

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291446 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.22

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.11.13

(54) ТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ИЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК, НАЦЕЛИВАЮЩИХСЯ НА CD70

(31) 62/934,945; 63/034,510

(32) 2019.11.13; 2020.06.04

(33) US

(86) PCT/IB2020/060718

(87) WO 2021/095009 2021.05.20

(71) Заявитель:

КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

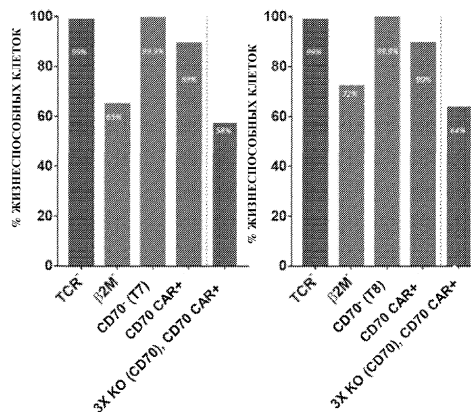
(72) Изобретатель:

Терретт Джонатан Александр, Декан
Мэри-Ли, Уилл Маттиас (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Аспекты изобретения относятся к композициям, содержащим популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD70, и к способам применения таковых для лечения Т-клеточных и В-клеточных злокачественных новообразований.



A1

202291446

202291446

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574189EA/026

ТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ИЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК, НАЦЕЛИВАЮЩИХСЯ НА CD70 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/934945, поданной 13 ноября 2019 г., и предварительной заявке на патент США № 63/034510, поданной 4 июня 2020 г. Каждая из предыдущих заявок включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В терапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) применяют генетически модифицированные Т-клетки для более специфичного и эффективного нацеливания и уничтожения раковых клеток. После сбора Т-клеток из крови их конструируют с возможностью размещения CAR на их поверхности. CAR можно вводить в Т-клетки с использованием технологии редактирования генов CRISPR/Cas9. При введении путем инъекции этих аллогенных Т-клеток с CAR пациенту рецепторы придают Т-клеткам способность уничтожать раковые клетки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что CAR+ к CD70 Т-клетки, такие как клетки CTX130, раскрытые в данном документе, обеспечивали долгосрочное устранение опухоли в модели подкожного ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы. Например, CAR+ к CD70 Т-клетки, описанные в данном документе (например, клетки CTX130), обеспечивали полное устранение опухоли в течение по меньшей мере 90 дней после введения. Значительное снижение опухолевой нагрузки также наблюдалось в дополнительной модели подкожного ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы. Кроме того, у людей, получавших Т-клетки с CAR, наблюдались распределение, размножение и персистенция клеток CTX130. Более высокая эффективность лечения также наблюдалась у пациентов-людей с лимфомой, которые получали лечение с применением клеток CTX130.

Соответственно, в некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ лечения злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток (например, злокачественного новообразования из Т-клеток или В-клеток или злокачественного новообразования из миелоидных клеток), при этом способ включает: (i) подвергание пациента-человека (например, взрослого пациента-человека), имеющего злокачественное новообразование из гемопоэтических клеток, первой процедуре лечения с применением лимфодеплеции, и (ii) введение пациенту-человеку первой дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток после стадии (i). Популяция генетически сконструированных Т-клеток содержит Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD70, нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген $\beta 2M$ и нарушенный ген

CD70, и где нуклеотидная последовательность, кодирующая *CAR*, встроена в нарушенный ген *TRAC*. В некоторых случаях популяция генетически сконструированных Т-клеток представляет собой клетки CTX130, раскрытые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления стадию (i) можно выполнять за приблизительно 2-7 дней до стадии (ii).

В некоторых вариантах осуществления первая процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (i) предусматривает совместное введение пациенту-человеку флударабина в количестве 30 мг/м² и циклофосфида в количестве 500 мг/м² в день внутривенно в течение трех дней. В качестве альтернативы или в дополнение стадия (ii) осуществляется посредством введения пациенту-человеку внутривенно популяции генетически сконструированных Т-клеток в первой дозе, которая может составлять от приблизительно 1×10^7 CAR+ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR+ клеток. В некоторых случаях первая доза может находиться в диапазоне от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 9×10^8 CAR+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления до стадии (i) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков: (a) изменение функционального статуса согласно ECOG до более 1, (b) значительное ухудшение клинического статуса, (c) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 92%, (d) неконтролируемая сердечная аритмия, (e) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (f) активная инфекция и (g) любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше).

В некоторых вариантах осуществления до стадии (ii) и после стадии (i) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков: (a) изменение функционального статуса согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG) до более 1; (b) активная неконтролируемая инфекция, (c) значительное ухудшение клинического статуса и (d) любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше).

Любой из способов, раскрытых в данном документе, может дополнительно включать мониторинг пациента-человека в отношении развития острой токсичности после стадии (ii). Примеры проявлений острой токсичности могут включать синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность, синдром лизиса опухоли, GvHD, внеопухолевую токсичность, специфическую в отношении мишени, неконтролируемую пролиферацию Т-клеток или их комбинацию.

В некоторых случаях раскрытый в данном документе способ может дополнительно включать подвергание пациента-человека второй процедуре лечения с применением лимфодеплеции и введение пациенту-человеку второй дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток после стадии (ii). В некоторых случаях вторая доза вводится пациенту-человеку через от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет после введения первой дозы. В некоторых примерах у пациента-человека, соответствующего

критериям введения второй дозы генетически сконструированных Т-клеток, не проявляются одно или несколько из следующего после стадии (ii): (a) дозолимитирующей токсичности (DLT), (b) GvHD степени 1 или больше, (c) CRS степени 4, который не разрешается до степени 2 в течение 72 часов, (d) нейротоксичности степени 3 или больше; (e) активной инфекции, (f) гемодинамической нестабильности и (g) дисфункции органов. В некоторых примерах вторая процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (iv) предусматривает совместное введение пациенту-человеку флударабина при 30 мг/м² и циклофосфида при 500 мг/м² в день внутривенно в течение 1-3 дней. В некоторых примерах вторую дозу генетически сконструированных Т-клеток можно вводить пациенту-человеку через 2-7 дней после второй процедуры лечения с применением лимфодеплеции. В некоторых примерах вторую дозу популяции генетически сконструированных Т-клеток можно вводить пациенту-человеку внутривенно при от приблизительно 1×10^7 CAR⁺ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток. Например, вторая доза может находиться в диапазоне от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток.

В некоторых случаях способ может дополнительно включать подвергание пациента-человека третьей процедуре лечения с применением лимфодеплеции и введение пациенту-человеку третьей дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток. В некоторых примерах третью дозу можно вводить пациенту-человеку через от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет после введения второй дозы. Пациент-человек может получать первую, вторую и третью дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток через три месяца и после введения второй дозы генетически сконструированных Т-клеток у него может не наблюдаться одно или несколько из следующего: (a) дозолимитирующей токсичности (DLT), (b) CRS степени 4, который не разрешается до степени 2 в течение 72 часов, (c) GvHD более чем 1 степени, (d) нейротоксичности степени 3 или больше, (e) активной инфекции, (f) гемодинамической нестабильности и (g) дисфункции органов. В некоторых примерах третья процедура лечения с применением лимфодеплеции может предусматривать совместное введение пациенту-человеку флударабина при 30 мг/м² и циклофосфида при 500 мг/м² в день внутривенно в течение 1-3 дней. В некоторых случаях третью дозу генетически сконструированных Т-клеток можно вводить пациенту-человеку через 2-7 дней после третьей процедуры лечения с применением лимфодеплеции. В некоторых примерах третью дозу популяции генетически сконструированных Т-клеток можно вводить пациенту-человеку внутривенно при от приблизительно 1×10^7 CAR⁺ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток. Например, третья доза может находиться в диапазоне от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток.

У любого пациента-человека, получающего вторую и/или третью дозы генетически сконструированных Т-клеток, могут наблюдаться стабильное заболевание или прогрессирование заболевания.

В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет 1×10^7 CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически

сконструированных Т-клеток составляет приблизительно 3×10^7 CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет приблизительно 1×10^8 CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет приблизительно $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет приблизительно 3×10^8 CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет приблизительно $4,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет приблизительно 6×10^8 CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет приблизительно $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляет приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток.

В некоторых случаях первая доза популяции генетически сконструированных Т-клеток является такой же, как вторая и/или третья дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток. В других случаях первая доза популяции генетически сконструированных Т-клеток является более низкой, чем вторая и/или третья дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток.

В любом из способов, раскрытых в данном документе, пациент-человек может подвергаться предшествующей противораковой терапии. В качестве альтернативы или в дополнение пациент-человек может иметь рецидивирующие или рефрактерные злокачественные новообразования из гемопоэтических клеток.

В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется Т-клеточное злокачественное новообразование, например, рецидивирующее или рефрактерное Т-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых примерах у пациента-человека имеется кожная Т-клеточная лимфома (CTCL). Такой пациент-человек может иметь фунгоидный микоз (MF), например, стадии Ib или выше, включая трансформированную крупноклеточную лимфому. В качестве альтернативы пациент-человек может страдать синдромом Сезари (SS). В других примерах у пациента-человека имеется периферическая Т-клеточная лимфома (PTCL). Примеры включают без ограничения ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AITL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), которая может быть Alk-положительной или Alk-отрицательной, Т-клеточный лейкоз или лимфому взрослых (ATLL), которые могут исключать вялотекущий подтип (не вялотекущую ATLL), и неутонченную периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL-NOS).

В некоторых примерах у пациента-человека имеется PTCL, ATLL или AITL, и

системная терапия первой линии была неэффективной. В некоторых примерах у пациента-человека имеется ALCL, и комбинированная терапия, предусматривающая брeutуксимаб ведотин, была неэффективной. В некоторых примерах у пациента-человека имеется ALK⁺ ALCL, и две предшествующие линии терапии, одна из которых предусматривает брeutуксимаб ведотин, были неэффективными. В других примерах у пациента-человека имеется ALK⁻ ALCL, и одна предшествующая линия терапии была неэффективной. В еще одних примерах у пациента-человека имеется MF или SS, и предшествующая системная терапия или предшествующая терапия с применением могамулизумаба были неэффективными.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек может иметь В-клеточное злокачественное новообразование, например, рецидивирующее или рефрактерное В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых примерах у пациента-человека имеется диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL). У такого пациента-человека предыдущая терапия с применением Т-клеток с CAR к CD19 была неэффективной. В других примерах у пациента-человека имеется мантийноклеточная лимфома (MCL).

В еще одних вариантах осуществления пациент-человек может иметь злокачественное новообразование из миелоидных клеток, например, рецидивирующее или рефрактерное злокачественное новообразование из миелоидных клеток. В некоторых примерах у пациента-человека имеется острый миелоидный лейкоз (AML).

Любой из пациентов-людей, подлежащих лечению посредством способа, раскрытого в данном документе, может не подвергаться лечению с применением могамулизумаба за по меньшей мере три месяца до введения первой дозы популяции генетически модифицированных Т-клеток.

В любом из способов, раскрытых в данном документе, пациент-человек может иметь CD70⁺ опухолевые клетки. Например, пациент-человек может иметь по меньшей мере 10% CD70⁺ опухолевых клеток в биологическом образце, полученном от пациента-человека. В некоторых случаях биологический образец представляет собой образец опухолевой ткани, и уровень CD70⁺ опухолевых клеток измеряется посредством иммуногистохимического анализа (ИНС). В других случаях биологический образец представляет собой образец крови или образец костного мозга, и уровень CD70⁺ опухолевых клеток определяется посредством проточной цитометрии. Любой из способов, раскрытых в данном документе, может дополнительно включать перед стадией (i) идентификацию пациента-человека, имеющего CD70⁺ опухолевые клетки, участвующие в формировании Т-клеточного или В-клеточного злокачественного новообразования.

В качестве альтернативы или в дополнение пациент-человек, подлежащий лечению посредством способа, раскрытого в данном документе, может быть подвергнут антицитокиновой терапии. В некоторых примерах пациент-человек характеризуется одним или несколькими из следующих признаков: (a) приемлемого функционирования органов, (b) отсутствия предшествующей трансплантации стволовых клеток (SCT), (c) отсутствия предшествующей терапии с применением средства, нацеливающегося на CD70, или

адоптивной терапии с применением Т-клеток или НК-клеток, (d) отсутствия известного противопоказания к терапии с применением лимфодеплеции, (e) отсутствия Т-клеточных или В-клеточных лимфом со злокачественным выпотом в настоящем или прошлом, который является симптоматическим или был симптоматическим, (f) отсутствия гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH), (g) отсутствия злокачественного новообразования или нарушений в центральной нервной системе, (h) отсутствия нестабильной стенокардии, аритмии и/или инфаркта миокарда, (i) отсутствия сахарного диабета, (j) отсутствия неконтролируемых инфекций, (k) отсутствия иммунодефицитных нарушений или аутоиммунных нарушений, которые требуют иммуносупрессивной терапии, и (l) отсутствия трансплантации солидных органов.

В любом из способов, раскрытых в данном документе, пациент-человек может быть подвержен мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней в отношении развития токсичности после каждого введения популяции генетически сконструированных Т-клеток. Если наблюдается развитие токсичности, то пациент-человек может быть подвергнут контролю токсичности.

Генетически сконструированные Т-клетки могут экспрессировать CAR, связывающийся с CD70. CAR может содержать внеклеточный домен, трансмембранный домен CD8, костимулирующий домен 4-1BB и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ . В некоторых случаях внеклеточный домен представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), который связывает CD70. В некоторых примерах scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий SEQ ID NO: 49, и переменный домен легкой цепи (V_L), содержащий SEQ ID NO: 50. В некоторых примерах scFv содержит SEQ ID NO: 48. В некоторых конкретных примерах CAR содержит SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки содержат нарушенный ген *TRAC*, который может быть получен с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9. В некоторых примерах система редактирования генов CRISPR/Cas9 может содержать направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9. В некоторых примерах нарушенный ген *TRAC* характеризуется делецией области, на которую нацеливается спейсерная последовательность под SEQ ID NO: 8 или ее часть.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки содержат нарушенный ген $\beta 2M$, который может быть получен с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9. В некоторых примерах система редактирования генов CRISPR/Cas9 может содержать направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 12 или 13.

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные Т-клетки содержат нарушенный ген CD $\square\square$, который может быть получен с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9. В некоторых примерах система редактирования генов CRISPR/Cas9 может содержать направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 4 или 5.

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** представлены графики, демонстрирующие эффективное редактирование нескольких генов в TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 (т. е. 3X KO (CD70), CAR⁺ к CD70) Т-клетках.

На **фиг. 2** представлен график, демонстрирующий, что поддерживаются нормальные количественные соотношения CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток среди популяции TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ Т-клеток.

На **фиг. 3** представлен график, демонстрирующий устойчивое увеличение количества клеток для TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ Т-клеток. Подсчитывали общее число жизнеспособных клеток среди 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) и 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) Т-клеток с CAR к CD70. 3X KO клетки получали с помощью sgRNA CD70 T7 или T8.

На **фиг 4A-4K** показаны графики, демонстрирующие относительную экспрессию CD70 в различных линиях раковых клеток. **Фиг. 4A:** график, демонстрирующий относительную экспрессию CD70 в девяти различных линиях раковых клеток. **Фиг. 4B:** график, демонстрирующий активность уничтожения клеток с применением TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клеток с тройным нокаутом (3КО (CD70), CAR⁺ к CD70) в отношении CD70-дефицитных клеток хронического миелогенного лейкоза (K562) при различных соотношениях эффектор:мишень. **Фиг. 4C:** график, демонстрирующий активность уничтожения клеток у тех же TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клеток с тройным нокаутом (3КО (CD70), CAR⁺ к CD70) в отношении CD70-экспрессирующих клеток множественной миеломы (MM.1S) при различных соотношениях эффектор:мишень. **Фиг. 4D:** график, демонстрирующий активность уничтожения клеток у тех же TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клеток с тройным нокаутом (3КО (CD70), CAR⁺ к CD70) в отношении CD70-экспрессирующих клеток Т-клеточной лимфомы (HuT78) при различных соотношениях эффектор:мишень. На **фиг. 4E** показан график, демонстрирующий активность уничтожения клеток у тех же TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клеток с тройным нокаутом (3КО (CD70), CAR⁺ к CD70) в отношении клеток Т-клеточной лимфомы с высоким уровнем экспрессии CD70 (MJ), клеток Т-клеточной лимфомы с низким уровнем экспрессии CD70 (HuT78) и клеток отрицательного контроля, не экспрессирующих CD70 (K562), при различных соотношениях эффектор:мишень. **Фиг. 4F-4K:** графики, демонстрирующие активность уничтожения клеток у TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ к CD70 Т-клеток (например, CTX130) в различных типах линий клеток острого миелоидного лейкоза, включая клетки MV411 (**фиг. 4F**), EOL-1 (**фиг. 4G**), HL60 (**фиг. 4H**), Kasumi-1 (**фиг. 4H**), KG1 (**фиг. 4J**) и THP-1 (**фиг. 4K**).

На **фиг. 5A-5B** показаны графики, демонстрирующие противоопухолевую

активность CAR+ к CD70 Т-клеток, например, клеток CTX130. **Фиг. 5А:** график, демонстрирующий уменьшение объема опухоли в модели ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы человека (например, опухолевых клеток HuT78), подвергнутой воздействию TRAC-/B2M-/CD70- CAR+ к CD70 Т-клеток, например, клеток CTX130. **Фиг. 5В:** график, демонстрирующий уменьшение объема опухоли в модели ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы человека (например, опухолевых клеток Hh), подвергнутой воздействию TRAC-/B2M-/CD70- CAR+ к CD70 Т-клеток, например, клеток CTX130.

Фиг. 6 представляет собой схематическое изображение иллюстративной схемы клинического исследования для оценки введения клеток CTX130 взрослым субъектам с рецидивирующими или рефрактерными Т-клеточными или В-клеточными злокачественными новообразованиями. DLT: дозолимитирующая токсичность; М: месяц; макс.: максимум; мин.: минимум. Период оценки DLT представляет собой первые 28 дней после инфузии CTX130.

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.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

CD70 представляет собой мембранный белок II типа и лиганд представителя суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) CD27 с распределением экспрессии в здоровых тканях, ограниченным активированными лимфоцитами и подгруппами дендритных и тимусных эпителиальных клеток как у людей, так и у мышей.

В отличие от его строго контролируемой экспрессии в нормальных тканях CD70 обычно экспрессируется на повышенных уровнях при множестве Т-клеточных и В-клеточных злокачественных новообразований, включая неутонченную периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL-NOS), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), синдром Сезари (SS), включая фунгоидный микоз (MF), острый Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, не являющиеся вялотекущими (ATLL), ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AITL; также известную как PTCL-AITL) и диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL). CD70 также экспрессируется при других гемопоэтических злокачественных новообразованиях, таких как миелоидные злокачественные новообразования.

Хотя злокачественные новообразования из гемопоэтических клеток, такие как Т-клеточные и В-клеточные злокачественные новообразования, можно лечить с применением традиционных методов лечения, таких как химиотерапия и/или ингибиторы контрольных точек (CPI), пациенты могут отвечать плохо или не отвечать вовсе, или у них может возникнуть рецидив после лечения. Такие пациенты не имеют вариантов лечения с установленной пользой с продлением жизни и нуждаются в новых альтернативных вариантах лечения.

CAR+ к CD70 Т-клетки, раскрытые в данном документе, такие как клетки CTX130, успешно снижали опухолевую нагрузку в модели подкожного ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы и демонстрировали долгосрочную эффективность *in vivo*, которая устраняла рост опухоли в течение длительного периода времени (например, в течение 90 дней после лечения).

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает в некоторых аспектах варианты терапевтического применения CAR+ к CD70 Т-клеток (например, клеток CTX130) для лечения Т-клеточных, В-клеточных злокачественных новообразований и злокачественных новообразований из миелодных клеток. В объем настоящего изобретения также входят Т-клетки с CAR к CD70, способы их получения (например, посредством подхода с применением CRISPR), а также компоненты и процедуры (например, подход с применением CRISPR для редактирования генов и компоненты, используемые в нем) для создания CAR к CD70+ Т-клеток, раскрытых в данном документе.

I. Аллогенные Т-клетки с CAR к CD70

В данном документе раскрыты Т-клетки с CAR к CD70 (например, клетки CTX130) для применения в лечении злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток, такого как Т-клеточное злокачественное новообразование, В-клеточное злокачественное новообразование или злокачественное новообразование из миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки с CAR к CD70 представляют собой аллогенные Т-клетки, содержащие нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген *B2M*, нарушенный ген *CD70* или их комбинацию. В конкретных примерах Т-клетки с CAR к CD70 экспрессируют CAR к CD70 и содержат нарушенные эндогенные гены *TRAC*, *B2M* и *CD70*. Любые подходящие способы редактирования генов, известные из уровня техники, можно применять для создания Т-клеток с CAR к CD70, раскрытых в данном документе, например, зависимое от нуклеазы целевое редактирование с использованием нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторных 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).

Иллюстративные генетические модификации Т-клеток с CAR к CD70 предусматривают направленное нарушение в константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), $\beta 2M$, CD70 или их комбинации. Нарушение в локусе TRAC приводит к потере экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) и предназначено для снижения вероятности реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD), в то время как нарушение в локусе $\beta 2M$ приводит к отсутствию экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC I) и предназначено для улучшения персистенции за счет снижения вероятности отторжения организмом хозяина. Нарушение в CD70 приводит в результате к потере экспрессии CD70, что предупреждает возможное межклеточное взаимное уничтожение до встраивания CAR к CD70. Добавление CAR к CD70 обеспечивает направление модифицированных Т-клеток к опухолевым CD70-экспрессирующим

клеткам.

CAR к CD70 может содержать CD70-связывающий одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), специфичный к CD70, за которым следуют шарнирный домен и трансмембранный домен (например, шарнирный домен и трансмембранный домен CD8), которые слиты с внутриклеточным косигнальным доменом (например, костимулирующим доменом 4-1BB) и сигнальным доменом CD3 ζ .

(i) Химерный антигенный рецептор (CAR)

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 CD3дзета (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: 52) и MALPVTALLPLALLHAARP (SEQ ID NO: 53). Можно использовать другие сигнальные пептиды.

(a) 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 переменный фрагмент (scFv, который может содержать переменную область тяжелой цепи антитела (V_H) и переменную 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 может являться специфичным в отношении антигена-мишени, представляющего интерес, например, патологического антигена, такого как опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "ассоциированный с опухолью антиген", относящийся к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая, как правило, экспрессируется на более высоком уровне в опухолевых клетках, чем в не являющихся опухолевыми клетках, в которых она может не экспрессироваться вообще или только на низких уровнях. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью структуры, которые распознаются иммунной системой хозяина, несущего опухоль, называются ассоциированными с опухолью антигенами. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с опухолью антиген представляет собой универсальный опухолевый антиген, если он широко экспрессируется в большинстве типов опухолей. В некоторых вариантах осуществления ассоциированные с опухолью антигены представляют собой дифференцировочные антигены, мутационные антигены, сверхэкспрессированные клеточные антигены или вирусные антигены. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой "опухолеспецифический антиген" или "TSA", что относится к иммуногенной молекуле, такой как белок, которая является уникальной для опухолевой клетки. Опухолеспецифические антигены экспрессируются исключительно в опухолевых клетках, например, в специфическом типе опухолевых клеток.

В некоторых примерах конструкции CAR, раскрытые в данном документе, содержат внеклеточный домен scFv, способный к связыванию с CD70. Пример CAR к CD70 представлен в примерах ниже.

(b) Трансмембранный домен

Полипептид CAR, 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 некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8a, содержащий последовательность FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASTQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR (SEQ ID NO: 54) или IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO: 55). Могут применяться другие трансмембранные домены.

(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 не более 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 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 вариантах осуществления полипептиды CAR, 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. В других примерах CAR, раскрытый в данном документе, содержит костимулирующую молекулу 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен CD28. В других вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен 4-1BB. В еще других вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен CD3 ζ , костимулирующий домен CD28 и костимулирующий домен 4-1BB.

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 WO 2019/097305A2 и WO2019/215500, при этом соответствующие раскрытия каждой из предшествующих заявок включены в данный документ посредством ссылки для цели и заявленного объекта, упомянутых в данном документе.

Например, CAR связывает CD70 (также известный как "CD70 CAR" или "CAR к CD70"). Аминокислотная последовательность иллюстративного CAR, который связывает CD70, представлена под SEQ ID NO: 46. См. также аминокислотные последовательности и кодирующие нуклеотидные последовательности компонентов в иллюстративной конструкции CAR к CD70 в **таблице 1** ниже.

Таблица 1. Последовательности иллюстративных компонентов конструкции CAR к CD70

Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
CD70	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG	43
rAAV	CCGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCC	
(scFV к CD70B с 41BB)	TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC CAACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGCCGCGACGCG TGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCC	

TTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACG
CAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAAT
GAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCT
AACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTG
CTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGA
TTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTC
CCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTG
GGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAA
GCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCT
TGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACT
GAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGT
GCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTG
GTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGA
CCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGT
CCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGG
CAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATC
CTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC
CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAA
GTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACA
AATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATC
ACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGA
CTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCA
CATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG
GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCG
CGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCT
CCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT
AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAA
CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTG
TGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGG
CCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGT
ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTG
GGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCC
CTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGC
GCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTC
GCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCAT

TTAAAATTTTGGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTC
TGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTG
CACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGC
GACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCG
AGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGG
ACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT
GCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTG
GGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGT
GAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAG
GGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAG
CGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGC
CTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACG
GAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC
TCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGG
GAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAG
TGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTG
ATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTG
GATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
AAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACCACC
ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTG
GCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAG
TTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGG
CGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTA
TACGTTACGAACACTACGGGATGAATTGGGTTCGCCA
AGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGA
TAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGACG
CTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCA
GCATATCCACCGCATAACATGGAGCTGTCCCGACTCC
GGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGG
ACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGG
GTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGC
AGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGG
TGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGGC
GGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTCG
CGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTT

TATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCC
GAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTC
TGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGG
AACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCACTGCAGGC
TGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAG
AGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGT
AGAAATTAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATT
TCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCG
CCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACC
TCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGC
CGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGAATTCGC
TTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTAC
GTGCGGCGTCCTTTTGTGTCCTCGTTATTACTTTG
TATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAA
GAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAG
ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTA
GCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGT
GAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCT
CCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAA
CGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACG
TGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATG
GGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGG
ACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGG
AGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGA
CGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGG
GTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACT
GCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAA
TCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTT
GTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAA
ACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCT
TCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCT
TCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGT
TCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTC
CTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCA
AAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTT

CTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAG
 ATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGGCACGTGGCCC
 AGCCTCAGTCTCTCCAAGTTCCTGCCTGCCTGC
 CTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAG
 GCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCT
 TATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTC
 ACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCAC
 CAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGG
 TGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGG
 GTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGA
 GCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTC
 AGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAC
 AGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCT
 CTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCA
 AGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACA
 GGAGCTCAATGAGAAAGGTAACCACGTGCGGACCG
 AGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTG
 ATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCG
 CTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACG
 CCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG
 AGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

CD70

LHA-RHA

(scFV κ CD70B c
 41BB)

GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCT
 TATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGC
 AGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAAT
 GAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCT
 AACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTG
 CTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGA
 TTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTTC
 CCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTG
 GGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAA
 GCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCT
 TGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCCT
 GAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGT
 GCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTG
 GTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGA

44

CCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGT
CCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTGTTGGGG
CAAAGAGGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATC
CTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGC
CGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAA
GTCTGTCTGCCTATTACCGATTTTGATTCTCAAACA
AATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATC
ACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGA
CTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCA
CATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG
GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCG
CGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCT
CCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT
AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAA
CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTG
TGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATATGG
CCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGT
ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTG
GGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCC
CTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGC
GCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTC
GCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCAT
TTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTC
TGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTG
CACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGC
GACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCG
AGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGG
ACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT
GCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTG
GGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGT
GAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAG
GGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAG
CGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGC
CTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACG
GAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC

TCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGG
GAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAG
TGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTG
ATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTG
GATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
AAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGACCACC
ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTG
GCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAG
TTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGG
CGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTA
TACGTTACGAACCTACGGGATGAATTGGGTTCGCCA
AGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGA
TAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGACG
CTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCA
GCATATCCACCGCATACATGGAGCTGTCCCGACTCC
GGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGG
ACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGG
GTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGC
AGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGG
TGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGGC
GGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTCG
CGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTT
TATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCC
GAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTC
TGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGG
AACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCACTGCAGGC
TGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAG
AGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGT
AGAAATTAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATT
TCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCG
CCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACC
TCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGC
CGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGAATTCGC
TTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTAC
GTGCGGCGTCCTTTTGTTGTCACTCGTTATTACTTTG

TATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAA
GAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAG
ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTA
GCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGT
GAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCT
CCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAA
CGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACG
TGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATG
GGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGG
ACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGG
AGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGA
CGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGG
GTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACT
GCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAA
TCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTT
GTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAA
ACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCT
TCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCT
TCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGT
TCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTC
CTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCA
AAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTT
CTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAG
ATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCC
AGCCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGC
CTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAG
GCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCT
TATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTC
ACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCAC
CAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGG
TGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAAGTCAGATGAGGG
GTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTTAGTTGGGGGA
GCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTC
AGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAAC
AGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCT

Нуклеотидная последовательность CAR к CD70 (scFv к CD70B с 41BB)	CTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGCCCTACCA AGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACA GGAGCTCAATGAGAAAGG	45
	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTG GCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAG TTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGG CGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTA TACGTTACGAACCTACGGGATGAATTGGGTTTCGCCA AGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGGA TAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGACG CTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCA GCATATCCACCGCATAACATGGAGCTGTCCCGACTCC GGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGG ACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGG GTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCA GTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGT GACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCG GTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTGCG GCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTTT ATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCG AAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTG GGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAA CTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCCTGCAGGCTG AGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAG AAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAG AAATTAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCT CCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCC TCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTT AGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGG GGTGCTGTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGT GATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGC GGCGTCCTTTTGTGTGCTACTCGTTATTACTTTGTATT GTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAAA CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCA GTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC	

CGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACT
 GCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGC
 ATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACT
 GAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGA
 TAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTA
 AACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTAC
 AATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTA
 CTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGG
 GAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTA
 CGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGC
 AGGCCCTGCCTCCCAGATAA

Аминокислотная
 последовательность
 CAR к CD70
 (scFv к CD70B с
 41BB)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGA
 SVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWI
 NTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRS
 DDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQTTVTVSSGGGGS
 GGGGSGGGGSGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRAS
 KSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVP
 DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWT
 FGQGTKVEIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPPTI
 ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA
 GTCGVLLLSLVITLYCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
 QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPK
 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

46

Нуклеотидная
 последовательность
 scFv к CD70B

CAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAA
 AAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGC
 GTCCGGTTATACGTTACGAACTACGGGATGAATTG
 GGTTCCGCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGA
 TGGGGTGGATAAATACCTACACCGGCGAACCTACAT
 ACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGC
 GCGATACCAGCATATCCACCGCATACATGGAGCTGT
 CCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATT
 GTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTACT
 GGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTG

47

	GAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGG GGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGA TAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGAT TAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGG ATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGG ACAACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAA TCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGT GGAAGCGGAAGTGAAGTTTACGCTCACGATCAGTTCA CTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAG CACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGC ACGAAAGTAGAAATTA	
Аминокислотная последовательность scFv к CD70B (линкер подчеркнут)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNW VRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMT RDTISISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DY WGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGDIVMTQSPD SLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQ PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK	48
VH к CD70	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNW VRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMT RDTISISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DY WGQGT TVTVSS	49
VL к CD70	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMH WYQQKPGQP PPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK	50
Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSG	51
Сигнальный пептид	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	52
Сигнальный пептид	MALPVTALLPLALLHAARP	53
Трансmemбранный домен CD8a	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CNHRNR	54
Трансmemбранный CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	55
Нуклеотидная	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAA	56

последовательность 4-1BB	CAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAG GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGAA GAAGGAGGATGTGAACTG	
Аминокислотная последовательность 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL	57
Нуклеотидная последовательность CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATG AATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCGGACAAGAAAA CATTACCAACCCTATGCCCCCCCCACGAGACTTCGCT GCGTACAGGTCC	58
Аминокислотная последовательность CD28	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS	59
Нуклеотидная последовательность CD3 ζ	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCA TATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTG AATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGAT AAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAA ACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACA ATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTAC TCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGG AAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTAC GGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCA GGCCCTGCCTCCCAGA	60
Аминокислотная последовательность CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	61
TRAC-LHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCT TATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGC AGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATG AGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCA ACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCT AATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATT CCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCC ATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGG	62

GTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGC
 AGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTG
 AGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGA
 AATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGC
 CTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT
 TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAAGCATGAGACC
 GTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCC
 ATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCA
 AAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCT
 CTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG
 TGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT
 CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAA
 TGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAC
 AGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT
 CA

Промотор EF1 α

GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCG
 CCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGG
 CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG
 TAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCC
 TTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTG
 CAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTT
 TGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTC
 CCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGC
 GTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGAT
 TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGA
 GAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCC
 TCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGG
 CCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTG
 TCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAT
 TTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAG
 ATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTG
 GTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGG
 CCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGG
 GCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGG
 TAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGC

Синтетический сигнал поли(А)	CTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCA AGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAA AGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCA AAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTC CTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTT TTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTT TTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGA GACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATT CTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCTTGG TTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTT TTCTTCCATTTAGGTGTCGTGA	64
TRAC-RHA	AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTT GGTTTTTTGTGTG TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCC TTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTC CCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCA GGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCC CAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCTGA TTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCC TCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAG TCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGA GAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCA GTCTCTCCAAGTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTTTGCT CAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCAT TCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCT CCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGT CAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCAC TGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAA GTGGAGGAATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCC CAGAGGAAGCACCATTTAGTTGGGGGAGCCCATCT GTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGA ATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCT	65

TCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAA
 ATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGG
 GAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCA
 ATGAGAAAGG

(ii) Нокаут генов *TRAC*, *B2M* и/или *CD70*

Т-клетки с CAR к CD70, раскрытые в данном документе, могут дополнительно содержать нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген *B2M*, нарушенный ген *CD70* или их комбинацию. Нарушение в локусе *TRAC* приводит к потере экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) и предназначено для снижения вероятности реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD), в то время как нарушение в локусе *β2M* приводит к отсутствию экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости I типа (MHC I) и предназначено для улучшения персистенции за счет снижения вероятности отторжения организмом хозяина. Нарушение гена *CD70* будет обеспечивать сведение к минимуму эффекта взаимного уничтожения при продуцировании Т-клеток с CAR к CD70. Кроме того, нарушение гена *CD70* улучшило здоровье и активность полученных сконструированных Т-клеток. Добавление CAR к CD70 обеспечивает направление модифицированных Т-клеток к опухолевым CD70-экспрессирующим 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 *β2M*.

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, как например РНК, раскрытые в данном документе (известной как целевая последовательность), а 3'-конец делетированного фрагмента может выходить за пределы области, на которую происходит нацеливание. В качестве альтернативы 3'-конец делетированного фрагмента может находиться в пределах области, на которую происходит нацеливание, а 5'-конец делетированного фрагмента может выходить за пределы области, на которую происходит нацеливание.

В некоторых случаях нарушенный ген TRAC в Т-клетках с CAR к CD70, раскрытых в данном документе, может предусматривать 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: 17, которая представляет собой целевой сайт направляющей РНК TRAC TA-1. См. таблицы последовательностей ниже. В некоторых примерах фрагмент под SEQ ID NO: 17 может быть заменен нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR к CD70. Такой нарушенный ген *TRAC* может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 44.

Нарушенный ген B2M в Т-клетках с CAR к CD70, 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: 31-36. См. **таблицу 4** ниже.

В качестве альтернативы или в дополнение нарушенный ген CD70 в Т-клетках с CAR к CD70, раскрытых в данном документе, может быть получен с применением технологии CRISPR/Cas. В некоторых примерах может использоваться gRNA для CD70, представленная в таблице последовательностей ниже. Нарушенный ген CD70 может содержать нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 37-42. См. **таблицу 5** ниже.

(iii) Иллюстративные Т-клетки с CAR к CD70

В некоторых примерах Т-клетки с CAR к CD70 представляют собой клетки CTX130, которые представляют собой CD70-направленные Т-клетки, содержащие нарушенный ген *TRAC*, ген *B2M* и ген *CD70*. Клетки CTX130 могут быть получены посредством генетической модификации *ex vivo* с применением компонентов системы редактирования генов CRISPR/Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9) (sgRNA и нуклеаза Cas9).

Также в объем настоящего изобретения входят популяции Т-клеток с CAR к CD70 (например, популяция клеток CTX130), которые содержат генетически сконструированные клетки (например, подвергнутые CRISPR-Cas9-опосредованному генетическому

редактированию), экспрессирующие CAR к CD70, раскрытый в данном документе, и нарушенные гены *TRAC*, *B2M* и *CD70*; и при этом нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR к CD70, встроена в локус *TRAC*.

