

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291459 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.10

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

(22) Дата подачи заявки
2020.11.13

(54) ТЕРАПИЯ CD70+ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ
СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК, НАЦЕЛИВАЮЩИХСЯ НА CD70

(31) 62/934,975; 63/034,563

(72) Изобретатель:

(32) 2019.11.13; 2020.06.04

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

(33) US

(86) PCT/IB2020/060720

(74) Представитель:

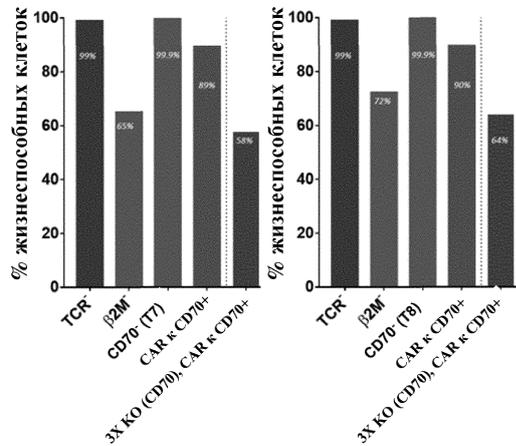
(87) WO 2021/095011 2021.05.20

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(57) Аспекты по настоящему изобретению относятся к композициям, содержащим популяцию генетически сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD70, и способам применения таковых для лечения CD70+ солидных опухолей.



A1

202291459

202291459

A1

**ТЕРАПИЯ CD70+ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ
СКОНСТРУИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК, НАЦЕЛИВАЮЩИХСЯ НА CD70
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает преимущество и приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/934975, поданной 13 ноября 2019 г., и предварительной заявке на патент США № 63/034563, 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 неожиданном открытии того, что Т-клетки с CAR+ к CD70 снижают опухолевую нагрузку в различных моделях подкожного ксенотрансплантата солидной опухоли. Также было продемонстрировано, что Т-клетки с CAR к CD70, описанные в данном документе, проявляли долгосрочную эффективность *in vivo*, которая обеспечивала предупреждение роста опухоли после повторного воздействия опухолевых клеток. Случаи значительного снижения опухолевой нагрузки также наблюдались после повторного введения доз Т-клеток с CAR к CD70. 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, у которых имеется RCC (репрезентативная CD70+ солидная опухоль), которые получали лечение с помощью клеток CTX130.

Соответственно, в аспектах настоящего изобретения предусмотрены способы лечения CD70+ солидных опухолей, включающие (i) подвергание пациента-человека, у которого имеются CD70+ солидные опухоли, лечению с применением лимфодеплеции и (ii) введение пациенту-человеку популяции генетически сконструированных Т-клеток (также называемое терапией с применением Т-клеток с CAR) после стадии (i).

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения CD70+ солидной опухоли, при этом способ включает (i) подвергание пациента-человека, у которого имеется CD70+ солидная опухоль, первой процедуре лечения с применением лимфодеплеции и (ii) введение пациенту-человеку первой дозы популяции

генетически сконструированных Т-клеток после стадии (i), где популяция генетически сконструированных Т-клеток предусматривает Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает CD70, и содержащие нарушенный ген $\beta 2M$, нарушенный ген *CD70* и нарушенный ген *TRAC*, в которые вставлена нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR. В некоторых примерах популяция генетически сконструированных Т-клеток представлена клетками CTX130, как раскрыто в данном документе.

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 некоторых вариантах осуществления до стадии (i) у пациента-человека не проявляются один или несколько из следующих признаков: (a) значительное ухудшение клинического статуса, (b) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 90%, (c) неконтролируемая сердечная аритмия, (d) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (e) активная инфекция и (e) острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше.

В некоторых вариантах осуществления стадию (i) осуществляют за приблизительно 2-7 дней до стадии (ii). В некоторых вариантах осуществления стадию (ii) осуществляют посредством введения популяции генетически сконструированных Т-клеток пациенту-человеку внутривенно в первой дозе, которая составляет от приблизительно 1×10^6 CAR⁺ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток. В некоторых примерах первая доза может находиться в диапазоне от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток.

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

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно включают (iii) мониторинг пациента-человека в отношении развития острой токсичности после стадии (ii). В некоторых вариантах осуществления острая токсичность включает синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность (например, ICANS), синдром лизиса опухоли (TLS), GvHD, внеопухолевую токсичность, специфическую в отношении мишени, и/или неконтролируемую пролиферацию Т-клеток. Внеопухолевая токсичность, специфическая в отношении мишени, может предусматривать активность популяции генетически сконструированных Т-клеток в отношении активированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток, остеобластов и/или эпителия, подобного эпителию почечных канальцев.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно включают (iv) подвержение пациента-человека второй процедуре лечения с применением лимфодеплеции и (v) введение пациенту-человеку второй дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток по прошествии нескольких недель после стадии (ii). В некоторых случаях после стадии (ii) у пациента-человека не проявляются одно или несколько из следующего: (a) дозолIMITирующая токсичность (DLT), (b) CRS степени 4, степень которого не понижается до степени 2 в течение 72 часов, (c) GvHD, характеризующаяся степенью, превышающей 1, (d) нейротоксичность, характеризующаяся степенью, составляющей 3 или больше, (e) активная инфекция, (f) гемодинамическая нестабильность и (g) дисфункция органов. Вторую дозу популяции генетически сконструированных Т-клеток можно вводить субъекту по прошествии от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет после первой дозы. В некоторых случаях вторую дозу можно вводить субъекту по прошествии приблизительно 6-10 недель после первой дозы. В других случаях вторую дозу можно вводить субъекту по прошествии приблизительно 14-18 недель после первой дозы.

В некоторых вариантах осуществления вторая процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (iv) предусматривает совместное введение пациенту-человеку флударабина в количестве 30 мг/м^2 и циклофосфида в количестве 500 мг/м^2 в день внутривенно в течение 1-3 дней.

В некоторых вариантах осуществления стадию (v) осуществляют по прошествии 2-7 дней после стадии (iv). В некоторых вариантах осуществления стадию (v) осуществляют посредством введения популяции генетически сконструированных Т-клеток пациенту-человеку внутривенно во второй дозе, которая составляет от приблизительно $1 \times 10^6 \text{ CAR}^+$ клеток до приблизительно $1 \times 10^9 \text{ CAR}^+$ клеток. В некоторых примерах первая доза может находиться в диапазоне от приблизительно 3×10^7 до приблизительно $9 \times 10^8 \text{ CAR}^+$ клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать (vi) подвержение пациента-человека третьей процедуре лечения с применением лимфодеплеции и (vii) введение пациенту-человеку третьей дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток по прошествии от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет (например, приблизительно 14-18 недель) после стадии (ii). В некоторых случаях вторую дозу популяции генетически сконструированных Т-клеток вводят по прошествии от приблизительно 8 недель до приблизительно двух лет (например, приблизительно 8-10 недель) после стадии (ii). В качестве альтернативы или в дополнение, третью дозу популяции генетически сконструированных Т-клеток можно вводить субъекту по прошествии от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет после введения второй дозы. В некоторых случаях третью дозу можно вводить субъекту по прошествии приблизительно 8-10 недель после второй дозы. В других случаях третью дозу можно вводить субъекту по прошествии приблизительно 14-18 недель после второй дозы.

В некоторых примерах после стадии (v) у пациента-человека не проявляются одно

или несколько из следующего: (a) дозопонижающая токсичность (DLT), (b) CRS степени 4, степень которого не понижается до степени 2 в течение 72 часов, (c) GvHD, характеризующаяся степенью, превышающей 1, (d) нейротоксичность, характеризующаяся степенью, составляющей 3 или больше, (e) активная инфекция, (f) гемодинамическая нестабильность и (g) дисфункция органов.

В некоторых вариантах осуществления третья процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (vi) предусматривает совместное введение пациенту-человеку флударабина в количестве 30 мг/м^2 и циклофосфида в количестве 500 мг/м^2 в день внутривенно в течение 1-3 дней.

В некоторых вариантах осуществления стадию (vii) осуществляют по прошествии 2-7 дней после стадии (vi). В некоторых вариантах осуществления стадию (vii) осуществляют посредством введения популяции генетически сконструированных Т-клеток пациенту-человеку внутривенно в третьей дозе, которая может составлять от приблизительно $1 \times 10^6 \text{ CAR}^+$ клеток до приблизительно $1 \times 10^9 \text{ CAR}^+$ клеток. В некоторых примерах вторая доза может находиться в диапазоне от приблизительно 3×10^7 до приблизительно $9 \times 10^8 \text{ CAR}^+$ клеток.

В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека наблюдается стабильное заболевание или прогрессирование заболевания.

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

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

вторая и/или третья дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек является взрослым. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек подвергался предшествующей противораковой терапии. В некоторых вариантах осуществления предшествующая противораковая терапия предусматривает ингибитор иммунной контрольной точки, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления CD70+ солидная опухоль является рецидивирующей или рефрактерной. В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеются CD70+ опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеются CD70+ опухолевые клетки в биологическом образце, полученном от пациента-человека. Соответственно, любой из способов, раскрытых в данном документе, в некоторых случаях до стадии (i) может дополнительно включать идентификацию пациента-человека, у которого имеются CD70+ опухолевые клетки.

В некоторых вариантах осуществления для пациента-человека предусмотрена антицитокиновая терапия. В некоторых вариантах осуществления для пациента-человека предусмотрена аутологичная или аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток после лечения с помощью популяции генетически сконструированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек характеризуется одним или несколькими из следующих признаков: (a) оценка общего состояния пациента по шкале Карновского (KPS), составляющая 80% или больше, (b) приемлемое функционирование органов, (c) отсутствие предшествующей трансплантации стволовых клеток (SCT), (d) отсутствия предшествующей терапии с применением средства, нацеливающегося на CD-70, или адоптивной терапии с применением Т-клеток или НК-клеток, (e) отсутствие известного противопоказания к терапии с помощью лимфодеплеции, (f) отсутствие в настоящем или прошлом Т-клеточных или В-клеточных лимфом со злокачественным выпотом, который является или являлся симптоматическим, (g) отсутствие гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH), (h) отсутствие злокачественного новообразования или нарушений в центральной нервной системе, (i) отсутствие нестабильной стенокардии, аритмии и/или инфаркта миокарда, (j) отсутствия сахарного диабета, (k) отсутствия неконтролируемых инфекций, (l) отсутствие иммунодефицитных нарушений или аутоиммунных нарушений, которые требуют иммуносупрессивной терапии, и (m) отсутствие трансплантации паренхиматозных органов или трансплантации костного мозга

В некоторых вариантах осуществления пациента-человека подвергают мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней в отношении развития токсичности после каждого введения популяции генетически сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления для пациента-человека предусмотрен контроль токсичности, если наблюдается развитие токсичности.

В некоторых вариантах осуществления CAR, который связывает CD70, содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен CD8, костимулирующий домен 4-1BB и

цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ , и при этом внеклеточный домен представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), который связывает CD70. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит варибельный домен тяжелой цепи (V_H), предусматривающий SEQ ID NO: 49, и варибельный домен легкой цепи (V_L), предусматривающий SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления scFv предусматривает SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления CAR предусматривает SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген *TRAC* характеризуется делецией области, на которую нацеливается спейсерная последовательность под SEQ ID NO: 8 или ее часть.

В некоторых вариантах осуществления 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.

В некоторых вариантах осуществления 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.

В некоторых вариантах осуществления CD70⁺ солидная опухоль представляет собой рак легкого, рак желудка, рак яичника, рак поджелудочной железы или рак предстательной железы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** представлены графики, демонстрирующие эффективное редактирование нескольких генов в TRAC⁻/ $\beta 2M$ ⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ (т. е. 3X KO, CAR к CD70⁺) Т-клетках.

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

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

На **фиг. 4** представлен график, демонстрирующий устойчивое уничтожение клеток, представленных клетками A498, с помощью 3X KO (TRAC⁻/ $\beta 2M$ ⁻/CD70⁻) CAR к CD70⁺ Т-клеток по сравнению с 2X KO (TRAC⁻/ $\beta 2M$ ⁻) CAR к CD70⁺ Т-клетками.

На **фиг. 5** представлен график, демонстрирующий уничтожение клеток A498 с помощью Т-клеток с CAR к CD70 после серийного повторного воздействия. Использовали 3X KO (TRAC⁻/ $\beta 2M$ ⁻/CD70⁻) и представленные опытной партией клеток CTX130 (CTX130) CAR к CD70⁺ Т-клетки.

На **фиг. 6А-6С** представлены графики, демонстрирующие результаты

тестирования опытной партии клеток СТХ130 (партия 01) в отношении секреции цитокинов в присутствии CD70⁺ клеток почечно-клеточной карциномы. Клетки СТХ130 культивировали совместно с CD70⁺ (A498; **фиг. 6А** или АСНН; **фиг. 6В**) или CD70⁻ (MCF7; **фиг. 6С**) клетками-мишенями при указанных соотношениях. Неотредактированные Т-клетки использовали в качестве контрольных Т-клеток. Определяли уровни IFN- γ (слева) и IL-2 (справа). Показаны средние значения для трех биологических повторностей \pm стандартное отклонение.

На **фиг. 7А-7С** представлены графики, демонстрирующие результаты тестирования опытной партии клеток СТХ130 (партия 01) в отношении активности уничтожения клеток, направленной против характеризующихся высоким уровнем CD70 (A498; **фиг. 7А**), низким уровнем CD70 (АСНН; **фиг. 7В**) и CD70-отрицательных (MCF7; **фиг. 7С**) линий клеток, при нескольких соотношениях Т-клеток и клеток-мишеней. Каждая точка данных представляет данные для трех повторностей \pm стандартное отклонение. Отрицательные значения показаны как нулевые.

На **фиг. 8А-8Н** включают графики, демонстрирующие экспрессию CD70 на различных типах раковых клеток и цитотоксичность CAR-Т-клеток к CD70 в отношении таковых. **Фиг. 8А**: относительная экспрессия CD70 в пяти разных линиях раковых клеток, как указано. **Фиг. 8В**: относительная экспрессия CD70 в трех разных линиях раковых клеток, как указано. **Фиг. 8С** представляет собой график, демонстрирующий относительную экспрессию CD70 в девяти разных линиях раковых клеток. **Фиг. 8D** представляет собой график, демонстрирующий активность уничтожения клеток с применением Т-клеток с нокаутом по трем генам, TRAC⁻ β 2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺, в отношении дополнительных линий клеток солидной опухоли с варьирующими уровнями экспрессии CD70 (соотношение эффекторных клеток и целевых клеток 4:1, 1:1 или 0,25:1). **Фиг. 8Е** представляет собой график, демонстрирующий активность уничтожения клеток с применением Т-клеток с нокаутом по трем генам, TRAC⁻ β 2M⁻CD70⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺, в отношении линий клеток солидной опухоли после периода совместного культивирования, составляющего 24 часа или 96 часов. На **фиг. 8F-8Н** показаны графики, демонстрирующие активность уничтожения клеток с применением Т-клеток с нокаутом по трем генам, TRAC⁻ β 2M⁻CD70⁻/CAR к CD70⁺ (ЗКО (CD70), CD70 CAR⁺), в отношении CD70-дефицитных клеток хронического миелогенного лейкоза (K562) (**фиг. 8F**), CD70-экспрессирующих клеток множественной миеломы (MM.1S) (**фиг. 8G**) и CD70-экспрессирующих клеток Т-клеточной лимфомы (HuT78) (**фиг. 8H**) при различных соотношениях эффекторных:целевых клеток.

На **фиг. 9А-9D** показаны графики, демонстрирующие результаты тестирования клеток СТХ130 в различных моделях подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы. **Фиг. 9А**: подкожная модель A498-NOG. **Фиг. 9В**: подкожная модель 786-O-NSG. **Фиг. 9С**: подкожная модель Saki-2-NSG. **Фиг. 9D**: подкожная модель Saki-1-NSG. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю на протяжении всего исследования. Каждая точка представляет собой средний объем

опухоли \pm стандартная ошибка.

На **фиг. 10** показан график, демонстрирующий результаты тестирования эффективности клеток CTX130 в модели подкожного ксенотрансплантата A498 с повторным воздействием опухолью. Обеспечивали рост опухолей с достижением среднего размера, составляющего примерно 51 мм^3 , после чего мышей, несущих опухоль, рандомизировали на две группы ($N=5/\text{группа}$). Группу 1 оставляли без обработки, в то время как группа 2 получала 7×10^6 CAR+ клеток CTX130, а группа 3 получала 8×10^6 CAR+ TRAC- B2M- T-клеток с CAR к CD70. В день 25 инициировали повторное воздействие опухолью, при этом 5×10^6 клеток A498 вводили путем инъекции в левый бок обработанным мышам, а также мышам в новой контрольной группе (группа 4). Объем опухоли измеряли два раза в неделю на протяжении всего исследования. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли \pm стандартная ошибка.

На **фиг. 11** показан график, демонстрирующий результаты тестирования эффективности клеток CTX130 в модели подкожного ксенотрансплантата A498 с повторным введением доз клеток CTX130. Когда среднее значение размера опухоли достигало среднего размера, составляющего примерно 453 мм^3 , мышей либо оставляли без обработки, либо им внутривенно вводили путем инъекции ($N=5$) $8,6 \times 10^6$ CAR+ клеток CTX130 на мышь. Мышей в группе 2 обрабатывали второй и третьей дозами, составляющими $8,6 \times 10^6$ CAR+ клеток CTX130 на мышь, в дни 17 и 36 соответственно. Мышей в группе 3 обрабатывали второй дозой, составляющей $8,6 \times 10^6$ CAR+ клеток CTX130 на мышь, в день 36. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю на протяжении всего исследования. Каждая точка представляет собой средний объем опухоли \pm стандартная ошибка.

На **фиг. 12A** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценки снижения объема опухоли на модели ксенотрансплантата опухоли яичника человека (например, опухолевых клеток SKOV-3), подвергавшейся воздействию 3X КО (TRAC-/B2M-/CD70-) T-клеток с CAR к CD70. На **фиг. 12B** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценки снижения объема опухоли на модели ксенотрансплантата немелкоклеточной опухоли легкого человека (например, опухолевых клеток NCI-H1975), подвергавшейся воздействию 3X КО (TRAC-/B2M-/CD70-) T-клеток с CAR к CD70. На **фиг. 12C** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценки снижения объема опухоли на модели ксенотрансплантата опухоли поджелудочной железы человека (например, опухолевых клеток Hs766T), подвергавшейся воздействию 3X КО (TRAC-/B2M-/CD70-) T-клеток с CAR к CD70. На **фиг. 12D** показан график, демонстрирующий результаты эксперимента, разработанного для оценки снижения объема опухоли на модели ксенотрансплантата опухоли желудка человека (например, опухолевых клеток SNU-1), подвергавшейся воздействию 3X КО (TRAC-/B2M-/CD70-) T-клеток с CAR к CD70.

Фиг. 13 представляет собой схематическое изображение иллюстративной схемы

клинического исследования для оценки введения клеток CTX130 взрослым субъектам с CD70+ солидной опухолью. 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 типа II и лиганд для CD27 - представителя суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) (Goodwin, (1993) *Cell*, 73, 447-456) с распределением экспрессии в здоровой ткани, ограниченным активированными лимфоцитами и подгруппами дендритных клеток и эпителиальных клеток тимуса, и как у людей, так и у мышей (Hintzen, (1994) *The Journal of Immunology*, 152, 1762-1773; Grewal, (2008) *Expert Opin Ther Targets*, 12, 341-51; Coquet et al. (2013) *J Exp Med*, 210, 715-728; Tesselaar et al., (2003) *J Immunol*, 170, 33-40). При лигировании CD70, экспрессированного на поверхности дендритных клеток, с CD27, экспрессированным Т-клетками, генерируется костимулирующий сигнал, который способствует характеристике активации и пролиферации Т-клеток пар TNF/TNFR (Watts, (2005) *Immunol*, 23, 23-68). В дополнение, CD70 представляет собой саму сигнальную молекулу, экспрессия которой повышена на активированных лимфоцитах и которая может действовать в качестве контрольной точки, ограничивающей неконтролируемое увеличение количества Т-клеток (O'Neill et al., (2017) *J Immunol*, 199, 3700-3710). CD27 представляет собой конститутивно экспрессируемый поверхностный рецептор Т-клеток, и опосредованная CD27-CD70 стимуляция лимфоцитов контролируется главным образом посредством паттерна ограниченной пространственной и временной экспрессии CD70. Как правило, CD70 остается на поверхности активированных лимфоцитов в течение максимум нескольких дней ((Hintzen, (1994) *The Journal of Immunology*, 152, 1762-1773; Lens, (1999) *British Journal of Hematology*, 106, 491-503; Nolte, (2009) *Immunological Reviews*, 229, 216-31).

