применением аллогенных Т-клеток с CAR

В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены способы лечения пациента-человека, имеющего В-клеточное злокачественное новообразование, с применением популяции любых генетически сконструированных Т-клеток с CAR к CD19, таких как Т-клетки СТХ110, раскрытые в данном документе. Терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19 может предусматривать две стадии лечения: (i) режим кондиционирования (лимфодеплецирующее лечение), который включает введение одной или нескольких доз одного или нескольких лимфодеплецирующих средств подходящему пациенту-человеку, и (ii) режим лечения (терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19), который включает введение пациенту-человеку популяции аллогенных Т-клеток с CAR к CD19, таких как Т-клетки СТХ110, раскрытые в данном документе.

(i) Группа пациентов

Пациент-человек может быть любым субъектом-человеком, для которого требуются постановка диагноза, лечение или терапия. Пациент-человек может быть любого возраста. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек является взрослым (например человеком, возраст которого составляет по меньшей мере 18 лет). В некоторых примерах пациент-человек может характеризоваться весом тела, составляющим 50 кг или больше. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек может быть ребенком.

Пациент-человек, подлежащий лечению посредством способов, описанных в данном документе, может быть пациентом-человеком, имеющим В-клеточное злокачественное новообразование, характеризующимся подозрением на его наличие, или характеризующимся риском его наличия. Субъект с подозрением на наличие В-клеточного злокачественного новообразования может демонстрировать один или несколько симптомов В-клеточного злокачественного новообразования, например, необъяснимую потерю веса, усталость, ночную потливость, одышку или опухшие железы. Субъект с риском развития В-клеточного злокачественного новообразования может быть субъектом, характеризующимся одним или несколькими факторами риска развития В-клеточного злокачественного новообразования, например, ослабленной иммунной системой, возрастом, мужским полом или инфекцией (например инфекцией, вызванной вирусом Эпштейна-Барра). Пациента-человека, которому требуется лечение с применением Т-клеток с CAR к CD19 (например Т-клеток СТХ110), можно идентифицировать посредством обычного медицинского обследования, например, физического обследования, лабораторных тестов, биопсии (например биопсии костного

мозга и/или биопсии лимфатических узлов), сканирования посредством магнитно-резонансной томографии (MRI) или ультразвуковых исследований.

Примеры В-клеточных злокачественных новообразований, которые можно лечить с применением способов, описанных в данном документе, включают без ограничения диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с перегруппировкой MYC и BCL2 и/или BCL6, трансформированную фолликулярную лимфому (FL), FL степени 3b или трансформацию хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) по Рихтеру. В некоторых примерах В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой DLBCL, например DLBCL высокой степени злокачественности или неутонченную DLBCL (NOS). В некоторых примерах В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой трансформированную FL или FL степени 3b. В некоторых примерах пациент-человек имеет по меньшей мере один поддающийся измерению патологический очаг, который является положительным по результатам позитронно-эмиссионной томографии (PET) с применением фтордезоксиглюкозы.

В некоторых вариантах осуществления человек, подлежащий лечению, имеет DLBCL и демонстрирует наличие параректальной массы, ретроперитонеальной массы, диффузных лимфатических узлов (LN), литических патологических очагов, патологического очага в миндалинах или их комбинации. В качестве альтернативы или в дополнение, пациент-человек может характеризоваться диффузией в костный мозг. В других примерах пациент-человек не характеризуется диффузией в костный мозг.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек, подлежащий лечению, имеет трансформированную FL. Такой пациент-человек может демонстрировать диффузные LN. В некоторых случаях пациент-человек может характеризоваться диффузией в костный мозг. В других случаях пациент-человек может не характеризоваться диффузией в костный мозг.

Пациент-человек, подлежащий лечению посредством способов, описанных в данном документе, может быть пациентом-человеком, который испытал рецидив после лечения, и/или который стал устойчивым к лечению, и/или который характеризовался отсутствием ответа на лечение. Используемый в данном документе термин "рецидив" или "рецидивы" относится к В-клеточному злокачественному новообразованию, такому как новообразования, раскрытые в данном документе, которые возвращаются после периода полного ответа. Прогрессирующее заболевание относится к случаю, когда заболевание ухудшается после последней оценки (например стабильное заболевание или частичный ответ). В некоторых вариантах осуществления прогрессирование имеет место в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления рецидив имеет место после лечения. Отсутствие ответа может быть определено посредством стандартной медицинской практики. Например, пациент-человек, подлежащий лечению посредством способов, описанных в данном документе, может быть пациентом-человеком, который ранее прошел одну или несколько линий предшествующей противораковой терапии. В

некоторых случаях пациент-человек может пройти две или более линий предшествующей противораковой терапии, например, химиотерапии, иммунотерапии, хирургического вмешательства или их комбинации. В некоторых примерах виды предшествующей противораковой терапии могут включать терапию с применением антитела к CD20, терапию, предусматривающую антрациклин, или их комбинацию.

В некоторых случаях пациент-человек имеет рефрактерное В-клеточное злокачественное новообразование. Используемый в данном документе термин "рефрактерный" относится к В-клеточному злокачественному новообразованию, такому как новообразования, раскрытые в данном документе, которое не отвечает на лечение или становится устойчивым к лечению. Пациент-человек, имеющий рефрактерное В-клеточное злокачественное новообразование, может страдать прогрессирующим заболеванием в ходе последней терапии или страдать стабильным заболеванием после по меньшей мере двух циклов терапии с продолжительностью стабильного заболевания до 6 месяцев (например, до 5 месяцев, до 4 месяцев, или до 3 месяцев, или до 2 месяцев, или до 1 месяца). В некоторых случаях пациент-человек мог ранее пройти предшествующую аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) и не демонстрировал ответа на такую трансплантацию (она была неэффективна), или он характеризовался прогрессированием или рецидивом после достижения определенного ответа. В других случаях пациент-человек может не соответствовать требованиям предшествующей аутологичной HSCT.

Пациента-человека можно подвергнуть скринингу для определения того, соответствует ли он требованиям прохождения режима кондиционирования (лимфодеплецирующего лечения) и/или терапии с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19, раскрытой в данном документе. Например, у пациента-человека, который соответствует требованиям лимфодеплеционного лечения, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (а) значительное ухудшение клинического статуса, (b) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 90%, (c) неконтролируемая сердечная аритмия, (d) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (e) активная инфекция и (e) острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени. В другом примере у пациента-человека, который соответствует требованиям режима лечения, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (а) активная неконтролируемая инфекция; (b) ухудшение клинического статуса по сравнению с клиническим статусом до лимфодеплеционного лечения; и (c) острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

Пациента-человека можно подвергнуть скринингу и исключить из режима кондиционирования и/или режима лечения на основании таких результатов скрининга. Например, пациента-человека можно исключить из режима кондиционирования и/или терапии с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19, если он соответствует одному или нескольким из следующих критериев исключения: (а) характеризуется функциональным статусом 0 или 1 согласно Восточной объединенной онкологической

группе (ECOG); (b) приемлемая функция почек, печени, сердца и/или легких; (c) не прошел предшествующей генной терапии или терапии с применением модифицированных клеток; (d) не прошел предшествующего лечения, предусматривающего антитело к CD19; (e) не прошел предшествующей аллогенной HSCT; (f) не имеет выявляемых злокачественных клеток в спинномозговой жидкости; (g) не имеет метастазов в головной мозг; (h) не страдает предшествующими нарушениями центральной нервной системы; (i) не страдает нестабильной стенокардией, аритмией и/или инфарктом миокарда; (j) не характеризуется неконтролируемой инфекцией; (k) не страдает иммунодефицитными нарушениями или аутоиммунными нарушениями, требующими иммуносупрессивной терапии, и (l) не характеризуется инфекцией вирусом иммунодефицита человека, вирусом гепатита В или вирусом гепатита С.

(ii) Режим кондиционирования (лимфодеплецирующая терапия)

Любые пациенты-люди, подходящие для способов лечения, раскрытых в данном документе, могут проходить лимфодеплецирующую терапию для снижения количества или деплеции эндогенных лимфоцитов у субъекта.

Лимфодеплеция относится к разрушению эндогенных лимфоцитов и/или Т-клеток, которое обычно используется перед иммунотрансплантацией и иммунотерапией. Лимфодеплецию можно достичь посредством облучения и/или химиотерапии. "Лимфодеплецирующее средство" может представлять собой любую молекулу, способную обеспечивать снижение количества, деплецию или устранение эндогенных лимфоцитов и/или Т-клеток при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецирующие средства вводятся в количестве, эффективном для снижения количества лимфоцитов на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% по сравнению с количеством лимфоцитов до введения средств. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецирующие средства вводятся в количестве, эффективном для снижения количества лимфоцитов таким образом, что количество лимфоцитов у субъекта ниже пределов выявления. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводится по меньшей мере одно (например, 2, 3, 4, 5 или больше) лимфодеплецирующее средство.

В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецирующие средства представляют собой цитотоксические средства, которые специфически уничтожают лимфоциты. Примеры лимфодеплецирующих средств включают без ограничения флударабин, циклофосфамид, бендамустин, 5-фторурацил, гемцитабин, метотрексат, дакарбазин, мелфалан, доксорубин, винбластин, цисплатин, оксалиплатин, паклитаксел, доцетаксел, иринотекан, фосфат этопсида, митоксантрон, кладрибин, денилейкин дифтитокс или DAB-IL2. В некоторых случаях лимфодеплецирующее средство может сопровождаться облучением в низких дозах. Лимфодеплеционный эффект режима кондиционирования можно подвергать мониторингу посредством стандартной практики.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, включает режим кондиционирования, который включает одно или несколько

лимфодеплецирующих средств, например флударабин и циклофосфамид. Пациент-человек, подлежащий лечению посредством способа, описанного в данном документе, может получать несколько доз одного или нескольких лимфодеплецирующих средств в течение подходящего периода (например 1-5 дней) на стадии кондиционирования. Пациент может получать одно или несколько лимфодеплецирующих средств один раз в день в течение периода лимфодеплеции. В одном примере пациент-человек получает флударабин при приблизительно 20-50 мг/м² (например 30 мг/м²) в день в течение 2-4 дней (например 3 дней) и циклофосфамид при приблизительно 500-750 мг/м² (например 500 или 750 мг/м²) в день в течение 2-4 дней (например 3 дней). В конкретных примерах пациент-человек может получать флударабин при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфамид при приблизительно 500 мг/м² в день в течение трех дней. В других конкретных примерах пациент-человек может получать флударабин при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфамид при приблизительно 750 мг/м² в день в течение трех дней.

Пациенту-человеку затем можно вводить любую из Т-клеток с CAR к CD19, таких как клетки CTX110, в течение подходящего периода времени после лимфодеплецирующей терапии, раскрытой в данном документе. Например, пациента-человека можно подвергать воздействию одного или нескольких лимфодеплецирующих средств за приблизительно 2-7 дней (например, за 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней) до введения Т-клеток с CAR+ к CD19 (например клеток CTX110). В некоторых случаях пациенту-человеку вводятся Т-клетки с CAR+ к CD19 (например клетки CTX110) в течение приблизительно 4-5 дней после лимфодеплецирующей терапии.

Поскольку аллогенные Т-клетки с CAR к CD19, такие как клетки CTX110, могут быть получены заранее и могут храниться в лечебном учреждении, лимфодеплецирующая терапия, раскрытая в данном документе, может быть применена к пациенту-человеку, имеющему В-клеточное злокачественное новообразование, в течение короткого временного окна (например в течение 2 недель) после того, как пациент-человек идентифицирован как подходящий для терапии с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19, раскрытой в данном документе. Например, первая доза лимфодеплецирующего средства терапии (например флударабина при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфамида при приблизительно 500 мг/м² или 750 мг/м²) может быть введена пациенту-человеку в течение двух недель (например, в течение 10 дней, в течение 9 дней, в течение 8 дней, в течение 7 дней, в течение 6 дней, в течение 5 дней, в течение 4 дней, в течение 3 дней, в течение двух дней или меньше) после того, как пациент-человек идентифицирован как подходящий для терапии с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19. В некоторых примерах лимфодеплецирующая терапия может быть применена к пациенту-человеку в течение 24-72 часов (например в течение 24 часов) после того, как пациент-человек идентифицирован как подходящий для лечения. Затем пациенту можно вводить CAR-Т-клетки в течение 2-7 дней (например, например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней) после лимфодеплецирующего лечения. Это позволяет своевременно лечить пациента-человека с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19, раскрытых в

данном документе, таких как клетки СТХ110, после диагностики заболевания и/или идентификации пациента без задержки (например задержки вследствие получения терапевтических клеток). В определенных случаях пациент может проходить лечение в ходе стационарного лечения в больнице. В определенных случаях пациент может проходить лечение в амбулаторных условиях.

Перед любой из стадий лимфодеплеции пациента-человека можно подвергнуть скринингу в отношении одного или нескольких признаков, для того, чтобы определить, соответствует ли пациент требованиям лимфодеплеционного лечения. Например, до лимфодеплеции у пациента-человека, который соответствует требованиям лимфодеплеционного лечения, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (а) значительное ухудшение клинического статуса, (б) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 90%, (с) неконтролируемая сердечная аритмия, (d) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (е) активная инфекция и (е) острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

После лимфодеплеции пациента-человека можно подвергнуть скринингу в отношении одного или нескольких признаков для того, чтобы определить, соответствует ли пациент требованиям для лечения с применением Т-клеток с CAR к CD19, таких как клетки СТХ110. Например, до лечения с применением Т-клеток с CAR к CD19 и после лимфодеплеционного лечения у пациента-человека, который соответствует требованиям для лечения с применением Т-клеток с CAR к CD19, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (а) активная неконтролируемая инфекция; (б) ухудшение клинического статуса по сравнению с клиническим статусом до лимфодеплеционного лечения; и (с) острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

(iii) Введение Т-клеток с CAR к CD19

Введение Т-клеток с CAR к CD19 может включать перенос (например трансплантацию) популяции генетически сконструированных Т-клеток, раскрытой в данном документе (например клеток СТХ110), пациенту-человеку, как также раскрыто в данном документе, посредством способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации популяции генетически сконструированных Т-клеток в необходимом участке, таком как участок опухоли, таким образом, что может быть достигнут необходимый эффект(эффекты). Популяцию генетически сконструированных Т-клеток можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от такого короткого, как от нескольких часов, например двадцати четырех часов, до нескольких дней, до нескольких недель или месяцев, до такого длинного, как несколько лет или даже вся продолжительность жизни субъекта, т. е. при долговременном приживлении. В некоторых случаях пациент может получать популяцию генетически сконструированных Т-клеток

(например клеток СТХ110) в ходе стационарного лечения в больнице. В некоторых случаях пациент может получать популяцию генетически сконструированных Т-клеток (например клеток СТХ110) в ходе лечения в амбулаторных условиях.

Например, в некоторых аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции можно вводить посредством системного пути введения, такого как интраперитонеальный или внутривенный путь.

В некоторых вариантах осуществления популяция генетически сконструированных Т-клеток вводится системно, что относится к введению популяции клеток не непосредственно в целевой участок, ткань или орган, а таким образом, что вместо этого они достигают кровеносной системы субъекта и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам. Подходящие способы введения включают инъекцию, инфузию, введение по каплям или проглатывание. Инъекция включает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, внутриспинномозговую и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления путь является внутривенным.

Эффективное количество относится к количеству генетически сконструированных Т-клеток в популяции, необходимому для предупреждения или облегчения по меньшей мере одного или нескольких признаков или симптомов медицинского состояния (например В-клеточного злокачественного новообразования), и относится к количеству генетически сконструированных Т-клеток в популяции, достаточному для обеспечения необходимого эффекта, например для лечения субъекта, имеющего медицинское состояние. Эффективное количество также включает количество, достаточное для предупреждения или задержки развития симптома заболевания, изменения хода развития симптома заболевания (например, без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания) или устранения симптома заболевания. Понятно, что для любого данного случая подходящее эффективное количество может быть определено специалистом в данной области техники посредством проведения стандартных экспериментов.

Эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции может составлять от приблизительно 1×10^7 CAR⁺ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток, например от приблизительно 1×10^7 клеток до приблизительно 1×10^9 клеток, которые экспрессируют CAR, который связывает CD19 (CAR⁺ клетки). В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции может составлять по меньшей мере 1×10^7 CAR⁺ клеток СТХ110, по меньшей мере 3×10^7 CAR⁺ клеток СТХ110, по меньшей мере 1×10^8 CAR⁺ клеток СТХ110, по меньшей мере 3×10^8 CAR⁺ клеток СТХ110 или по меньшей мере 1×10^9 CAR⁺ клеток

CTX110. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции может составлять дозу популяции генетически сконструированных Т-клеток, например дозу, содержащую от приблизительно 1×10^7 клеток CTX110 до приблизительно 1×10^9 клеток CTX110.

Эффективность терапии с применением Т-клеток с CAR к CD19, описанной в данном документе, может определить квалифицированный врач. Терапия с применением Т-клеток с CAR к CD19 (например, включая клетки CTX110) считается "эффективной", если один или все признаки или симптомы, например уровни CD19, изменяются благоприятным образом (например снижаются на по меньшей мере 10%), или улучшаются или ослабляются другие клинически приемлемые симптомы или маркеры В-клеточного злокачественного новообразования. Эффективность также можно измерить по отсутствию ухудшения состояния субъекта, что оценивается по госпитализации или необходимости в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование В-клеточного злокачественного новообразования останавливается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение В-клеточного злокачественного новообразования у пациента-человека и включает: (1) подавление заболевания, например остановку или замедление прогрессирования симптомов, или (2) облегчение заболевания, например регрессию симптомов, и (3) предупреждение или снижение вероятности развития симптомов.

После каждого введения дозы Т-клеток с CAR к CD110 пациента-человека можно подвергнуть мониторингу в отношении острой токсичности, такой как синдром лизиса опухоли (TLS), синдром высвобождения цитокинов (CRS), синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (ICANS), аплазия В-клеток, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), цитопения, реакция "трансплантат против хозяина" (GvHD), гипертония, почечная недостаточность или их комбинация.

Если у пациента-человека проявляются один или несколько симптомов острой токсичности, то пациента-человека можно подвергнуть контролю токсичности. Из уровня техники известны способы лечения пациентов, у которых проявляются один или несколько симптомов острой токсичности. Например, пациенту-человеку, у которого проявляется симптом CRS (например, сердечные, дыхательные и/или неврологические аномалии), может быть введено антицитокиновое терапевтическое средство. Кроме того, пациенту-человеку, у которого не проявляется симптом CRS, может быть введено антицитокиновое терапевтическое средство для стимуляции пролиферации Т-клеток с CAR к CTX110.

В качестве альтернативы или в дополнение, если у пациента-человека проявляются один или несколько симптомов острой токсичности, то лечение пациента-человека может быть прекращено. Лечение пациента также может быть прекращено, если у пациента проявляются один или несколько признаков нежелательного явления (АЕ), например, пациент характеризуется отклонениями лабораторных показателей, и/или пациент

демонстрирует признаки прогрессирования заболевания.

Терапию с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD19 (например, включая клетки CTX110), описанную в данном документе, также можно использовать в видах комбинированной терапии. Например, способы лечения с применением Т-клеток с CAR к CD19, описанные в данном документе, можно использовать совместно с другими терапевтическими средствами для лечения В-клеточного злокачественного новообразования, или для повышения эффективности популяции генетически сконструированных Т-клеток, и/или снижения проявления побочных эффектов от популяции генетически сконструированных Т-клеток.

IV. Набор для терапии В-клеточных злокачественных новообразований с применением аллогенных Т-клеток с CAR

Настоящее изобретение также предусматривает наборы для применения популяции Т-клеток с CAR к CD19, таких как клетки CTX110, описанные в данном документе, в способах лечения В-клеточного злокачественного новообразования. Такие наборы могут содержать один или несколько контейнеров, содержащих первую фармацевтическую композицию, которая содержит одно или несколько лимфодеплецирующих средств, и вторую фармацевтическую композицию, которая содержит любую нуклеиновую кислоту или популяцию генетически сконструированных Т-клеток (например клеток, описанных в данном документе), и фармацевтически приемлемый носитель. Наборы, содержащие генетически сконструированные CAR-Т-клетки, раскрытые в данном документе, например клетки CTX110, можно хранить и применять в месте оказания помощи, что обеспечивает быстрое лечение пациентов-людей после постановки диагноза.

В некоторых вариантах осуществления набор может содержать инструкции по применению любого из способов, описанных в данном документе. Включенные инструкции могут содержать описание введения первой и/или второй фармацевтической композиции субъекту для достижения предполагаемой активности у пациента-человека. Набор может дополнительно содержать описание выбора пациента-человека, подходящего для лечения, на основании идентификации того, нуждается ли пациент-человек в лечении. В некоторых вариантах осуществления инструкции содержат описание введения первой и второй фармацевтической композиции пациенту-человеку, который нуждается в лечении.

Инструкции, относящиеся к применению популяции Т-клеток с CAR к CD19, таких как Т-клетки CTX110, описанные в данном документе, обычно включают информацию о дозировке, графике введения доз и пути введения для предполагаемого средства лечения. Контейнеры могут представлять собой однократные дозы, объемные упаковки (например упаковки с множеством доз) или частичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах по настоящему изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше. Этикетка или листок-вкладыш указывают, что популяция генетически сконструированных Т-клеток используется для лечения, задержки начала и/или облегчения Т-клеточного или В-клеточного злокачественного новообразования у

субъекта.

Наборы, предусмотренные в данном документе, находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает без ограничения флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т. п. Также рассматриваются упаковки для применения в комбинации со специфическим устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения или устройство для инфузии. Набор может иметь отверстие для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь отверстие для стерильного доступа. По меньшей мере одно активное средство в фармацевтической композиции представляет собой популяцию Т-клеток с CAR к CD19, таких как Т-клетки CTX110, раскрытые в данном документе.

Наборы необязательно могут содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и пояснительная информация. Обычно набор содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш (листки-вкладыши) в контейнере или на нем. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает изделия, содержащие содержимое наборов, описанных выше.

Общие методики

При осуществлении настоящего изобретения на практике будут использоваться, если не указано иное, общепринятые методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе, такой как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practice approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid*

Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985; *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986; и В. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel *et al.* (eds.).

Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области техники может на основании приведенного выше описания применять настоящее изобретение в его наиболее полном объеме. Следовательно, следующие конкретные варианты осуществления должны толковаться как исключительно иллюстративные и никоим образом не ограничивающие остальную часть настоящего изобретения. Все публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки для целей или заявляемого объекта, упомянутых в данном документе.

Пример 1. Получение аллогенных Т-клеток с CAR, нацеливающихся на CD19.

Аллогенные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении CD19, получали из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров, как описано в публикации США № 2018-0325955, включенной в данный документ посредством ссылки. Вкратце, первичные Т-клетки человека сначала подвергали электропорации с помощью Cas9 или рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP) Cas9:sgRNA, нацеливающихся на TRAC (AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (SEQ ID NO: 26)) и B2M (GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (SEQ ID NO: 27)). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC репарируют посредством репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы (SEQ ID NO: 56), содержащей правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (CAR). CAR состоял из одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), полученного из мышинового антитела, специфического в отношении CD19, шарнирной области CD8 и трансмембранного домена, а также сигнального домена, содержащего сигнальные домены CD3z и CD28. Аминокислотная последовательность CAR и кодирующая ее нуклеотидная последовательность изложены под SEQ ID NO: 40 и 39 соответственно. Используемые в данном примере gRNA содержат следующие спейсерные последовательности: спейсер gRNA для TRAC (AGAGCAACAGUGCUGUGGCC (SEQ ID NO: 19)) и спейсер gRNA для B2M (GCUACUCUCUCUUUCUGGCC (SEQ ID NO: 21)). Популяция клеток, содержащая TRAC⁻/β2M⁻/CAR-к-CD19⁺ Т-клетки, упоминается в данном документе как "клетки TC1" или "клетки CTX110".

Посредством технологии редактирования CRISPR/Cas9 достигали высокой частоты нокаута константной области гена TCRα (TRAC) с ~98% снижением поверхностной экспрессии TCR в первичных Т-клетках человека от здоровых доноров, что направлено на значительное снижение проявления реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD). Также можно достигнуть высокой частоты нокаута гена β-2-микроглобулина (B2M), что направлено на повышение персистенции у пациентов, что потенциально приводит к повышению общей эффективности. Значения частоты двойного нокаута TRAC/B2M достигали в ~80% Т-клеток без какой-либо последующей очистки или обогащения с

применением антител. Т-клетки человека, экспрессирующие CD19-специфический CAR в пределах нарушенного локуса TRAC, полученного посредством репарации, направляемой гомологией, с применением доставляемой AAV6 донорной матрицы наряду с нокаутом гена B2M, постоянно получали с высокой эффективностью. Эта сайт-специфическая интеграция CAR защищает от потенциального повышения количества CD3+CAR+ клеток, дополнительно снижая риск развития GVHD, при этом также снижая риск инсерционного мутагенеза, ассоциированного с механизмами ретровирусной или лентивирусной доставки. Данные сконструированные аллогенные Т-клетки с CAR демонстрируют CD19-зависимую Т-клеточную секрецию цитокинов и эффективный CD19-специфический лизис раковых клеток.

Получение продукта, представляющего собой аллогенные Т-клетки с CAR к CD19 (ФИГ. 1), продемонстрировало эффективность редактирования (например, эффективность более 50% для TRAC-/B2M-/CAR-к-CD19+ Т-клеток) (ФИГ. 2).

Пример 2. Исследование с повышением дозы для определения эффективности Т-клеток с CAR на модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата лимфомы Беркитта человека из клеток Raji у мышей NOG.

Эффективность CAR-Т-клеток, нацеливающихся на CD19, на модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата лимфомы Беркитта человека из клеток Raji у мышей NOG оценивали с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скоттсдейл, Аризона). Вкратце, 12 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. В день 1 мыши получали подкожную инокуляцию 5×10^6 клеток Raji/мышь. Далее мышей разделяли на 3 группы обработки, как показано в таблице 1. В день 8 (через 7 дней после инокуляции клетками Raji) группа обработки 2 и группа обработки 3 получали однократную внутривенную дозу 200 мкл TRAC-/B2M-/CAR-к-CD19⁺ клеток (TC1) согласно таблице 1.

Таблица 1 Группы обработки.

| Группа | Клетки Raji (s.c.) | Обработка с помощью TC1 (i.v.) | N |
|--------|-----------------------------|--------------------------------|---|
| 1 | 5×10^6 клеток/мышь | Отсутствует | 4 |
| 2 | 5×10^6 клеток/мышь | 5×10^6 клеток/мышь | 4 |
| 3 | 5×10^6 клеток/мышь | 1×10^7 клеток/мышь | 4 |

Измеряли объем опухоли и вес тела и отдельных мышей подвергали эвтаназии, если объем опухоли составлял $\geq 500 \text{ мм}^3$.

К дню 18 данные демонстрируют статистически значимое уменьшение объема опухоли в ответ на клетки TC1 по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 3). Влияние на объем опухоли было дозозависимым (таблица 2); мыши, получающие более высокие дозы клеток TC1, демонстрировали значительное уменьшение объема опухоли по сравнению с мышами, получающими либо более низкую дозу клеток TC1, либо не

получающими обработку. В обработанной группе также наблюдали повышение выживаемости (таблица 2).

Таблица 2 Опухолевый ответ и выживаемость.

| Группа | Объем опухоли (день 18) | Объем опухоли (день 20) | Выживаемость (дни) | N |
|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| 1 | 379,6 ± 67,10 | 482 ± 47,37 | 20-22 | 4 |
| 2 | 214,0 ± 20,73 | 372,2 ± 78,21 | 25 | 4 |
| 3 | 107,5 ± 7,33* | 157,1 ± 10,62** | 27 (конец исследования) | 4 |

p=0,007 по сравнению с контролем (группа 1)

** p=0,0005 по сравнению с контролем (группа 1)

Пример 3. Оценка эффективности Т-клеток с CAR, нацеливающихся на CD19, на моделях с внутривенной диссеминацией у мышей NOG.

Для дальнейшей оценки эффективности TRAC⁺/B2M⁺/CAR-к-CD19⁺ клеток (TC1) использовали мышинные модели с диссеминацией.

Модель с внутривенной диссеминацией опухолевого ксенотрансплантата лимфомы Беркитта человека из клеток Raji.

Модель с внутривенной диссеминацией (модель с диссеминацией) с применением линии опухолевых клеток лимфомы Беркитта человека из клеток Raji у мышей NOG использовали, чтобы дополнительно продемонстрировать эффективность TC1. Эффективность TC1 оценивали на модели с диссеминацией с применением способов, применяемых компанией Translations Drug Development, LLC (Скоттсдейл, Аризона) и описанных в данном документе. Вкратце, 24 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. В начале исследования мышей разделяли на 5 групп обработки, как показано в таблице 9. В день 1 мыши в группах 2-5 получали внутривенную инъекцию $0,5 \times 10^6$ клеток Raji/мышь. Мышей инокулировали внутривенно для моделирования заболевания с диссеминацией. В день 8 (через 7 дней после инъекции клеток Raji) группы обработки 3-5 получали однократную внутривенную дозу 200 мкл клеток TC1 (таблица 3).