Следует учитывать, что нарушение гена охватывает генную модификацию посредством редактирования генов (например, использование редактирования генов с помощью CRISPR/Cas для вставки или делеции одного или нескольких нуклеотидов). 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 *β2M*.

В конкретных случаях CAR к CD70+ Т-клетки представляют собой клетки CTX130, которые получают с использованием технологии CRISPR для нарушения генов-мишеней и трансдукции аденоассоциированным вирусом (AAV) для доставки конструкции CAR. CRISPR-Cas9-опосредованное редактирование генов предусматривает три направляющие РНК (sgRNA): sgRNA CD70-7 (SEQ ID NO: 2), которая нацеливается на локус CD70, и sgRNA TA-1 (SEQ ID NO: 6), которая нацеливается на локус *TRAC*, и sgRNA B2M-1 (SEQ ID NO: 10), которая нацеливается на локус *β2M*. CAR к CD70 клеток CTX130 состоит из одноцепочечного фрагмента антитела к CD70 (scFv), специфичного к CD70, за которым следует шарнирный и трансмембранный домен CD8, который слит с внутриклеточным косигнальным доменом 4-1BB и сигнальным доменом CD3ζ. Таким образом, CTX130 представляет собой средство иммунотерапии на основе CD70-направленных Т-клеток, в состав которого входят аллогенные Т-клетки, которые генетически модифицированы *ex vivo* с использованием компонентов редактирования генов CRISPR/Cas9 (sgRNA и нуклеаза Cas9).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% популяции клеток СТХ130 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% сконструированных Т-клеток популяции 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 СТХ130 могут не экспрессировать поверхностный белок TRAC 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% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок 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% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок TRAC на выявляемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% популяции клеток СТХ130 могут не экспрессировать поверхностный белок CD70 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%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% сконструированных Т-клеток популяции могут не экспрессировать поверхностный белок CD70 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%, 90-100% или 95-100% сконструированных Т-клеток популяции не экспрессируют поверхностный белок CD70 на выявляемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления значительный процент популяции клеток СТХ130 может содержать более чем одно редактирование гена, что приводит к появлению определенного процента клеток, не экспрессирующих более чем один ген и/или белок.

Например, по меньшей мере 50% популяции клеток СТХ130 могут не экспрессировать два поверхностных белка на выявляемом уровне, например, не экспрессировать белки $\beta 2M$ и TRAC, белки $\beta 2M$ и CD70 или белки TRAC и CD70 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 два поверхностных белка на выявляемом уровне. В другом примере по меньшей мере 50% популяции клеток СТХ130 могут не экспрессировать на выявляемом уровне все три целевые белка, представляющие собой поверхностные белки $\beta 2M$, TRAC и CD70. 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 поверхностные белки $\beta 2M$, TRAC и CD70 на выявляемом уровне.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток CTX130 может содержать более чем одно редактирование гена (например, в более чем одном гене), которое может представлять собой редактирование, описанное в данном документе. Например, популяция клеток CTX130 может содержать нарушенный ген *TRAC*, полученный посредством технологии CRISPR/Cas с использованием направляющей РНК TA-1 (см. также **таблицу 2**, SEQ ID NO: 6-7). В качестве альтернативы или в дополнение популяция клеток CTX130 может содержать нарушенный ген $\beta 2M$, полученный посредством технологии CRISPR/Cas9 с использованием направляющей РНК B2M-1 (см. также **таблицу 2**, SEQ ID NO: 10-11). Такие клетки CTX130 могут содержать вставки/делеции в гене $\beta 2M$, который предусматривает одну или несколько нуклеотидных последовательностей, перечисленных в **таблице 4**. Например, популяция клеток CTX130 может содержать нарушенный ген *CD70*, полученный посредством технологии CRISPR/Cas с использованием направляющей РНК CD70-7 (см. также **таблицу 2**, SEQ ID NO: 2-3). Кроме того, популяция клеток CTX130 может содержать вставки/делеции в гене *CD70*, который может предусматривать одну или несколько нуклеотидных последовательностей, перечисленных в **таблице 5**.

В некоторых вариантах осуществления клетки CTX130 могут предусматривать делецию в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. Например, клетки CTX130 могут предусматривать делецию фрагмента AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (SEQ ID NO: 17) в гене *TRAC* или его части, например, фрагмента из SEQ ID NO: 17, содержащего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 последовательных пар оснований. В некоторых вариантах осуществления клетки CTX130 включают делецию, предусматривающую фрагмент из SEQ ID NO: 17 в гене *TRAC*. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию SEQ ID NO: 17 в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Т-клетка предусматривает делецию, представляющую собой SEQ ID NO: 17, в гене *TRAC* по сравнению с немодифицированными Т-клетками.

Кроме того, популяция клеток CTX130 может содержать клетки, экспрессирующие CAR к CD70, такие как раскрытые в данном документе (например, SEQ ID NO: 46). Кодированная последовательность CAR к CD70 может быть встроена в локус *TRAC*, например, в область, на которую нацелена направляющая РНК TA-1 (см. также **таблицу 2**, SEQ ID NO: 6-7). В таких случаях аминокислотная последовательность иллюстративного CAR к CD70 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере

75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% клеток CTX130 представляют собой CAR+ клетки, которые экспрессируют CAR к CD70. См. также WO 2019/097305A2 и WO2019/215500, соответствующие раскрытия каждой из которых включены посредством ссылки для заявленного объекта и цели, упомянутых в данном документе.

В конкретных примерах Т-клетки с CAR к CD70, раскрытые в данном документе (например, клетки CTX130), представляют собой популяцию Т-клеток, содержащую CAR+ Т-клетки в количестве, большем или равном 30%, TCR+ Т-клетки в количестве, меньшем или равном 0,4%, B2M+ Т-клетки в количестве, меньшем или равном 30%, и CD70+ Т-клетки в количестве, меньшем или равном 2%.

(v) Фармацевтические композиции

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, содержащие любую из популяций генетически сконструированных Т-клеток с CAR к CD70, как раскрыто в данном документе, например клеток CTX130, 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, Berge *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 CD70 (например, клеток CTX130), 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 CD70, таких как клетки CTX130, суспендированные в растворе для криоконсервации (например, по сути 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 CD70, также раскрытых в данном документе (например, клеток CTX130), которые необязательно могут быть суспендированы в растворе для криоконсервации, как раскрыто в данном документе, можно хранить в среде, которая по сути не оказывает влияния на жизнеспособность и биоактивность Т-клеток, для будущего применения, например, в условиях, обычно используемых для хранения клеток и тканей. В некоторых примерах фармацевтическую композицию можно хранить в паровой фазе жидкого азота при температуре, меньшей или равной -135°C . Значимых изменений в отношении внешнего вида, количества клеток, жизнеспособности, % CAR⁺ Т-клеток, % TCR⁺ Т-клеток, % B2M⁺ Т-клеток и % CD70⁺ Т-клеток после того, как клетки хранились в таких условиях в течение определенного периода времени, не наблюдали.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, раскрытая в данном документе, может представлять собой суспензию для инфузии, содержащую Т-клетки CAR к CD70, раскрытые в данном документе, такие как клетки CTX130. В некоторых примерах суспензия может содержать приблизительно $25\text{--}85 \times 10^6$ клеток/мл (например, 50×10^6 клеток/мл) с 30% CAR⁺ Т-клеток или меньше, 0,4% TCR⁺ Т-клеток или меньше, 30% B2M⁺ Т-клеток или меньше и 2% CD70⁺ Т-клеток или меньше. В некоторых примерах суспензия может содержать приблизительно 25×10^6 CAR⁺ клеток/мл. В конкретных примерах фармацевтическая композиция может быть помещена во флакон, каждый из которых содержит приблизительно $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ Т-клеток, таких как клетки CTX130 (например, жизнеспособные клетки). В других примерах фармацевтическая композиция может быть помещена во флакон, каждый из которых содержит приблизительно 3×10^8 CAR⁺ Т-клеток, таких как клетки CTX130 (например, жизнеспособных клеток).

II. Получение Т-клеток с CAR к CD70

Любые подходящие способы редактирования генов, известные из уровня техники, можно использовать для создания генетически сконструированных иммунных клеток (например, Т-клеток, таких как клеток CTX130), раскрытых в данном документе, например, зависимое от нуклеазы целевое редактирование с использованием нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторных 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 CTX130, получают посредством технологии CRISPR в комбинации с гомологичной рекомбинацией с применением вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV) в качестве донорной матрицы.

(i) CRISPR-Cas9-опосредованная система редактирования генов для генной инженерии

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 транскрипционной 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: нехомологичное 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 не кодирующие области генов. В качестве альтернативы при HDR используется длинный отрезок гомологичной донорной ДНК, обеспечиваемой 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 создания 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: 1.

Аминокислотная последовательность нуклеазы Cas9 (SEQ ID NO:1):

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHE

RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL
 NPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK
 NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAA
 KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQ
 SKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
 HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP
 WNFEEVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG
 MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLG
 TYHDLKKIHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLK
 RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQ
 VSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ
 KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDI
 NRLSDYDVHDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLN
 AKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
 KLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLES
 EFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETN
 GETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD
 WDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEA
 KGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYE
 KLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIR
 EQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQL
 GGD

(b) Направляющие PHK (gRNA)

Опосредованное CRISPR-Cas9 редактирование генов, описанное в данном документе, предусматривает применение направляющей PHK 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 *CD70*, или гена *TRAC*, или гена $\beta 2M$ для редактирования гена в конкретной целевой последовательности. Направляющая PHK 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 *CD70*, представлена под SEQ ID NO: 2. См. также WO2019/215500, 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 использованием последовательности гена *CD70*, расположенной на хромосоме 19 (GRCh38: хромосома 19: 6583183-6604103; Ensembl; ENSG00000125726). В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область *CD70*, и Cas9 создают разрывы в геномной области *CD70*, что приводит к вставкам/делециям в гене *CD70*

с нарушением экспрессии mRNA или белка.

Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на ген *TRAC*, представлена под SEQ ID NO: 6. См. WO2019/097305A2, 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 mRNA или белка.

Иллюстративная gRNA, нацеливающаяся на ген $\beta 2M$, представлена под SEQ ID NO: 10. 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 mRNA или белка.

Таблица 2. Последовательности sgRNA и последовательности целевых генов
SEQ ID
NO:

Последовательности sgRNA			SEQ ID NO
sgRNA для CD70 (CD70-7)	Модифицированная	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcu agaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaa aaguggcaccgagucggugcU*U*U*U	2
	Немодифицированная	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcuaga aaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaaaag uggcaccgagucggugcUUUU	3
	Модифицированная	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGC	4
sgRNA для CD70, спейсер	Немодифицированная	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC	5
	Модифицированная	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcu agaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaa aaguggcaccgagucggugcU*U*U*U	6
sgRNA для TRAC (TA-1)	Немодифицированная	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuaga aaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaaaag	7

		uggcaccgagucggugcUUUU	
sgRNA для <i>TRAC</i> спейсер	Модифициро ванная Немодифици рованная	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC AGAGCAACAGUGCUGUGGCC	8 9
sgRNA для <i>β2M</i> (B2M-1)	Модифициро ванная Немодифици рованная	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcu agaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaa aaguggcaccgagucggugcU*U*U*U GCUACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaa auagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcUUUU	10 11
sgRNA для <i>β2M</i> , спейсер	Модифициро ванная Немодифици рованная	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC GCUACUCUCUCUUUCUGGCC	12 13

Целевые последовательности (PAM)

Целевая последова тельность <i>CD70</i> (PAM)	GCTTTGGTCCCATTGGTCGC (GGG)	14
Целевая последова тельность <i>CD70</i>	GCTTTGGTCCCATTGGTCGC	15
Целевая последова тельность <i>TRAC</i> (PAM)	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG)	16
Целевая последова тельность <i>TRAC</i>	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC	17

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 шпильчатой 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 CD70 представляет собой 5'-GCTTTGGTCCCATTGGTCGC-3' (SEQ ID NO: 15), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC-3' (SEQ ID NO: 5). В другом примере, если целевая последовательность TRAC представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 17), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 9). В другом

примере, если целевая последовательность $\beta 2M$ представляет собой 5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 19), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-GCUACUCUCUCUUUCUGGCC-3' (SEQ ID NO: 13). Спейсер gRNA взаимодействует с целевой нуклеиновой кислотой, представляющей интерес, специфическим в отношении последовательности образом за счет 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'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-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*.

Спейсерная последовательность в gRNA представляет собой последовательность (например, последовательность из 20 нуклеотидов), которая определяет целевую последовательность (например, целевые последовательности ДНК, такие как геномная целевая последовательность) целевого гена, представляющего интерес. Иллюстративная спейсерная последовательность gRNA, нацеливающаяся на ген *CD70*, представлена под SEQ ID NO: 4. Иллюстративная спейсерная последовательность gRNA, нацеливающаяся на

ген *TRAC*, представлена под SEQ ID NO: 8. Иллюстративная спейсерная последовательность gRNA, нацеливающаяся на ген *$\beta 2M$* , представлена под SEQ ID NO: 12.

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 не более 10 ошибочно спаренных оснований, например, не более 9, не более 8, не более 7, не более 6, не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 ошибочно спаренного основания.

Неограничивающие примеры gRNA, которые можно использовать, как предусмотрено в данном документе, представлены в WO 2019/097305A2 и WO2019/215500, при этом соответствующие раскрытия каждой из предшествующих заявок 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 нацеливающейся 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-метилфосфоротиоатными 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, при этом соответствующие раскрытия каждой из предшествующих заявок включены в данный документ посредством ссылки для целей и заявленного объекта, упомянутых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область TRAC, обуславливают возникновение вставок/делеций в гене TRAC, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 3**. В некоторых вариантах осуществления gRNA (например, SEQ ID NO: 6), нацеливающаяся на геномную область *TRAC*, обуславливает возникновение вставок/делеций в гене *TRAC*, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 3**.

Таблица 3. Отредактированные последовательности гена *TRAC*

Описание	Последовательность (делеции обозначены с помощью тире (-); вставки обозначены жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AA-----GAGCAACAAATCTGACT	23
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGCTGT- GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	24
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTG-----CTGGAGCAACAAATCTGACT	25
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGT----- GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	26
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTG-----CTGACT	27
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGCTGT GGGCCTGGAGCAACAAATC TGACT	28
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGC-- TGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	29
Отредактированный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATC TGACT	30

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область $\beta 2M$, обуславливают возникновение вставок/делеций в гене $\beta 2M$, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления gRNA (например, SEQ ID NO: 10), нацеливающаяся на геномную область $\beta 2M$, обуславливает возникновение вставок/делеций в гене $\beta 2M$, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 4**.

Таблица 4. Отредактированные последовательности гена $\beta 2M$

Описание	Последовательность (делеции обозначены с помощью тире (-); вставки обозначены жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT-GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	31
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT--GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	32
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTT-----CTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCCGCT	33
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG ATAG CCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCC TCCCGCT	34
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC-----GCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCCGCT	35
Отредактированный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT GTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCGCT	36

В некоторых вариантах осуществления gRNA, нацеливающиеся на геномную область *CD70*, обуславливают возникновение вставок/делеций в гене *CD70*, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 5**. В некоторых вариантах осуществления gRNA (например, SEQ ID NO: 2), нацеливающаяся на геномную область *CD70*, обуславливает возникновение вставок/делеций в гене *CD70*, содержащем по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в **таблице 5**.

Таблица 5. Отредактированные последовательности гена *CD70*

Описание	Последовательность (делеции обозначены с помощью тире (-); вставки обозначены жирным шрифтом)	SEQ ID NO:
Отредактированный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC ACCAAGCCCGCG--CAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	37

Отредактиро ванный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCGAACCA ATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	38
Отредактиро ванный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC----- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	39
Отредактиро ванный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG- CCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	40
Отредактиро ванный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGC- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	41
Отредактиро ванный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATCACCA----- AGCCCGCAGGACG	42

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

Нуклеиновая кислота, кодирующая конструкцию CAR, 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 гер и сар, которые при транскрипции образуют капсиды, которые инкапсулируют геном AAV для доставки в клетки-мишени. Поверхностные рецепторы на этих капсидах обуславливают серотип AAV, который определяет, с какими целевыми органами капсиды связываются в первую очередь и, таким образом, какие клетки наиболее эффективно инфицирует 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 клетки-мишени, 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, может быть разработана для вставки в представляющий интерес геномный сайт 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 (например, за счет донорной матрицы, которую может переносить вирусный вектор, такой как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV)), может быть разработана таким образом, что она может быть вставлена в местоположение в пределах гена *TRAC* для нарушения 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 иметь областей гомологии с целевым местоположением 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 однострочной и/или двухстрочной, 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 аминокислоты(аминокислот) и применение модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфотриэтильные, фосфорамидатные, и остатки О-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 полуксанер, 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, инсультаторы, внутренние участки посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды 2A и/или сигналы полиаденилирования.

III. Лечение злокачественных новообразований из гемопоэтических клеток

В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены способы лечения пациента-человека, имеющего злокачественное новообразование из гемопоэтических клеток (например, Т-клеточное или В-клеточное злокачественное новообразование или злокачественное новообразование из миелоидных клеток), с применением популяции

любых из Т-клеток с CAR к CD70, таких как клетки CTX130, раскрытые в данном документе. Терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR к CD70 может предусматривать две стадии лечения: (i) режим кондиционирования (лимфодеплецирующее лечение), который предусматривает введение одной или нескольких доз одного или нескольких лимфодеплецирующих средств подходящему пациенту-человеку, и (ii) режим лечения (терапия с применением Т-клеток с CAR к CD70), который предусматривает введение пациенту-человеку популяции Т-клеток с CAR к CD70, таких как клетки CTX130, раскрытые в данном документе. Если применимо, пациенту-человеку можно вводить несколько доз Т-клеток с CAR к CD70, и перед введением пациенту каждой дозы Т-клеток с CAR к CD70 можно применять лечение с применением лимфодеплеции.

(i) Популяция 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 вариантах осуществления пациент-человек является ребенком. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек характеризуется весом тела, превышающим или равным 60 кг.

Пациент-человек, подлежащий лечению посредством способов, описанных в данном документе, может быть пациентом-человеком, имеющим злокачественное новообразование из гемопоэтических клеток (например, содержащее патологические CD70+ клетки), характеризующимся подозрением на его наличие или характеризующимся риском его наличия. В некоторых примерах у пациента-человека имеется Т-клеточное злокачественное новообразование, подозрение на его наличие или риск его возникновения. В некоторых примерах у пациента-человека имеется В-клеточное злокачественное новообразование, подозрение на его наличие или риск его возникновения. В некоторых примерах у пациента-человека имеется злокачественное новообразование из миелоидных клеток, подозрение на его наличие или риск его возникновения. Субъект с подозрением на наличие злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток может демонстрировать один или несколько симптомов злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток, например, необъяснимую потерю веса, усталость, ночную потливость, одышку или опухшие железы. Субъект с риском развития злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток может быть субъектом, характеризующимся одним или несколькими факторами риска развития злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток, 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 CD70 (например, клетки CTX130), можно идентифицировать посредством обычного медицинского обследования, например, физикального обследования, лабораторных тестов, биопсии (например, биопсии костного мозга и/или биопсии лимфатических узлов),

сканирования посредством магнитно-резонансной томографии (MRI) или ультразвуковых исследований.

В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется Т-клеточное злокачественное новообразование, например, рецидивирующее или рефрактерное Т-клеточное злокачественное новообразование. Такой пациент-человек может быть носителем патологических CD70+ Т-клеток. Примеры включают без ограничения кожную Т-клеточную лимфому (CTCL), периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL) и Т-клеточный лейкоз. В некоторых случаях Т-клеточное злокачественное новообразование может представлять собой CTCL, которая может предусматривать фунгоидный микоз (MF), например, стадии Ib или выше, включая трансформированную крупноклеточную лимфому или синдром Сезари (SS).

В некоторых случаях Т-клеточное злокачественное новообразование представляет собой PTCL. Примеры включают без ограничения ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AITL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), которая может быть Alk-положительной или Alk-отрицательной, Т-клеточный лейкоз или лимфому взрослых (ATLL), которые могут исключать вялотекущий подтип (не вялотекущую ATLL), и неутонченную периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL-NOS).

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек может иметь В-клеточное злокачественное новообразование, например, рецидивирующее или рефрактерное В-клеточное злокачественное новообразование. Такой пациент-человек может быть носителем патологических CD70+ В-клеток. В некоторых примерах у пациента-человека имеется диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL). У такого пациента-человека предыдущая терапия с применением Т-клеток с CAR к CD19 была неэффективной. В других примерах у пациента-человека имеется мантийноклеточная лимфома (MCL), которая представляет собой агрессивный тип В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL), ассоциированный с плохим прогнозом.

В еще одних вариантах осуществления пациент-человек может иметь злокачественное новообразование из миелоидных клеток, например, рецидивирующее или рефрактерное злокачественное новообразование из миелоидных клеток. В некоторых примерах у пациента-человека имеется острый миелоидный лейкоз (AML, также называемый острым миелогенным лейкозом).

В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется CD70+ лейкоз. В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется CD70+ Т-клеточный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется CD70+ лимфома. В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется CD70+ Т-клеточная лимфома.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек, подлежащий лечению посредством способов, описанных в данном документе, может быть пациентом-человеком, имеющим опухоль, содержащую CD70-экспрессирующие опухолевые клетки (CD70-экспрессирующая опухоль), которую можно идентифицировать посредством любого

способа, известного из уровня техники. Например, CD70-экспрессирующую опухоль можно идентифицировать посредством иммуногистохимического анализа (ИНС) ткани, собранной посредством эксцизионной биопсии или трепан-биопсии репрезентативной опухоли. В другом примере CD70-экспрессирующую опухоль можно идентифицировать посредством проточной цитометрии в опухолевых клетках, определенных посредством иммунофенотипирования, собранных в периферической крови или костном мозге. В конкретных примерах пациент-человек, подлежащий лечению посредством способа, раскрытого в данном документе, может иметь опухоль, содержащую по меньшей мере 10% CD70⁺ опухолевых клеток от общего количества раковых клеток в биологическом образце (например, образце ткани, таком как образец лимфатического узла, образец крови или образец костного мозга).

Любой из способов, раскрытых в данном документе, может дополнительно включать стадию идентификации пациента-человека, подходящего для аллогенной терапии с применением Т-клеток с CAR к CD70, на основании наличия и/или уровня CD70⁺ опухолевых клеток у пациента. Стадию идентификации можно осуществлять посредством определения наличия и/или уровня CD70⁺ опухолевых клеток в образце биопсии, полученном от пациента-кандидата посредством, например, ИНС. В качестве альтернативы стадию идентификации можно осуществлять посредством определения наличия и/или уровня CD70⁺ опухолевых клеток в образце крови или образце костного мозга, полученном от пациента-кандидата посредством, например, проточной цитометрии.

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. Неограничивающие примеры включают пациента, у которого имеется: (a) рецидивирующее или рефрактерное злокачественное новообразование из гемопоэтических клеток (например, Т-клеточные или В-клеточные злокачественные новообразования или злокачественное новообразование из миелоидных клеток), (b) SS или фунгоидный микоз (MF) на стадии IIВ или больше, при которых может быть необходимость в трансплантации, (c) диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), которая может не отвечать на терапию с применением Т-клеток с CAR к CD19, (d) PTCL, ATLL (например, лейкозная ATLL, лимфоматозная ATLL) или AITL, и системная терапия первой линии была неэффективной, (e) ALCL, и комбинированная терапия, предусматривающая бреутуксимаб ведотин, была неэффективной, (f) ALK⁺ ALCL, и две предшествующие линии терапии были неэффективными (например, одна из таких может предусматривать брентуксимаб ведотин), (g) ALK-ALCL, и одна предшествующая линия терапии была неэффективной, или (h) MF или SS, и один или несколько из предшествующих способов системной терапии были неэффективными (например, по меньшей мере два), которые в некоторых случаях могут предусматривать предшествующую терапию с применением могамулизумаба.

Пациентом-человеком, подлежащим лечению посредством способов, описанных в данном документе, может быть пациент-человек, который недавно подверглся

предшествующему лечению, или пациент, который ранее не подвергался лечению. Например, пациент-человек, подлежащий лечению, описанному в данном документе, может не подвергаться лечению с применением могамулизумаба за по меньшей мере три месяца до введения первой дозы популяции генетически модифицированных Т-клеток.

Любой из пациентов-людей, получавших лечение с применением способа, раскрытого в данном документе, может получать последующее лечение. Например, для пациента-человека предусмотрена антицитокиновая терапия. В другом примере для пациента-человека предусмотрена аутологичная или аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток после лечения с применением популяции генетически сконструированных Т-клеток.

Пациента-человека можно подвергать скринингу для определения того, соответствует ли пациент требованиям прохождения режима кондиционирования (лимфодеплецирующего лечения) и/или режима лечения (терапии с применением Т-клеток с CAR к CD70). Например, у пациента-человека, который соответствует требованиям лечения с применением лимфодеплеции, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (а) изменение функционального статуса согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG) до более 1, (b) значительное ухудшение клинического статуса (например, значительное ухудшение клинического статуса, которое может повышать потенциальный риск АЕ, ассоциированных с режимом кондиционирования и/или режимом лечения), (с) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 92%, (d) неконтролируемая сердечная аритмия, (е) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (f) активная инфекция и (g) любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше).

В другом примере у пациента-человека, который соответствует требованиям режима лечения, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (а) изменение функционального статуса согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG) до более 1, (b) активная неконтролируемая инфекция, (с) значительное ухудшение клинического статуса (например, значительное ухудшение клинического статуса, которое может повышать потенциальный риск АЕ, ассоциированных с инфузией аллогенных Т-клеток с CAR), и (d) любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше).

Значительное ухудшение клинического статуса, которое может повышать потенциальный риск АЕ, ассоциированных с режимом кондиционирования и/или режимом лечения, может включать без ограничения клинически значимое ухудшение цитопении, клинически значимое повышение уровней трансаминазы (например, больше 3 x ULN), клинически значимое повышение уровня общего билирубина (например, больше 2 x ULN) и клинически значимое повышение уровня креатинина в сыворотке крови.

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 схемы лечения, если пациент соответствует любому из следующих критериев исключения: (a) предшествующая трансплантация аллогенных стволовых клеток (SCT), (b) менее чем 60 дней после аутологичной SCT во время скрининга и с неразрешенными серьезными осложнениями, (c) предшествующее лечение с применением любых средств, нацеливающихся на CD70, (d) предшествующее лечение с применением любых Т-клеток с CAR или любых других модифицированных Т-клеток или естественных клеток-киллеров (NK), за исключением аутологичных Т-клеток с CAR к CD19, и у пациента имеется DLBCL, (e) известное противопоказание к любому лечению с применением лимфодеплеции или любому из вспомогательных веществ из любой схемы лечения, (f) Т-клеточные или В-клеточные лимфомы со злокачественным выпотом в настоящем или прошлом, который является симптоматическим или был симптоматическим, (g) клинические признаки гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH), (h) выявляемые злокачественные клетки в спинномозговой жидкости (CSF) или результаты магнитно-резонансной томографии (МРТ), указывающие на метастазы в головной мозг, (i) клинически значимая патология ЦНС в анамнезе или ее наличие, (j) нестабильная стенокардия, аритмия или инфаркт миокарда в течение 6 месяцев до скрининга, (k) предшествующее или сопутствующее злокачественное новообразование, за исключением тех, которые подвергали лечению посредством подхода, направленного на излечение тех, у кого была ремиссия в течение более чем 12 месяцев, без необходимости применения системной терапии (в некоторых случаях может допускаться базальноклеточная или плоскоклеточная карцинома кожи, соответствующим образом подвергнутая резекции, и карцинома шейки матки *in situ* или предшествующее злокачественное новообразование, которые были подвергнуты полной резекции и находились в ремиссии в течение более чем 3 лет), и (l) неконтролируемая острая угрожающая жизни бактериальная, вирусная или грибковая инфекция.

Пациента-человека, подвергаемого лечению с применением лимфодеплеции, можно подвергать скринингу в отношении соответствия требованиям для получения одной или нескольких доз Т-клеток с CAR к CD70, раскрытых в данном документе, таких как клетки СТХ130. Например, у пациента-человека, подвергнутого лечению с применением лимфодеплеции, который соответствует требованиям для прохождения лечения с использованием Т-клеток с CAR к CD70, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (a) изменение функционального статуса согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG) до более 1, (b) активная неконтролируемая инфекция, (c) значительное ухудшение клинического статуса (например, значительное ухудшение клинического статуса, которое может повышать потенциальный риск АЕ, ассоциированных с инфузией аллогенных Т-клеток с CAR), и (d) любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше).

После каждого введения дозы Т-клеток с CAR к CD70 пациента-человека можно подвергать мониторингу в отношении видов острой токсичности, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS), синдром лизиса опухоли (TLS), нейротоксичность

(например, синдром нейротоксичности, ассоциированной с иммунными эффекторными клетками, или ICANS) и реакция "трансплантат против хозяина" (GvHD). Кроме того, можно подвергать мониторингу один или несколько из следующих нежелательных эффектов: гипотензию, почечную недостаточность (которая может быть вызвана, например, супрессией клеток эпителия, подобных клеткам почечных канальцев), гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), виды длительной цитопении и/или супрессию остеобластов. После каждой дозы Т-клеток с CAR к CD70 пациента-человека можно подвергать мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней в отношении развития токсичности.

Если у пациента-человека проявляются один или несколько симптомов острой токсичности, то для пациента-человека может предусматриваться контроль 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, можно вводить антицитокиновое терапевтическое средство для стимуляции пролиферации Т-клеток с CAR к CD70.

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.

(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 имmunотрансплантацией и имmunотерапией. 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, доксорубицин, 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. Мониторинг лимфодеплеционного эффекта режима кондиционирования можно осуществлять 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, 20 мг/м² или 30 мг/м²) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней) и циклофосфамид при приблизительно 300-600 мг/м² (например, 500 мг/м²) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней). В другом примере пациент-человек получает флударабин при приблизительно 20-30 мг/м² (например, 25 мг/м²) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней) и циклофосфамид при приблизительно 300-500 мг/м² (например, 300 мг/м² или 400 мг/м²) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней). При необходимости доза циклофосфамида может быть увеличена, например, до 1000 мг/м².

Затем пациенту-человеку можно вводить любые Т-клетки с CAR к CD70, такие как клетки CTX130, в течение подходящего периода времени после лимфодеплецирующей терапии, как раскрыто 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 CAR к CD70+ Т-клеток (например, клеток CTX130).

Поскольку аллогенные Т-клетки с CAR к CD70, такие как клетки CTX130, могут быть получены заранее, лимфодеплецирующая терапия, раскрытая в данном документе, может применяться к пациенту-человеку, имеющему Т-клеточное или 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 CD70, раскрытой в данном документе.

Способы, описанные в данном документе, охватывают повторное введение

пациенту-человеку доз CAR к CD70+ Т-клеток. В таких случаях пациента-человека подвергают лечению с применением лимфодеплеции перед повторным введением доз. Например, для пациента-человека могут предусматриваться первая процедура лечения с применением лимфодеплеции и первая доза CTX130 с последующей второй процедурой лечения с применением лимфодеплеции и второй дозой CTX130. В другом примере для пациента-человека могут предусматриваться первая процедура лечения с применением лимфодеплеции и первая доза CTX130, вторая процедура лечения с применением лимфодеплеции и второй дозой CTX130 и третья процедура лечения с применением лимфодеплеции и третьей дозой CTX130.

Перед любой из стадий лимфодеплеции (например, до начальной стадии лимфодеплеции или до любой последующей стадии лимфодеплеции в сочетании с повторным введением доз Т-клеток с CAR к CD70, таких как клетки CTX130), пациента-человека можно подвергать скринингу в отношении наличия одного или нескольких признаков, чтобы определить, соответствует ли пациент требованиям для лечения с применением лимфодеплеции. Например, до лимфодеплеции у пациента-человека, который соответствует требованиям для лечения с применением лимфодеплеции, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (a) изменение функционального статуса согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG) до более 1, (b) значительное ухудшение клинического статуса (например, значительное ухудшение клинического статуса, которое может повышать потенциальный риск АЕ, ассоциированных с лечением с применением лимфодеплеции), (c) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 92%, (d) неконтролируемая сердечная аритмия, (e) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (f) активная инфекция и (g) любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше). В некоторых примерах значительное ухудшение клинического статуса, которое может повышать потенциальный риск нежелательных явлений, ассоциированных с лечением с применением лимфодеплеции, включает без ограничения клинически значимое ухудшение любой цитопении, клинически значимое повышение уровней трансаминазы (например, больше 3 x ULN), клинически значимое повышение уровня общего билирубина (например, больше 2 x ULN) и/или клинически значимое повышение уровня креатинина в сыворотке крови.

После лимфодеплеции пациента-человека можно подвергать скринингу в отношении одного или нескольких признаков для того, чтобы определить, соответствует ли пациент требованиям для лечения с использованием Т-клеток с CAR к CD70. Например, до лечения с использованием Т-клеток с CAR к CD70 и после лечения с применением лимфодеплеции у пациента-человека, который соответствует требованиям для лечения с использованием Т-клеток с CAR к CD70, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (a) изменение функционального статуса согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG) до более 1, (b) активная неконтролируемая инфекция, (c)

значительное ухудшение клинического статуса (например, значительное ухудшение клинического статуса, которое может повышать потенциальный риск АЕ, ассоциированных с инфузией аллогенных Т-клеток с CAR), и (d) любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше).

(iii) Введение Т-клеток с CAR к CD70

Аспекты настоящего изобретения предусматривают способы лечения Т-клеточного или В-клеточного злокачественного новообразования, включающие подвергание пациента-человека лечению с применением лимфодеплеции и введение пациенту-человеку дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток, описанных в данном документе (например, клеток CTX130).

Введение Т-клеток с CAR к CD70 может включать размещение (например, трансплантацию) популяции генетически сконструированных Т-клеток в организме пациента-человека посредством способа или пути, которые приводят к обеспечению по меньшей мере частичной локализации популяции генетически сконструированных Т-клеток в требуемом участке, таком как местоположение опухоли, таким образом, что может(-гут) обеспечиваться требуемый(-ые) эффект(-ы). 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 такого длинного, как несколько лет или даже вся продолжительность жизни субъекта, т. е. при долговременном приживлении. 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, а следовательно предусмотрены метаболизм и другие подобные процессы. 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, Т-клеточного или В-клеточного злокачественного новообразования), и относится к количеству генетически сконструированных Т-клеток в популяции, достаточному для обеспечения необходимого эффекта, например, для лечения субъекта, у которого имеется 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 3×10^7 клеток до приблизительно 1×10^9 клеток, которые экспрессируют CAR, который связывает CD70.

Эффективное количество популяции генетически сконструированных Т-клеток может содержать от приблизительно $3,0 \times 10^7$ клеток до приблизительно 9×10^8 клеток, которые экспрессируют CAR к CD70 (CAR⁺ клеток), например, CAR⁺ клеток CTX130. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции может предусматривать по меньшей мере $3,0 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере 4×10^8 CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере $4,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере 5×10^8 CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере $5,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере 6×10^8 CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере $6,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере 7×10^8 CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере 8×10^8 CAR⁺ клеток CTX130, по меньшей мере $8,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130 или по меньшей мере 9×10^8 CAR⁺ клеток CTX130. В некоторых примерах количество CAR⁺ клеток CTX130 может не превышать 1×10^9 клеток.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции, как раскрыто в данном документе (например, клеток CTX130), может находиться в диапазоне от приблизительно $3,0 \times 10^7$ до приблизительно 3×10^8 CAR⁺ Т-клеток, например, от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^8 CAR⁺ Т-клеток или от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 3×10^8 CAR⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции, как раскрыто в данном документе (например, клеток CTX130), может находиться в диапазоне от приблизительно $1,5 \times 10^8$ до приблизительно 3×10^8 CAR⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции, как раскрыто в данном документе (например, клеток CTX130), может находиться в диапазоне от приблизительно $3,0 \times 10^8$ до

осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции, как раскрыто в данном документе (например, клеток CTX130), может находиться в диапазоне от приблизительно 3×10^8 до приблизительно $4,5 \times 10^8$ CAR⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции может предусматривать дозу популяции генетически сконструированных Т-клеток, например, дозу, предусматривающую от приблизительно $3,0 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток CTX130, например, любую дозу или диапазон доз, раскрытые в данном документе. В некоторых примерах эффективное количество составляет $4,5 \times 10^6$ CAR⁺ клеток CTX130. В некоторых примерах эффективное количество составляет 6×10^8 CAR⁺ клеток CTX130. В некоторых примерах эффективное количество составляет $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130. В некоторых примерах эффективное количество составляет 9×10^8 CAR⁺ клеток CTX130.