В отличие от его строго контролируемой экспрессии в нормальных тканях, CD70 обычно экспрессируется на повышенных уровнях во многих солидных опухолях (Flieswasser et al., *Cancers*, 11 1161, 1-13, 2019; Grewal, (2008) *Expert Opin Ther Targets*, 12, 341-51; Wajant, 2016 *Expert Opin Ther Targets*, 20, 959-73). Ограниченный паттерн экспрессии CD70 в нормальных тканях и его широко распространенная экспрессия при различных злокачественных новообразованиях делают его привлекательной мишенью для терапевтических средств на основе антител.

Неожиданно, CAR к CD70+ Т-клетки, раскрытые в данном документе, обеспечивали успешное снижение опухолевой нагрузки в различных моделях подкожного

ксенотрансплантата CD70-положительной солидной опухоли и продемонстрировали долгосрочную эффективность *in vivo*, которая обеспечивала предупреждение роста опухоли после повторного воздействия опухолевых клеток. В частности, CAR к CD70+ Т-клетки характеризуются значительно сниженной опухолевой нагрузкой в моделях ксенотрансплантатов яичника, легкого, поджелудочной железы и желудка. Случаи значительного снижения опухолевой нагрузки также наблюдались после повторного введения доз Т-клеток с CAR к CD70.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены, в некоторых аспектах, терапевтические пути применения CAR к CD70+ Т-клеток (например, клеток CTX130) для лечения CD70-положительных солидных опухолей. 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 видов рака, экспрессирующих CD70 (например, солидных CD70+ опухолей). 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 включают 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 варибельный

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 MALPVTALLPLALLLHAARP (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 вариабельный фрагмент (scFv, который может содержать вариабельную область тяжелой цепи антитела (V_H) и вариабельную область легкой цепи антитела (V_L) (в любой ориентации). В некоторых случаях фрагменты V_H и V_L могут быть связаны посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер включает гидрофильные остатки с фрагментами из глицина и серина для гибкости, а также фрагментами из глутамата и лизина для дополнительной растворимости. scFv-фрагмент сохраняет антигенсвязывающую специфичность исходного антитела, из которого получен scFv-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления scFv может содержать гуманизированные домены V_H и/или V_L . В других вариантах осуществления домены V_H и/или V_L scFv являются полностью человеческими.

Антигенсвязывающий внеклеточный домен 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 FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG 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 когнатым 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.

Таблица 1. Последовательности иллюстративных компонентов конструкции CAR к CD70

Описание	Последовательность	SEQ ID NO:
CD70 гAAV (scFV к CD70B с 41BB)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCCGCC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG AGTGGCCAACATCACTAGGGGTTCTGCGGC CGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTT GCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCT GGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCA AAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTA	43

ATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACC
ATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGT
TGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGT
TTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTA
CTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAA
GATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATT
AAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCA
GGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCA
TGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGT
CCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTC
TAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGT
GACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTTCA
TCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGC
AAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGAT
CCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCT
GCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG
ACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCT
CAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATG
TGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAG
GTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGG
GCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGT
TGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTA
GAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA
TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG
GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGT
GAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAA
CACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCC
TGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTT
GAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG
ATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAG
TTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTC
GTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGG
CCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCT
GTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAA
AATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG

GCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTG
CACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGG
CGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCG
GCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGA
ATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTG
CTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCC
CCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCTGGCAC
CAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGG
CCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGG
CGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACAC
AAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCCTCAGCCGTGCG
TTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCC
AGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTAC
GTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGA
TGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA
AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCT
TGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTC
ATTCTAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTT
TCTTCCATTTAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCT
TCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGT
TGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGGT
GCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCGGCGC
TTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATA
CGTTCACGAACACTACGGGATGAATTGGGTTCGCCA
AGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTG
GATAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCC
GACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCG
ATACCAGCATATCCACCGCATACATGGAGCTGTC
CCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATT
GTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTA
CTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGT
GGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGA
GGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAAT
CCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAG
GGCAACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTT

TCAACGAGCGGATATTCTTTTATGCATTGGTACCA
GCAAAAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGCTGATC
TACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCGGA
CCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAAGTACTTTA
CGCTCACGATCAGTTCCTGCAGGCTGAGGATGT
AGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTC
CCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAA
TTAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTC
CCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCC
CTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTAACCT
CTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGC
CGGGGGTGCTGTTACATACGAGGGGCTTGACTTC
GCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGG
TACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCCTCGTTATTA
CTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGG
CAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA
TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG
ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGA
AGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGA
AGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGA
ATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCG
CGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGG
AGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGA
AAGAATCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCC
AGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAAT
AGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGG
TCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCA
ACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGG
CCCTGCCTCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCA
TCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGG
AGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTT
CAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCC
CCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGC
AGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCT
GCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCT

	<p>CTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCA AAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGT TCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGC AGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTG GCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGTGAGTTCTGCCT GCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGC TCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGT TGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAAT CTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCA CTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCAC ATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCAC CATTCTAGTTGGGGGAGCCATCTGTCAGCTGGG AAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTT AACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGAC AAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTA CTGAAGATAACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGA GGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATG AGAAAGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGC GTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCCGGGC TTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGCTGCCTGCAGG</p>	
<p>CD70 LHA-RHA (scFV κ CD70B c 41BB)</p>	<p>GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGC CTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAG ACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAACCTCTA TCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAG ATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACATAAACCTC CCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTGGGGAGA CCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGC TGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCA GAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTAT TAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCC CTGCATTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGC</p>	<p>44</p>

CTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTT
GGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTC
CCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCT
ATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCA
GCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCA
TCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGA
AATGAGATCATGTCCTAACCCTGATCCTCTTGTCC
CACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTAC
CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG
TCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAAT
GTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCAC
AGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGAC
TTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGC
ACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAG
GGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTG
GCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAC
TGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC
CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTT
TTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAA
GTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTT
ACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTC
CACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCT
TCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCT
TGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGT
TGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCCGCCGCGTG
CGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC
TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGAT
GACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGT
CTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTA
TTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC
CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGG
GGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGG
GGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT
GGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGC
GGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGA

GCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAG
GGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAG
AGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAA
GGCCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGAC
TCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCG
ATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTA
GGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC
CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCC
AGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTG
CCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGC
CTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTT
AGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCCGGTGACA
GCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGC
AGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGG
GCGGAGGTGAAAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGG
TGTCCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACGAAC
TACGGGATGAATTGGGTTCGCCAAGCGCCGGGGC
AGGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTA
CACCGGCCGAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAA
GGGCGAGTCACTATGACGCGCGATAACCAGCATAT
CCACCGCATAACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTC
AGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGGACT
ATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGGG
TACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGC
AGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCT
GGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTT
GGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAAT
TGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGAT
ATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGA
CAACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAA
TCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTA
GTGGAAGCGGAACACTGACTTTACGCTCACGATCAG
TTCCTGACAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATT
GCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGG
TCAAGGCACGAAAGTAGAAATTAAGTGCTGCT

GCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGAC
CACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTC
CCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCC
GAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTC
ATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTAC
ATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCT
TTTGTTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCA
CAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTG
TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACA
AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGA
TTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGC
GAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGC
ATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAA
CTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGC
TTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGG
GGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCAAGAAGG
ACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCG
GAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAAC
GACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCA
AGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGAT
GCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAAT
AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTG
TTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTT
TGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTC
CAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGG
CAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTT
CAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTC
AATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCG
GCCTTATCCATTGCCACCAAACCCTCTTTTTACT
AAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAG
AATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGG
TGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCT
CTCCAACCTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCA
GACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATT
CTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTCT

	<p>CCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAA GTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAAT CACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTG TTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGGG TGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGA GCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACT TCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAA AACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGG CTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCC CTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCC TGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG</p>	
<p>Нуклеотидная последовательность CAR к CD70 (scFV к CD70B с 41BB)</p>	<p>ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTT GGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTC CAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAAC CCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCC GGTTATACGTTACGA ACTACGGGATGAATTGGGT TCGCCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATG GGGTGGATAAATACCTACACCGGCGAACCTACAT ACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGAC GCGCGATACCAGCATATCCACCGCATA CATGGAG CTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTA CTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGG ACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAG TAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGC GGAGGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCC AATCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAG AGGGCAACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCG TTCAACGAGCGGATATTCTTTTATGCATTGGTAC CAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGCTGA TCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCG GACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAACTGACTT TACGCTCACGATCAGTTC ACTGCAGGCTGAGGATG TAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTC CCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAA TTAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCC</p>	<p>45</p>

	<p>CAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCC TCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTC TTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCC GGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGC TTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTA CGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTT TGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAG AAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTA TGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGG CTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGA GGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCGAAGCG CAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCA GCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAG GAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAG ACCCGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGA ATCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAA GGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGT ATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCAC GATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCA AAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCT GCCTCCCAGATAA</p>	
<p>Аминокислотная последовательность CAR к CD70 (scFV к CD70B с 41BB)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKW MGWINTYTGEPYADAFKGRVTMTRDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT VTV SSGGGSGGGGSGGGSGDIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQP KLLIYL ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQHSREVPWTFGQGTKVEIKSAAAFVPVFLPAKPTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDT</p>	<p>46</p>

	YDALHMQALPPR	
Нуклеотидная последовательность scFv к CD70B	CAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGA AAAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAA GGCGTCCGGTTATACGTTACGAACTACGGGATG AATTGGGTTCCGCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGA AATGGATGGGGTGGATAAATACCTACACCGGCGA ACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTC ACTATGACGCGGATACCAGCATATCCACCGCAT ACATGGAGCTGTCCGACTCCGGTCAGACGACAC GGCTGTCTACTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATT ATGGCATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGT AACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGG GGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGTGACATAG TTATGACCCAATCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCT CTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTCGCGCAT CAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTTTATG CATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGA AGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCT GGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCG GAACTGACTTTACGCTCACGATCAGTTCAGTGCAG GCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAG TAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACG AAAGTAGAAATTA	47
Аминокислотная последовательность scFv к CD70B (линкер подчеркнут)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGM NWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADAFKGRV TMTRDTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARDYGDY GMDYWGQGT ^{TVTVSS} GGGGSGGGGSGGGGSGDIV MTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHW YQQKPGQPPLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDF LTISLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK	48
VH к CD70	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGM NWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADAFKGRV TMTRDTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARDYGDY GMDYWGQGT ^{TVTVSS}	49
VL к CD70	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFM	50

	HWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVE IK	
Линкер	GGGSGGGSGGGSG	51
Сигнальный пептид	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	52
Сигнальный пептид	MALPVTALLPLALLHAARP	53
Трансмембранный домен CD8a	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCNHRNR	54
Трансмембранный CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	55
Нуклеотидная последовательность 4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCA ACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCA AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG	56
Аминокислотная последовательность 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL	57
Нуклеотидная последовательность CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACAT GAATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGA AAACATTACCAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTT CGCTGCGTACAGGTCC	58
Аминокислотная последовательность CD28	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRS	59
Нуклеотидная последовательность CD3 ζ	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGG CATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGA ACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTG CTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGG GGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGG ACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCG GAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAAC GACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCA AGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGAT	60

	GCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA	
Аминокислотная последовательность CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHGDLQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	61
TRAC-LHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGC CTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGA CGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTAT CAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGA TTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTCC CATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACC ACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTG GGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGA GTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTA AATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCT GCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCT GGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGG CCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCC AGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTAT TTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGC CCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATC TGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGGAAA TGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCCTCA CAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAG CTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG CCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGT CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGA CAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCA	62
Промотор EF1 α	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACAT CGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGT CGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGC GGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGC TCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTAT ATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCG CAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCC	63

	<p>GTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTA CT TCCACTG GCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGC TTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGG CCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAAT CTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCG ATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCT GCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGT AAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCG GTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTG CGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCT GCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAG TCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCA AGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGG AAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAG CTCAAATGGAGGACGCGGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCT TTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACG GAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT CTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGG GGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACT GAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGC ACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTG AGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACA GTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCG TGA</p>	
Синтетический сигнал поли(А)	<p>AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTG TTGGTTTTTTGTGTG</p>	64
TRAC-RHA	<p>TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG CCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTC TTCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTT CGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGT TCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACT</p>	65

	CCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCA CCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCT TGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAA AGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCAC GTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCTG CCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACT GCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAA GTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAA TCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTC ACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCA CATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTA AAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCA CCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGG AAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTT AACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGAC AAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTA CTTGAAGATAACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGA GGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATG AGAAAGG	
--	---	--

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

T-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 T-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 T-клеток с CAR к CD70. Кроме того, нарушение гена *CD70* неожиданно обеспечивало улучшение здорового состояния и активности полученных в результате сконструированных T-клеток. Добавление CAR к CD70 обеспечивает направление модифицированных T-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 $\beta 2M$ может считаться клеткой, нокаутной по $\beta 2M$, если белок $\beta 2M$ не может быть выявлен на клеточной поверхности с применением антитела, которое специфически связывает белок $\beta 2M$.

В некоторых вариантах осуществления нарушенный ген может быть описан как содержащий мутированный фрагмент относительно аналога дикого типа. Мутированный фрагмент может содержать делецию, нуклеотидную замену, добавление или их комбинацию. В других вариантах осуществления нарушенный ген может быть описан как содержащий делецию фрагмента, который присутствует в аналоге дикого типа. В некоторых случаях 5'-конец делетированного фрагмента может быть расположен в пределах области гена, на которую нацеливается разработанная направляющая РНК, 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 использованием компонентов 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 $\beta 2M$ может считаться клеткой, нокаутной по $\beta 2M$, если белок $\beta 2M$ не может быть выявлен на клеточной поверхности с применением антитела, которое специфически связывает белок $\beta 2M$.

В примерах, представленных в данном документе, описывается создание отредактированных Т-клеток и конструирование подвергнутых редактированию Т-клеток для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), который связывает CD70, получая таким образом Т-клетки с CAR к CD70, экспрессирующие CAR к CD70 и содержащие нарушенные эндогенные гены *TRAC*, $\beta 2M$ и *CD70*.

В конкретных случаях CAR к CD70+ Т-клетки представляют собой клетки СТХ130, 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 $\beta 2M$. CAR к CD70 клеток СТХ130 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 CD3 ζ . Таким образом, СТХ130 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 обнаруживаемом 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 СТХ130 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 СТХ130 может содержать нарушенный ген *TRAC*, полученный посредством технологии CRISPR/Cas с использованием направляющей РНК ТА-1 (см. также таблицу 2, SEQ ID NO: 6-7). В качестве альтернативы или в дополнение популяция клеток СТХ130 может содержать нарушенный ген $\beta 2M$, полученный

посредством технологии CRISPR/Cas9 с использованием направляющей РНК В2М-1 (см. также таблицу 2, SEQ ID NO: 10-11). Такие клетки СТХ130 могут содержать вставки/делеции в гене $\beta 2M$, который предусматривает одну или несколько нуклеотидных последовательностей, перечисленных в **таблице 4**. Например, популяция клеток СТХ130 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 СТХ130 может содержать вставки/делеции в гене $CD70$, который может предусматривать одну или несколько нуклеотидных последовательностей, перечисленных в **таблице 5**.

В некоторых вариантах осуществления клетки СТХ130 могут предусматривать делецию в гене $TRAC$ по сравнению с немодифицированными Т-клетками. Например, клетки СТХ130 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 СТХ130 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, предусматривающую SEQ ID NO: 17, в гене $TRAC$ по сравнению с немодифицированными Т-клетками.

Кроме того, популяция клеток СТХ130 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 ТА-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 СТХ130 представляют собой CAR+ клетки, которые экспрессируют CAR к CD70. См. также WO 2019/097305A2 и WO2019/215500, соответствующие изобретения 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 СТХ130), 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%, В2М+ Т-клетки в количестве, меньшем или равном 30%, и

CD70+ Т-клетки в количестве, меньшем или равном 2%.

(iv) 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 СТХ130, и фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции можно использовать в лечении рака у пациентов-людей, что также раскрыто в данном документе.

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

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

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, раскрытая в данном документе, содержит популяцию генетически сконструированных Т-клеток с CAR к CD70 (например, клеток СТХ130), 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, % V2M⁺ 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 $\geq 30\%$ CAR⁺ Т-клеток, $\leq 0,4\%$ TCR⁺ Т-клеток, $\leq 30\%$ V2M⁺ Т-клеток и $\leq 2\%$ CD70⁺ Т-клеток. 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, жизнеспособных клеток). 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 клетки CTX130), раскрытых в данном документе, например, зависимое от нуклеазы целевое редактирование с использованием нуклеаз с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффлекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), или нуклеаз CRISPR-Cas9, направляемых с помощью РНК (CRISPR/Cas9; белок 9, ассоциированный с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами). В конкретных примерах генетически сконструированные иммунные клетки, такие как клетки CTX130, получают посредством технологии CRISPR в комбинации с гомологичной рекомбинацией с применением вектора

на основе аденоассоциированного вируса (AAV) в качестве донорной матрицы.

(i) Система редактирования генов, опосредованная CRISPR-Cas9

Система CRISPR-Cas9 представляет собой встречающийся в природе защитный механизм прокариот, который был переориентирован в направляемую с помощью РНК платформу для нацеливания на ДНК, используемую для редактирования генов. Она основана на ДНК-нуклеазе Cas9 и двух некодирующих РНК, crRNA (crRNA) и трансактивирующей РНК (tracrRNA), для нацеливания на расщепление ДНК. CRISPR является сокращением от коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, семейства последовательностей ДНК, обнаруженных в геномах бактерий и архей, которые содержат фрагменты ДНК (спейсерную ДНК), сходные с чужеродной ДНК, воздействию которой подвергалась клетка, например, вирусов, которые инфицировали или атаковали прокариот. Эти фрагменты ДНК используются прокариотами для выявления и разрушения сходной чужеродной ДНК при повторном введении, например, из сходных вирусов во время последующих атак. Транскрипция локуса CRISPR приводит к образованию молекулы РНК, содержащей спейсерную последовательность, которая связывается с белками Cas (ассоциированными с CRISPR), способными распознавать и разрезать чужеродную экзогенную ДНК, и нацеливается на них. Были описаны многочисленные типы и классы систем CRISPR/Cas (см., например, Koonin *et al.*, (2017) *Curr Opin Microbiol* 37:67-78).