Таблица 3. Группы обработки.

| Группа | Клетки Raji (i.v.) | Обработка с помощью TC1 (i.v.) | N |
|--------|-------------------------------|--|---|
| 1 | Отсутствует | Отсутствует | 8 |
| 2 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | Отсутствует | 4 |
| 3 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | 1×10^6 клеток/мышь ($\sim 0,5 \times 10^6$ CAR ⁺ Т-клеток) | 4 |
| 4 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | 2×10^6 клеток/мышь | 4 |

| | | | |
|---|-------------------------------|--|---|
| | | ($\sim 1,0 \times 10^6$ CAR+ T-клеток) | |
| 5 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | 4×10^6 клеток/мышь ($\sim 2,0 \times 10^6$ CAR+ T-клеток) | 4 |

В ходе исследования мышей ежедневно подвергали мониторингу, а вес тела измеряли два раза в неделю. Важной конечной точкой было время до проявления периморбидности, а также оценивали эффект приживаемости Т-клеток. Процент смертности животных и время до гибели регистрировали для каждой группы в исследовании. Мышей подвергали эвтаназии до наступления агонального состояния. Мыши могли быть определены как находящиеся в агональном состоянии и умерщвленные, если удовлетворялись один или несколько из следующих критериев:

потеря веса тела, составляющая 20% или больше, продолжалась в течение периода времени, превышающего 1 неделю;

опухоли, которые подавляют нормальные физиологические функции, такие как прием пищи, питье, подвижность и способность мочиться и/или испражняться;

продолжительная обильная диарея, приводящая к чрезмерной потере веса ($> 20\%$), или

непрекращающиеся хрипы и дыхательная недостаточность.

Животных также считали находящимися в агональном состоянии, если имели место длительная или чрезмерная боль или дистресс, определенные посредством клинических наблюдений, такие как протрация, сутулость, паралич/парез, вздутие живота, изъязвления, абсцессы, судорожные припадки и/или кровоизлияния.

Подобно модели подкожного ксенотрансплантата (пример 2), на модели с диссеминацией показано статистически значимое преимущество в выживаемости у мышей, обработанных с помощью TRAC⁺/B2M⁺/CAR-к-CD19⁺ клеток (TC1), как показано на **фиг. 4**, $p < 0,0001$. Влияние обработки с помощью TC1 на выживаемость в модели с диссеминацией также было дозозависимым (**таблица 4**).

Таблица 4. Выживаемость животных.

| Группа | Клетки Raji (i.v.) | Обработка с помощью TC1 (i.v.) | Макс. выживаемость (дни) | Медианная выживаемость (дни) |
|--------|--------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 1 | Нет | Нет | Макс. | Макс. |
| 2 | Да | Нет | 20 | 20 |
| 3 | Да | 1×10^6 клеток/мышь | 21 | 21 |
| 4 | Да | 2×10^6 клеток/мышь | 25 | 25 |
| 5 | Да | 4×10^6 клеток/мышь | 32 | 26 |

Второй эксперимент проводили с применением модели с внутривенной диссеминацией, описанной выше.

В день 1 мыши в группах 2-4 получали внутривенную инъекцию $0,5 \times 10^6$ клеток Raji/мышь. Мышей инокулировали внутривенно для моделирования заболевания с диссеминацией. В день 4 (через 3 дней после инъекции клеток Raji) группы обработки 2-4 получали однократную внутривенную дозу 200 мкл клеток TC1 в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Группы обработки.

| Группа | Клетки Raji (i.v.) | Обработка с помощью TC1 (i.v.) | N |
|--------|-------------------------------|--|---|
| 1 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | Отсутствует | 6 |
| 2 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | $0,6 \times 10^6$ CAR ⁺ клеток/мышь | 7 |
| 3 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | $1,2 \times 10^6$ CAR ⁺ клеток/мышь | 5 |
| 4 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | $2,4 \times 10^6$ CAR ⁺ клеток/мышь | 5 |

И снова на модели с диссеминацией показано статистически значимое преимущество в выживаемости у мышей, обработанных с помощью TRAC⁺/B2M⁺/CAR-к-CD19⁺ клеток (TC1), как показано на **фиг. 5**, $p=0,0016$. Влияние обработки с помощью TC1 на выживаемость в модели с диссеминацией также было дозозависимым (**таблица 6**).

Таблица 6. Выживаемость животных.

| Группа | Клетки Raji (i.v.) | Обработка с помощью TC1 (i.v.) | Макс. выживаемость (дни) | Медианная выживаемость (дни) | Значимость |
|--------|--------------------|--|--------------------------|------------------------------|------------|
| 1 | Да | Нет | 20 | 20 | |
| 2 | Да | $0,6 \times 10^6$ CAR ⁺ клеток/мышь | 35 | 27 | $p=0,005$ |
| 3 | Да | $1,2 \times 10^6$ CAR ⁺ клеток/мышь | 39 | 37 | $p=0,016$ |
| 4 | Да | $2,4 \times 10^6$ CAR ⁺ клеток/мышь | 49 | 46 | $p=0,016$ |

Оценка ответа селезенки в отношении обработки с помощью TC1

Селезенку собирали у мышей через 2-3 недели после инъекции клеток Raji и оценивали ткань посредством проточной цитометрии в отношении персистенции клеток TC1 и устранения клеток Raji в селезенке.

Селезенку переносили к 3 мл 1X DPBS CMF в С-пробирке и диссоциировали с применением диссоциатора MACS Octo. Образец переносили через сито с размером пор 100 микрон в коническую пробирку объемом 15 мл, центрифугировали (1700 об/мин, 5 минут, ART с тормозом) и ресуспендировали в 1 мл 1X DPBS CMF для подсчета с применением Guava PCA. Костный мозг центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл 1X DPBS CMF для подсчета с применением Guava PCA. Клетки ресуспендировали при

концентрации 10×10^6 клеток/мл в 1X DPBS CMF для окрашивания для проточной цитометрии.

Образцы (50 мкл) добавляли к 1 мл 1X Pharm Lyse и инкубировали в течение 10-12 минут при комнатной температуре (к. т.). Образцы центрифугировали и затем один раз промывали с помощью 1X DPBS CMF. Образцы ресуспендировали в 50 мкл 1X DPBS и инкубировали с TruStain для человека и мыши в течение 10-15 минут при к. т. Образцы промывали один раз с помощью 1 мл 1X DPBS CMF и ресуспендировали в 50 мкл 1X DPBS CMF для окрашивания. Добавляли поверхностные антитела и клетки инкубировали в течение 15-20 минут в темноте при к. т. и затем промывали с помощью 1 мл 1X DPBS CMF. Затем образцы ресуспендировали в 125 мкл 1X DPBS CMF для обработки на проточном цитометре. Клетки окрашивали с помощью панели следующих поверхностных антител.

Таблица 7. Панель антител.

| FITC | PE | APC | C3 | APCCy7 | V421 | V510 |
|------------------|------------------|-------------------|----------|--------------|-----------------|--------------------|
| huCD3 (UCHL1) | huCD45 (HI30) | huCD19 (HIB19) | 7AA D | CD8 (SK1) | CD4 (RPA-T4) | mCD45 (30- F11) |

Популяции клеток определяли посредством электронного гейтирования (PI=общее количество лейкоцитов) на основании отношения прямого и бокового светорассеяния. Выполняли компенсацию для предотвращения перетекания из одного канала в другой после первоначальной настройки устройства с применением Ultra Comp Beads от Thermo Fisher. Проточный цитометр настраивали для сбора 10000 CD45+ событий в каждой пробирке. Сбор данных проточной цитометрии осуществляли с применением проточного цитометра FACSCanto™. Данные собирали с применением программного обеспечения VO FACSDiva™ (версия 6.1.3 или 8.0.1). Анализ данных проточной цитометрии получали в форме проточных цитограмм, которые представляют собой графические изображения, сгенерированные для измерения показателей относительного процентного содержания для каждого типа клеток.

В этом примере демонстрируется, что после обработки клетками TC1 терапевтически полезные TRAC⁺/B2M⁺/CAR-к-CD19⁺ клетки сохраняются в селезенке и селективно устраняют клетки Raji из ткани (**ФИГ. 6А**). Кроме того, обработка клетками TC1 не характеризуется индуцированными клетками Raji увеличением массы клеток (**ФИГ. 6А**). Дополнительно, на **ФИГ. 7** показано, что оставшиеся клетки человека в селезенках мышей, обработанных TRAC⁺/B2M⁺/CAR-к-CD19⁺ клетками, являются CD8⁺. Эти CD8⁺ Т-клетки также являются CD3-отрицательными, что доказывает то, что персистирующие Т-клетки в этой модели остаются TCR/CD3-отрицательными и, таким образом, отредактированными.

Модель опухолевого трансплантата острого лимфобластного лейкоза человека из клеток Nalm-6

с внутривенной диссеминацией

Модель с внутривенной диссеминацией (модель с диссеминацией) с применением линии опухолевых клеток острого лимфобластного лейкоза человека из клеток Nalm-6 у мышей NOG использовали, чтобы дополнительно продемонстрировать эффективность TC1. Эффективность TC1 оценивали на модели с диссеминацией с применением способов, применяемых компанией Translations Drug Development, LLC (Скоттсдейл, Аризона) и описанных в данном документе. Вкратце, 24 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. В начале исследования мышей разделяли на 5 групп обработки, как показано в таблице 14. В день 1 мыши в группах 2-4 получали внутривенную инъекцию $0,5 \times 10^6$ клеток Nalm6/мышь. Мышей инокулировали внутривенно для моделирования заболевания с диссеминацией. В день 4 (через 3 дней после инъекции клеток Nalm6) группы обработки 2-4 получали однократную внутривенную дозу 200 мкл клеток TC1 в соответствии с **таблицей 8**.

Таблица 8. Группы обработки.

| Группа | Клетки Nalm6 (i.v.) | Обработка с помощью TC1 (i.v.) | N |
|--------|-------------------------------|--|---|
| 1 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | Отсутствует | 6 |
| 2 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | 1×10^6 CAR ⁺ клеток/мышь | 6 |
| 3 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | 2×10^6 CAR ⁺ клеток/мышь | 6 |
| 4 | $0,5 \times 10^6$ клеток/мышь | 4×10^6 CAR ⁺ клеток/мышь | 6 |

В ходе исследования мышей ежедневно подвергали мониторингу, а вес тела измеряли два раза в неделю, как описано выше.

Подобно модели с клетками Raji с внутривенной диссеминацией (выше), на модели Nalm6 также показано статистически значимое преимущество в выживаемости у мышей, обработанных с помощью TRAC⁺/B2M⁺/CAR-к-CD19⁺ клеток (TC1), как показано на **фиг. 8**, $p=0,0004$. Влияние обработки с помощью TC1 на выживаемость в модели с клетками Nalm6 с диссеминацией также было дозозависимым (**таблица 9**).

Таблица 9. Выживаемость животных.

| Группа | Клетки Nalm6 (i.v.) | Обработка с помощью TC1 (i.v.) | Макс. выживаемость (дни) | Медианная выживаемость (дни) | Значимость |
|--------|---------------------|--|--------------------------|------------------------------|------------|
| 1 | Да | Нет | 31 | 25,5 | |
| 2 | Да | 1×10^6 CAR ⁺ клеток/мышь | 32 | 31 | $p=0,03$ |
| 3 | Да | 2×10^6 CAR ⁺ клеток/мышь | 38 | 36 | $p=0,0004$ |

| | | | | | |
|---|----|---|----|----|----------|
| 4 | Да | 4×10^6 CAR ⁺ клеток/мышь | 52 | 46 | p=0,0004 |
|---|----|---|----|----|----------|

Пример 4. Дополнительная оценка эффективности Т-клеток с CAR, нацеливающихся на CD19, на моделях с внутривенной диссеминацией у мышей NOG.

Целью данного исследования была оценка противоопухолевой активности Т-клеток с CAR⁺ к CD19 при нескольких уровнях дозы по сравнению с линией опухолевых клеток острого лимфобластного лейкоза из Nalm6-Fluc-GFP у мышей NOG. Мышей инокулировали внутривенно для моделирования заболевания с диссеминацией. Значимой конечной точкой было время до периморбидности. Биолюминесцентную визуализацию осуществляли с мониторингом прогрессирования заболевания с диссеминацией.

Вкратце, 6 самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 1 недели помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. В день 1 мыши получали внутривенную инокуляцию при 5×10^4 клеток Nalm6-Fluc-GFP (Nalm6-Fluc-Neo/eGFP-Puro; Imanis Life Sciences (Рочестер, Миннесота)) на мышь. Через (3) дня после инокуляции клетками Nalm6-Fluc-GFP мышей разделили на группы обработки и им вводили дозу популяций Т-клеток, содержащих TRAC-/β2M-/CAR-к-CD19+ Т-клетки, как показано в **таблице 10**. Значения в области интересующих значений (ROI) фиксировали и регистрировали. Вес тела измеряли два раза в день и биолюминесценцию измеряли два раза в неделю, начиная с дня 4 (через 3 дня после инокуляции клетками Nalm6-Fluc-GFP) до дня 67, один раз в неделю, начиная с дня 74 до конца исследования. Для измерения биолюминесценции мышам путем интраперитонеальной инъекции вводили 200 мкл D-люциферина при 150 мг/кг. Кинетические изображения получали в начале исследования и по мере необходимости на протяжении всего исследования для определения оптимальной последующей дозы D-люциферина и времени воздействия для визуализации мышей. Мышей визуализировали посредством регистрации сигнала люминесценции (открытое излучение) с применением прибора для визуализации AMI 1000 с версией программного обеспечения 1.2.0 (Spectral Instruments Imaging Inc.; Тусон, Аризона).

Таблица 10. Группы обработки.

| Группа | Т-клетка с CAR к CD19 | Количество введенных Т-клеток (iv) | Т-клетки с CAR+ к CD19 | N |
|--------|-----------------------|------------------------------------|------------------------|---|
| 1 | N/A | N/A | N/A | 5 |
| 2 | TRAC-/β2M-/к-CD19 | 3×10^6 клеток/мышь | $\sim 1,8 \times 10^6$ | 5 |
| 3 | TRAC-/β2M-/к-CD19 | 6×10^6 клеток/мышь | $\sim 3,6 \times 10^6$ | 5 |
| 4 | TRAC-/β2M-/к-CD19 | 12×10^6 клеток/мышь | $7,2 \times 10^6$ | 4 |

Отдельных мышей подвергали эвтаназии в период периморбидности (клинические признаки, указывающие на высокую опухолевую нагрузку (например, отсутствие подвижности, сгибание спины, гипоактивность), или 20% или большая потеря веса тела, сохраняющаяся в течение периода времени, составляющего более чем 1 неделю). Мышей подвергали эвтаназии до наступления агонального состояния. Исследование завершали в день 99, когда последнюю мышь подвергали эвтаназии как выжившую в течение длительного периода времени.

На **ФИГ. 9** показана длительная выживаемость мышей, получавших разные дозы клеток TC1, по сравнению с необработанными мышами. На **ФИГ. 10** показаны уровни биолюминесценции от низких до невыявляемых у мышей, которые получали самую высокую дозу клеток TC1 (12×10^6 клеток/мышь), и которые в результате характеризовались самой продолжительной выживаемостью, как показано на **ФИГ. 9**. В день 74 биолюминесценцию выявляли у всех 4 мышей, что свидетельствует об экспансии опухолевых клеток в группе обработки.

В целом, эти результаты демонстрируют, что однократная инъекция клеток TC1 может продлевать выживаемость мышей, которым вводили летальную дозу клеток B-ALL Nalm6. Эта пролонгированная выживаемость является дозозависимой, при этом наблюдается дифференцированный ответ выживаемости между низкими, средними и высокими дозами клеток TC1.

Пример 5. Анализ реакции "трансплантат против хозяина" у мышей, которым вводили аллогенные CAR-T-клетки, нацеливающиеся на CD19.

Проводили исследование на мышах с оценкой потенциала неотредактированных T-клеток человека и клеток TC1 вызывать реакцию "трансплантат против хозяина" (GvHD). После облучения всего тела при 200 сГр самкам мышей NOG путем однократной внутривенной медленной болюсной инъекции вводили неотредактированные T-клетки человека или клетки TC1. Животных наблюдали в течение до 119 дней только после облучения (группа 1) или после облучения совместно с однократным введением РВМС (группа 2), электропорированных T-клеток (группа 3) или клеток TC1 (группа 4). Клетки вводили через примерно 6 часов после облучения в день 1. В **таблице 11** показано краткое описание групп и схемы исследования.

Таблица 11. Группы обработки.

| Номер группы | Тестируемое изделие | Уровень дозы (клеток/мышь) | Общая доза облучения | Количество животных (самки) |
|--------------|-----------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | Только облучение | 0 | 200 сГр | 12 |
| 2 | Облучение+РВМС | 6×10^6 | | 6 |
| 3 | Облучение+EP T-клетки | 3×10^7 | | 6 |
| 4 | Облучение+клетки TC1 | 3×10^7 | | 6 |

Конечными точками исследования были выживаемость, кинетика проявления симптомов GvHD и измерения веса тела.

Смертность наблюдали в группе 1 (3 из 12 животных), группе 2 (6 из 6 животных) и группе 3 (2 из 6 животных) в течение первых 30 дней после обработки (ФИГ. 11). Все животные в группе 4 (клетки TC1) выжили до запланированного вскрытия (ФИГ. 11). Животные в агональном состоянии в группах 1, 2 и 3 испытывали потерю веса и/или клинические наблюдения, соответствующие развитию GvHD (от легкого до значительного ощущения холода при прикосновении, от легкого до умеренного истощения, от легкой до выраженной сутулости, значительная потеря веса, от легкой до тяжелой алопеции, выраженная гипоактивность, умеренное затрудненное дыхание и выраженное тахипноэ). Животные в группах 1 и 4 и животные не в агональном состоянии в группе 3 испытывали умеренную потерю веса после облучения, которая повышалась в ходе исследования (ФИГ. 12). Никаких заметных клинических наблюдений не регистрировали.

Данное исследование продемонстрировало, что неотредактированные РВМС человека индуцируют фатальную GvHD у облученных мышей NOG у всех животных (группа 2) с началом через 2-3 недели после введения клеток. Напротив, ни у одной мыши, которая получала клетки TC1 (группа 4), не развилась GvHD в ходе исследования (119 дней), несмотря на большее количество клеток, которое вводили данным животным (3×10^7 клеток TC1 на мышь по сравнению с 6×10^6 РВМС на мышь). Процедура облучения индуцировала временную потерю веса во всех группах, и он восстанавливался во всех группах, которые не получали неотредактированные РВМС.

Второе исследование проводили для дальнейшей оценки потенциала неотредактированных T-клеток человека и клеток TC1 вызывать GvHD. В частности, самкам мышей NOD/SCID/IL2R γ null (NSG) путем однократной внутривенной медленной болюсной инъекции вводили неотредактированные T-клетки человека или клетки TC1 после облучения всего тела (общая доза облучения 200 сГр, 160 сГр/мин; целевая LDR_{0/140R}). Конечными точками данного исследования были выживаемость, кинетика проявления симптомов GvHD и измерения веса тела. Гистопатологический анализ также выполняли в отношении всех собранных тканей. Воздействие оценивали в крови и тканях

мышей посредством проточной цитометрии и иммуногистохимического анализа (ИНС), при необходимости.

Клетки вводили в виде однократной дозы посредством внутривенного медленного болюса, как описано в **таблице 12**.

Таблица 12. Схема исследования.

| Номер группы | Тестируемое изделие | Доза (клеток/мышь) | Концентрация (клеток/мл) | Общая доза облучения | Количество животных | |
|--------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|----|
| | | | | | М | Ф |
| 1 | Среда-носитель - без RT ^a | 0 | 0 | 0 сГр | 5 | 5 |
| 2 | Среда-носитель - RT ^a | 0 | 0 | 200 сГр | 15 | 15 |
| 3 | Неотредактированные Т-клетки | 1×10^7 | 4×10^7 | | 15 | 15 |
| 4 | ТС1 - низкая доза | 2×10^7 | 8×10^7 | | 15 | 15 |
| 5 | ТС1 - высокая доза | 4×10^7 | 16×10^7 | | 15 | 15 |

^aЖивотных группы 1 не облучали и им не вводили дозы клеток (животным вводили среду-носитель, 1X PBS). Животных группы 2 облучали, но им не вводили дозы клеток (животным вводили среду-носитель, фосфатно-солевой буферный раствор [PBS]).

Животных рандомизировали на группы обработки по весу тела с применением валидированной доклинической системы программного обеспечения (Provantis). В связи с большим объемом данного исследования введение доз и вскрытие проводили с промежутком в девять дней. Для минимизации систематической ошибки животным из контрольной группы и групп ТС1 (группы 4 и 5) вводили дозы и проводили их вскрытие в один и тот же день. Вскрытие проводили в день исследования 85 во всех группах.

Смертность наблюдали в случае всех животных, которые получали неотредактированные Т-клетки человека (группа 3), с началом в день 14 (**ФИГ. 13**). Всех мышей, которые получали неотредактированные Т-клетки человека (группа 3), к дню 29 либо находили мертвыми, либо отправляли на внеплановую эвтаназию. Клинические признаки у этих животных соответствовали развитию GvHD и включали тусклый мех, снижение активности от легкой до тяжелой степени, сгорбленную позу, исхудание от легкой до умеренной степени и учащенное дыхание. Заметные изменения

гематологических параметров наблюдали при эвтаназии у мышей, которым вводили неотредактированные Т-клетки человека (группа 3), включая снижение количеств эритроцитов, гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитов и ретикулоцитов. Воспаление от минимальной до умеренной степени наблюдали в печени, легких, почках, селезенке и тимусе животных из группы 3. Некроз часто сопровождал воспаление в этих тканях. Эти результаты соответствовали развитию GvHD. Кроме того, у большинства животных из группы 3 также присутствовало снижение клеточности от легкой до тяжелой степени в костном мозге из бедренной кости и грудины, что, вероятно, связано с эффектами облучения всего тела. Вероятно, это наблюдалось только в данной группе в связи с ранними сроками вскрытия (2-4 недели после облучения) по сравнению с 12 неделями для всех других групп. В соответствии с наличием GvHD иммуногистохимический анализ животных из группы 3 выявил присутствие CD45P⁺P-клеток человека во всех исследованных тканях (почка, печень, селезенка, легкое, кожа и пищеварительный тракт). Все животные в других группах выжили до запланированного вскрытия.

Кроме того, не наблюдали значимой потери веса в группах 1, 2, 4 или 5 (ФИГ. 14). В этих группах не было зарегистрировано заметных клинических наблюдений, которые соответствовали GvHD, характеризовавшихся наблюдениями по меньшей мере двух симптомов, которые, вероятно, считаются указывающими на GvHD. У нескольких животных из групп 4 и 5 на протяжении всего исследования наблюдали такие симптомы, как тусклый мех, снижение активности от легкой до умеренной степени и/или легкое исхудание. Хотя эти симптомы часто ассоциированы с GvHD, они, вероятно, не связаны с ТС1, поскольку их наблюдали нечасто, они были временные и непродолжительные, а также их наблюдали у некоторых облученных контрольных животных (группа 2).

В целом, результаты этих двух исследований подтвердили, что клетки ТС1 не индуцируют реакцию "трансплантат против хозяина".

Пример 6. Получение и характеристика разработанных партий аллогенных CAR-T-клеток, нацеливающихся на CD19.

Клетки ТС1 для целей клинического исследования получали из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров, полученных посредством стандартной процедуры лейкофереза. Мононуклеарные клетки обогащали Т-клетками и активировали шариками, покрытыми антителами к CD3/CD28, затем подвергали электропорации с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR-Cas9 и трансдуцировали вектором на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащим ген CAR. Модифицированные Т-клетки размножали в культуре клеток, очищали, составляли в суспензию и криоконсервировали.

Перед модификацией клеток Т-клетки от шести разных здоровых доноров оценивали в отношении экспрессии различных маркеров клеточной поверхности. Ранее было показано, что CD27⁺CD45RO⁻ Т-клетки в пределах подгруппы CD8⁺ коррелируют с полными ответами при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) при лечении посредством терапии с применением Т-клеток с CAR к CD19 (Fraietta *et al.*, Nat Med, Vol.

24(5): 563-571, 2018). Соответственно, процент CD27+CD45O- Т-клеток в пределах подгруппы CD8+ от шести разных доноров оценивали посредством проточной цитометрии. Вкратце, 1×10^6 клеток инкубировали с антителами Fab-биотин или IgG-биотин в качестве отрицательного контроля. Клетки промывали буфером для окрашивания и инкубировали с мышинным антителом к IgG для захвата избыточных первичных антител. Клетки снова промывали и инкубировали с полной панелью вторичных антител (CD8, Biolegend: № по каталогу 300924, CD45RO, Biolegend: № по каталогу 304230, CD27, Biolegend: № по каталогу 560612) и красителем для определения жизнеспособности. Клетки промывали последний раз буфером для окрашивания и анализировали на проточном цитометре с захватом различных окрашенных популяций. На **ФИГ. 15** показаны уровни CD27+CD45RO- Т-клеток в пределах их подгрупп CD8+. Получение аллогенных CAR-Т-клеток позволяет выбрать донорный исходный материал с благоприятными характеристиками, такими как высокий уровень CD27+CD45RO- клеток во фракции CD8+ донора, представляющего интерес.

Более конкретно, лейкопаки от 18-40-летних доноров-мужчин использовали для выделения CD4+ и CD8+ Т-клеток. После выделения, обогащения и активации CD4+ и CD8+ Т-клеток клетки подвергали электропорации с рибонуклеопротеиновыми комплексами, содержащими белок нуклеазу Cas9, sgRNA для TRAC (SEQ ID NO: 26) или sgRNA для B2M (SEQ ID NO: 27). Рибонуклеопротеиновые комплексы TRAC и B2M перед электропорацией объединяли. После электропорации свежеразмороженный rAAV, содержащий донорную матрицу (SEQ ID NO: 54), кодирующую CAR к CD19 (SEQ ID NO: 40), добавляли к клеткам и клетки инкубировали. Затем клетки размножали в культуре и добавляли rhIL-2 и rhIL-7 один раз в три-четыре дня. Клетки, подготовленные для мониторинга, тестировали в отношении идентичности Т-клеток и редактирования генов с помощью панели TCR (CD5, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, B2M и CD45). После подтверждения идентичности Т-клеток проводили деплецию TCR $\alpha\beta$ посредством инкубации клеток с биотин-конъюгированным антителом к TCR $\alpha\beta$ и шариками с антителами к биотину. Деплетированные клетки выделяли и составляли для введения. Полученная популяция клеток содержала менее 0,5% TCR $\alpha\beta$ + клеток. На **ФИГ. 16** показан анализ TCR $\alpha\beta$ + клеток до и после очистки.

Восемь разработанных партий клеток TC1 тестировали в отношении идентичности Т-клеток. Средние результаты для восьми протестированных партий демонстрировали, что 84,58% нокаутов B2M (т. е. 15,42% B2M+ клеток) и 99,98% клеток представляли собой TCR- (т. е. 0,2% TCR+), и ~ 50% нокинов относились к CAR к CD19 (**ФИГ. 17**).

Кроме того, у доноров оценивали маркеры истощения и старения до и после редактирования Т-клеток. В частности, процент PD1+, LAG3+, TIM3+ и CD57+ клеток определяли для общих популяций Т-клеток. Экспрессию маркеров оценивали посредством проточной цитометрии, как описано выше, с применением следующих вторичных антител: мышинное антитело к PD1 PeCy7, Biolegend, № по каталогу 329918; мышинное антитело к TIM3BV421, Biolegend, № по каталогу 345008; мышинное антитело к

CD57 PerCp Cy5.5, Biolegend, № по каталогу 359622, и мышинное антитело к LAG3 PE, Biolegend, № по каталогу 369306. На **ФИГ. 18** показано, что маркеры истощения или старения никогда не повышались на более чем 15% от общей популяции Т-клеток после редактирования генома.

Кроме того, селективное уничтожение тремя разными партиями клеток TC1 оценивали *in vitro*. В частности, клетки TC1 инкубировали с CD19-положительными линиями клеток (K562-CD19; Raji и Nalm6) или CD19-отрицательными линиями клеток (K562). Уничтожение измеряли с применением анализа цитотоксичности на основе проточной цитометрии через ~24 часа. В частности, целевые клетки метили с помощью 5 мкМ efluor670 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), промывали и инкубировали в течение ночи (50000 целевых клеток на лунку; 96-луночный планшет с U-образным дном [Corning, Тьюксбери, Массачусетс]) в совместных культурах с TC1 или контрольными Т-клетками в различных соотношениях (от 0,1:1 до 4:1 Т-клеток к целевым клеткам). На следующий день лунки промывали и среду заменяли 200 мкл свежей среды, содержащей 5 мг/мл 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) с разведением 1:500 с подсчетом мертвых/погибающих клеток. Наконец, в каждую лунку добавляли 25 мкл шариков CountBright (Thermo Fisher Scientific) и затем клетки анализировали посредством проточной цитометрии с применением проточного цитометра Novocyte (ACEA Biosciences, Сан-Диего, Калифорния). Программное обеспечение Flowjo (v10, Flowjo, Ашленд, Орегон) использовали для анализа файлов данных проточной цитометрии (файлы с расширением fcs). TCR $\alpha\beta$ ⁺ Т-клетки (неотредактированные клетки) использовали в качестве контролей. Клетки TC1 эффективно уничтожали CD19-положительные клетки с большими значениями скорости, чем неотредактированные Т-клетки, а CD19-отрицательные клетки демонстрировали низкие уровни лизиса клеток в присутствии клеток TC1, которых было не больше, чем при совместном культивировании с неотредактированными Т-клетками (**ФИГ. 19**).