В некоторых примерах пациенту, у которого имеется CTCL, например, фунгоидный микоз (MF) с крупноклеточной трансформацией, можно вводить подходящую дозу клеток CTX130, например, от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 6×10^8 CAR⁺ клеток CTX130. Такому пациенту с MF можно вводить приблизительно 3×10^7 CAR⁺ клеток CTX130. В качестве альтернативы пациенту с MF можно вводить приблизительно 1×10^8 CAR⁺ клеток CTX130. В другом примере пациенту с MF можно вводить приблизительно 3×10^8 CAR⁺ клеток CTX130. В другом примере пациенту с MF можно вводить приблизительно $4,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130. В другом примере пациенту с MF можно вводить приблизительно 6×10^8 CAR⁺ клеток CTX130. В другом примере пациенту с MF можно вводить приблизительно $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130. В другом примере пациенту с MF можно вводить приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток CTX130.

В некоторых примерах пациенту, у которого имеется CTCL, например, фунгоидный микоз (MF) с крупноклеточной трансформацией, можно вводить подходящую дозу клеток CTX130, например, от приблизительно 9×10^9 до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток CTX130. Такому пациенту с MF можно вводить приблизительно 9×10^9 CAR⁺ клеток CTX130. В качестве альтернативы пациенту с MF можно вводить приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток CTX130.

В некоторых вариантах осуществления подходящую дозу клеток CTX130 вводят из одного или нескольких флаконов с фармацевтической композицией, при этом каждый флакон содержит приблизительно $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130. В некоторых вариантах осуществления подходящую дозу клеток CTX130 вводят из одного или нескольких флаконов с фармацевтической композицией, при этом каждый флакон содержит приблизительно 3×10^8 CAR⁺ клеток CTX130. В некоторых вариантах осуществления подходящая доза клеток CTX130, вводимая субъекту, составляет количество, в один или несколько раз превышающее $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130, например, в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 6 раз превышающее $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130. В некоторых вариантах осуществления подходящая доза клеток CTX130 вводится из одного или

нескольких заполненных или частично заполненных флаконов с фармацевтической композицией.

Эффективность терапии с применением Т-клеток с CAR к CD70, описанной в данном документе, может определить квалифицированный врач. Терапия с применением Т-клеток с CAR к CD70 считается "эффективной", если один или все признаки или симптомы, например, уровни CD70, изменяются благоприятным образом (например, снижаются на по меньшей мере 10%), или улучшаются или ослабляются другие клинически приемлемые симптомы или маркеры Т-клеточного или В-клеточного злокачественного новообразования. Эффективность также можно измерить по отсутствию ухудшения состояния субъекта, что оценивается по госпитализации или необходимости в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование Т-клеточного или 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 предусматривает любое лечение Т-клеточного или В-клеточного злокачественного новообразования у пациента-человека и предусматривает: (1) подавление заболевания, например остановку или замедление прогрессирования симптомов, или (2) облегчение заболевания, например регрессию симптомов, и (3) предупреждение или снижение вероятности развития симптомов.

Способы лечения, описанные в данном документе, охватывают повторную лимфодеплецию и повторное введение доз Т-клеток с CAR к CD70. До каждого повторного введения доз Т-клеток с CAR к CD70 пациент подвергается еще одной процедуре лечения с применением лимфодеплеции. Дозы Т-клеток с CAR к CD70 могут быть одинаковыми для первой, второй и третьей доз. Например, каждая из первой, второй и третьей доз может составлять 1×10^7 CAR⁺ клеток, 3×10^7 CAR⁺ клеток, 1×10^8 CAR⁺ клеток, $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток, 3×10^8 CAR⁺ клеток, $4,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток, 6×10^8 CAR⁺ клеток, $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток или 9×10^8 CAR⁺ клеток. В других случаях дозы Т-клеток с CAR к CD70 могут увеличиваться в отношении числа CAR⁺ клеток по мере увеличения числа доз. Например, первая доза составляет 1×10^7 CAR⁺ клеток, вторая доза составляет 1×10^8 CAR⁺ клеток, и третья доза составляет 1×10^9 CAR⁺ клеток. В качестве альтернативы первая доза CAR⁺ клеток является более низкой, чем вторая и/или третья доза CAR⁺ клеток, например, первая доза составляет 1×10^7 CAR⁺ клеток, а вторая и третья дозы составляют 1×10^9 CAR⁺ клеток. В некоторых примерах доза Т-клеток с CAR к CD70 может увеличиваться на $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток для каждой последующей дозы.

Пациентов можно оценивать в отношении повторного введения доз после каждого введения Т-клеток с CAR к CD70. Например, после первой дозы Т-клеток с CAR к CD70 пациент-человек может соответствовать требованиям в отношении получения второй дозы Т-клеток с CAR к CD70, если у пациента не проявляются одно или несколько из следующего: (a) дозолIMITирующей токсичности (DLT), (b) CRS степени 4, который не разрешается до степени 2 в течение 72 часов, (c) GvHD более чем 1 степени, (d) нейротоксичности степени 3 или больше, (e) активной инфекции, (f) гемодинамической

нестабильности и (g) дисфункции органов. В другом примере после введения второй дозы Т-клеток с CAR к CD70 пациент-человек может соответствовать требованиям в отношении получения третьей дозы CTX130, если у этого пациента не проявляются одно или несколько из следующего: (a) дозолимитирующей токсичности (DLT), (b) CRS степени 4, который не разрешается до степени 2 в течение 72 часов, (c) GvHD более чем 1 степени, (d) нейротоксичности степени 3 или больше, (e) активной инфекции, (f) гемодинамической нестабильности и (g) дисфункции органов.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек, как раскрыто в данном документе, может получать несколько доз Т-клеток с CAR к CD70 (например, клеток CTX130, как раскрыто в данном документе), т. е. подвергаться повторному введению доз. Всего пациент-человек может получать не более трех доз (т. е. повторное введение доз, осуществляемое не более чем 2 раза). Интервал между двумя последовательными дозами может составлять от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет. В некоторых примерах пациенту-человеку может осуществляться повторное введение доз, если у пациента произошло достижение частичного ответа (PR) или полного ответа (CR) после первой дозы (или второй дозы) и впоследствии наблюдалось прогрессирование в течение 2 лет после последней дозы. В других примерах пациенту-человеку можно повторно вводить дозу, в случае если у пациента произошло достижение PR (но не CR) или стабильного заболевания (SD) после самой последней дозы.

В некоторых случаях повторное введение доз Т-клеток с CAR к CD70 может осуществляться через не более 12 недель после введения первой дозы Т-клеток с CAR к CD70. Пациенту-человеку можно повторно вводить дозу до не более двух раз в течение 12 недель. Если пациенту вводятся две дозы, вторую дозу можно вводить через 3-6 недель или 9-12 недель после введения первой дозы. Если пациенту вводятся три дозы, третью дозу можно вводить через 9-12 недель после введения первой дозы и вторую дозу можно вводить через 3-6 недель после введения первой дозы.

После каждого введения дозы Т-клеток с CAR к CD70 пациента-человека можно подвергать мониторингу в отношении видов острой токсичности, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS), синдром лизиса опухоли (TLS), нейротоксичность, реакция "трансплантат против хозяина" (GvHD), и/или видов внеопухолевой токсичности, специфической в отношении мишени (например, вследствие активности Т-клеток с CAR к CD70 в отношении активированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток, остеобластов и/или эпителия, подобного эпителию почечных канальцев), и/или неконтролируемой пролиферации Т-клеток. Кроме того, можно подвергать мониторингу один или несколько из следующих нежелательных эффектов: гипотензию, почечную недостаточность (которая может быть вызвана, например, супрессией клеток эпителия, подобных клеткам почечных канальцев), гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), виды длительной цитопении и/или супрессию остеобластов. После каждой дозы Т-клеток с CAR к CD70 пациента-человека можно подвергать мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней в отношении развития токсичности. Если наблюдается развитие токсичности, то

для пациента-человека может предусматриваться контроль 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, можно вводить антицитокиновое терапевтическое средство для стимуляции пролиферации Т-клеток с CAR к CD70.

Способы лечения с применением Т-клеток с CAR к CD70, описанные в данном документе, можно использовать у пациента-человека, который подвергался предшествующей противораковой терапии, такой как предшествующая терапия с применением Т-клеток с CAR к CD19, предшествующая системная терапия первой линии, предшествующая комбинированная терапия или предшествующая терапия с применением могамулизумаба.

Способы лечения с использованием Т-клеток с CAR к CD70, описанные в данном документе, также можно применять в видах комбинированной терапии. Например, способы лечения с применением Т-клеток с CAR к CD70, описанные в данном документе, можно использовать совместно с другими терапевтическими средствами для лечения Т-клеточного или 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 лечения злокачественных новообразований из гемопоэтических клеток

Настоящее изобретение также предусматривает наборы для применения популяции Т-клеток с CAR к CD70, таких как клетки CTX130, описанные в данном документе, в способах лечения злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток, например, Т-клеточного злокачественного новообразования, В-клеточного злокачественного новообразования или злокачественного новообразования из миелоидных клеток. Такие наборы могут содержать один или несколько контейнеров, содержащих первую фармацевтическую композицию, которая содержит одно или несколько лимфоплецирующих 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.

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 CD70, таких как клетки СТХ130, 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. На этикетке или листке-вкладыше указывается, что популяция генетически сконструированных Т-клеток используется для лечения, задержки начала и/или облегчения злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток (например, Т-клеточного, В-клеточного злокачественного новообразования или злокачественного новообразования из миелоидных клеток) 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 CD70, таких как клетки СТХ130, 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 содержащее наборы, 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 B. 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.

ПРИМЕРЫ

Для более полного понимания описанного изобретения представлены следующие примеры. Примеры, описанные в настоящей заявке, предоставлены для иллюстрации способов и композиций, представленных в данном документе, и никоим образом не должны быть истолкованы как ограничивающие его объем.

Пример 1. Получение Т-клеток с нокаутами нескольких генов

В данном примере описано применение технологии редактирования генов CRISPR/Cas9 для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия двух или трех генов одновременно. В частности, ген Т-клеточного рецептора (TCR) (генетически отредактированный в константной области TCR альфа (TRAC)), ген $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2M$) и ген кластера дифференцировки 70 (CD70) редактировали с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9 с получением Т-клеток, дефицитных по двум или более из перечисленных генов. Для краткости и ясности используются следующие сокращения:

2X KO: TRAC⁻/ $\beta 2M$ ⁻;

3X KO (CD70): TRAC⁻/ $\beta 2M$ ⁻/CD70⁻.

Активированные первичные Т-клетки человека электропорировали с помощью комплексов RNP Cas9:gRNA. Смесь для нуклеофекции содержала раствор Nucleofector™, 5×10^6 клеток, 1 мкМ Cas9 и 5 мкМ gRNA (как описано в Hendel *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2015; 33(9):985-989, PMID: 26121415). Для получения Т-клеток с нокаутом по двум генам (2X KO) клетки электропорировали с помощью двух разных комплексов RNP, каждый из

которых содержал белок Cas9 и одну из следующих sgRNA: TRAC (SEQ ID NO: 6) и β 2M (SEQ ID NO: 10) при концентрациях, указанных выше. Для получения Т-клеток с нокаутом по трем генам (3X KO) клетки электропорировали с помощью трех разных комплексов RNP, при этом каждый комплекс РНК содержал белок Cas и одну из следующих sgRNA: (a) TRAC (SEQ ID NO: 6), β 2M (SEQ ID NO: 10) и CD70 (SEQ ID NO: 2 или 66). Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 3, 7, 11 и/или 67). См. также последовательности в **таблице 6**.

Таблица 6. Последовательности gRNA/целевые последовательности

Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA для TRAC	AGAGCAACAGUGCUG UGGCCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaaggcuagu ccguuaucaacuugaaaaagugg caccgagucggugcUUUU (SEQ ID NO: 7)	A*G*A*GCAACAGUGCUGU GGCCguuuuagagcuagaaaauagca aguuaaaauaaggcuaguccguuauca acuugaaaaaguggcaccgagucggug cU*U*U*U (SEQ ID NO: 6)
Спейсер sgRNA для TRAC	AGAGCAACAGUGCUG UGGCC (SEQ ID NO: 9)	A*G*A*GCAACAGUGCUGU GGCC (SEQ ID NO: 8)
sgRNA для β 2M	GCUACUCUCUCUUUCU GGCCguuuuagagcuagaaa agcaaguuaaaauaaggcuagucc guuaucaacuugaaaaaguggca ccgagucggugcUUUU (SEQ ID NO: 11)	G*C*U*ACUCUCUCUUUCU GGCCguuuuagagcuagaaaauagca aguuaaaauaaggcuaguccguuauca acuugaaaaaguggcaccgagucggug cU*U*U*U (SEQ ID NO: 10)
Спейсер sgRNA для β 2M	GCUACUCUCUCUUUCU GGCC (SEQ ID NO: 13)	G*C*U*ACUCUCUCUUUCU GGCC (SEQ ID NO: 12)
sgRNA для CD70; также называется Т7	GCUUUGGUCCCAUUG GUCGCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaaggcuagu ccguuaucaacuugaaaaagugg caccgagucggugcUUUU (SEQ ID NO: 3)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGG UCGCguuuuagagcuagaaaauagca aguuaaaauaaggcuaguccguuauca acuugaaaaaguggcaccgagucggug cU*U*U*U (SEQ ID NO: 2)
Спейсер sgRNA для CD70; также называется Т7	GCUUUGGUCCCAUUG GUCGC (SEQ ID NO: 5)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGG UCGC (SEQ ID NO: 4)
sgRNA для CD70; также называется Т8	GCCCGCAGGACGCACC CAUAguuuuagagcuagaaa	G*C*C*CGCAGGACGCACC CAUAguuuuagagcuagaaaauagca

```

agcaaguuaaaauaaggcuagucc  aguuaaaauaaggcuaguccguuauca
guuaucaacuugaaaaaguggca  acuugaaaaaguggcaccgagucggug
ccgagucggugcUUUU          cU*U*U*U (SEQ ID NO: 66)
(SEQ ID NO: 67)

```

Спейсер sgRNA для CD70; GCCCGCAGGACGCACC G*C*C*CGCAGGACGCACC
также называется T8 CAUA (SEQ ID NO: 69) CAUA (SEQ ID NO: 68)

Через приблизительно одну (1) неделю после электропорации клетки либо оставляли необработанными, либо обрабатывали с использованием форболмиристатацетата (PMA)/иономицина в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии (см., например, Kalaitzidis D et al., J Clin Invest 2017; 127(4): 1405-1413) для оценки уровней экспрессии TRAC, β 2M и CD70 на клеточной поверхности клеток из популяции отредактированных клеток. Использовали следующие первичные антитела (таблица 7).

Таблица 7. Антитела

Антитело	Клон	Флуоресцентный краситель	№ по каталогу	Разведение	На 1
TCR	BW242/412	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100	1 мкл
β 2M	2M2	PE-Cy7	316318 (Biolegend)	1:100	1 мкл
CD70	113-16	FITC	355105 (Biolegend)	1:100	1 мкл

В таблице 8 показано высокоэффективное редактирование нескольких генов. Для клеток с тройным нокаутом у 80% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR, β 2M и CD70 (таблица 8).

Таблица 8. Процент жизнеспособных клеток с отсутствующей экспрессией в популяциях клеток с ЗКО

	TRAC KO	β 2M KO	CD70 KO	ЗКО
ЗКО (CD70)	99%	79%	99%	80%

Чтобы оценить, влияет ли редактирование трех генов в Т-клетках на увеличение количества клеток, подсчитывали количества клеток среди Т-клеток с двумя и тремя отредактированными генами (неотредактированные Т-клетки использовали в качестве контроля) в течение двухнедельного периода времени после редактирования. Для каждого генотипа Т-клеток получали и высевали 5×10^6 клеток.

Пролиферация клеток (увеличение количества) продолжалась на протяжении периода теста после электропорации. Подобную клеточную пролиферацию наблюдали среди Т-клеток с нокаутом по двум (β 2M-/TRAC-) и трем (β 2M-/TRAC-/CD70-) генам, на

что указывало число жизнеспособных клеток (данные не показаны). Эти данные свидетельствуют о том, что редактирование нескольких генов не влияет на здоровое состояние Т-клеток, как измерено по пролиферации Т-клеток.

Пример 2. Получение Т-клеток с CAR к CD70 с несколькими нокаутами

В данном примере описывается получение аллогенных Т-клеток человека, в которых отсутствовала экспрессия гена *TCR*, гена $\beta 2M$ и/или гена *CD70* и экспрессируется химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающийся на CD70. Эти клетки обозначены как TCR⁻/ $\beta 2M$ /CD70⁻/CAR⁺ к CD70 или 3 х KO (CD70) CAR⁺ к CD70.

Аденовирусный вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 6 (AAV6) (MOI 50000), содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 43 (содержащую донорную матрицу под SEQ ID NO: 44, кодирующую CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46) доставляли с помощью RNP Cas9:sgRNA (1 мкМ Cas9, 5 мкМ gRNA) в активированные аллогенные Т-клетки человека. Использовали следующие sgRNA для: TRAC (SEQ ID NO: 6), $\beta 2M$ (SEQ ID NO: 10) и CD70 (SEQ ID NO: 2 или 66). Также можно использовать немодифицированные версии (или другие модифицированные версии) gRNA (например, SEQ ID NO: 3, 7, 11 и/или 67). Через приблизительно одну (1) неделю после электропорации клетки обрабатывали для проточной цитометрии с целью оценки уровней экспрессии TRAC, $\beta 2M$ и CD70 на клеточной поверхности клеток из популяции отредактированных клеток. Использовали следующие первичные антитела (таблица 9).

Таблица 9. Антитела

Антитело	Клон	Флуоресцентный краситель	№ по каталогу	Разведение
TCR	BW242/412	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100
$\beta 2M$	2M2	PE-Cy7	316318 (Biolegend)	1:100
CD70	113-16	FITC	355105 (Biolegend)	1:100

Анализ доли Т-клеток. Затем оценивали доли CD4⁺ и CD8⁺ клеток в популяции отредактированных Т-клеток посредством проточной цитометрии с использованием следующих антител (таблица 10).

Таблица 10. Антитела

Антитело	Клон	Флуоресцентный краситель	№ по каталогу	Разведение
CD4	RPA-T4	BV510	300545 (Biolegend)	1:100
CD8	SK1	BV605	344741 (Biolegend)	1:100

Высокой эффективности редактирования генов и экспрессии CAR достигали в популяциях отредактированных Т-клеток с CAR к CD70. Кроме того, редактирование не оказывало отрицательного влияния на популяцию Т-клеток CD4/CD8. На **фиг. 1** показаны высокоэффективное редактирование генов и экспрессия CAR к CD70 в Т-клетке с CAR с

нокаутом по трем генам. У более чем 55% жизнеспособных клеток отсутствовала экспрессия TCR, $\beta 2M$ и CD70, а также экспрессировался CAR к CD70. На **фиг. 2** показано, что нормальные доли подгрупп CD4/CD8 Т-клеток поддерживались среди TRAC-/ $\beta 2M$ -/CD70-/CAR к CD70⁺ клеток, что указывало на то, что такие редактирования нескольких генов не влияют на биологию Т-клетки, как измерено с помощью доли подгрупп CD4/CD8 Т-клеток.

Пример 3. Эффект КО CD70 в отношении клеточной пролиферации Т-клеток с CAR к CD70 *in vitro*

Чтобы дополнительно оценить влияние нарушения гена *CD70* на Т-клетки с CAR, получали Т-клетки с CAR к CD70, как описано в примере 2. В частности, TRAC-/ $\beta 2M$ -/CD70- CAR⁺ к CD70 Т-клетки получали с применением двух различных gRNA (T7 (SEQ ID NO: 2 и T8 (SEQ ID NO: 66)). После электропорации увеличение количества клеток оценивали с помощью подсчета числа Т-клеток с редактированием двух и трех генов в течение двухнедельного периода после редактирования. Для каждого генотипа Т-клеток получали и высевали 5×10^6 клеток. Пролиферацию определяли посредством подсчета количества жизнеспособных клеток. На **фиг. 3** показано, что TRAC-/ $\beta 2M$ -/CD70-/CAR к CD70⁺ Т-клетки с нокаутом по трем генам, полученные либо с T7, либо с T8 gRNA, характеризовались большим увеличением количества клеток по сравнению с TRAC-/ $\beta 2M$ -/CAR к CD70⁺ Т-клетками с нокаутом по двум генам. Эти данные позволяют предположить, что нокаут гена *CD70* дает преимущество Т-клеткам с CAR к CD70⁺ в отношении клеточной пролиферации.

Пример 4. КО CD70 улучшает уничтожение клеток в нескольких типах клеток

Экспрессия CD70 в различных линиях раковых клеток. Относительную экспрессию CD70 измеряли в различных линиях раковых клеток для дальнейшего оценивания способности CAR⁺ к CD70 Т-клеток уничтожать различные типы раковых клеток. Экспрессию CD70 измеряли посредством проточно-цитометрического анализа с применением антитела к CD70 человека, конъюгированного с Alexa Fluor 647 (BioLegend, № по кат. 355115). Линии раковых клеток оценивали в отношении экспрессии CD70 посредством проточно-цитометрического анализа (**таблица 11А, фиг. 4А**) с применением антитела к CD70 человека, конъюгированного с FITC (BioLegend, № по кат. 355105), на **фиг. 4А**. Линии клеток SKOV-3 (яичника), NuT78 (лимфомы), NCI-H1975 (легкого) и Hs-766T (поджелудочной железы) характеризовались уровнями экспрессии CD70, которые были сходны с таковыми или превышали таковые клеток ACHN, но были ниже, чем у клеток A498 (**таблица 22, фиг. 4А**).

При остром миелоидном лейкозе (AML) CD70 может экспрессироваться на высоких уровнях. Экспрессию CD70 измеряли в нескольких линиях клеток острого миелоидного лейкоза посредством проточно-цитометрического анализа: THP-1, MV-4-11, EOL-1, HL-60, Kasumi-1 и KG1. В **таблице 11В** показано, что эти клетки экспрессируют CD70, и все они могут быть нацелены на Т-клетки с CAR к CD70, как продемонстрировано данными об уничтожении клеток, описанными в данном документе.

Таблица 11А. Экспрессия CD70 в линиях раковых клеток

Линия клеток	Тип рака	Относительная экспрессия CD70
A498	Карцинома почки	Высокая
ACHN	Рак почки (клетки получены из метастаза)	От средней до низкой
SK-OV-3	Аденокарцинома яичника	Средняя
NCI-H1975	Аденокарцинома легкого (NSCLC)	Средняя
Calu-1	Карцинома легкого	Низкая
DU 145	Карцинома предстательной железы	Низкая
SNU-1	Карцинома желудка	Высокая
Hs 766T	Карцинома поджелудочной железы	Средняя
MJ	Кожная Т-клеточная лимфома (CTCL)	Высокая
HuT78	Кожная Т-клеточная лимфома (CTCL; синдром Сезари)	От средней до низкой
HuT102	Кожная Т-клеточная лимфома (CTCL)	Средняя
HH	Кожная Т-клеточная лимфома (CTCL)	От средней до низкой
PANC-1	Карцинома поджелудочной железы	Низкая
U937	AML: острый миелоидный лейкоз	Отсутствие экспрессии
K562	Хронический миелогенный лейкоз	Отсутствие экспрессии (отрицательный контроль)

Таблица 11В. Экспрессия CD70 в линиях клеток лейкоза

Иллюстративные линии клеток AML	Экспрессия CD70, определенная посредством проточной цитометрии
THP-1	88,9%
MV-4-11	99,9%
EOL-1	70,1%

HL-60	12,5%
Kasumi-1	19,4%
KG1	14,8%

Уничтожение клеток. Определяли способность CAR+ к CD70 T- клеток селективно уничтожать клетки, экспрессирующие CD70. Разрабатывали анализ посредством проточной цитометрии для тестирования уничтожения суспензионных линий раковых клеток (например, раковых клеток K562, MM.1S, HuT78 и MJ, которые называются "целевыми клетками") 3X KO (CD70) (TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻) CAR+ к CD70 T-клетками. Три из использованных линий целевых клеток представляли собой CD70-экспрессирующие раковые клетки (например, MM.1S, HuT78 и MJ), тогда как у третьей, клетки которой использовали в качестве раковых клеток отрицательного контроля, экспрессия CD70 отсутствовала (например, K562). TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻/CAR+ к CD70 T-клетки совместно культивировали либо с CD70-экспрессирующими линиями клеток MM.1S, HuT78 или MJ, либо с CD70-отрицательной линией клеток K562. Целевые клетки метили с помощью 5 мкМ eFluor670 (eBiosciences), промывали и высевали при плотности 50000 целевых клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Целевые клетки совместно культивировали с TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻ CAR+ к CD70 T-клетками при варьирующих соотношениях (0,5:1, 1:1, 2:1 и 4:1 CAR+ T-клеток и целевых клеток) и инкубировали в течение ночи. Уничтожение целевых клеток определяли через 24 часа совместного культивирования. Клетки промывали и в каждую лунку добавляли 200 мкл среды, содержащей 5 мг/мл DAPI при разбавлении 1:500 (Molecular Probes) (для подсчета мертвых/погибающих клеток). Затем клетки анализировали посредством проточной цитометрии и определяли количество оставшихся живых целевых клеток.

На **фиг. 4В, фиг. 4С, фиг. 4D и фиг. 4Е** продемонстрировано селективное уничтожение целевых клеток TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻ CAR+ к CD70 T-клетками (например, CTX130). 24-часовое совместное культивирование с 3X KO (CD70) CAR+ T-клетками приводило к почти полному уничтожению клеток Т-клеточной лимфомы (HuT78), даже при низком соотношении CAR+ Т-клеток и CD70-экспрессирующих целевых клеток, составляющем 0,5:1 (**фиг. 4D**). Подобным образом, 24-часовое совместное культивирование приводило к почти полному уничтожению клеток множественной миеломы (MM.1S) при всех тестируемых соотношениях CAR+ Т-клеток и целевых клеток (**фиг. 4С**). Сходным образом, 24-часовое совместное культивирование приводило к эффективному лизису клеток Т-клеточной лимфомы с высокой экспрессией CD70 (MJ) при всех протестированных соотношениях CAR+ Т-клеток и целевых клеток. На **фиг. 4Е** показан лизис клеток по сравнению с клетками Т-клеточной лимфомы с более низким уровнем экспрессии CD70 (HuT78). Было обнаружено, что уничтожение целевых клеток было селективным в том отношении, что TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻/CAR+ к CD70 Т-клетки не индуцировали уничтожение CD70-дефицитных клеток K562, что было выше уровня в контрольных образцах (например, либо раковые клетки отдельно, либо совместное

культивирование с Т-клетками без RNP) при любом тестируемом соотношении эффекторных клеток и целевых клеток (**фиг. 4В**). На **фиг. 4F-4К** продемонстрировано, что TRAC-/β2M-/CD70- CAR+ к CD70 Т-клетки (например, CTX130) способны эффективно уничтожать различные CD70-экспрессирующие линии клеток AML. В частности, совместное 24-часовое культивирование приводило к эффективному уничтожению различных линий клеток острого миелоидного лейкоза, включая клетки MV411 (**фиг. 4F**), EOL-1 (**фиг. 4G**), HL60 (**фиг. 4H**), Kasumi-1 (**фиг. 4H**), KG1 (**фиг. 4J**) и THP-1 (**фиг. 4K**). Кроме того, данные демонстрируют, что эффект уничтожения Т-клеток с CAR к CD70 в отношении клеток острого миелоидного лейкоза повышается с повышением дозы Т-клеток с CAR к CD70.

Пример 5. Эффективность клеток CTX130: обработка в модели кожного опухолевого трансплантата Т-клеточной лимфомы

Способность Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70, элиминировать Т-клеточную лимфому оценивали *in vivo* с применением модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата Т-клеточной лимфомы (Hu T78 или Hh) у мышей.

CRISPR/Cas9 и AAV6 использовали, как описано выше (см., например, пример 2), с получением CAR+ к CD70 Т-клеток человека, которые не экспрессируют TCR, β2M, CD70 с сопутствующей экспрессией локуса TRAC с применением конструкции CAR, нацеливающейся на CD70 (SEQ ID NO: 46). В данном примере активированные Т-клетки сначала подвергали электропорации с помощью 3 различных RNP-комплексов Cas9:sgRNA, содержащих sgRNA, нацеливающиеся на TRAC (SEQ ID NO: 6), β2M (SEQ ID NO: 10) и CD70 (SEQ ID NO: 2). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC репарируют посредством репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы (SEQ ID NO: 43) (кодирующей CAR к CD70, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 46), содержащей правое и левое плечи гомологии к локусу TRAC, фланкирующие кассету химерного антигенного рецептора (-/+ регуляторные элементы для экспрессии генов).

Полученные модифицированные Т-клетки представляют собой TRAC-/β2M-/CD70- CAR+ к CD70 Т-клетки (CTX130). Способность этих CAR+ к CD70 Т-клеток снижать тяжесть заболевания, вызванного линией CD70+ клеток Т-клеточной лимфомы, оценивали на мышах NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, 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 в течение 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 3×10^6 клеток Т-клеточной лимфомы (HuT78 или Hh) в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли 25-75 мм³ (целевой размер составляет примерно 50 мм³) мышей далее делили на 2 группы обработки, как показано в **таблице 12**. В день 1 группа обработки 2 получала однократную внутривенную дозу 200 мкл CAR+ к CD70 Т-клеток согласно **таблице 12**.

Таблица 12. Группы обработки.

Группа	CAR-T	Опухолевые клетки	Обработка CAR+ Т-клетками (<i>i.v.</i>)	N
1	Отсутствует	3×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5
2	Т-клетки с CAR к CTX130	3×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю с дня начала обработки. Ко дню 12 после инъекции опухоли NuT78, обработанные Т-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать уменьшение объема у 4 из 5 обработанных мышей (фиг. 5А). В дальнейшем опухоли элиминировались ко дню 30 и до конца исследования (фиг. 5А). Рост опухоли NuT78 значительно подавлялся в течение 90-дневного периода исследования (фиг. 5А). Обработка CAR+ к CD70 Т-клетками эффективно замедляла рост опухолей Т-клеточной лимфомы Нh у всех мышей, протестированных в течение 45-дневного периода времени (фиг. 5В).

Эти данные демонстрируют, что CAR+ к CD70 клетки (CTX130) подавляли рост опухолей CD70+ Т-клеточной лимфомы человека *in vivo* с большей активностью в отношении прижившихся ксенотрансплантатов NuT78 и Нh Т-клеточной лимфомы.

Пример 6. Открытое многоцентровое исследование фазы 1 безопасности и эффективности аллогенных сконструированных посредством CRISPR-Cas9 Т-клеток (CTX130) у взрослых субъектов с Т-клеточными или В-клеточными злокачественными новообразованиями, предусматривающее повышение дозы и расширение когорт.

CTX130 представляет собой средство иммунотерапии на основе CD70-направленных Т-клеток, состоящее из аллогенных Т-клеток, которые генетически модифицированы *ex vivo* с применением компонентов (одиночные направляющие РНК [sgRNA] и нуклеаза Cas9) системы редактирования генов CRISPR-Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9). Модификации включали целенаправленное нарушение в локусах константной области альфа-цепи Т-клеточного рецептора (TRAC), бета-2-микроглобулина (B2M) и CD70, а также вставку трансгена химерного антигенного рецептора к CD70 (CAR) в локус TRAC посредством кассеты экспрессии на основе аденоассоциированного вируса (AAV). CAR к CD70 (SEQ ID NO: 46) состоит из одноцепочечного варибельного фрагмента к CD70 (SEQ ID NO: 48), полученного из ранее охарактеризованной гибридомы IF6, продуцирующей антитела к CD70, трансмембранного домена CD8 (SEQ ID NO: 54, костимулирующего домена 4-1BB (SEQ ID NO: 57) и сигнального домена CD3 ζ (SEQ ID NO: 61).

В данном исследовании соответствующие требованиям пациенты-люди получают внутривенную (IV) инфузию CTX130 после лимфодеплецирующей (LD) химиотерапии.

1. ИССЛЕДУЕМАЯ ПОПУЛЯЦИЯ

Повышение дозы (часть А) предусматривает взрослых субъектов со следующими рецидивирующими/рефрактерными Т-клеточными или В-клеточными злокачественными новообразованиями: (а) периферической Т-клеточной лимфомой, неуточненной (PTCL-NOS), (b) анапластической крупноклеточной лимфомой (ALCL), (с) синдромом Сезари (SS), включая фунгоидный микоз (MF), (d) Т-клеточным лейкозом /лимфомой взрослых (ATLL), лейкозными и лимфоматозными подтипами, (е) ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой (AITL) и (f) диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL). Расширение когорт (часть В) предусматривает субъектов с DLBCL и такими же критериями включения и исключения для включения в часть А, а также субъектов с описанными в данном документе Т-клеточными лимфомами.

Субъекты, подлежащие лечению в данном исследовании, могут также предусматривать субъектов с Т- или В-клеточными лимфомами, например, CTCL (включая фунгоидный микоз стадии Ib и выше, включая трансформацию в крупноклеточную лимфому, синдром Сезари); PTCL: AITL, ALCL (Alk-положительную и Alk-отрицательную), ATLL, за исключением вялотекущего подтипа, и PTCL-NOS) и DLBCL после того, как CD19-направленная терапия с применением аутологичных Т-клеток с CAR была неэффективной.

2. ЦЕЛЬ И ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью исследования фазы 1 с повышением дозы является оценка безопасности и эффективности аллогенных сконструированных посредством CRISPR-Cas9 Т-клеток к CD70 (клеток CTX130) у субъектов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями.

Существует неудовлетворенная медицинская потребность в субъектах с выбранными и описанными Т- или В-клеточными лимфомами (например, лимфомами, раскрытыми в данном документе). Сообщалось, что выбранные Т- или В-клеточные злокачественные новообразования характеризуются высокой экспрессией CD70 и следовательно являются потенциальной мишенью для способов терапии, направленных на Т-клетки с CAR (Baba et al., (2008) *J Virol* 82 3843-52; Lens et al., (1999) *Br J Hematol* 106, 491-503; McEarchern et al., (2007) *Blood* 109, 1185-92; Shaffer et al., (2011) *Blood* 117, 4304-14).

Хотя терапия с применением Т-клеток с CAR приводила к большому клиническому успеху, одобренные продукты являются аутологичными и требуют сбора и получения клеток для конкретного пациента. Эти проблемы привели к тому, что значительная часть (примерно 30% в 1 исследовании) включенных в исследование субъектов никогда не получали продукт на основе аутологичных Т-клеток с CAR (Schuster et al., (2019) *N Engl J Med* 380, 45-56). Кроме того, гетерогенная природа каждого аутологичного продукта затрудняла демонстрацию корреляции между дозой Т-клеток с CAR, токсичностью и/или ответом для большинства изученных признаков заболевания (Mueller et al., (2017) *Blood* 130, 2317-2325). Недавние данные свидетельствуют о том, что исходный материал, в частности иммунофенотип выделенных Т-клеток, может оказывать влияние на ответ на

лечение при заболевании (Fraietta et al., (2018) *Nat Med* 24, 563-71). Эти результаты подтверждают преимущество аллогенного подхода лечения с применением Т-клеток с CAR для тех пациентов, которые нуждаются в неотложной циторедуктивной терапии.

CTX130 получают из Т-клеток здоровых доноров, что должно приводить к постоянной экспрессии CAR и иммунофенотипам при осуществлении способов получения. Кроме того, процесс получения, инициированный из клеток здоровых доноров, значительно снижает риск непреднамеренной трансдукции злокачественных Т-клеток в ходе лечения. Недавно зарегистрированный случай рецидива ALL у субъекта со злокачественными В-клетками при трансдукции Т-клетками с CAR дополнительно подчеркивает этот потенциальный риск лентивирусного подхода, при котором вставка CAR не связана с нарушенным TCR (Ruella et al., (2018) *Nat Med* 24, 1499-503). Отдельные неудачи при получении от субъектов, сложности планирования, токсичность, ассоциированная с промежуточной химиотерапией, и риски лейкафереза для субъекта не относятся к продуктам на основе аллогенных Т-клеток с CAR. Возможность немедленного введения CTX130 позволяет субъектам своевременно получать продукт и помогает субъектам избежать необходимости в промежуточной химиотерапии.

Аутологичные Т-клетки с CAR, полученные от пациентов с прогрессирующими рецидивирующими злокачественными новообразованиями, могут быть склонны к раннему истощению (Fraietta et al., (2018) *Nat Med* 24, 563-71; Mackall, (2019) Cancer Research, AACR annual meeting, Abstract PL01-05; Riches et al., (2013) *Blood* 121, 1612-21). Применение Т-лимфоцитов здоровых доноров в качестве основы для многократного редактирования аллогенных Т-клеток с CAR становится возможным благодаря высокоточному инструменту для редактирования CRISPR-Cas9.

4 стадии редактирования, примененные к CTX130, обеспечивают безопасность и эффективность следующим образом.

□ **Безопасность.** Делеция локуса TRAC для нарушения эндогенного TCR и его взаимодействий с системой МНС хозяина для супрессии реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD).

□ **Активность Т-клеток.** Вставка конструкции CAR, нацеливающейся на CD70, делеция локуса B2M и делеция локуса CD70.