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

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

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

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

NHEJ представляет собой надежный механизм репарации, который проявляет

высокую активность в большинстве типов клеток, включая неделящиеся клетки. NHEJ подвержен ошибкам и часто может приводить к удалению или добавлению от одного до нескольких сотен нуклеотидов в сайте DSB, хотя такие модификации обычно составляют < 20 нуклеотидов. Полученные в результате вставки и делеции (вставки/делеции) могут нарушать кодирующие или некодирующие области генов. В качестве альтернативы при HDR используется длинный отрезок гомологичной донорной ДНК, 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):

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDS
 GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLVESFLVEEDKKHE
 RHPIFGNIVDEVAYNEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL
 NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK
 NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKD TYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAA
 KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQ
 SKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
 HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP
 WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYFYFTVYNELTKVKYVTEG
 MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLG
 TYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLK
 RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQ
 VSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQ

KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDI
 NRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLN
 AKLITQRKFDNLTKAERGGELSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
 KLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLES
 EFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETN
 GETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD
 WDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEA
 KGYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYE
 KLKGSPEDEQKQLFVEQHKNHYLDEIEEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKH RDKPIR
 EQAENIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQL
 GGD

(b) Направляющие ПНК (gRNA)

Опосредованное CRISPR-Cas9 редактирование генов, описанное в данном документе, предусматривает применение направляющей ПНК 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 ПНК 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. также WO2019/097305A2, соответствующие изобретения 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 изобретения 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

Последовательности sgRNA			SEQ ID NO :
sgRNA для CD70 (CD70-7)	Модифицированная	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcuagaa auagcaaguuaaaauaaggcuagucsguuaucaacuugaaaaaguggca ccgagucggugcU*U*U*U	2
	Немодифицированная	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaauaaggcuagucsguuaucaacuugaaaaaguggcaccg agucggugcUUUU	3
sgRNA для CD70, спейсер	Модифицированная	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGC	4
	Немодифицированная	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC	5
sgRNA для TRAC (TA-1)	Модифицированная	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaa auagcaaguuaaaauaaggcuagucsguuaucaacuugaaaaaguggca ccgagucggugcU*U*U*U	6
	Немодифицированная	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaaua gcaaguuaaaauaaggcuagucsguuaucaacuugaaaaaguggcaccg agucggugcUUUU	7
sgRNA для TRAC, спейсер	Модифицированная	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC	8
	Немодифицированная	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC	9
sgRNA для $\beta 2M$	Модифицированная	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaa auagcaaguuaaaauaaggcuagucsguuaucaacuugaaaaaguggca	10

(B2M-1)		ccgagucggugcU*U*U*U	
	Немодифицированная	GCUACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaaauag saaguuaaaauaaggcuaguccguuaucuugaaaaagggcaccga gucggugcUUUU	11
sgRNA для $\beta 2M$, спейсер	Модифицированная	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC	12
	Немодифицированная	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC	13
Целевые последовательности (PAM)			
Целевая последовательность $CD70$ с (PAM)		GCTTTGGTCCCATTGGTCGC (GGG)	14
Целевая последовательность $CD70$		GCTTTGGTCCCATTGGTCGC	15
Целевая последовательность TRAC с (PAM)		AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG)	16
Целевая последовательность TRAC		AGAGCAACAGTGCTGTGGCC	17
Целевая последовательность $\beta 2M$ с (PAM)		GCTACTCTCTTTCTGGCC (TGG)	18
Целевая последовательность		GCTACTCTCTTTCTGGCC	19

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'-AGAGCAACAGUGCUGGGCC-3' (SEQ ID NO: 9). В другом примере, если целевая последовательность β 2M представляет собой 5'-GCTACTCTCTTTCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 19), то спейсерная последовательность gRNA представляет собой 5'-GCUACUCUCUCUUCUGGCC-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'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-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:
Отредактирован	AA----- GAGCAACAAATCTGACT	23

ный ген <i>TRAC</i>		
Отредактирован ный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGCTGT- GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	24
Отредактирован ный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTG-----CTGGAGCAACAAATCTGACT	25
Отредактирован ный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGT----- GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	26
Отредактирован ный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTG-----CTGACT	27
Отредактирован ный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGCTGTGGGCCTGGAGCAACAAATC TGACT	28
Отредактирован ный ген <i>TRAC</i>	AAGAGCAACAGTGC-- TGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	29
Отредактирован ный 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:
Отредактирован ный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTC CCGCT	31
Отредактирован ный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC-- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTC CCGCT	32
Отредактирован ный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTT----- CTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCC GCT	33
Отредактирован	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTG	34

ный ген $\beta 2M$	GATAGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTAC CCTCCCGCT	
Отредактирован ный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC----- GCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	35
Отредактирован ный ген $\beta 2M$	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTTCTG TGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCC TCCCGCT	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, 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:
Отредактирован ный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC ACCAAGCCCGCG -- CAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	37
Отредактирован ный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC ACCAAGCCCGCGA ACCAA TGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	38
Отредактирован ный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC----- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	39
Отредактирован ный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC ACCAAGCCCGCG - CCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	40
Отредактирован ный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC ACCAAGCCCGC - ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG	41
Отредактирован ный ген <i>CD70</i>	CACACCACGAGGCAGATC ACCA ----- AGCCCGCAGGACG	42

(ii) Векторы на основе AAV для доставки конструкции 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 сайт-специфическим 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 *rep* и *cap*, которые при транскрипции образуют капсиды, которые инкапсулируют геном AAV для доставки в целевые клетки. 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 одонитевой и/или двухнитевой, и может быть введена в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности можно защитить (например, от экзонуклеолитической деградации) посредством способов, известных специалистам в данной области техники. Например, один или несколько дидезоксинуклеотидных остатков добавляются к 3'-концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируются с одним или обоими концами. См., например, Chang *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls *et al.*, (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают без ограничения добавление концевой аминокислотной группы(аминокислот) и применение модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфороксиантные, фосфорамидатные, и остатки O-метилрибозы или дезоксирибозы.

Донорная матрица может быть введена в клетку как часть векторной молекулы, содержащей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Более того, донорная матрица может быть введена в клетку в виде депротенинизированной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты со средством, таким как липосома или полксамер, или может быть доставлена вирусами (например,

аденовирусом, AAV, вирусом герпеса, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с дефектной интегразой (IDLV)).

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

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

III. Лечение экспрессирующих CD70 опухолей

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением конструируют с химерным антигенным рецептором (CAR), разработанным для нацеливания на CD70. CD70 сперва идентифицировали как лиганд для CD27, костимулирующий рецептор, вовлеченный в пролиферацию и выживание Т-клеток. CD70 обнаруживается только на небольшом проценте активированных Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток в дренирующих лимфатических узлах во время вирусной инфекции. Многие опухоли человека также экспрессируют CD70, в том числе без ограничения виды солидного рака, такие как рак молочной железы, рак желудка, рак яичника и глиобластома. Из-за ограниченного паттерна экспрессии (Flieswasser et al., *Cancers*, (2019) 11:1611) в нормальных тканях и сверхэкспрессии при многих видах рака CD70 является привлекательной терапевтической мишенью. Неограничивающие примеры видов рака (например, солидных опухолей), которые можно лечить, как предусмотрено в данном документе, включают рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак шейки матки, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак носоглотки, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластому, лимфому и/или меланому.

В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены способы лечения пациента-человека, у которого имеется экспрессирующая CD70 опухоль (например, CD70+ солидная опухоль) с применением популяции любых из Т-клеток с CAR к CD70, таких как клетки CTX130, раскрытые в данном документе.

Такие способы лечения могут включать режим кондиционирования (лимфодеплецирующее лечение), который предусматривает введение одной или нескольких доз одного или нескольких лимфодеплецирующих средств подходящему пациенту-человеку, и 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, как раскрыто в данном документе. Если это применимо,

пациент-человек может получать 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 представлять собой пациента-человека, у которого имеется CD70+ солидная опухоль (например, рак легкого, рак желудка, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и/или их комбинация), есть подозрение на ее наличие или есть риск ее возникновения. У субъекта, у которого имеется подозрение на наличие CD70+ солидной опухоли, может проявляться один или несколько симптомов рака, например утомляемость, уплотнение или область уплотнения, которая может ощущаться под кожей, изменения веса, включая необъяснимую потерю веса или набор веса, кожные изменения (например, пожелтение, потемнение или покраснение кожи, язвы, которые не заживают, или изменения существующих родинок), изменения ритма дефекации и мочеиспускания, непрекращающийся кашель или затрудненное дыхание, затрудненное глотание, охриплость, непрекращающаяся диспепсия или дискомфорт после еды, непрекращающаяся, необъяснимая боль в мышцах и суставах, непрекращающаяся, необъяснимая лихорадка или ночная потливость или необъяснимые кровотечения или образование синяков.

Субъект с риском наличия CD70+ солидной опухоли может представлять собой субъекта, у которого имеется один или несколько факторов риска CD70+ солидной опухоли, например возраст, курение, ожирение, высокое артериальное давление, излишнее воздействие солнца, воздействие химических веществ и/или вирусов, семейный анамнез или генетические состояния. Пациент-человек, который нуждается в лечении с использованием Т-клеток с CAR к CD70 (например, клетки CTX130), можно идентифицировать посредством обычного медицинского обследования, например, лабораторных тестов, биопсии, методов визуализации (например, исследования методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) или исследования методом компьютерной томографии (КТ), сцинтиграфии скелета, ультразвуковых исследований, исследования методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и рентгенографии).

Примеры CD70+ солидных опухолей, которые можно лечить, как предусмотрено в данном документе, включают рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак шейки матки, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак носоглотки,

немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластома, лимфому и/или меланому.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек, подлежащий лечению посредством способов, описанных в данном документе, может представлять собой пациента, у которого имеется опухоль, содержащая CD70-экспрессирующие опухолевые клетки (CD70-экспрессирующая опухоль), которую можно идентифицировать с помощью любого метода, известного из уровня техники, например с помощью иммунного анализа, такого как иммуногистохимический анализ (ИНС) или проточная цитометрия.

Любой из способов, раскрытых в данном документе, может дополнительно включать стадию идентификации пациента-человека, подходящего для терапии на основе аллогенных Т-клеток с CAR к CD70, на основе наличия и/или уровня CD70+ опухолевых клеток у пациента.

Пациент-человек, подлежащий лечению посредством способов, описанных в данном документе, может представлять собой пациента-человека, у которого имеется распространенная солидная опухоль, например неоперабельная или метастатическая солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек может иметь солидную опухоль, которая рецидивировала после лечения и/или стала устойчивой к лечению и/или перестала отвечать на лечение. Пациент-человек, подлежащий лечению посредством способов, описанных в данном документе, может представлять собой пациента-человека, который недавно получил предшествующее лечение. В качестве альтернативы, пациент-человек может являться таковым, который не получал предшествующего лечения.

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.

В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется рецидивирующая или рефрактерная CD70+ солидная опухоль. Используемый в данном документе термин "рефрактерная CD70+ солидная опухоль" относится к CD70+ солидной опухоли, которая не отвечает на лечение или становится устойчивой к лечению. Используемый в данном документе термин "рецидивирующая CD70+ солидная опухоль" относится к CD70+ солидной опухоли, которая возвращается после периода полного ответа. В некоторых вариантах осуществления рецидив имеет место после лечения. В других вариантах осуществления рецидив имеет место во время лечения. Отсутствие ответа может быть определено посредством стандартной медицинской практики. В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется рецидивирующая CD70+ солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления у пациента-человека имеется рефрактерная CD70+ солидная опухоль.

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 для лечения с применением лимфодеплеции, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (a) ухудшение клинического статуса, (b) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 90%, (c) неконтролируемая сердечная аритмия, (d) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (e) активная инфекция и (f) острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше. В другом примере у пациента-человека, который соответствует требованиям режима лечения, не проявляются один или несколько из следующих признаков: (a) активная неконтролируемая инфекция; (b) ухудшение клинического статуса по сравнению с клиническим статусом до лечения с применением лимфодеплеции и (c) острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше (например, ICANS).

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) предшествующее лечение с помощью любых средств, нацеливающихся на CD70, (b) предшествующее лечение с помощью любых Т-клеток с CAR или любых других модифицированных Т- или естественных киллерных клеток (NK), (c) предшествующая анафилактическая реакция на любое лечение с применением лимфодеплеции или любое из вспомогательных веществ, предусматриваемых любой схемой лечения, (d) наличие выявляемых злокачественных клеток в спинномозговой жидкости (CSF) или при магнитно-резонансной томографии (MRI), указывающее на метастазы в головном мозге, (e) наличие в анамнезе или присутствие клинически значимой патологии ЦНС, (f) нестабильная стенокардия, аритмия или инфаркт миокарда в течение 6 месяцев до скрининга и (g) неконтролируемая, острая, опасная для жизни бактериальная, вирусная или грибковая инфекция. В некоторых случаях у пациента-человека может отсутствовать сахарный диабет с уровнем HbA_{1c}, составляющим 6,5% или 48 ммоль/мл.

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 CTX130. Например, у пациента-человека, подвергаемого 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) активная неконтролируемая инфекция, (b) ухудшение клинического статуса и (c) острая неврологическая токсичность, характеризующаяся

степенью, составляющей 2 или больше (например, ICANS).

После каждого введения дозы Т-клеток с CAR к CD70 пациента-человека можно подвергать мониторингу в отношении случаев острой токсичности, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS), синдром лизиса опухоли (TLS), нейротоксичность, реакция "трансплантат против хозяина" (GvHD), внеопухолевая токсичность, специфическая в отношении мишени, и/или неконтролируемая пролиферация Т-клеток. Внеопухолевая токсичность, специфическая в отношении мишени, может предусматривать активность популяции генетически сконструированных Т-клеток в отношении активированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток, остеобластов и/или эпителия, подобного эпителию почечных канальцев. 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 быть предусмотрен 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 иммуотрансплантацией и иммунотерапией. Лимфодеплецию можно достичь посредством облучения и/или химиотерапии. "Лимфодеплецирующее средство" может представлять собой любую молекулу, способную обеспечивать снижение количества, деплецию или устранение эндогенных лимфоцитов и/или Т-клеток при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецирующие средства вводятся в количестве, эффективном для снижения количества лимфоцитов на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% по сравнению с

количеством лимфоцитов до введения средств. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецирующие средства вводятся в количестве, эффективном для снижения количества лимфоцитов таким образом, что количество лимфоцитов у субъекта ниже пределов выявления. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводится по меньшей мере одно (например, 2, 3, 4, 5 или больше) лимфодеплецирующее средство.

В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецирующие средства представляют собой цитотоксические средства, которые специфически уничтожают лимфоциты. Примеры лимфодеплецирующих средств включают без ограничения флударабин, циклофосфамид, бендамустин, 5-фторурацил, гемцитабин, метотрексат, дакарбазин, мелфалан, доксорубин, винбластин, цисплатин, оксалиплатин, паклитаксел, доцетаксел, иринотекан, фосфат этопсида, митоксантрон, кладрибин, денилейкин дифтитокс или DAB-IL2. В некоторых случаях лимфодеплецирующее средство может сопровождаться облучением в низких дозах. 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 в количестве приблизительно $20\text{-}50\text{ мг/м}^2$ (например, 30 мг/м^2) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней) и циклофосфамид в количестве приблизительно $300\text{-}600\text{ мг/м}^2$ (например, 500 мг/м^2) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней). В одном примере пациент-человек получает флударабин в количестве приблизительно $20\text{-}50\text{ мг/м}^2$ (например, 20 мг/м^2 или 30 мг/м^2) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней) и циклофосфамид в количестве приблизительно $300\text{-}600\text{ мг/м}^2$ (например, 500 мг/м^2) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней). В одном примере пациент-человек получает флударабин в количестве приблизительно $20\text{-}30\text{ мг/м}^2$ (например, 25 мг/м^2) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней) и циклофосфамид в количестве приблизительно $300\text{-}600\text{ мг/м}^2$ (например, 300 мг/м^2 или 400 мг/м^2) в день в течение 2-4 дней (например, 3 дней). При необходимости доза циклофосфамида может быть увеличена, например, до 1000 мг/м^2 .

Затем пациенту-человеку можно вводить любые Т-клетки с CAR к CD70, такие как клетки СТХ130, 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 СТХ130).

Поскольку аллогенные Т-клетки с CAR к CD70, такие как клетки CTX130, можно получить заранее, лимфодеплецирующая терапия, раскрытая в данном документе, может применяться к пациенту-человеку, у которого имеется CD70+ опухоль, в течение короткого временного окна (например, в течение 2 недель) после того, как пациент-человек был идентифицирован как подходящий для терапии на основе аллогенных CAR-Т-клеток 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) значительное ухудшение клинического статуса, (b) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 90%, (c) неконтролируемая сердечная аритмия, (d) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами, (e) активная инфекция и (e) острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше.

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) активная неконтролируемая инфекция, (b) ухудшение клинического статуса и (c) острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше.

(iii) Введение Т-клеток с CAR к CD70

В аспектах настоящего изобретения предусматриваются способы лечения CD70+

солидной опухоли, включающие подвергание пациента-человека лечению с применением лимфодеплеции и введение пациенту-человеку дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток, описанных в данном документе (например, клеток СТХ130).

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 обеспечиваться требуемый эффект(эффекты). Популяцию генетически сконструированных Т-клеток можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от такого короткого, как от нескольких часов, например двадцати четырех часов, до нескольких дней, до 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, требуемому для предупреждения или облегчения по меньшей мере одного или нескольких признаков или симптомов медицинского состояния (например, рака), и относится к количеству генетически сконструированных Т-клеток в популяции, достаточному для обеспечения требуемого 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 $1,0 \times 10^6$ клеток до приблизительно $1,0 \times 10^9$ CAR+ клеток, например от приблизительно $3,0 \times 10^7$ клеток до приблизительно $1,0 \times 10^9$ клеток, которые экспрессируют CAR к CD70 (CAR+ клеток), например CAR+ клеток СТХ130. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции может предусматривать от приблизительно $3,0 \times 10^7$ CAR+ клеток до приблизительно 9×10^8 клеток, которые экспрессируют CAR к CD70, например, CAR+ клеток СТХ130. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции может предусматривать по меньшей мере $3,0 \times 10^8$ CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере 4×10^8 CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере $4,5 \times 10^8$ CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере 5×10^8 CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере $5,5 \times 10^8$ CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере 6×10^8 CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере $6,5 \times 10^8$ CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере 7×10^8 CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере $7,5 \times 10^8$ CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере 8×10^8 CAR+ клеток СТХ130, по меньшей мере $8,5 \times 10^8$ CAR+ клеток СТХ130 или по меньшей мере 9×10^8 CAR+ клеток СТХ130. В некоторых примерах количество CAR+ клеток СТХ130 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 СТХ130), 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 СТХ130), 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 СТХ130), может находиться в диапазоне от приблизительно $3,0 \times 10^7$ до приблизительно 9×10^8 CAR+ Т-клеток, например, от приблизительно $3,5 \times 10^7$ до приблизительно 6×10^8 CAR+ Т-клеток или от приблизительно $3,5 \times 10^8$ до приблизительно $4,5 \times 10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции, как раскрыто в данном документе (например, клеток СТХ130), может находиться в диапазоне от приблизительно $4,5 \times 10^8$ до приблизительно 9×10^8 CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество генетически сконструированных Т-клеток в популяции, как

приблизительно $3,0 \times 10^8$ CAR⁺ клеток STX130 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток STX130, например, любую дозу или диапазон доз, раскрытые в данном документе. В некоторых примерах эффективное количество составляет $4,5 \times 10^6$ CAR⁺ клеток STX130. В некоторых примерах эффективное количество составляет 6×10^8 CAR⁺ клеток STX130. В некоторых примерах эффективное количество составляет $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток STX130. В некоторых примерах эффективное количество составляет 9×10^8 CAR⁺ клеток STX130.

В некоторых примерах пациент, у которого имеется распространенная CD70+ солидная опухоль (например, неоперабельная или метастатическая CD70+ солидная опухоль) или рецидивирующая/рефрактерная CD70+ солидная опухоль, может получать подходящую дозу клеток STX130, например, от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 6×10^8 CAR⁺ клеток STX130. Такому пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно 3×10^7 CAR⁺ клеток STX130. В качестве альтернативы пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно 1×10^8 CAR⁺ клеток STX130. В другом примере пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно 3×10^8 CAR⁺ клеток STX130. В другом примере пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно $4,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток STX130. В другом примере пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно 6×10^8 CAR⁺ клеток STX130. В другом примере пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток STX130. В другом примере пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток STX130.

В некоторых примерах пациент, у которого имеется распространенная CD70+ солидная опухоль (например, неоперабельная или метастатическая CD70+ солидная опухоль) или рецидивирующая/рефрактерная CD70+ солидная опухоль, может получать подходящую дозу клеток STX130, например от приблизительно 9×10^9 до приблизительно $1,0 \times 10^9$ CAR⁺ клеток STX130. Такому пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно 9×10^9 CAR⁺ клеток STX130. В качестве альтернативы пациенту с солидной опухолью можно вводить приблизительно $1,0 \times 10^9$ CAR⁺ клеток STX130.

В некоторых вариантах осуществления подходящую дозу клеток STX130 вводят из одного или нескольких флаконов с фармацевтической композицией, каждый из которых содержит приблизительно $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток STX130. В некоторых вариантах осуществления подходящую дозу клеток STX130 вводят из одного или нескольких флаконов с фармацевтической композицией, каждый из которых содержит приблизительно 3×10^8 CAR⁺ клеток STX130. В некоторых вариантах осуществления подходящая доза клеток STX130, вводимая субъекту, составляет количество, в один или несколько раз превышающее $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ клеток STX130, например, 1-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное или 6-кратное количество CAR⁺ клеток STX130. В некоторых вариантах осуществления подходящую дозу клеток STX130 вводят 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, как, например, уровни CD70, изменяются благоприятным образом (например, снижаются на по меньшей мере 10%), или улучшаются или ослабляются другие клинически приемлемые симптомы или маркеры CD70+ солидной опухоли. Эффективность также можно измерить по отсутствию ухудшения состояния субъекта, что оценивается по госпитализации или необходимости в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование CD70+ солидной опухоли останавливается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение CD70+ солидной опухоли у пациента-человека и включает (1) подавление заболевания, например остановку или замедление прогрессирования симптомов, или (2) облегчение заболевания, например регрессию симптомов, и (3) предупреждение или снижение вероятности развития симптомов.

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 составляет 1×10^6 CAR+ клеток, 1×10^7 CAR+ клеток, 3×10^7 CAR+ клеток, 1×10^8 CAR+ клеток, $1,5 \times 10^8$ CAR+ клеток, $4,5 \times 10^8$ CAR+ клеток, 6×10^8 CAR+ клеток, $7,5 \times 10^8$ CAR+ клеток, $9,8 \times 10^8$ или 1×10^9 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 1×10^6 CAR+ клеток, вторая доза составляет 1×10^7 CAR+ клеток, и третья доза составляет 1×10^8 CAR+ клеток. В качестве альтернативы первая доза CAR+ клеток является более низкой, чем вторая и/или третья доза CAR+ клеток, например, первая доза составляет 1×10^6 CAR+ клеток, а вторая и третьи дозы составляют 1×10^8 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) дозолIMITирующая токсичность (DLT), (b) CRS степени 4, степень которого не понижается до степени 2 в течение 72 часов, (c) GvHD, характеризующаяся степенью, превышающей 1, (d) нейротоксичность, характеризующаяся степенью, составляющей 3 или больше, (e) активная инфекция, (f) гемодинамическая нестабильность и (g) дисфункция 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) дозолIMITирующая токсичность (DLT), (b) CRS степени 4, степень которого не понижается до степени 2 в течение 72 часов, (c) GvHD, характеризующаяся степенью, превышающей 1, (d) нейротоксичность, характеризующаяся степенью, составляющей 3 или больше, (e) активная инфекция, (f) гемодинамическая нестабильность и (g) дисфункция органов.