Клетки TC1, полученные от трех уникальных доноров, также использовали для оценки роста в отсутствие цитокинов и/или сыворотки крови. В частности, клетки TC1 выращивали в полной среде для Т-клеток в течение 14 дней. В день 0 клетки из культуры выращивали либо в полной среде для Т-клеток (содержащей X-VIVO 15 (Lonza, Базель, Швейцария), 5% сыворотке крови АВ человека (Valley Biomedical, Винчестер, Вирджиния), IL-2 (Miltenyi, Бергиш-Гладбах, Германия) и IL-7 (Cellgenix, Фрайбург, Германия)) (полные среды), средах, содержащих сыворотку крови, но не содержащих цитокинов IL-2 или IL-7 (5% сыворотка крови, без цитокинов), или без сыворотки крови или цитокинов (без сыворотки крови, без цитокинов). Клетки подсчитывали, как указано выше, в течение до 35 дней после удаления цитокинов и/или сыворотки крови. Никакого повышения количества клеток TC1 не наблюдали в отсутствие цитокина и/или сыворотки крови (**ФИГ. 20**).

Для введения клетки TC1 ресуспендировали в растворе криоконсерванта (CryoStor CS-5) и помещали во флакон для инфузии объемом 6 мл. Общая доза содержалась в одном

или нескольких флаконах. Инфузия каждого флакона осуществляется в течение 20 минут после размораживания.

Пример 7. Открытое многоцентровое исследование фазы I безопасности и эффективности аллогенных сконструированных посредством CRISPR-Cas9 Т-клеток (CTX110) у субъектов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями с повышением дозы и расширением когорт.

CTX110 представляет собой средство иммунотерапии на основе Т-клеток с CD19-направленным химерным антигенным рецептором (CAR), состоящее из аллогенных Т-клеток, которые генетически модифицированы *ex vivo* с применением компонентов (одна направляющая РНК и нуклеаза Cas9) для редактирования генов CRISPR-Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9). Модификации включают направленное нарушение локусов константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TCR) (TRAC) и бета-2-микроглобулина (B2M), а также вставку трансгена CAR к CD19 в локус TRAC посредством кассеты экспрессии на основе аденоассоциированного вируса. CAR к CD19 (SEQ ID NO: 40) состоит из одноцепочечного варибельного фрагмента к CD19, содержащего SEQ ID NO: 47, трансмембранного домена CD8 под SEQ ID NO: 32, костимулирующего домена CD28 под SEQ ID NO: 36 и сигнального домена CD3 ζ под SEQ ID NO: 38.

В данном исследовании соответствующие требованиям пациенты-люди получали внутривенную (IV) инфузию CTX110 после лимфодеплецирующей (LD) химиотерапии.

Исследуемая популяция

Повышение дозы и расширение когорт включает взрослых субъектов с В-клеточными злокачественными новообразованиями. Субъекты распределяются по независимым группам повышения дозы на основании гистологического анализа заболевания. Включенные в исследование взрослые субъекты включают субъектов с выбранными подтипами неходжкинской лимфомы (NHL), включая неуточненную (NOS) диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с перегруппировками *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*, трансформированную фолликулярную лимфому (FL), FL степени 3b или трансформацию CLL по Рихтеру.

Цель и обоснование исследования

Целью исследования фазы I с повышением дозы является оценка безопасности и эффективности аллогенных сконструированных посредством CRISPR-Cas9 Т-клеток к CD19 (клеток CTX110) у субъектов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями.

Исходы для пациентов с рецидивирующими/рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями являются исторически неблагоприятными. Однако применение терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR в этих условиях приводило к полным и устойчивым ответам, в то время как предыдущие варианты лечения были паллиативными (June et al., (2018) *Science*, 359, 1361-1365; Maus and June,

(2016) *Clin Cancer Res*, 22, 1875-1884; Neelapu et al., (2017) *N Engl J Med*, 377,2531-2544; Schuster et al., (2019) *N Engl J Med*, 380, 45-56; Schuster et al., (2017) *N Engl J Med*, 377, 2545-2554). Виды терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR требуют сбора и получения клеток для конкретного пациента. К сожалению, некоторые пациенты не являются кандидатами для прохождения лейкофереза или они испытывают прогрессирование заболевания или смерть в ожидании лечения. Готовый продукт на основе Т-клеток с CAR, таких как CTX110, может обеспечить преимущество, заключающееся в немедленной доступности, снижении изменчивости процесса получения и предотвращении ошибок при получении для отдельных субъектов.

Кроме того, пациенты, прошедшие лечение в ходе нескольких курсов химиотерапии, могут иметь Т-клетки с истощенными или стареющими фенотипами. Низкие значения частоты ответа у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), прошедших лечение посредством терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR, частично объясняются фенотипом истощенных Т-клеток (Fraieta et al., (2018) *Nat Med*, 24, 563-571; Riches et al., (2013) *Blood*, 121, 1612-1621). Начиная с ранее не подвергавшихся химиотерапии Т-клеток от здорового донора, аллогенные подходы могут повысить последовательность и эффективность терапии с применением Т-клеток с CAR по сравнению с аутологичными препаратами.

Основным препятствием для применения аллогенных Т-клеток с CAR был риск развития реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD). Технология редактирования генов CRISPR Cas9 обеспечивает надежное мультиплексное редактирование клеток. Процесс получения CTX110 заключается во введении конструкции CAR с нарушенным локусом TRAC посредством гомологичной рекомбинации. Доставка и точная вставка CAR в геномный локус TRAC с применением донорной матрицы ДНК, доставляемой AAV, и HDR отличается от случайной вставки генетического материала с применением способов лентивирусной и ретровирусной трансдукции. Вставка гена CAR в локус TRAC приводит к устранению TCR почти во всех клетках, экспрессирующих CAR, что минимизирует риск развития GvHD. Кроме того, получение из клеток здорового донора устраняет риск непреднамеренной трансдукции злокачественных В-клеток (Ruella et al., (2018) *Nat Med*, 24, 1499-1503). Это первое исследование на человеке с участием субъектов с рецидивирующими/рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями направлено на оценку безопасности, а также эффективности CTX110 посредством данного подхода с применением модифицированных посредством CRISPR-Cas9 аллогенных CAR-Т-клеток.

CTX110, средство иммунотерапии на основе CD19-направленных генетически модифицированных аллогенных Т-клеток, получают из клеток здоровых доноров, следовательно, полученные клетки предназначены для обеспечения каждого субъекта стабильным конечным продуктом достоверного качества. Кроме того, получение CTX110 посредством точной доставки и вставки CAR в сайт TRAC с помощью AAV и репарации,

направляемой гомологией (HDR), не представляет рисков, ассоциированных со случайной вставкой лентивирусных и ретровирусных векторов.

Цели

Первичная цель, часть А (повышение дозы): оценить безопасность повышающихся доз СТХ110 в комбинации с различными лимфодеплеционными средствами у субъектов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями с определением рекомендованной дозы части В.

Первичная цель, часть В (расширение когорт): оценить эффективность СТХ110 у субъектов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями, измеренную по скорости объективного ответа (ORR).

Вторичные цели (части А и В): дополнительно охарактеризовать эффективность, безопасность и фармакокинетику СТХ110.

Цели исследования (части А и В): идентифицировать геномные, метаболические и/или протеомные биомаркеры, ассоциированные с СТХ110, которые могут указывать на клинический ответ, устойчивость, безопасность или фармакодинамическую активность, или прогнозировать их.

Конечные точки

Первичные конечные точки

Часть А: частота нежелательных явлений, определенных как дозолIMITИРУЮЩАЯ токсичность.

Часть В: частота объективного ответа (ORR), определенная как полный ответ (CR) + частичный ответ (PR) согласно критериям ответа Лугано для злокачественной лимфомы (Cheson et al., (2014) *J Clin Oncol*, 32, 3059-3068), как определено посредством независимого централизованного радиологического обзора.

Классификация согласно Лугано обеспечивает стандартизированный способ оценки визуализации у субъектов с лимфомой. Он состоит из радиологических оценок опухолевой нагрузки посредством диагностической СТ и метаболических оценок посредством FDG-PET с применением F¹⁸ для гистологических анализов с повышенным поглощением FDG (см. таблицы 13-14).

Таблица 13. Компоненты оценки классификации согласно Лугано.

| Диагностическая СТ/MRI | FDG-PET с применением F¹⁸ |
|---|--|
| Поражения целевых лимфатических узлов и внеузловые патологические очаги До 6 наиболее крупных целевых узлов, узловых образований или других лимфоматозных патологических очагов, которые можно измерить по двум диаметрам (наибольший диаметр [LDi] и наименьший диаметр), следует | Оценка посредством PET по 5-балльной шкале (Довиль) (Лимфатические узлы и дополнительные лимфатические узлы) * По 5-балльной шкале участок с наиболее интенсивным поглощением FDG в данный момент времени оценивается следующим образом: |

| | | |
|--|---|---|
| <p>идентифицировать из разных областей тела, представляющих общее бремя заболеваний субъекта, включая средостенное и ретроперитонеальное заболевания, в случае вовлечения.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Узловая форма заболевания: LD_i должен составлять > 1,5 см ▪ Внеузловая форма заболевания: LD_i должен составлять > 1,0 см <p>Неизмеряемые патологические очаги Все другие патологические очаги (включая узловые, внеузловые и поддающиеся оценке) следует рассматривать как неизмеряемое заболевание (например, кожные, GI, костные, селезеночные, печеночные, почечные, плевральные или перикардальные экссудаты, асцит).</p> <p>Увеличение органа (селезенка) Селезенка считается увеличенной (спленомегалия), если размер от краниальной до каудальной части составляет > 13 см.</p> <p>Новые патологические очаги</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Узловая форма заболевания: LD_i должен составлять > 1,5 см ▪ Внеузловая форма заболевания: любой размер | Балл | Критерии |
| | 1 | Поглощение отсутствует |
| | 2 | Поглощение ≤ в средостении |
| | 3 | Поглощение > в средостении, но ≤ в печени |
| | 4 | Поглощение умеренно выше, чем в печени (умеренно указывает на поглощение, превышающее поглощение в нормальной печени) |
| | 5 | Поглощение заметно выше, чем в печени (заметно указывает на поглощение, значительно превышающее поглощение в нормальной печени) и/или новые патологические очаги |
| X | Маловероятно, что новые области поглощения связаны с лимфомой | |
| <p>Костный мозг: поглощение FDG оценено как</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ отсутствие поглощения FDG, характерного для лимфомы ▪ очаговое поглощение FDG, характерное для лимфомы ▪ диффузное поглощение FDG, характерное для лимфомы | | |

СТ: компьютерная томография; FDG с применением F¹⁸: фтордезоксиглюкоза F18; LD_i: наибольший диаметр; MRI: магнитно-резонансная томография; PET: позитронно-эмиссионная томография.

* См. (Barrington et al., (2014) *J Clin Oncol*, 32, 3048-3058).

Таблица 14. Критерии Лугано для оценки ответа.

В каждый последующий момент времени регистрируется ответ на основании PET и ответ на основании СТ согласно определениям, приведенным ниже.

| Ответ и участок | Ответ на основании PET | Ответ на основании СТ |
|-----------------|------------------------|------------------------------|
| ПОЛНЫЙ | | |
| | Полный метаболический | Полный радиологический ответ |

| | ответ* ВСЕ из следующего | ВСЕ из следующего |
|---|---|---|
| Лимфатические узлы, внеузловые патологические очаги | Балл 1, 2 или 3* | Лимфатические узлы: Все < 1,5 см по измерениям наибольшего диаметра. Внелимфатическое заболевание отсутствует. |
| Неизмеряемый патологический очаг | N/A | Отсутствует |
| Увеличение органа | N/A | Селезенка: нормальный размер |
| Новые патологические очаги | Отсутствие новых патологических очагов (новые патологические очаги при оценке получают 5 баллов) | Отсутствует |
| Костный мозг | Отсутствие заболевания в костном мозге с повышенным поглощением FDG | Нормальный по морфологии; если не определено, отрицательный согласно ИНС. |
| ЧАСТИЧНЫЙ | | |
| | Частичный метаболический ответ | Частичная ремиссия ВСЕ из следующего |
| Лимфатические узлы, внеузловые патологические очаги | Балл 4 или 5 со снижением поглощения по сравнению с исходным уровнем и остаточными образованиями любого размера | ≥ 50% снижение SPD всех целевых патологических очагов по сравнению с исходным уровнем |
| Неизмеряемый патологический очаг | N/A | Отсутствует, в норме или регрессирует, но без увеличения |
| Увеличение органа | N/A | Селезенка: ≥ 50% снижение по сравнению с исходным уровнем в увеличенной части |
| Новые патологические очаги | Отсутствует | Отсутствует |
| Костный мозг | Остаточное поглощение выше, чем поглощение в нормальном костном мозге, но снижено по сравнению с исходным уровнем (например, устойчивые очаговые изменения в костном мозге с ответом с вовлечением узлов) | N/A |
| ОТСУТСТВИЕ ОТВЕТА/СТАБИЛЬНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ | | |

| | Отсутствие метаболического ответа | Стабильное заболевание |
|---|--|---|
| Лимфатические узлы, внеузловые патологические очаги | Балл 4 или 5 без значительного изменения поглощения FDG по сравнению с исходным уровнем | < 50% снижение SPD всех целевых очагов по сравнению с исходным уровнем Отсутствие прогрессирования |
| Неизмеряемый патологический очаг | N/A | Отсутствие повышения, характерного для прогрессирования |
| Увеличение органа | N/A | Селезенка: отсутствие повышения, характерного для прогрессирования |
| Новые патологические очаги | Отсутствует | Отсутствует |
| Костный мозг | Отсутствие изменения по сравнению с исходным уровнем | N/A |
| ПРОГРЕССИРОВАНИЕ | | |
| | Прогрессирующий метаболический ответ | Прогрессирующее заболевание ЛЮБОЕ из следующего |
| Лимфатические узлы, внеузловые патологические очаги | Лимфатические узлы/узловые образования: балл 4 или 5 с повышением поглощения по сравнению с исходным уровнем. Внеузловые патологические очаги: новые очаги с повышенным поглощением FDG, характерные для лимфомы. | Прогрессирование PPD Отдельный узловой/внеузловой патологический очаг должен быть аномальным (узловой патологический очаг с $LDi > 1,5$ см, внеузловой патологический очаг с $LDi > 1,0$ см) с: <ul style="list-style-type: none"> ▪ увеличением на $\geq 50\%$ от произведения перпендикулярных диаметров (PPD) от самого низкого уровня И ▪ увеличением LDi или SDi от самого низкого уровня <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\geq 0,5$ см для патологических очагов ≤ 2 см ▪ $\geq 1,0$ см для патологических очагов > 2 см |
| Неизмеряемый патологический очаг | Отсутствует | Однозначное прогрессирование |
| Увеличение органа | Отсутствует | Прогрессирование ранее существовавшей спленомегалии: длина селезенки должна увеличиться на 50% от степени ее предыдущего увеличения по сравнению с исходным уровнем |

| | | |
|----------------------------|--|---|
| | | (например, селезенка размером 15 см должна увеличиться до 16 см). Новый случай спленомегалии: селезенка должна увеличиться на по меньшей мере 2 см по сравнению с исходным уровнем или рекуррентная спленомегалия |
| Новые патологические очаги | Новые очаги с повышенным поглощением FDG, характерные для лимфомы, а не для другой этиологии | Возобновление роста ранее устраненных патологических очагов новый узел > 1,5 см по любой оси новый внеузловой участок > 1,0 см по любой оси новый внеузловой участок < 1,0 см по любой оси или однозначно характерный для лимфомы/связанный с лимфомой новое поддающееся оценке заболевание, однозначно характерное для лимфомы/связанное с лимфомой любого размера |
| Костный мозг | Новые/рекуррентные очаги с повышенным поглощением FDG | Новое или рекуррентное вовлечение |

FDG: фтордезоксиглюкоза; ИНС: иммуногистохимический анализ; LD_i: наибольший диаметр; N/A: не применимо; PPD: перпендикулярные диаметры; SD_i: наименьший диаметр; SPD: сумма произведений диаметров.

* Балл по Довиль, равняющийся 3, указывает на полный метаболический ответ (Barrington et al., (2014) *J Clin Oncol*, 32, 3048-3058).

Примечание: известно, что в кольце Вальдейера или во внеузловых участках с высоким физиологическим поглощением или с активацией в селезенке или костном мозге (например посредством химиотерапии или миелоидных колониестимулирующих факторов) поглощение может быть выше, чем в нормальном средостении и/или печени. В этих обстоятельствах можно сделать вывод о полном метаболическом ответе, если поглощение в участках первоначального вовлечения не выше, чем в окружающей нормальной ткани, даже если ткань характеризуется высоким физиологическим поглощением.

Вторичные конечные точки (повышение дозы и расширение когорты)

Эффективность

Продолжительность ответа/ремиссии (центральное чтение/оценка).
Продолжительность ответа/ремиссии сообщается только для субъектов, у которых имели место случаи объективного ответа. Оно рассчитывается как время между первым

объективным ответом и датой прогрессирования заболевания или смерти по любой причине.

Выживаемость без прогрессирования/без явлений (центральное чтение/оценка). Выживаемость без прогрессирования (PFS) и выживаемость без явлений рассчитываются как разница между датой инфузии CTX110 и датой прогрессирования заболевания или смерти по любой причине. Субъекты, которые не характеризовались прогрессированием и все еще участвуют в исследовании на момент даты прекращения сбора данных, подвергаются цензуре на момент даты последней оценки.

Общая выживаемость. Общая выживаемость рассчитывается как время между датой введения первой дозы CTX110 и смертью по любой причине. Субъекты, которые являются живыми на момент даты прекращения сбора данных, подвергаются цензуре на момент последней даты, в который известно, что они являются живыми.

Безопасность

Частота и тяжесть АЕ и клинически значимых лабораторных отклонений.

Фармакокинетика

Уровни CTX110 в крови с течением времени.

Конечные точки исследования (повышение дозы и расширение когорт)

Уровни CTX110 в тканях (например, перенос CTX110 в костный мозг, CSF и/или опухолевую ткань можно оценить в любых образцах, собранных согласно отбору образцов по протоколу).

Уровни цитокинов в крови и других тканях.

Распространенность антител к CTX110.

Уровни В-клеток и иммуноглобулинов с течением времени.

Влияние антицитокиновой терапии на пролиферацию CTX110, CRS и ответ.

Частота аутологичной или аллогенной HSCT после терапии с применением CTX110.

Частота и тип последующей противораковой терапии.

Время до полного ответа/ремиссии.

Первая последующая выживаемость без терапии.

Другие геномные, белковые, метаболические или фармакодинамические конечные точки.

Схема исследования

Это открытое многоцентровое исследование фазы 1 для оценки безопасности и эффективности CTX110 у субъектов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями. Исследование разделено на 2 части: повышение дозы (часть А) с последующим расширением когорт (часть В).

В части А исследуется повышение доз CTX110 в когорте А у взрослых субъектов с 1 из следующих подтипов NHL: NOS DLBCL, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перегруппировками *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*, FL степени 3b или трансформированная FL.

В части исследования по повышению дозы добавляли 1 дополнительную когорту (когорту В) с группой с NHL, аналогично когорте А, для изучения повышенной дозы циклофосфида (750 мг/м^2) по сравнению с когортой А (500 мг/м^2). Субъекты в когорте В подвергаются лечению при повышенной дозе циклофосфида для изучения эффектов более длительной супрессии лимфоцитов в отношении роста Т-клеток с CAR после инфузии CTX110 (см. таблицу 15).

Таблица 15. Когорта А и когорта В.

| Когорта | Подгруппа заболевания | Лечение |
|---------|--|--|
| А | Взрослые субъекты с NOS DLBCL, В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности с перегруппировками <i>MYC</i> и <i>BCL2</i> и/или <i>BCL6</i> , FL степени 3b и трансформированной FL | LD химиотерапия: совместное введение 30 мг/м^2 флударабина+циклофосфамид 500 мг/м^2 IV один раз в день в течение 3 дней □ CTX110, начиная с DL1 |
| В | То же, что и когорта А | LD химиотерапия: совместное введение 30 мг/м^2 флударабина+циклофосфамид 750 мг/м^2 IV один раз в день в течение 3 дней □ CTX110, начиная с DL2 |

DL1/2: уровень дозы 1 или 2; DLBCL: диффузная В-крупноклеточная лимфома; FL: фолликулярная лимфома; IV: внутривенно; LD: лимфодеплеция.

Исследование разделено на 2 части: повышение дозы (часть А) с последующим расширением когорт (часть В). Обе части исследования будут состоять из 3 основных стадий: скрининг, лечение и последующее наблюдение. Схематическое изображение схемы исследования показано на **ФИГ. 21**.

График оценок представлен в **таблице 16** и **таблице 17**.

Стадия 1 - скрининг для определения соответствия требованиям для лечения (до 14 дней).

Стадия 2 - лимфодеплецирующая (LD) химиотерапия и инфузия CTX110 (1-2 недели). Как перед началом LD химиотерапии, так и перед началом инфузии CTX110 соответствие субъектов клиническим требованиям должно быть подтверждено повторно.

Стадия 2А - LD химиотерапия:

когорта А: совместное введение 30 мг/м^2 флударабина и 500 мг/м^2 циклофосфида внутривенно (IV) один раз в день в течение 3 дней.

Когорта В: совместное введение 30 мг/м^2 флударабина и 750 мг/м^2 циклофосфида внутривенно (IV) один раз в день в течение 3 дней.

Стадия 2В - инфузия CTX110:

когорта А (подгруппы с NHL): лимфоплецирующая (LD) химиотерапия (30 мг/м² флударабина и 500 мг/м² циклофосфамида внутривенно [IV] один раз в день в течение 3 дней) завершена за по меньшей мере 48 часов (но не более чем за 7 дней) до инфузии СТХ110 (повышение дозы от уровня дозы [DL] 1).

Когорта В (более высокая доза LD химиотерапии): LD химиотерапия (30 мг/м² флударабина и 750 мг/м² циклофосфамида IV один раз в день в течение 3 дней) завершена за по меньшей мере 48 часов (но не более чем за 7 дней) до инфузии СТХ110 (повышение дозы от уровня дозы [DL] 2).

Стадия 3 - последующее наблюдение (5 лет после последней инфузии СТХ110).

Как для повышения дозы, так и для расширения когорт субъекты должны оставаться в непосредственной близости от исследовательского центра (т.е. в течение 1-часового перемещения) в течение 28 дней после инфузии СТХ110. В течение этого периода мониторинга острой токсичности субъектов будут регулярно оценивать в отношении нежелательных явлений (АЕ), включая синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность и GvHD. Рекомендации по контролю токсичности приведены в протоколе исследования. Во время повышения дозы всех субъектов будут госпитализировать в течение первых 7 дней после инфузии СТХ110 или дольше, если этого требует местное законодательство или практика исследовательского центра.

По истечении периода мониторинга острой токсичности субъектов будут наблюдать в течение до 5 лет после инфузии СТХ110 с физикальными осмотрами, регулярными лабораторными оценками и оценками посредством визуализации, а также оценками АЕ. После завершения данного исследования субъекты должны будут участвовать в отдельном долгосрочном исследовании с последующим наблюдением в течение дополнительных 10 лет для оценки долгосрочной безопасности и выживаемости.

LD химиотерапию следует отложить при наличии любого из следующих признаков или симптомов:

значительное ухудшение клинического статуса, которое, согласно мнению исследователя, повышает потенциальный риск АЕ, ассоциированных с LD химиотерапией.

Потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения > 91%.

Новая неконтролируемая сердечная аритмия.

Гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами.

Активная инфекция: посевы крови, положительные в отношении бактерий, грибов или вирусов, не отвечающих на лечение.

- Острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------|---|---|---|---|---|---|--|--|---|--|---|---|--|---|--|--|--|---|
| Тест в отношении беременности ⁶ | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Статус согласно ESOG | X | | X | | | | | | | X | | X | | | | | | | |
| Эхокардиограмма | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ECG в 12 отведениях ⁷ | X | X | X | | | | | | | X | | | | | | | | | |
| MRI головного мозга | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Люмбальная пункция ⁸ | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Оценка ICE ⁹ | X | | X | X | X | X | X | | | X | | | | | | | | | |
| Результаты, сообщаемые пациентом | X | | | | | | | | | | | X | X | | X | | | | X |
| Сопутствующие лекарственные препараты ¹⁰ | Непрерывно | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Нежелательные явления ¹¹ | Непрерывно | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------|---|---|--|--|--|--|--|--|---|---|-----------------|-----------------|---|---|--|---|---|
| Госпитализация | Непрерывно | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Лечение | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LD химиотерапия ¹² | | X | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Инфузия СТХ110 ¹³ | | | X | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ответ заболевания NHL/оценка NHL (в центральной нервной системе и локально) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Сканирование посредством PET/CT ¹⁴ | X | | | | | | | | | X | | X | X | X | X | | X | X |
| Биопсия ВМ ¹⁵ | X | | | | | | | | | X | | | | | | | | |
| Биопсия опухоли ¹⁶ | | | | | | | | | | X | | | | | | | | |
| Патология опухоли ¹⁷ | X | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ответ заболевания В-клеточной ALL у взрослых/оценка заболевания В-клеточной ALL у взрослых | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Биопсия и аспирация ВМ (в центральной нервной системе и локально) ^{14, 15} | X | | | | | | | | | | X | X ¹⁸ | X ¹⁸ | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|--|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| В-клетки (CD19, CD20) | X | | X | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Группа крови, результаты скрининга Ab ²² | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Биомаркеры (кровь, центральная нервная система) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PK CTX110 ^{23, 24} | X | | X ²⁵ до /после | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Цитокины ²⁶ | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | |
| Ab к Cas9 ²⁴ | X | | | | | | | | | | X | | X | | | X | | | X |
| Ab к CTX110 ²⁴ | X | | | | | | | | | | X | | X | | | X | | | X |
| Имунофенотип | X | | X ²⁵ до/ после | | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| ДНК | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Внеклеточная ДНК | X | | | | | | | | | | X | X | X | X | | X | | X | X |
| РВМС | X | | | | | | | | | | X | | X | X | X | X | | X | X |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Исследуемые биомаркеры ²⁷ | X | X ²⁸ | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
|--------------------------------------|---|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Ab: антитело; AE: нежелательное явление; BM: костный мозг; Cas9: CRISPR-ассоциированный белок 9; CBC: общий анализ крови; ЦНС: центральная нервная система; CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; CRP: С-реактивный белок; CT: компьютерная томография;

D или d: день; EC₉₀: эффективная концентрация 90%; ECG: электрокардиограмма; ECOG: Восточная объединенная онкологическая группа; HBV: вирус гепатита В; HCV: вирус гепатита С; HIV-1/-2: вирус иммунодефицита человека 1 или 2 типа; HSCT: трансплантат гемопоэтических стволовых клеток; ICE: энцефалопатия, ассоциированная с иммунными эффекторными клетками; ICF: форма информированного согласия; IPI: Международный прогностический индекс; LD: лимфодеплеция; LP: люмбальная пункция; M: месяц; MRI: магнитно-резонансная томография; PBMC: моноклеарная клетка периферической крови; ПЦР: полимеразная цепная реакция; PET: позитронно-эмиссионная томография; PK: фармакокинетический(фармакокинетика); Q: каждый; TBNK: Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (клетки).

¹ Оценки посредством скрининга завершены в течение 14 дней с момента получения информированного согласия. Субъектам разрешен 1-кратный повторный скрининг в течение 3 месяцев с момента подписания первоначального согласия.

² Если не указано иное, все исходные оценки в день 1 должны быть выполнены до инфузии STX110.

³ Включает полный хирургический и кардиологический анамнез.

⁴ Включает артериальное давление в положении сидя, частоту сердечных сокращений, частоту дыхания, пульсоксиметрию и температуру.

⁵ Рост только при скрининге.

⁶ Для субъектов-женщин с детородным потенциалом. Тест в отношении беременности посредством анализа сыворотки крови при скрининге. Тест в отношении беременности посредством анализа сыворотки крови или мочи за 72 часа до начала LD химиотерапии.

⁷ До LD химиотерапии и до инфузии STX110.

⁸ LP при скрининге субъектов с высоким риском поражения ЦНС (например, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перестройками *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*, субъекты с поражением яичек лимфомой или показателем с показателем IPI с высоким риском для ЦНС). Для LP, выполняемых во время нейротоксичности, образцы должны быть отправлены в центральную лабораторию для анализа PK STX110 и исследуемых биомаркеров, если это возможно.