CRISPR-Cas9 позволяет сочетать введение конструкции CAR в качестве локуса, подвергаемого делеции 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 других общеизвестных способов трансдукции, таких как лентивирусная и ретровирусная трансдукция. Вставка гена CAR в локус TRAC приводит к элиминации TCR почти во всех клетках, экспрессирующих CAR. В то время как CRISPR-Cas9-опосредованное нарушение эндогенного TCR может значительно снижать или элиминировать риск GvHD, предполагается, что нарушение генов, кодирующих белки МНС класса I, повышает персистенцию Т-клеток с CAR. Делеция локуса CD70

предназначена для повышения персистенности CTX130 и для снижения потенциального тесного связывания за счет повышенной экспрессии на активированных Т-клетках с CAR.

3. ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичная цель, часть А (повышение дозы): оценить безопасность повышения доз CTX130 у субъектов с рецидивирующими/рефрактерными Т- или В-клеточными злокачественными новообразованиями и определить рекомендуемую дозу для части В (RPBD).

Первичная цель, часть В (расширение когорт): оценить эффективность CTX130 у субъектов с DLBCL (например, тех, у которых CD19-направленная терапия с применением аутологичных Т-клеток с CAR ранее была неэффективной), а также при других типах Т-клеточной лимфомы, раскрытых выше, как измерено посредством частоты объективного ответа (ORR) согласно критериям ответа Лугано (Cheson et al., (2014) *J Clin Oncol* 32, 3059-68).

Вторичные цели (части А и В): оценить активность CTX130, включая время до ответа (TTR), продолжительность ответа (DoR), выживаемость без прогрессирования (PFS), общую выживаемость (OS), частоту контроля заболевания (DCR), время до прогрессирования (TTP) с течением времени; описать и оценить нежелательные явления (AE), представляющие интерес, включая синдром высвобождения цитокинов (CRS) и реакцию "трансплантат против хозяина" (GvHD), и определить характеристики фармакокинетики (размножение и персистенность) CTX130 в крови.

Цели исследования (части А и В): идентифицировать геномные, метаболические и/или протеомные биомаркеры, которые ассоциированы с заболеванием, клиническим ответом, устойчивостью или безопасностью; определить характеристики фармакодинамической активности, потенциально связанной с клиническим ответом; дополнительно описать кинетику эффективности CTX130 и описать эффект CTX130 в отношении исходов, сообщаемых пациентами (PRO).

4. СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИЕ

4.1 Критерии включения

Для того, чтобы считаться соответствующим критериям включения для участия в данном исследовании субъект должен соответствовать всем критериям включения, перечисленным ниже:

1. Возраст, превышающий или равный 18 годам, и вес тела, превышающий или равный 60 кг.

2. Способность понимать и соблюдать требуемые согласно протоколу процедуры исследования и добровольно подписывать документ о письменном информированном согласии.

3. Что касается субъектов с Т-клеточной лимфомой, то в исследование включаются только субъекты со следующими признаками:

☐ подтвержденный диагноз Т-клеточного злокачественного новообразования,

включая следующие подгруппы:

- a) PTCL-NOS,
- b) ALCL,
- c) SS, включая MF стадии IIВ или больше (например, которым может требоваться трансплантация),
- d) лейкозные и лимфоматозные подтипы ATLL,
- e) ангиоиммуобластная Т-клеточная лимфома (AITL). В некоторых случаях субъекты, которые характеризовались каким-либо выпотом до или во время периода скрининга, могли быть исключены.

☐ У субъектов с PTCL-NOS, ATLL или AITL должны были быть неэффективными 1 или больше линий системной терапии.

☐ У субъектов с ALCL комбинированная химиотерапия и/или терапия с применением брентуксимаба ведотина в комбинации или в виде единственного средства должны были быть неэффективными, субъекты должны быть неподходящими для них или должны отказаться от них.

o У субъектов с анапластической киназа-отрицательной лимфомой (ALK⁻) ALCL одна предшествующая линия терапии должна была быть неэффективной.

o У субъектов с анапластической киназа-положительной лимфомой (ALK⁺) ALCL 2 предшествующие линии терапии должны были быть неэффективными.

☐ У субъектов с фунгоидным микозом (MF) или синдромом Сезари (SS) должны были быть неэффективными по меньшей мере 2 из следующих видов системной терапии: брентуксимаб ведотин, ромидеписин (или другие назначенные ингибиторы гистондеацетилаз [HDAC]), пралатрексат, могамулизумаб или химиотерапия. Если могамулизумаб был последним терапевтическим средством перед включением в исследование, то между введением последней дозы могамулизумаба и инфузией CTX130 должно пройти по меньшей мере 3 месяца.

4. Для субъектов с В-клеточной лимфомой: DLBCL у субъектов, которые являются подходящими для терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR к CD19, однако попытка лечения была неудачной.

5. Субъекты должны иметь CD70-экспрессирующие опухоли, определенные в лабораториях, соответствующих применимым местным требованиям (например, Поправкам к программам усовершенствования клинических лабораторных исследований [CLIA] или эквивалентным для регионов за пределами США), включая любую из:

☐ CD70-положительной (10% клеток или больше) по результатам иммуногистохимического анализа (ИHC) ткани, собранной посредством эксцизионной биопсии или трепан-биопсии репрезентативного опухолевого очага.

☐ CD70-положительной (10% клеток или больше) по результатам проточной цитометрии опухолевых клеток, определенных посредством иммунофенотипирования, собранных в периферической крови или костном мозге при скрининге.

6. Субъекты должны быть готовы предоставить ткань, недавно полученную из

опухолевого очага посредством трепан-биопсии или эксцизионной биопсии при скрининге, если недоступны результаты биопсии, выполненной в течение 3 месяцев до включения в исследование и после последней системной или таргетной терапии после прогрессирования.

7. Функциональный статус 0-1 согласно Восточной объединенной онкологической группе (см. **таблицу 13**).

8. Соответствие критериям прохождения LD-химиотерапии и инфузии Т-клеток с CAR, описанным в данном документе.

9. Нормальная функция органов:

☐ Почки: клиренс креатинина (CrCl) 50 мл/мин или больше.

☐ Печень:

о уровень аспартатаминотрансферазы (AST) или аланинаминотрансферазы (ALT) меньше 3 x верхнего предела нормы (ULN).

о Уровень общего билирубина меньше 2 x ULN (при синдроме Жильбера: уровень общего билирубина меньше 3 мг/дл и нормальный уровень конъюгированного билирубина).

☐ Сердце: гемодинамическая стабильность и фракция выброса левого желудочка (LVEF), большая или равная 45%, согласно данным эхокардиограммы.

☐ Легкие: уровень насыщения кислородом из воздуха в помещении больше 92% по данным пульсоксиметрии.

☐ Гематологические характеристики: количество тромбоцитов больше 25000/мм³ и абсолютное количество нейтрофилов больше 500/мм³.

10. Пациенты-женщины с детородным потенциалом (в постменархеальном периоде с интактной маткой и по меньшей мере 1 яичником, а также находящиеся менее 1 года в постменопаузе) должны дать согласие на применение приемлемого способа высокоэффективной контрацепции с момента включения в исследование и на протяжении по меньшей мере 12 месяцев после инфузии CTX130.

11. Пациенты мужского пола должны дать согласие на применение приемлемых высокоэффективных способов контрацепции с момента включения в исследование и на протяжении по меньшей мере 12 месяцев после инфузии CTX130.

Таблица 13. Оценка функционального статуса пациента по шкале ECOG.

Степень	Описание
0	Полностью активен, способен к повседневной деятельности на уровне до заболевания без ограничения
1	Ограничен в физически напряженной активности, однако является амбулаторным пациентом и способен выполнять легкую или сидячую работу, например, легкую работу по дому, работу в офисе
2	Является амбулаторным пациентом и способен к уходу за собой, однако не способен заниматься какими-либо активностями; бодрствует и время

- бодрствования составляет более чем приблизительно 50%
- 3 Способен лишь к ограниченному уходу за собой; прикован к постели или креслу на протяжении более чем 50% часов бодрствования
 - 4 Полностью недееспособен; не может осуществлять уход за собой; полностью прикован к постели или креслу
 - 5 Умерший

Разработано Восточной объединенной онкологической группой, Robert L. Comis, MD, Group Chair (Oken et al., (1982) *Am J Clin Oncol*, 5, 649-655).

4.2 Критерии исключения

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

1. Предшествующая трансплантация аллогенных стволовых клеток (SCT).
2. Менее 60 дней после аутологичной SCT во время скрининга и с неразрешенными серьезными осложнениями.
3. Предшествующее лечение с применением средств, нацеливающихся на CD70.
4. Для субъектов с DLBCL предшествующее лечение с применением Т-клеток с CAR или других модифицированных Т-клеток или естественных клеток-киллеров (NK), за исключением аутологичных Т-клеток с CAR к CD19.
5. Известное противопоказание к применению любого(любых) средства(средств) LD-химиотерапии или любого из вспомогательных веществ продукта на основе CTX130.
6. Т-клеточные или В-клеточные лимфомы со злокачественным выпотом в настоящем или прошлом, который является симптоматическим или был симптоматическим.
7. Клинические признаки гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH): комбинация лихорадки, бицитопении, гипертриглицеридемии или гипофибриногенемии и уровня ферритина больше 500 мкг/л.
8. Активное проявление основного заболевания центральной нервной системы (ЦНС) по результатам визуализации при скрининге.
9. Наличие в анамнезе или присутствие клинически значимой патологии центральной нервной системы, такой как судорожный припадок, инсульт, повреждение головного мозга тяжелой степени, заболевание мозжечка, миелопатия (например, тропический спастический парапарез), синдром обратимой задней энцефалопатии (PRES) в анамнезе с предшествующей терапией или другое состояние, которое может усилить виды токсичности, связанной с Т-клетками с CAR.
10. Нестабильная стенокардия, аритмия или инфаркт миокарда в течение 6 месяцев до скрининга.
11. Неконтролируемая острая опасная для жизни бактериальная, вирусная или грибковая инфекция.
12. Положительный результат на наличие вируса иммунодефицита человека 1 или 2

типа (HIV-1 или HIV-2) или активной инфекции, вызванной вирусом гепатита В или вирусом гепатита С. Допускаются субъекты с предшествующей инфекцией, вызванной вирусами гепатита В или С, в анамнезе, у которых документально подтверждена не выявляемая вирусная нагрузка (посредством количественной полимеразной цепной реакции или тестирования на нуклеиновые кислоты).

13. Предшествующее или сопутствующее злокачественное новообразование, за исключением субъектов, подвергавшихся лечению посредством подхода, направленного на излечение тех, у кого была ремиссия в течение более чем 12 месяцев, без необходимости применения системной терапии (одобрено применение антигормональной терапии).

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

15. Предшествующая трансплантация солидных органов.

16. Предшествующее применение противоопухолевых средств, включая лучевую терапию, в течение 14 дней до включения в исследование. Для исследуемых средств время вымывания необходимо обсудить с медицинским наблюдателем. Применение физиологических доз стероидов разрешено для субъектов, ранее принимавших стероиды. Интратекальная профилактика для субъектов с ATLL разрешена, если она назначена. Субъекты с ATLL, получающие ингибитор RANKL деносумаб, должны проходить терапию в течение по меньшей мере 4 недель и должны характеризоваться стабилизированными скорректированными уровнями кальция в сыворотке крови, и субъекты исключаются, если уровень кальция в сыворотке крови составляет больше 11,5 мг/дл или больше 2,9 ммоль/л, или уровень ионизированного кальция составляет больше 1,5 ммоль/л. Применение антител, направленных на CCR-4, таких как могамулизумаб, запрещается за 3 месяца до инфузии CTX130.

17. Диагноз значительного психического расстройства, которое может серьезно помешать возможности пациента участвовать в исследовании.

18. Получали живые вакцины или лекарственные препараты растительного происхождения, предусматриваемые в рамках традиционной китайской медицины, или средства лечения растительного происхождения, не являющиеся отпускаемыми без рецепта, в течение 28 дней до включения в исследование.

19. Беременные или кормящие женщины.

5. СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1 План исследования

Это открытое многокогортное многоцентровое исследование фазы 1 с повышением дозы у субъектов в возрасте 18 лет или больше с рецидивирующими или рефрактерными Т- или В-клеточными злокачественными новообразованиями. Исследование разделено на 2 части: повышение дозы (часть А) с последующим расширением когорт (часть В).

В части А повышение дозы начинается у взрослых субъектов с 1 из следующего:

1. Т-клеточные злокачественные новообразования:

□ У субъектов с PTCL-NOS, лейкозной или лимфоматозной ATLL или AITL должны были быть неэффективными 1 или больше линий системной терапии.

□ У субъектов с ALCL комбинированная химиотерапия и/или терапия с применением брентуксимаба ведотина должны были быть неэффективными, субъекты должны были быть неподходящими для них или должны отказаться от них.

о У субъектов с ALK⁻ ALCL 1 предшествующая линия терапии должна была быть неэффективной.

о У субъектов с ALK⁺ ALCL 2 предшествующие линии терапии должны были быть неэффективными.

□ У субъектов с MF или SS должна была быть неэффективной по меньшей мере 1 предшествующая терапия. У субъектов с SS должна была быть неэффективной предшествующая системная терапия, включая лечение с применением могамулизумаба, если оно назначено. Если могамулизумаб был последним терапевтическим средством перед включением в исследование, то между введением последней дозы могамулизумаба и инфузией CTX130 должен пройти период времени, составляющий по меньшей мере 3 месяца.

2. В-клеточное злокачественное новообразование:

□ DLBCL у субъектов, у которых была неэффективной попытка лечения посредством терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR к CD19.

Повышение дозы осуществляли в соответствии с критериями, описанными в данном документе.

В части В инициируется расширение когорт для дальнейшей оценки безопасности и эффективности CTX130 при RPBД у субъектов с DLBCL, у которых была неэффективной предыдущая попытка лечения с применением аутологичных Т-клеток с CAR к CD19. Субъекты с DLBCL включаются в часть В согласно тем же критериям включения и исключения, которые необходимы для включения в часть А. Это расширение предназначено для отклонения ORR, составляющей менее чем 18%, у пациентов после терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR к CD19.

5.1.1 Схема исследования

Исследование разделено на 2 части: повышение дозы (часть А) с последующим расширением когорт (часть В). Обе части исследования состоят из 3 основных стадий: скрининг, лечение и последующее наблюдение. Схематическое изображение схемы исследования показано на **фиг. 6**.

3 основных стадии исследования являются следующими.

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

Стадия 2 - лечение.

Стадия 2А - LD-химиотерапия: совместное введение 30 мг/м² флударабина и 500 мг/м² циклофосфида IV один раз в день в течение 3 дней. Оба средства начинают применять в один и тот же день и вводят в течение 3 последовательных дней. LD-

химиотерапия должна быть завершена за по меньшей мере 48 часов (но не более чем 7 дней) до инфузии CTX130.

Стадия 2В - инфузия CTX130: вводили через по меньшей мере 48 часов (но не более чем 7 дней) после завершения 3-дневного курса LD-химиотерапии.

Соответствие требованиям клинического исследования - соответствие субъектов требованиям клинического исследования должно быть повторно подтверждено согласно критериям, предусмотренным в данном документе, до начала LD-химиотерапии и инфузии CTX130.

Стадия 3 - последующее наблюдение (5 лет после последней инфузии CTX130)

В течение периода после инфузии CTX130 субъекты подвергаются мониторингу в отношении видов острой токсичности (дни 1-28), включая CRS, нейротоксичность, GvHD и другие АЕ. Рекомендации по контролю токсичности описаны в данном документе. В ходе части А (повышения дозы) все субъекты госпитализируются в течение первых 7 дней после инфузии CTX130 или дольше, если этого требует местное законодательство или практика исследовательского центра. Как в рамках части А, так и в рамках части В субъекты должны оставаться в непосредственной близости от исследовательского центра (т. е. в пределах 1-часового периода переезда) в течение 28 дней после инфузии CTX130.

После периода наблюдения в отношении острой токсичности субъекты подвергаются последующему наблюдению в течение до 5 лет после инфузии CTX130 с физикальными осмотрами, регулярными лабораторными оценками и оценками посредством визуализации, а также оценками АЕ. После завершения данного исследования субъекты должны участвовать в отдельном долгосрочном исследовании с последующим наблюдением в течение дополнительных 10 лет для оценки долгосрочной безопасности и выживаемости.

5.2 Повышение дозы CTX130

Клетки CTX130 вводятся IV с применением схемы равномерного введения дозы на основании количества CAR⁺ Т-клеток. Уровни доз, оцененные в данном исследовании, представлены в **таблице 14**. Предел дозы, составляющий 1×10^5 TCR⁺ клеток/кг, может быть установлен для всех уровней доз.

Таблица 14. Повышение дозы CTX130

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

Повышение дозы осуществляется с применением стандартной схемы 3+3, согласно которой от 3 до 6 субъектов включаются в исследование для каждого уровня дозы в зависимости от возникновения видов дозолимитирующей токсичности (DLT), как

определено в данном документе.

Повышение дозы осуществляют в соответствии со следующими правилами:

☐ Если 0 из 3 субъектов испытывают DLT, то осуществляют повышение до следующего уровня дозы.

☐ Если 1 из 3 субъектов испытывает DLT, то количество получающих текущий уровень дозы расширяют до 6 субъектов.

о Если 1 из 6 субъектов испытывает DLT, то уровень дозы повышают до следующего.

о Если большее или равное 2 количество из 6 субъектов испытывает DLT, то:

☐ при уровне дозы -1 проводят оценку альтернативной схемы введения дозы или заявляют о невозможности определить рекомендуемую дозу для расширения когорты в рамках части В;

☐ при уровне дозы 1 проводят его уменьшение до уровня дозы -1;

☐ Если уровень дозы составляет 2-4, то предыдущий уровень дозы признается максимальной переносимой дозой (MTD).

☐ Если большее или равное 2 количество из 3 субъектов испытывает DLT, то:

о при уровне дозы -1 проводят оценку альтернативной схемы введения дозы или заявляют о невозможности определить рекомендуемую дозу для расширения когорты в рамках части В;

о при уровне дозы 1 проводят его понижение до уровня дозы -1;

о Если уровень дозы составляет 2-4, то предыдущий уровень дозы признается MTD.

☐ Будет разрешено промежуточное введение доз между DL2 и DL3, например, $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130.

☐ Будет разрешено промежуточное введение доз между DL3 и DL4, например, $4,5 \times 10^8$, 6×10^8 или $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток CTX130.

☐ Никакое повышение дозы не превышает наивысшую дозу, указанную в **таблице 14**.

5.2.1 Определения дозолимитирующей токсичности (DLT)

Период оценки DLT начинается с инфузии CTX130 и длится в течение 28 дней. При всех уровнях дозы (от -1 до 4) субъекты с уровнями доз от 1 до 3 подвергаются лечению поэтапно, таким образом, что субъект получает CTX130 только после того, как предыдущий субъект завершил период оценки DLT (т. е. со смещением на по меньшей мере 28 дней). Введение доз между каждым уровнем дозы также может быть смещено на по меньшей мере 28 дней.

Субъекты должны получать CTX130 с оценкой DLT. Если субъект прерывает участие в исследовании в любое время до инфузии CTX130 по причинам, отличным от токсичности, то субъект не оценивается в отношении DLT, а субъект для его замены включается в исследование с тем же уровнем дозы, который был у субъекта, прервавшего участие в исследовании. Если субъект, оцениваемый в отношении DLT (т. е. субъект, которому вводили CTX130), характеризуется признаками или симптомами потенциальной

DLT, то период оценки DLT может быть продлен, чтобы обеспечить улучшение или разрешение до того, как будет заявлено о DLT.

Виды токсичности оцениваются и документируются согласно Общим терминологическим критериям оценки нежелательных явлений (CTCAE) NCI версии 5.0, за исключением CRS (критерии ASTCT; критерии Американского общества трансплантологии и клеточной терапии; критерии Ли), нейротоксичности (критерии ICANS; критерии оценки синдрома нейротоксичности, ассоциированной с иммунными эффекторными клетками, CTCAE версии 5.0; критерии Ли) и GvHD (критерии MAGIC; критерии Международного консорциума по острой GvHD Mount Sinai; Harris et al., (2016) *Biol Blood Marrow Transplant* 22, 4-10). АЕ, которые не имеют вероятной причинно-следственной связи с CTX130, не рассматриваются в качестве DLT.

Виды DLT определяются как:

A. CRS степени 4

B. GvHD степени 2 или больше, рефрактерная к стероидам (например, прогрессирующее заболевание через 3 дня лечения с применением стероидов [например, 1 мг/кг/день] или отсутствие ответа через 7 дней лечения). GvHD, не рефрактерная к стероидам, и разрешающаяся до степени 1 в течение 14 дней, не должна определяться как DLT (классификация GvHD представлена в **таблице 34**).

C. Нейротоксичность степени 3 или 4 (на основе критериев ICANS).

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

E. Любая гематологическая токсичность степени 4, которая не снижается до степени 2 или меньше в течение 28 дней.

F. Любая возникающая токсичность степени 3 или больше в отношении жизненно важных органов при лечении с применением CTX130 (например, легочная, сердечная) любой продолжительности, не связанная с основным злокачественным новообразованием или его прогрессированием, считается DLT со следующими исключениями.

Исключения

Критерии

№ 1	Любой CRS степени 3 согласно системе оценки CRS (таблица 29), который улучшается до степени 2 или меньше при соответствующем медицинском вмешательстве в течение 72 часов.
№ 2	Лихорадка степени 3 или 4, разрешающаяся в течение 72 часов при соответствующем медицинском вмешательстве.
№ 3	Усталость степени 3 или 4 продолжительностью менее 7 дней.
№ 4	Любые отклоняющиеся от нормы результаты функциональных тестов печени степени 3 или 4, которые улучшаются до степени 2 или меньше в течение 7 дней.

- № 5 Почечная недостаточность степени 3 или 4, которая улучшается до степени 2 или меньше в течение 7 дней.
- № 6 Смерть вследствие прогрессирования заболевания.
Тромбоцитопения или нейтропения степени 3 или 4 оцениваются ретроспективно. После того, как по меньшей мере 6 субъектам осуществили инфузию, если у 50% или более субъектов имелись виды длительной цитопении (т. е. продолжительностью более чем 28 дней после инфузии), повышение дозы приостанавливается до завершения.
- № 7 Виды цитопении степени 3 или больше, которые присутствовали в начале LD-химиотерапии, не могут считаться DLT и идентифицируются как явления другой этиологии.

6. ПРОЦЕДУРЫ, ПРЕДУСМАТРИВАЕМЫЕ ИССЛЕДОВАНИЕМ

Как соответствующая повышению дозы, так и соответствующая расширению части исследования состоят из 3 отдельных стадий: (1) скрининг и подтверждение соответствия требованиям, (2) LD-химиотерапия и инфузия CTX130 и (3) последующее наблюдение. В течение периода скрининга субъектов оценивают в соответствии с критериями соответствия требованиям, описанными в данном документе. После включения в исследование субъекты получают средство LD-химиотерапии с последующей инфузией CTX130. После завершения периода лечения субъекты оцениваются в отношении ответа опухоли на лечение, прогрессирования заболевания и выживаемости. На протяжении всех периодов исследования субъектов подвергали регулярному мониторингу в отношении безопасности.

Полный график оценок представлен в **таблице 15** и **таблице 16**. Пропущенные процедуры оценивания подлежат переносу на другую дату и осуществлению как можно ближе к первоначально запланированной дате. Исключение делается, когда перенос на другую дату, по мнению лечащего врача, перестает быть необходимым с медицинской точки зрения или становится небезопасным, поскольку другая дата является слишком близкой по времени к следующей запланированной процедуре оценивания. В данном случае от выполнения пропущенной процедуры оценивания следует отказаться.

Для целей данного протокола день 0 не предусматривался. Все даты визитов и временные окна подлежат расчету с использованием дня 1 в качестве даты инфузии CTX130.

6.2 Оценка энцефалопатии, ассоциированной с иммунными эффекторными клетками (ICE)

Нейрокогнитивная оценка должна проводиться с применением оценки ICE.

Инструмент оценки ICE представляет собой слегка модифицированную версию инструмента скрининга CARTOX-10, который сегодня включает тест на рецептивную афазию (Neelapu et al., (2018) *Nat Rev Clin Oncol* 15, 47-62). Оценка ICE предусматривает исследование различных областей когнитивной функции: ориентации, называния, выполнения команд, письма и внимания (см. **таблицу 17**).

Таблица 17. 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 представлена в виде общего количества баллов (0-10) по всем процедурам оценки.

Оценка ICE проводится при скрининге перед введением СТХ130 в день 1 и в дни 2, 3, 5, 7 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 оценка должна выполняться одним и тем же научным сотрудником, который знаком с инструментом для оценки ICE или обучен его применению.

6.3 Результаты, о которых сообщали пациенты

Пять опросов PRO, Европейская организация по исследованию и лечению рака (EORTC) QLQ-C30, опросники EuroQol EQ-5D-5L, Функциональная оценка общей терапии рака (FACT-G), опросник Skindex-29 для SS и MF и опросник дерматологического индекса качества жизни (DLQI) для SS и MF вводили в соответствии со схемой, представленной в **таблице 15** и **таблице 16**. Опросники должны заполняться (самостоятельно на языке, наиболее знакомом субъекту) до проведения процедур клинической оценки.

EORTC QLQ-C30 является опросником, предназначенным для измерения качества жизни при раке. Он состоит из 5 функциональных шкал, предусматривающих несколько пунктов (физические, ролевые, социальные, эмоциональные и когнитивные функции), 3 шкал симптомов (усталость, тошнота, боль) и дополнительных пунктов для отдельных

симптомов (финансовые последствия, потеря аппетита, диарея, запор, нарушение сна и качества жизни). Тест EORTC QLQ-C30 утвержден и широко используется у пациентов, имеющих рак (Wisloff et al., (1996) *Br J Haematol* 92, 604-13.; Wisloff and Hjorth, (1997) *Br J Haematol* 97, 29-37). Предусматриваемые им оценки присваивают по 4-балльной шкале (1=отсутствует вовсе, 2=в небольшой степени, 3=в существенной степени, 4=в крайне высокой степени). Инструмент EORTC QLQ-C30 также содержит 2 общие шкалы, в которых используется оценка по 7-балльной шкале с опорными критериями (1=очень плохо и 7=отлично).

EQ-5D-5L представляет собой общий показатель состояния здоровья и содержит опросник, который оценивает 5 доменов, включая мобильность, уход за собой, обычные виды деятельности, боль/дискомфорт и тревожность/депрессию, а также визуальную аналоговую шкалу. EQ-5D-5L использовали в сочетании с QLQ-C30 (Moreau et al., (2019) *Leukemia* 33, 12:2934-2946).

FACT-G представляет собой утвержденный инструмент из 27 пунктов, с помощью которого измеряют воздействие терапии рака в 4 доменах: физическое, социальное/семейное, эмоциональное и функциональное благополучие. Общий балл FACT-G основан на всех 27 пунктах и варьирует от 0 до 108, при этом более высокие баллы указывают на лучшее качество жизни (Cella et al., (1993) *J Clin Oncol* 11, 570-9).

Skindex-29 предназначен для измерения влияния кожного заболевания на качество жизни по 3 категориям: симптомы (7 пунктов), эмоции (10 пунктов) и функционирование (12 пунктов). Все ответы преобразовывались в линейную шкалу из 100, варьируя от 0 (отсутствие эффекта) до 100 (эффект ощущается все время). Оценки представлены в виде баллов по 3 шкалам, соответствующим 3 доменам; балл по шкале представляет собой среднее значение ответов пациента на вопросы в данном домене (Chren, (2012) *Dermatol Clin* 30, 231-6).

Таблица 15. График оценок: скрининг до месяца 24

[illegible]

Тест в отношении беременности ¹⁰	X	X									X	X	X										
Статус согласно ECOG	X	X	X								X		X										
Эхокардиограмма	X																						
ECG в отведениях ¹¹	X	X	X								X												
Оценка ICE ¹²	X		X	X	X	X	X				X												
PRO ¹³	X		X				X		X	X	X		X			X		X				X	
Con meds ¹⁴	Непрерывно																						
AE ¹⁵	Непрерывно																						
Госпитализация			Непрерывно																				
Оценки заболевания/ответа В и Т-клеточной лимфомы																							
ПЕТ/СТ-сканирование всего тела ¹⁶	X										X		X			X	X	X		X		X	

[illegible]

[illegible]

			ле																			
Цитокины ³¹	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X						
BSAP, PINP ³²	X		X				X		X	X	X		X			X		X				
Ab к Cas9	X										X		X			X		X				X
Антитело к CTX130	X										X		X			X		X				X
Иммунофенотип	X		X ³⁰ до/пос ле		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Внеклеточная ДНК	X										X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
Исследуемые биомаркеры	X	X ³ ₄	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Ab: антитело; AE: нежелательное явление; AESI: нежелательное явление, представляющее особый интерес; ALT: аланинаминотрансфераза; AST: аспаратаминотрансфераза; ATLL: Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых; BM: костный мозг; BSAP: специфичная в отношении костей щелочная фосфатаза; BUN: азот мочевины крови; Cas9: CRISPR-ассоциированный белок 9; CBC: общий анализ крови; chemo: химиотерапия; CMV: цитомегаловирус; ЦНС: центральная нервная система; con meds: сопутствующие лекарственные препараты; CR: полный ответ; CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; CRP: С-реактивный белок; CRS: синдром высвобождения цитокинов; CT: компьютерная томография; D или д.: день; DLQI: Дерматологический индекс качества жизни; ДНК: дезоксирибонуклеиновая кислота; ECG: электрокардиограмма; ECOG: Восточная объединенная онкологическая группа; eGFR: расчетная скорость клубочковой фильтрации; EORTC QLQ-C30: Европейская организация по исследованию и лечению рака QLQ-C30 и опросник; FACT-G: Функциональная оценка общей терапии рака; FDG: фтордезоксиглюкоза; GvHD: болезнь "трансплантат против хозяина"; HBsAb: антитело к коровому белку гепатита В; HBsAb: антитело к поверхностному белку гепатита В; HBsAg: поверхностный

антиген гепатита В; HBV: вирус гепатита В; HBV: вирус гепатита С; ВИЧ-1/-2: вирус иммунодефицита человека 1 или 2 типа; ICE: энцефалопатия, ассоциированная с иммунными эффекторными клетками; Ig: иммуноглобулин; INR: международное нормализованное соотношение; LD: лимфодеплетирующий; LDH: лактатдегидрогеназа; М: месяц; MF: грибовидный микоз; MRD: минимальная остаточная болезнь; МРТ: магнитно-резонансная томография; NK: естественная клетка-киллер; PET: позитронно-эмиссионная томография; PINP: пропептид проколлагена N I типа; PRO: результаты, о которых сообщали пациенты; PT: протромбиновое время; PTT: частичное протромбиновое время; PНК: рибонуклеиновая кислота; SGOT: сывороточная глутаминовая щавелевоуксусная трансаминаза; SGPT: сывороточная глутаминовая пировиноградная трансаминаза; SS: синдром Сезари; TBNK: Т-, В- и NK-клетки.

¹ Оценки посредством скрининга должны были завершиться в течение 14 дней с момента получения информированного согласия. Субъектам разрешался однократный повторный скрининг, который мог осуществляться в течение 3 месяцев с момента первоначального согласия.

² Субъекты должны были начинать LD химиотерапию в течение 7 дней после включения в исследование. Физикальный осмотр, взвешивание и лабораторные исследования свертывания крови проводили до введения первой дозы LD химиотерапии. Основные показатели жизнедеятельности, СВС с лейкоцитарной формулой, химический анализ сыворотки крови и АЕ/сопутствующие лекарственные препараты следовало оценивать и регистрировали каждый день (т. е. 3 раза) в ходе LD химиотерапии.

³ CTX130 вводили через период времени, составляющий от 48 часов до 7 дней после завершения LD химиотерапии.

⁴ Если не указано иное, все исходные оценки в день 1 должны быть выполнены до инфузии CTX130, если не указано иное; подробности см. в Руководстве по поисковому исследованию

⁵ Соответствия требованиям должно было подтверждаться каждый раз после завершения скрининга. Соответствие также должно было подтверждаться в первый день LD химиотерапии и в день инфузии CTX130. Соответствие требованиям должно было подтверждаться после завершения всех оценок в указанный день и перед дозированием.

⁶ Включало полный хирургический и кардиологический анамнез.

⁷ Включало оценку признаков и симптомов GvHD: кожи, слизистой оболочки полости рта, склер, рук и ног.

⁸ Включало артериальное давление, частоту сердечных сокращений, частоту дыхания, пульсоксиметрию и температуру.

⁹ Рост только при скрининге.

¹⁰ Для субъектов-женщин с детородным потенциалом. При скрининге требовался тест в отношении беременности посредством анализа сыворотки крови. Тест сыворотки крови в отношении беременности в течение 72 часов после начала LD химиотерапии, день 28,

M2 и M3 оценивали в местной лаборатории.

¹¹ До LD химиотерапии и до инфузии CTX130.

¹² В день 1 до введения CTX130. Если симптомы со стороны ЦНС сохранялись, то оценку ICE следовало продолжать выполнять примерно один раз в 2 дня до разрешения симптомов до степени 1 или до исходного уровня.

¹³ Опросники EORTC QLQ-30, EQ-5D-5L, FACT-G, опросник Skindex-29 для оценки SS и MF и опросник DLQI для оценки SS и MF. PRO должны были завершаться при скрининге, до введения дозы в день 1, день 7, день 14, день 21, день 28 при визите в месяц 3 после введения дозы, а затем в соответствии с графиком оценки.

¹⁴ Все сопутствующие лекарственные препараты собирали в течение 3 месяцев после инфузии CTX130. После этого собирали только выбранные сопутствующие лекарственные препараты, как описано в данном документе.

¹⁵ Периоды сбора АЕ описаны в данном документе. Если субъект начинал новую противораковую терапию, то следовало сообщать только о AESI, которые возможно были связаны или связаны с CTX130.

¹⁶ PET/CT и MPT головного мозга всего тела (включая шею) необходимо было выполнять при скрининге (т. е. в течение 28 дней до инфузии CTX130). Лимфомы, не характеризующиеся повышенным поглощением FDG, могли отслеживаться после исходного уровня с помощью CT по клиническим показаниям. PET/CT или CT всего тела (включая шею, если она была затронута на исходном уровне) должны были выполняться по клиническим показаниям при подозрении на CR. Сканирование после инфузии осуществляли согласно графику оценок, согласно критериям ответа, определенным в протоколе, и согласно клиническим показаниям для всех исходных лимфом с повышенным поглощением FDG. MPT с контрастом могла использоваться для части CT, когда CT клинически противопоказана или согласно требованиям местного законодательства. Если PET не могла быть выполнена с CT диагностического качества, то необходимо было выполнить отдельную диагностическую CT. PET/CT оценивали локально и централизованно.

¹⁷ Оценка кожи должна была выполняться локально, но также можно было оценивать централизованно, если для этого существовали показания (т. е. щипковая биопсия кожи). Фотографии кожи и mSWAT должны были выполняться после LD химиотерапии в день 3 и до инфузии CTX130.

¹⁸ Биопсия (включая щипковую биопсию кожи) должна была выполняться при скрининге, если ткань для биопсии после прогрессирования была недоступна/неприемлема (раздел 7.2.12.1), в день 7+2 дня и в день 28 ± 2 дня после введения дозы CTX130. Биопсия опухоли должна оцениваться локально и централизованно.

¹⁹ Оценку периферической крови выполняли согласно руководящим принципам учреждения.

²⁰ Биопсию костного мозга и аспират собирали у всех субъектов при скрининге. Если у субъекта был отрицательный результат в отношении инфильтрации ВМ при скрининге, то в день 28 выполняли только биопсию костного мозга и сбор аспирата. В противном случае выполнялись дополнительные биопсии ВМ и сборы аспирата для подтверждения CR для субъекта с положительной инфильтрацией ВМ при скрининге. Биопсия/аспират ВМ должны были оцениваться локально и централизованно. Образцы, полученные посредством аспирации ВМ, после инфузии CTX130 должны быть отправлены для анализа РК CTX130 и исследуемых биомаркеров.

²¹ Оценка минимальной остаточной болезни на основе периферической крови. MRD должна была оцениваться локально и централизованно.

²² ATLL-специфические биомаркеры для локальной оценки. Изменения уровней клеток ATLL в периферической крови, контролируемые с помощью иммунофенотипирования на основе маркеров, таких как CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD52, и провирусная нагрузка человеческого вируса Т-клеточного лейкоза 1 типа (HTLV-1).

²³ Субъекты должны были иметь CD70-экспрессирующие опухоли (в отношении дополнительных подробностей см. в разделе 3.1, критерий включения № 5). Ткань могла быть представлена и протестирована в любое время до или в течение 14-дневного окна для скрининга при условии, что субъект подписал соответствующее согласие.

²⁴ Гематокрит, гемоглобин, количество эритроцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, базофилов, эозинофилов, тромбоцитов, абсолютное количество нейтрофилов.