В некоторых вариантах осуществления пациент-человек, как раскрыто в данном документе, может получать несколько доз Т-клеток с CAR к CD70 (например, клеток СТХ130, 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. См. также пример 11 ниже.

Повторное введение Т-клеток с CAR к CD70, таких как клетки СТХ130, может осуществляться по прошествии от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет после первой дозы Т-клеток с CAR к CD70. Например, повторное введение доз Т-клеток с CAR к CD70 может осуществляться по прошествии приблизительно 8-10 недель после первой дозы Т-клеток с CAR к CD70. В других примерах повторное введение доз Т-клеток с CAR к CD70 может осуществляться по прошествии приблизительно 14-18 недель после первой дозы Т-клеток с CAR к CD70. В случае если пациенту вводят две дозы, вторую дозу можно вводить в период времени, составляющий от 8 недель до двух лет (например, 8-10 недель или 14-18 недель) после предыдущей дозы. В некоторых примерах пациенту можно вводить три дозы. Третью дозу можно вводить по прошествии 14-18 недель после первой дозы, и вторую дозу можно вводить по прошествии 6-10 недель после первой дозы. В некоторых случаях интервал между двумя последовательными дозами может составлять приблизительно 6-10 недель.

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, ICANS), реакция "трансплантат против хозяина" (GvHD), внеопухолевая токсичность, специфическая в отношении мишени, и/или неконтролируемая пролиферация Т-клеток. Внеопухолевая токсичность, специфическая в отношении мишени, может предусматривать активность популяции генетически сконструированных Т-клеток в отношении активированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток, остеобластов и/или эпителия, подобного эпителию почечных канальцев. Также можно осуществлять мониторинг в отношении одного или нескольких из следующих

потенциальных проявлений токсичности: гипотонии, почечной недостаточности, гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH), длительных цитопений и/или поражения печени, индуцированного лекарственными средствами. 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 использованием Т-клеток с CAR к CD70, описанные в данном документе, можно применять для лечения пациента-человека, который подвергался предшествующей противораковой терапии. Например, Т-клетки с CAR к CD70, как описано в данном документе, можно вводить пациенту, который ранее получал лечение с помощью ингибитора иммунной контрольной точки, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора фактора роста эндотелия сосудов или их комбинации.

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 применять совместно с другими терапевтическими средствами для лечения CD70+ солидной опухоли 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 экспрессирующих CD70 опухолей

В настоящем изобретении также предусмотрены наборы для применения популяции Т-клеток с CAR к CD70, таких как клетки CTX130, описанные в данном документе, в способах лечения CD70+ солидных опухолей. Такие наборы могут содержать один или несколько контейнеров, содержащих первую фармацевтическую композицию, которая содержит одно или несколько лимфодеплецирующих средств, и вторую фармацевтическую композицию, которая содержит любую нуклеиновую кислоту или популяцию генетически сконструированных Т-клеток (например, клеток, описанных в данном документе), и фармацевтически приемлемый носитель.

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 в листке-вкладыше указывают, что популяцию генетически сконструированных Т-клеток применяют для лечения, задержки начала и/или облегчения симптомов CD70+ солидной опухоли 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 содержимое наборов, описанных выше.

Общие методики

При осуществлении настоящего изобретения на практике будут использоваться, если не указано иное, общепринятые методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе, такой как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.

B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.): Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds. 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practice approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985; *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986"; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986) и 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 $\beta 2M$ (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: (а) 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). См. также последовательности в **таблице 6**.

Таблица 6. Последовательности gRNA/целевые последовательности

Название	Немодифицированная последовательность	Модифицированная последовательность
sgRNA для TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC guuuuagagcuagaauagcaaguuaaaau aaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucgggucUUUU (SEQ ID NO: 7)	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCgu uuuagagcuagaauagcaaguuaaaauaaggcua guccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 6)
Спейсер sgRNA для TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC (SEQ ID NO: 9)	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC (SEQ ID NO: 8)
sgRNA для $\beta 2M$	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC guuuuagagcuagaauagcaaguuaaaau aaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucgggucUUUU (SEQ ID NO: 11)	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCgu uuuagagcuagaauagcaaguuaaaauaaggcua guccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 10)
Спейсер sgRNA для $\beta 2M$	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC (SEQ ID NO: 13)	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC (SEQ ID NO: 12)
sgRNA для CD70; также называется : T7	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC guuuuagagcuagaauagcaaguuaaaau aaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucgggucUUUU (SEQ ID NO: 3)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCgu uuuagagcuagaauagcaaguuaaaauaaggcua guccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 2)

Спейсер sgRNA для CD70; также называется : T7	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC (SEQ ID NO: 5)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGC (SEQ ID NO: 4)
sgRNA для CD70; также называется : T8	GCCCCGACGGACGCACCCAUAg uuuuagagcuagaaaagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucsaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcUUUU (SEQ ID NO: 67)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCAUAg uuuagagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggcu aguccguuaucsaacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 66)
Спейсер sgRNA для CD70; также называется : T8	GCCCCGACGGACGCACCCAU (SEQ ID NO: 69)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCAU (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

Антител о	Клон	Флуоресцентны й краситель	№ по каталогу	Разведение	На 1
TCR	BW242/41 2	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. % жизнеспособных клеток с отсутствующей экспрессией в популяциях клеток с ЗКО

	TRAC KO	β 2M KO	CD70 KO	3KO
3KO (CD70)	99%	79%	99%	80%

Чтобы оценить, влияет ли редактирование трех генов в Т-клетках на увеличение количества клеток, подсчитывали число клеток среди Т-клеток с редактированием двух и трех генов (неотредактированные Т-клетки использовали в качестве контроля) в течение двухнедельного периода 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 позволяют предположить, что редактирование нескольких генов не влияет на здоровое состояние Т-клеток, измеряемое 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 *β 2M* и/или гена *CD70* и экспрессируется химерный антигенный рецептор (CAR), нацеливающийся на CD70. Эти клетки обозначены как TCR⁻/ β 2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ или 3X 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), 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). Через приблизительно одну (1) неделю после электропорации клетки обрабатывали для проточной цитометрии с целью оценки уровней экспрессии TRAC, β 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
β 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, β 2M и CD70, а также экспрессировался CAR к CD70. На **фиг. 2** показано, что нормальные доли подгрупп CD4/CD8 Т-клеток поддерживались среди TRAC⁻/ β 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, 3X КО (TRAC⁻/ β 2M⁻/CD70⁻) Т-клетки с CAR к CD70 получали с использованием двух разных 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 с помощью подсчета числа жизнеспособных клеток. На **фиг. 3** показано, что TRAC⁻/ β 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⁻/ β 2M⁻/CAR к CD70⁺ Т-клетками с нокаутом по двум генам. Эти данные позволяют предположить, что нокаут гена *CD70* дает преимущество CAR к CD70⁺ Т-клеткам в отношении клеточной пролиферации.

Пример 4. Функция клеточного уничтожения у Т-клеток с CAR к CD70 с нокаутом по CD70

Анализ клеточного уничтожения использовали для оценивания способности TRAC⁻/ β 2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ Т-клеток и TRAC⁻/ β 2M⁻/CAR к CD70⁺ Т-клеток уничтожать линию полученных из почечно-клеточной карциномы (RCC) CD70⁺ адгерентных клеток (клеток A498). Адгерентные клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве 50000 клеток на лунку и оставляли на протяжении ночи при 37°C. На следующий день добавляли отредактированные Т-клетки с CAR к CD70 в лунки, содержащие клетки-мишени при указанных соотношениях. После указанного инкубационного периода Т-

клетки с CAR удаляли из культуры посредством аспирации и в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл Cell titer-Glo (Promega) для оценки числа оставшихся жизнеспособных клеток. Количество света, испускаемого на каждую лунку, затем количественно определяли с использованием планшет-ридера. Клетки характеризовались эффективным уничтожением клеток, полученных из RCC, после 24-часовой совместной инкубации (фиг. 4). Т-клетки с CAR к CD70 демонстрировали более высокую эффективность при нокауте CD70, что четко видно при низких соотношениях Т-клетка: А498 (1:1 и 0,5:1), при этом лизис клеток оставался выше 90% для TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ Т-клеток, в то время как лизис клеток падал ниже 90% для TRAC⁻/β2M⁻/CAR к CD70⁺ Т-клеток. Это позволяет предположить, что нокаут гена CD70 обеспечивает более высокую эффективность уничтожения клеток CAR к CD70⁺ Т-клетками.

Пример 5. Нокаут CD70 сохранял способность CAR к CD70⁺ Т-клеток к уничтожению при серийном повторном воздействии

CAR к CD70⁺ Т-клетки, полученные, как указано выше, подвергали серийному повторному воздействию линии CD70⁺ клеток рака почки А498 и оценивали их способность уничтожать линию CD70⁺ клеток рака почки А498.

Клетки А498 высевали в колбу Т25 и смешивали при соотношении 2:1 (Т-клетка и А498) с 10×10⁶ CAR к CD70⁺ Т-клеток, содержащих либо два (TRAC⁻/β2M⁻), либо три (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) редактирования с помощью gRNA. CAR к CD70⁺ Т-клетки с тремя редактированиями также обозначены как СТХ130.

Через два или три дня после каждого воздействия клетки подсчитывали, промывали, повторно суспендировали в свежей среде для Т-клеток и на следующий день подвергали повторному воздействию с тем же соотношением двух CAR к CD70⁺ Т-клеток на одну клетку А498 (2:1, CAR⁺ Т:целевые). Воздействие на CAR к CD70⁺ Т-клетки с помощью CD70⁺ клеток А498 повторяли 13 раз. Через три-четыре дня после каждого воздействия на клетки А498 (и до следующего повторного воздействия) отбирали аликвоты культуры и анализировали в отношении способности Т-клеток с CAR уничтожать клетки-мишени А498 при соотношении 2:1 (Т-клетка с CAR: целевая клетка). Уничтожение клеток измеряли с использованием Cell titer-glo (Promega). До первого воздействия с помощью А498 все из CAR к CD70⁺ Т-клеток с 2X КО (TRAC⁻/β2M⁻) и 3X КО (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) демонстрировали уничтожение клеток-мишеней, представленных клетками А498, приближающееся к 100%. Однако при девятом воздействии 2X КО (TRAC⁻/β2M⁻) CAR к CD70⁺ Т-клетки индуцировали уничтожение клеток-мишеней, представленных клетками А498, ниже 40%, тогда как 3X КО (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) CAR к CD70⁺ Т-клетки демонстрировали уничтожение клеток-мишеней выше 60% (фиг. 5). Уничтожение клеток-мишеней для 3X КО (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) CAR к CD70⁺ Т-клеток оставалось выше 60% даже после 13 повторных воздействий с помощью клеток А498, демонстрируя, что эти Т-CAR⁺ клетки были устойчивы к истощению.

Пример 6. Измерение секреции цитокинов CAR к CD70⁺ Т-клетками (СТХ130) в присутствии CD70⁺ клеток

Цель данного исследования заключалась в оценке способности СТХ130 секретировать эффекторные цитокины в присутствии клеток, экспрессирующих CD70.

Линии раковых клеток-мишеней (A498, ACHN и MCF7) получали из ATCC (HTB-44, CRL-1611 и HTB-22). Оценивали экспрессию CD70 на линиях клеток-мишеней. Вкратце, клетки СТХ130 или контрольные Т-клетки (неотредактированные Т-клетки) культивировали совместно с линиями клеток-мишеней в 96-луночных планшетах с U-образным дном при различных соотношениях Т-клеток и клеток-мишеней от 0,125:1 до 4:1. Клетки культивировали в общей сложности в 200 мкл среды для клеток-мишеней в течение 24 часов, как описано в каждом эксперименте. Анализ проводили в среде, не содержащей добавки, представленной IL-2 и IL-7, для оценки активации Т-клеток в отсутствие дополнительных цитокинов.

Способность клеток СТХ130 или контрольных Т-клеток (неотредактированные Т-клетки без экспрессии CAR к CD70) специфически секретировать эффекторные цитокины интерферон- γ (INF γ) и интерлейкин-2 (IL-2) после культивирования совместно с CD70-положительными или CD70-отрицательными клетками-мишенями оценивали с использованием анализа MILLIPLEX на основе Luminex, как описано в данном документе. Линии клеток A498 и ACHN использовали в качестве CD70⁺ линий-мишеней, а клеточную линию MCF7 использовали в качестве CD70- линии-мишени. Поскольку анализ проводили совместно с анализом цитотоксичности, то протокол являлся таким, как указано далее. Клетки-мишени высевали (50000 клеток-мишеней на 96-луночный планшет) в течение ночи, а затем культивировали совместно с клетками СТХ130 или контрольными Т-клетками при различных соотношениях (0,125:1, 0,25:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 и до 4:1 Т-клеток и клеток-мишеней). Через двадцать четыре часа планшеты центрифугировали, супернатант собирали и хранили при -80°C до дальнейшей обработки. IL-2 и INF γ количественно определяли следующим образом: набор MILLIPLEX[®] (Millipore, номер по каталогу HCYTOMAG-60K) использовали для количественного определения секреции INF γ и IL-2 с использованием магнитных микросфер HCYIFNG-MAG (Millipore, номер по каталогу HCYIFNG-MAG) и HIL2-MAG (Millipore, номер по каталогу HIL2-MAG) соответственно. Анализ проводили, следуя протоколу производителя. Вкратце, восстанавливали предусматриваемые MILLIPLEX[®] образцы, соответствующие стандарту и предназначенные для контроля качества (QC), и получали серийные разведения рабочих стандартов в диапазоне от 10000 пг/мл до 3,2 пг/мл. Предусматриваемые MILLIPLEX[®] стандарты, QC, а также клеточные супернатанты вносили в каждый планшет, и среду для анализа применяли для разведения супернатантов. Все образцы инкубировали с гранулами HCYIFNG-MAG и HIL2-MAG в течение 2 часов. После инкубации планшет промывали с использованием автоматизированного магнитного устройства для отмывки планшетов. Раствор антител для обнаружения цитокинов/хемокинов человека вносили в каждую лунку и инкубировали в течение 1 часа с последующей инкубацией со стрептавидино-фикоэритрином в течение 30 минут. Затем планшет промывали, образцы

ресуспендировали со 150 мкл проточной жидкости и встряхивали на планшетном шейкере в течение 5 минут. Проводимое в отношении образцов считывание данных выполняли с использованием прибора Luminox® 100/200™ с программным обеспечением xPONENT®, и получение и анализ данных завершали с использованием программного обеспечения MILLIPLEX® Analyst. Данные относительно медианной интенсивности флуоресценции (MFI) анализировали автоматически с применением способа с подбором 5-параметрической логистической кривой для расчета концентрации цитокинов, измеряемой в неизвестных образцах.

Чтобы определить, секретировали ли СТХ130 цитокины в присутствии CD70-положительных и CD70-отрицательных клеток, опытную партию 01 культивировали совместно с клетками A498, ACHN или MCF7 в течение 24 часов. Клетки СТХ130 секретировали как IFN γ , так и IL-2 после культивирования совместно с CD70+ клетками (A498 и ACHN), но не при культивировании совместно с CD70-отрицательными клетками (MCF7) (фиг. 6А-6С, таблицы 11-16). Неотредактированные контрольные Т-клетки не проявляли специфической секреции эффекторных цитокинов в тестируемых линиях клеток.

Таблица 11. Секретия IFN γ клетками СТХ130 в присутствии CD70+ линии клеток А498

Соотношение Т-клетки: А498	IFN γ (пг/мл)					
	СТХ130			Неотредактированные Т-клетки		
0	6,54*	6,54*	7,77	6,54*	7,14	6,54*
0,125	2592,57	2466,99	3213	6,54	6,54*	6,54*
0,25	5991	5592	5196	9,75	7,14	8,4
0,5	10713	9300	9354	7,14	6,54*	9,75
1	16830	14514	13752	6,54*	6,54	8,4
2	24645	22809	22053	8,4	14,01	15,54
4	38364	38364	38238	11,82	10,41	17,1

Образцы, отмеченные звездочками (*), указывают на то, что значение было ниже LoD (которое составляло 6,54 пг/мл).

Таблица 12. Секретия IL-2 клетками СТХ130 в присутствии CD70+ линии клеток А498

Соотношение Т-клетки: А498	IL-2 (пг/мл)					
	СТХ130			Неотредактированные Т-клетки		
0	6,15*	6,15*	6,15*	6,15*	6,15*	6,15*
0,125	733,14	668,61	728,22	6,15*	6,15*	6,15*

0,25	916,05	1056,24	1099,62	6,15*	6,15*	6,15*
0,5	1753,2	1684,14	1473,69	6,15*	6,15*	6,15*
1	2803,95	2277,39	1887,84	6,15*	6,15*	6,15*
2	3375	2930,55	2294,85	6,15*	6,15*	6,15*
4	3516	3162	2984,04	6,15*	6,15*	6,15*

Образцы, отмеченные звездочками (*), указывают на то, что значение было ниже LoD (которое составляло 6,15 пг/мл).

Таблица 13. Секретия IFN γ клетками STX130 в присутствии CD70+ линии клеток АСНН

Соотношение Т-клетки: АСНН	IFN γ (пг/мл)					
	СТX130			Неотредактированные Т-клетки		
0	2,92	5,4	7,12	4,36	4,88	2,36*
0,125	757,56	1369,96	981	2,92	7,12	8,36
0,25	1776,44	2668,04	2507,68	4,36	3,4	7,12
0,5	4508	6904	5248	8,36	7,12	7,12
1	11148	16568	13624	9,64	3,88	9,64
2	32460	52872	39228	5,96	7,12	8,36
4	67268	86620	64944	9,64	12,4	16,88

Образцы, отмеченные звездочками (*), указывают на то, что значение было ниже LoD (которое составляло 2,36 пг/мл).

Таблица 14. Секретия IL-2 клетками STX130 в присутствии CD70+ линии клеток АСНН

Соотношение Т-клетки: АСНН	IL-2 (пг/мл)					
	СТX130			Неотредактированные Т-клетки		
0	4,48*	4,48*	4,48*	4,48*	4,48*	4,48*
0,125	247,16	367,2	266,4	4,48*	4,48*	4,48*
0,25	455,16	651,6	552,92	4,48*	4,48*	4,48*
0,5	961,76	1466,04	1326,48	4,48*	4,48*	4,48*
1	2437,04	3337,08	2891,04	4,48*	4,48*	4,48*
2	7180	12148	8388	4,48*	4,48*	4,48*
4	12324	17040	13028	4,48*	4,48*	4,48*

Образцы, отмеченные звездочками (*), указывают на то, что значение было ниже LoD (которое составляло 4,48 пг/мл).

Таблица 15. Отсутствие секретии IFN γ клетками STX130 в присутствии

CD70- линии клеток MCF7

Соотношение Т-клетки: MCF7	IFN γ (пг/мл)					
	CTX130			Неотредактированные Т-клетки		
0	2,25*	2,25*	2,25*	2,25*	2,25*	2,25*
0,125	2,25*	2,25*	2,25*	2,25*	2,25*	2,25*
0,25	2,25*	3,26	3,26	2,25*	2,25*	2,25*
0,5	4,41	2,72	4,02	2,25*	2,25*	2,25*
1	5,86	5,23	5,23	2,25*	2,25*	2,25*
2	19,64	15,06	14,81	2,25*	2,72	2,25
4	29,85	29,58	21,44	6,08	4,41	4,41

Образцы, отмеченные звездочками (*), указывают на то, что значение было ниже LoD (которое составляло 2,25 пг/мл).

Таблица 16. Отсутствие секреции IL-2 клетками CTX130 в присутствии CD70+ линии клеток MCF7

Соотношение Т-клетки: MCF7	IL-2 (пг/мл)					
	CTX130			Неотредактированные Т-клетки		
0	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*
0,125	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*
0,25	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*
0,5	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*
1	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*
2	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*
4	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*	2,74*

Образцы, отмеченные звездочками (*), указывают на то, что значение было ниже LoD (которое составляло 2,74 пг/мл).

Эти результаты демонстрируют, что клетки CTX130 проявляют эффекторную функцию путем секретирования IFN γ и IL-2 в присутствии клеток почечно-клеточной карциномы, экспрессирующих CD70, но не в присутствии CD70-отрицательной линии клеток MCF7.

Пример 7. Селективное уничтожение CD70+ клеток, осуществляемое CAR к CD70+ Т-клетками (CTX130)

Целью данного исследования являлась оценка способности CTX130 селективно лизировать клетки, экспрессирующие CD70, *in vitro*.