⁹ В день 1 до введения СТХ110. Если симптомы со стороны ЦНС сохраняются после дня 28, оценку ICE следует продолжать выполнять примерно один раз в 2 дня до разрешения симптомов до степени 1 или до исходного уровня.

¹⁰ Информацию о всех сопутствующих лекарственных препаратах будут собирать через ≤ 3 месяца после введения СТХ110, после чего будут собирать информацию только о выбранных сопутствующих лекарственных препаратах.

¹¹ Следует собрать информацию обо всех АЕ от момента подписания информированного согласия до визита в месяц 3, следует собрать информацию обо всех SAE и AESI после визита в месяц 3 и до визита в месяц 60. В течение ≤ 3 месяцев после введения СТХ110 следует сообщать только о SAE и AESI, если субъект начинает новую противораковую терапию до визита в месяц 3. Будет сообщаться только о AESI, если субъект начинает новую противораковую терапию после визита в месяц 3.

¹² Следует начинать LD химиотерапию в течение 7 дней после включения в исследование. После завершения LD химиотерапии следует обеспечить период выведения ≥ 48 часов (но ≤ 7 дней) перед инфузией СТХ110. Физикальный осмотр, взвешивание и лабораторные исследования свертывания крови проводили до введения первой дозы LD химиотерапии. Основные показатели жизнедеятельности, CBC, клинический химический анализ и АЕ/сопутствующие лекарственные препараты оценивали и регистрировали каждый день (т. е. 3 раза) в ходе LD химиотерапии.

¹³ СТХ110 вводили через от 48 часов до 7 дней после завершения LD химиотерапии.

¹⁴ Оценку заболевания на исходном уровне (PET/СТ для субъектов с NHL) следует выполнять за 28 дней до инфузии СТХ110. MRI с контрастированием допускается, если СТ клинически противопоказана, или если это требуется согласно местному законодательству.

¹⁵ Биопсия ВМ для подтверждения полного ответа в качестве части оценки заболевания. Биопсию ВМ также можно выполнять во время рецидива заболевания. Образцы, полученные посредством аспирации ВМ, после инфузии СТХ110 должны быть отправлены для анализа РК СТХ110 и исследуемых биомаркеров. Следует выполнить в течение ± 5 дней с даты визита.

¹⁶ Необязательно: для субъектов, которые страдают заболеванием, поддающемся биопсии, и которые предоставили отдельное согласие. Следует выполнить в течение ± 5 дней с даты визита.

¹⁷ Предпочтительно, чтобы субъекты подвергались биопсии опухоли в ходе скрининга. Однако, если биопсию рецидивирующего/рефрактерного заболевания выполняли в течение 3 месяцев до включения в исследование и после последней линии терапии, можно использовать архивную ткань. Если в ходе исследования происходит рецидив, необходимо предпринять все возможные попытки осуществить биопсию рецидивирующей опухоли и отправить ее результаты для центрального патологического исследования. Биопсия опухоли относится к тканям, отличным от костного мозга.

¹⁸ Оценки в месяцы 2 и 3 для подтверждения CR, если он не достигнут в месяц 1.

¹⁹ Следует выполнять только у субъектов, которые прошли предшествующую аллогенную HSCT.

²⁰ Тестирование в отношении инфекционных заболеваний (HIV-1, HIV-2, антитело к HCV/ПЦР, поверхностный антиген HBV, поверхностное антитело HBV, антитело к коровому белку HBV) через ≤ 30 дней после подписания ICF может рассматриваться для определения соответствия субъекта критериям участия в исследовании.

²¹ Оценка подгруппы лимфоцитов при скрининге, перед началом первого дня LD химиотерапии, перед инфузией CTX110, затем во всех перечисленных временных точках. Следует включить 6-цветную панель TBNK или эквивалент для T-клеток, B-клеток и естественных клеток-киллеров.

²² Результаты скрининга группы крови и антител.

²³ Образцы для анализа РК CTX110 должны быть отправлены после любой биопсии LP, BM или биопсии ткани, выполненной после инфузии CTX110. В случае возникновения CRS образцы для оценки уровней CTX110 будут собирать каждые 48 часов между запланированными визитами до тех пор, пока CRS не разрешится.

²⁴ Спонсор может потребовать прекращение сбора образцов, если последовательные тесты являются отрицательными. Следует продолжать сбор образцов для всех перечисленных временных точек до тех пор, пока спонсор не дал иных инструкций.

²⁵ Два образца, собранные в день 1: одна инфузия до введения CTX110 и одна через 20 (± 5) минут после окончания инфузии CTX110.

²⁶ Дополнительные образцы цитокинов следует собирать каждый день в течение всего периода проявления CRS. Перед инфузией CTX110 необходимо собрать образцы в день 1.

²⁷ Образцы для анализа исследуемых биомаркеров должны быть отправлены после любой биопсии LP или BM, выполненной после инфузии CTX110. В случае возникновения CRS образцы для оценки исследуемых биомаркеров будут собирать каждые 48 часов между запланированными визитами до тех пор, пока CRS не разрешится.

²⁸ Только до первого дня LD химиотерапии.

Таблица 17. График оценок (месяцы 30-60).

| Оценки | M30 (± 21 день) | M36 (± 21 день) | M42 (± 21 день) | M48 (± 21 день) | M54 (± 21 день) | M60 (± 21 день) | Прогрессирую щее заболевание | Вторичное последующ ее наблюдени |
|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|---|
|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|---|

| | | | | | | | | e ¹ |
|--|---|---|---|---|---|---|---|----------------|
| Основные показатели жизнедеятельности ² | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Физикальное обследование | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Сопутствующие лекарственные препараты ³ | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Оценка заболевания ⁴ | X | X | X | X | X | X | X | |
| СВС с лейкоцитарной формулой ⁵ | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Химический анализ сыворотки крови ⁵ | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Иммуноглобулины ^{5,6} | X | X | X | X | X | X | X | |
| Подгруппы лимфоцитов ^{5,6} | X | X | X | X | X | X | X | |
| Персистентность СТХ110 (кровь, центральная нервная система) ^{6,7} | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Исследуемые биомаркеры (кровь, центральная нервная система) | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Ab к Cas9 (кровь, центральная нервная система) ⁶ | | X | | X | | X | X | |
| Ab к СТХ110, Ab к даратумумабу (кровь, центральная нервная система) ⁶ | | X | | X | | X | X | |
| Результаты, сообщаемые пациентом | | X | | X | | X | X | |
| Нежелательные явления ⁸ | X | X | X | X | X | X | X | X |

Ab: антитело; AESI: нежелательное явление, представляющее особый интерес; BM: костный мозг; Cas9: CRISPR-ассоциированный

белок 9; CBC: общий анализ крови; CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; CT: компьютерная томография; NHL: неходжкинская лимфома; PET: позитронно-эмиссионная томография; PK: фармакокинетика; SAE: серьезное нежелательное явление; TBNK: Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (клетки).

¹ Субъекты с прогрессирующим заболеванием или проходящие трансплантацию стволовых клеток откажутся от обычного графика оценок и будут посещать ежегодные визиты для исследования. Визиты будут проходить с интервалом в 12 месяцев. Субъекты, частично отозвавшие согласие, должны будут пройти как минимум эти процедуры.

² Включает измерение температуры, артериального давления, частоты пульса и частоты дыхания.

³ Будут собирать информацию только о выбранных сопутствующих лекарственных препаратах.

⁴ Оценка заболевания будет состоять из обзора исследователем физикального осмотра, CBC, клинического химического анализа и лактатдегидрогеназы для субъектов с NHL, и физикального осмотра, CBC с лейкоцитарной формулой и клинического химического анализа в случае В-клеточной ALL. Субъекты с NHL с подозрением на наличие злокачественного новообразования будут проходить визуализацию посредством PET/CT и/или биопсию костного мозга для подтверждения рецидива. Следует предпринимать все возможные попытки получения результатов биопсии рецидивирующей опухоли у пациентов с прогрессированием.

⁵ Оценивали в местной лаборатории. Следует включить 6-цветную панель TBNK или эквивалент для Т-клеток, В-клеток и естественных клеток-киллеров.

⁶ Спонсор может потребовать прекращения сбора образцов. Следует продолжать сбор образцов для всех перечисленных временных точек до тех пор, пока спонсор не дал иных инструкций.

⁷ Образцы для анализа PK CTX110 следует отправлять в центральную лабораторию после любой люмбарной пункции, биопсии ВМ или биопсии ткани, выполненной после инфузии CTX110.

⁸ В течение до 3 месяцев после инфузии CTX110 следует сообщать о SAE и AESI, если субъект начинает новую противораковую терапию до визита в месяц 3 в ходе исследования. Будет сообщаться только о AESI, если субъект начинает новую противораковую терапию после визита в месяц 3 в ходе исследования.

Целью лимфодеплеции является обеспечение значительной экспансии Т-клеток с CAR после инфузии. LD химиотерапию, состоящую из флударабина и циклофосфамида в разных дозах, успешно применяли в нескольких исследованиях аутологичных Т-клеток с CAR. Обоснованием применения LD химиотерапии является устранение регуляторных Т-клеток и других конкурирующих элементов иммунной системы, которые действуют в качестве «приемников цитокинов», повышая доступность цитокинов, таких как интерлейкин 7 (IL-7) и интерлейкин 15 (IL-15) (Dummer et al., (2002) *J Clin Invest*, 110, 185-192; Gattinoni et al., (2005) *J Exp Med*, 202, 907-912). Кроме того, постулируется, что наивные Т-клетки начинают пролиферировать и дифференцироваться в Т-клетки, подобные клеткам памяти, если общие количества наивных Т-клеток снижаются ниже определенного порога (Dummer et al., (2002) *J Clin Invest*, 110, 185-192). Когорта А будет использовать циклофосфамид (500 мг/м²) и флударабин (30 мг/м²) при дозах, которые соответствуют дозам, используемым в регистрационных клинических испытаниях аксикаптагена цилолейцела. Когорта В будет использовать более высокую дозу циклофосфамида (750 мг/м²) для оценки того, может ли повышенная интенсивность лимфодеплеции способствовать экспансии клеток в составе продукта на основе аллогенных Т-клеток с CAR. Дозы циклофосфамида в пределах этого диапазона (всего > 120 мг/кг или 3 г/м²) использовали в предыдущих исследованиях терапии с применением Т-клеток с CAR при гематологических злокачественных новообразованиях (Brentjens et al., (2011) *Blood*, 118, 4817-4828; Kochenderfer et al., (2015) *J Clin Oncol*, 33, 540-549; Turtle et al., (2016) *Sci Transl Med*, 8, 355ra116). При применении в составе LD химиотерапии с более высокой интенсивностью повышенные дозы циклофосфамида ассоциированы с повышенной эффективностью (Hirayama et al., (2019) *Blood*, 133, 1876-1887).

Инфузию CTX110 следует отложить при наличии любого из следующих признаков или симптомов:

- новая активная неконтролируемая инфекция.
- Ухудшение клинического статуса по сравнению с клиническим статусом перед началом LD химиотерапии, что, по мнению исследователя, подвергает субъекта повышенному риску проявления токсичности.
- Острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

Доза CTX110

Клетки CTX110 вводятся IV с применением схемы равномерного введения дозы на основании количества CAR+ Т-клеток. Начальная доза составляет 3×10^7 CAR+ Т-клеток, что примерно на 1 log ниже, чем дозы аутологичных Т-клеток с CAR, которые в настоящее время одобрены для лечения NHL, включая KYMRIAH[®] (всего 5×10^8 Т-клеток с CAR) и YESCARTA[®] (2×10^6 /кг, максимум 2×10^8 Т-клеток с CAR).

Повышение дозы

Повышение дозы будет выполняться с применением стандартной схемы 3+3. Следующие дозы CTX110 на основании количества CAR+ Т-клеток могут быть оценены в данном исследовании, начиная с DL1 для когорты А. Только после оценки и

подтверждения безопасности DL2 в когорте А Комитетом по обзору безопасности (SRC) последующая когорта В может быть открыта/в нее могут быть включены субъекты и может быть начато повышение дозы с DL2. В связи с предельной дозой в исследовании, составляющей 7×10^4 TCR+ клеток/кг, исследование можно продолжать с DL4 в когорте А и/или когорте В, если значения веса субъектов ≥ 60 кг (см. таблицу 18).

Таблица 18. Уровни доз.

| Уровень дозы | Общая доза CAR+ Т-клеток |
|--------------|--------------------------|
| -1 | 1×10^7 |
| 1 | 3×10^7 |
| 2 | 1×10^8 |
| 3 | 3×10^8 |
| 4 | 1×10^9 |

CAR: химерный антигенный рецептор.

Период оценки DLT начинается с инфузии СТХ110 и длится в течение 28 дней. Первые 3 субъекта в каждой когорте будут подвергаться лечению поочередно таким образом, что 2-й и 3-й субъекты будут получать СТХ110 только после того, как предыдущий субъект завершил период оценки DLT. При последующих уровнях доз или повышении того же уровня дозы в когорты могут быть включены до 3 субъектов и введение им доз можно осуществлять одновременно.

Субъекты должны получать СТХ110 с оценкой DLT. Если субъект прерывает участие в исследовании в любое время до инфузии СТХ110, субъекта не будут оценивать в отношении DLT, а субъект для его замены будет включен в исследование с тем же уровнем дозы, который был у субъекта, прервавшего участие в исследовании. Если у субъекта, оцениваемый в отношении DLT, характеризуется признаками или симптомами потенциальной DLT, период оценки DLT будет продлен согласно определенному в протоколе окну для обеспечения улучшения или разрешения до заключения о DLT.

Токсичность классифицировали и документировали согласно Общим терминологическим критериям оценки нежелательных явлений Национального института рака (CTCAE) версии 5, за исключением CRS (критерии Ли), нейротоксичности (ICANS, критерии оценки синдрома нейротоксичности, ассоциированной с иммунными эффекторными клетками, и CTCAE v5.0) и GvHD (критерии Международного консорциума по острой GVHD Mount Sinai [MAGIC]).

DLT будет определяться как любое из следующих явлений, имеющих место в ходе периода оценки DLT, которое сохраняется дольше указанной продолжительности (относительно времени начала):

GvHD ≥ 2 степени, рефрактерная к стероидам (например, прогрессирующее заболевание через 3 дня лечения с применением стероидов [например 1 мг/кг/день], стабильное заболевание через 7 дней или частичный ответ через 14 дней лечения).

Смерть в ходе периода DLT (за исключением по причине прогрессирования заболевания).

Любая токсичность 3 или 4 степени, которая, по мнению исследователя, является клинически значимой и не улучшается в течение 72 часов.

Следующее **НЕ** будет рассматриваться в качестве DLT:

CRS 3 или 4 степени, который нормализуется до ≤ 2 степени в течение 72 часов.

Нейротоксичность 3 или 4 степени (например, энцефалопатия, спутанность сознания), которая улучшается до ≤ 2 степени в течение 14 дней.

Лихорадка 3 или 4 степени.

Кровотечение в условиях тромбоцитопении (количество тромбоцитов $< 50 \times 10^9/\text{л}$); задокументированные бактериальные инфекции или лихорадка в условиях нейтропении (абсолютное количество нейтрофилов $< 1000/\text{мм}^3$).

Гипогаммаглобулинемия 3 или 4 степени.

Легочная токсичность 3 или 4 степени, которая разрешается до ≤ 2 степени в течение 7 дней. Для субъектов с интубацией по причине перегрузки жидкостью вследствие поддерживающей терапии этот период времени можно увеличить до 14 дней.

Исследования функции печени 3 или 4 степени, которая улучшается до ≤ 2 степени в течение 14 дней.

Почечная недостаточность 3 или 4 степени, которая улучшается до ≤ 2 степени в течение 21 дня.

Тромбоцитопения или нейтропения 3 или 4 степени будут оценены ретроспективно. После инфузии по меньшей мере 6 субъектам, если $\geq 50\%$ субъектов страдают длительной цитопенией (т. е. длящейся более чем 28 дней после инфузии), повышение дозы будет приостановлено до оценки SRC.

АЕ, которые не имеют вероятной причинно-следственной связи с СТХ110, не будут рассматриваться в качестве DLT.

Контроль токсичности

Субъекты должны подвергаться тщательному мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней после инфузии СТХ110. Сообщалось о значительной токсичности средств терапии на основе аутологичных Т-клеток с CAR, и от исследователей требуется проактивный мониторинг и лечение всех нежелательных явлений согласно руководству по протоколу.

Следующие общие рекомендации предусмотрены на основании предшествующего опыта применения средств терапии на основе CD19-направленных аутологичных Т-клеток с CAR:

лихорадка представляет собой наиболее частое раннее проявление синдрома высвобождения цитокинов (CRS), однако субъекты могут также испытывать слабость, гипотензию или спутанность сознания в качестве первого проявления.

Диагностика CRS должна быть основана на клинических симптомах, а НЕ на лабораторных значениях.

У субъектов, которые не отвечали на лечение, CRS-специфический контроль всегда предусматривает рассмотрение сепсиса и устойчивых инфекций. Субъектов следует постоянно оценивать в отношении устойчивых или вновь возникающих бактериальных инфекций, а также грибковых или вирусных инфекций.

CRS, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH) и синдром лизиса опухоли (TLS) могут возникать одновременно после инфузии Т-клеток с CAR. Субъектов следует постоянно подвергать мониторингу в отношении признаков и симптомов всех состояний и контролировать соответствующим образом.

Нейротоксичность может возникать во время CRS, в ходе разрешения CRS или после разрешения CRS. Оценивание и контроль нейротоксичности будут проводиться отдельно от CRS.

Тоцилизумаб должен быть введен в течение 2 часов с момента назначения.

Профиль безопасности CTX110 будет постоянно оцениваться на протяжении всего исследования, и исследователи на регулярной основе будут обновлять новую информацию, относящуюся к идентификации и контролю потенциальной токсичности, связанной с CTX110.

Инфузионные реакции

В испытаниях аутологичных CD19-направленных Т-клеток с CAR сообщалось об инфузионных реакциях, включая временную лихорадку, озноб и/или тошноту. Ацетаминофен (парацетамол) и гидрохлорид дифенгидрамина (или другое H1-антигистаминное средство) можно повторно вводить один раз в 6 часов после инфузии CTX110, при необходимости, если возникает инфузионная реакция. При необходимости могут быть назначены нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты, если у пациента продолжается лихорадка, которая не облегчалась ацетаминофеном. Системные стероиды не следует вводить, за исключением случаев, когда существует опасность для жизни, поскольку это вмешательство может оказывать неблагоприятный эффект на Т-клетки с CAR.

Фебрильная реакция и профилактика инфекций

Профилактика инфекций должна осуществляться согласно установленному стандарту оказания помощи пациентам с В-клеточными злокачественными новообразованиями в условиях ослабленного иммунитета. В случае фебрильной реакции следует начать оценку инфекции и назначить пациенту соответствующее лечение антибиотиками, жидкостями и другой поддерживающей помощью, как это указано с медицинской точки зрения и определено лечащим врачом. Если лихорадка сохраняется, то следует учитывать вирусные и грибковые инфекции на протяжении всего медицинского контроля пациента. Если у субъекта развивается сепсис или системная бактериемия после инфузии CTX110, следует начать выполнение соответствующих посевов и медицинский контроль. Кроме того, следует учитывать CRS в любых случаях лихорадки после инфузии CTX110 в течение 30 дней после инфузии.

Синдром лизиса опухоли (TLS)

Субъекты, проходящие терапию с применением Т-клеток с CAR, подвергаются повышенному риску развития TLS. Субъектов необходимо подвергать тщательному мониторингу в отношении TLS посредством лабораторных оценок и симптомов с начала LD химиотерапии и до 28 дней после инфузии CTX110. Все пациенты должны получать профилактический аллопуринол (или альтернативное средство, отличное от аллопуринола, например фебуксостат) и потреблять повышенное количество жидкости перорально/IV в ходе скрининга и до начала LD химиотерапии. Профилактику можно прекратить через 28 дней после инфузии CTX110 или после того, как проходит риск развития TLS.

В исследовательских центрах должны осуществляться мониторинг и лечение TLS согласно установленному стандарту оказания помощи или согласно опубликованным руководствам (Cairo and Bishop, (2004) *Br J Haematol*, 127, 3-11). Контроль TLS, включая введение расбуриказы, следует начинать незамедлительно при наличии клинических показаний.

Синдром высвобождения цитокинов (CRS)

CRS представляет собой основной вид токсичности, о которой сообщалось при терапии с применением аутологичных CD19-направленных Т-клеток с CAR. CRS возникает вследствие гиперактивации иммунной системы в ответ на вовлечение CAR целевого антигена, что приводит к повышению уровня многих цитокинов в результате быстрой стимуляции и пролиферации Т-клеток (Frey et al., (2014) *Blood*, 124, 2296; Maude et al., (2014) *Cancer J*, 20, 119-122). Когда цитокины высвобождаются, могут проявляться различные клинические признаки и симптомы, ассоциированные с CRS, включая сердечные, желудочно-кишечные (GI), неврологические, дыхательные (одышка, гипоксия), кожные, сердечно-сосудистые (гипотензия, тахикардия) и системные (лихорадка, озноб, потливость, анорексия, головные боли, недомогание, усталость, артралгия, тошнота и рвота) симптомы и отклонения лабораторных показателей (свертывания крови, почечных и печеночных).

Целью контроля CRS является предупреждение опасных для жизни осложнений при сохранении потенциала противоопухолевых эффектов CTX110. Симптомы обычно возникают через 1-14 дней после терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR, однако время проявления симптомов для аллогенных Т-клеток с CAR полностью не определено.

CRS следует идентифицировать и лечить на основании клинического проявления, а не лабораторных изменений уровней цитокинов. Если имеется подозрение на CRS, оценивание и контроль следует проводить согласно рекомендациям в **таблице 19**, которые адаптированы из опубликованных руководств (Lee et al., (2014) *Blood*, 124, 188-195). С момента разработки оригинальных критериев оценки CRS согласно Ли, врачи, использующие средства терапии на основе Т-клеток с CAR, получили более глубокое понимание проявления и динамики CRS. Согласно недавним консенсусным критериям Американского общества трансплантации крови и костного мозга (ASBMT) (Lee et al.,

(2018) *Biol Blood Marrow Transplant*) рекомендуется, чтобы оценивание основывалось на наличии лихорадки с гипотензией и/или гипоксией, а также с другой стороны токсичность в отношении органов следует контролировать отдельно посредством поддерживающей помощи. Соответственно, в этом протоколе нейротоксичность будет оцениваться и контролироваться с применением другой шкалы (см. раздел под названием "Синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (ICANS)"), а конечная токсичность в отношении органов в контексте контроля CRS относится только к печеночной и почечной системам (как в критериях оценивания Пенн; (Porter et al., (2018) *J Hematol Oncol*, 11, 35). Спонсор может пересмотреть критерии оценивания CRS и алгоритмы контроля токсичности для того, чтобы отразить консенсусное предложение ASBMT, основанное на клиническом опыте применения CTX110 и других средств терапии на основе Т-клеток с CAR.

Таблица 19. Руководство по оцениванию и контролю синдрома высвобождения цитокинов.

| Тяжесть CRS ¹ | Тоцилизумаб | Кортикостероиды |
|--|---|--|
| <p>Степень 1 Симптомы требуют только симптоматического лечения (например, лихорадка, усталость, головная боль, миалгия, недомогание).</p> | N/A | N/A |
| <p>Степень 2 Симптомы требуют умеренного вмешательства и отвечают на него. Потребность в кислороде < 40% FiO₂ или гипотензия, отвечающая на жидкости или низкую дозу 1 вазопрессорного средства, или токсичность 2 степени в отношении органов.²</p> | <p>Ввести 8 мг/кг тоцилизумаба³ IV в течение 1 часа (но не более 800 мг). При необходимости повторить введение тоцилизумаба один раз в 8 часов при отсутствии ответа на IV введение жидкостей или повышение дополнительного введения кислорода. Ограничить введение до ≤ 3 доз в течение 24-часового периода времени; максимум</p> | <p>При отсутствии улучшения в течение 24 часов после начала введения тоцилизумаба осуществлять контроль как при 3 степени.</p> |

| | | |
|---|---|---|
| | всего 4 дозы. | |
| <p>Степень 3</p> <p>Симптомы требуют значительного вмешательства и отвечают на него. Потребность в кислороде $\geq 40\%$ FiO₂, или гипотензия, требующая высокой дозы или нескольких вазопрессорных средств⁴, или токсичность в отношении органов 3 степени, или трансаминит 4 степени.</p> | Как при 2 степени. | <p>Если отсутствует улучшение в течение 24 часов после начала введения тоцилизумаба, ввести метилпреднизолон 1 мг/кг IV два раза в день.</p> <p>Продолжить применение кортикостероидов до достижения ≤ 1 степени события, затем постепенно снижать дозу в течение 3 дней.</p> |
| <p>Степень 4</p> <p>Опасные для жизни симптомы. Требования к аппарату искусственной вентиляции легких, непрерывному вено-венозному гемодиализу или токсичности 4 степени в отношении органов (за исключением трансаминита).</p> | <p>Как при 2 степени.</p> <p>Если отсутствует ответ на несколько доз тоцилизумаба и стероидов, рассмотреть применение других антицитокиновых средств терапии (например силтуксимаба).</p> | Как при 3 степени. |

CRS: синдром высвобождения цитокинов; FiO₂: доля вдыхаемого кислорода; IV: внутривенно; N/A: не применимо.

¹ См. (Lee et al., (2014) Blood, 124, 188-195).

² См. пункт под названием "Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome (ICANS)" для контроля неврологической токсичности. Токсичность в отношении органов относится только к печеночной и почечной системам.

³ См. инструкцию по применению тоцилизумаба.

⁴ См. таблицу 20 для получения информации о высоких дозах вазопрессорных средств.

Таблица 20. Высокие дозы вазопрессорных средств.

| Прессорное средство | Доза* |
|---|--|
| Монотерапия с применением норэпинефрина | ≥ 20 мкг/мин |
| Монотерапия с применением дофамина | ≥ 10 мкг/кг/мин |
| Монотерапия с применением фенилэфрина | ≥ 200 мкг/мин |
| Монотерапия с применением эпинефрина | ≥ 10 мкг/мин |
| В случае вазопрессина | Вазопрессин+эквивалент норэпинефрина ≥ 10 мкг/мин** |
| В случае комбинации вазопрессорных средств (не вазопрессин) | Эквивалент норэпинефрина ≥ 20 мкг/мин** |

* Все дозы необходимо вводить в течение ≥ 3 часов.

** Уравнение эквивалента вазопрессорного средства испытания VASST: эквивалентная доза норэпинефрина=[норэпинефрин (мкг/мин)] + [дофамин (мкг/мин)/2] + [эпинефрин (мкг/мин)] + [фенилэфрин (мкг/мин)/10]

На протяжении всего периода CRS субъекты должны получать поддерживающую помощь, состоящую из антипиретиков, IV жидкостей и кислорода. Субъектов, которые испытывали CRS ≥ 2 степени (например, гипотензия, отсутствие ответа на жидкости или гипоксия, требующая дополнительной оксигенации), необходимо подвергать мониторингу посредством непрерывной кардиотелеметрии и пульсоксиметрии. Для субъектов, испытывающих CRS 3 степени, рассмотреть возможность проведения эхокардиограммы для оценки сердечной функции. При CRS 3 или 4 степени рассмотреть возможность поддерживающей терапии посредством интенсивной помощи. Интубацию для защиты дыхательных путей вследствие нейротоксичности (например судорожного припадка), а не вследствие гипоксии, не следует рассматривать в качестве CRS 4 степени. Аналогичным образом, длительная интубация вследствие нейротоксичности без других признаков CRS (например гипоксии) не рассматривается в качестве CRS 4 степени. Исследователи всегда должны учитывать потенциал основной инфекции в случаях тяжелого CRS, поскольку проявление (лихорадка, гипотензия, гипоксия) является сходным. Разрешение CRS определяется по разрешению лихорадки (температура ≥ 38 °C), гипоксии и гипотензии (Lee et al., (2018) *Biol Blood Marrow Transplant*).

Синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (ICANS)

Нейротоксичность наблюдали при применении терапевтических средств на основе аутологичных CD19-направленных Т-клеток с CAR. Она может возникать во время CRS, в

ходе разрешения CRS или после разрешения CRS, и ее патофизиология является неясной. Недавний консенсус ASBMT дополнительно определил нейротоксичность, ассоциированную с CRS, как синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (ICANS), нарушение, характеризующееся патологическим процессом, затрагивающим ЦНС, после любой иммунной терапии, которая приводит к активации или вовлечению эндогенных или инфузированных Т-клеток и/или других иммунных эффекторных клеток (Lee et al., (2018) *Biol Blood Marrow Transplant*). Признаки и симптомы могут быть прогрессирующими и могут включать афазию, измененный уровень сознания, нарушение когнитивных навыков, моторную слабость, судорожные припадки и отек головного мозга. Классификацию ICANS разрабатывали на основе критериев рабочей группы по токсичности, ассоциированной с терапией с применением Т-клеток с CAR (CAROX), которые ранее использовали в испытаниях аутологичных Т-клеток с CAR (Neelapu et al., (2018) *N Engl J Med*, 377, 2531-2544). ICANS включает оценку уровня сознания, наличия/отсутствия судорожных припадков, двигательных отклонений, наличия/отсутствия отека головного мозга и общую оценку неврологических доменов посредством применения модифицированного инструмента для оценивания, называемого ICE (энцефалопатия, ассоциированная с эффекторными иммунными клетками) (см. **таблицу 21**).