²⁵ Биохимические анализы сыворотки крови должны были включать ALT (SGPT), AST (SGOT), билирубин (общий и прямой), альбумин, щелочную фосфатазу, бикарбонат, BUN, кальций, хлорид, креатинин, eGFR, глюкозу, LDH, магний, фосфор, калий, натрий, общий белок, CRP, мочевую кислоту (до дня 28). Креатинин следовало оценивать чаще между днями 1 и 28 для контроля острого повреждения почечных канальцев: ежедневно в дни 1-7, через день в дни 8-14 и два раза в неделю до дня 28. При подозрении на острое повреждение почечных канальцев следовало провести дополнительные исследования, в том числе анализ осадка мочи и определение фракционной экскреции натрия в моче, а также начать консультацию у нефролога.

²⁶ Включая PT, PTT, фибриноген, INR и d-димер.

²⁷ Вирусные серологии для ВИЧ-1, ВИЧ-2, HBV (HBsAg, HBsAb, HBcAb), HCV (HCV антитело и РНК) и CMV при скрининге; однако исторические результаты, полученные в течение 60 дней после включения в исследование, могли использоваться для определения возможности включения в исследование.

²⁸ Включая IgA, IgG, IgM.

²⁹ Оценка подгруппы лимфоцитов при скрининге, перед началом первого дня LD химиотерапии, перед инфузией CTX130, затем все перечисленные моменты времени оценивали в местной лаборатории. Включала 6-цветную панель TBNK или эквивалентную для T-, B- и NK-клеток.

³⁰ Для оценок уровней CTX130 и иммунофенотипа 2 образца должны были собираться в день 1: одна инфузия перед CTX130 и одна через 20 минут (± 5 минут) после окончания инфузии CTX130. Для оценки уровня CTX130: если возникал CRS, то образцы для оценки уровней CTX130 собирали каждые 48 часов между запланированными визитами до тех пор, пока CRS не разрешался. В дополнение к указанным моментам времени образцы для анализа уровней CTX130 должны были отправляться в центральную лабораторию из любого незапланированного сбора крови, аспирата ВМ или биопсии ткани, выполненной после инфузии CTX130.

³¹ Дополнительные образцы цитокинов следовало собирать каждый день в течение всего периода проявления CRS.

³² Образцы следовало собирать в одно и то же время дня (± 2 часа) в определенные дни сбора.

³³ Образцы для анализа исследуемых биомаркеров должны были отправляться после любой биопсии LP или ВМ, выполненной после инфузии CTX130. В случае возникновения CRS образцы для оценки исследуемых биомаркеров собирали каждые 48 часов между запланированными визитами до тех пор, пока CRS не разрешался.

³⁴ Только до первого дня LD химиотерапии.

Таблица 16. График оценок: Месяцы 30-60

Оценки	Месяц 30 (± 21 день)	Месяц 36 (± 21 день)	Месяц 42 (± 21 день)	Месяц 48 (± 21 день)	Месяц 54 (± 21 день)	Месяц 60 (± 21 день)	Прогрессирующее заболевание ¹	Вторичное последующее наблюдение ²
Физикальное обследование	X	X	X	X	X	X	X	X
Основные показатели жизнедеятельности ³	X	X	X	X	X	X	X	X
PRO ⁴		X		X		X	X	
Сопутствующие	X	X	X	X	X	X	X	X

лекарственные препараты ⁵								
АЕ ⁶	X	X	X	X	X	X	X	X
Оценка заболевания/ответа ⁷	X	X	X	X	X	X	X	
Лабораторные процедуры оценки (кровь, локальные)								
СВС с лейкоцитарной формулой ⁸	X	X	X	X	X	X	X	X
Химический анализ сыворотки крови ⁸	X	X	X	X	X	X	X	X
Подгруппы лимфоцитов ⁸	X	X	X	X	X	X	X	
Биомаркеры (кровь, центральная)								
Уровни CTX130 ⁹	X	X	X	X	X	X	X	X
Ab к Cas9		X		X		X	X	
Антитело к CTX130		X		X		X	X	
Внеклеточная ДНК							X	
Исследуемые биомаркеры	X	X	X	X	X	X	X	X

Ab: антитело; АЕ: нежелательное явление; AESI: нежелательное явление, представляющее особый интерес; AITL: ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома; ALCL: анапластическая крупноклеточная лимфома; ATLL: Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых; BM: костный мозг; Cas9: CRISPR-ассоциированный белок 9; CBC: общий анализ крови; CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; CT: компьютерная томография; DLBCL: диффузная В-крупноклеточная лимфома; DLQI: Дерматологический индекс качества жизни; ДНК: дезоксирибонуклеиновая кислота; EORTC QLQ-C30: опросник Европейской организации по исследованию и лечению рака QLQ-C30; FACT-G: Функциональная оценка общей терапии рака; ISCL: Международное общество по кожным лимфомам; М: месяц; М-белок: моноклональный белок; MF: грибовидный микоз; PD: прогрессирующее заболевание; PET: позитронно-эмиссионная томография; PRO: результаты, о которых сообщали пациенты; PTCL-NOS: неуточненная периферическая Т-

клеточная лимфома; SAE: серьезное нежелательное явление; SCT: трансплантация стволовых клеток; SS: Синдром Сезари.

¹ Субъекты с болезнью Паркинсона прерывали нормальный график оценок, получали перечисленные оценки исследования, а затем вторичное наблюдение (см. сноску 2).

² Субъекты, частично отозвавшие свое согласие, прекращали нормальный график оценок и подвергались следующим процедурам, как минимум: сокращенный физикальный осмотр, CBC с лейкоцитарной формулой, химический анализ сыворотки крови, оценка заболевания/статуса выживания, персистенция CTX130, выбор сопутствующих лекарственных препаратов/процедур (противоопухолевая терапия, связанная с заболеванием хирургия, SCT) и отдельные АЕ (АЕ и SAE, связанные с лечением, новые злокачественные образования, новые/ухудшающиеся аутоиммунные, иммунодефицитные или неврологические нарушения).

³ Включая измерение температуры, артериального давления, частоты сердечных сокращений, пульсоксиметрии и частоты дыхания.

⁴ Опросники EORTC QLQ-30, EQ-5D-5L, FACT-G, опросник Skindex-29 для оценки SS и MF и опросник DLQI для оценки SS и MF.

⁵ После этого собирали только выбранные сопутствующие лекарственные препараты, как описано в данном документе.

⁶ Если субъект начинал новую противораковую терапию, то следовало сообщать только о событиях, определенных как AESI, как описано в данном документе, которые возможно были связаны или связаны с CTX130.

⁷ Оценки заболевания основывались на оценках в соответствии с критериями ответа Лугано (Cheson et al., (2014) *J Clin Oncol* 32, 3059-68) для субъектов с PTCL-NOS, ALCL, лейкозной и лимфоматозной ATLL, AITL и DLBCL, а также критериями ответа ISCL (Olsen et al., (2011) *J Clin Oncol* 29, 2598-607) для субъектов с SS или MF, и включали PET/CT всего тела, аспирацию и биопсию BM, а также оценку кожи.

⁸ Оценивали в местной лаборатории.

⁹ В дополнение к указанным моментам времени образцы для анализа уровней CTX130 должны были отправляться в центральную лабораторию из любого незапланированного сбора крови, аспирата BM или биопсии ткани, выполненной после инфузии CTX130.

DLQI представляет собой опросник из 10 вопросов, используемый для измерения влияния кожных заболеваний на качество жизни. 10 вопросов охватывают следующие темы: симптомы, душевный дискомфорт, покупки и уход за домом, одежда, общение и отдых, спорт, работа или учеба, близкие отношения, секс и лечение. Каждый вопрос оценивается от 0 до 3, что дает возможный диапазон баллов от 0 (означает отсутствие влияния кожного заболевания на качество жизни) до 30 (означает максимальное влияние на качество жизни) (Finlay and Khan, (1994) *Clin Exp Dermatol* 19, 210-6).

6.4 Оценки заболевания и ответа В- и Т-клеточной лимфомы

Оценки заболевания основывались на оценках в соответствии с критериями ответа Лугано (Cheson et al., (2014) *J Clin Oncol* 32, 3059-68; см. раздел 6.10) для субъектов с PTCL-NOS, ALCL, лейкозной и лимфоматозной ATLL, AITL и DLBCL, а также в соответствии с критериями ответа ISCL (Olsen et al., (2011) *J Clin Oncol* 29, 2598-607; см. раздел 6.11) для субъектов с SS или MF.

Оценка заболевания головного мозга должна была выполняться с помощью МРТ, чтобы исключить поражение головного мозга у субъектов во время скрининга.

Согласно (Olsen et al., (2011) *J Clin Oncol* 29, 2598-607), субъекты с SS должны были иметь следующее.

☐ Поддающееся измерению заболевание согласно критериям Лугано; отвечающие определению SS с 80% или больше площади поверхности тела и поражением крови.

☐ Эритродермия, определяемая как эритема, покрывающая по меньшей мере 80% поверхности тела.

☐ Перестройка клонального Т-клеточного рецептора (TCR) в крови, идентифицированная с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или Саузерн-блоттинга.

☐ Абсолютное количество клеток Сезари в крови, составляющее 1000/мкл или больше, или соответствие 1 из следующих 2 критериев:

о увеличенное количество CD4⁺ или CD3⁺ клеток с соотношением CD4 и CD8, составляющим 10 или больше;

о увеличенное количество CD4⁺ клеток с не соответствующим норме фенотипом (как например, соотношение CD4⁺CD7⁻ 40% или больше или соотношение CD4⁺CD26⁻ 30% или больше).

Для анализа эффективности исход заболевания оценивался с использованием критериев ответа Лугано для следующего подтипа опухоли, как оценивалось с помощью ПЕТ/СТ или СТ для заболевания с повышенным поглощением FDG (фтордезоксиглюкозы).

☐ PTCL-NOS

☐ ALCL

☐ Лейкозная и лимфоматозная ATLL

☐ AITL

☐ DLBCL

Для субъектов с гиперкальциемией ATLL обострения не считались PD, пока

сохранялось активное заболевание, и их следовало лечить симптоматически согласно руководящим принципам учреждения. Изменения уровней клеток ATLL в периферической крови контролировали с помощью иммунофенотипирования на основе маркеров, таких как CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD52, и при этом провирусная нагрузка человеческого вируса Т-клеточного лейкоза 1 типа (HTLV-1) должна была быть конечной точкой исследования.

Повышенный лимфоцитоз на фоне уменьшения размеров лимфатических узлов не считается PD, и определение ответа должно было зависеть от лимфатических узлов и измерения внеузлового заболевания.

Измерение кожных поражений при не CTCL должно было проводиться в соответствии с рекомендациями по оценке ответа на кожные очаги, как описано в данном документе.

Критерии ответа ISCL использовались для субъектов с SS или MF, как оценивалось для СТ (или PET/СТ, если показано). Эритродермическое обострение не считалось прогрессированием заболевания в течение первых 2 месяцев.

Оценку заболевания Т-клеточной лимфомы и ответа следовало проводить в соответствии с графиком в **таблице 15** и **таблице 16** и включать оценки, описанные ниже. Все категории ответа (включая прогрессирование) требуют проведения 2 последовательных оценок с интервалом в по меньшей мере 1 неделю в любое время до начала любой новой терапии.

6.5 Биопсия перед CTX130

Гистопатологический диагноз подтипа Т-клеточной лимфомы основывался на местной и центральной лабораторной оценке.

Субъектам необходимо было пройти биопсию опухоли при скрининге или, если биопсию выполняли в течение 3 месяцев до включения в исследование и после последней системной или целевой терапии, то могла быть получена архивная ткань. Если архивная ткань имела недостаточный объем или качество для выполнения требований центральной лаборатории, то во время скрининга необходимо было выполнить биопсию. Биопсия костей и других декальцинированных тканей неприемлема из-за помех для последующих анализов. Части биопсии ткани отправляли в центральную лабораторию для анализа.

Архивные образцы опухолевой ткани могли анализировать в отношении внутренних и ТМЕ-специфических биомаркеров, включая анализ ДНК, РНК, белка и метаболитов.

6.6 Рентгенографическая оценка с помощью PET/СТ заболеваний всего тела

Позитронно-эмиссионную томографию (PET)/СТ всего тела (включая шею) и МРТ головного мозга следовало выполнять при скрининге (т. е. в течение 28 дней до инфузии CTX130) и при подозрении на CR. Сканирование после инфузии осуществляли согласно графику оценок в **таблице 15** и **таблице 16**, согласно критериям ответа, определенным в протоколе(см. раздел 6.10 и раздел 6.11), и согласно клиническим показаниям для всех исходных лимфом с повышенным поглощением FDG. PET/СТ для заболевания, не характеризующегося повышенным поглощением FDG, могло сопровождаться СТ.

МРТ с контрастом могла использоваться для части СТ, когда СТ клинически

противопоказана или согласно требованиям местного законодательства. Если PET не могла быть выполнена с СТ диагностического качества, то необходимо было выполнить отдельную диагностическую СТ.

По возможности, методы визуализации, аппараты и параметры сканирования, используемые для рентгенографической оценки заболевания, должны оставаться неизменными во время исследования. Для анализов эффективности проводили радиографическую оценку заболевания в соответствии с установленными протоколом критериями ответа.

6.7 Оценка кожи

Оценку кожи проводили, как указано в **таблице 15** и **таблице 16**. Первоначальную оценку кожных заболеваний следовало проводить после третьего введения LD химиотерапии и перед инфузией CTX130. Прогноз MF и SS зависел от типа и степени выраженности очагов кожи и внекожного заболевания (Olsen et al., (2011) *J Clin Oncol* 29, 2598-607). Рекомендации основаны на согласованных руководящих принципах (ISCL, Консорциум США по кожным лимфомам USCLC)]; Рабочая группа по кожным лимфомам EORTC, включая систему подсчета баллов для оценки опухолевой массы в коже, лимфатических узлах, крови и внутренних органах; определение ответа кожи, узлов, крови и внутренних органов и сводная оценка общего ответа представлены в разделе 6.11. Оценка ответа должна была сопровождаться фотодокументацией репрезентативных участков.

6.8 Биопсия и аспират костного мозга

Сбор биопсии костного мозга и аспирата при скрининге выполняли для всех субъектов. Если у субъекта был отрицательный результат в отношении инфильтрации ВМ при скрининге, то в день 28 выполняли только биопсию костного мозга и сбор аспирата. В противном случае выполнялись дополнительные биопсии ВМ и сборы аспирата для подтверждения CR для субъекта с положительной инфильтрацией ВМ при скрининге. Субъектам с поражением ВМ в анамнезе, которые достигли полного ответа согласно PET/СТ-сканированию, выполняли биопсию ВМ для подтверждения оценки ответа. Если у субъекта проявлялись признаки рецидива, то биопсию следовало повторить.

Образец на наличие CTX130 (выявленный посредством ПЦР) следовало отправить для оценки в центральную лабораторию в любой момент времени, когда выполнялся анализ ВМ. Образцы, полученные посредством аспирации ВМ, после инфузии CTX130 должны быть отправлены для анализа РК CTX130 и исследуемых биомаркеров. Следовало соблюдать стандартные руководящие принципы учреждения по биопсии ВМ. Избыточная проба (при ее наличии) могла храниться для поискового исследования.

6.9 Биопсия опухоли

Субъектам необходимо осуществить прохождение биопсии опухоли при скрининге или, если биопсию после прогрессирования выполняли в течение 3 месяцев до включения в исследование и после последней системной или таргетной терапии, то может быть получена архивная ткань. Если архивная ткань имела недостаточный объем или качество для выполнения требований центральной лаборатории, то во время скрининга необходимо

было выполнить биопсию, как описано в данном документе.

Биопсию опухоли выполняли в день 7 (+ 2 дня или как только это становилось клинически возможным) и день 28 ($\pm$ 2 дня). Если рецидив возникал во время исследования субъекта, то следовало сделать все возможное, чтобы получить биопсию рецидивной опухоли и отправить ее в центральную лабораторию.

Биопсия должна была исходить из поддающихся измерению, но нецелевых очагов. В случае если брали несколько биопсий, то следовало приложить усилия, чтобы получить их из аналогичных тканей. Метастазы в печень, как правило, были менее желательны. Биопсия костей и других декальцинированных тканей неприемлема из-за помех для последующих анализов. Этот образец анализировали в отношении присутствия СТХ130, а также биомаркеров, присущих опухоли, и биомаркеров, специфичных для ТМЕ, включая анализ ДНК, РНК, белка и метаболитов.

6.10 Критерии ответа Лугано, 2014

Нижеследующее адаптировано из Cheson et al., (2014) *J Clin Oncol* 32, 3059-68.

Диагноз Для первоначальной диагностики тонкоигольной аспирации недостаточно. Инцизионная или эксцизионная биопсия предпочтительнее, чтобы обеспечить достаточное количество ткани для этих исследований. Толстоигольная биопсия могла рассматриваться, когда эксцизионная биопсия была невозможна и для подтверждения рецидива; однако за недиагностическим образцом должна была следовать инцизионная или эксцизионная биопсия.

Исходное поражение участка Критерии поражения участка обобщены в **таблице 18**.

Таблица 18. Критерии для поражения участка

Участок ткани	Клинически й	Авидность FDG	Тест	Положительный результат
Лимфатические узлы	Пальпируемый	Гистологические исследования с повышенным поглощением FDG Неавидное заболевание	ПЕТ-СТ СТ	Повышенное поглощение FDG Увеличение узла неустановленной этиологии
Селезенка	Пальпируемый	Гистологические исследования с повышенным поглощением FDG Неавидное заболевание	ПЕТ-СТ СТ	Диффузное поглощение, солитарное новообразование, милиарные очаги, новообразования больше 13 см в длину

				вертикально, масса, новообразования
Печень	Пальпируемый	Гистологические исследования с повышенным поглощением FDG	PET-CT CT	Диффузное поглощение, масса новообразования
		Невидное заболевание		
ЦНС	Признаки, симптомы		CT MPT Оценка CSF	Очаговое(-ые) новообразование(-я) Лептоменингеальная инфильтрация, очаговые новообразования Цитология, проточная цитометрия
Другое (например, кожа, участка легкое, желудочно-кишечный тракт, кость, костный мозг)	Зависимый от		PET-CT ¹ , биопсия	Поражение лимфомой

CSF: спинномозговая жидкость; CT: компьютерная томография FDG: фтордезоксиглюкоза; GI: желудочно-кишечный тракт; MPT: магнитно-резонансная томография; PET: позитронно-эмиссионная томография.

¹ PET-CT достаточна для определения поражения костного мозга и может рассматриваться как предполагающая с высокой вероятностью поражение других экстралимфатических участков. При необходимости можно рассмотреть подтверждение биопсии этих участков.

Визуализация Для стадирования гистологических исследований, обычно чувствительных к фтордезоксиглюкозе (FDG), следовало использовать позитронно-эмиссионную томографию (PET)-компьютерную томографию (CT). Следовало сообщать о сканировании с визуальной оценкой, отмечая расположение главных очагов в узловых и внеузловых участках. Изображения должны быть масштабированы до фиксированного

стандартизованного значения поглощения и таблицы цветов; и при этом следовало различать от физиологического поглощения и других моделей заболевания в соответствии с характеристиками распределения и/или СТ.

РЕТ-СТ следовало выполнять следующим образом.

☐ Как можно дольше после последнего введения химиотерапии для промежуточных сканирований

☐ 6-8 недель после химиотерапии в конце лечения в идеале (но минимум 3 недели)

☐ 3 месяца или больше после лучевой терапии

СТ с контрастным усилением могла включаться для более точного измерения размера узла и для более точного различения кишечника от лимфаденопатии; а также на фоне сдавления/тромбоза центральных/медиастинальных сосудов. СТ с контрастным усилением также предпочтительнее для планирования облучения. Для гистологических исследований с переменной активностью FDG следовало определять стадии с помощью СТ-сканирования.

Для субъектов с стадией, определенной с помощью СТ, заболевание следовало оценивать в соответствии с **таблицей 19**.

Таблица 19. Оценка заболевания для определения стадии на основе СТ.

Поддающийся измерению участок узла	Измеримый участок внеузлового заболевания	Не поддающиеся измерению участки заболевания
LDi больше 1,5 см	LDi больше 1,0 см	☐ Все другие участки заболевания: ☐ Узловой, внеузловой ☐ Поддающееся оценке заболевание
Не более 6 поддающихся измерению узловых/внеузловых участков: ☐ Крупнейшие целевые узлы, узловые новообразования или другие лимфоматозные очаги ☐ Поддающееся измерению внеузловое заболевание ☐ Поддающийся измерению по 2 диаметрам (LDi и SDi) ☐ Представляют различные области тела/общая тяжесть заболевания ☐ Включали заболевания средостения и забрюшинного пространства, если оно присутствовало		Примеры ☐ Кожа, GI, кость, селезенка, печень, почки, выпоты

GI: желудочно-кишечный тракт; LDi: самый длинный поперечный диаметр очага;

SDi: самая короткая ось перпендикулярна LDi.

Основной объем опухоли Единичное узловое новообразование, в отличие от множественных более мелких узлов, размером 10 см или более трети трансторакального диаметра на любом уровне грудных позвонков, определяемая с помощью СТ, является определением объемного заболевания для лимфомы Ходжкина (HL). Для определения объема рентгенография грудной клетки не требовалась. Для HL и неходжкинской лимфомы (NHL) следовало регистрировать самое длинное измерение с помощью СТ-сканирования.

Измерения общего объема опухоли следовало изучать как потенциальные прогностические факторы с помощью PET и СТ.

Поражение селезенки, печени и костного мозга Поражение селезенки и печени лучше всего определялось с помощью PET-СТ, как описано в **таблице 20**.

Таблица 20. Поражение селезенки и печени.

Селезенка	Печень
Использовалось одно измерение, которое хорошо коррелировало с объемом	Размер печени при физикальном обследовании или СТ не являлся надежным показателем поражения печени лимфомой
В большинстве исследований для длины по вертикали использовалось 10-12 см (от краниальной до каудальной)	Диффузно повышенное или очаговое накопление с очаговыми или диссеминированными
Рекомендация согласно Лугано:	новообразованиями или без них
Спленомегалия больше 13 см	свидетельствовало о поражении печени

Поражение костного мозга можно определить следующим образом:

- ☐ HL, если проводилась PET-СТ, биопсия костного мозга (ВМВ) не требовалась.
- ☐ DLBCL, ВМВ, если PET была отрицательной и выявление дискордантного гистологического исследования было важно для устранения у субъекта.
- ☐ Другие подтипы, рекомендовался односторонний ВМВ ~2,5 см, а также иммуногистохимия и проточная цитометрия при скрининге/исходном уровне.
- ☐ Если он не был поражен в исходном состоянии, то должен был быть нормальным для CR и свидетельством заболевания с повышенным поглощением FDG в костном мозге для полного метаболического ответа (CMR).

Система определения стадии Для анатомического описания распространенности заболевания следовало использовать модифицированную систему определения стадии согласно Ann Arbor (**таблица 21**).

Таблица 21. Проверенная система определения стадии для первичных узловых лимфом

Стадия	Поражение	Внеузловой статус
Ограниченная		
Стадия I	Один узел или группа смежных узлов	Один внеузловой очаг без поражения узла
Стадия II	Две или более узловые группы на одной и той же стороне диафрагмы	Стадия I или II по выраженности в узле с ограниченным смежным внеузловым поражением
Стадия II, объемная ¹	II, как указано выше, при объемном заболевании	N/A
Прогрессирующая		
Стадия III	Узлы по обеим сторонам диафрагмы Узлы над диафрагмой с поражением селезенки	N/A
Стадия IV	Дополнительное несмежное внеузловое поражение	N/A

ПРИМЕЧАНИЕ. Степень заболевания определяли с помощью позитронно-эмиссионной томографии - компьютерной томографии для лимфом с повышенным поглощением и компьютерной томографии для гистологических исследований с отсутствующим повышенным поглощением. Миндалины, кольцо Вальдейера и селезенка считались узловой тканью.

¹ Лечится ли объемное заболевание стадии II как ограниченное или прогрессирующее заболевание могло определяться гистологией и рядом прогностических факторов.

Оценка ответа PET-СТ следовало использовать для оценки ответа гистологических исследованиях с повышенным поглощением FDG по 5-балльной шкале; СТ предпочтительнее при низком или переменном поглощении FDG.

Наблюдение после ремиссии не рекомендовалось, особенно для DLBCL и HL, хотя повторное исследование могло рассматриваться после сомнительных результатов после лечения.

Разумное использование последующего сканирования могло рассматриваться при индолентных лимфомах с остаточным внутрибрюшным или забрюшинным заболеванием.

Критерии для ответа обобщены в **таблице 22**.

Таблица 22. Проверенные критерии Лугано для оценки ответа.

Ответ и участок	Ответ на основе PET/СТ	Ответ на основании СТ
Полный	Полный метаболический ответ	Полный рентгенологический ответ (все из нижеперечисленного)
Лимфатические узлы и внемлимфатические узлы	Балл 1, 2 или 3 ¹ с наличием или отсутствием остаточного новообразования на 5PS ² 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.	Целевые узлы/узловые новообразования должны регрессировать до 1,5 см или больше в LDi Отсутствие внемлимфатических участков заболевания
Неизмеряемый патологический очаг	Не применимо	Отсутствует
Увеличение органа	Не применимо	Регресс в отношении нормы

Новые патологические очаги	Отсутствует	Отсутствует
Костный мозг	Отсутствие признака заболевания с повышенным поглощением FDG в костном мозге	Нормальный по морфологии; если не определено, то отрицательный согласно ИНС.
Частичный	Частичный метаболический ответ	Частичная ремиссия (все из нижеперечисленного)
Лимфатические узлы и внемфатические узлы	Балл 4 или 5 ² со сниженным поглощением по сравнению с исходным уровнем и остаточным(-и) новообразованием(-ями) любого размера В промежутке времени эти результаты предполагали поддающееся лечению заболевание В конце лечения эти данные указывали на остаточное заболевание	Снижение на 50% или больше SPD до не более 6 целевых поддающихся измерению узлов и внеузловых участков Если поражение было слишком маленьким для измерения на СТ, то считали 5 мм x 5 мм в качестве значения по умолчанию. В случае если больше не заметно - 0 × 0 мм Для узла больше 5 мм×5 мм, но небольшого размера
Неизмеряемый патологический очаг	Не применимо	Отсутствует/норма, регресс, но без увеличения
Увеличение органа	Не применимо	Селезенка должна регрессировать более чем на 50% по сравнению с нормой.
Новые патологические очаги	Отсутствует	Отсутствует
Костный мозг	Остаточное поглощение выше, чем поглощение в нормальном костном мозге, но снижено по сравнению с исходным	Не применимо

	уровнем (допускалось диффузное поглощение, совместимое с реактивными изменениями после химиотерапии). Если имелись стойкие очаговые изменения в костном мозге в контексте узлового ответа, то следовало рассмотреть возможность дальнейшего обследования с помощью МРТ, биопсии или интервального сканирования.	
Отсутствие ответа/стабильное заболевание	Отсутствие метаболического ответа	Стабильное заболевание
Целевые узлы/узловые новообразования, внеузловые очаги	Балл 4 или 5 без значительного изменения поглощения FDG по сравнению с исходным уровнем в промежуточный период или в конце лечения.	Снижение менее чем на 50% SPD от исходного уровня до 6 Встречались доминантные, поддающиеся измерению узлы и внеузловые участки; отсутствовали критерии прогрессирующего заболевания
Неизмеряемый патологический очаг	Не применимо	Отсутствие повышения, характерного для прогрессирования
Увеличение органа	Не применимо	Отсутствие повышения, характерного для прогрессирования
Новые патологические очаги	Отсутствует	Отсутствует
Костный мозг	Отсутствие изменения по сравнению с	Не применимо

	исходным уровнем	
Прогрессирующее заболевание	Прогрессирующее метаболическое заболевание	Для прогрессирующего заболевания требовалось по меньшей мере 1 из следующего
Отдельные целевые узлы/узловые новообразования Внеузловые очаги	Балл 4 или 5 с увеличением интенсивности поглощения от исходного уровня и/или Новые главные очаги с повышенным поглощением FDG, характерные для лимфомы при промежуточной или окончательной оценке лечения	Прогрессирование PPD Отдельный узел/очаг должны были быть не соответствующими норме с: ☐ LD_i больше 1,5 см и ☐ Увеличение на 50% или больше от самого низкого уровня PPD и ☐ Увеличение LD_i или SD_i от самого низкого уровня ☐ 0,5 см для очагов размером 2 см или меньше ☐ 1,0 см для очагов больше 2 см
Ответ и участок	Ответ на основе PET/СТ	Ответ на основании СТ
		☐ В условиях спленомегалии длина селезенки должна увеличиться на больше 50% от степени ее предыдущего увеличения по сравнению с исходным уровнем (например, селезенка размером 15 см должна увеличиться до более 16 см). При отсутствии предшествующей

		спленомегалии должно увеличиться на по меньшей мере 2 см от исходного уровня. ☐ Новая или рекуррентная спленомегалия
Неизмеряемый патологический очаг	Отсутствует	Новое или явное прогрессирование ранее существовавших неизмеренных очагов
Новые патологические очаги	Новые главные очаги с повышенным поглощением FDG, характерные скорее для лимфомы, чем для другой этиологии (например, инфекции, воспаления). Если нет уверенности в этиологии новых очагов, то можно рассмотреть биопсию или интервальное сканирование.	Возобновление роста ранее устраненных патологических очагов ☐ новый узел больше 1,5 см по любой оси ☐ Новый внеузловой участок больше 1,0 см по любой оси; если больше 1,0 см по любой оси, то его наличие должно быть однозначным и должно быть связано с лимфомой ☐ Поддающееся оценке заболевание любого размера Связанный с лимфомой
Костный мозг	Новые или рекуррентные главные очаги с повышенным поглощением FDG	Новое или рекуррентное вовлечение

5PS: 5-балльная шкала; CT: компьютерная томография; FDG: фтордезоксиглюкоза; ИНС: иммуногистохимия; LD_i: самый длинный поперечный диаметр очага; МРТ: магнитно-резонансная томография; PET: позитронно-эмиссионная томография; PPD: векторное

произведение LDi и перпендикулярного диаметра; SDi : кратчайшая ось, перпендикулярная LDi ; SPD : сумма произведений перпендикулярных диаметров множественных очагов.

¹ Балл 3 у многих субъектов указывал на хороший прогноз при стандартном лечении, особенно во время промежуточного сканирования. Однако в исследованиях, включающих PET, где изучалась деэскалационная терапия, могли предпочтительнее рассматривать 3 балла как недостаточный ответ (во избежание недостаточного лечения). Измеренные доминирующие очаги. Не более 6 самых крупных доминантных узлов, узловых новообразований и внеузловых очагов выбирались так, чтобы они были поддающимися измерению по 2 диаметрам. Узлы предпочтительно должны быть из разных областей организма и должны были включать, где это применимо, медиастинальные и забрюшинные участки. К неузловым очагам относятся очаги в солидных органах (например, печени, селезенке, почках, легких), поражение GI, кожные очаги или те, которые обнаруживаются при пальпации. Не поддающиеся измерению очаги Любое заболевание, не выбранное в качестве измеряемого, доминирующее заболевание и действительно поддающееся оценке заболевание, следовало считать неизмеряемым. Такие участки включали любые узлы, узловые новообразования и внеузловые участки, не выбранные в качестве доминантных или поддающихся измерению или не отвечающие требованиям в отношении измеримости, но все еще считающиеся не соответствующими норме, а также действительно поддающееся оценке заболевание, которое представляло собой любой участок подозреваемого заболевания, которое бы трудно отслеживалось количественно с помощью измерения, включая плевральные выпоты, асцит, очаги в костях, лептоменингеальное заболевание, новообразования в брюшной полости и другие очаги, которые не могут быть подтверждены и отслежены с помощью визуализации. В кольце Вальдейера или во внеузловых участках (например, желудочно-кишечном тракте, печени, костном мозге) поглощение FDG могло быть выше, чем в средостении при полном метаболическом ответе, но не должно было быть выше, чем нормальное физиологическое поглощение в окружающей среде (например, с активацией костного мозга как результат химиотерапии или миелоидных факторов роста).

² 5-балльная шкала PET: 1, отсутствие поглощения выше фона ; 2, поглощение $\leq$ средостения; 3, поглощение $\geq$ средостения, но $\leq$ печени; 4, поглощение умеренно $>$ печени; 5, поглощение заметно выше, чем в печени и/или новых очагах; X, новые участки поглощения вряд ли связаны с лимфомой.

6.11 Критерии ответа согласно Международному обществу по кожным лимфомам, 2011 г.

Нижеследующее адаптировано из Olsen et al., (2011) *J Clin Oncol.* 29, 18:2598-607.

Определения Используемые определения для пятен, бляшки и опухоли приведены в таблице 23

Таблица 23. Модифицированные версии ISCL/EORTC в отношении классификации TNMB для MF/SS

Стадии Описание TNMB

TNMB

Кожа ¹

T ₁	Ограниченные пятна, папулы и/или бляшки, покрывающие < 10% поверхности кожи; могли далее расслаиваться на T _{1a} (только пятно) по сравнению с T _{1b} (бляшка ± пятно)
T ₂	Пятна, папулы или бляшки, покрывающие ≥ 10% поверхности кожи; могли далее расслаиваться на T _{2a} (только пятно) по сравнению с T _{2b} (бляшка ± пятно)
T ₃	Одна или несколько опухолей (≥ 1 см диаметром)
T ₄	Слияние эритемы, покрывающей ≥ 80% поверхности тела

Узел ²

N ₀	Отсутствие клинически несоответствующих норме лимфатических узлов; биопсия не требовалась
N ₁	Клинически отклоняющиеся от нормы лимфатические узлы; гистопатологический анализ Dutch степени 1 или NCI LN ₀₋₂
N _{1a}	Отрицательный клон
N _{1b}	Положительный клон
N ₂	Клинически отклоняющиеся от нормы лимфатические узлы; гистопатологический анализ Dutch степени 2 или NCI LN ₃
N _{2a}	Отрицательный клон
N _{2b}	Положительный клон
N ₃	Клинически отклоняющиеся от нормы лимфатические узлы; гистопатологический анализ Dutch степени 3-4 или NCI LN ₄ ; положительный или отрицательный клон
N _x	Клинически несоответствующие норме лимфатические узлы без гистологического подтверждения или невозможности полностью определить характеристики гистологических подкатегорий

Внутренние органы

M ₀	Отсутствие поражений внутренних органов
M ₁	Поражение внутренних органов (должно было подтвердиться наличие патологии и следовало указать пораженный орган)

Кровь

B ₀	Отсутствие значительного поражения крови: $\leq 5\%$ лимфоцитов периферической крови являлись атипичными клетками (Сезари)
B _{0a}	Отрицательный клон
B _{0b}	Положительный клон
B ₁	Низкая опухолевая масса крови: $> 5\%$ лимфоцитов периферической крови являлись атипичными клетками (Сезари), но не соответствовали критериям B ₂
B _{1a}	Отрицательный клон
B _{1b}	Положительный клон
B ₂	Высокая опухолевая масса крови: $\geq 1000/\text{мкл}$ клеток Сезари с положительным клоном ³ ; клетки Сезари можно заменить на 1 из следующих: $\text{CD4}/\text{CD8} \geq 10$, $\text{CD4}+\text{CD7-}$ клеток $\geq 40\%$ или $\text{CD4}+\text{CD26}$ клеток $\geq 30\%$

EORTC: Европейская организация по исследованию и лечению рака; ISCL: Международное общество по кожным лимфомам; MF: грибовидный микоз; NCI: Национальный институт рака; SS: синдром Сезари; TNMB: Международная классификация стадий злокачественных образований крови.

¹ Пятно=очаг любого размера без уплотнения или значительного возвышения над окружающей непораженной кожей: может присутствовать пойкилодермия. Бляшка=возвышающийся или затвердевший очаг любого размера: могут присутствовать корки или пойкилодермия. Опухоль=любое солидное или узловатое образование диаметром ≥ 1 см с признаками глубокой инфильтрации кожи и/или вертикального роста.

² Классификация лимфатических узлов была изменена по сравнению с обновленными версиями ISCL/EORTC 2007 г., чтобы включить центральные узлы. Лимфатические узлы считаются аномальными, если их диаметр превышает 1,5 см в диаметре.

³ Клон в крови должен соответствовать клону кожи. Релевантность изолированного клона в крови или клона в крови, который не соответствовал клону в коже, еще предстояло определить.

Диагноз. Гистопатологический диагноз должен был подтверждаться патологоанатомом, специализирующимся на кожной лимфоме, при биопсии кожи,

репрезентативной для текущего заболевания. Для синдрома Сезари (SS; определяется как соответствие критериям T₄ плюс B₂), когда биопсия эритродермической кожи может выявить только предположительные, но не диагностические гистопатологические признаки, диагноз мог основываться либо на биопсии узла, либо на выполнении критериев B₂, включая наличие клона в крови, который соответствует клону кожи. Для ранней стадии пятна грибовидного микоза (MF), когда гистологический диагноз с помощью световой микроскопии не подтверждался, следовало использовать диагностические критерии, рекомендованные ISCL.

Оценка.

□ Предварительную оценку и подсчет параметров ответа следовало проводить на исходном уровне (день 1 лечения), а не при скрининге.

□ Все ответы должны были быть по меньшей мере 4 недели по продолжительности.

Оценка кожи, определение балла и определение ответа.