Способность клеток CTX130 или контрольных Т-клеток (неотредактированные Т-

клетки без экспрессии CAR к CD70) специфически уничтожать CD70-положительные или CD70-отрицательные клетки-мишени оценивали с использованием анализа цитотоксичности на основе люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo. Клеточные линии A498 и ACHN использовали в качестве CD70-положительных линий-мишеней, а линию клеток MCF7 использовали в качестве CD70-отрицательной линии-мишени (все получены из ATCC). В этих экспериментах использовали Т-клетки из опытной партии 01.

Высевали по 50000 человеческих клеток-мишеней (CD70-положительных A498 и ACHN, CD70-отрицательных MCF7) на лунку 96-луночного планшета с непрозрачными стенками (Corning, Tewksbury, Массачусетс) в течение ночи. На следующий день клетки культивировали совместно с Т-клетками в различных соотношениях (0,125:1, 0,25:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 и 4:1 Т-клеток и клеток-мишеней) в течение 24 часов. Клетки-мишени инкубировали с неотредактированными Т-клетками (TCR+B2M+CAR-) или клетками СТХ130. После отмывания Т-клеток вручную с помощью PBS оставшиеся жизнеспособные клетки-мишени количественно определяли с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (анализ CellTiter-Glo® 2.0, Promega G9242). Флуоресценцию измеряли с использованием планшет-ридера Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, Вермонт). Перед обработкой клеток для анализа CellTiter-Glo супернатанты собирали для количественного определения секреции цитокинов после совместного культивирования.

Затем рассчитывали процент лизиса клеток, используя следующее уравнение с использованием относительных световых единиц (RLU):

% лизиса клеток = ((RLU клеток-мишеней без эфффектора - RLU клеток-мишеней с эфффектором)) / (RLU клеток-мишеней без эфффектора) X 100.

Опытную партию СТХ130 (партия 01) тестировали в отношении активности уничтожения клеток, направленной против CD70+ клеточных линий A498 и ACHN. Партия СТХ130 продемонстрировала высокую активность уничтожения клеток, в частности направленную как против характеризующихся высокой (A498; **фиг. 7А**), так и против характеризующихся низкой (ACHN; **фиг. 7В**) экспрессией CD70 клеток, но не при культивировании совместно с CD70- клетками MCF7 (**фиг. 7С**). В отсутствие экспрессии CAR контрольные неотредактированные Т-клетки были менее эффективны в уничтожении CD70+ клеток. См. также данные, приведенные в **таблицах 17-19**.

Таблица 17. Процент мертвых клеток А498 в присутствии клеток СТХ130

Соотношение Т-клетки: клетки А498	СТХ130			Неотредактированные Т-клетки		
	0,125	33,6	32,8	26,5	-3,1	-0,8
0,25	55,6	53,1	54,3	-1,2	2,7	3,1
0,5	82,4	80,7	78,5	-3,5	1,8	1,4
1	92,0	90,3	91,4	-6,5	-1,5	-2,6

2	94,5	91,3	91,6	-6,0	-1,1	-1,0
4	87,7	81,8	96,0	-7,4	-5,9	-6,7

Таблица 18. Процент мертвых клеток АСНН в присутствии клеток СТХ130

Соотношение Т-клетки: клетки АСНН	СТХ130			Неотредактированные Т-клетки		
	0,125	3,8	-1,3	-0,9	2,7	-2,9
0,25	7,5	0,2	4,2	4,6	-1,6	1,3
0,5	15,9	3,4	9,2	4,1	3,5	-0,9
1	18,1	14,5	17,5	0,3	10,3	-0,9
2	43,1	38,9	47,8	-0,8	-0,4	1,4
4	86,3	77,3	90,5	-5,6	5,6	-3,7

Таблица 19. Процент мертвых клеток МСF7 в присутствии клеток СТХ130

Соотношение Т-клетки: клетки МСF7	СТХ130			Неотредактированные Т-клетки		
	0,125	10,8	-4,4	0,2	-0,7	1,9
0,25	13,0	-10,2	-0,3	2,6	2,8	-0,1
0,5	5,6	-12,3	-7,1	0,8	-1,4	-9,5
1	0,6	-15,3	-10,3	-1,0	-3,7	-12,5
2	0,7	-22,6	-10,6	-3,5	-8,1	-13,7
4	0,1	-26,2	-16,2	-12,8	-10	-20,5

Эти результаты продемонстрировали, что клетки СТХ130 были способны лизировать линии раковых клеток *in vitro* CD70-специфическим образом.

Пример 8. КО CD70 улучшает уничтожение клеток для нескольких типов 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 уничтожить различные типы раковых клеток. Экспрессию CD70 измеряли с помощью анализа FACS с применением антитела к человеческому CD70 с Alexa Fluor 647 (BioLegend, № по кат. 355115). На **фиг. 8А** показана относительная экспрессия CD70 в клетках АСНН, измеренная с помощью FACS, по сравнению с другими линиями клеток рака почки: А498, 786-О, saski-1 и Saki-2. Кроме того, линии клеток, не являющиеся линиями клеток рака почки, оценивали по экспрессии CD70 с помощью анализа FACS (**таблица 20, фиг. 8А-8С**) с применением либо антитела к человеческому CD70 с Alexa Fluor 647 (BioLegend, № по кат. 355115; **фиг. 8В**), либо антитела к человеческому CD70 с FITC (BioLegend, № по кат. 355105); на **фиг. 8С**). SNU-1 (клетки рака желудочно-кишечного тракта) характеризовались высокими уровнями экспрессии CD70, которые были сходными с

таковым в клетках A498 (фиг. 8B). Линии клеток SKOV-3 (яичника), HuT78 (лимфомы), NCI-H1975 (легкого) и Hs-766T (поджелудочной железы) характеризовались уровнями экспрессии CD70, которые были сходными с таковым или превышали таковые в клетках ACHN, но были ниже, чем в клетках A498 (таблица 20, фиг. 8C).

Таблица 20. Линии клеток и относительная экспрессия CD70

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	T-клеточная лимфома	Высокая
HuT78	T-клеточная лимфома	Средняя
HuT102	T-клеточная лимфома	Средняя
PANC-1	Карцинома поджелудочной железы	Низкая
U937	AML	Отсутствие экспрессии
K562	Хронический миелогенный лейкоз	Отсутствие экспрессии (отрицательный контроль)

Анализ уничтожения клеток Способность CAR к CD70⁺ клеток с несколькими отредактированными генами уничтожать различные клетки солидных опухолей определяли с применением анализа уничтожения клеток. Для количественного определения уничтожения клеток клетки промывали, среду заменяли на 200 мл среды, содержащей 5 мг/мл DAPI в разведении 1:500 (Molecular Probes) (для подсчета мертвых/погибающих клеток). Наконец, в каждую лунку добавляли 25 мл гранул CountBright (Life Technologies). Затем клетки обрабатывали посредством проточной цитометрии.

1) Клетки/мл=((число событий с живыми целевыми клетками)/(число событий с гранулами)) x ((заданное количество гранул из партии (гранулы/50 мкл))/(объем образца))

2) Общее количество целевых клеток рассчитывали путем умножения клетки/мл на общий объем клеток.

3) Процент лизиса клеток затем рассчитывали с помощью следующего уравнения:

$\% \text{ лизиса клеток} = (1 - ((\text{общее количество целевых клеток в тестовом образце}) / (\text{общее количество целевых клеток в контрольном образце}))) \times 100.$

Действительно выяснили, что TRAC⁺/β2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) характеризовались неожиданно эффективным уничтожением клеток многих линий клеток солидной опухоли по прошествии всего лишь 24 часов совместного культивирования (на **фиг. 8D** показано уничтожение с помощью 3X KO CAR⁺ Т-клеток). 3X KO, CAR CD70⁺ Т-клетки уничтожали > 60% опухолевых клеток почки, поджелудочной железы и яичника (A498, ACHN, SK-OV-3 и Hs-766T) при соотношении эффекторных клеток и целевых клеток, составляющем 4:1, и > 50% при соотношении эффекторных клеток и целевых клеток, составляющем 1:1 (**фиг. 8D**). Уничтожение клеток для линий раковых клеток, которые характеризовались экспрессией CD70 (NCI-H1975, Calu-1 и DU 145) от средней до низкой, по-прежнему оставалось эффективным с уничтожением > 30% при соотношении эффекторных клеток и целевых клеток, составляющем 4:1, в течение 24 часов совместного культивирования (**фиг. 8E**). Более длительное воздействие (т. е. 96 часов) на любую из 3X KO CAR CD70⁺ Т-клеток приводило к повышению уровня уничтожения раковых клеток во всех типах клеток, в частности, для клеток SKOV-3, Hs-766T и NCI-H1975, где уничтожение составляло > 80% при соотношении эффекторных клеток и целевых клеток, составляющем 1:1 (**фиг. 8E**).

(b) Селективное уничтожение дополнительных линий клеток, экспрессирующих CD70

Определяли способность CAR к CD70⁺ Т-клеток селективно уничтожать CD70-экспрессирующие клетки. Разрабатывали анализ проточной цитометрии для тестирования уничтожения суспензионных линий раковых клеток (например, раковых клеток K562, MM.1S и HuT78, которые называются "целевыми клетками") 3X KO (CD70) (TRAC⁺/β2M⁻/CD70⁻) CAR к CD70⁺ Т-клетками. Две из применяемых линий целевых клеток представляли собой линии CD70-экспрессирующих раковых клеток (например, MM.1S и HuT78), в то время как у третьей, клетки которой использовали в качестве раковых клеток отрицательного контроля, экспрессия CD70 отсутствовала (например, K562). TRAC⁺/β2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70⁺ Т-клетки совместно культивировали либо с линиями CD70-экспрессирующих клеток MM.1S или HuT78, либо с отрицательной по CD70 линией клеток K562. Целевые клетки метили с помощью 5 мкМ efluor670 (eBiosciences), промывали и высевали с плотностью 50000 целевых клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Целевые клетки совместно культивировали с TRAC⁺/β2M⁻/CD70⁻ CAR к CD70⁺ Т-клетками при варьирующих соотношениях (0,5:1, 1:1, 2:1 и 4:1 CAR⁺ Т-клеток и целевых клеток) и инкубировали на протяжении ночи. Уничтожение целевых клеток определяли после 24 часов совместного культивирования. Клетки промывали и в каждую лунку добавляли 200 мкл среды, содержащей 5 мг/мл DAPI в разведении 1:500 (Molecular Probes) (для подсчета мертвых/погибающих клеток). Затем клетки анализировали посредством проточной цитометрии и определяли количество оставшихся живых целевых клеток.

На фиг. 8F-8H продемонстрировано селективное уничтожение целевых клеток с помощью TRAC-/B2M-/CD70- CAR к CD70+ Т-клеток. 24-часовое совместное культивирование с 3X KO (CD70) CAR+ Т-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. 8H**). 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. 8G**). Выяснили, что уничтожение целевых клеток было селективным в том отношении, что TRAC-/B2M-/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 в совместной культуре с Т-клетками без RNP) при любом тестируемом соотношении эффекторных клеток и целевых клеток (**фиг. 8F**).

Уничтожение клеток SNU-1 оценивали визуально. Уничтожение целевых клеток после длительного воздействия CAR+ Т-клеток также оценивали посредством микроскопии для раковых клеток SNU-1. Клетки SNU-1 высевали с плотностью 1 миллион клеток на лунку в 6-луночный планшет и смешивали при соотношении эффекторных клеток и целевых клеток, составляющем 4:1, с 3X KO (CD70) CAR к CD70+ Т-клетками. Совместную культуру инкубировали в течение шести (6) дней и наличие жизнеспособных раковых клеток оценивали с помощью микроскопа. Все целевые клетки карциномы желудка (SNU-1) элиминировали в лунках, содержащих TRAC⁺/β2M⁺CD70⁻/CAR к CD70+ Т-клетки, по сравнению с контрольными лунками, что указывает на то, что раковые клетки были полностью элиминированы CAR к CD70+ Т-клетками с увеличением их количества в совместной культуре.

Пример 9. Эффективность Т-клеток с CAR к CD70: обработка на модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы у мышей NOG

Способность Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70, элиминировать клетки карциномы почки, которые экспрессируют высокие уровни CD70, оценивали *in vivo* с использованием моделей подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы у мышей. Эти модели включали подкожную модель A498-NOG, подкожную модель 786-O-NSG, подкожную модель Saki-2-NSG и подкожную модель Saki-1-NSG. Клетки CTX130 получали, как описано в данном документе.

Для каждой модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы пять миллионов клеток, относящихся к указанному типу клеток, вводили путем инъекции подкожно в правый бок мышам NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/JicTac). Когда среднее значение размера опухоли достигало среднего размера, составляющего примерно 150 мм³, мышей либо оставляли без обработки, либо им внутривенно вводили путем инъекции 8×10⁶ CAR+ клеток CTX130 (TRAC⁺/B2M⁻/CD70⁻/CAR к CD70+ Т-клеток) на мыш. В случае подкожной модели A498-NOG

дополнительной группе мышей вводили путем инъекции $7,5 \times 10^6$ CAR+ TRAC⁻B2M⁻ Т-клеток с CAR к CD70 на мышь.

Клетки CTX130 полностью устраняли рост опухоли в подкожной модели A498-NOG (фиг. 9А) и в подкожной модели Saki-2-NSG (фиг. 9С). Рост опухоли у мышей, которым инъецировали TRAC⁻/B2M⁻/CAR к CD70+ Т-клетки, являлся сходным с таковым у не получавших обработку контрольных мышей (фиг. 9А). Клетки CTX130 значительно снижали рост опухоли в подкожной модели 786-O-NSG (фиг. 9В) и в подкожной модели Saki-1-NSG (фиг. 9D).

В совокупности эти результаты продемонстрировали, что клетки CTX130 снижали рост опухоли в четырех типах моделей подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы.

Модель с повторным воздействием опухолью, основанная на модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы

Эффективность CTX130 также тестировали на модели подкожного ксенотрансплантата A498 с повторным воздействием. Вкратце, пять миллионов клеток A498 вводили путем инъекции подкожно в правый бок мышам NOD (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/JicTac). Обеспечивали рост опухолей с достижением среднего размера, составляющего примерно 51 мм^3 , после чего мышей, несущих опухоль, рандомизировали на две группы (N=5/группа). Группу 1 оставляли без обработки, в то время как группа 2 получала 7×10^6 CAR+ клеток CTX130, а группа 3 получала 8×10^6 CAR+ TRAC⁻ B2M⁻ Т-клеток с CAR к CD70. В день 25 инициировали повторное воздействие опухолью, при этом 5×10^6 клеток A498 вводили путем инъекции в левый бок обработанным мышам, а также мышам в новой контрольной группе (группа 4).

Как показано на фиг. 10, у мышей, обработанных клетками CTX130, не наблюдалось роста опухоли после повторного воздействия посредством инъекции клеток A498 в левый бок, в то время как у мышей, обработанных с помощью Т-клеток с CAR к CD70, наблюдался рост опухоли из клеток A498, введенных путем инъекции в левый бок. Эти результаты продемонстрировали, что клетки CTX130 сохраняли более высокую эффективность *in vivo* после повторного воздействия опухолевых клеток, чем другие CAR к CD70+ Т-клетки (CAR+ TRAC⁻B2M⁻ Т-клетки с CAR к CD70).

Эффективность повторного введения доз CTX130 в модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата почечно-клеточной карциномы

Эффективность CTX130 также тестировали на модели подкожного ксенотрансплантата A498 с повторным введением доз. Вкратце, пять миллионов клеток A498 вводили путем инъекции подкожно в правый бок мышам NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/JicTac). Когда среднее значение размера опухоли достигало среднего размера, составляющего примерно 453 мм^3 , мышей либо оставляли без обработки, либо им внутривенно вводили путем инъекции (N=5) $8,6 \times 10^6$ CAR+ клеток CTX130 на мышь. Мышей в группе 2 обрабатывали второй и третьей дозами, составляющими $8,6 \times 10^6$ CAR+ клеток CTX130 на мышь, в дни 17 и 36 соответственно. Мышей в группе 3

обрабатывали второй дозой, составляющей $8,6 \times 10^6$ CAR+ клеток CTX130 на мышь, в день 36.

Как показано на **фиг. 11**, у мышей, которым вводили дозы клеток CTX 130 в день 1, а затем повторно в день 17 и 36, наблюдался меньший рост опухоли, чем у мышей, которым вводили только одну повторную дозу в день 36. Эти результаты продемонстрировали, что повторное введение доз клеток CTX130 обеспечивало повышенное подавление роста опухоли.

Пример 10. Эффективность Т-клеток с CAR к CD70: обработка на моделях ксенотрансплантата CD70+ солидной опухоли у мышей NOG.

Способность Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70, элиминировать опухолевые клетки, которые экспрессируют CD70, оценивали *in vivo* с применением модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата у мышей.

CRISPR/Cas9 и AAV6 применяли, как описано выше (см., например, пример 3), для получения Т-клеток человека, в которых отсутствует экспрессия TCR, $\beta 2M$, CD70 и при этом осуществляется экспрессия из локуса TRAC с применением конструкции CAR, нацеливающейся на CD70 (SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46). В этом примере активированные Т-клетки подвергали первой электропорации с использованием 3 разных комплексов RNP Cas9:sgRNA, содержащих sgRNA, нацеливающиеся на TRAC (SEQ ID NO: 6), $\beta 2M$ (SEQ ID NO: 10) и CD70 (SEQ ID NO: 2). Двухнитевой разрыв ДНК в локусе TRAC подвергали восстановлению путем репарации, направляемой гомологией, с помощью доставляемой AAV6 ДНК-матрицы, включающей донорную матрицу (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44) (кодирующая 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 3X КО (TRAC-/ $\beta 2M$ -/CD70-) CAR к CD70+ Т-клетки. Способность CAR к CD70+ Т-клеток снижать тяжесть заболевания, обусловленного линией опухолевых клеток с CD70+, оценивали на мышцах NOG с применением способов, описанных в данном документе.

Обработка на модели опухоли яичника

Способность Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70, элиминировать клетки аденокарциномы яичника, которые экспрессируют умеренные уровни CD70, оценивали *in vivo* с использованием модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата карциномы яичника (SKOV-3) на мышцах.

Способность CAR к CD70+ Т-клеток снижать тяжесть заболевания, обусловленного линией CD70+ клеток карциномы яичника, оценивали на мышцах NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, Аризона). Вкратце, двенадцать (12) самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержащиеся в условиях отсутствия

патогенов, за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10^6 клеток карциномы яичника SKOV-3/мышь в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли, составляющего 25-75 мм³ (целевой размер составляет ~50 мм³), мышей дополнительно делили на две группы обработки, как показано в **таблице 21**. В день 1 группа обработки 2 получала однократную внутривенную дозу CAR к CD70+ Т-клеток, составляющую 200 мкл, в соответствии с **таблицей 21**.

Таблица 21. Группы обработки

Группа	CAR-T	Клетки SKOV-3	Обработка Т-клетками (<i>i. v.</i>)	N
1	Отсутствует	5×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5
2	3X KO (CD70) CAR к CD70+ Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю со дня начала обработки. Ко дню 9 после инъекции опухоли, которые обрабатывали Т-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать снижение объема относительно опухолей у не получавших обработку животных. Ко дню 17 после инъекции CD70+ опухоли рака яичника у мышей, получавших обработку Т-клетками с CAR к CD70, были полностью элиминированы. Эта полная регрессия роста опухоли сохранялась у получавших обработку животных до дня 44 после инъекции, после чего у 4 из 5 мышей, получавших обработку Т-клетками с CAR к CD70, опухоли отсутствовали до конца наблюдения (день 69) (**фиг. 9А**). Эти данные демонстрируют, что 3X KO (TRAC- β 2M-/CD70-) CAR к CD70+ Т-клетки являются высокоэффективными *in vivo* для лечения опухолей яичника человека.

Обработка на модели опухоли немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC)

Способность Т-клеток, экспрессирующих CD70 CAR, элиминировать клетки аденокарциномы легкого, которые экспрессируют умеренные уровни CD70, оценивали *in vivo* с применением модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата карциномы легкого (NCI-H1975) на мышах.

Способность этих CAR к CD70+ Т-клеток снижать тяжесть заболевания, обусловленного линией CD70+ клеток карциномы легкого, 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}Il2rg^{tm1Lug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10^6 клеток карциномы легкого NCI-H1975/мышь в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли, составляющего 25-75 мм³ (целевой размер составляет ~50 мм³), мышей дополнительно делили на 2 группы обработки, как показано в **таблице 22**. В день 1 группа

обработки 2 получала однократную внутривенную дозу CAR к CD70+ Т-клеток, составляющую 200 мкл, в соответствии с **таблицей 22**.