Оценка любого нового проявления нейротоксичности должна включать неврологическое обследование (включая инструмент для оценивания ICE, **таблица 22**), MRI головного мозга и исследование CSF (посредством люмбальной пункции) по клиническим показаниям. Если MRI головного мозга провести невозможно, все субъекты должны пройти СТ без контрастирования для исключения внутримозгового кровоизлияния. Электроэнцефалограмму также следует рассматривать по клиническим показаниям. В тяжелых случаях для защиты дыхательных путей может потребоваться эндотрахеальная интубация.

Неседативную противосудорожную профилактику (например леветирацетам) следует рассматривать у всех субъектов в течение по меньшей мере 21 дня после инфузии CTX110 или после разрешения неврологических симптомов (если исследователь не считает, что лекарственный препарат против судорожных припадков вносит вклад в проявление неблагоприятных симптомов). Субъекты, которые испытывают ICANS ≥ 2 степени, должны подвергаться мониторингу посредством кардиотелеметрии и пульсоксиметрии. При тяжелой или опасной для жизни неврологической токсичности следует проводить поддерживающую терапию посредством интенсивной помощи. Всегда следует рассматривать возможность консультации невролога. Осуществлять мониторинг пациентов в отношении тромбоцитов и признаков коагулопатии и соответствующим образом осуществлять трансфузию препаратов крови для снижения риска внутримозгового кровоизлияния. В **таблице 21** представлены критерии оценивания нейротоксичности, и в **таблице 23** представлено руководство по контролю.

Для субъектов, которые получают активный контроль посредством применения стероидов в течение более чем 3 дней, рекомендуется противогрибковая и противовирусная профилактика для снижения риска тяжелой инфекции при длительном применении стероидов. Следует также рассмотреть противомикробную профилактику.

Таблица 21. Оценивание ICANS.

| Домен нейротоксичности | Степень 1 | Степень 2 | Степень 3 | Степень 4 |
|---|------------------------|-------------------------------|---|---|
| Балльная оценка ICE ¹ | 7-9 | 3-6 | 0-2 | 0 (субъект невосприимчив и не может пройти оценивание ICE) |
| Подавленный уровень сознания ² | Пробуждается спонтанно | Пробуждается в ответ на голос | Пробуждается только при воздействии тактильного раздражителя | Субъект невосприимчив или требует сильных или повторяющихся тактильных раздражителей для пробуждения; ступор или кома |
| Судорожный припадок | N/A | N/A | Любой клинический судорожный припадок, очаговый или генерализованный, который быстро разрешается, или неконвульсивные судорожные припадки на EEG, которые разрешаются посредством | Опасный для жизни продолжительный судорожный припадок (> 5 мин) или повторяющиеся клинические или электрические судорожные припадки без возврата к исходному уровню в промежутках |

| | | | | |
|--------------------------------------|-----|-----|--|--|
| | | | вмешательства | между ними |
| Двигательные отклонения ³ | N/A | N/A | N/A | Глубокая очаговая моторная слабость, такая как гемипарез или парапарез |
| Повышенное ICP/отек головного мозга | N/A | N/A | Очаговый/локальный отек при нейровизуализации ⁴ | Диффузный отек головного мозга при нейровизуализации, и, децеребрационная или декорткационная поза, паралич VI черепного нерва, папилладема или триада Кушинга |

СТСАЕ: Общие терминологические критерии оценивания нежелательных явлений; EEG: электроэнцефалограмма; ICANS: синдром нейротоксичности, ассоциированный с эффекторными иммунными клетками; ICE: энцефалопатия, ассоциированная с эффекторными иммунными клетками (инструмент для оценивания); ICP: внутричерепное давление; N/A: не применимо.

Степень ICANS определяется по наиболее тяжелому явлению (балльная оценка ICE, уровень сознания, судорожный припадок, двигательные нарушения, повышение ICP/отек головного мозга), не связанному с какой-либо другой причиной.

¹ Субъект с балльной оценкой ICE, составляющей 0, может быть классифицирован как страдающий ICANS 3 степени в случае нахождения в сознании с глобальной афазией, однако субъект с балльной оценкой ICE, составляющей 0, может быть классифицирован как страдающий ICANS 4 степени, если он невосприимчив.

² Подавленный уровень сознания не должен быть связан с какой-либо другой причиной (например седативным лекарственным препаратом).

³ Тремор и миоклонус, ассоциированные со средствами терапии на основе иммунных эффекторных клеток, следует оценивать согласно СТСАЕ v5.0, однако они не влияют на оценивание ICANS.

Таблица 22. Оценка ICE.

| Домен | Оценка | Максимальный |
|-------|--------|--------------|
|-------|--------|--------------|

| | | балл |
|---------------------------|---|-------------|
| Ориентация | Ориентация в отношении года, месяца, города, больницы | 4 балла |
| Способность к обозначению | Обозначьте 3 объекта (например, укажите на часы, ручку, кнопку) | 3 балла |
| Следование команде | Способность следовать командам (например, "покажите мне 2 пальца" или "закройте глаза и высуньте язык") | 1 балл |
| Письмо | Способность написать стандартное предложение (включает существительное и глагол) | 1 балл |
| Внимание | Способность к обратному отсчету от 100 до 10 | 1 балл |

Балльная оценка ICE будет представлена в виде общего количества баллов (0-10) по всем оценкам.

Оценивание ICE будет проводиться в ходе скрининга перед введением СТХ110 в день 1 и в дни 2, 3, 5, 8 и 28. Если субъект испытывает симптомы со стороны ЦНС, оценивание ICE следует продолжать примерно один раз в два 2 дня до разрешения симптомов. Для минимизации вариативности по возможности оценивание должно выполняться одним и тем же научным сотрудником, который знаком с оценкой ICE или обучен ее осуществлению.

Таблица 23. Руководство по контролю ICANS.

| Тяжесть | Контроль |
|--|--|
| Степень 2 | Рассмотреть возможность введения 10 мг дексаметазона IV один раз в 6 часов (или эквивалента метилпреднизолона), если субъект уже не принимает эквивалентную дозу стероидов для лечения CRS. Продолжать применение дексаметазона до достижения ≤ 1 степени события, затем постепенно снижать дозу в течение 3 дней. |
| Степень 3 | Вводить 10 мг дексаметазона IV один раз в 6 часов, если субъект уже не принимает эквивалентную дозу стероидов для лечения CRS. Продолжать применение дексаметазона до достижения ≤ 1 степени события, затем постепенно снижать дозу в течение 3 дней. |
| Степень 4 | Вводить 1000 мг метилпреднизолона IV в день в течение 3 дней; при улучшении осуществлять контроль, как указано выше. |
| CRS: синдром высвобождения цитокинов; ICANS: синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками; IV: внутривенно. | |

Головная боль, которая может возникнуть в условиях лихорадки или после химиотерапии, является неспецифическим симптомом. Головная боль как таковая не обязательно может быть проявлением ICANS, поэтому необходимо проводить дополнительную оценку. Слабость или проблемы с равновесием, возникающие в результате потери физической формы и потери мышечной массы, исключаются из определения ICANS. Аналогично, внутричерепное кровоизлияние с ассоциированным отеком или без него может возникнуть вследствие коагулопатий у этих субъектов и также исключено из определения ICANS. Эти и другие виды нейротоксичности следует фиксировать согласно СТСАЕ v5.0.

Аплазия В-клеток

Может возникать аплазия В-клеток и ее будут контролировать посредством отслеживания уровней иммуноглобулина G в крови. IV введение гаммаглобулина будет осуществляться при клинически значимой гипогаммаглобулинемии (системных инфекциях) согласно установленному стандарту оказания помощи.

Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH)

Сообщалось о HLH после лечения с применением аутологичных CD19-направленных Т-клеток с CAR (Barrett et al., (2014) *Curr Opin Pediatr*, 26, 43-49; Maude et al., (2014) *N Engl J Med*, 371, 1507-1517; Maude et al., (2015) *Blood*, 125, 4017-4023; Porter et al., (2015) *Sci Transl Med*, 7, 303ra139; Teachey et al., (2013) *Blood*, 121, 5154-5157. HLH представляет собой клинический синдром, который является результатом воспалительной реакции после инфузии Т-клеток с CAR, при котором выработка цитокинов активированными Т-клетками приводит к избыточной активации макрофагов. Признаки и симптомы HLH могут включать виды лихорадки, виды цитопении, гепатоспленомегалию, дисфункцию печени с гипербилирубинемией, коагулопатию со значительным снижением уровня фибриногена и заметное повышение уровней ферритина и С-реактивного белка (CRP). Также наблюдались неврологические отклонения (Jordan et al., (2011) *Blood*, 118, 4041-4052; La Rosée, (2015) *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 190-196.

CRS и HLH могут характеризоваться сходными клиническими синдромами с частично совпадающими клиническими признаками и патофизиологией. HLH, вероятно, будет возникать во время CRS или при разрешении CRS. Следует рассмотреть HLH при необъяснимых повышенных результатах функциональных тестов печени или видах цитопении с другими признаками CRS или без них. Мониторинг CRP и ферритина может способствовать постановке диагноза и определению клинического течения.

При подозрении на наличие HLH:

часто осуществлять мониторинг параметров свертывания крови, включая фибриноген. Эти тесты можно проводить чаще, чем указано в графике оцениваний, и частота должна определяться на основании лабораторных данных.

Уровень фибриногена должен составлять ≥ 100 мг/дл для снижения риска кровотечения.

Коагулопатию следует корректировать препаратами крови.

Учитывая частичное совпадение с CRS, субъектов также следует контролировать с применением руководства для лечения CRS в **таблице 19**.

Виды цитопении

Сообщалось о нейтропении и тромбоцитопении 3 степени, иногда продолжающихся более 28 дней после инфузии, у субъектов, подвергавшихся лечению продуктами на основе аутологичных CD19-направленных Т-клеток с CAR (Kymriah USPI, 2017; Yescarta USPI, 2017). Следовательно, субъектов, получающих CTX110, следует подвергать мониторингу в отношении видов токсичности и оказывать им соответствующую поддержку. Следует рассматривать возможность осуществления противомикробной и противогрибковой профилактики для любого субъекта с длительной нейтропенией.

G-CSF можно рассматривать в случаях нейтропении 4 степени через 21 день после инфузии CTX110, если риск CRS устранен.

Реакция "трансплантат против хозяина"

GvHD наблюдается в условиях аллогенной HSCT и является результатом того, что иммунокомпетентные донорные Т-клетки (трансплантат) распознают реципиента (хозяина) как чужеродного. Последующий иммунный ответ активирует донорные Т-клетки для атаки реципиента с уничтожением чужеродных антиген-несущих клеток. GvHD подразделяется на острые, хронические и перекрывающиеся симптомы на основании как времени с момента проявления аллогенной HSCT, так и клинических проявлений. Признаки острой GvHD могут включать макулопапулезную сыпь; гипербилирубинемия с желтухой вследствие поражения малых желчных протоков, приводящую к холестазу; тошноту, рвоту и анорексию; водянистую или кровавую диарею и схваткообразную боль в животе (Zeiser and Blazar, (2017) *N Engl J Med*, 377, 2167-2179).

В поддержку предлагаемого клинического исследования проводили доклиническое исследование GvHD и переносимости, соответствующее требованиям надлежащей лабораторной практики (GLP), на мышах с ослабленным иммунитетом при 2 дозах, которые превышали все предложенные клинические уровни доз по меньшей мере в 10 раз. Кроме того, вследствие специфичности вставки CAR в локус TRAC крайне маловероятно, что Т-клетка одновременно является CAR+ и TCR+. Оставшиеся TCR+ клетки удаляли в ходе процесса получения посредством иммуноаффинной хроматографии на колонке с антителами к TCR для достижения < 0,5% TCR+ клеток в конечном продукте. Предел дозы, составляющий 7×10^4 TCR+ клеток/кг, будет использоваться для всех уровней доз. Этот предел ниже, чем предел 1×10^5 TCR+ клеток/кг на основании опубликованных отчетов о количестве аллогенных клеток, способных вызывать тяжелую GvHD в ходе SCT с донорами, идентичными по гаплотипу (Bertaina et al., (2014) *Blood*, 124, 822-826). Посредством данного специфического редактирования, очистки и строгих критериев выпуска продукта риск GvHD после введения CTX110 должен быть низким, хотя фактическая частота является неизвестной. После инфузии CTX110 пациентов следует подвергать тщательному мониторингу в отношении признаков острой GvHD. Время

проявления потенциальных симптомов является неизвестным. Однако, учитывая, что экспансия Т-клеток с CAR контролируется антигенами, и, вероятно, будет происходить только в случае TCR- клеток, маловероятно, что количество TCR+ клеток значительно превысит количество инфузировавшихся клеток.

Постановка диагноза и оценивание GvHD должны основываться на опубликованных критериях (Harris et al., (2016) *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, 4-10), как указано в **таблице 24**.

Таблица 24. Критерии оценивания острой GvHD

| Стадия | Кожа (только активная эритема) | Печень (уровень билирубина в мг/дл) | Верхние отделы GI | Нижние отделы GI (количество кала/день) |
|--------|--|--|---|---|
| 0 | Отсутствие активной (эритематозной) сыпи при GvHD | < 2 | Отсутствие тошноты, рвоты или анорексии или их периодический характер | < 500 мл/день или < 3 эпизода/день |
| 1 | Макулопапулезная сыпь < 25% BSA | 2-3 | Постоянная тошнота, рвота или анорексия | 500-999 мл/день или 3-4 эпизода/день |
| 2 | Макулопапулезная сыпь 25-50% BSA | 3,1-6 | - | 1000-1500 мл/день или 5-7 эпизодов/день |
| 3 | Макулопапулезная сыпь > 50% BSA | 6,1-15 | - | > 1500 мл/день или > 7 эпизодов/день |
| 4 | Генерализованная эритродермия (> 50% BSA) совместно с буллезным образованием и шелушением > 5% BSA | > 15 | - | Сильная боль в животе с кишечной непроходимостью или без нее или в значительной степени кровянистый кал (независимо от объема кала) |

BSA: площадь поверхности тела; ЖКТ: желудочно-кишечный тракт; GvHD: реакция "трансплантат против хозяина".

Общая степень GvHD будет определяться на основании наиболее тяжелого поражения целевых органов.

Степень 0: Отсутствие поражения 1-4 стадии любого органа.

Степень 1: поражение кожи 1-2 стадии без вовлечения печени, верхних отделов GI или нижних отделов GI.

Степень 2: сыпь 3 стадии, и/или поражение печени 1 стадии, и/или поражение верхних отделов GI 1 стадии, и/или поражение нижних отделов GI 1 стадии.

Степень 3: поражение печени 2-3 стадии, и/или поражение нижних отделов GI 2-3 стадии, поражение кожи 0-3 стадии, и/или поражение верхних отделов GI 0-1 стадии.

Степень 4: поражение кожи, печени 4 стадии или вовлечение нижних отделов GI, поражение верхних отделов GI 0-1 стадии.

Следует исключить потенциальные противоречивые факторы, которые могут имитировать GvHD, такие как инфекции и реакции на лекарственные препараты. Биопсию кожи и/или GI необходимо проводить для подтверждения до или непосредственно после начала лечения. В случае вовлечения печени следует попытаться провести биопсию печени, если это клинически возможно. Образец(образцы) всех биоптатов также отправят в центральную лабораторию для оценки патологии. Подробная информация о подготовке и транспортировке образцов содержится в лабораторном руководстве.

Рекомендации по контролю острой GvHD указаны в **таблице 25**. Для обеспечения сопоставимости между субъектами в конце испытания исследователи должны следовать этим рекомендациям, за исключением конкретных клинических сценариев, при которых следование им может подвергнуть субъекта риску.

Таблица 25. Контроль острой GvHD

| Степень | Контроль |
|---------|---|
| 1 | Кожа: стероиды для местного применения или иммуносупрессанты; в случае 2 стадии: 1 мг/кг преднизона (или эквивалентная доза). |
| 2-4 | Начать введение 2 мг/кг преднизона один раз в день (или эквивалентной дозы). В случае опасений по поводу мальабсорбции следует рассмотреть стероид для IV введения, такой как метилпреднизолон. Постепенное снижение дозы стероида можно начинать после того, как наблюдается улучшение после ≥ 3 дней применения стероидов. Постепенное снижение дозы должно составлять 50% от общей суточной дозы стероида один раз в 5 дней. GI: в дополнение к стероидам начать введение средств против диареи согласно стандартной практике. |

GI: желудочно-кишечный тракт; IV: внутривенный.

Решения о начале терапии второй линии следует принимать раньше для пациентов с более тяжелой GvHD. Например, вторичная терапия может быть показана через 3 дня при прогрессирующих проявлениях GvHD, через 1 неделю при устойчивой GvHD 3 степени или через 2 недели при устойчивой GvHD 2 степени. Системная терапия второй линии может быть показана раньше субъектам, которые не переносят лечение высокими дозами глюкокортикоидов (Martin et al., (2012) *Biol Blood Marrow Transplant*, 18, 1150-1163). Выбор вторичной терапии и времени ее начала будет сделан на основании клинической оценки лечащим врачом-исследователем и местной практики.

Контроль рефрактерной острой GvHD или хронической GvHD будет осуществляться согласно установленному руководству. При лечении субъектов иммуносупрессантами (включая стероиды) следует принимать меры противoinфекционной профилактики согласно местным руководствам.

Гипотензия и почечная недостаточность

При терапии с применением Т-клеток с CAR сообщалось о гипотензии и почечной недостаточности, которые следует лечить посредством IV введения болюсов изотонического раствора хлорида натрия согласно установленным практическим руководствам. При необходимости следует рассмотреть возможность диализа.

Соответствие критериям включения в исследование

Критерии включения

Для того, чтобы считаться соответствующим критериям включения для участия в данном исследовании субъект должен соответствовать критериям включения, перечисленным ниже (если они не указаны как необязательные критерии):

1. Возраст ≥ 18 лет и вес > 50 кг (необязательный критерий).
2. Способность понимать и соблюдать требуемые согласно протоколу процедуры исследования и добровольно подписывать документ о письменном информированном согласии.
3. Диагностировано 1 из следующих В-клеточных злокачественных новообразований:

гистологически подтвержденные В-клеточные NHL: NOS DLBCL, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перегруппировками *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*, трансформированная FL или FL степени 3b.

Подтверждение гистологического анализа опухоли из местной патологической лаборатории (архивная ткань от последнего рецидива/прогрессирования [в течение 3 месяцев с момента включения в исследование] или биопсия в ходе скрининга).

По меньшей мере 1 измеряемый патологический очаг, который является положительным по результатам позитронно-эмиссионной томографии (PET) с применением фтордезоксиглюкозы, как определено согласно критериям Лугано (балльная оценка 4 или 5 по 5-балльной шкале критериев Лугано). Ранее облученные патологические очаги будут считаться измеряемыми только в том случае, если после завершения лучевой терапии документально подтверждено прогрессирование.

4. Рефрактерное или рецидивирующее заболевание, о чем свидетельствуют следующие критерии, специфические в отношении когорт:

две или более линий предшествующей терапии, включая моноклональное антитело к CD20 и схему, предусматривающую антрациклин, и неэффективность предшествующей аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) или не соответствие критериям или отказ от предшествующей аутологичной HSCT. Субъекты, прошедшие аутологичную HSCT, должны восстановиться после видов токсичности, связанных с HSCT.

В случае рефрактерного заболевания субъекты должны страдать прогрессирующим заболеванием в ходе последней терапии или страдать стабильным заболеванием после по меньшей мере 2 циклов терапии с продолжительностью стабильного заболевания до 6 месяцев.

В случае субъектов с трансформированной FL субъекты должны проходить по меньшей мере 1 линию химиотерапии для лечения заболевания после трансформации в DLBCL.

5. Функциональный статус 0 или 1 согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG).

6. Соответствие критериям прохождения LD химиотерапии и инфузии T-клеток с CAR.

7. Нормальная функция органа:

почки: расчетная скорость клубочковой фильтрации > 50 мл/мин/1,73 м².

Печень: уровень аспартаттрансаминазы или аланинтрансаминазы < 3 x верхний предел нормы (ULN); уровень общего билирубина $< 1,5$ x ULN (для субъектов с синдромом Жильбера уровень общего билирубина < 2 мг/дл).

Сердце: гемодинамическая стабильность и фракция выброса левого желудочка $\geq 45\%$ по данным эхокардиограммы.

Легкие: уровень насыщения кислородом воздуха в помещении $> 91\%$ по данным пульсоксиметрии.

8. Субъекты-женщины с детородным потенциалом (в постменархеальном периоде с интактной маткой и по меньшей мере 1 яичником, которые находятся менее 1 года в постменопаузе) должны дать согласие на применение приемлемого способа(способов) контрацепции с момента включения в исследование и на протяжении по меньшей мере 12 месяцев после инфузии CTX110.

9. Субъекты-мужчины должны дать согласие на применение эффективного способа контрацепции с момента включения в исследование и на протяжении по меньшей мере 12 месяцев после инфузии CTX110.

10. Согласие на участие в дополнительном долгосрочном последующем исследовании после завершения данного исследования.

Критерии исключения

Для соответствия критериям включения для участия в исследовании субъект не должен соответствовать ни одному из критериев исключения, перечисленных ниже:

1. Соответствие критериям аутологичной HSCT и согласие на ее проведение.

2. Лечение с применением следующих видов терапии, как описано ниже:

предшествующее лечение посредством любой генной терапии или терапии с применением генетически модифицированных клеток, включая Т-клетки с CAR.

Предшествующее лечение с применением CD19-направленного антитела, биспецифического средства для рекрутирования Т-клеток или конъюгата антитело-лекарственное средство, если не подтверждена экспрессия CD19 (посредством иммуногистохимического анализа или проточной цитометрии) после прогрессирования или рецидива после последнего CD19-направленного лечения.

3. Предшествующая аллогенная HSCT.

4. Известное противопоказание к применению циклофосфида, флударабина или любого из вспомогательных веществ продукта CTX110.

5. Выявляемые злокачественные клетки в спинномозговой жидкости (CSF), или результаты магнитно-резонансной томографии (MRI), указывающие на метастазы в головной мозг в ходе скрининга, или наличие в анамнезе поражения злокачественным новообразованием центральной нервной системы (ЦНС) (CSF или визуализация).

6. В анамнезе эпилепсия, цереброваскулярная ишемия/кровоизлияние, деменция, заболевание мозжечка или любое аутоиммунное заболевание с поражением ЦНС.

7. Нестабильная стенокардия, клинически значимая аритмия или инфаркт миокарда в течение 6 месяцев до скрининга.

8. Неконтролируемая острая опасная для жизни бактериальная, вирусная или грибковая инфекция.

9. Положительный результат на наличие инфекции вирусом иммунодефицита человека (HIV) 1 или 2 типа или активным вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV). Допускаются субъекты с предшествующей инфекцией HBV или HCV в анамнезе, у которых документально подтверждена невыявляемая вирусная нагрузка (посредством количественной полимеразной цепной реакции [ПЦР] или тестирования нуклеиновых кислот). Тестирование в отношении инфекционных заболеваний (HIV-1, HIV-2, антитело к HCV и ПЦР, поверхностный антиген HBV, поверхностное антитело HBV, антитело к коровому белку HBV), проведенное в течение 30 дней после подписания формы информированного согласия, может рассматриваться для определения соответствия субъекта критериям участия в исследовании.

10. Предшествующее или сопутствующее злокачественное новообразование, за исключением базальноклеточной или плоскоклеточной карциномы кожи, соответствующим образом подвергнутой резекции, и *in situ* карциномы шейки матки, или предшествующего злокачественного новообразования, которое было подвергнуто полной резекции и находилось в ремиссии ≥ 5 лет.

11. Лучевая терапия в течение 14 дней с момента включения в исследование.

12. Применение системной противоопухолевой терапии или исследуемого средства в течение 14 дней или 5 периодов полувыведения, в зависимости от того, что дольше, с момента включения в исследование. Исключения делаются для 1) предшествующей терапии с применением ингибирующих/стимулирующих молекул контрольных точек иммунного ответа, которая запрещена в течение 3 периодов полувыведения после включения в исследование, и 2) применение ритуксимаба в течение 30 дней до скрининга запрещено.

13. Первичное иммунодефицитное нарушение или активное аутоиммунное заболевание, требующее применение стероидов и/или другой иммуносупрессивной терапии.

14. Диагноз значительного психического расстройства или другого медицинского состояния, которое может нарушить способность субъекта к участию в исследовании.

15. Женщины, которые являются беременными или кормящими грудью.

Статистические методы

Размер выборки

Размер выборки в части исследования, связанной с повышением дозы, будет составлять от примерно 6 до 54 субъектов, в зависимости от количества оцениваемых уровней доз и когорт, а также наличия DLT.

Если исследование продолжается до расширения когорт, будет использоваться оптимальная 2-стадийная схема согласно Саймону. Размер выборки для каждой когорты будет зависеть от предположения о величине эффекта для конкретного показания.

Для расширения когорты А на первой стадии в исследование будут включены до 30 субъектов. Если 10 или больше из первых 30 субъектов в наборе для полного анализа достигают объективного ответа, то набор для участия в исследовании будет расширен для включения дополнительных 47 субъектов (всего 77) на второй стадии. Конечный размер выборки из 77 субъектов будет характеризоваться 90% мощностью ($\alpha=0,05$, 2-сторонний критерий) для тестирования разницы между ORR 45% с CTX110 и ORR 26%, расчетным значением ORR для терапии спасения у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной DLBCL.

Как и в когорте А, по завершении части исследования, связанной с повышением дозы, когорты В может перейти к расширению когорт после внесения изменений в протокол.

К настоящему времени все субъекты, которые участвовали в данном исследовании, завершили стадию 1 (скрининг в отношении соответствия критериям включения в исследование) в течение 14 дней. Один субъект завершил стадию 1 в течение 2 дней. Субъект, который соответствовал критериям включения в исследование, начал лимфодеплецирующую терапию в течение 24 часов после завершения стадии 1. Все соответствующие требованиям субъекты завершили период скрининга (стадия 1) и проходили LD химиотерапию в течение менее чем 15 дней, при этом один пациент завершил скрининг и начал получение дозы LD химиотерапии в течение 72 ч. Некоторые

из субъектов, соответствующих требованиям, имели DLBCL (например неуточненную (NOS) с высокой степенью злокачественности); другие имели трансформированную FL и трансформацию по Рихтеру.

Все субъекты, проходящие LD химиотерапию, прогрессировали до получения дозы DL1 или DL2 CTX110 в течение 2-7 дней после завершения LD химиотерапии. Результаты, полученные у этих пациентов к настоящему времени, кратко описаны ниже.

Субъекты, получавшие как дозу DL1, так и дозу DL2, испытывали снижение метаболической активности опухоли (поглощения FDG при ПЕТ-сканировании) и/или уменьшение размера опухоли. Наблюдали дозозависимый ответ, включая полный и устойчивый ответ в течение > 60 дней при DL2. Ни один из пациентов, подвергнутых лечению, до настоящего времени не демонстрировал какую-либо DLT. Кроме того, терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR проявляла желаемые фармакокинетические характеристики у подвергнутых лечению субъектов-людей, включая экспансию и персистенцию Т-клеток с CAR после инфузии. Дозозависимый эффект также наблюдали как в отношении экспансии, так и в отношении персистенции CTX110. Все субъекты при DL2 демонстрировали экспансию и персистенцию CTX110. У одного пациента наблюдали до 90-кратной экспансии CTX110 в периферической крови. Кроме того, персистенция клеток CTX110 можно выявить у субъектов при DL2 через по меньшей мере 8-10 дней после лечения и ее выявляли до 28 дней после инфузии.

ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|-----------------------------------|--|
| 1 | Отредактированный ген <i>TRAC</i> | AAGAGCAACAAATCTGACT |
| 2 | Отредактированный ген <i>TRAC</i> | AAGAGCAACAGTGCTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT |
| 3 | Отредактированный ген <i>TRAC</i> | AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT |
| 4 | Отредактированный ген <i>TRAC</i> | AAGAGCAACAGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT |
| 5 | Отредактированный ген <i>TRAC</i> | AAGAGCAACAGTGCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT |
| 6 | Отредактированный ген <i>TRAC</i> | AAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT |
| 7 | Отредактированный ген <i>TRAC</i> | AAGAGCAACAGTGCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT |
| 8 | Отредактированный ген <i>TRAC</i> | AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT |

| | | |
|----|--|---|
| 21 | Немодифицированный спейсер sgRNA для <i>B2M</i> | GCUACUCUCUCUUUCUGGCC |
| 22 | Модифицированная sgRNA для <i>TRAC</i> (TA-1) *: остаток 2'-О-метилфосфотиоата | A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaauga gcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcU*U*U*U |
| 23 | Модифицированный спейсер sgRNA для <i>TRAC</i> *: остаток 2'-О-метилфосфотиоата | A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC |
| 24 | Модифицированная sgRNA для <i>B2M</i> *: остаток 2'-О-метилфосфотиоата | G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaauga gcaaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagu cggugcU*U*U*U |
| 25 | Модифицированный спейсер sgRNA для <i>B2M</i> *: остаток 2'-О-метилфосфотиоата | G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC |
| 26 | Целевая последовательность <i>TRAC</i> | AGAGCAACAGTGCTGTGGCC |
| 27 | Целевая последовательность <i>B2M</i> | GCTACTCTCTTTCTGGCC |
| 28 | Целевая последовательность | AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG) |

| | | |
|----|---|--|
| | TRAC с (PAM) | |
| 29 | Целевая последовательность B2M с (PAM) | GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (TGG) |
| 30 | Сигнальный пептид | MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP |
| 31 | Сигнальный пептид | MALPVTALLPLALLLHAARP |
| 32 | Трансмембранный домен CD8a | IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY |
| 33 | Нуклеотидная последовательность 4-1BB | AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA ACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAG AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAA GAAGAAGGAGGATGTGAACTG |
| 34 | Аминокислотная последовательность 4-1BB | KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL |
| 35 | Нуклеотидная последовательность CD28 | TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATG AATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAA ACATTACCAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGC TGCGTACAGGTCC |
| 36 | Аминокислотная последовательность CD28 | SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRS |
| 37 | Нуклеотидная последовательность CD3-дзета | CGAGTGAAGTTTTCCC GAAGCGCAGACGCTCCGGC ATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAAC TGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTT GATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGG GTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTC TACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGC CTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGAC GGGGAAAAGGTCACGATGGCCTTACCAAGGGTTG AGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCA TATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA |
| 38 | Аминокислотная последовательность | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY |

| | | |
|----|---|--|
| | CD3-дзета | SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR |
| 39 | FMC63-28Z (FMC63-CD8[tm]- CD28[костимулиру ющий домен]- CD3z) | ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAAC TTCCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTC AGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCAC TGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGT CAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGTACCAGCA GAAGCCCGACGGAACGGTAAACTCCTCATCTATC ATACGTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGAT TTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTATTCCTTGA CTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACA TATTTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTACACT TTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTC CACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAG GTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGC GGCCCCGGTCTCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTCT GTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGAT TATGGCGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAA GGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAG AGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCT TGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTT TTCCTTAAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACC GCTATATATTATTGTGCTAACATTATTACTACGGC GGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGGCAGGGGAC TTCTGTCACAGTCAGTAGTGCTGCTGCCTTTGTCCC GGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGC CCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTC TCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACC CGCCGCCGGGGGTGCTGTTCATAAGAGGGGCTTGG ACTTCGCTTGTGATATTACATTTGGGCTCCGTTGG CGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACCTCGTTA TTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGC GGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGA CTCCTCGCCGGCCTGGGGCCGACAAGAAAACATTAC CAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTAC |

| | | |
|----|--|---|
| | | <p>AGGTCCCAGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGC TCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATA ACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGAC GTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAT GGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAA GGA CTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGC GGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAAC GACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAA GGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGC ACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA</p> |
| 40 | <p>Аминокислотная последовательность FMC63-28Z (FMC63-CD8[tm]- CD28[костимулиру ющий домен]- CD3z)</p> | <p>MLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGD RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGPNLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFL KMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p> |
| 41 | <p>TRAC-LHA (800 п. о.)</p> | <p>GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCC TTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGAC GCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCA ATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTC CCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTC TGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCC AGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT TTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATT GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAG AATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAGG TTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAAC</p> |

| | | |
|----|-------------------------|---|
| | | <p>GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGAT AGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA GCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAG CATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC GCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTG GGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTA ACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCC TGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGA TTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTG ATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATG AGGTCTATGGACTTCA</p> |
| 42 | TRAC-RHA (800 п. о.) | <p>TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGC CTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTT CCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGC AGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTG CCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCT GATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAA CCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTG GCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGAT GAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCA GCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTCCTGCCTGCCTGC CTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAG GCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCT TATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCT CACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCA CCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCA GGTGTGGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAG GGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGG GAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAAC TTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAA AACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGC TCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGCCCTA CCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGG ACAGGAGCTCAATGAGAAAGG</p> |

| | | |
|----|-------------------|--|
| 43 | EF1a | GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATC GCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCTG GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG GTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG CCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAA GTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACG GGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT GGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGC CCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGT ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTG GGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCC CCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGG CGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCT TCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGC CATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTT TTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAG ATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGG GCGGGCAGCGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGT TCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAG AATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTG CTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCC CGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCA GTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC TGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCT CGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAG GAAAAGGGCCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATG TGA CTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACC TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTT TAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTT CCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCC AGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGC CCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCT CAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTAG GTGTCGTGA |
| 44 | Сигнальный пептид | ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAAC |

| | | |
|----|--|---|
| | GM-CSF | TTCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCC |
| 45 | Сигнальный пептид GM-CSF | MLLLVTSLLLCELPHPAFLLP |
| 46 | scFv к CD19 | GATATTCAGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCT GCCTCACTGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCAG GGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGT ACCAGCAGAAGCCCACGGAACGGTAAACTCCTC ATCTATCATACTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCG TCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTAT TCCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATT GCGACATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCT TACACTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTAC CGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTG GAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAG GAGAGCGGCCCCGGTCTCGTTGCCCCCAGTCAAAG CCTCTCTGTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATT GCCTGATTATGGCGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCC GCGAAAGGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGG GCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAA AGTCGCTTGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAG TCAAGTTTTCTTAAATGAACAGTTTGCAGACTGA CGATACCGCTATATATTATTGTGCTAAACATTATTA CTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGGC AGGGGACTTCTGTCACAGTCAGTAGT |
| 47 | Аминокислотная последовательность scFv к CD19 Линкер подчеркнут | DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNLPHYTFGGGKLEIT <u>GSTSGS</u> <u>GKPGSGEGSTKGEV</u> KLQESGPLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNS ALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS |
| 48 | Внеклеточная часть CD8a+трансмембра нная часть CD8a+5' линкер | <u>GCTGCTGCC</u> TTTGTCCCAGTATTCTCCCAGCCAAA CCGACCACGACTCCC GCCCGCCCTCCGACACCC GCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGC CCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGT |

| | | |
|----|--|---|
| | (подчеркнут) | TCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTA CATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCT TTTGTGTGCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCAC AGGAATCGC |
| 49 | Внеклеточная часть CD8a+трансмембра нная часть CD8a (без линкера) | TTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACG ACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACC ATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCA TGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAG GGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGC TCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGTC ACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCG C |
| 50 | Внеклеточная часть CD8a+трансмембра нная часть CD8a | FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCNHRNR |
| 51 | VH CD19 | EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALSRLTIHKDNS KSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGTSVTVSS |
| 52 | VL CD19 | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT |
| 53 | Линкер CD19 | GSTSGSGKPGSGEGSTKG |
| 54 | LHA-RHA | GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCC TTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGAC GCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCA ATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTC CCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTC TGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCC AGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTT TTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATT GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAG AATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGG TTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAAC GTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGCCAAGATTGAT |

| | | |
|--|--|--|
| | | AGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGA GCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAG CATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCC GCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTG GGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTA ACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCC TGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGA TTCTCAAACAAATGTGTACAAAAGTAAGGATTCTG ATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACATG AGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGT TGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAG AGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGT CGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGG AGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG TTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT TTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTACTT CCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCT TCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTT GCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTG AGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGA ATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTC GATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCT GCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTT TTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTC CCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAG CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCG CCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC CGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGG AGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTC |
|--|--|--|

| | |
|--|--|
| | ACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAG CCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGC CGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGG GTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATG CGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCA TTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTC TTCCATTTAGGTGTCGTGACCACCATGCTTCTTTTG GTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCCTCATCCA GCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGACTCAG ACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCG AGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTA GCAAATACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGAC GGAACGGTAAAACTCCTCATCTATCATAACGTCAAG GTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGGTTC TGGGAGCGGAACTGACTATTCCTTGACTATTTCAA CCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTTGTCA ACAAGGTAATACCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAG GAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGC TCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAA AGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCCGTC TCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGCA CAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGCGTCT CCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGGTCTTGAA TGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTA TTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCTTGACGATAAT AAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAA TGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATT ATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGTTACG CGATGGATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTCACA GTCAGTAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTC CCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCC TCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCTCAACCTCT TAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCG |
|--|--|

GGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTT
GTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGT
GCGGCGTCCTTTTGTGTGTCCTCGTTATTACTTTGTA
TTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGT
TGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCC
GGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTAT
GCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCG
AGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCAT
ATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTG
AATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGA
TAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGT
AAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTA
CAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGG
GGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAG
TACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATA
TGCAGGCCCTGCCTCCAGATAATAATAAAATCGCT
ATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGT
GTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG
CCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCT
TCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCG
CAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCT
GCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTC
TGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAA
ACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCT
GGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGA
TGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCC
AGCCTCAGTCTCTCCAAGTCTGAGTTCCTGCCTGCCTG
CCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTA
GGCCTCATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTC
CTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAG
CTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACC
CACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCAC
CAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATG
AGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGG

| | | |
|----|--------|--|
| | | <p>GGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATA ACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAG AAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGG GCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGCC CTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCT GGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG</p> |
| 55 | spCas9 | <p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDK KHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDK ADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFI QLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLEN LIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSD AILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGA SAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNE LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEER LKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIR DKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQ KAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMK RIEEDIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGR DMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFR KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIHKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEIQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR</p> |

| | | |
|----|------|---|
| | | <p>DFATVRKVLSPQVNVIVKKTEVQTGGFSKESILPKRN SDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKE VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNEL ALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDK PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTST KEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD</p> |
| 56 | rAAV | <p>CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCAC GCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAA GGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTT AGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAACCTCT ATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAG ATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCC CATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGACC ACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGG GCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTT ATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATA AAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTT CAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGT GAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGAT TGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATC ACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTAT AAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAG CCCCGCCCTTGCCATCACTGGCATCTGGACTCCAG CCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGT CCTAACCTGATCCTCTTGTTCCACAGATATCCAGA ACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTA AATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATT TTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATT CTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGAC ATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCA</p> |

GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGA
AGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCC
TAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG
ATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG
GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTG
AACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACA
CAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGG
CCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAAT
TACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCC
GAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAG
GCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTG
AGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG
TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTG
CTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGAT
GACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTC
TTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTT
CGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGT
GCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCT
GCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCG
CGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG
CTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG
ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAA
AATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG
TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGT
CCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACC
GGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT
TTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGT
TTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGG
AGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAA
TTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTT
GGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTT
TTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACCATGCTT
CTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCCTC
ATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGA

| | |
|--|--|
| | <p>CTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAG ACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGAC ATTAGCAAATACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCC CGACGGAACGGTAAAACCTCATCTATCATAACGTC AAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGG TTCTGGGAGCGGAACTGACTATTCCTTGACTATTTT AAACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTT GTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTACACTTTCGGAG GAGGAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGT GGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCAC TAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCCG GTCTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGT GCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGCG TCTCCTGGATAAAGGCAGCCCCGCGAAAGGGTCTT GAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAAC GTATTATAACTCCGCTCTCAAAGTCGCTTGACGAT AATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTA AAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATA TATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGT TACGCGATGGATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGT CACAGTCAGTAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATT TCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCG GCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAAC CTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCG CCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTC GCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGT ACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACCTCGTTATTACTT TGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGT AGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCT CGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACC CTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTC CCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGG CATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAA CTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCT TGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGG</p> |
|--|--|

GGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACT
CTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGG
CCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGA
CGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTT
GAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGC
ATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAAT
CGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTT
GTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCA
AACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACAC
CTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGC
CTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAG
GTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAAC
TCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCA
CCAAAACCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTT
GTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAG
CAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTG
GCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTTCCTGCCTG
CCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCT
TCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCC
TCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTCC
CAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATT
ACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATG
CACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAG
ATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGT
TGGGGGAGCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAA
ATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTT
GAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGA
AGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCA
GCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGG
CCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGTAACCACG
TGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGA
ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG
CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA
GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

* обозначает нуклеотид с 2'-О-метилфосфоротиоатной модификацией.

"n" относится к спейсерной последовательности на 5'-конце.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Все признаки, раскрытые в настоящем описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в настоящем описании, может быть заменен альтернативным признаком для той же, эквивалентной или сходной цели. Таким образом, если явно не указано иное, каждый раскрытый признак является только примером общего ряда эквивалентных или сходных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области техники может легко установить существенные характеристики настоящего изобретения и, не выходя за рамки его сущности и объема, может внести различные изменения и модификации настоящего изобретения для адаптации его к различным путям применения и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя в данном документе были описаны и проиллюстрированы несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, специалисты в данной области техники легко смогут представить множество других средств и/или структур для выполнения функции, и/или получения результатов, и/или одно или нескольких преимуществ, описанных в данном документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. В более общем плане специалисты в данной области техники легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или путей применения, при которых используются идеи настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить с применением не более чем стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в пределах прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления настоящего изобретения могут быть реализованы на практике иным образом, чем как конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления настоящего изобретения по настоящему раскрытию направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанные в данном документе. Кроме того, в объем настоящего изобретения по настоящему раскрытию включена любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми.

Все определения, как определено и используется в данном документе, следует понимать как имеющие приоритет над определениями из словаря, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычными значениями определенных терминов.

Все ссылочные материалы, патенты и заявки на патенты, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении заявляемого объекта, для которого каждые из них цитируются, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Формы единственного числа, используемые в данном документе в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как "по меньшей мере один".

Фразу "и/или", используемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую "один или оба" из элементов, соединенных таким образом, т. е. элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других случаях присутствуют раздельно. Множественные элементы, перечисленные с помощью "и/или", следует толковать одинаково, т. е. "один или несколько" элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных союзом "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с открытой фразой, такой как "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления одновременно к А и В (необязательно включая другие элементы), и т. п.

Используемый в данном документе в описании и формуле изобретения союз "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении пунктов в перечне союзы "или" или "и/или" следует интерпретировать как включающие, т. е. включающие по меньшей мере один, но также включающие более одного из числа или перечня элементов и необязательно дополнительные элементы, не внесенные в перечень. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как "только один из" или "ровно один из" или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из", будут относиться к включению ровно одного элемента из числа или перечня элементов. Как правило, термин "или", используемый в данном документе, следует интерпретировать только как указывающий на исключающие альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), если ему предшествуют термины исключительности, такие как "любой", "один из", "только один из" или "ровно один из". Термин "состоящий по сути из" при использовании в формуле изобретения имеет обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемую в данном документе в описании и в формуле изобретения фразу "по

меньшей мере один" применительно к перечню из одного или нескольких элементов следует понимать как означающую по меньшей мере один элемент, выбранный из любых одного или нескольких элементов в перечне элементов, но необязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в перечне элементов, и не исключая любые комбинации элементов в перечне элементов. Данное определение также допускает, что элементы могут необязательно присутствовать помимо элементов, конкретно обозначенных в перечне элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В" или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном варианте осуществления к по меньшей мере одному А, необязательно включая более одного, без присутствия В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления к по меньшей мере одному В, необязательно включая более одного, без присутствия А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления к по меньшей мере одному А, необязательно включая более одного, и к по меньшей мере одному В, необязательно включая более одного (и необязательно включая другие элементы), и т. п.

Также следует учитывать, что, если явно не указано иное, в любых заявляемых в данном документе способах, которые предусматривают более чем одну(одно) стадию или действие, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа упоминаются.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения В-клеточного злокачественного новообразования у пациента-человека, при этом способ включает:

(i) подвергание пациента-человека, имеющего В-клеточное злокачественное новообразование, лимфодеплеционному лечению, и

(ii) введение пациенту-человеку популяции генетически сконструированных Т-клеток после стадии (i), где популяция генетически сконструированных Т-клеток содержит Т-клетки, которые содержат:

(a) нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*),

(b) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD19, где CAR содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент к CD19 (scFv), который содержит вариабельную область тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 51, и вариабельную область легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 52, и где нуклеиновая кислота вставлена в нарушенный ген *TRAC*, и

(c) нарушенный ген бета-2-микроглобулина (*β2M*);

где популяцию генетически сконструированных Т-клеток вводят пациенту-человеку в дозе, составляющей от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ Т-клеток.

2. Способ по п. 1, где нарушенный ген *TRAC* характеризуется делецией фрагмента, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где популяция генетически сконструированных Т-клеток, вводимых пациенту-человеку на дозу, содержит не более чем 7×10^4 TCR⁺ Т-клеток/кг.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где лимфодеплеционное лечение на стадии (i) включает совместное введение пациенту-человеку флударабина при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфамида при приблизительно 500-750 мг/м² в день в течение трех дней.

5. Способ по п. 4, где лимфодеплеционное лечение на стадии (i) включает совместное введение пациенту-человеку флударабина при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфамида при приблизительно 500 мг/м² в день в течение трех дней или флударабина при приблизительно 30 мг/м² и циклофосфамида при приблизительно 750 мг/м² в день в течение трех дней.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где популяцию генетически сконструированных Т-клеток вводят пациенту-человеку в дозе, составляющей приблизительно 1×10^7 , приблизительно 3×10^7 , приблизительно 1×10^8 , приблизительно 3×10^8 или приблизительно 1×10^9 CAR⁺ Т-клеток.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где до стадии (i) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков:

(a) значительное ухудшение клинического статуса,

(b) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 91%,

(c) неконтролируемая сердечная аритмия,

(d) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами,

(e) активная инфекция и

(f) острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где стадию (i) выполняют за приблизительно 2-7 дней до стадии (ii).

9. Способ по любому из пп. 1-8, где после стадии (i) и до стадии (ii) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков:

(a) активная неконтролируемая инфекция;

(b) ухудшение клинического статуса по сравнению с клиническим статусом до стадии (i), и

(c) острая неврологическая токсичность ≥ 2 степени.

10. Способ по любому из пп. 1-9, дополнительно включающий (iii) мониторинг пациента-человека в отношении развития острой токсичности после стадии (ii) и (iv) контроль острой токсичности в случае ее возникновения.

11. Способ по п. 10, где стадию (iii) выполняют в течение по меньшей мере 28 дней после введения популяции генетически сконструированных Т-клеток.

12. Способ по п. 10 или п. 11, где острая токсичность включает синдром лизиса опухоли (TLS), синдром высвобождения цитокинов (CRS), синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (ICANS), аплазию В-клеток, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), цитопению, реакцию "трансплантат против хозяина" (GvHD), гипертонию, почечную недостаточность или их комбинацию.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где В-клеточное злокачественное новообразование представляет собой неходжкинскую лимфому, которая необязательно выбрана из группы, состоящей из диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перегруппировкой *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*, трансформированную фолликулярную лимфому (FL) и FL степени 3b.

14. Способ по п. 13, где DLBCL представляет собой неуточненную DLBCL (NOS).

15. Способ по любому из пп. 1-14, где пациент-человек имеет по меньшей мере один поддающийся измерению патологический очаг, который является положительным по результатам позитронно-эмиссионной томографии (PET) с применением фтордезоксиглюкозы.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где В-клеточное злокачественное новообразование является рефрактерным и/или рецидивирующим.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где пациент-человек прошел одну или несколько линий предшествующей противораковой терапии.

18. Способ по п. 17, где пациент-человек прошел две или более линий предшествующей противораковой терапии.

19. Способ по п. 17 или п. 18, где виды предшествующей противораковой терапии предусматривают антитело к CD20, схему, предусматривающую антрациклин, или их комбинацию.

20. Способ по п. 17, где пациент-человек страдает рефрактерной или рецидивирующей трансформированной FL и прошел по меньшей мере одну линию химиотерапии для лечения заболевания после трансформации в DLBCL.

21. Способ по любому из пп. 16-19, где В-клеточное злокачественное новообразование является рефрактерным, и пациент-человек страдает прогрессирующим заболеванием в ходе последней терапии или страдает стабильным заболеванием после по меньшей мере двух циклов терапии с продолжительностью стабильного заболевания, составляющей до 6 месяцев.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где предшествующая аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) у пациента-человека была неэффективной или он не соответствовал требованиям предшествующей аутологичной HSCT.

23. Способ по любому из пп. 1-21, где пациент-человек является субъектом для дополнительной противораковой терапии после лечения с применением популяции генетически сконструированных Т-клеток.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где пациент-человек характеризуется одним или несколькими из следующих признаков:

(m) характеризуется функциональным статусом 0 или 1 согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG);

(n) приемлемая функция почек, печени, сердца и/или легких;

(o) не проходил предшествующей генной терапии или терапии с применением модифицированных клеток;

(p) не проходил предшествующего лечения, предусматривающего антитело к CD19;

(q) не проходил предшествующей аллогенной HSCT;

(r) не имеет выявляемых злокачественных клеток в спинномозговой жидкости;

(s) не имеет метастазов в головной мозг;

(t) не страдает предшествующими нарушениями центральной нервной системы;

(u) не страдает нестабильной стенокардией, аритмией и/или инфарктом миокарда;

(v) не характеризуется неконтролируемой инфекцией;

(w) не страдает иммунодефицитными нарушениями или аутоиммунными нарушениями, требующими иммуносупрессивной терапии, и

(x) не характеризуется инфекцией вирусом иммунодефицита человека, вирусом гепатита В или вирусом гепатита С.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47.

26. Способ по п. 25, где CAR, который связывает CD19, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к CD19, вставлена в сайт делеции в нарушенном гене *TRAC*.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где нарушенный ген *TRAC* содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 54.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где нарушенный ген $\beta 2M$ в популяции генетически сконструированных Т-клеток содержит по меньшей мере одну из нуклеотидных последовательностей, изложенных под SEQ ID NO: 9-14.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где популяция генетически сконструированных Т-клеток является аллогенной.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где по меньшей мере 90% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на выявляемом уровне.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где по меньшей мере 70% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на выявляемом уровне, где по меньшей мере 50% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок В2М на выявляемом уровне, и/или где по меньшей мере 30% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на выявляемом уровне.

33. Способ по п. 32, где по меньшей мере 99,5% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок TCR на выявляемом уровне.

34. Способ по любому из пп. 1-33, где по меньшей мере 70% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок В2М на выявляемом уровне.

35. Способ по п. 34, где по меньшей мере 85% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток не экспрессируют поверхностный белок В2М на выявляемом уровне.

36. Способ по любому из пп. 1-35, где по меньшей мере 50% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на выявляемом уровне.

37. Способ по п. 36, где по меньшей мере 70% Т-клеток в популяции генетически сконструированных Т-клеток экспрессируют CAR на выявляемом уровне.

38. Способ по любому из пп. 1-37, где популяцию генетически сконструированных Т-клеток вводят пациенту-человеку посредством внутривенной инфузии.

39. Способ по любому из пп. 1-38, где популяция генетически сконструированных Т-клеток суспендирована в растворе для криоконсервации.

40. Фармацевтическая композиция для применения в лечении В-клеточного злокачественного новообразования, при этом фармацевтическая композиция содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые содержат:

(a) нарушенный ген константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (*TRAC*), который необязательно характеризуется делецией фрагмента, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26,

(b) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD19, где CAR содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент к CD19 (scFv), который содержит вариабельную область тяжелой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 51, и вариабельную область легкой цепи, изложенную под SEQ ID NO: 52, и где нуклеиновая кислота вставлена в нарушенный ген *TRAC*, и

(c) нарушенный ген бета-2-микроглобулина (*$\beta 2M$*);

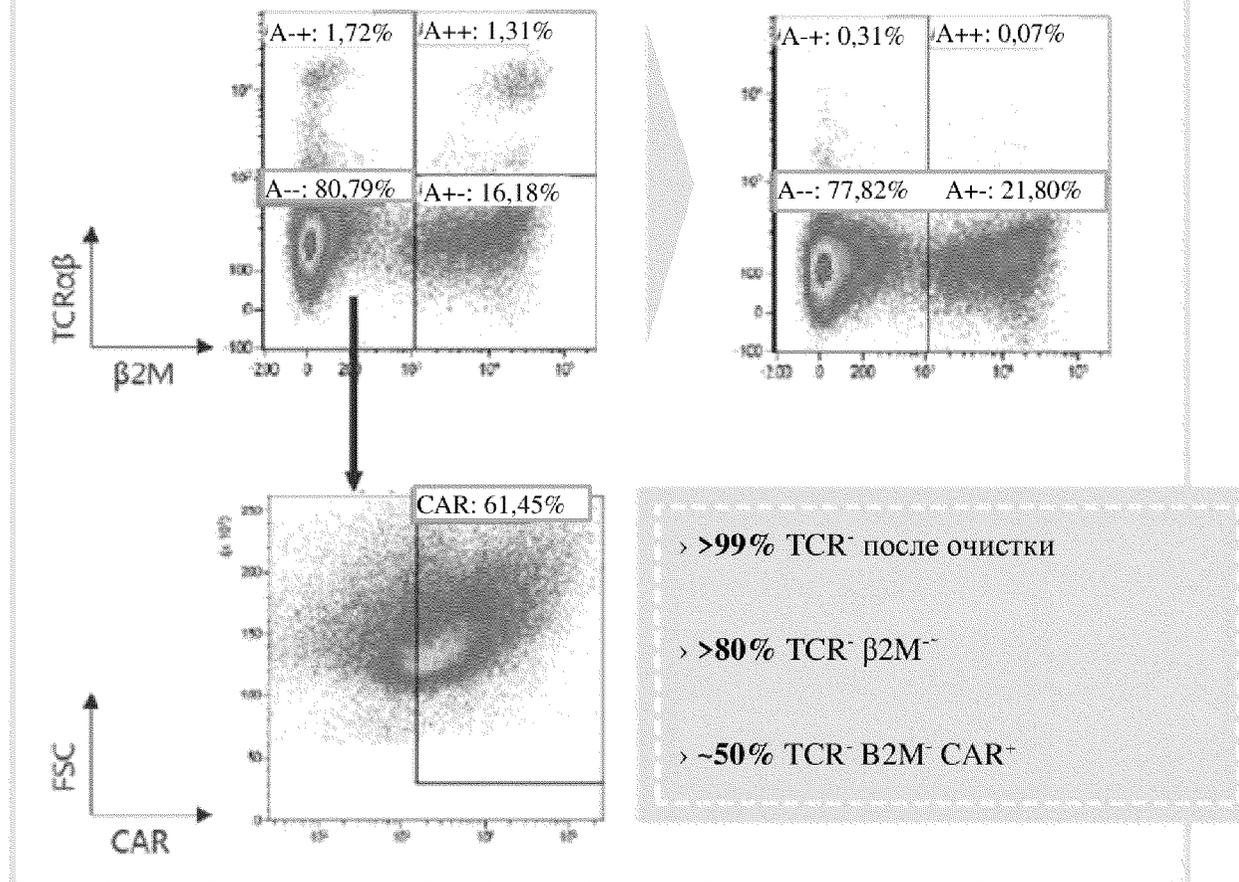
где композиция содержит от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ Т-клеток.

41. Фармацевтическая композиция для применения по п. 40, где популяция генетически сконструированных Т-клеток указана в любом из пп. 1, 2, 25-37 и п. 39.

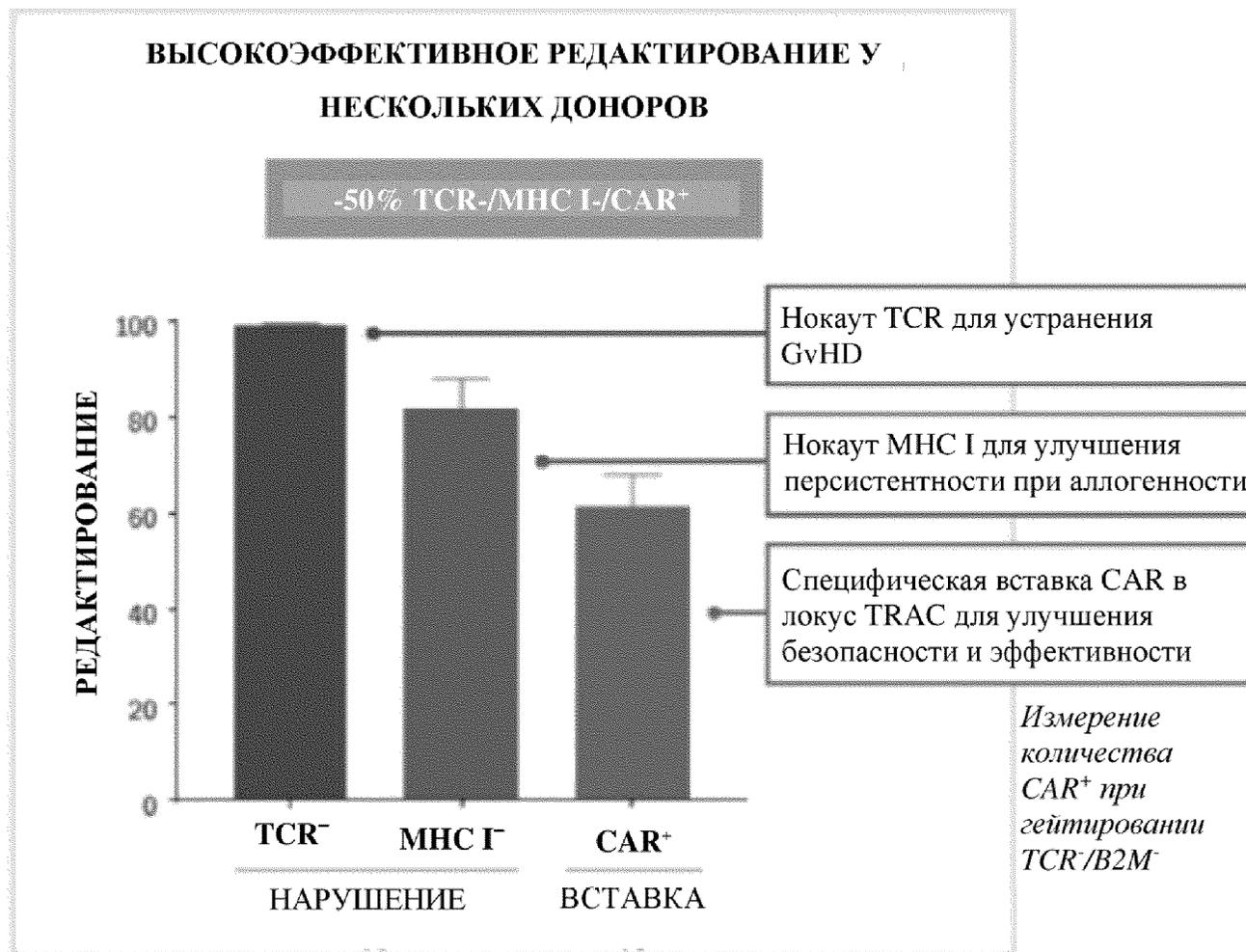
42. Фармацевтическая композиция для применения по п. 40 или п. 41, где фармацевтическая композиция предназначена для применения в способе по любому из пп. 1-24 и п. 38.