Для оценки кожи следовало использовать инструмент для взвешенной оценки тяжести заболевания (SWAT) или модифицированный SWAT (mSWAT).

Определение ответа представлено в **таблице 24**.

Таблица 24. Ответ в коже

Ответ	Определение
Полный ответ	100% освобождение от очагов кожи ¹
Частичный ответ	50-99% освобождение от кожного заболевания от исходного уровня без новых опухолей (T ₃) у субъектов только с кожным заболеванием T ₁ , T ₂ или T ₄
Стабильное заболевание	повышение степени излечения кожного заболевания с менее чем 25% до менее чем 50% по сравнению с исходным уровнем без новых опухолей (T ₃) у субъектов только с кожным заболеванием T ₁ , T ₂ или T ₄
Прогрессирующее заболевание ²	Увеличение кожного заболевания на $\geq 25\%$ от исходного уровня или новые опухоли (T ₃) у субъектов только с кожным заболеванием T ₁ , T ₂ или T ₄ или утрата ответа: у пациентов с полным или частичным ответом увеличение балла кожи больше, чем сумма самого низкого уровня плюс 50% от исходного балла
Рецидив	Любой рецидив заболевания у пациентов с полным ответом

ПРИМЕЧАНИЕ. На основе балла модифицированного Инструмента для взвешенной оценки тяжести заболевания.

¹ Для определения полного ответа биопсия нормально выглядящей кожи не требовалась. Тем не менее, биопсия кожи должна была выполняться на репрезентативном участке кожи, если были какие-либо подозрения на остаточное заболевание (трудноизлечимая эритема или пигментное изменение), в противном случае был бы полный

ответ. Если гистологические признаки вызвали подозрение или предполагали наличие грибовидного микоза/синдрома Сезари (см. гистологические критерии для раннего грибовидного микоза), то ответ следовало рассматривать только как частичный ответ.

² Какой критерий встречался первым.

Оценка лимфатических узлов, определение балла и определение ответа

Периферические лимфатические узлы. Следовало определить характеристики полного статуса участников согласно Международной классификации стадий злокачественных образований крови (TNMB), и при этом рекомендовалась компьютерная томография (СТ) с оговоркой, что существует значительная вариабельность между наблюдателями. Магнитно-резонансная томография (МРТ) является альтернативой СТ.

Центральные лимфатические узлы. Если имелся признак увеличения центральных узлов (определяемый как диаметр больше 1,5 см по длинной оси или диаметр больше 1,0 см диаметром по короткой оси) и подтверждение поражения MF/SS с помощью биопсии (т. е. иссечение, тонкоигольная аспирация или кор-биопсия), то после этого все центральные узлы следовало отслеживать так же, как и периферические узлы (произведение самых длинных двухмерных измерений всех увеличенных узлов).

Определение ответа представлено в **таблице 25**.

Таблица 25. Ответ в лимфатических узлах.

Ответ	Определение ¹
Полный ответ	Все лимфатические узлы в наибольшем поперечном (по длинной оси) диаметре теперь составляли 1,5 см или меньше согласно способу, применяемому для оценки лимфатических узлов на исходном уровне или при отрицательном результате биопсии на лимфому; кроме того, лимфатические узлы, которые классифицировались N ₃ и имели размер 1,5 см или меньше по длинной оси и больше 1 см по короткой оси на исходном уровне, теперь должны были иметь размер 1 см или меньше по короткой оси или биопсия должна была быть отрицательной для лимфомы
Частичный ответ	Общее снижение на 50% или больше SPD каждого не соответствующего норме лимфатического узла на исходном уровне и отсутствие новых лимфатических узлов больше 1,5 см диаметром по длинной оси или больше 1,0 см диаметром по короткой оси, если длинная ось составляла 1-1,5 см диаметром
Стабильное заболевание	Неудачи в достижении критериев для CR, PR и PD

Прогрессирующее заболевание ²	увеличение на 50% или больше SPD от исходного уровня лимфатических узлов или любой новый узел размером больше 1,5 см по длинной оси или больше 1 см по короткой оси, если 1-1,5 см по длинной оси, что гистологически соответствовало N3, или утрата ответа: увеличение на больше чем 50% от самого низкого уровня SPD лимфатических узлов у пациентов с PR
Рецидив	Любой новый лимфатический узел больше 1,5 см по длинной оси у пациентов с CR гистологически соответствовал N ₃

CR: полный ответ; PD: прогрессирующее заболевание; PR: частичный ответ; SPD: сумма максимального линейного размера (большая ось) × самый длинный перпендикулярный размер (малая ось).

¹ Периферические и центральные лимфатические узлы.

² Какой критерий встречался первым.

Оценка заболеваний внутренних органов, определение балла и определение ответа Подтверждение биопсии на исходном уровне рекомендовалось для всех форм заболевания внутренних органов, за исключением поражений печени и селезенки, которые могли диагностироваться с помощью визуализирующих исследований. Следовало отметить, что аспирация костного мозга/трепанобиопсия не считались обязательными ни для заключения, ни для оценки ответа. Могли быть ограничения в подтверждении CR во внутренних органах только с помощью СТ, и в этих случаях могла потребоваться подтверждающая биопсия или ее отсутствие, оценка CR могла быть невозможна. Определение ответа представлено в **таблице 26**.

Таблица 26. Ответ во внутренних органах

Ответ	Определение
Полный ответ	Печень, селезенка или любой другой орган, считающийся пораженным на исходном уровне, не должны быть увеличены при физикальном обследовании и должны считаться нормальными при визуализации; при визуализации печени или селезенки не должно быть новообразований; любая опухоль после лечения должна быть определена с помощью биопсии как отрицательная в отношении лимфомы.
Частичный ответ	регрессия на 50% или больше любых новообразований селезенки или печени, или измеримого заболевания (SPD) в любых органах, не соответствующих норме на исходном уровне; отсутствие увеличения размера печени или селезенки

	и отсутствие новых участков поражения
Стабильное заболевание	Неудачи в достижении критериев для CR, PR или PD
Прогрессирующее заболевание ²	увеличение размера на более чем 50% (SPD) любых органов, пораженных на исходном уровне, или поражение нового органа, или утрата ответа: увеличение на больше чем 50% от самого низкого уровня в размере (SPD) любого пораженного вышеуказанного органа у пациента с PR
Рецидив	Поражение нового органа у пациентов с CR

CR: полный ответ; PR: частичный ответ; SPD: сумма максимального линейного размера (большая ось) × самый длинный перпендикулярный размер (малая ось); SD: стабильное заболевание; PD: прогрессирующее заболевание.

¹ Какой критерий встречался первым.

Оценка крови, определение балла и определение ответа. Абсолютное количество CD4⁺CD26⁻ клеток, определенное с помощью проточной цитометрии, являлось наиболее разумной количественной мерой потенциального поражения крови MF/SS. У субъектов с CD26⁺ Т-клетки с CD4⁺CD7⁻ являлись альтернативной популяцией для контроля.

На основе верхнего предела нормального значения 1600/мкл для клеток CD4 в крови, абсолютное количество менее чем 250/мкл CD4⁺/CD26⁻ или CD4⁺CD7⁻ клеток, по-видимому, являлось нормальным значением для этих субпопуляций CD4 и могло также использоваться для определения отсутствия или нормализации поражений крови (B₀). С другой стороны, абсолютное количество клеток Сезари являлось необязательным способом, когда мазки хорошего качества интерпретировались одним квалифицированным специалистом, при этом количество клеток Сезари ниже чем 250/мкл и выше чем 1000/мкл являлось приемлемым определяющим фактором B₀ и B₂.

Определение ответа представлено в **таблице 27**.

Таблица 27. Ответ в крови ¹

Ответ	Определение
Полный ответ ²	B ₀
Частичный ответ ³	снижение больше чем на 50% количественных измерений опухолевой массы в крови от исходного уровня у тех, кто имел высокую опухолевую массу на исходном уровне (B ₂).
Стабильное заболевание	Неудачи в достижении критериев для CR, PR или PD
Прогрессирующее заболевание ⁴	От B ₀ до B ₂ или увеличение больше чем на > 50% от исходного уровня и по

меньшей мере 5000 неопластических клеток/мкл или
 утрата ответа: у пациентов с PR, которые изначально были B2 на
 исходном уровне, увеличение больше чем на 50% увеличение от
 самого низкого уровня и по меньшей мере 5000 неопластических
 клеток/мкл.

Рецидив Увеличение количества неопластических лимфоцитов крови до
 В₁ или больше у пациентов с CR
 CR: полный

CR: полный ответ; PR: частичный ответ; SD: стабильное заболевание; PD: прогрессирующее заболевание.

¹ Как определено по абсолютному количеству неопластических клеток/мкл.

² Если биопсия костного мозга была выполнена на исходном уровне и было определено, что она однозначно свидетельствует о лимфоматозном поражении, то для подтверждения общей CR, когда оценка крови теперь соответствовала критериям В₀, повторная биопсия костного мозга не должна была показывать остаточное заболевание, или ответ следовало рассматривать только как PR.

³ Отсутствие PR у пациентов с заболеванием В₁ на исходном уровне, поскольку разница в диапазоне неопластических клеток, которые определяют В₁, не считалась значимой и не должна была влиять на определение общего объективного ответа.

⁴ Какое встречалось первым.

Определение общего балла ответа. Согласованный общий балл ответа на MF/SS представлен в **таблице 28**.

Таблица 28. Общий балл ответа

Общий балл¹	Определение	Кожа	Узлы	Кровь	Внутренние органы
CR	Полное исчезновение всех клинических признаков заболевания	CR	Все категории имели CR/NI		
PR	Регрессия поддающегося измерению заболевания	CR PR	Все категории не имели CR/NI и ни одна категория не имела PD Ни одна категория не имела PD, и если какая-либо категория участвовала на исходном уровне, то по меньшей мере 1 имела CR или PR.		
SD	Неудача в достижении	PR	Ни одна категория не имела PD, и		

	CR, PR или PD, характерных для всех заболеваний		если какая-либо категория была поражена на исходном уровне, то ни в одной не имелось CR или PR
PD	Прогрессирующее заболевание	SD	CR/NI, PR, SD в любой категории, и при этом ни одна категория не имела PD в какой-либо категории
Рецидив	Рецидив заболевания при предшествующем CR		Рецидив в любой категории

CR: полный ответ; NI: не поражено; PR: частичный ответ; PD: прогрессирующее заболевание; SD: стабильное заболевание.

¹ Рекомендовалось не только рассчитать долю субъектов, достигших ответа или неблагоприятного результата, но также составить таблицу выживания с учетом продолжительности интервала времени, в течение которого каждый субъект находился под наблюдением.

7. ЛЕЧЕНИЕ

7.1. Лимфодеплецирующая химиотерапия

Все субъекты получали LD химиотерапию перед инфузией CTX130. В состав LD-химиотерапии входят:

- ☐ флударабина 30 мг/м² IV ежедневно в 3 дозах и
- ☐ циклофосфида 500 мг/м² IV ежедневно в 3 дозах.

Взрослые пациенты с умеренным нарушением функции почек (CrCl 50-70 мл/мин./1,73 м²) должны были получать дозу флударабина, сниженную на по меньшей мере 20%, или в соответствии с местными инструкциями по медицинскому применению.

Оба средства начинают применять в один и тот же день и вводят в течение 3 последовательных дней. Субъекты должны начинать прохождение LD-химиотерапии в течение 7 дней после включения в исследование.

См. текущую полную информацию в отношении флударабина и циклофосфида для получения рекомендаций относительно хранения, получения, введения, инструкций по поддерживающей терапии и устранения токсичности, ассоциированной с LD химиотерапией.

LD химиотерапию можно было отложить при наличии любого из следующих признаков или симптомов.

- ☐ Изменение функционального статуса согласно ECOG до более 1.
- ☐ Значительное ухудшение клинического статуса, которое повышало потенциальный риск АЕ, ассоциированных с LD химиотерапией, например:
 - о клинически значимое ухудшение любой цитопении,
 - о клинически значимое повышение уровней трансаминаз (например, > 3 x ULN),
 - о клинически значимое повышение общего билирубина (например, > 2 x ULN) или

о клинически значимое повышение креатинина в сыворотке крови.

☐ Потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более 92%.

☐ Новая неконтролируемая сердечная аритмия.

☐ Гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами.

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

☐ Любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше).

7.2. Введение CTX130

Инфузию CTX130 следует отложить при наличии любого из следующих признаков или симптомов.

☐ Изменение функционального статуса согласно ECOG до более 1.

☐ Новая активная неконтролируемая инфекция.

☐ Значительное ухудшение клинического состояния увеличивало потенциальный риск АЕ, ассоциированных с инфузией аллогенных Т-клеток с CAR, например:

о клинически значимое повышение уровней трансаминаз (например, $> 3 \times \text{ULN}$),

о клинически значимое повышение общего билирубина (например, $> 2 \times \text{ULN}$) или

о клинически значимое повышение креатинина в сыворотке крови.

☐ Любая острая неврологическая токсичность (например, острая неврологическая токсичность степени 2 или больше).

CTX130 вводили через по меньшей мере 48 часов (но не более чем 7 дней) после завершения LD химиотерапии.

Учитывая потенциальную клиническую пользу, которая могла быть получена от повторного введения доз, текущее исследование давало возможность повторять введение доз CTX130 не более двух раз через 2 месяца после инфузии CTX130, чтобы иметь максимум 3 дозы в исследовании.

Повторное введение доз через 3 месяца после инфузии CTX130 могло произойти в следующих случаях.

☐ Прогрессирующее заболевание - в месяц 2 после инфузии CTX130, если наблюдались новые очаги или рост более чем на 20% (критерии ответа Лугано и ISCL), то следовало рассмотреть возможность повторного введения доз, если явление прогрессирования не представляло собой клинически угрожающий сценарий.

☐ Стабильное заболевание или частичный ответ - повторная доза; повторное введение доз происходило, если полная ремиссия не была достигнута к месяцу 3.

☐ Полная ремиссия - без повторного введения доз.

В некоторых случаях могли быть разрешены не более чем 2 повторных введения доз для субъектов с клетками CTX130. Чтобы рассматриваться для повторного введения доз, субъекты должны либо 1) достичь частичного ответа (PR) или полного ответа (CR) после начальной или второй инфузии CTX130 и впоследствии прогрессировать в течение 2 лет

после последней дозы, либо 2) или стабильного заболевания (SD) во время исследовательского визита в месяц 1 после самой последней инфузии CTX130 (решения о повторном введении доз основывались на локальных КТ-сканировании/оценке). Самое раннее время, когда субъекту могла быть назначена повторная доза, составляло 6 недель после первоначальной или второй инфузии CTX130.

Чтобы рассматривалось повторное введение доз субъекты должны были соответствовать следующим критериям.

- о Отсутствие DLT во время повышения дозы (если это применимо).
- о Отсутствие CRS 3 степени или более (например, 4), который не разрешался до 2 степени или менее (например, 2) в течение 72 часов после инфузии CTX130.
- о Отсутствие GVHD более 1 степени после инфузии CTX130.
- о Отсутствие ICANS 2 или более (степени например, 3 или более) после инфузии CTX130.
- о Соответствие критериям для LD химиотерапии и инфузии CTX130 (например, гемодинамически стабильное, отсутствие активных инфекций).

о Соответствие всем критериям эффекторных органов (например, печени, почки, сердца, легких, неврологических), как в критериях включения/исключения.

Перед каждым введением доз субъекты получали еще одну дозу LD химиотерапии. В частях А и В субъекту могла вводиться повторная доза не более двух раз через 3 месяца после инфузии CTX130, чтобы получить максимум 3 дозы в исследовании. В части А разрешалось повышение дозы внутри субъекта, если у субъекта не наблюдалось DLT при предшествующем уровне дозы и не наблюдалось DLT при последующем более высоком уровне дозы в течение периода оценки DLT. Повышение дозы внутри субъекта допускалось только один раз до последующего более высокого уровня дозы, если доза выводилась, и если субъект продолжал получать пользу и не нарушал ни одного из критериев повторного введения доз.

7.3. Осуществление контроля после инфузии CTX130

После инфузии CTX130 жизненно важные функции субъектов следует подвергать мониторингу каждые 30 минут в течение 2 часов после завершения инфузии или до разрешения любых потенциальных клинических симптомов.

Субъектов на этапе части А госпитализируют в течение как минимум 7 дней после инфузии CTX130. В рамках обеих частей А и В субъекты должны оставаться в непосредственной близости от исследовательского центра (т. е. в пределах 1-часового периода переезда) в течение по меньшей мере 28 дней после инфузии CTX130. Контроль видов острой токсичности, связанной с CTX130, должен происходить ТОЛЬКО в исследовательском центре.

Субъектов наблюдали на наличие признаков синдрома высвобождения цитокинов (CRS), синдрома лизиса опухоли (TLS), нейротоксичности, болезни "трансплантат против хозяина" (GvHD) и других нежелательных явлений (AE) в соответствии с графиком оценок (таблица 15 и таблица 16). Рекомендации по устранению видов токсичности, связанной с

Т-клетками с CAR, описаны в разделе 8. Субъекты должны оставаться госпитализированными до тех пор, пока степень негематологических видов токсичности, связанной с CTX130 (например, лихорадка, гипотензия, гипоксия, текущая неврологическая токсичность) не вернется к степени 1. Субъекты могут оставаться госпитализированными в течение более длительных периодов, если медицинские администраторы сочтут это необходимым.

7.4. Предшествующие и сопутствующие лекарственные препараты

7.4.1 Разрешенные лекарственные препараты

На протяжении всего исследования принимались необходимые поддерживающие меры для оптимального медицинского обслуживания, включая антибиотики IV для лечения инфекций, факторы роста, компоненты крови и т. д., за исключением запрещенных лекарственных препаратов, описанных в данном документе.

Лекарственные препараты для ингибирования деминерализации костей, такие как бифосфонаты или ингибитор RANKL, разрешались по усмотрению медицинского администратора для симптоматической терапии, включая гиперкальциемию.

Все виды сопутствующей терапии, включая рецептурные и безрецептурные лекарственные препараты, а также медицинские процедуры должны регистрироваться с даты подписания информированного согласия в течение 3 месяцев после инфузии CTX130. Начиная с 3 месяцев после инфузии CTX130 собирали только следующие выбранные сопутствующие лекарственные препараты: прививки, противораковые методы лечения (например, химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия), иммунодепрессанты (включая стероиды) и любые исследуемые средства.

7.4.2 Запрещенные лекарственные препараты

Следующие лекарственные препараты запрещены в течение определенных периодов исследования, как указано ниже:

Запрещенные в течение 28 дней до и через 3 месяца после инфузии CTX130

- ☐ Живые вакцины.
- ☐ Фитотерапия как часть традиционной китайской медицины или растительные лекарственные средства, не принадлежащие к отпускаемым без рецепта.

Запрещенные на протяжении всего исследования до начала новой противоопухолевой терапии

- ☐ Любая иммуносупрессивная терапия, если только она не рекомендована для лечения CRS или ICANS или если она предварительно не обсуждалась и не была одобрена медицинским администратором.

☐ После введения CTX130 следовало избегать терапии кортикостероидами в фармакологической дозе (более чем 10 мг/день преднизона или эквивалентных доз других кортикостероидов) и других иммуносупрессивных лекарственных средств, за исключением случаев, когда были медицинские показания для лечения новой токсичности или в виде части устранения CRS или нейротоксичности, ассоциированной с CTX130.

- ☐ Любая противораковая терапия (например, химиотерапия, иммунотерапия,

целевая терапия, облучение или другие исследуемые средства), кроме LD химиотерапии до прогрессирования заболевания. Паллиативная лучевая терапия для устранения симптомов разрешалась в зависимости от степени, дозы и участка(-ов). Участок(-и), доза и степень должны следовало определять и обсуждать с медицинским администратором для определения.

Запрещены в течение первого месяца после инфузии CTX130:

☐ Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) после инфузии CTX130 из-за потенциального ухудшения симптомов CRS; следовало соблюдать осторожность при введении гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) после CTX130.

☐ В течение периода оценки DLT (28 дней) самолечение субъекта жаропонижающими средствами (например, ацетаминофеном, аспирином).

Запрещенные за 3 месяца до и во время лечения с помощью CTX130 и до 6 месяцев после инфузии CTX130

☐ CCR-4-направленные антитела, такие как могамулизумаб, из-за повышенного риска GvHD.

8. КОНТРОЛЬ ТОКСИЧНОСТИ

8.1 Общее руководство

Субъектов следует подвергать тщательному мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней после инфузии CTX130. Сообщалось о случаях значительной токсичности средств терапии на основе аутологичных Т-клеток с CAR, и в соответствии с указаниями протокола требовался проактивный контроль и лечение всех нежелательных явлений (АЕ).

Следующие общие рекомендации предусмотрены на основании предшествующего опыта применения средств терапии на основе CD70-направленных аутологичных Т-клеток с CAR:

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

☐ Диагноз CRS должен быть основан на клинических симптомах, а НЕ на лабораторных значениях.

☐ В отношении субъектов, которые не отвечают на специфический в отношении CRS контроль, всегда предусматривают возможность наличия сепсиса и устойчивых инфекций. Субъектов следует постоянно оценивать в отношении устойчивых или вновь возникающих бактериальных инфекций, а также грибковых или вирусных инфекций.

☐ CRS, HLH и 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.

☐ ICANS может возникать во время CRS, в ходе разрешения CRS или после разрешения CRS. Оценивание и устранение ICANS проводили отдельно от CRS.

☐ Тоцилизумаб следует вводить в течение 2 часов с момента назначения.

Профиль безопасности СТХ130 постоянно оценивался на протяжении всего исследования.

8.2 Специфические рекомендации в отношении токсичности

8.2.1 Реакции в отношении инфузии

В испытаниях с аутологичными Т-клетками с CAR сообщалось о реакциях, связанных с инфузией, включая транзиторную лихорадку, озноб и/или тошноту, чаще всего возникающих в течение 12 часов после введения. Ацетаминофен (парацетамол) и гидрохлорид дифенгидрамина (или другое H1-антигистаминное средство) можно повторно вводить один раз в 6 часов после инфузии СТХ130, 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.

8.2.2 Профилактика инфекций и фебрильная реакция

Профилактика инфекции должна была проводиться в соответствии с установленным стандартом лечения пациентов с Т-клеточными или В-клеточными злокачественными образованиями. В случае фебрильной реакции следует начать оценку инфекции и надлежащий контроль для субъекта с помощью антибиотиков, жидкостей и других поддерживающих средств ухода, как это указано с медицинской точки зрения и определено лечащим врачом. Если лихорадка сохраняется, то следует учитывать вирусные и грибковые инфекции на протяжении всего времени контроля субъекта с помощью медицинских средств. Если у субъекта развивается сепсис или системная бактериемия после инфузии СТХ130, то следует начать выполнение соответствующих посевов и медикаментозный контроль. Кроме того, следовало учитывать CRS в любых случаях лихорадки после инфузии СТХ130 в течение 28 дней после инфузии.

Вирусный энцефалит (например, энцефалит, вызванный вирусом герпеса человека [HHV]-6) необходимо учитывать при дифференциальной диагностике у субъектов, у которых возникали нейрокогнитивные симптомы после получения СТХ130. Люмбальная пункция (LP) требуется при любой нейрокогнитивной токсичности 3-й или более высокой степени и настоятельно рекомендуется при явлениях 1-й и 2-й степени. Всякий раз, когда выполняют люмбальную пункцию, комиссия по инфекционным заболеваниям анализирует данные следующих оценок (как минимум): количественное тестирование в отношении HSV 1 и 2, энтеровируса, пареховируса человека, VZV, CMV и HHV-6. Люмбальную пункцию следует выполнять в течение 48 часов после появления симптомов, а результаты комиссии по инфекционным заболеваниям должны быть доступны в течение 4 дней после LP для их надлежащего контроля у субъекта.

8.2.3 Синдром лизиса опухоли (TLS)

Субъекты, получавшие терапию с использованием Т-клеток с CAR, могли подвергаться повышенному риску развития TLS. Субъектов необходимо подвергать

тщательному мониторингу в отношении TLS посредством лабораторных оценок и симптомов с начала LD химиотерапии и до 28 дня после инфузии CTX130. Субъектам с повышенным риском TLS следует с профилактической целью назначать аллопуринол (или отличную от аллопуринола альтернативу, такую как фебуксостат) и/или расбуриказу и повышенную пероральную/IV гидратацию во время скрининга и до начала LD химиотерапии. Профилактику можно прекратить через 28 дней после инфузии CTX130 или после того, как проходит риск развития TLS.

Исследовательские центры должны подвергать мониторингу и лечить TLS согласно установленному стандарту оказания помощи или согласно опубликованным руководствам (Cairo and Bishop, (2004) *Br J Haematol*, 127, 3-11). Контроль TLS, в том числе введение расбуриказы, следует начинать незамедлительно при наличии клинических показаний.

8.2.4 Синдром высвобождения цитокинов (CRS)

CRS представляет собой токсичность, связанную с иммунотерапией, включая Т-клетки с CAR, в результате высвобождения цитокинов, в частности IL-6 и IL-1 (Norelli et al., 2018). CRS возникал вследствие гиперактивации иммунной системы в ответ на вовлечение CAR целевого антигена, что приводило к повышению уровня многих цитокинов в результате быстрой стимуляции и пролиферации Т-клеток (Frey et al., 2014; Maude et al., 2014a).

Клиническое представление CRS могло быть легким и ограничиваться повышением температуры или могло включать одну или несколько систем органов (например, сердечную, желудочно-кишечную [GI], респираторную, кожную, центральную нервную) и множественные симптомы (например, высокую температуру, утомляемость, анорексия, тошноту, рвоту, сыпь, гипотензию, гипоксию, головную боль, делирий, спутанность сознания). CRS может быть опасным для жизни. Клинически CRS можно по ошибке принять за системную инфекцию или, в тяжелых случаях, за септический шок. Часто самым ранним признаком является повышенная температура, что требует немедленной дифференциальной диагностики и своевременного начала соответствующего лечения.

Целью контроля CRS является предупреждение опасных для жизни состояний и осложнений при сохранении потенциала противораковых эффектов CTX130. Симптомы обычно возникали через 1-14 дней после терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR злокачественных образований крови.

CRS следует идентифицировать и лечить исходя из клинической картины, а не лабораторных измерений. При подозрении на CRS следовало применять классификацию в соответствии с согласованными рекомендациями ASTCT (ранее известного как Американское общество трансплантации крови и костного мозга, ASBMT) (**таблица 29**; Lee et al., (2019) *Biol Blood Marrow Transplant* 25, 625-638), и устранение следовало осуществлять в соответствии с рекомендациями в **таблице 30**, которые адаптированы из опубликованных руководств (Lee et al., (2014) *Blood* 124, 188-95; Lee et al., (2019) *Biol Blood Marrow Transplant* 25, 625-638). Соответственно, оценку нейротоксичности приводили в соответствие с критериями ASTCT для ICANS.

Таблица 29. Оценивание CRS в соответствии с согласованными критериями ASTCT

Параметр CRS	Степень 1	Степень 2	Степень 3	Степень 4
Лихорадка ^a	Температура 38°C или больше	Температура 38°C или больше	Температура 38°C или больше	Температура 38°C или больше
С гипотензией	Отсутствует	Не требуется сосудосуживающих средств	Требуется вазопрессорное средство с вазопрессином или без него ^b	Требуется несколько вазопрессорных средств (за исключением вазопрессина) ^b
И/или ^c Гипоксия	Отсутствует	Требуется назальная канюля с низким потоком ^d или продувка	Требуется назальная канюля с высоким потоком ^d , лицевая маска, маска без дыхательной системы или маска Вентури	Требуется положительное давление (например, CPAP, BiPAP, интубация и искусственная вентиляция легких)

ASTCT: Американское общество трансплантологии и клеточной терапии; BiPAP: двухуровневое положительное давление в дыхательных путях; С: по Цельсию; CPAP: постоянное положительное давление в дыхательных путях; CRS: синдром высвобождения цитокинов.

^a Лихорадка определялась как температура 38°C или выше, не связанная с какой-либо другой причиной. У пациентов с CRS, которые затем получали жаропонижающие или антицитокиновые терапевтические средства, такие как астоцелизумаб или стероиды, лихорадка больше не учитывалась для степени тяжести последующего CRS. В данном случае оценивание CRS основано на гипотензии и/или гипоксии.

^b См. **таблицу 31** для получения информации о высоких дозах вазопрессорных средств.

^c Степень ХРС определялась более серьезным явлением: гипотензией или гипоксией, не связанными с какой-либо другой причиной. Например, пациент с температурой 39,5°C, гипотензией, требующей введения 1 сосудосуживающего средства, и

гипоксией, требующей назальной канюли с низким потоком, классифицировался как с CRS 3-й степени.

^d Назальная канюля с низким потоком определялась как доставка кислорода со скоростью 6 л/мин или меньше. Низкий поток также включает подачу кислорода посредством продувки, иногда используемую в педиатрии. Назальная канюля с высоким потоком определялась как доставка кислорода со скоростью больше 6 л/мин.

Примечание: Органные токсические явления, ассоциированные с CRS, могут быть оценены в соответствии с СТCAE версии 5.0, однако они не влияли на оценивание CRS.

Таблица 30. Руководство по оцениванию и контролю синдрома высвобождения цитокинов.

Тяжесть CRS ¹	Тоцилизумаб	Кортикостероиды	Контроль гипотензии
Степень 1	Можно было ² рассматривать тоцилизумаб	N/A	N/A
Степень 2	Ввести 8 мг/кг тоцилизумаба IV в течение 1 часа (но не более 800 мг). ² 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 всего 4 дозы.	Контроль в соответствии с установленными руководствами, если отсутствует улучшение после первоначальной терапии тоцилизумабом. Продолжить применение кортикостероидов до достижения явления, характеризующегося степенью, большей или равной 1, затем снижать дозу соответствующим образом.	Устранить в соответствии с руководящими принципами учреждения.

Степень 3	Как при 2 степени.	Как при 2 степени.	Устранить в соответствии с руководящими принципами учреждения.
Степень 4	Как при 2 степени. Если отсутствовал ответ на несколько доз тоцилизумаба и стероидов, то рассматривалось применение других антицитокиновых средств терапии (например, анакинры).	Как при 2 степени.	Устранить в соответствии с руководящими принципами учреждения.

CRS: синдром высвобождения цитокинов; IV: внутривенно; N/A: не применимо.

¹ См. (Lee et al., (2019) *Biol Blood Marrow Transplant* 25, 625-638)

² См. инструкцию по применению тоцилизумаба.

Таблица 31. Высокие дозы вазопрессорных средств.

Прессорное средство	Доза*
Монотерапия с применением норэпинефрина	20 мкг/мин или больше
Монотерапия с применением дофамина	10 мкг/кг/мин или больше
Монотерапия с применением фенилэфрина	200 мкг/мин или больше
Монотерапия с применением эпинефрина	10 мкг/мин или больше
В случае вазопрессина	Вазопрессин+эквивалент норэпинефрина 10 мкг/мин или больше**
В случае комбинации вазопрессорных	Эквивалент норэпинефрина 20 мкг/мин или

средств (не вазопрессин)	больше**
--------------------------	----------

* Все дозы необходимо вводить в течение периода, превышающего или равного 3 часам.

** Уравнение испытания эквивалента вазопрессорного средства 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. Субъекты, которые испытывали CRS 2 или большей степени, должны были подвергаться контролю посредством кардиотелеметрии и пульсоксиметрии. Для субъектов, испытывающих CRS 3-й степени, рассматривали возможность проведения эхокардиограммы для оценки сердечной функции. При CRS 3-й или 4-й степени рассматривали возможность поддерживающей терапии посредством интенсивной терапии. Следует учитывать потенциал основной инфекции в случаях тяжелого CRS, поскольку проявление (лихорадка, гипотензия, гипоксия) является сходным. Разрешение CRS определяли по разрешению лихорадки (температура $\geq 38^{\circ}\text{C}$), гипоксии и гипотензии (Lee et al., (2019) *Biol Blood Marrow Transplant* 25, 625-638).

8.2.4.1 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.

8.2.5 Синдром нейротоксичности, ассоциированной с иммунными эффекторными клетками (ICANS)

Нейротоксичность документировали у субъектов с В-клеточными злокачественными новообразованиями, получавших процедуры терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR. Нейротоксичность может возникать во время CRS, в ходе разрешения CRS или после разрешения CRS, и ее патофизиология остается неясной. Недавнее согласование ASTCT (ранее известное как ASBMT) дополнительно определил ICANS как 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., (2019) *Biol Blood Marrow Transplant* 25, 625-638). Признаки и симптомы могут быть прогрессирующими и могут включать без ограничения афазию, измененный уровень сознания, нарушение когнитивных навыков, моторную слабость, судорожные припадки и отек головного мозга. Классификацию ICANS (таблица 32) разрабатывали на основе критериев рабочей группы по токсичности, ассоциированной с терапией с использованием Т-клеток с CAR (CARTOX), которые ранее использовали в испытаниях аутологичных Т-клеток с CAR (Neelapu et al., (2018) *Nat Rev Clin Oncol* 15, 47-62). 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, называемого энцефалопатия, ассоциированная с иммунными эффекторными клетками (ICE) (**таблица 17**).

Оценка любого нового проявления нейротоксичности должна включать неврологическое обследование (включая инструмент для оценивания ICE, **таблица 17**), магнитно-резонансную томографию головного мозга (МРТ) и исследование CSF по клиническим показаниям. Если это было клинически возможно, то для люмбальной пункции, выполненной во время нейротоксичности, образцы спинномозговой жидкости следовало отправить в центральную лабораторию для исследования в отношении биомаркеров и в отношении наличия СТХ130 (с помощью ПЦР). Если МРТ головного мозга невозможно было провести, то все пациенты должны были пройти неконтрастную компьютерную томографию (СТ), чтобы исключить внутримозговое кровоизлияние. Электроэнцефалограмму также следует рассматривать по клиническим показаниям. В тяжелых случаях для защиты дыхательных путей может потребоваться эндотрахеальная интубация.

Неседативная противосудорожная профилактика (например, леветирацетам) могла рассматриваться, в частности, у субъектов с судорогами в анамнезе, в течение по меньшей мере 28 дней после инфузии СТХ130 или после разрешения неврологических симптомов (в случае если противосудорожный лекарственный препарат вносил вклад в проявление неблагоприятных симптомов). Субъекты, которые испытывали ICANS, характеризующийся степенью, составляющей 2 или больше, должны подвергаться мониторингу с помощью 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 32** представлены критерии оценивания нейротоксичности, и в **таблице 33** 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 32. Оценивание ICANS.

Домен	Степень 1	Степень 2	Степень 3	Степень 4
нейротоксичности				
Балльная оценка ICE ¹	7-9	3-6	0-2	0 (субъект невосприимчив и не

				может пройти оценку ICE)
Подавленный уровень сознания ²	Пробуждает ся 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 генерализован ный, который быстро разрешается, или неконвульсивн ые судорожные припадки на EEG, которые разрешаются посредством вмешательства	Опасный для жизни продолжительный судорожный припадок (> 5 мин) или повторяющиеся клинические или электрические судорожные припадки без возврата к исходному уровню в промежутках между ними
Двигательные отклонения ³	N/A	N/A	N/A	Глубокая очаговая моторная слабость, такая как гемипарез или параспарез

Повышенное ICP/отек головного мозга	N/A	N/A	Очаговый/локальный отек при нейровизуализации ⁴	Диффузный отек головного мозга при нейровизуализации, дещеребрационная 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 иммунными эффекторными клетками (инструмент для оценки); 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 33. 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 явления $\leq$ 1-й степени, 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 явления $\leq$ 1-й степени, 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 CTCAE v5.0.

8.2.6 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, возникает в период 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 уровня CRP и ферритина может способствовать постановке диагноза и определению клинического течения.

При подозрении на наличие HLH:

- ☐ часто подвергать мониторингу параметры свертывания крови, в том числе уровень фибриногена. Эти тесты можно проводить чаще, чем указано в графике процедур оценки, 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 следовало контролировать с применением руководства для лечения CRS в **таблице 29**.

8.2.7 Виды длительной цитопении

Сообщалось о нейтропении и тромбоцитопении 3 степени, которые иногда продолжались более чем 28 дней после инфузии Т-клеток с CAR у субъектов, получавших аутологичные продукты на основе Т-клеток с CAR (Kymriah US prescribing information [USPI], 2018; Raje et al., (2019) *N Engl J Med* 380, 1726-37; Yescarta USPI, 2019). Следовательно, субъектов, получающих CTX130, следует подвергать мониторингу в отношении видов токсичности и оказывать соответствующую поддержку. Осуществлять мониторинг пациентов в отношении уровней тромбоцитов и признаков коагулопатии и соответствующим образом осуществлять трансфузию препаратов крови для снижения риска кровоизлияния. Следует рассматривать возможность осуществления противомикробной и противогрибковой профилактики для любого субъекта с длительной нейтропенией.

Вследствие временной экспрессии CD70 на активированных Т- и В-лимфоцитах могла возникнуть оппортунистическая инфекция, такая как реактивация вирусной инфекции. Оппортунистические инфекции следовало рассматривать в случае появления клинических симптомов.