Таблица 22. Группы обработки

Группа	CAR-T	Клетки NCI-N1975	Обработка Т-клетками (<i>i. v.</i>)	N
1	Отсутствует	5×10 ⁶ клеток/мышь	Отсутствует	5
2	3X KO (CD70) CAR к CD70+ Т-клетки	5×10 ⁶ клеток/мышь	1×10 ⁷ клеток/мышь	5

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю со дня начала обработки. Ко дню 12 после инъекции опухоли, которые обрабатывали Т-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать снижение объема относительно опухолей у не получавших обработку животных. Такая полная регрессия опухолей у получавших обработку животных наблюдалась до дня 33 после инъекции. Лечение с помощью Т-клеток с CAR к CD70 приводило к сильной активности против развившихся ксенотрансплантатов рака легкого N1975 через 40 дней после инъекции (повторный рост опухоли подавлялся у всех мышей до дня 40 с размером опухоли < 100 мм³), после чего опухоли начинали расти (**фиг. 9В**). Эти данные демонстрируют, что 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR к CD70+ клетки обладают сильной активностью против CD70+ опухолей рака легкого человека *in vivo*.

Обработка на модели опухоли поджелудочной железы

Способность Т-клеток, экспрессирующих CD70 CAR, элиминировать клетки карциномы поджелудочной железы, которые экспрессируют умеренные уровни CD70, оценивали *in vivo* с использованием модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата поджелудочной железы (Hs 766T) на мышах.

Способность этих CAR к CD70+ Т-клеток снижать тяжесть заболевания, обусловленного линией CD70+ клеток карциномы поджелудочной железы, 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}Il2rg^{tm1Sug}/JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержали в условиях отсутствия патогенов за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10⁶ клеток карциномы поджелудочной железы Hs766T в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли, составляющего 25-75 мм³ (целевой размер составляет ~50 мм³), мышей дополнительно делили на 2 группы обработки, как показано в **таблице 23**. В день 1 группа обработки 2 получала однократную внутривенную дозу CAR к CD70+ Т-клеток, составляющую 200 мкл, в соответствии с **таблицей 23**.

Таблица 23. Группы обработки

Группа	CAR-T	Клетки Hs766T	Обработка Т-клетками (<i>i. v.</i>)	N

1	Отсутствует	5×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5
2	3X KO (CD70) CAR к CD70+ Т-клетки	5×10^6 клеток/мышь	1×10^7 клеток/мышь	5

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю со дня начала обработки. Ко дню 15 после инъекции опухоли, которые обрабатывали Т-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать снижение объема у всех получавших обработку животных. Обработка с помощью CAR к CD70+ Т-клеток обеспечивала эффективное снижение размера CD70+ опухолей рака поджелудочной железы у всех тестируемых мышей ($< 37 \text{ мм}^3$) без признаков дальнейшего роста в течение всего исследования (до дня 67) (фиг. 9С). Эти данные демонстрируют, что 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR к CD70+ клетки индуцируют регрессию CD70+ опухолей рака поджелудочной железы человека *in vivo* с высокой активностью против развившихся ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы Hs766Т и со стойкими ответами в течение более чем 60 дней после начала обработки.

Обработка на модели опухоли желудка

Способность Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD70, элиминировать клетки аденокарциномы яичника, которые экспрессируют умеренные уровни CD70, оценивали *in vivo* с использованием модели подкожного опухолевого ксенотрансплантата карциномы желудка (SNU-1) на мышах.

Способность этих CAR к CD70+ Т-клеток снижать тяжесть заболевания, обусловленного линией CD70+ клеток карциномы яичника, оценивали на мышах NOG с применением способов, применяемых компанией Translational Drug Development, LLC (Скотсдейл, Аризона). Вкратце, двенадцать (12) самок мышей CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1}Sug/ JicTac) в возрасте 5-8 недель по отдельности помещали в вентилируемые клетки-микроизоляторы, содержащиеся в условиях отсутствия патогенов, за 5-7 дней до начала исследования. Мыши получали подкожную инокуляцию 5×10^6 клеток карциномы желудка SNU-1/мышь в заднюю часть правого бока. При достижении среднего размера опухоли, составляющего $25\text{-}75 \text{ мм}^3$ (целевой размер составляет $\sim 50 \text{ мм}^3$), мышей дополнительно делили на две группы обработки, как показано в **таблице 24**. В день 1 группа обработки 2 получала однократную внутривенную дозу CAR к CD70+ Т-клеток, составляющую 200 мкл, в соответствии с **таблицей 24**.

Таблица 24. Группы обработки

Группа	CAR-T	Клетки SNU-1	Обработка Т-клетками (<i>i. v.</i>)	N
1	Отсутствует	5×10^6 клеток/мышь	Отсутствует	5

2	3X KO (CD70) CAR к CD70+ T-клетки	5×10 ⁶ клеток/мышь	1×10 ⁷ клеток/мышь	5
---	-----------------------------------	----------------------------------	-------------------------------	---

Объем опухоли измеряли 2 раза в неделю со дня начала обработки. Ко дню 10 после инъекции опухоли, которые обрабатывали T-клетками с CAR к CD70, начинали демонстрировать снижение объема опухоли. Ко дню 20 после инъекции CD70+ опухоли рака желудка у мышей, получавших обработку T-клетками с CAR к CD70, наблюдалось значительное снижение размера опухоли. К дню 60 после инъекции CD70+ опухоли рака желудка характеризовались полной регрессией роста опухоли (фиг. 9D). Эти данные демонстрируют, что 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR к CD70+ T-клетки являются высокоэффективными *in vivo* для лечения опухолей желудка человека.

Пример 11. Открытое многоцентровое исследование фазы 1 безопасности и эффективности аллогенных, сконструированных посредством CRISPR-Cas9 T-клеток (CTX130) у взрослых субъектов с экспрессирующим CD70 раком с повышением дозы и расширением когорт.

CTX130 представляет собой средство иммунотерапии на основе CD70-направленных T-клеток, состоящее из аллогенных T-клеток, которые генетически модифицированы *ex vivo* с применением компонентов (одиночные направляющие РНК [sgRNA] и нуклеаза Cas9) для редактирования генов CRISPR-Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9). Модификации включали целенаправленное нарушение в локусах константной области альфа-цепи T-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 CD70-связывающего одноцепочечного переменного фрагмента, полученного из ранее охарактеризованной гибридомы IF6, направленной против CD70 (SEQ ID NO: 48, трансмембранного домена CD8 (SEQ ID NO: 54, костимулирующего домена 4-1BB (SEQ ID NO: 57) и сигнального домена CD3ζ (SEQ ID NO: 61).

1. ОБЗОР ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1 Исследуемая популяция

Повышение дозы и расширение когорт предусматривает взрослых субъектов с экспрессирующим CD70 раком например, CD70+ солидной опухолью, которая может являться распространенной (например, неоперабельной или метастатической), рецидивирующей или рефрактерной.

Повышение дозы и расширение когорт предусматривает взрослых субъектов с экспрессирующим CD70 раком поджелудочной железы, который может являться распространенным (например, неоперабельным или метастатическим), рецидивирующим или рефрактерным.

Повышение дозы и расширение когорт предусматривает взрослых субъектов с экспрессирующим CD70 раком желудка, который может являться распространенным

(например, неоперабельным или метастатическим), рецидивирующим или рефрактерным.

Повышение дозы и расширение когорт предусматривает взрослых субъектов с экспрессирующим CD70 раком легкого, который может являться распространенным (например, неоперабельным или метастатическим), рецидивирующим или рефрактерным.

Повышение дозы и расширение когорт предусматривает взрослых субъектов с экспрессирующим CD70 раком яичника, который может являться распространенным (например, неоперабельным или метастатическим), рецидивирующим или рефрактерным.

Повышение дозы и расширение когорт предусматривает взрослых субъектов с экспрессирующим CD70 раком предстательной железы.

В некоторых случаях у субъекта имеется почечно-клеточная карцинома (RCC), иллюстративная CD70+ солидная опухоль, которая может являться распространенной (например, неоперабельной или метастатической), рецидивирующей или рефрактерной.

1.2 Способ введения

Субъекты получали внутривенную (IV) инфузию CTX130 после лимфодеплецирующей (LD) химиотерапии.

1.3 Продолжительность участия субъектов

Субъекты участвуют в данном исследовании в течение примерно 5 лет. После завершения данного исследования все субъекты должны были участвовать в отдельном долгосрочном исследовании с последующим наблюдением в течение дополнительных 10 лет для оценки безопасности и выживаемости.

2. ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью исследования фазы 1 с повышением дозы является оценка безопасности и эффективности аллогенных, сконструированных посредством CRISPR-Cas9 Т-клеток к CD70 (CTX130), у субъектов с CD70+ солидной опухолью, например распространенной (например, неоперабельной или метастатической), рецидивирующей или рефрактерной CD70+ солидной опухолью.

Средства терапии на основе Т-клеток с CAR представляет собой adoptивные терапевтические средства на основе Т-клеток (ACT), применяемые для лечения злокачественных новообразований у человека. Хотя терапия на основе Т-клеток с CAR привела к большим клиническим успехам, включая длительную ремиссию у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной неходжкинской лимфомой (NHL) и педиатрических пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ALL), ее исследовательское применение согласно показаниям для солидных опухолей еще не продемонстрировало соответствующий клинический ответ. Кроме того, одобренные в настоящее время ACT являются аутологичными и требуют сбора и получения клеток для конкретного пациента, что приводило к повторному введению остаточных контаминирующих опухолевых клеток, присутствующих среди сконструированных Т-клеток (Ruella et al., (2018) *Nat Med*, 24, 1499-1503). 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). Кроме того, низкие значения частоты ответов у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и отсутствие ответа у пациентов с В-клеточным ALL, получавших лечение с применением средства терапии на основе аутологических Т-клеток с CAR, частично объяснялись истощением Т-клеточного фенотипа (Fraietta et al., (2018) *Nat Med* 24, 563-571; Riches et al., (2013) *Blood*, 121, 1612-21; Mackall, (2019) *Cancer Research, AACR annual meeting*, Abstract PL01-05; Long et al., (2015) *Nat Med*, 21, 581-90; Walker et al., (2017) *Mol Ther*, 25, 2189-2201; Zheng et al., (2018) *Drug Discov Today*, 23, 1175-1182).

Наконец, сбор, отправка, изготовление и отправка обратно лечащему врачу пациента требуют больших временных затрат, и в результате у некоторых пациентов наблюдается прогрессирование заболевания или летальный исход во время ожидания прохождения лечения. Готовый продукт на основе аллогенных Т-клеток с CAR мог бы обеспечить такие преимущества, как немедленная доступность, отсутствие производственных сбоев и Т-клетки от здоровых доноров, ранее не подвергавшихся химиотерапии, таким образом, обеспечивая более стабильный продукт по сравнению с терапевтическими средствами на основе аутологических Т-клеток с CAR.

С помощью редактирования посредством CRISPR-Cas9 можно добиться нарушения в белках эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR) и главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I. Нокаут TCR предназначен для значительного снижения или устранения риска реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD), тогда как нокаут МНС предназначен для увеличения персистенции Т-клеток с CAR. С помощью данного испытания, впервые проводимого с участием людей с CD70+ солидными опухолями, оценивали безопасность и эффективность данного подхода на основе модифицированных посредством CRISPR-Cas9 аллогенных Т-клеток с CAR.

CTX130, средство иммунотерапии на основе CD70-направленных генетически модифицированных аллогенных Т-клеток, получали из клеток здоровых доноров, следовательно полученные клетки предназначены для обеспечения каждого субъекта стабильным конечным продуктом достоверного качества. Кроме того, получение CTX130 посредством точной доставки и вставки CAR в сайт TRAC с помощью AAV и репарации, направляемой гомологией (HDR), не представляет рисков, ассоциированных со случайной вставкой лентивирусных и ретровирусных векторов.

В 4 стадиях редактирования, примененных к CTX130, безопасность и эффективность обеспечивали следующим образом.

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

- **Активность Т-клеток:** Вставка CD70-нацеливающейся конструкции CAR, 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 элиминированию TCR почти во всех клетках, экспрессирующих CAR. В то время как CRISPR-Cas9-опосредованное нарушение эндогенного TCR может значительно снизить 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 персистенции CTX130 и для снижения потенциального тесного связывания за счет повышенной экспрессии на активированных Т-клетках с CAR.

CTX130, средство иммунотерапии на основе CD70-направленных генетически модифицированных аллогенных Т-клеток, получали из клеток здоровых доноров, следовательно полученные клетки предназначены для обеспечения каждого субъекта стабильным конечным продуктом достоверного качества. Кроме того, получение CTX130 посредством точной доставки и вставки CAR в сайт TRAC с помощью AAV и репарации, направляемой гомологией (HDR), не представляет рисков, ассоциированных со случайной вставкой лентивирусных и ретровирусных векторов. 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 сочетается 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.

Наконец, CD70 является мембраносвязанным лигандом рецептора CD27, который принадлежит к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли. CD70 экспрессируется при некоторых гематологических злокачественных новообразованиях. CD70 также экспрессируется на высоком уровне негематологическими злокачественными новообразованиями, такими как почечно-клеточная карцинома и глиобластома.

3. ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичная цель, часть А (повышение дозы): оценить безопасность повышающихся доз CTX130 у субъектов с CD70+ солидной опухолью для определения рекомендованной дозы для части В (RPBD).

Первичная цель, часть В (расширение когорт): Оценить эффективность CTX130 у субъектов с CD70+ солидной опухолью, измеренную по частоте объективного ответа (ORR) в соответствии с Критериями оценки ответа при солидных опухолях (RECIST 1.1).

Вторичные цели (части А и В): Оценить активность CTX130, в том числе 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; дополнительно характеризовать

эффективность СТХ130 с течением времени; дополнительно оценить безопасность СТХ130 и описать и оценить нежелательные явления, представляющие особый интерес (AESI), в том числе синдром высвобождения цитокинов (CRS), синдром лизиса опухоли и GvHD; и определить характеристики фармакокинетики (PK) (увеличение количества и персистенцию) СТХ130 в крови.

Поисковые цели (части А и В): идентифицировать геномные, метаболические и/или протеомные биомаркеры, которые ассоциированы с заболеванием, клиническим ответом, устойчивостью, безопасностью или фармакодинамической (PD) активностью; дополнительно описать кинетику эффективности СТХ130 и описать эффект СТХ130 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. Диагностированная распространенная, рецидивирующая или рефрактерная CD70+ солидная опухоль

О Наличие опухолевых тканей.

о Наличие поддающегося измерению заболевания согласно оценке радиолога из исследовательского центра в соответствии с RECISTv1.1. Целевые очаги, расположенные в ранее облученном участке, считаются поддающимися измерению, если в таких очагах было продемонстрировано прогрессирование.

о Наличие по меньшей мере одного нецелевого очага, подходящего для биопсии.

4. Оценка общего состояния пациента по шкале Карновского (KPS), составляющая 80% или больше, согласно проведенному в период скрининга оцениванию.

5. Соответствие указанным в протоколе критериям для прохождения LD-химиотерапии и инфузии Т-клеток с CAR, описанных в данном документе.

6. Нормальная функция органов:

- Почки: клиренс креатинина (CrCl), больший или равный 50 мл/мин.

- Печень:

о уровень аспаратаминотрансферазы (AST) и аланинаминотрансферазы (ALT), меньший чем 3-кратный верхний предел нормы (ULN);

о уровень общего билирубина, меньший чем 2-кратный ULN (при синдроме Жильбера уровень общего билирубина, меньший чем 3 мг/дл) и нормальный уровень

конъюгированного билирубина;

о уровень альбумина, больший чем 90% нижнего предела нормы.

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

- Легкие: уровень насыщения кислородом из воздуха в помещении, больший чем 90%, согласно данным пульсоксиметрии.

- Гематологические характеристики: Количество тромбоцитов, большее чем $100000/\text{мм}^3$, абсолютное количество нейтрофилов, большее чем $1500/\text{мм}^3$, и уровень гемоглобина (Hgb), больший чем 9 г/дл, без предварительной трансфузии клеток крови до скрининга.

- Свертывание крови: активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT) или PTT, меньшее или равное 1,5-кратному ULN.

7. Пациенты-женщины с детородным потенциалом (в постменоархиальном периоде, с интактной маткой и по меньшей мере 1 яичником, а также находящиеся менее 1 года в постменопаузе) должны дать согласие на применение высокоэффективного способа контрацепции (как указано в протоколе) с момента включения в исследование и на протяжении по меньшей мере 12 месяцев после последней инфузии CTX130.

8. Пациенты-мужчины должны дать согласие на применение высокоэффективного способа контрацепции (как указано в протоколе) с момента включения в исследование и на протяжении по меньшей мере 12 месяцев после последней инфузии CTX130.

4.2 Критерии исключения

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

1. Предшествующее лечение с помощью любых средств, нацеливающихся против CD70.

2. Предшествующее лечение с помощью Т-клеток с CAR или любых других модифицированных Т- или естественных киллерных клеток (NK).

3. Известные противопоказания к применению любого(-ых) средства(средств) LD-химиотерапии или любого из вспомогательных веществ продукта на основе CTX130.

4. Субъекты с проявлением наличия у них злокачественного новообразования со стороны центральной нервной системы (ЦНС), о чем свидетельствовали положительные результаты скрининга посредством MRI или анамнез.

5. История или наличие клинически значимой патологии ЦНС, такой как судороги, инсульт, тяжелая травма головного мозга, заболевание мозжечка, синдром обратимой задней энцефалопатии (PRES) в анамнезе с предшествующей терапией или другое состояние, которое может увеличить формы токсичности, связанной с Т-клетками с CAR.

6. Текущий клинически значимый плевральный выпот, или асцит, или любой перикардальный выпот, или плевральный выпот или асцит в анамнезе за последние 2 месяца.

7. Нестабильная стенокардия, клинически значимая аритмия или инфаркт миокарда

в течение 6 месяцев до скрининга.

8. Сахарный диабет с текущим уровнем гемоглобина A1c (HbA1c) 7,0% или 48 ммоль/мл.

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

10. Положительный результат на наличие вируса иммунодефицита человека 1 или 2 типа 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 невыявляемая вирусная нагрузка (посредством количественной полимеразной цепной реакции или тестирования на нуклеиновые кислоты).

11. Предшествующее или сопутствующее злокачественное новообразование, за исключением тех, которых подвергали лечению посредством подхода, направленного на излечение, не требующего системной терапии, а также находившихся в ремиссии в течение более чем 12 месяцев, или любое другое локализованное злокачественное новообразование, которое характеризуется низким риском развития до метастатического заболевания.

12. Первичное иммунодефицитное нарушение или активное аутоиммунное заболевание, требующее применения стероидов и/или любой другой иммуносупрессивной терапии.

13. Предшествующие случаи прохождения трансплантации паренхиматозных органов или получения трансплантата костного мозга.

14. Применение противоопухолевого или исследуемого средства, в том числе лучевой терапии, в течение 14 дней до включения в исследование. Применение физиологических доз стероидов допускается для субъектов, ранее принимавших стероиды, при наличии клинических показаний и после консультации с медицинским наблюдателем.

15. Получали живые вакцины или лекарственные препараты на основе растительного сырья, предусматриваемые в рамках традиционной китайской медицины, или растительные лекарственные средства, не являющиеся отпускаемыми без рецепта, в течение 28 дней до включения в исследование.

16. Диагноз значительного психического нарушения, которое может серьезно помешать способности субъекта принимать участие в исследовании.

17. Беременные или кормящие женщины.

5. СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1 План исследования

Это было несравнительное открытое многоцентровое исследование фазы 1 для оценки безопасности и эффективности СТХ130 у субъектов с CD70+ солидной опухолью. 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 CD70+ солидной опухолью, например неоперабельной или метастатической. Субъект мог переходить как на CPI, так и на ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Повышение дозы осуществляли в соответствии с критериями, описанными в данном документе.

В части В инициировали создание расширенной когорты для дальнейшей оценки безопасности и эффективности СТХ130 с использованием оптимальной 2-стадийной схемы Саймона. На первой стадии субъекты подвергаются лечению с использованием рекомендованной дозы СТХ130 для расширения когорты в рамках части В (на уровне или ниже MTD, определенной в части А).

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. 13**.

3 основных стадии являлись следующими.

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

Стадия 2 - LD-химиотерапия и инфузия СТХ130.

Стадия 2А - LD-химиотерапия: совместное введение 30 мг/м² флударабина и 500 мг/м² циклофосфида внутривенно (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 СТХ130.

Стадия 2В - инфузия СТХ130.

Соответствие клиническим требованиям - как перед началом LD-химиотерапии, так и перед началом инфузии СТХ130 соответствие субъектов клиническим требованиям должно быть подтверждено повторно.

Стадия 3 - последующее наблюдение (5 лет после последней инфузии СТХ130).

В течение периода после инфузии СТХ130 субъектов подвергали мониторингу в отношении видов острой токсичности (дни 1-28), включая CRS, синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (ICANS), GvHD и другие АЕ. Рекомендации по контролю токсичности описаны в данном документе (см. раздел 8). В ходе части А (повышения дозы) всех субъектов госпитализируют в течение первых 7 дней после инфузии СТХ130 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 СТХ130.