По доверенности

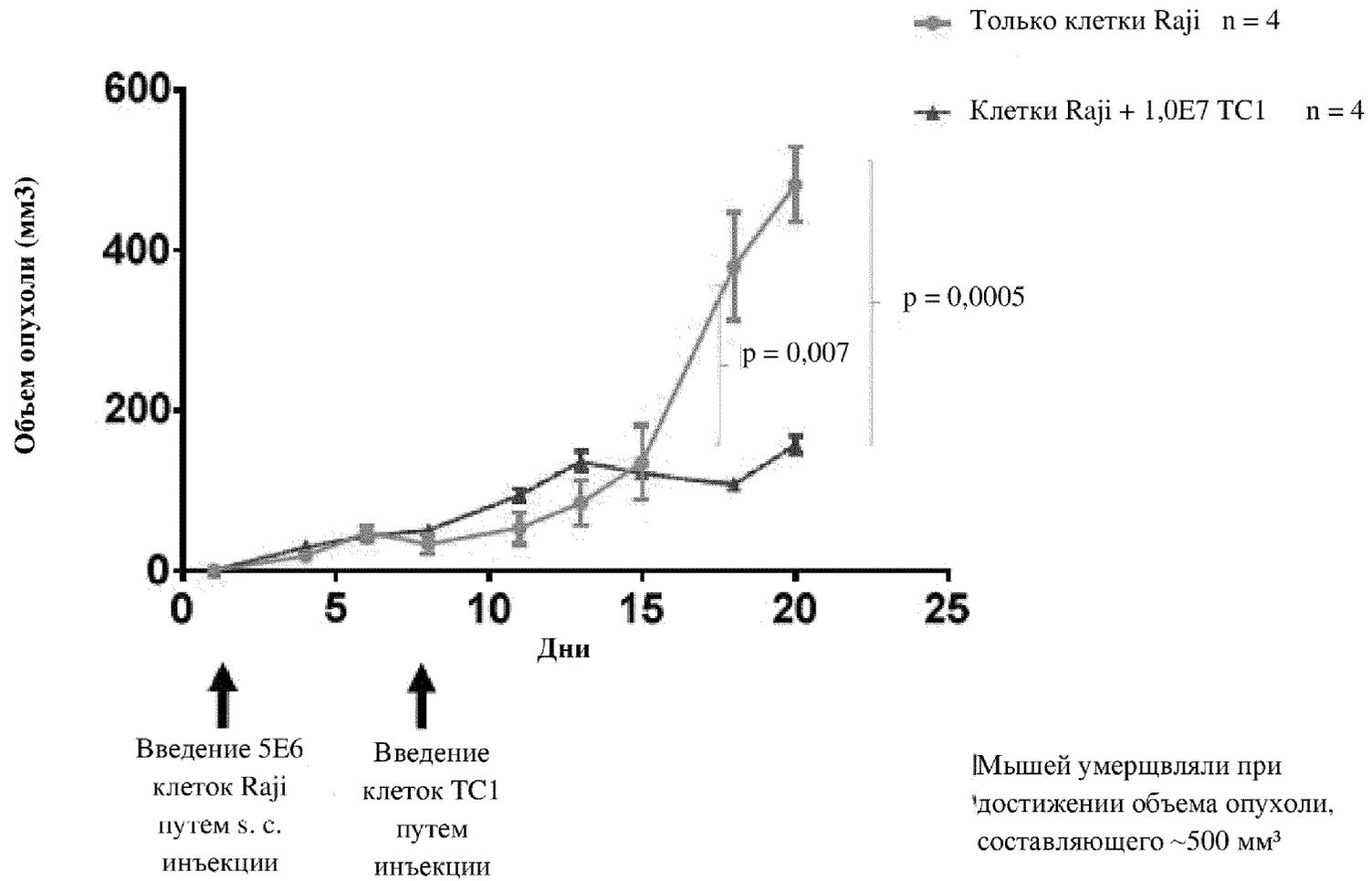
Проточная цитометрия с применением первичных T-клеток



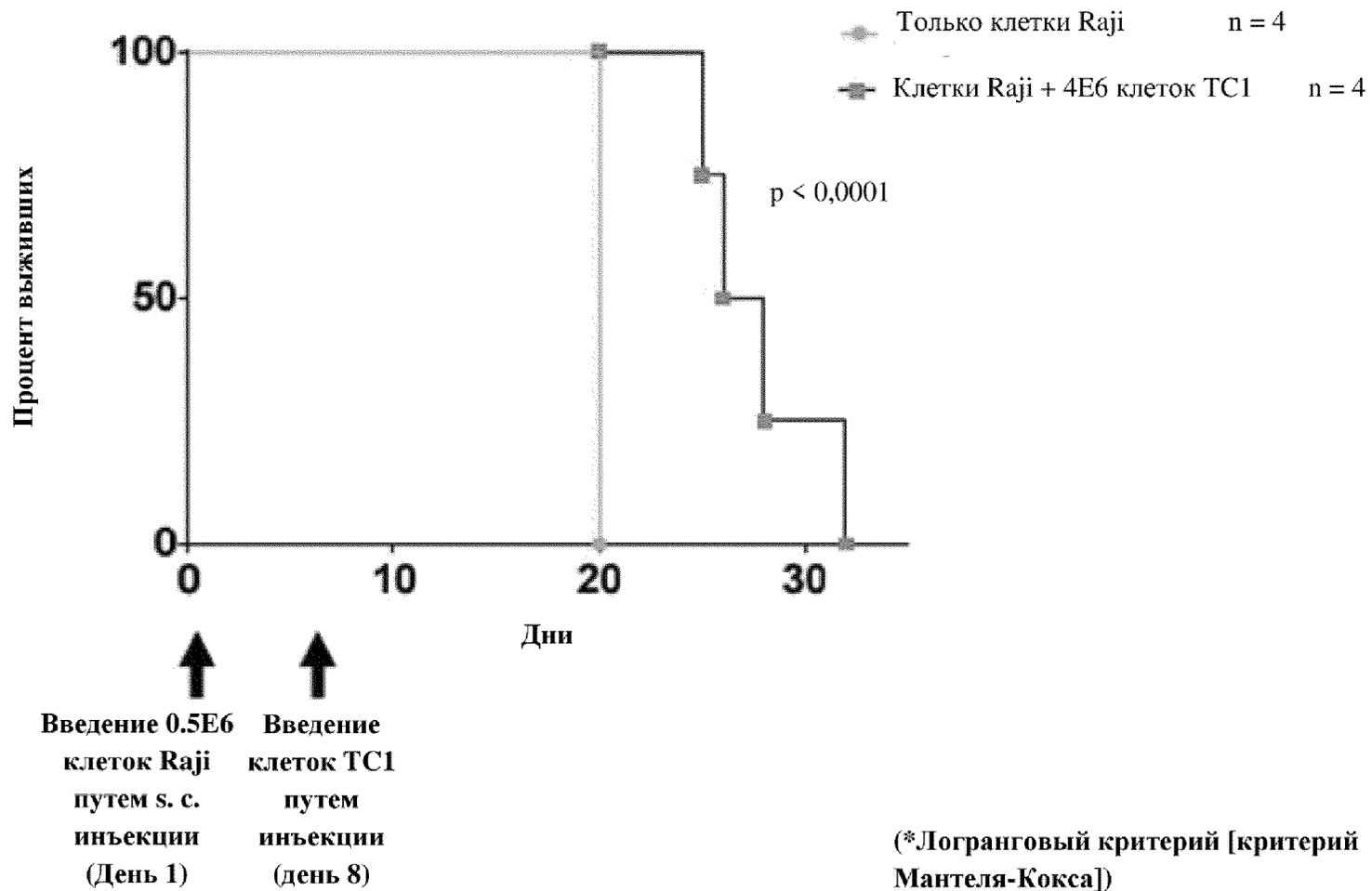
ФИГ. 1



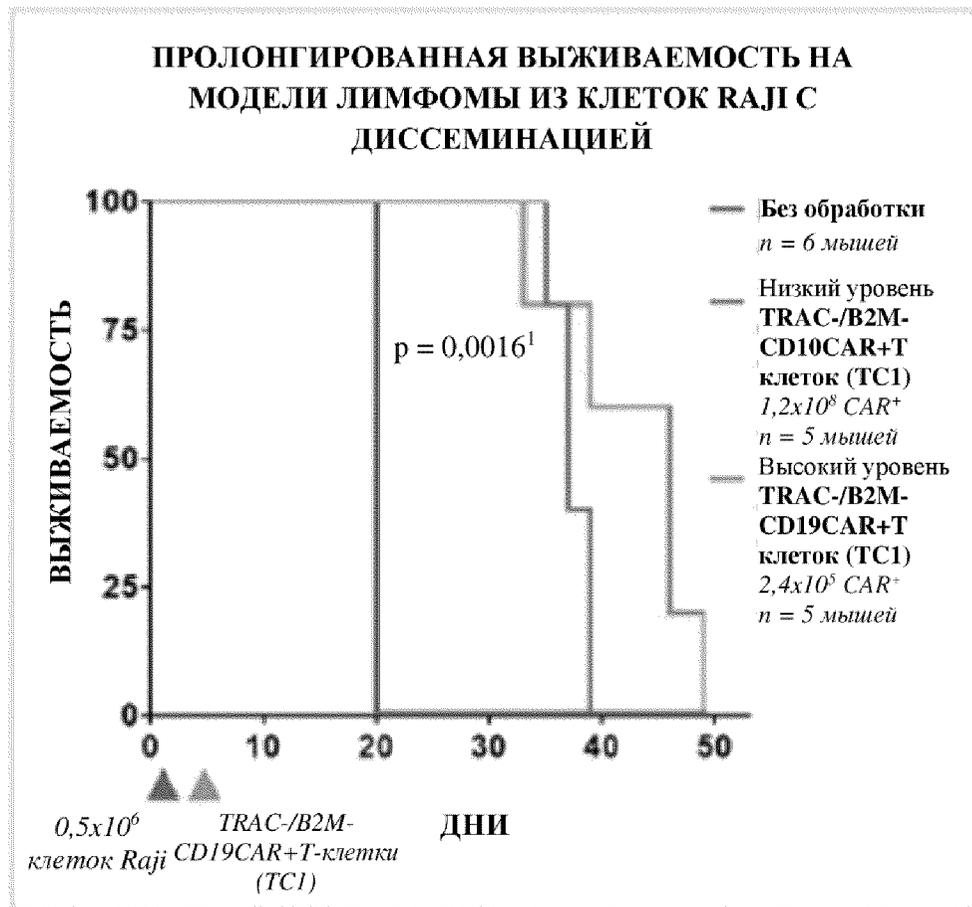
ФИГ. 2



ФИГ. 3

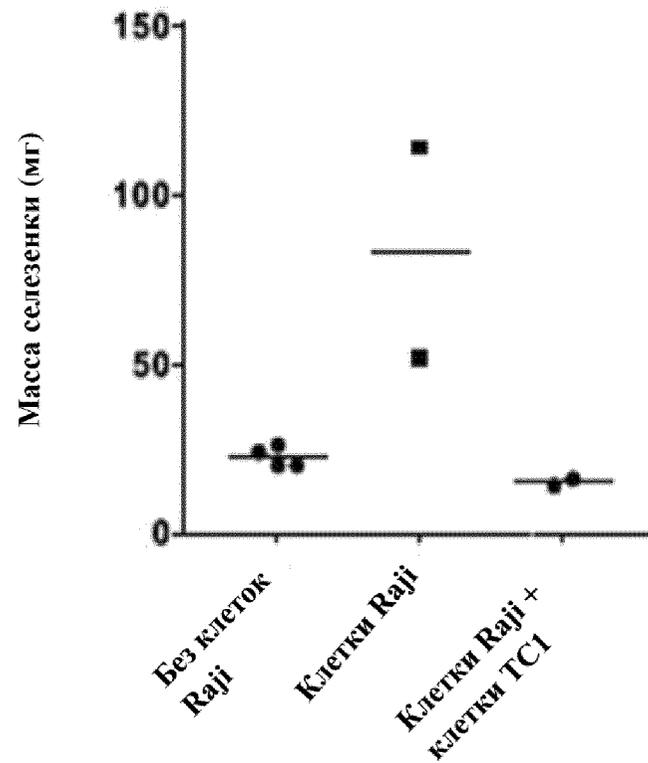
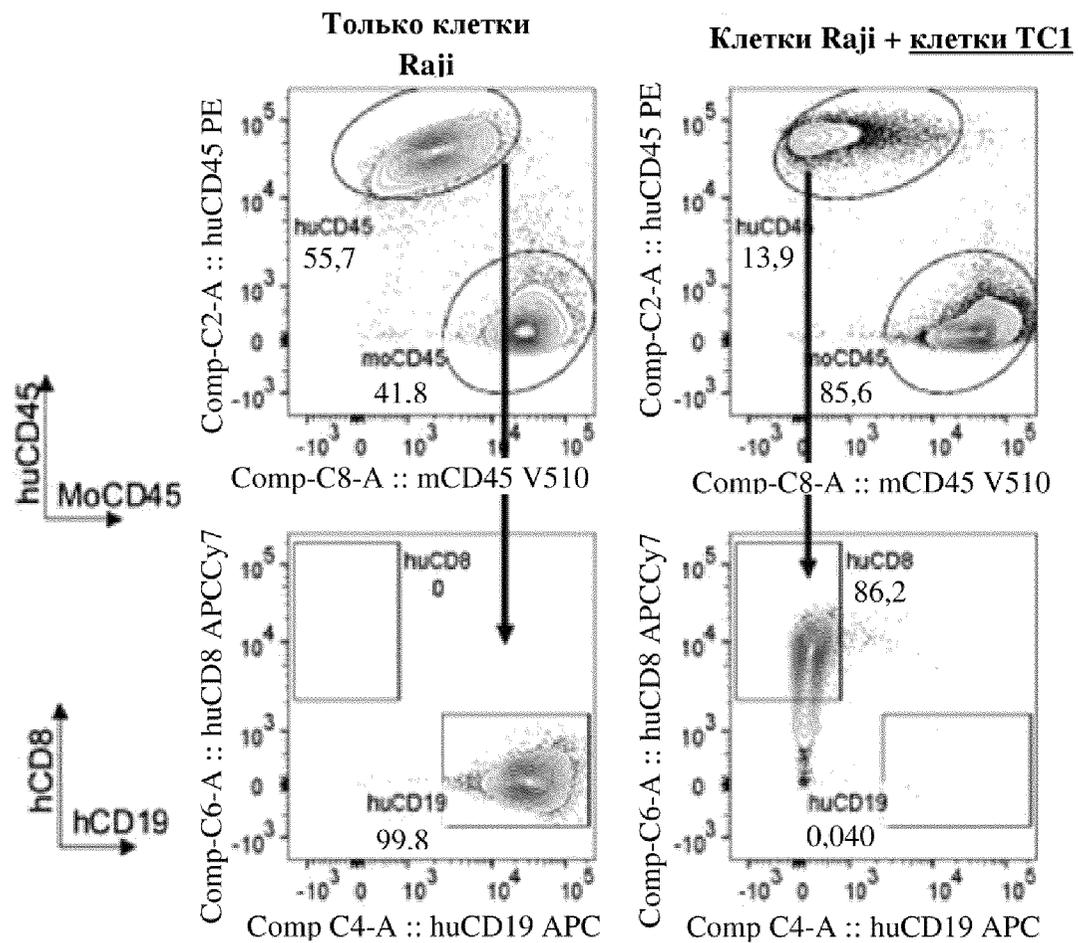


ФИГ. 4



(1) Логранговый критерий
(Критерий Мантеля-Кокса)