Во время повышения дозы уровень G-CSF можно рассматривать в случаях нейтропении 4-й степени после инфузии CTX130. Во время расширения когорты G-CSF можно вводить с осторожностью по усмотрению лечащего врача.

8.2.8 Болезнь "трансплантат против хозяина" (GvHD)

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 и водянистую или кровавую диарею и схваткообразную боль в животе (Zeiser and Blazar, (2017) *N Engl J Med*, 377, 2167-2179).

В поддержку предусмотренного клинического исследования было проведено неклиническое исследование GvHD и переносимости в соответствии с GLP на мышах с ослабленным иммунитетом, получавших 2 дозы IV: высокая доза 4×10^7 клеток CTX130 на мышь (примерно $1,6 \times 10^9$ клеток/кг) и низкая доза 2×10^7 клеток на мышь (примерно $0,8 \times 10^9$ клеток/кг). Оба уровня дозы превышали предусмотренную наивысшую клиническую дозу в более чем 10 раз при нормализации по весу тела. Ни у одной из мышей, получавших CTX130, не развилась фатальная GvHD в течение 12-недельного исследования. При вскрытии у некоторых животных наблюдали инфильтрацию мононуклеарными клетками в мезентериальном лимфатическом узле и тимусе. В легких некоторых животных также наблюдали периваскулярное воспаление от минимального до легкого. Эти результаты согласовались с легкой GvHD, но не проявлялись клиническими симптомами у этих мышей.

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 $< 0,4\%$ TCR+ клеток в конечном продукте. Предел дозы, составляющий 7×10^4 TCR+ клеток/кг, использовался 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 CTX130 должен быть низким, хотя фактическая распространенность является неизвестной. Однако учитывая, что экспансия Т-клеток с CAR контролируется антигенами, и вероятно происходила только в случае TCR-клеток, маловероятно, что количество TCR+ клеток могло значительно превышать 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 34**.

Таблица 34. 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".

Общую степень GvHD определяли 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.

Рекомендации по устранению острой GvHD указаны в **таблице 35**. Для обеспечения сопоставимости между субъектами в конце испытания, эти рекомендации должны выполняться, за исключением конкретных клинических сценариев, в которых их соблюдение могло подвергнуть субъекта риску.

Таблица 35. 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 могло основываться на клинической оценке и местной практике.

Контроль рефрактерной острой GvHD или хронической GvHD осуществляли в соответствии с установленными руководствами. При лечении субъектов иммуносупрессантами (включая стероиды) следует принимать меры противоинфекционной профилактики согласно местным руководствам.

8.2.9 Проявления видов целевой токсичности вне опухоли

8.2.9.1 Активность CTX130 в отношении активированных Т- и В-лимфоцитов, дендритных клеток

Активированные Т- и В-лимфоциты кратковременно экспрессируют CD70, и дендритные клетки, а также эпителиальные клетки тимуса, в определенной степени экспрессируют CD70. Таким образом, эти клетки могли стать мишенью для активированных CTX130.

8.2.9.2 Активность CTX130 в отношении остеобластов

Активность CTX130 выявляли в доклинических исследованиях в культуре клеток первичных остеобластов человека. Таким образом, костный обмен контролировался по уровням кальция, а также по 2 маркерам, специфичным для остеобластов, аминоконцевому пропептиду проколлагена I типа (PINP) и специфической в отношении кости щелочной фосфатазы (BSAP), которые считались наиболее полезными маркерами при оценке формирования кости (Fink et al., (2000) *Osteoporosis* 11, 295-303). Доступны стандартизированные анализы для оценки обоих маркеров в сыворотке крови. Концентрация этих пептидных маркеров отражает активность остеобластов и образование нового костного коллагена. PINP и BSAP измеряли с помощью центральной лабораторной оценки при скрининге, на исходном уровне, в дни 7, 14, 21 и 28, а также в месяцы 3, 6 и 12 исследования (**таблица 15**). Образцы должны были собирать в одно и то же время дня (± 2 часа) в указанные дни сбора из-за сильного влияния циркадных ритмов на костный метаболизм.

8.2.9.3 Активность CTX130 в отношении эпителия, подобного эпителию почечных канальцев

Активность CTX130 в отношении эпителиальных клеток, подобных клеткам почечных канальцев, выявляли в неклинических исследованиях CTX130 в первичном эпителии человеческой почки. Следовательно, субъекты должны были находиться контролироваться в отношении острого повреждения канальцев посредством осуществления контроля повышения уровня креатинина в сыворотке крови на по меньшей мере 0,3 мг/дл (26,5 мкмоль/л) в течение 48-часового периода и/или в 1,5 или более раз выше исходного значения в течение предыдущих 7 дней. Креатинин сыворотки оценивался ежедневно в течение первых 7 дней после инфузии CTX130, через день между днем 8 и днем 14 лечения, а затем два раза в неделю до дня 28 (**таблица 14**). При подозрении на

острое повреждение почечных канальцев следовало провести дополнительные исследования, в том числе анализ осадка мочи и определение фракционной экскреции натрия в моче, а также начать консультацию у нефролога.

9. СТАТИСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

9.1 Размер выборки

В части А (увеличение дозы) размер выборки составлял от примерно 6 до 24 субъектов, подлежащих оценке DLT, в зависимости от количества оцениваемых уровней доз и возникновения DLT.

В части В (расширение когорты) могла использоваться 2-стадийная схема Minimax Саймона, и при этом можно было включить в исследование не более 21 субъекта с DLBCL.

9.2 Наборы для анализа

Часть А (повышение дозы)

□ Набор для оценки DLT включал всех субъектов, которые получали CTX130 и находились под наблюдением в течение по меньшей мере 28 дней после инфузии или после проявления DLT.

Часть А+часть В

□ **Набор для анализа безопасности (SAS):** все субъекты, которые были включены в исследование и получили как минимум 1 дозу исследуемого препарата. Субъектов классифицировали в соответствии с полученным лечением, где полученное лечение определялось как назначенные уровень дозы/схема, если они были получены хотя бы один раз, или первый полученный уровень дозы/схема, если назначенное лечение никогда не получалось. SAS был основным набором для анализа данных безопасности.

□ **Полный набор для анализа (FAS):** Все субъекты, которые были включены в исследование, и получили инфузию CTX130, и прошли по меньшей мере 1 оценку сканирования на исходном уровне и 1 оценку после исходного уровня. FAS являлся основным набором анализов для оценки клинической активности.

9.3 Конечные точки

9.3.1 Первичные конечные точки

□ **Часть А (повышение дозы):** Частота нежелательных явлений (AE), определяемая как виды дозолимитирующей токсичности (DLT), и определение RPBD.

□ **Часть В (расширение когорты):** Частота объективного ответа (ORR) согласно (полный ответ [CR] + частичный ответ [PR]) в соответствии с критериями ответа Лугано (Cheson et al., (2014) *J Clin Oncol* 32, 3059-68) для субъектов с DLBCL по оценке независимого централизованного радиологического обзора.

9.3.2 Вторичные конечные точки

8.3.2.1 Эффективность

Часть А. Оценка эффективности согласно критериям ответа Лугано (Cheson et al., (2014) *J Clin Oncol* 32, 3059-68) для субъектов с PTCL-NOS, ALCL, лейкозной и лимфоматозной ATLL, AITL и DLBCL, а также согласно критериям ответа ISCL (Olsen et al., 2011) для субъектов с SS или MF;

Часть В. Оценки эффективности согласно критериям ответа Лугано (Cheson et al., (2014) *J Clin Oncol* 32, 3059-68) для субъектов с DLBCL:

☐ Наилучший ответ у субъекта (полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабильное заболевание (SD), прогрессирующее заболевание (PD) или отсутствие оценки (NE)).

☐ Частота объективного ответа (ORR), определяемая как процент субъектов, достигших CR или PR.

☐ Время до ответа (TTR), определяемое как время между датой инфузии CTX130 и первым документально подтвержденным ответом (PR/CR).

☐ Продолжительность ответа (DoR), определяемая как время между первым объективным ответом PR/CR и датой прогрессирования заболевания или смерти по любой причине. Сообщалось только для субъектов, у которых были явления PR/CR.

☐ Выживаемость без прогрессирования (PFS), определенная как разница между датой инфузии CTX130 и датой прогрессирования заболевания или смерти по любой причине.

☐ Общая выживаемость (OS), определяемая как время между датой введения CTX130 и смертью по любой причине.

☐ Коэффициент контроля заболевания (DCR), определяемый как процент субъектов, достигших CR, PR или SD.

☐ Время до прогрессирования (TTP), определяемое как разница между датой инфузии CTX130 и датой PD.

9.3.2.2 Безопасность

☐ Частота и тяжесть АЕ и клинически значимых лабораторных отклонений.

9.3.2.3 Фармакокинетика

☐ Уровни CTX130 в крови с течением времени.

9.3.2.4 Конечные точки исследования (части А и В)

☐ Уровни CTX130 в тканях.

☐ Уровни цитокинов в крови и других тканях.

☐ Частота возникновения антител к CTX130.

☐ Влияние антицитокиновой терапии на пролиферацию CTX130, CRS и ответ.

☐ Частота аутологичной или аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) после терапии с использованием CTX130.

☐ Частота и тип последующей противораковой терапии.

☐ Время до полного ответа (CR), определяемое как время между датой инфузии CTX130 и первым документально подтвержденным CR.

☐ Время до прогрессирования заболевания (PD), определяемое как время между датой инфузии CTX130 и первыми признаками прогрессирования заболевания.

☐ Изменения уровней клеток ATLL в периферической крови, контролируемые с помощью иммунофенотипирования на основе маркеров, таких как CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD52, и провирусная нагрузка HTLV-1.

- ☐ Оценка ответа и степень соответствия централизованной проверке.
- ☐ Выживаемость без первой последующей терапии, определяемая как время между датой инфузии CTX130 и датой первой последующей терапии или смерти по любой причине.
- ☐ Изменение PRO от исходного уровня, измеренное Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC) с помощью опросников QLQ-30, EQ-5D-5L, FACT-G, опросника Skindex-29 для SS и MF и опросника Дерматологического индекса качества жизни (DLQI) для SS и MF.
- ☐ Изменение когнитивных показателей от исходного уровня согласно оценке ICE.
- ☐ Другие геномные, белковые, метаболические или фармакодинамические конечные точки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

К настоящему времени все субъекты, которые участвовали в данном исследовании, завершили стадию 1 (скрининг в отношении соответствия требованиям) в течение 14 дней. После соответствия критериям требования двое субъектов начинали лимфоплецирующую терапию в течение 24 часов после завершения стадии 1. Все субъекты, соответствующие критериям, завершали период скрининга (стадия 1) и начинали LD химиотерапию в течение менее чем 8 дней, при этом один субъект завершал скрининг и начинал получать дозу химиотерапии LD в течение 72 часов. Один субъект, получавший LD химиотерапию, уже переходил на получение дозы DL1 CTX130 в течение 5 дней после завершения LD химиотерапии.

До сих пор ни у одного из получавших лечение субъектов в данном исследовании не было выявлено каких-либо DLT. Точно так же не наблюдались DTL в параллельном исследовании с использованием CTX130 для лечения субъектов с RCC. См., например, заявку на патент США № 62/934961, поданную 13 ноября 2019 г., и заявку на патент США № 63/034552, поданную 4 июня 2020 г. Кроме того, терапия с использованием аллогенных Т-клеток с CAR проявляла требуемые фармакокинетические характеристики у подвергнутых лечению субъектов-людей, включая экспансию и персистенцию Т-клеток с CAR после инфузии. Значительное распределение, увеличение количества и персистенцию Т-клеток с CAR наблюдали уже в DL1. У одного субъекта с Т-клеточной лимфомой, обследованного на дату исследования, наблюдалось не более чем 20-кратное увеличение количества CTX130 в периферической крови выше T_0 , а персистенцию клеток CTX130 наблюдали у субъектов с DL1 не более 14 дней после инфузии. Аналогичные закономерности распределения, размножения и персистенции Т-клеток с CAR наблюдались в соответствующем исследовании RCC CTX130, где наблюдалось 87-кратное размножение CTX130, а клетки CTX130 выявлялись в течение по меньшей мере 28 дней после инфузии.

Субъекты, соответствующие критериям, в данном исследовании имели MF с крупноклеточной трансформацией. Результаты, полученные от первого субъекта с Т-клеточной лимфомой, суммированы ниже.

- ☐ У субъекта, получавшего дозу DL1, наблюдалось значительное уменьшение

кожных очагов, как это задокументировано на фотографии, в соответствии с критериями Ольсона/ISCL для оценки ответа кожной Т-клеточной лимфомы. Кроме того, ПЕТ/СТ-сканирование через 4 недели после инфузии СТХ130 у того же субъекта выявило резкое уменьшение узловых и кожных очагов, при этом большинство очагов полностью исчезли, что соответствует формальному частичному метаболическому ответу.

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. В целом, термин "или", используемый в данном документе, следует интерпретировать только как указывающий на исключаящие 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.

Термин "приблизительно" или "примерно" означает нахождение конкретного значения в пределах приемлемого диапазона ошибок, определенного специалистом средней квалификации в данной области, который будет частично зависеть от того, каким образом значение измеряют или определяют, т. е. ограничений системы измерения. Например, термин "приблизительно" может означать в пределах приемлемого стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области. В качестве альтернативы термин "приблизительно" может означать диапазон, составляющий не более $\pm 20\%$, предпочтительно не более $\pm 10\%$, более предпочтительно не более $\pm 5\%$ и еще более предпочтительно не более $\pm 1\%$ от заданного значения. В качестве альтернативы, в частности, в отношении биологических систем или процессов, термин может означать в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 2-кратного значения. Когда в настоящей заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, если не указано иное, термина "приблизительно" является подразумеваемым, и в данном контексте для конкретного значения означает нахождение в пределах приемлемого диапазона ошибок.

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 злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток, при этом способ включает:

(i) подвергание пациента-человека, имеющего злокачественное новообразование из гемопоэтических клеток, первой процедуре лечения с применением лимфодеплеции;

(ii) введение пациенту-человеку первой дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток после стадии (i), где популяция генетически сконструированных Т-клеток содержит Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD70, нарушенный ген *TRAC*, нарушенный ген $\beta 2M$ и нарушенный ген *CD70*, и где нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, встроена в нарушенный ген *TRAC*.

2. Способ по п. 1, где первая процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (i) предусматривает совместное введение пациенту-человеку флударабина при 30 мг/м² и циклофосфида при 500 мг/м² в день внутривенно в течение трех дней.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где до стадии (i) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков:

- (a) изменение функционального статуса согласно ECOG до более 1,
- (b) значительное ухудшение клинического статуса,
- (c) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 92%,
- (d) неконтролируемая сердечная аритмия,
- (e) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами,
- (f) активная инфекция и
- (g) любая острая неврологическая токсичность.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где стадию (i) осуществляют за приблизительно 2-7 дней до стадии (ii).

5. Способ по любому из пп. 1-4, где стадию (ii) осуществляют посредством введения популяции генетически сконструированных Т-клеток пациенту-человеку внутривенно в первой дозе, которая составляет от приблизительно 1×10^7 CAR⁺ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток, необязательно от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где до стадии (ii) и после стадии (i) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков:

- (a) изменение функционального статуса согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG) до более 1,
- (b) активная неконтролируемая инфекция,
- (c) значительное ухудшение клинического статуса и
- (d) любая острая неврологическая токсичность.

7. Способ по любому из пп. 1-6, дополнительно включающий (iii) мониторинг пациента-человека в отношении развития острой токсичности после стадии (ii).

8. Способ по п. 7, где острая токсичность предусматривает синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность, синдром лизиса опухоли, GvHD, внеопухолевую токсичность, специфическую в отношении мишени, и/или неконтролируемую пролиферацию Т-клеток.

9. Способ по любому из пп. 1-8, дополнительно включающий (iv) подвергание пациента-человека второй процедуре лечения с применением лимфодеплеции и (v) введение пациенту-человеку второй дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток после стадии (ii), где необязательно вторую дозу вводят через от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет после введения первой дозы, и где необязательно у пациента-человека не проявляются одно или несколько из следующего после стадии (ii):

- (a) дозолимитирующей токсичности (DLT),
- (b) CRS степени 4, который не разрешается до степени 2 в течение 72 часов,
- (c) GvHD более чем 1 степени,
- (d) нейротоксичности степени 3 или больше,
- (e) активной инфекции,
- (f) гемодинамической нестабильности и
- (g) дисфункции органов.

10. Способ по п. 9, где вторая процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (iv) предусматривает совместное введение пациенту-человеку флударабина при 30 мг/м² и циклофосфида при 500 мг/м² в день внутривенно в течение 1-3 дней.

11. Способ по п. 9 или п. 10, где стадию (v) осуществляют через 2-7 дней после стадии (iv).

12. Способ по любому из пп. 9-11, где стадию (v) осуществляют посредством введения популяции генетически сконструированных Т-клеток пациенту-человеку внутривенно во второй дозе, которая составляет от приблизительно 1×10^7 CAR⁺ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток, необязательно от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток.

13. Способ по любому из пп. 9-12, где способ дополнительно включает (vi) подвергание пациента-человека третьей процедуре лечения с применением лимфодеплеции и (vii) введение пациенту-человеку третьей дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток, где необязательно пациент-человек получает первую, вторую и третью дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток в течение трех месяцев, и где необязательно у пациента-человека не проявляются одно или несколько из следующего после стадии (v):

- (a) дозолимитирующей токсичности (DLT),
- (b) CRS степени 4, который не разрешается до степени 2 в течение 72 часов,
- (c) GvHD более чем 1 степени,
- (d) нейротоксичности степени 3 или больше,
- (e) активной инфекции,
- (f) гемодинамической нестабильности и

(g) дисфункции органов.

14. Способ по п. 13, где третья процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (vi) предусматривает совместное введение пациенту-человеку флударабина при 30 мг/м² и циклофосфида при 500 мг/м² в день внутривенно в течение 1-3 дней.

15. Способ по п. 13 или п. 14, где стадию (vii) осуществляют через 2-7 дней после стадии (vi).

16. Способ по любому из пп. 13-15, где стадию (vii) осуществляют посредством введения популяции генетически сконструированных Т-клеток пациенту-человеку внутривенно в третьей дозе, которая составляет от приблизительно 1×10^7 CAR⁺ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток, необязательно от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток.

17. Способ по любому из пп. 9-16, где у пациента-человека проявляется стабильное заболевание или прогрессирование заболевания.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляют 1×10^7 CAR⁺ клеток, 3×10^7 CAR⁺ клеток, 1×10^8 CAR⁺ клеток, 3×10^8 CAR⁺ клеток или 1×10^9 CAR⁺ клеток, где необязательно первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляют $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток, $4,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток, 6×10^8 CAR⁺ клеток, $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток или 9×10^8 CAR⁺ клеток.

19. Способ по любому из пп. 9-18, где первая доза популяции генетически сконструированных Т-клеток является такой же, как вторая и/или третья дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток.

20. Способ по любому из пп. 9-18, где первая доза популяции генетически сконструированных Т-клеток является более низкой, чем вторая и/или третья дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где пациент-человек подвергался предшествующей противораковой терапии.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где у пациента-человека имеются рецидивирующие или рефрактерные злокачественные новообразования из гемопоэтических клеток.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где у пациента-человека имеется Т-клеточное злокачественное новообразование, которое необязательно выбрано из группы, состоящей из кожной Т-клеточной лимфомы (CTCL), периферической Т-клеточной лимфомы (PTCL) и Т-клеточного лейкоза.

24. Способ по п. 23, где CTCL представляет собой синдром Сезари (SS) или фунгоидный микоз (MF), где необязательно у пациента-человека имеется MF стадии Ib или выше, необязательно трансформированная крупноклеточная лимфома.

25. Способ по п. 23, где PTCL представляет собой ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому (AITL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), Т-клеточный лейкоз или лимфому взрослых (ATLL) или неуточненную PTCL (PTCL-NOS).

26. Способ по п. 25, где у пациента-человека имеется PTCL, ATLL или AITL, и системная терапия первой линии была неэффективной.

27. Способ по п. 25 или п. 26, где у пациента-человека имеется ALCL, и комбинированная терапия, предусматривающая брeutуксимаб ведотин, была неэффективной.

28. Способ по п. 27, где у пациента-человека имеется ALK⁺ ALCL, и две предшествующие линии терапии, одна из которых предусматривает брeutуксимаб ведотин, были неэффективными.

29. Способ по п. 27, где у пациента-человека имеется ALK⁻ ALCL, и одна предшествующая линия терапии была неэффективной.

30. Способ по п. 24, где у пациента-человека имеется MF или SS, и предшествующая системная терапия или предшествующая терапия с применением могамулизумаба были неэффективными.

31. Способ по любому из пп. 1-22, где у пациента-человека имеется В-клеточное злокачественное новообразование, которое необязательно представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) или мантийноклеточную лимфому (MCL).

32. Способ по п. 31, где у пациента-человека имеется DLBCL, и предшествующая терапия с применением Т-клеток с CAR к CD19 была неэффективной.

33. Способ по любому из пп. 1-22, где у пациента-человека имеется злокачественное новообразование из миелоидных клеток, которое необязательно представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML).

34. Способ по любому из пп. 1-33, где пациент-человек не подвергался лечению с применением могамулизумаба за по меньшей мере три месяца до введения первой дозы популяции генетически модифицированных Т-клеток.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где у пациента-человека имеются CD70⁺ опухолевые клетки.

36. Способ по п. 35, где у пациента-человека имеется по меньшей мере 10% CD70⁺ опухолевых клеток в биологическом образце, полученном от пациента-человека.

37. Способ по п. 36, где биологический образец представляет собой образец опухолевой ткани, и уровень CD70⁺ опухолевых клеток измеряют посредством иммуногистохимического анализа (ИHC).

38. Способ по п. 37, где биологический образец представляет собой образец крови или образец костного мозга, и уровень CD70⁺ опухолевых клеток определяют посредством проточной цитометрии.

39. Способ по любому из пп. 35-38, где способ дополнительно включает перед стадией (i) идентификацию пациента-человека, имеющего CD70⁺ опухолевые клетки, участвующие в формировании злокачественного новообразования из гемопоэтических клеток, которое необязательно представляет собой Т-клеточное злокачественное новообразование, В-клеточное злокачественное новообразование или злокачественное новообразование из миелоидных клеток.

40. Способ по любому из пп. 1-39, где пациента-человека подвергают антицитокиновой терапии.

41. Способ по любому из пп. 1-40, где пациент-человек характеризуется одним или несколькими из следующих признаков:

- (a) приемлемое функционирование органов,
- (b) отсутствие предшествующей трансплантации стволовых клеток (SCT),
- (c) отсутствие предшествующей терапии с применением средства, нацеливающегося на CD70, или адоптивной терапии с применением Т-клеток или НК-клеток,
- (d) отсутствие известного противопоказания к терапии с применением лимфодеплеции,
- (e) отсутствие Т-клеточных или В-клеточных лимфом со злокачественным выпотом в настоящем или прошлом, который является симптоматическим или был симптоматическим,
- (f) отсутствие гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH),
- (g) отсутствие злокачественного новообразования или нарушений в центральной нервной системе,
- (h) отсутствие нестабильной стенокардии, аритмии и/или инфаркта миокарда,
- (i) отсутствие сахарного диабета,
- (j) отсутствие неконтролируемых инфекций,
- (k) отсутствие иммунодефицитных нарушений или аутоиммунных нарушений, требующих иммуносупрессивной терапии, и
- (l) отсутствие трансплантации солидных органов.

42. Способ по любому из пп. 1-41, где пациента-человека подвергают мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней в отношении развития токсичности после каждого введения популяции генетически сконструированных Т-клеток.

43. Способ по п. 42, где пациента-человека подвергают контролю токсичности, если наблюдается развитие токсичности.

44. Способ по любому из пп. 1-43, где пациент-человек является взрослым.

45. Способ по любому из пп. 1-44, где CAR, который связывает CD70, содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен CD8, костимулирующий домен 4-1BB и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ , и где внеклеточный домен представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), который связывает CD70.

46. Способ по п. 45, где scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий SEQ ID NO: 49, и переменный домен легкой цепи (V_L), содержащий SEQ ID NO: 50.

47. Способ по п. 46, где scFv содержит SEQ ID NO: 48.

48. Способ по любому из пп. 45-47, где CAR содержит SEQ ID NO: 46.

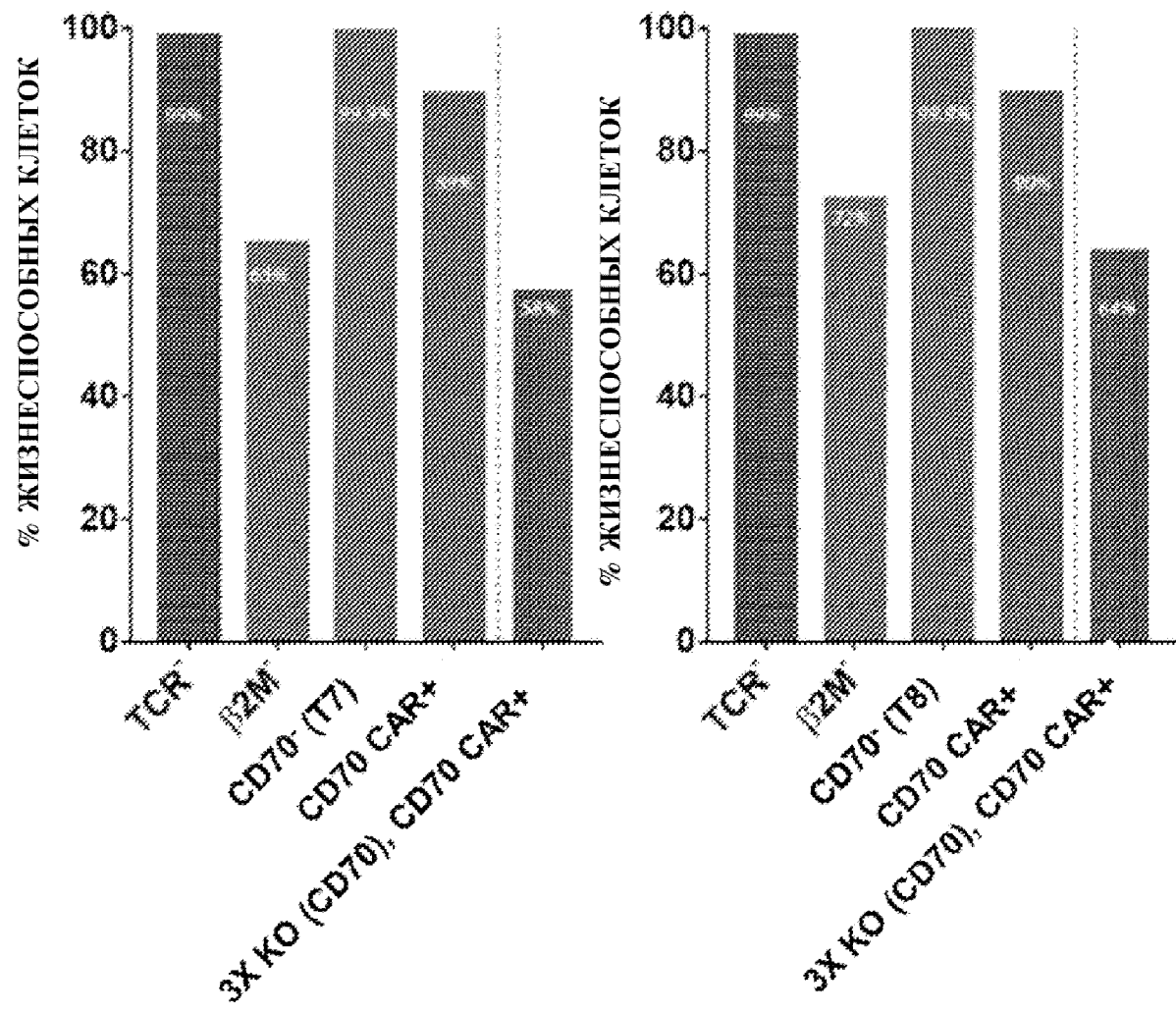
49. Способ по любому из пп. 1-48, где нарушенный ген *TRAC* получают с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9, которая содержит направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

50. Способ по п. 49, где нарушенный ген *TRAC* характеризуется делецией области, на которую нацеливается спейсерная последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9 или ее часть.

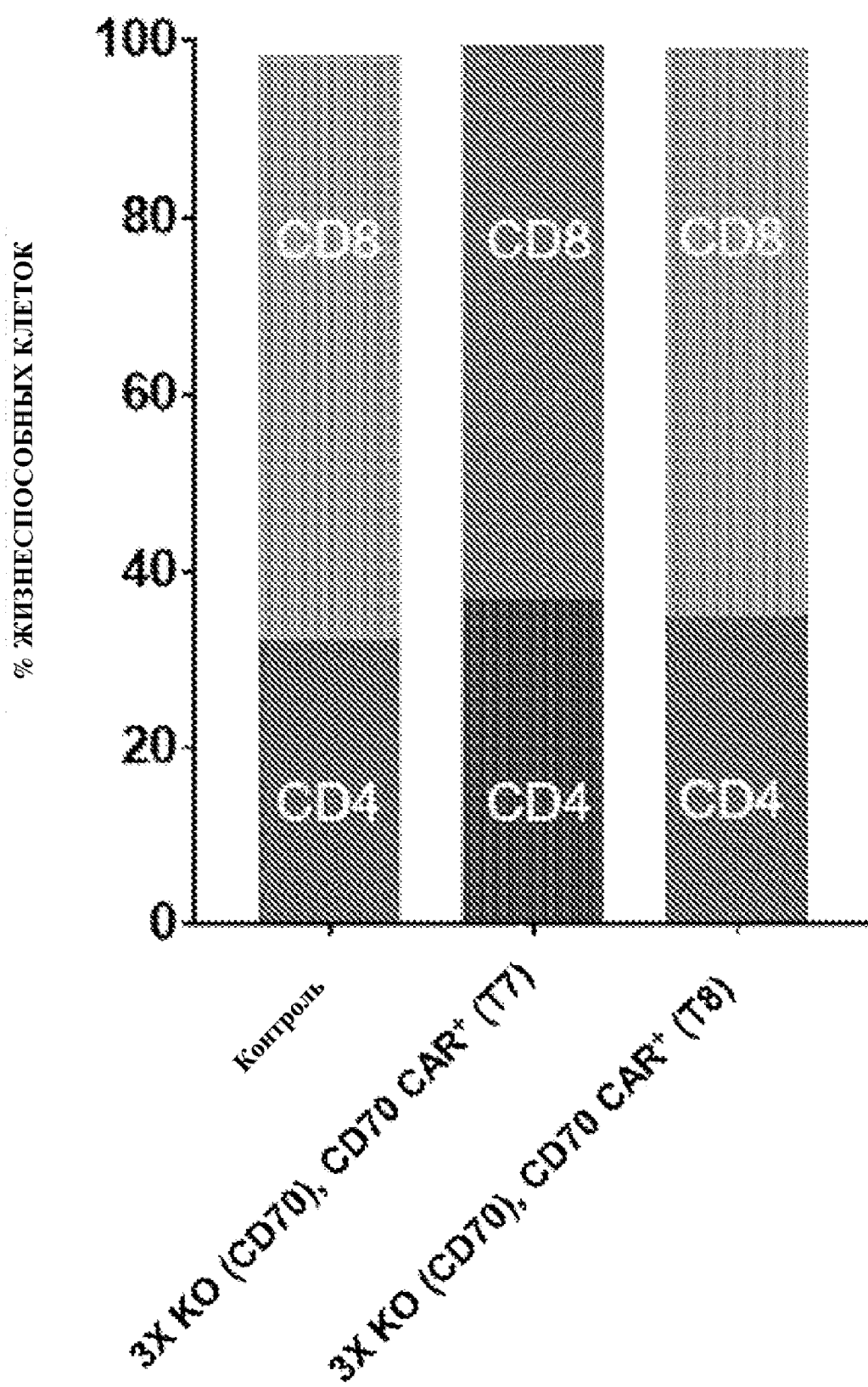
51. Способ по любому из пп. 1-50, где нарушенный ген $\beta 2M$ получают с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9, которая содержит направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 12 или 13.

52. Способ по любому из пп. 1-51, где нарушенный ген CD70 получают с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9, которая содержит направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 4 или 5.