Субъекты участвуют в данном исследовании в течение не более 5 лет. После завершения данного исследования субъекты должны принять участие в отдельном

долгосрочном исследовании с последующим наблюдением в течение дополнительных 10 лет для оценки долгосрочной безопасности и выживаемости.

5.2 Повышение дозы СТХ130

В данном исследовании могут оцениваться следующие дозы СТХ130, основанные на количестве CAR⁺ Т-клеток (таблица 25), начиная с уровня дозы 1 (DL1). Предел дозы, составляющий 1×10^5 TCR⁺ клеток/кг, может быть установлен для всех уровней доз.

Таблица 25. Повышение дозы СТХ130.

Уровень дозы	Общая доза CAR ⁺ Т-клеток
-1 (уменьшение)	1×10^6
1	3×10^7
2	1×10^8
3	3×10^8
4	9×10^8

CAR: химерный антигенный рецептор.

Повышение дозы осуществляют с использованием стандартной схемы 3+3, согласно которой от 3 до 6 субъектов включают в исследование для каждого уровня дозы в зависимости от возникновения видов дозолимитирующей токсичности (DLT) после первоначального введения дозы, как определено в данном документе. Период оценки DLT начинается с первоначальной инфузии СТХ130 и длится в течение 28 дней. При уровне дозы 1 (и уровне дозы -1, если необходимо) субъекты подлежат получению лечения поэтапно, так что субъект будет получать СТХ130 только после того, как предыдущий субъект завершал период оценки DLT (например, со смещением на 28 дней). В случае возникновения DLT при уровне дозы 1, требующей снижения дозы до уровня дозы -1, в случае всех субъектов вводимые им дозы при уровне дозы -1 также будут подвергаться смещению на 28 дней. Если при уровне дозы 1 не возникает DLT, то повышение дозы продолжают до уровня дозы 2, а введение дозы будет подвергаться смещению на 14 дней между каждым субъектом. Если DLT не возникает при первых 2 уровнях дозы (уровни дозы 1 и 2), то при последующих уровнях дозы (уровни дозы 3 и 4) введение дозы будет подвергаться смещению на 7 дней между каждым субъектом.

Повышение дозы осуществляют в соответствии со следующими правилами:

- о Если 0 из 3 субъектов испытывает DLT, то уровень дозы повышают до следующего.
- о 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;
- при уровнях дозы 2 или 3 предыдущий уровень дозы заявляют как MTD.

○ Если большее или равное 2 количество из 3 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 понижение до уровня дозы -1;

○ При уровнях дозы 2 или 3 предыдущий уровень дозы заявляют как MTD.

○ Могут допускаться промежуточные дозы между DL2 и DL3, например, $1,5 \times 10^8$ CAR⁺ Т-клеток.

○ Могли быть допустимы промежуточные дозы между DL3 и DL4, например $4,5 \times 10^8$ CAR⁺ Т-клеток, 6×10^8 CAR⁺ Т-клеток или $7,5 \times 10^8$ CAR⁺ Т-клеток, что могло быть основано на обзоре данных по безопасности и эффективности DL4.

○ Никакое повышение дозы не превышает наивысшую дозу, указанную в **таблице 25** в данном исследовании.

5.2.1 Определение максимально переносимой дозы

MTD является самой высокой дозой, при которой виды DLT наблюдаются у менее чем 33% субъектов. MTD не могла быть определена в данном исследовании. Решение о переходе к расширенной когорте, предусматриваемой в часть В, может приниматься в отсутствие MTD при условии, что доза находится на уровне максимальной исследуемой дозы (или MAD) для части А исследования или не превышает его.

5.2.2 Определения DLT

Виды токсичности оценивали и документировали в соответствии с Общими терминологическими критериями нежелательных явлений (CTCAE) Национального института рака (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 СТХ130, не рассматриваются в качестве видов DLT.

DLT определяют как:

А. GvHD, характеризующаяся степенью, большей чем 2, если она не демонстрирует ответ на лечение стероидами (например, 1 мг/кг/день) в течение 7 дней (оценивание GvHD представлено в **таблице 31**).

В. Любая токсичность 3-5 степени, связанная с СТХ130, возникающая в течение 28 дней незамедлительно после инфузии СТХ130, с исключениями, которые сгруппированы ниже.

Следующее **HE** подлежит рассмотрению в качестве видов DLT:

- о Любой CRS 3 или 4 степени в соответствии с системой оценки CRS, течение которого улучшается до достижения степени, составляющей 2 или меньше, при соответствующем медицинском вмешательстве в течение 72 часов.
- о Лихорадка 3 или 4 степени, разрешающаяся в течение 72 часов при соответствующем медицинском вмешательстве.
- о Усталость 3 степени продолжительностью менее 7 дней.
- о Любые установленные посредством функциональных тестов печени аномалии 3 или 4 степени, степень которых понижается до степени, составляющей 2 или меньше, в течение 14 дней.
- о Любая токсичность 3 степени, затрагивающая жизненно важные органы, кроме сердца (например, легкие, почки), степень которой понижается до степени, составляющей 2 или меньше, в течение 7 дней.
- о Любая кардиотоксичность 3 степени, степень которой понижается до степени, составляющей 2 или меньше, в течение 72 часов.
- о Любая нейротоксичность 3 степени, которая в течение 72 часов разрешается до степени, составляющей 2 или меньше.
- о Смерть вследствие прогрессирования заболевания.
- о GvHD, которая не является рефрактерной к стероидам и разрешается до степени 1 в течение 14 дней.

5.3 Повторное введение доз CTX130 в рамках части А и части В

В данном исследовании будет предусматриваться возможность не более чем 2 повторных введений доз клеток CTX130 субъектам. Чтобы рассматриваться для повторного введения доз, субъекты должны либо 1) достичь частичного ответа (PR) или полного ответа (CR) после первоначальной или второй инфузии CTX130 и впоследствии продемонстрировать прогрессирование в течение 2 лет после последней дозы, даже без соответствия формальным критериям RECIST в отношении прогрессирования, либо 2) достигнуть PR (но не CR) или стабильного заболевания (SD) во время исследовательского визита через 3 месяца после самой последней инфузии CTX130 (решения о повторном введении доз будут основываться на локальных КТ-сканировании/оценке).

Самое раннее время, когда субъекту может быть назначена повторная доза, составляет 2 месяца после первоначальной или второй инфузии CTX130.

Для повторного введения доз CTX130 субъекты должны соответствовать следующим критериям:

- Подтверждение того, что опухоль является CD70⁺, при рецидиве (на основе локальной или центральной оценки), если имеется очаг, поддающийся биопсии.
- Отсутствие предшествующей DLT во время повышения дозы (если это применимо).
- Отсутствие предшествующего CRS, характеризующегося степенью, составляющей 3 или больше, который не подвергся разрешению до степени,

составляющей 2 или меньше, в течение 72 часов после инфузии СТХ130.

Отсутствие предшествующей GvHD, характеризующейся степенью, большей чем 1, после инфузии СТХ130.

Отсутствие предшествующего ICANS, характеризующегося степенью, составляющей 2 или больше, после инфузии СТХ130.

Соответствие первоначальным критериям включения в исследование (№1, №2, №4-8) и критериям исключения (№2 [за исключением предшествующего лечения с помощью Т-клеток с CAR]-17), как описано в данном документе (см. раздел 4).

Соответствие критериям LD-химиотерапии и инфузии СТХ130, как описано в данном примере.

Субъекты, которым вводят повторную дозу, должны находиться под наблюдением в соответствии с первоначальным введением доз. Все скрининговые процедуры оценки подлежат повторению, включая MRI головного мозга.

Дополнительные соображения относительно повторного введения дозы включают следующие:

КТ-сканирование, демонстрирующее рецидив/прогрессирование заболевания, будет служить новым исходным уровнем для оценки ответа опухоли. Повторное введение доз должно осуществляться в течение 28 дней после этого сканирования.

Если у субъекта сохраняется PR при визите в месяц 3 и ему повторно вводится доза, то для оценки ответа опухоли продолжают использовать результаты исходного сканирования.

Субъекты из когорт с повышением дозы, которым повторно вводится доза, будут получать самую высокую дозу СТХ130, которая считается безопасной.

Субъектам в расширенной когорте будет повторно вводиться доза, рекомендуемая для части В.

Перед каждой процедурой введения дозы субъекты могут получать еще одну дозу средства LD-химиотерапии.

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 СТХ130 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 СТХ130. После завершения периода лечения субъектов оценивают в отношении ответа, демонстрируемого опухолью, прогрессирования заболевания и выживаемости. На протяжении всех периодов исследования субъектов подвергали регулярному мониторингу в отношении безопасности.

Полный график процедур оценки представлен в **таблице 26** и **таблице 27**. 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 СТХ130.

Тест в отношении беременности ⁹	X	X									X		X	X						
MRI головного мозга ¹⁰	X																			
Оценка общего состояния пациента по шкале Карновского (KPS)	X		X		X		X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Эхокардиограмма	X																			
ECG в 12 отведениях ¹¹	X	X	X									X								
Оценка ICE ¹²	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
PRO ¹³	X		X				X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Сопутствующие лекарственные препараты ¹⁴	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
АЕ ¹⁵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Госпитализация					Непрерывно															

Процедуры оценки (центральные) заболевания/ответа, проводимые в отношении метастатической ccRCC																				
КТ-сканирование ¹⁶	X												X	X	X	X	X	X	X	X
Биопсия опухоли ^{17,18}	X						X						X							
Лабораторные процедуры оценки (локальные)																				
СВС с лейкоцитарной формулой	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Химический анализ сыворотки крови ¹⁹	X	X	X ¹⁹	X	X	X	X	X	X	X	X									
Параметры свертывания крови	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Серологический анализ вирусов ²⁰	X																			
Подгруппы лимфоцитов ²¹	X	X	X			X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ферритин, CRP, триглицериды	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Биомаркеры (кровь, центральная нервная система)																				

Уровни СТХ130 ²²	X		X ²³ до/после	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Цитокины ²⁴	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
BSAP, PINP ²⁵	X		X				X		X	X	X			X	X		X			
Ab к СТХ130	X									X				X	X		X			X
Внеклеточная ДНК	X									X			X	X	X	X	X		X	X
Исследуемые биомаркеры ²⁶	X ⁷	X ⁸	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

АЕ: нежелательное явление; BSAP: специфическая в отношении кости щелочная фосфатаза; Cas9: CRISPR-ассоциированный белок 9; CBC: общий анализ крови; chemo: химиотерапия; ЦНС: центральная нервная система; CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; CRP: С-реактивный белок; CRS: синдром высвобождения цитокинов; КТ: компьютерная томография; д.: день; ECG: электрокардиограмма; EORTC: Европейская организация по исследованию и лечению рака; FACT-G: общая функциональная оценка терапии рака; FCSI-19: функциональная оценка терапии рака - почечный симптоматический индекс; HBV: вирус гепатита В; HCV: вирус гепатита С; HIV: вирус иммунодефицита человека; ICE: энцефалопатия, ассоциированная с иммунными эффекторными клетками; LD: лимфодеплецирующий; М: месяц; MRI: магнитно-резонансная томография; PINP: N-концевой пропептид проколлагена I типа; PRO: исход, сообщаемый пациентом; TBNK: Т-, В-, естественные киллерные клетки (NK).

Примечание: Процедуры оценки на исходном уровне подлежат осуществлению перед инфузией СТХ130 в день 1, если не указано иное; сведения касательно образцов, тестируемых централизованно, см. в Руководстве по лабораторным исследованиям.

Примечание: Как для части А, так и для части В в данном исследовании предусматривается возможность повторного введения дозы СТХ130 субъектам в соответствии с критериями повторного введения дозы, раскрытыми в данном документе. Все скрининговые процедуры оценки подлежат повторению, включая MRI головного мозга. Субъекты, которым вводят повторную дозу, должны находиться под наблюдением согласно графику процедур оценки в соответствии с первоначальным введением доз. Самое раннее время, когда

субъекту может быть назначена повторная доза, составляет 2 месяца после первоначальной или второй инфузии СТХ130.

¹ Скрининговые процедуры оценки подлежат завершению в течение 14 дней после подписания формы информированного согласия. Субъектам разрешается прохождение однократного повторного скрининга, который может осуществляться в течение 3 месяцев с момента первоначального согласия.

² Субъекты должны начинать прохождение LD-химиотерапии в течение 7 дней после включения в исследование. После завершения LD-химиотерапии убеждаются в том, что период выведения составил по меньшей мере 48 часов (но не более чем 7 дней) перед инфузией СТХ130. Перед LD-химиотерапией проводят физикальное обследование, определение веса и лабораторные исследования свертывания крови. Основные показатели жизнедеятельности, CBC, клинический химический анализ и АЕ/сопутствующие лекарственные препараты подлежат оценке и регистрированию каждый день (т. е. 3 раза) в ходе LD-химиотерапии.

³ СТХ130 будет вводиться через период времени, составляющий от 48 часов до 7 дней, после завершения LD-химиотерапии.

⁴ Соответствие требованиям подлежит подтверждению каждый раз после завершения скрининга. Соответствие требованиям также подлежит подтверждению в первый день LD-химиотерапии, в день инфузии СТХ130. Соответствие требованиям подлежит подтверждению после завершения всех процедур оценки в указанный день и перед введением дозы.

⁵ Включает полный хирургический и кардиологический анамнез.

⁶ Включает оценку признаков и симптомов GvHD: кожи, слизистой оболочки полости рта, склеры, рук и ног.

⁷ Включает артериальное давление, частоту сердечных сокращений, частоту дыхания, пульсоксиметрию и температуру.

⁸ Рост только при скрининге.

⁹ Для субъектов-женщин с детородным потенциалом. Оценка проводится в местной лаборатории. Тесты на беременность необходимы при скрининге, в течение 72 часов после начала LD-химиотерапии и в М1/день 28, М2/день 56 и М3/день 84. Все тесты будут представлять собой тесты сыворотки крови на наличие беременности.

¹⁰ MRI головного мозга подлежит проведению при скрининге (т. е. в течение 28 дней до инфузии СТХ130).

¹¹ Тест, предусматривающий ECG в 12 отведениях, подлежит проведению перед LD-химиотерапией и инфузией СТХ130.

¹² В день 1 до введения СТХ130. Если симптомы со стороны ЦНС сохраняются после дня 42, оценку ICE следует продолжать выполнять примерно один раз в 2 дня до разрешения симптомов до степени 1 или до исходного уровня.

¹³ Опросники EORTC QLQ-C30, EQ-5D-5L, FKSI-19 и FACT-G. PRO должны заполняться при скрининге, до введения дозы в день 1, а затем в день 7, день 15, день 22 и день 28 после инфузии СТХ130 и впоследствии в соответствии с графиком оценки.

¹⁴ Данные относительно всех сопутствующих лекарственных препаратов будут собираться в течение 3 месяцев после инфузии СТХ130. После этого будут собираться данные относительно только выбранных сопутствующих лекарственных препаратов (например, иммуномодулирующих средств, препаратов крови, противоопухолевых лекарственных препаратов, а также гормонов и факторов роста).

¹⁵ Оценка безопасности для сведенных в таблицу требований к отчетности об АЕ в рамках периода исследования. Данные относительно нежелательных явлений будут собираться для включенных в исследование субъектов с момента подписания ICF до окончания исследования в соответствии с требованиями к отчетности об АЕ для каждого периода времени в рамках исследования, как описано в данном документе.

¹⁶ КТ на исходном уровне подлежит выполнению в течение 28 дней до инфузии СТХ130. КТ для оценки ответа будет выполняться через 6 недель после инфузии СТХ130 (день 42) и в месяцы 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 24 после инфузии СТХ130. Результаты сканирования будут оцениваться локально и централизованно для определения целей. По возможности следует использовать одно и то же оборудование для КТ и параметры тестов. MRI будет выполняться в тех случаях, когда КТ противопоказана и после обсуждения с медицинским наблюдателем.

¹⁷ Биопсия будет выполняться при скрининге, если биоптат ткани после прогрессирования является недоступным/неприемлемым, в день 7+2 дня и в день 42 ± 2 дня после введения дозы СТХ130.

¹⁸ Если во время исследования возникает рецидив, то следует сделать все возможное, чтобы получить биоптат рецидивирующей опухоли и отправить его в центральную лабораторию.

¹⁹ Креатинин подлежит более частой оценке между днями 1 и 28 для мониторинга в отношении острого повреждения почечных канальцев: ежедневно в дни 1-7, через день в дни 8-15 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.

²⁰ Включает HIV, HBV и HCV при скрининге; тем не менее, представленные в анамнезе результаты, полученные в течение 60 дней после включения в исследование, могут использоваться для определения соответствия требованиям.

²¹ Оценка подгруппы лимфоцитов при скрининге, перед началом первого дня LD-химиотерапии, перед инфузией СТХ130, затем все перечисленные моменты времени будут оцениваться в местной лаборатории. Следует включить 6-цветную панель TBNK или ее аналог для T-, B- и NK-клеток.

²² Образцы для определения уровня СТХ130 следует собирать при любой люмбальной пункции или биопсии ткани, выполняемой

Лабораторные процедуры оценки (кровь, локальные)								
СВС с лейкоцитарной формулой	X	X	X	X	X	X	X	X
Химический анализ сыворотки крови	X	X	X	X	X	X	X	X
Подгруппы лимфоцитов ⁷	X	X	X	X	X	X	X	
Биомаркеры (кровь, центральная нервная система)								
Персистенция СТХ130 ⁸	X	X	X	X	X	X	X	X
Антитело к СТХ130		X		X		X	X	
Исследуемые биомаркеры	X	X	X	X	X	X	X	X

АЕ: нежелательное явление; Cas9: CRISPR-ассоциированный белок 9; СВС: общий анализ крови; CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; КТ: компьютерная томография; EORTC: Европейская организация по исследованию и лечению рака; FACT-G: общая функциональная оценка терапии рака; FKSI-19: функциональная оценка терапии рака - почечный симптоматический индекс; М: месяц; MRI: магнитно-резонансная томография; PRO: исход, сообщаемый пациентом; SCT: трансплантация стволовых клеток; TBNK: Т-, В-, естественные киллерные клетки (NK).

¹ Субъекты с прогрессирующим заболеванием или проходящие SCT откажутся от обычного графика процедур оценки и будут осуществлять посещение в рамках ежегодных исследовательских визитов. Субъекты, частично отозвавшие согласие, должны будут пройти как минимум эти процедуры.

² Включает артериальное давление в положении сидя, частоту сердечных сокращений, частоту дыхания, пульсоксиметрию и температуру.

³ Опросники EORTC QLQ-C30, EQ-5D-5L, FKSI-19 и FACT-G.

⁴ Будут собирать информацию только о выбранных сопутствующих лекарственных препаратах.

⁵ Оценка безопасности для сведенных в таблицу требований к отчетности об АЕ в рамках периода исследования. Данные относительно АЕ будут собираться для включенных в исследование субъектов с момента подписания информированного согласия до

окончания исследования в соответствии с требованиями к отчетности об АЕ в каждый период времени в рамках исследования, как описано в данном документе.

⁶ Оценка заболевания будет состоять из обзора исследователем результатов физикального обследования, общего анализа крови и клинической химии. Субъекты с подозрением на наличие злокачественного новообразования будут проходить визуализацию посредством КТ (или возможно MRI) и/или биопсию ткани для подтверждения рецидива. Следует сделать все возможное, чтобы получить биоптат рецидивирующей опухоли от пациентов, у которых наблюдается прогрессирование.

⁷ Оценку проводят в местной лаборатории. Следует включить 6-цветную панель TBNK или ее аналог для Т-, В- и NK-клеток.

⁸ Образцы для определения уровня СТХ130 следует отправлять в центральную лабораторию при любой люмбальной пункции или биопсии ткани, выполняемой после инфузии СТХ130.

6.1 Скрининг субъектов

6.1.1 Оценка общего состояния пациента по шкале Карновского

Общее состояние оценивают в моменты времени, указанные в **таблице 26**, с использованием шкалы Карновского для определения общего самочувствия субъекта и его способности выполнять повседневную деятельность с баллами в диапазоне от 0 до 100. Более высокий балл означает лучшую способность выполнять виды повседневной деятельности.

Оценка общего состояния пациента по шкале Карновского показана в **таблице 28** и используется для определения общего состояния в текущем исследовании (Réus et al., (2013) *BMC Med Inform Decis Mak.*, 13: 72).