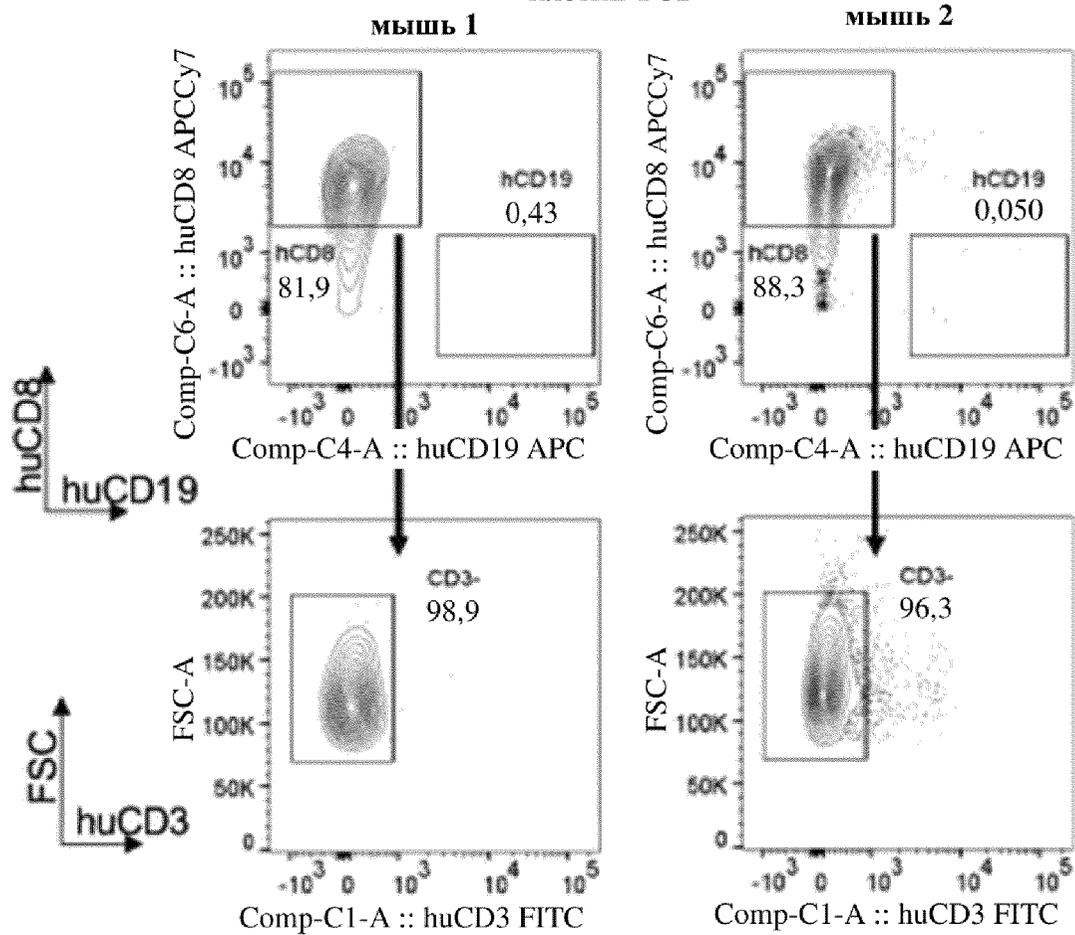
ФИГ. 5



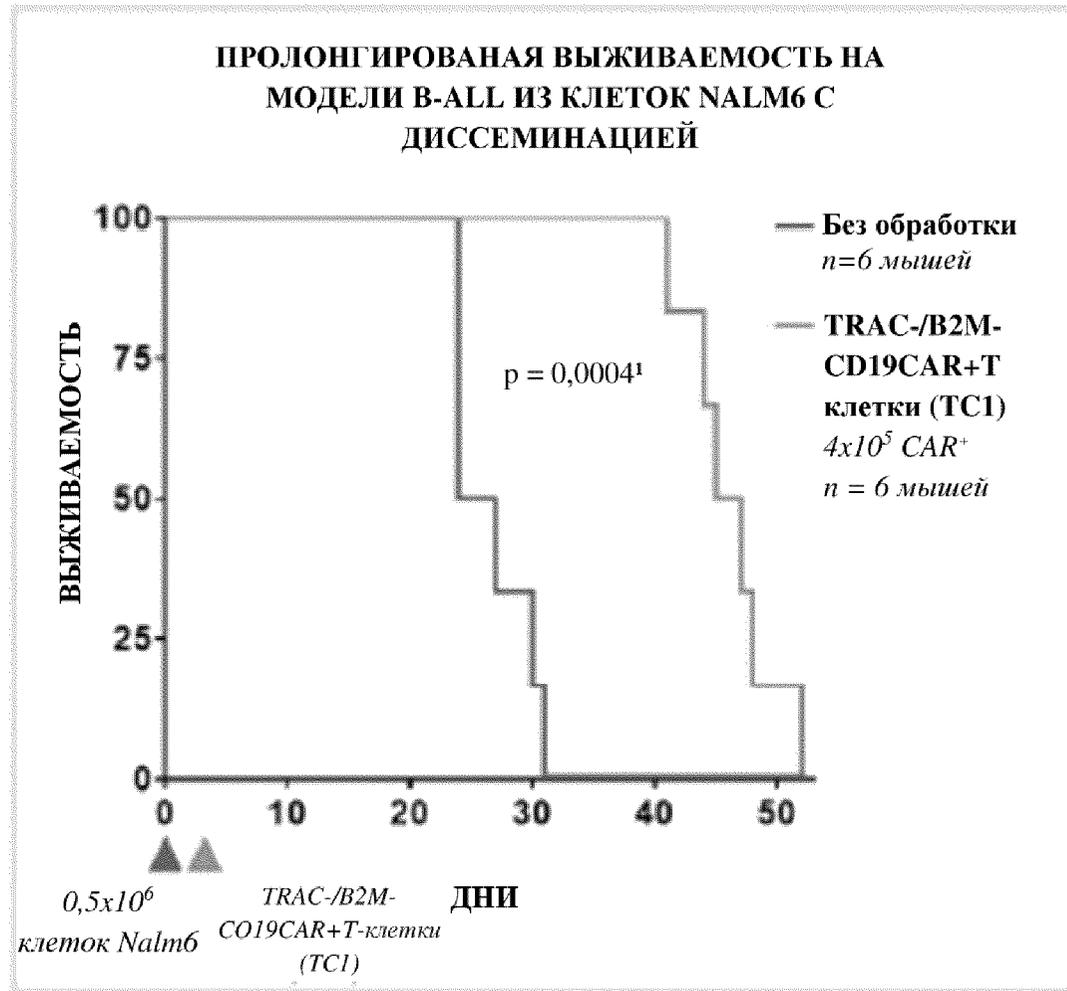
ФИГ. 6А

ФИГ. 6В

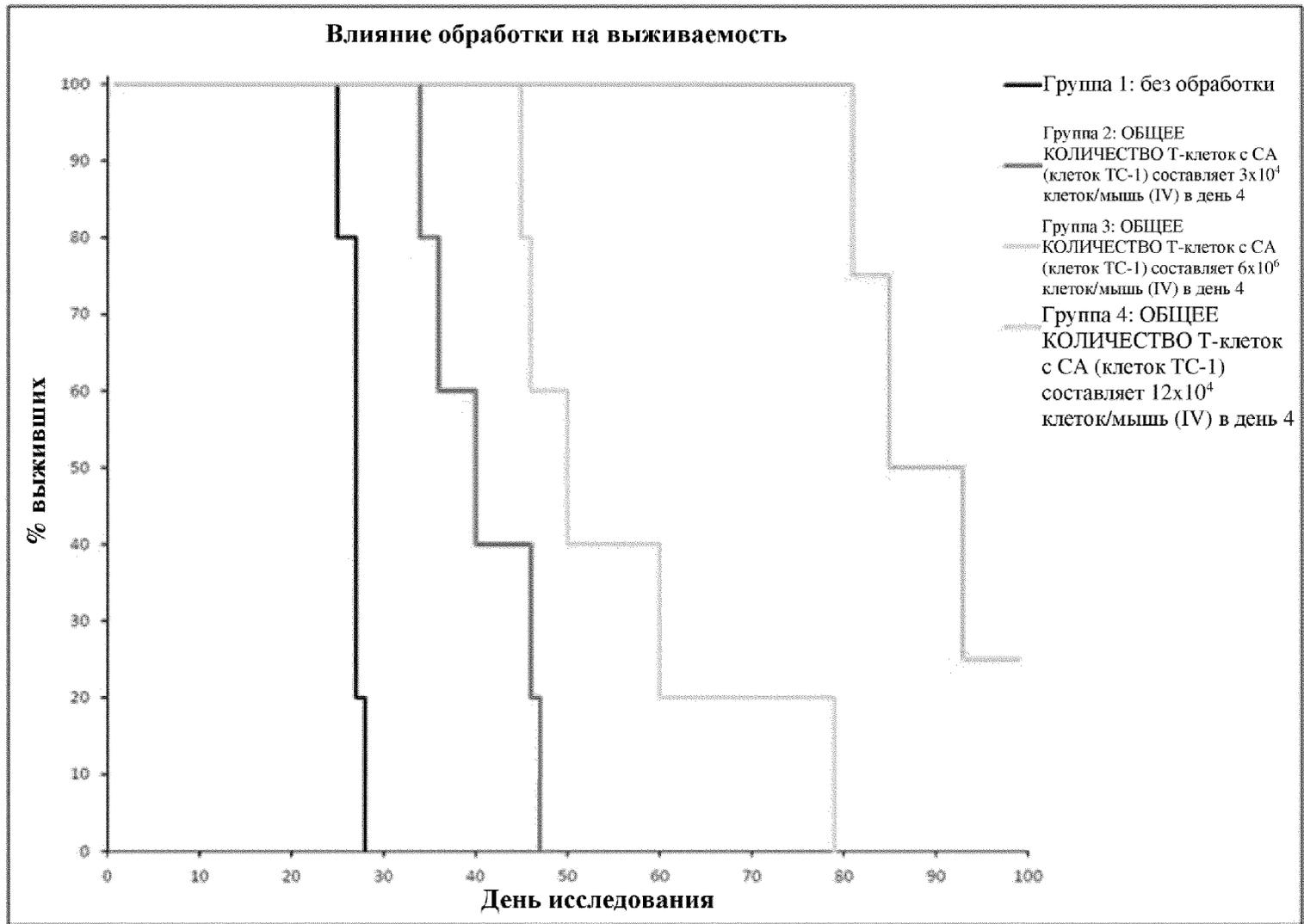
Клетки Raji +
клетки TC1



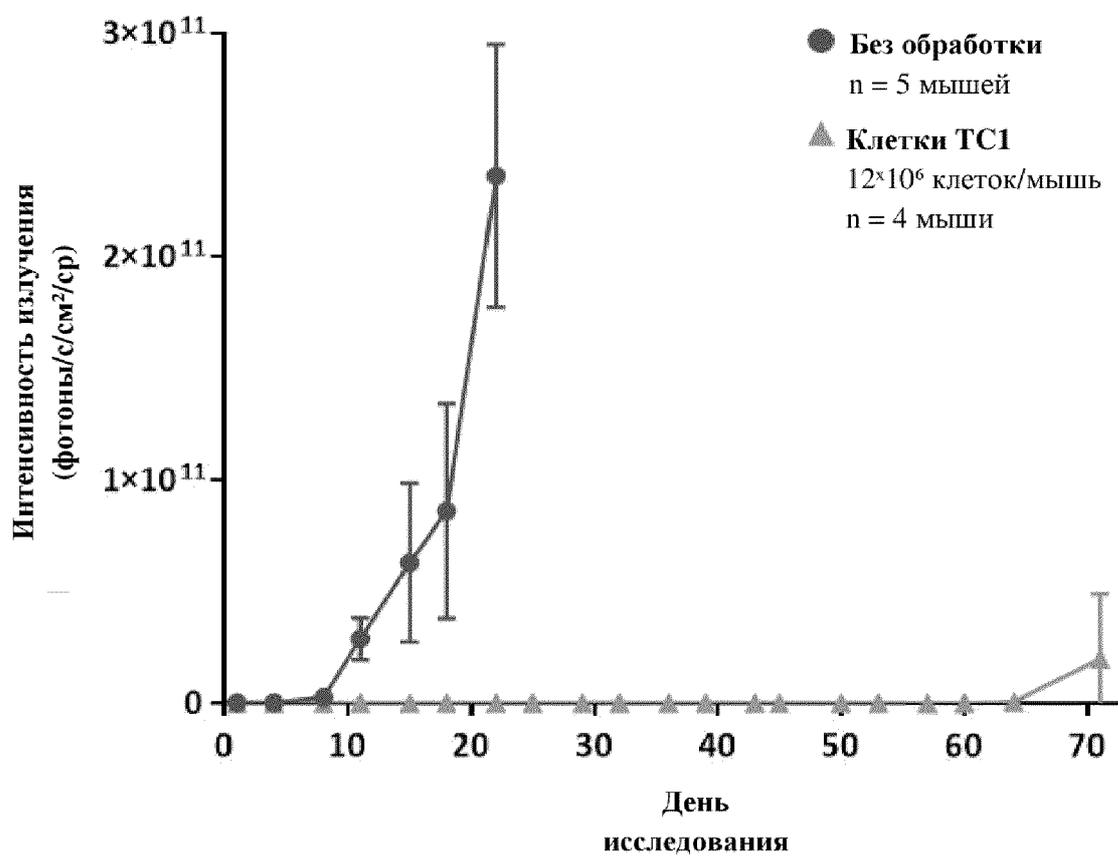
ФИГ. 7



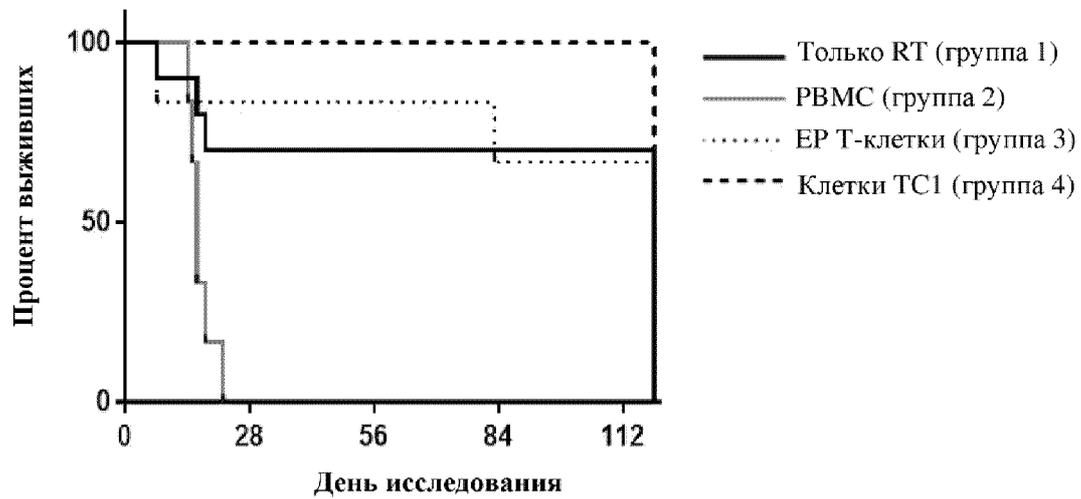
ФИГ. 8



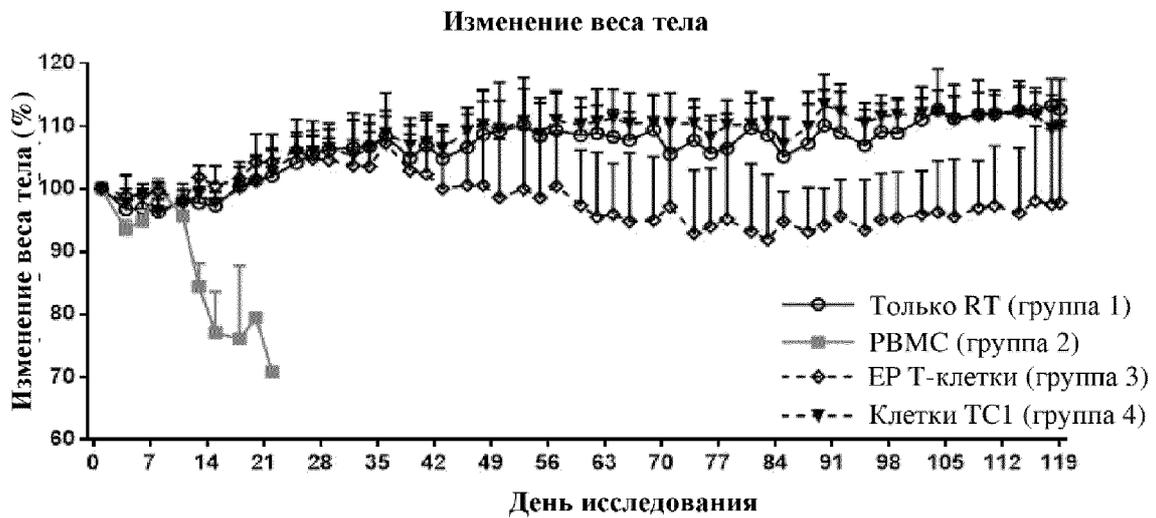
ФИГ. 9



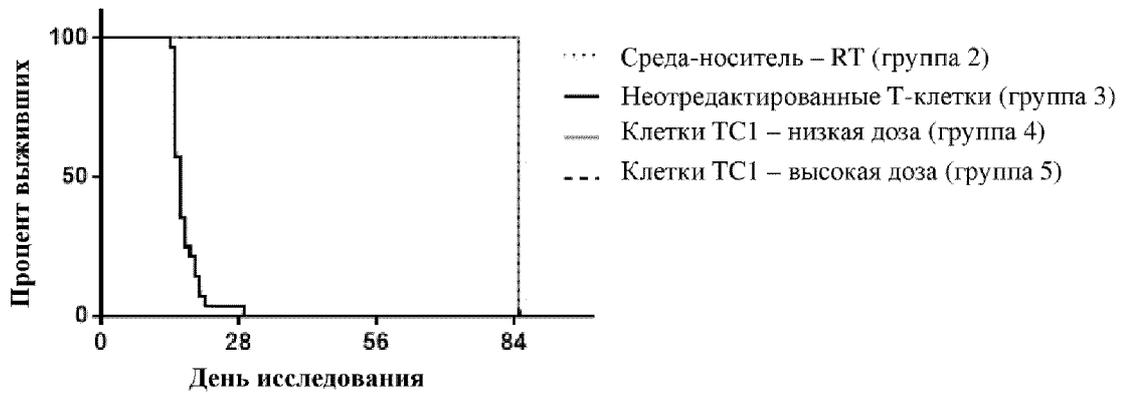
ФИГ. 10



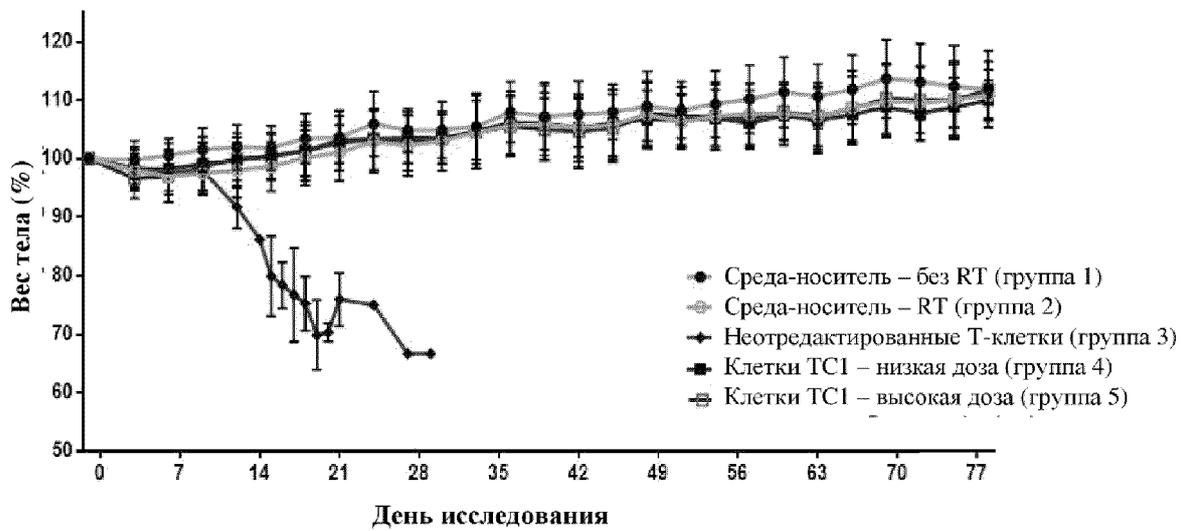
ФИГ. 11



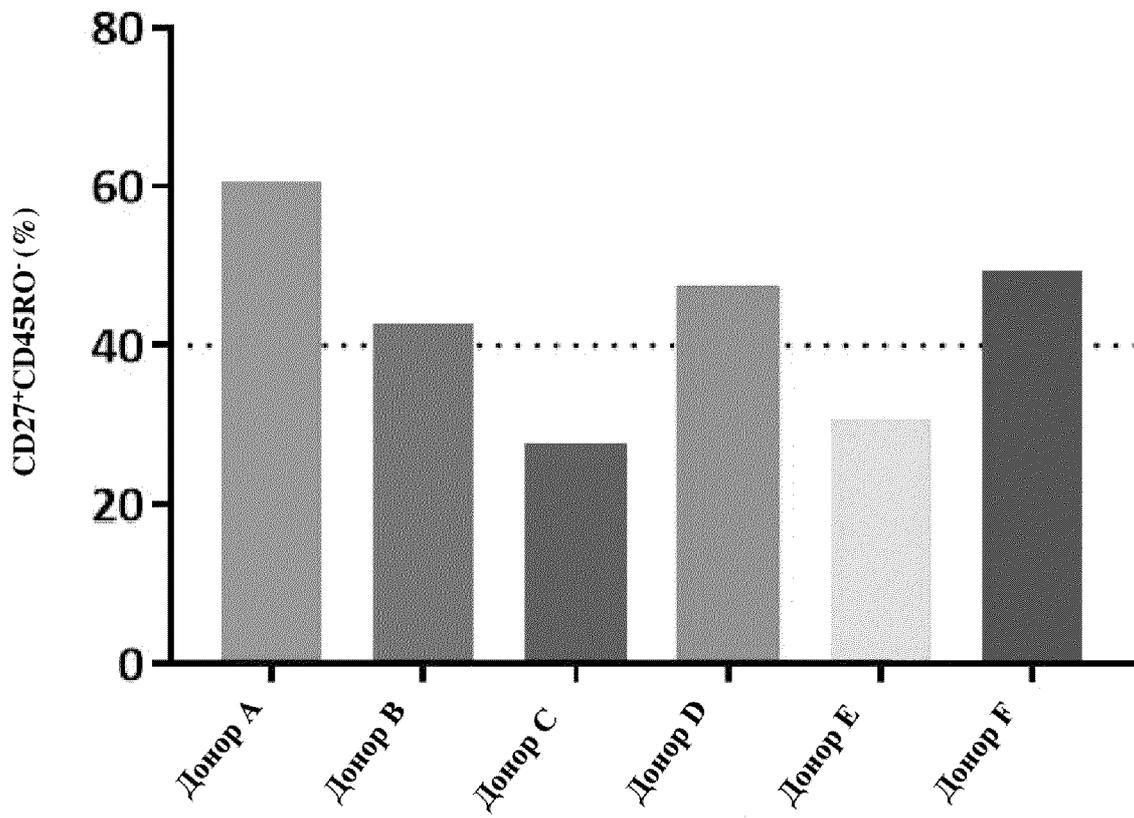
ФИГ. 12



ФИГ. 13



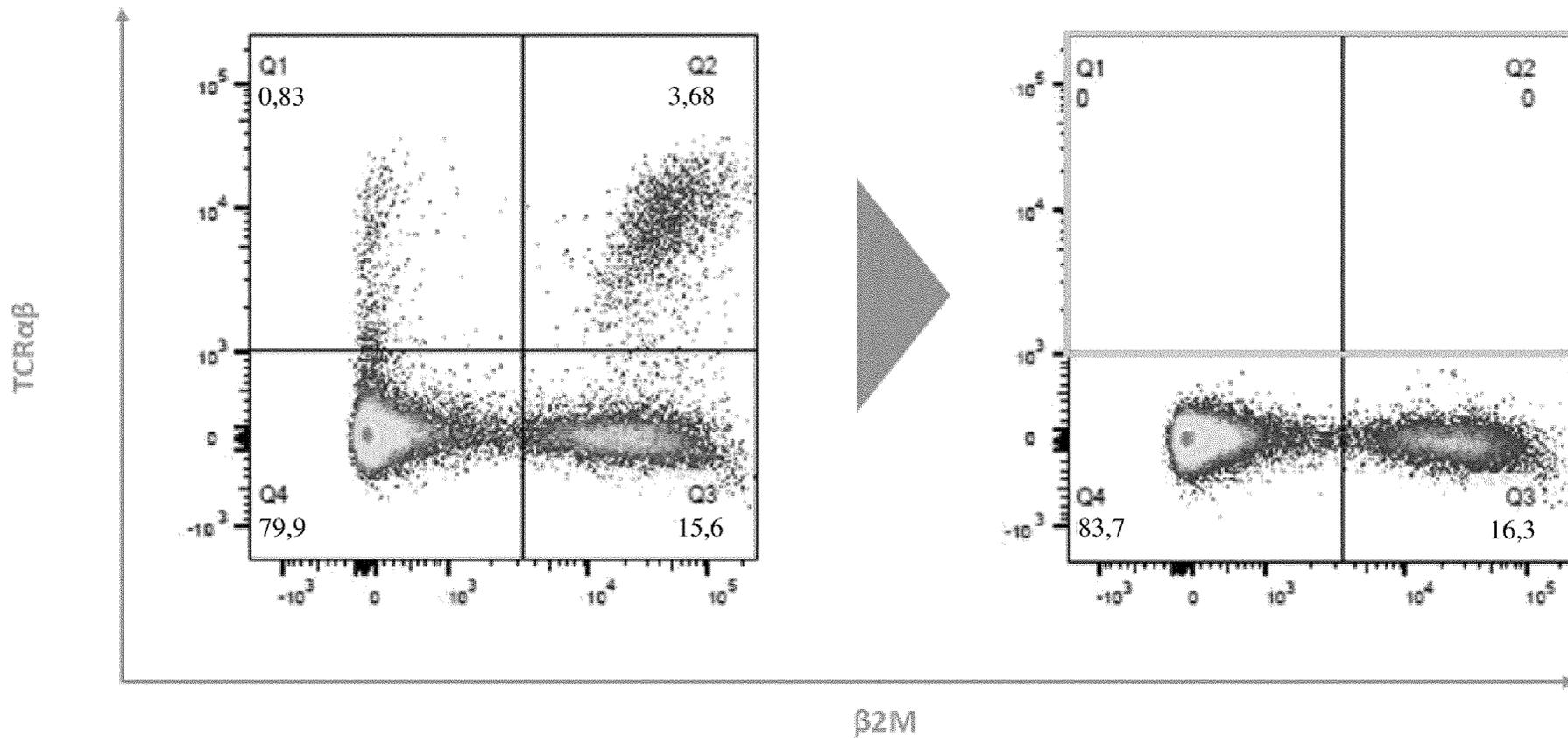
ФИГ. 14



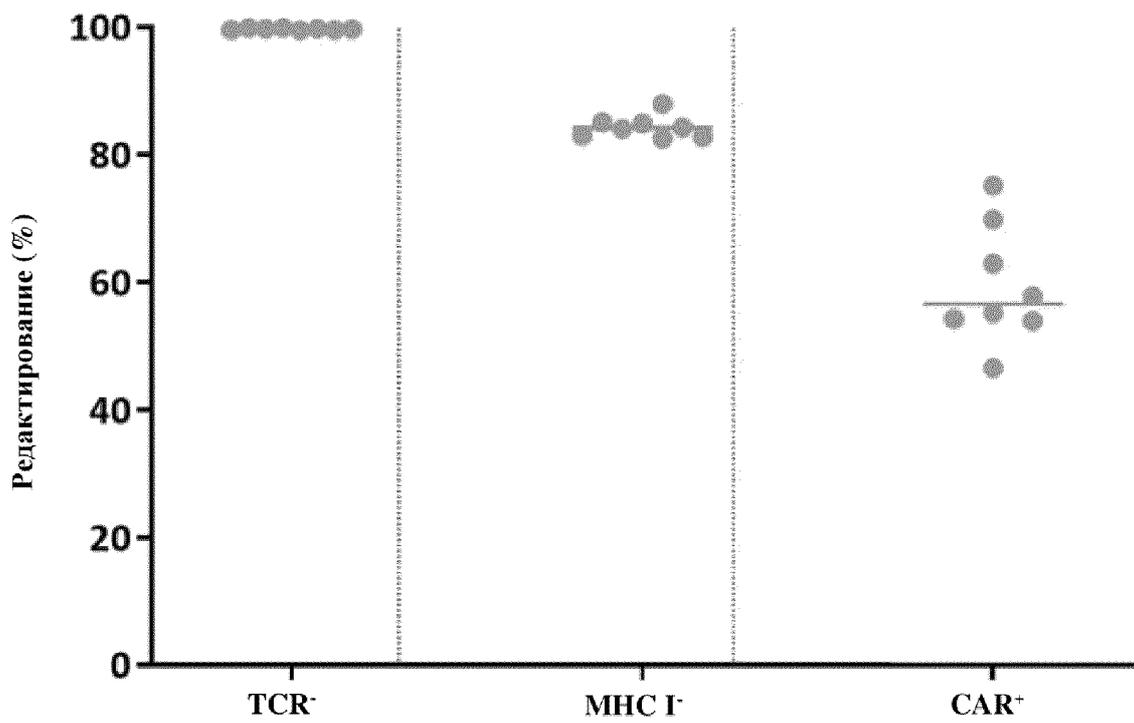
ФИГ. 15

Исходный
процент TCR⁺
составляет
95,5%

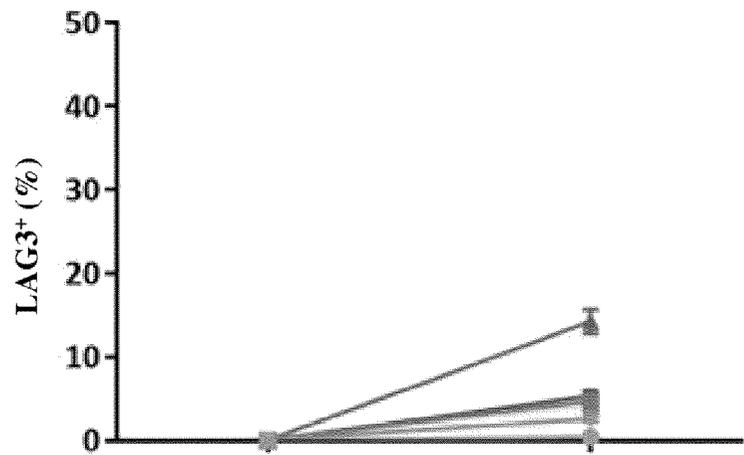
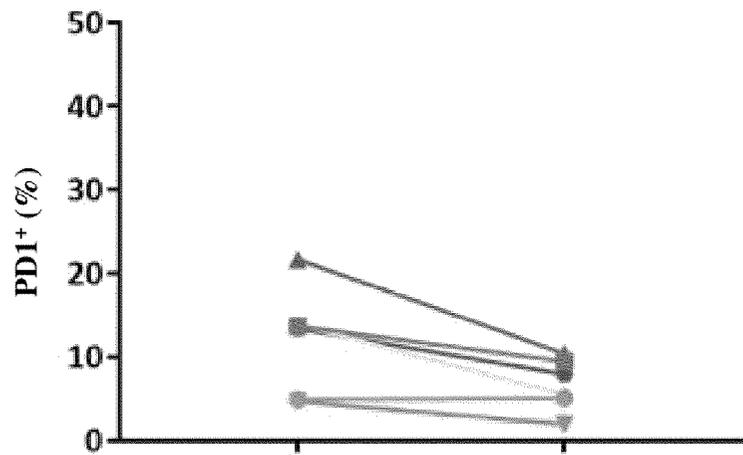
> 99,5% TCR⁺
после деплеции



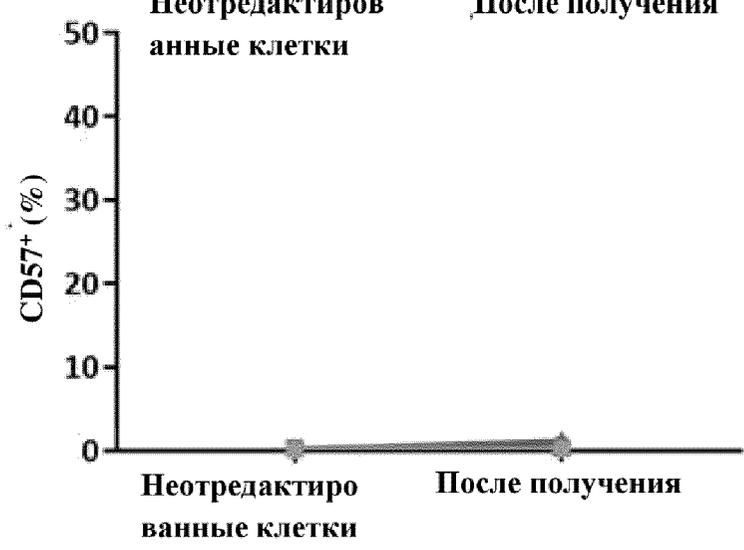
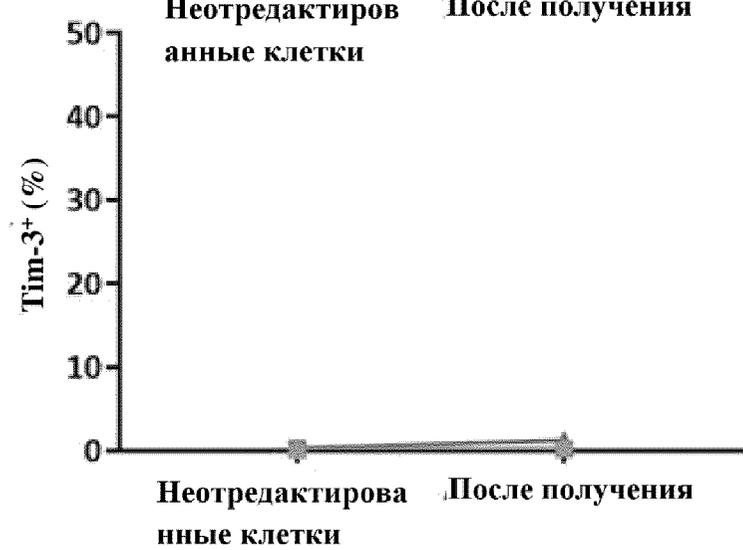
ФИГ. 16



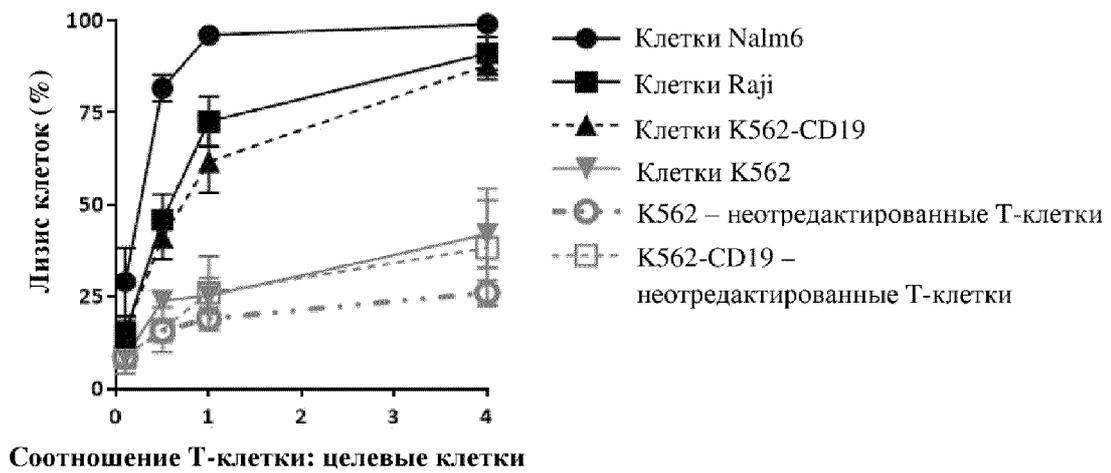
ФИГ. 17



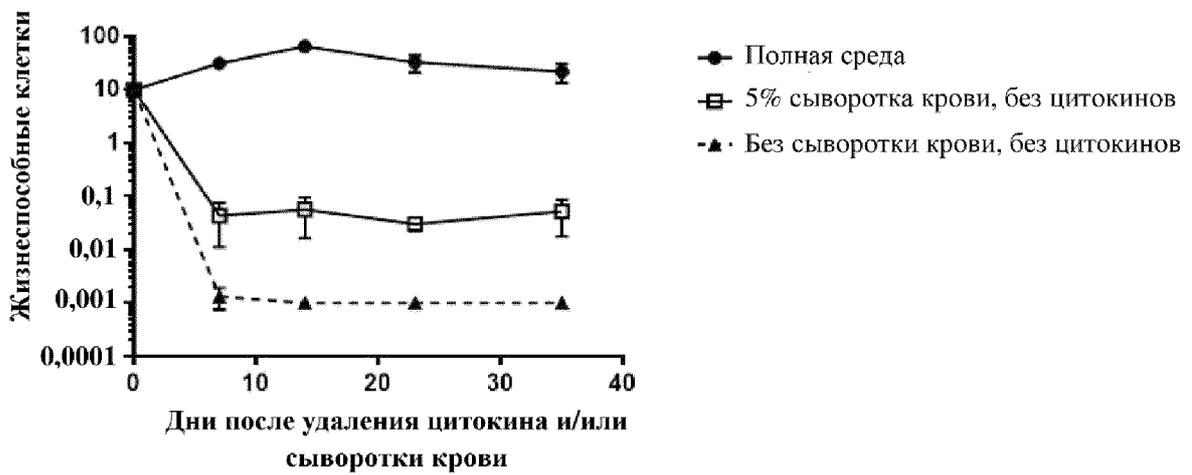
- ◆ Донор А
- Донор В
- ▲ Донор С
- ◆ Донор D
- ◆ Донор E
- ◆ Донор F



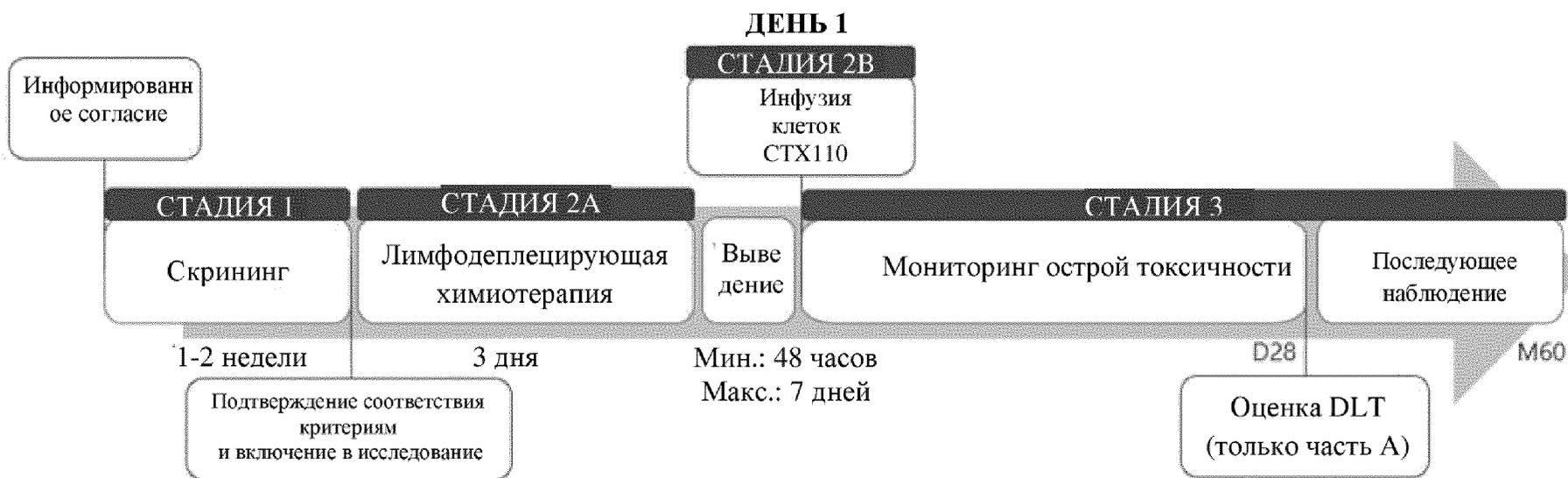
ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20



ФИГ. 21