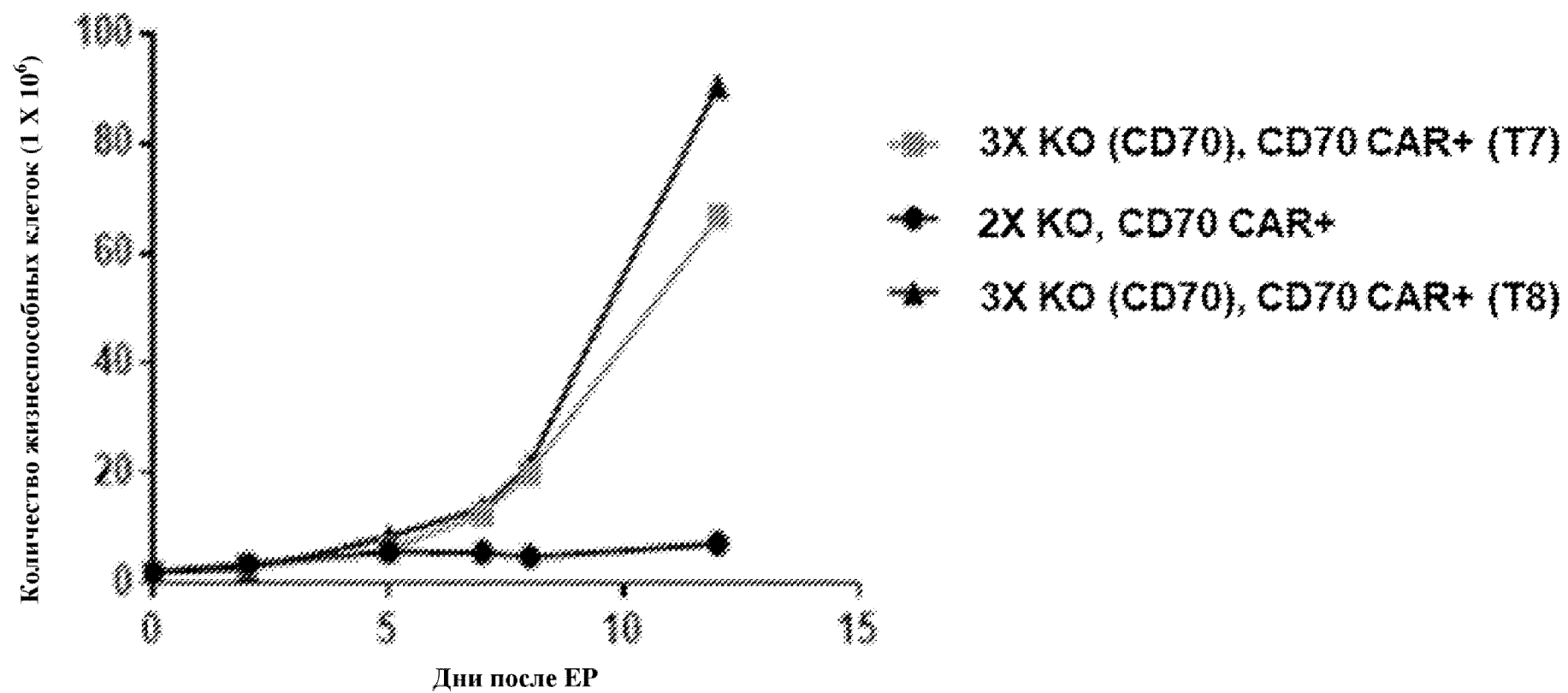
По доверенности



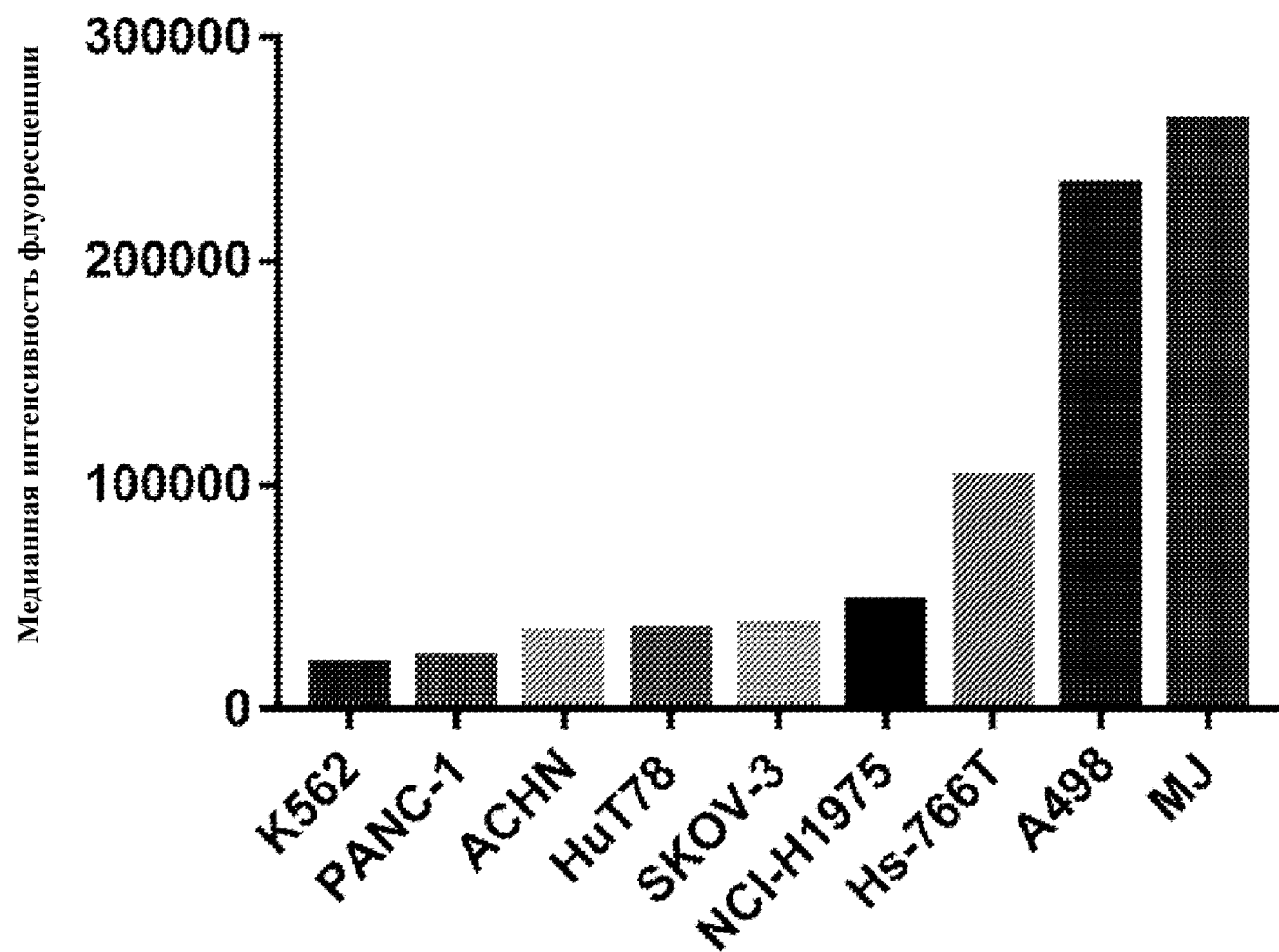
Фиг. 1



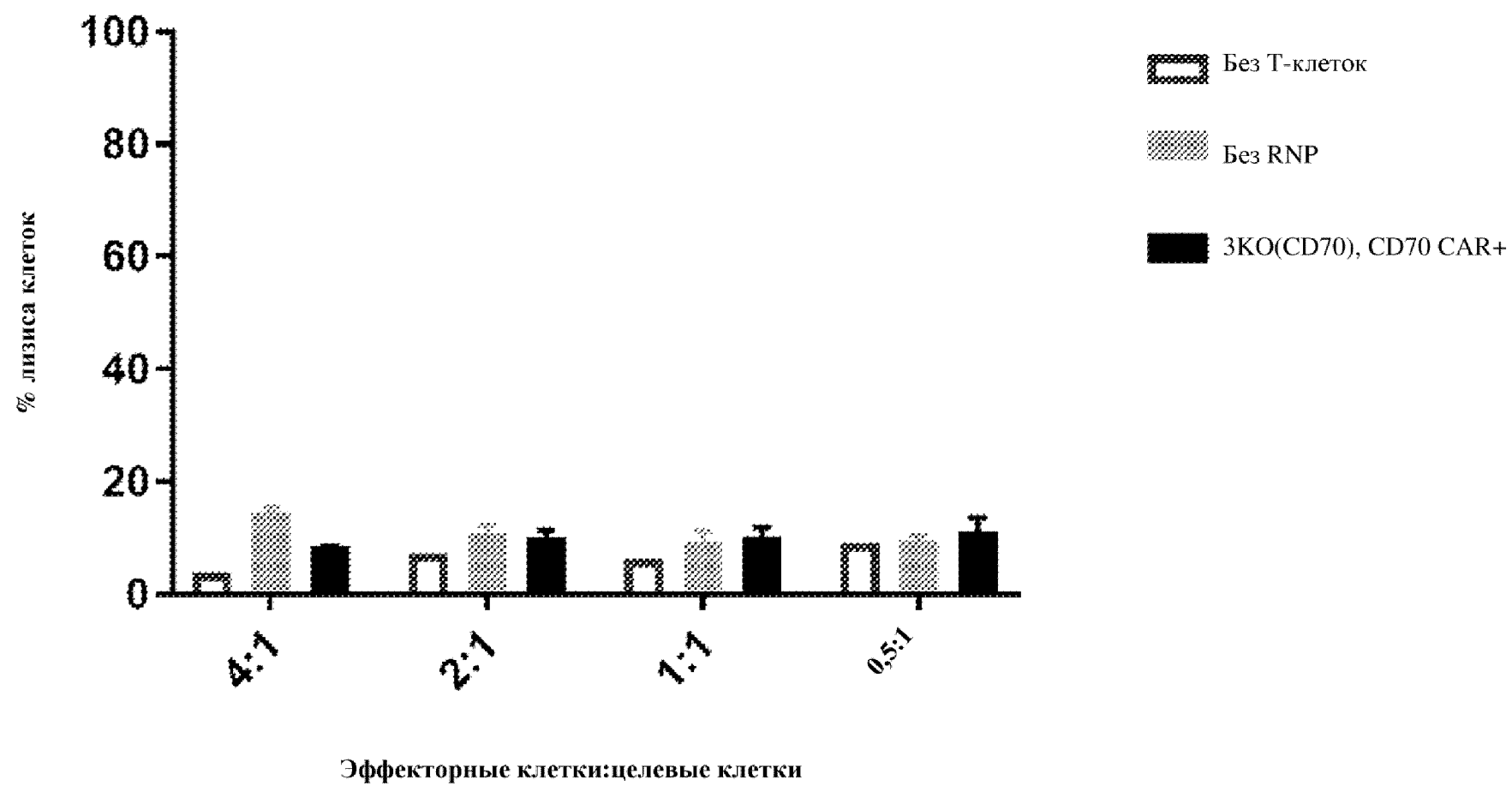
Фиг. 2



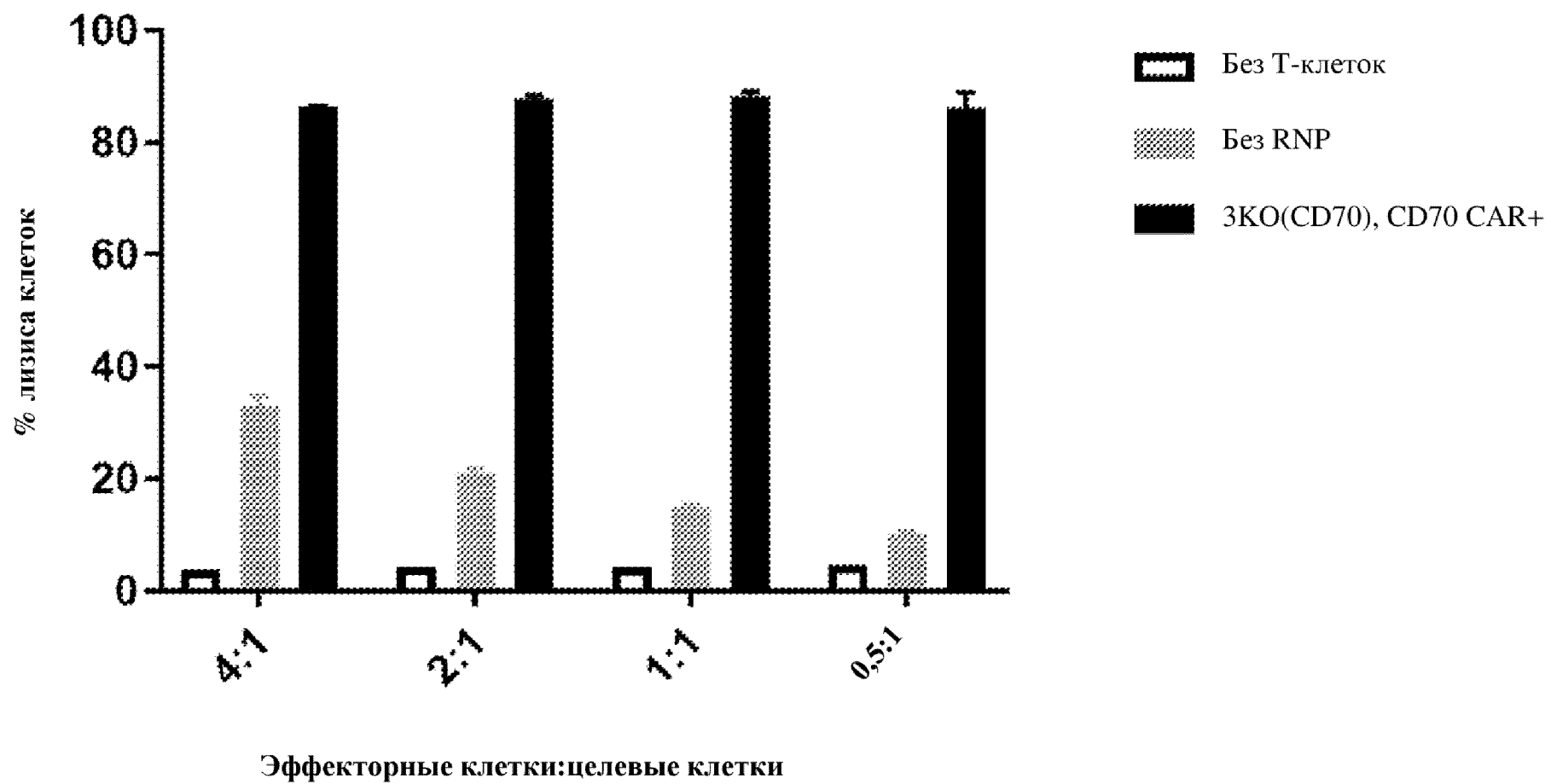
Фиг. 3



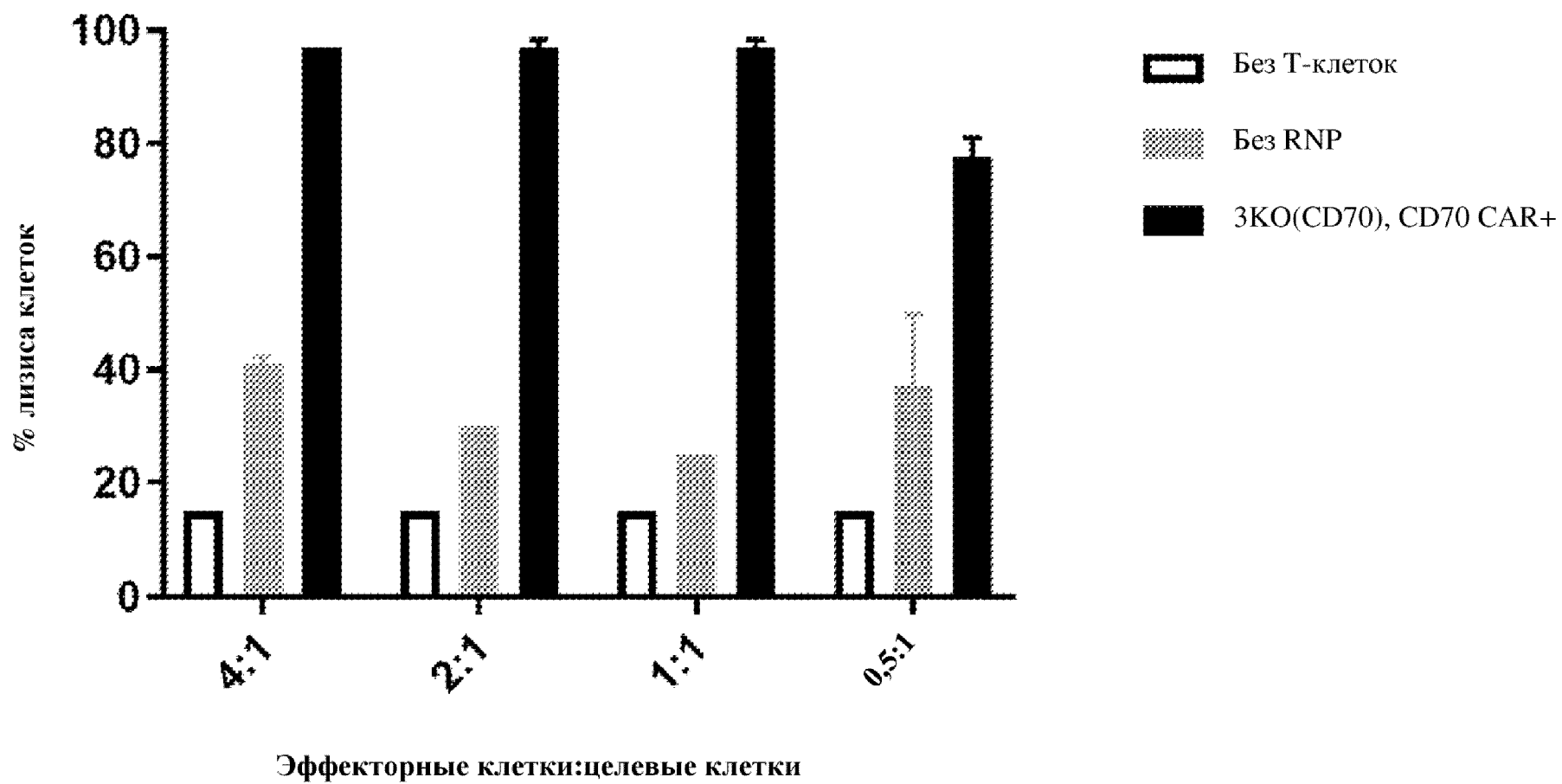
Фиг. 4А



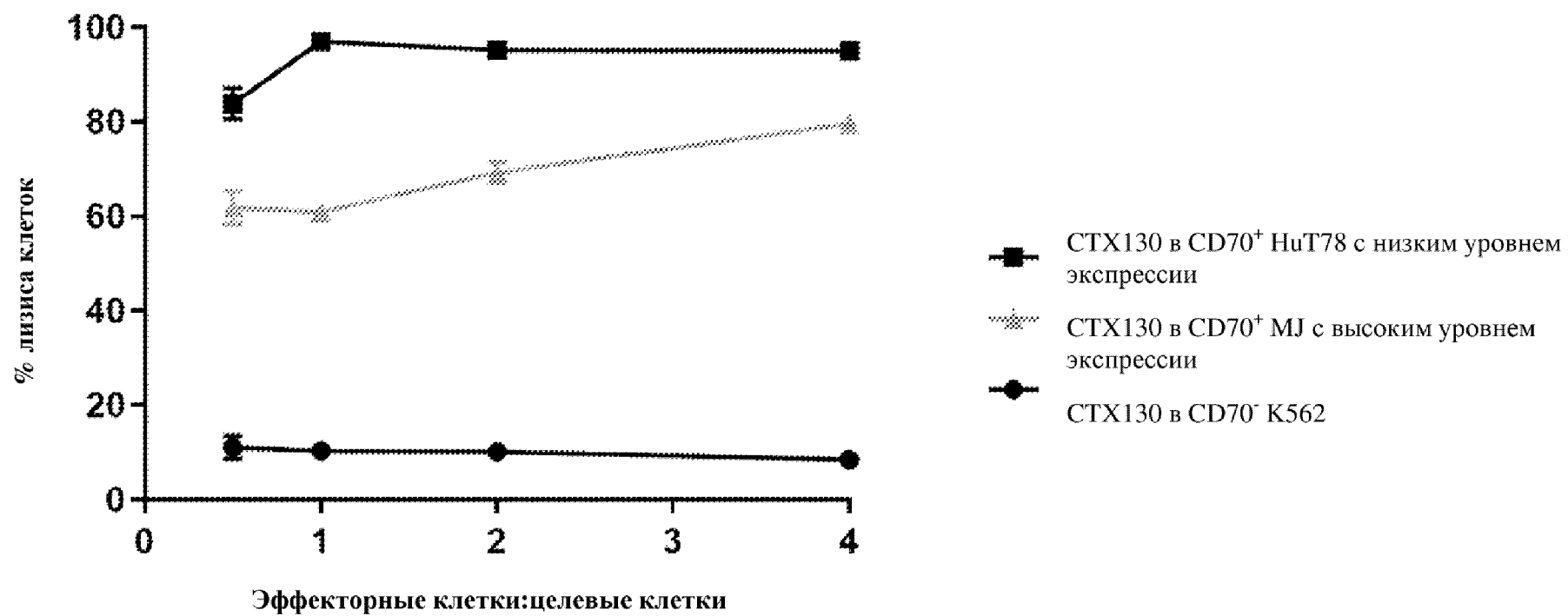
Фиг. 4В



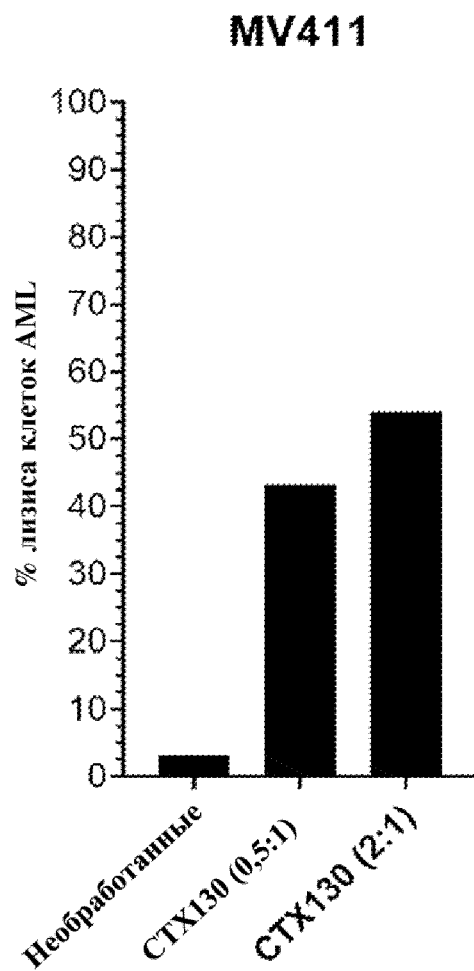
Фиг. 4С



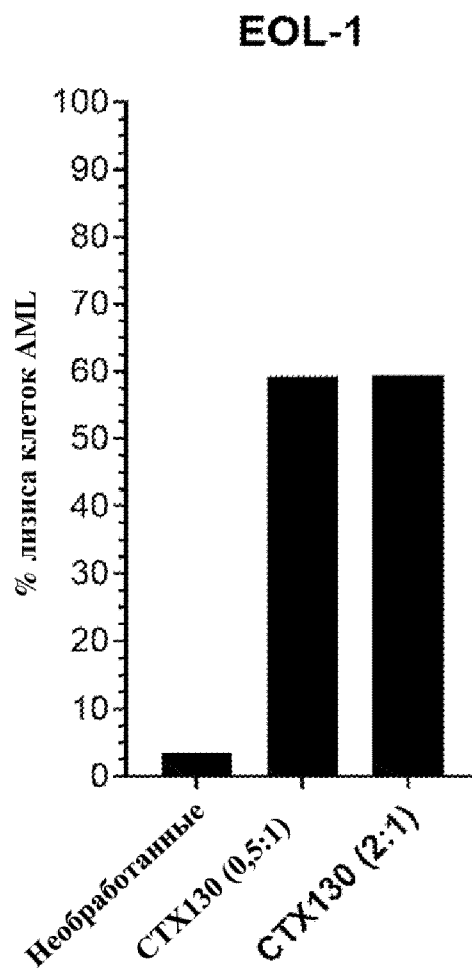
Фиг. 4D



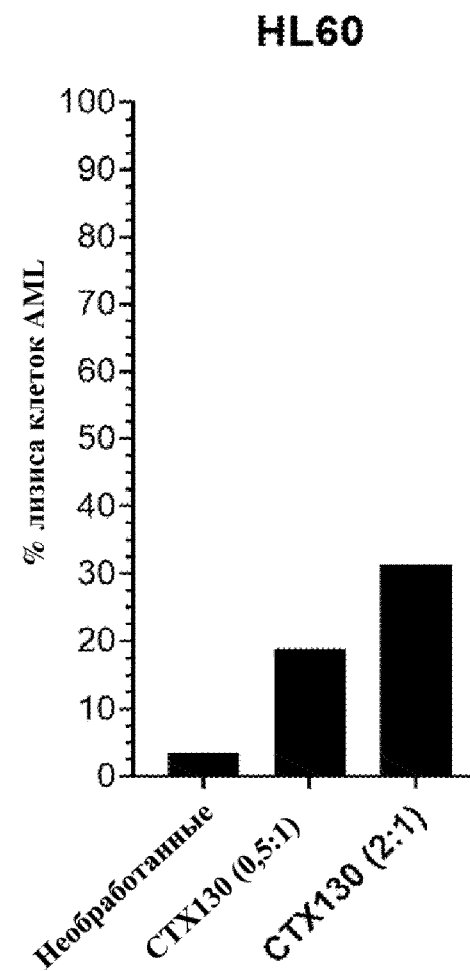
Фиг. 4Е



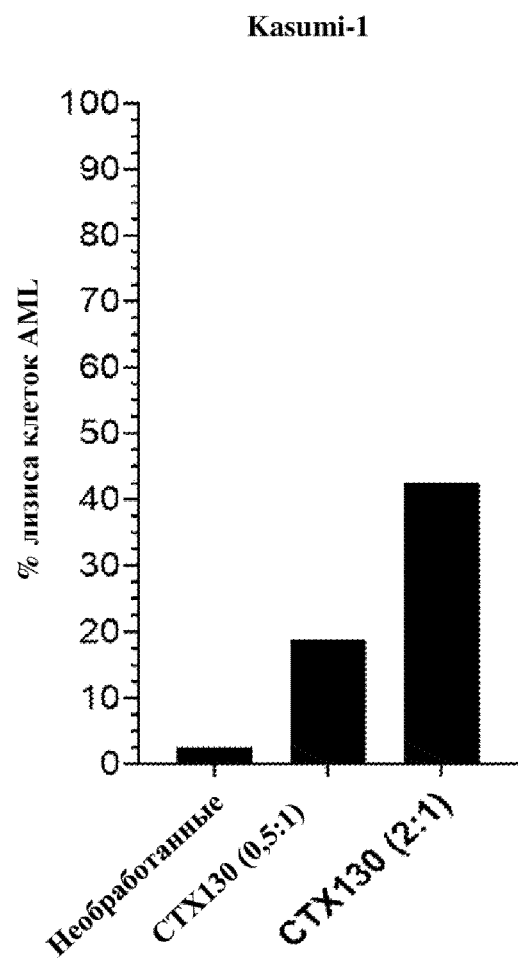
Фиг. 4F



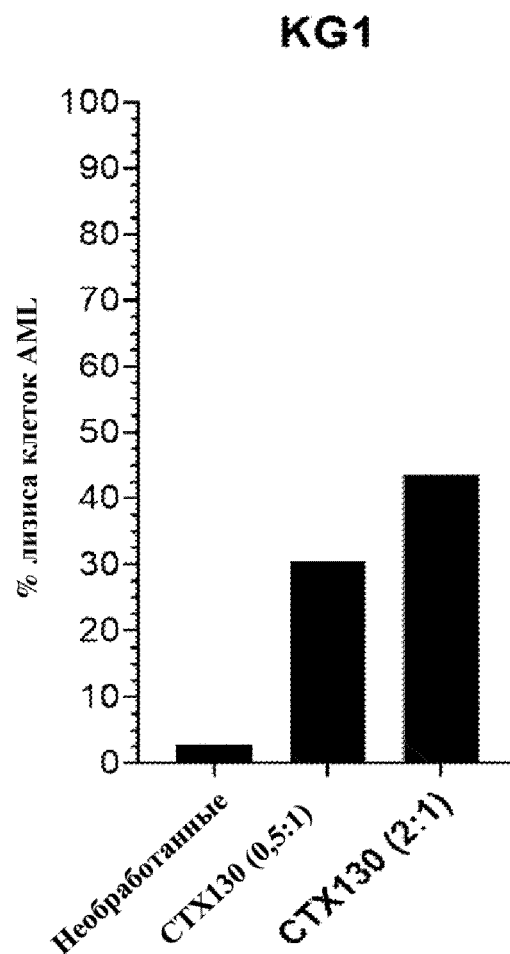
Фиг. 4G



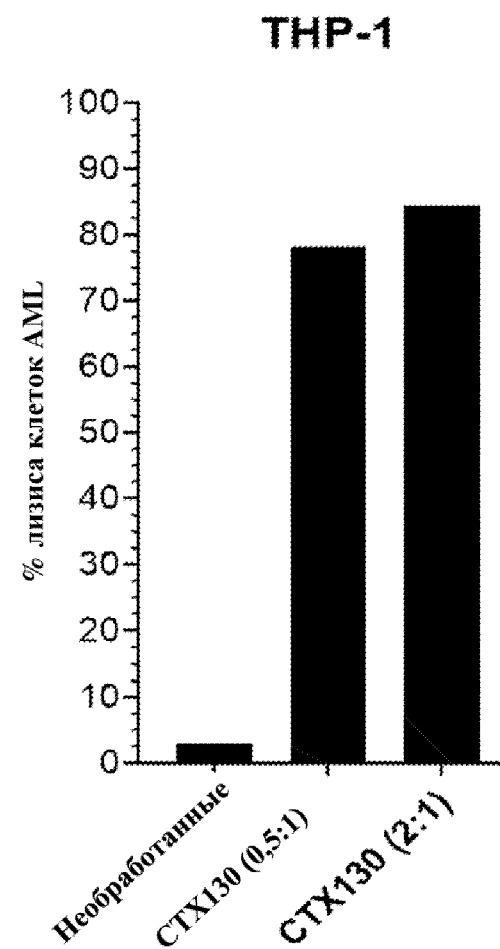
Фиг. 4H



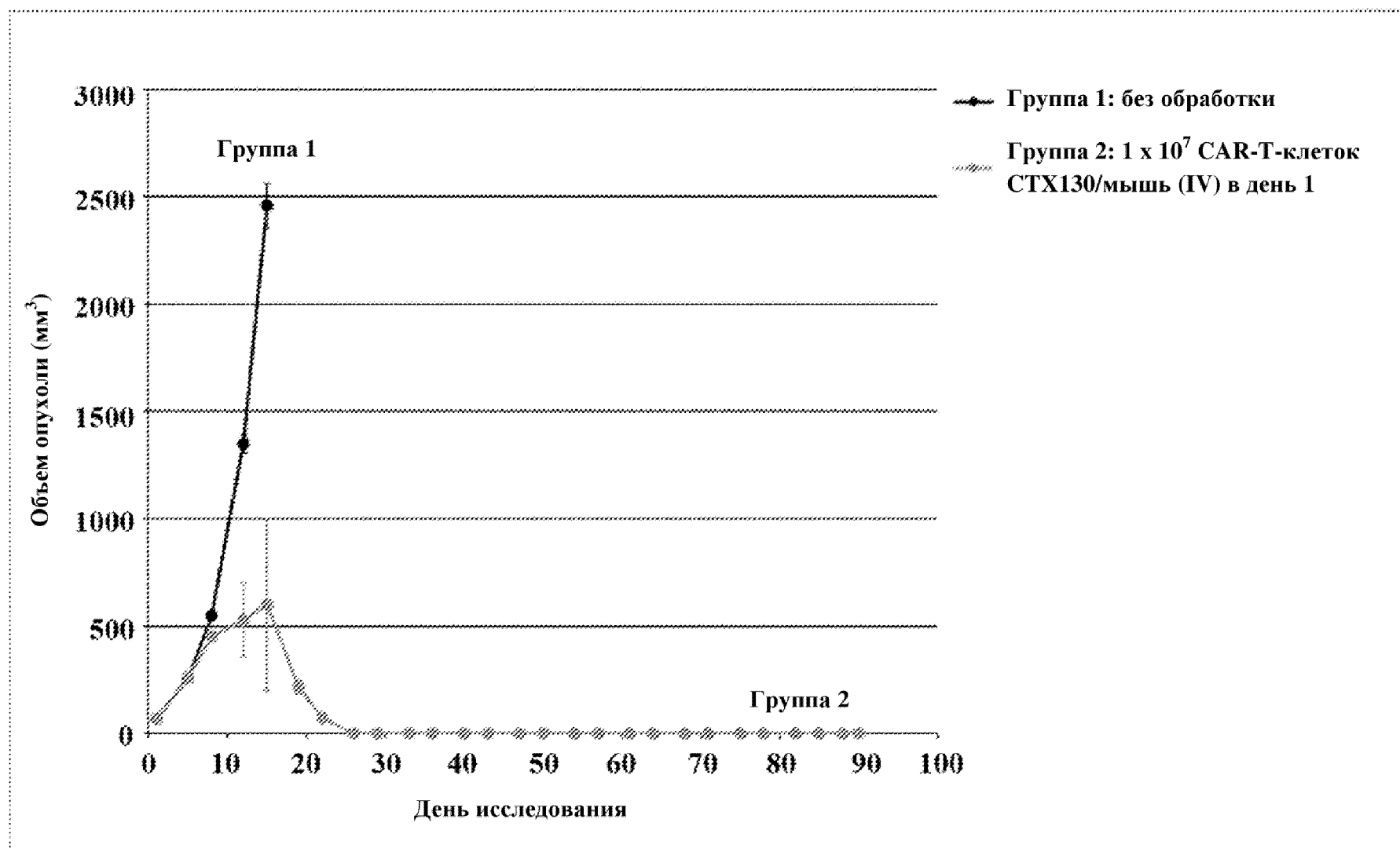
Фиг. 4Н



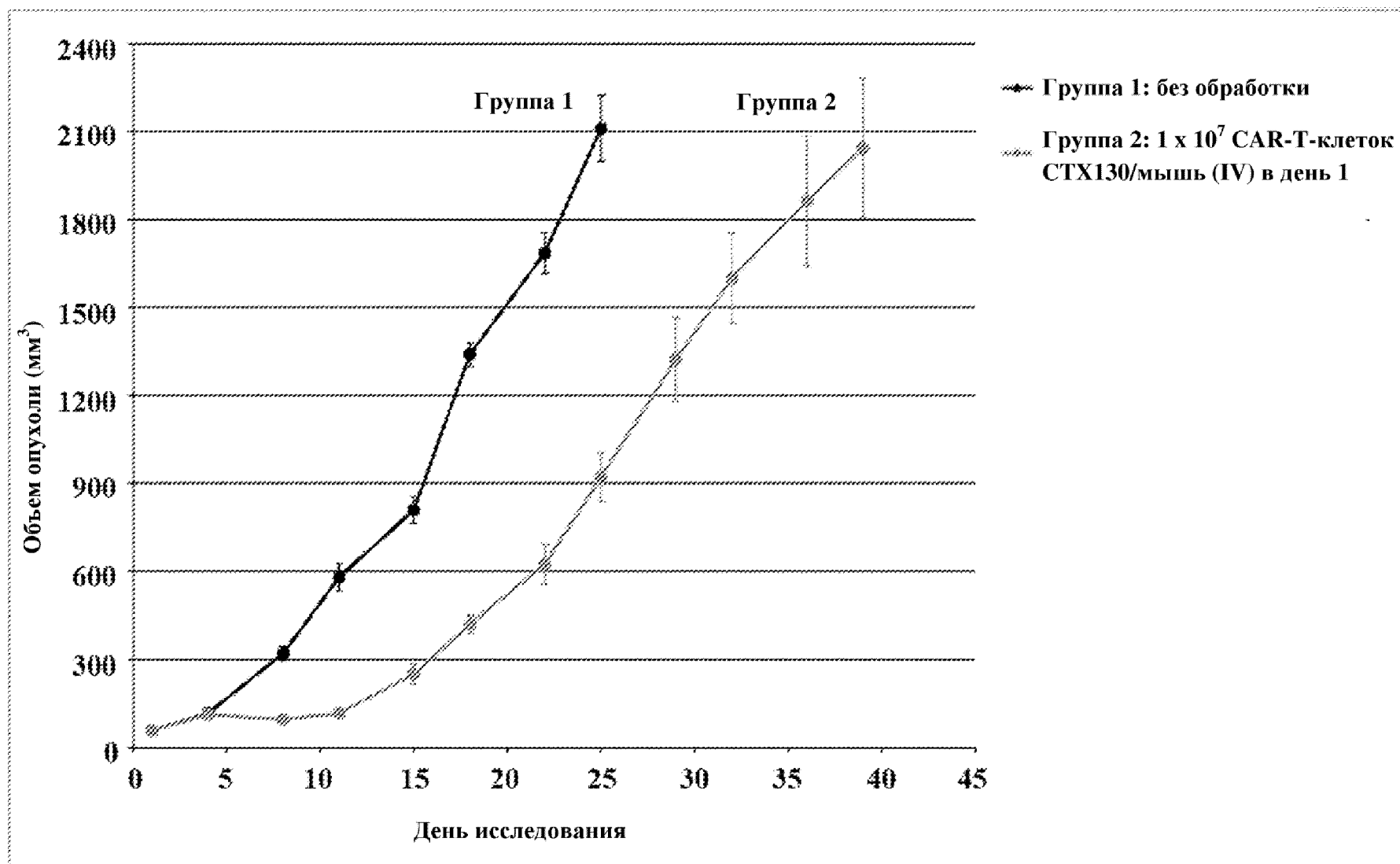
Фиг. 4J



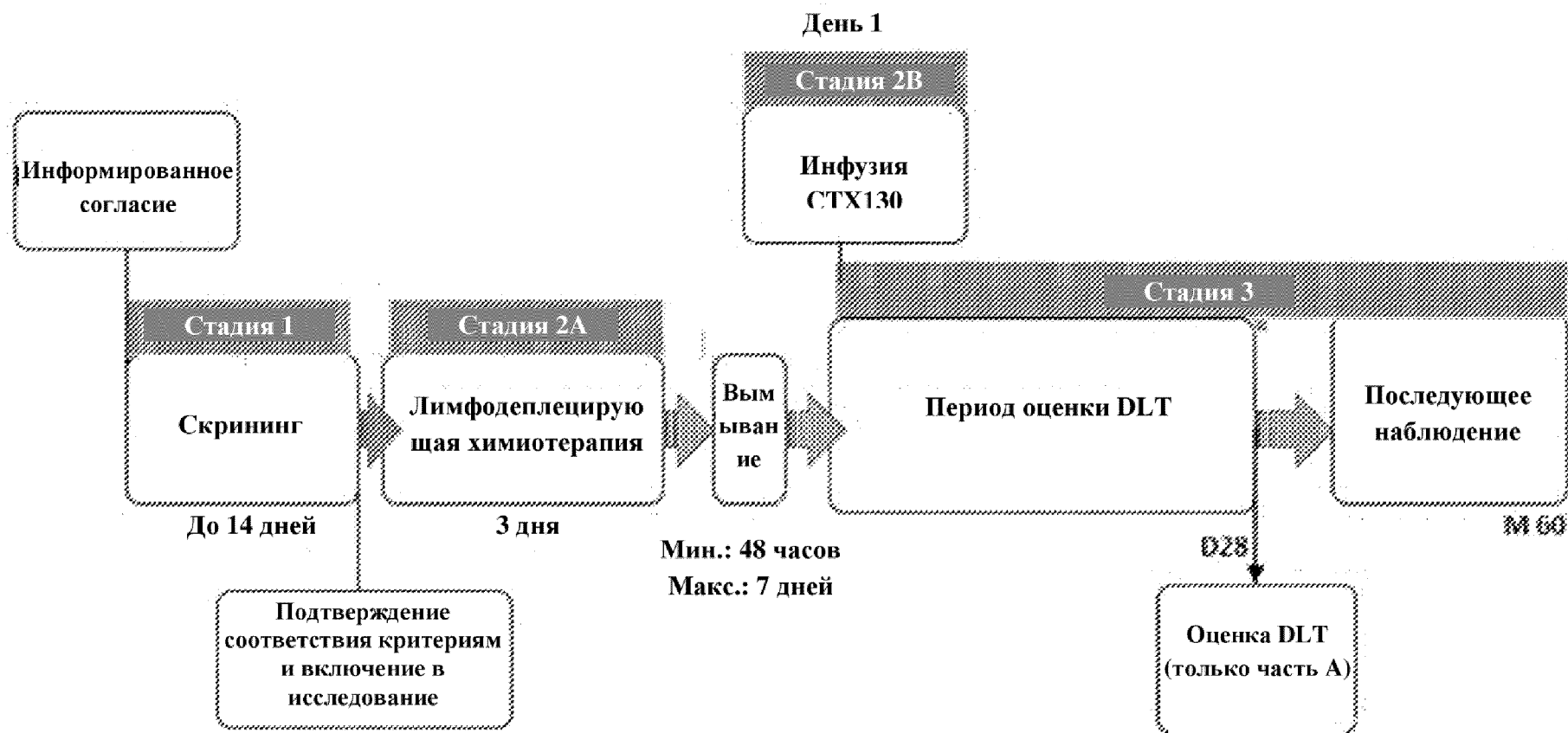
Фиг. 4К



Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6