Таблица 28. Оценка общего состояния пациента по шкале Карновского

Общее состояние по шкале Карновского	Градация по шкале Карновского
Нормальное, без жалоб	100
Способен осуществлять обычные виды деятельности; незначительные признаки или симптомы заболевания	90
Нормальная деятельность с усилием	80
Осуществляет уход за собой. Неспособен вести обычную деятельность или выполнять активную работу	70
Периодически нуждается в помощи, но способен удовлетворить большинство своих потребностей	60
Требуется значительная помощь и частое медицинское обслуживание	50
Характеризуется ограниченной трудоспособностью. Требуется особый уход и помощи	40
Серьезная потеря трудоспособности. Показана госпитализация, несмотря на то, что смерть в ближайшее время не угрожает	30
Крайне болен. Необходима госпитализация. Необходимо активное поддерживающее лечение	20
Умиравший	10
Умерший	0

6.1.2 MRI головного мозга

Чтобы исключить метастазы в ЦНС, MRI головного мозга будет проводиться при скрининге (т. е. в течение 28 дней до инфузии СТХ130). Требования для получения, обработки и передачи результатов данной MRI будут изложены в Руководстве по

визуализации.

6.1.3 Эхокардиограмма

Трансторакальная эхокардиограмма сердца (для оценки фракции выброса левого желудочка) будет выполняться и анализироваться обученным медицинским персоналом при скрининге для подтверждения соответствия требованиям. В случае появления симптомов со стороны сердца во время CRS необходимо проведение адекватной с медицинской точки зрения оценки в соответствии с установленными руководствами.

6.1.4 Электрокардиограмма

Электрокардиограммы (ECG) по двенадцати отведениям (12) получают во время скрининга, перед каждой процедурой LD-химиотерапии в первый день лечения, перед введением СТХ130 в день 1 и в день 42. Интервалы QTc и QRS определяют по ECG. Могут быть получены дополнительные ECG.

6.1.5 Процедуры оценки заболевания и ответа для ccRCC

Процедуры оценивания заболевания основаны на процедурах оценки в соответствии с критериями RECIST версии 1.1 (Eisenhauer et al., (2009) *European Journal of Cancer* 45, 228-247) и описаны в данном документе, например, в разделе 6.2. Для анализов эффективности исход заболевания оценивается с применением критериев ответа RECIST v1.1. Оценку заболевания и ответа следовало проводить в соответствии с графиком в **таблице 29** и **таблице 30** и она включает оценки, описанные в данном документе. Все категории ответа (в том числе прогрессирование) требуют проведения 2 последовательных оценок, выполненных с интервалом в по меньшей мере в 1 неделю в любое время перед назначением любой новой терапии.

6.1.6 Рентгенологическая оценка заболевания (КТ или MRI)

По возможности следует использовать одно и то же оборудование для КТ и параметры тестов. MRI выполняют в тех случаях, когда КТ противопоказана и после обсуждения с медицинским наблюдателем.

КТ на исходном уровне подлежит выполнению при скрининге (т. е. в течение 28 дней до инфузии СТХ130), через 6 недель после инфузии СТХ130 (в день 42) и месяцы 3 (день 84), 6, 9, 12, 15, 18 и 24 после инфузии СТХ130 согласно графику процедур оценки, представленному в **таблице 26**, согласно RECIST версии 1.1 (например, раздел 6.2) и по клиническим показаниям. Результаты сканирования оценивают локально и централизованно для определения целей.

Результаты КТ-сканирования должны быть получены со срезами толщиной 5 мм без промежутка между ними (непрерывные). Если у субъекта имеются противопоказания к проведению КТ с внутривенным контрастированием, то можно выполнять не предусматривающую контрастирования КТ органов грудной клетки и магнитно-резонансную томографию (MRI) органов брюшной полости и таза с контрастным усилением. Результаты MRI должны быть получены при толщине срезов 5 мм без промежутка (смежные). Следует сделать все возможное, чтобы подвергнуть визуализации каждого субъекта с использованием идентичного протокола сбора данных на одном и том

же сканере в течение всего времени визуализации.

Кроме того, если субъект проходит позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ)/КТ-сканирование с фтордезоксиглюкозой (FDG) по причинам, не связанным с исследованием, то возможно, что КТ-компонент сканирования может использоваться для оценки ответа заболевания.

По возможности, методы визуализации, аппараты и параметры сканирования, используемые для рентгенографической оценки заболевания, должны оставаться неизменными во время исследования.

6.1.7 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 имеет недостаточный объем или качество для удовлетворения требований центральной лаборатории, то во время скрининга необходимым является выполнение биопсии (см. раскрытия в данном примере).

Биопсию опухоли также будут выполнять в день 7 (+ 2 дня или как только это станет клинически возможным) и день 42 (\pm 2 дня). Если рецидив возникает во время участия субъекта в исследовании, то следует сделать все возможное, чтобы получить биоптат рецидивирующей опухоли и отправить его в центральную лабораторию.

Биоптаты должны происходить из поддающихся измерению, но являющихся нецелевыми очагов в соответствии с анализом RECIST 1.1. В случае взятия нескольких биоптатов следует приложить усилия, чтобы получить их из аналогичных тканей. Метастазы в печень, как правило, являются менее желательными. Биоптаты костной ткани и других декальцинированных тканей неприемлемы ввиду создания препятствий для последующих анализов. Этот образец анализируют на присутствие СТХ130, а также биомаркеров, присущих опухоли, и биомаркеров, специфичных для ТМЕ, включая анализ ДНК, РНК, белка и метаболитов.

6.1.8 Исходы, сообщаемые пациентами

Четыре опроса относительно исхода, сообщаемого пациентом (PRO), применяют в соответствии с графиками, приведенными в **таблице 26** и **таблице 27**: QLQ-C30 Европейской организации по исследованию и лечению рака (EORTC), Европейский опросник для оценки качества жизни в 5 категориях по 5 уровням (EQ-5D-5L) и опросники FACT - общая (FACT-G). Опросники должны заполняться (самостоятельно на языке, наиболее знакомом субъекту) до проведения процедур клинической оценки.

EORTC QLQ-C30 является опросником, предназначенным для измерения качества жизни пациентов, у которых имеется рак. 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, у которых имеется рак (Wisloff et al., (1996) *Br J Haematol* 92, 604-613; 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.

Опросник FACT-G предназначен для оценки качества жизни, связанного с состоянием здоровья, у пациентов, подвергаемых лечению рака. Он подразделяется на физический, социальный/семейный, эмоциональный и функциональный домены (Cella et al., (1993) *J Clin Oncol* 11:570-79).

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

Нейрокогнитивная оценка проводится с использованием 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: ориентацию, способность к обозначению, следование команде, письмо и внимание (таблица 29А).

Таблица 29А. 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.

Оценку ICE проводят в ходе скрининга, перед введением СТХ130 в день 1 и в дни 2, 3, 5, 8, 42 и 56. Если симптомы со стороны ЦНС сохраняются после дня 42, оценку ICE следует продолжать выполнять примерно один раз в 2 дня до разрешения симптомов до степени 1 или исходного уровня. 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.

6.1.10. Лабораторные тесты

Лабораторные образцы собирали и анализировали в соответствии с графиком оценки, как раскрыто в данном исследовании. Для анализа в случае всех тестов, перечисленных в нижеследующей **таблице 29В**, использовались местные лаборатории, отвечающие применимым местным требованиям (например, Поправкам к программам усовершенствования клинических лабораторных исследований).

Table 29В Тесты, проводимые в местной лаборатории

СВС лейкоцитарной формулой	с	Гематокрит, гемоглобин, количество эритроцитов, количество лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, базофилов, эозинофилов, количество тромбоцитов, абсолютное количество нейтрофилов
Химический анализ сыворотки крови		ALT (SGPT), AST (SGOT), билирубин (общий и прямой), альбумин, щелочная фосфатаза, бикарбонат, BUN, кальций, хлорид, креатинин, eGFR, глюкоза, лактатдегидрогеназа, магний, фосфор, калий, натрий, общий белок, мочевая кислота
Свертывание крови		PT, aPTT, международное нормализованное соотношение, фибриноген
Серологический анализ вирусов ¹		HIV-1, HIV-2, антитело к вирусу гепатита С и его РНК, поверхностный антиген вируса гепатита В, антитело к поверхностному белку вируса гепатита В, антитело к коровому белку вируса гепатита В
Подгруппы лимфоцитов		6-цветная панель TBNK или ее аналог (Т-клетки, В-клетки и НК-клетки)
Мониторинг отношения CRS/HLH	в	Ферритин, CRP, триглицериды
Сыворотка крови при беременности ²		Хорионический гонадотропин человека (hCG)

ALT: аланинаминотрансфераза; aPTT: активированное частичное тромбопластиновое время; AST: аспартатаминотрансфераза; BUN: азот мочевины крови; СВС: общий анализ

крови; CRP: С-реактивный белок; CRS: синдром высвобождения цитокинов; eGFR: расчетная скорость клубочковой фильтрации; HIV-1/-2: вирус иммунодефицита человека 1 или 2 типа; HLH: гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз; НК: естественная киллерная клетка; PT: протромбиновое время; SGOT: сывороточная глутаминовая щавелевоуксусная трансаминаза; SGPT: сывороточная глутаминовая пировиноградная трансаминаза; TBNK: Т-, В- и NK-клетки

¹ Результаты серологического анализа вирусов в анамнезе, полученные в течение 60 дней после включения в исследование, могут использоваться для определения соответствия требованиям.

² Только для женщин с детородным потенциалом. Тест на беременность необходим при скрининге, в течение 72 часов после начала LD-химиотерапии и в М1/день 28, М2/день 56 и М3/день 84. Все тесты будут представлять собой тесты сыворотки крови на наличие беременности.

6.2 Критерии оценки ответа при солидных опухолях, версия 1.1 (RECIST v1.1)

Следующее адаптировано из E.A. Eisenhauer, et al: New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОЧАГОВ НА ИСХОДНОМ УРОВНЕ

Поддающиеся измерению очаги

Очаги, которые можно точно измерять в по меньшей мере одном измерении.

- Очаги с наибольшим диаметром, вдвое превышающим толщину среза, и размером по меньшей мере 10 мм или больше при оценке с помощью КТ или MRI (толщина среза 5-8 мм).
- Очаги с наибольшим диаметром, составляющим по меньшей мере 20 мм, согласно оценке при рентгенографии грудной клетки.
- Поверхностные очаги с наибольшим диаметром 10 мм или больше при оценке штангенциркулем.
- Злокачественные лимфатические узлы с размером по короткой оси 15 мм или больше при оценке посредством КТ.

ПРИМЕЧАНИЕ: Самая короткая ось используется в качестве диаметра для злокачественных лимфатических узлов, самая длинная ось - для всех других поддающихся измерению очагов.

Не поддающееся измерению заболевание

Не поддающееся измерению заболевание включает очаги, которые характеризуются слишком небольшим размером, чтобы их можно было считать поддающимися измерению (включая узлы с короткой осью от 10 до 14,9 мм), и действительно не поддающееся измерению заболевание, такое как плевральный или перикардиальный выпоты, асцит, воспалительное заболевание молочной железы,

лептоменингеальное заболевание, лимфангиит с поражением кожи или легкого, клинические очаги, которые невозможно точно измерить штангенциркулем, образования в брюшной полости, идентифицированные при физикальном обследовании, которые не поддаются измерению посредством воспроизводимых методик визуализации.

- Заболевание костей: заболевание костей является не поддающимся измерению, за исключением компонентов, представленных мягкими тканями, которые можно оценивать посредством КТ или MRI и которые соответствуют определению измеримости на исходном уровне.

- Предшествующее местное лечение: ранее облученный очаг (или очаг, подвергшийся другому местному лечению) является не поддающимся измерению, если только он не подвергся прогрессированию после завершения лечения.

Нормальные участки

- Кистозные очаги: простые кисты не следует рассматривать как злокачественные образования и не следует регистрировать ни как целевое, ни как нецелевое заболевание. Кистозные очаги, которые, как считается, представляют собой кистозные метастазы, могут являться поддающимися измерению очагами, если они соответствуют конкретному определению, приведенному выше. Если также присутствуют некистозные очаги, то они являются более предпочтительными для рассмотрения в качестве целевых очагов.

- Нормальные узлы: узлы с короткой осью менее 10 мм считаются нормальными и не должны регистрироваться или отслеживаться как поддающееся или не поддающееся измерению заболевание.

РЕГИСТРИРОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОЦЕДУР ОЦЕНКИ ОПУХОЛИ

Все участки, пораженные заболеванием, должны оцениваться на исходном уровне. Процедуры оценки на исходном уровне следует проводить перед исследованием как можно ближе к его началу. Для адекватной оценки на исходном уровне все необходимые процедуры сканирования должны быть выполнены в течение 28 дней до лечения, а все заболевания должны быть надлежащим образом задокументированы. Если оценка на исходном уровне является неадекватной, последующие статусы, как правило, должны быть неопределенными.

Целевые очаги

Все поддающиеся измерению очаги в количестве не более чем максимум 2 очага на орган, в общей сложности насчитывающие 5 очагов, являющихся репрезентативными для всех вовлеченных органов, следует идентифицировать как целевые очаги на исходном уровне. Целевые очаги следует выбирать на основании размера (самые длинные очаги) и пригодности для точных повторных измерений. Регистрируют наибольший диаметр для каждого очага, за исключением случаев патологических лимфатических узлов, для которых следует регистрировать короткую ось. Сумма диаметров (наибольший для неузловых очагов, короткая ось для узловых очагов) для всех целевых поражений на исходном уровне является основой для сравнения с результатами процедур оценки, выполненных в рамках исследования.

- Если два целевых очага подвергаются слиянию, то используют измерение слившейся массы. Если большой целевой очаг разделяется, то используют сумму частей.

- Измерения целевых очагов, которые становятся небольшими, следует продолжать регистрировать. Если целевой очаг становится слишком небольшим для измерения, то следует зарегистрировать 0 мм, если считается, что очаг исчез; в противном случае следует зарегистрировать 5 мм как значение по умолчанию.

ПРИМЕЧАНИЕ: В случае если узловые очаги уменьшаются до менее 10 мм (норма), то все равно следует регистрировать фактическое измерение.

Нецелевое заболевание

Все не поддающиеся измерению заболевания являются нецелевыми. Все поддающиеся измерению очаги, не идентифицированные как целевые очаги, также включают в качестве нецелевого заболевания. Измерения не требуются, а вместо этого результаты процедур оценки выражают как **ОТСУТСТВУЕТ, НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ СТАТУС, ПРИСУТСТВУЕТ/НЕ ПОВЫШЕНО, ПОВЫШЕНО**. Несколько нецелевых очагов в одном органе можно регистрировать как один пункт в индивидуальной регистрационной форме (например, "множественные увеличенные тазовые лимфатические узлы" или "множественные метастазы в печень").

СТАТУС ОБЪЕКТИВНОГО ОТВЕТА ПРИ КАЖДОЙ ПРОЦЕДУРЕ ОЦЕНКИ.

Участки, пораженные заболеванием, должны оцениваться с использованием той же методики, что и на исходном уровне, включая согласующиеся введение контраста и выбор времени сканирования. Если необходимо внести изменения, то необходимо обсудить случай с рентгенологом, чтобы определить, возможна ли замена. В противном случае последующие объективные статусы являются неопределенными.

Целевое заболевание

- **Полный ответ (CR):** полное исчезновение всех целевых очагов, за исключением узловых патологических очагов. Все целевые узлы должны уменьшиться до нормального размера (менее 10 мм по короткой оси). Все целевые очаги должны быть подвергнуты оценке.

- **Частичный ответ (PR):** уменьшение значения суммы диаметров всех целевых поддающихся измерению очагов на величину, большую или равную 30%, по сравнению с исходным уровнем. Короткий диаметр используется при определении суммы для целевых узлов, в то время как самый длинный диаметр используется при определении суммы для всех других целевых очагов. Все целевые очаги должны быть подвергнуты оценке.

- **Стабильное состояние:** не подходит под статусы CR, PR или прогрессирование. Все целевые очаги должны быть подвергнуты оценке. Стабильное состояние может следовать за PR только в том редком случае, когда сумма увеличивается менее чем на 20% от самого низкого уровня, но в достаточной степени, чтобы ранее задокументированное снижение на 30% больше не имело места.

- **Объективное прогрессирование (PD):** увеличение суммы диаметров целевых поддающихся измерению очагов на 20% относительно величины наименьшей

наблюдаемой суммы (относительно величины исходного уровня, если во время терапии не наблюдается уменьшение суммы) с минимальным абсолютным увеличением на 5 мм.

- Неопределенный. Прогрессирование задокументировано не было, а также:
 - о один или несколько целевых поддающихся измерению очагов не были оценены;
 - о или применяемые способы оценки не соответствовали тем, которые применялись на исходном уровне;
 - о или один или несколько целевых очагов не поддаются точному измерению (например, плохо видны, за исключением случаев, когда они слишком малы для измерения);
 - о или один или несколько целевых очагов были иссечены или облучены и больше не появлялись или не увеличивались.

Нецелевое заболевание

- CR: исчезновение всех нецелевых очагов и нормализация уровней опухолевых маркеров. Все лимфатические узлы должны быть "нормального" размера (менее 10 мм по короткой оси).
- Отличный от CR/отличный от PD: персистенция любых нецелевых очагов и/или уровня опухолевого маркера выше пределов нормы.
- PD: однозначное прогрессирование ранее существовавших очагов. Как правило, общая опухолевая нагрузка должна увеличиваться в достаточной степени, чтобы стать причиной для прекращения терапии. При наличии SD или PR при целевом заболевании прогрессирование вследствие однозначного увеличения степени нецелевого заболевания должно иметь место в редких случаях.
- Неопределенный: наличие прогрессирования не было определено и один или несколько нецелевых участков не оценивались, или способы оценки не соответствовали тем, которые применялись на исходном уровне.

Новые очаги

Появление любого нового однозначно злокачественного очага указывает на PD. Если новый очаг является сомнительным, например, ввиду его небольшого размера, то дальнейшая оценка обеспечивает выяснение этиологии. Если повторные процедуры оценки подтверждают статус очага, то прогрессирование должно регистрироваться на дату первоначальной оценки. Очаг, идентифицированный в ранее не подвергавшейся сканированию области, считают новым очагом.

Дополнительные исследования

- Если определение CR зависит от остаточного очага, который уменьшился в размере, но не исчез полностью, то рекомендуется исследование остаточного очага с помощью биопсии или тонкоигольной аспирации. Если наличие патологии не идентифицируют, то объективным статусом являлся CR.
- Если определение прогрессирования зависит от очага, подвергшегося увеличению, возможно ввиду некроза, то очаг можно исследовать с помощью биопсии или тонкоигольной аспирации для уточнения статуса.

Субъективное прогрессирующее

Субъекты, в случае которых требуется прекращение лечения без объективных свидетельств прогрессирующего заболевания, не должны регистрироваться как характеризующиеся статусом PD в CRF при оценке опухоли. Необходимо было приложить все усилия, чтобы задокументировать объективное прогрессирующее даже после прекращения лечения (см. таблицу 30).

Таблица 30. Статус объективного ответа при каждой процедуре оценки

Целевые очаги	Нецелевое заболевание	Новые очаги	Объективный статус
CR	CR	Отсутствуют	CR
CR	Отличный от CR/отличный от PD	Отсутствуют	PR
CR	Неопределенный или отсутствующий	Отсутствуют	PR
PR	Отличный от CR/отличный от PD, неопределенный или отсутствующий	Отсутствуют	PR
SD	Отличный от CR/отличный от PD, неопределенный или отсутствующий	Отсутствуют	Стабильный
Неопределенный или отсутствующий	Отличный от PD	Отсутствуют	Неопределенный
PD	Любой	Присутствуют или отсутствуют	PD
Любой	PD	Присутствуют или отсутствуют	PD
Любой	Любой	Присутствуют	PD

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

Для включения в исследование пациентов только с нецелевым заболеванием использовали таблицу 31.

Таблица 31. Статус объективного ответа при каждой оценке для пациентов только с нецелевым заболеванием

Нецелевое заболевание	Новые очаги	Объективный статус
CR	Отсутствуют	CR
Отличный от CR/отличный от PD	Отсутствуют	Отличный от CR/отличный от PD
Неопределенный	Отсутствуют	Неопределенный
Однозначное прогрессирование	Присутствуют или отсутствуют	PD
Любой	Присутствуют	PD

7. ИССЛЕДУЕМОЕ ЛЕЧЕНИЕ

7.1 Лимфодеплецирующая химиотерапия

Все субъекты получают средство LD-химиотерапии перед инфузией СТХ130.

В состав LD-химиотерапии входят:

- флударабин в количестве 30 мг/м² IV ежедневно в 3 дозах и
- циклофосамид в количестве 500 мг/м² IV ежедневно в 3 дозах.

Взрослые пациенты с умеренным нарушением функции почек (клиренс креатинина 50-70 мл/мин/1,73 м²) должны 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. LD-химиотерапия должна быть завершена за по меньшей мере 48 часов (но не более чем 7 дней) до инфузии СТХ130.

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

- Значительное ухудшение клинического статуса, которое повышает потенциальный риск АЕ, ассоциированных с LD-химиотерапией.
- Потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более 91%.
- Новая неконтролируемая сердечная аритмия.
- Гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами.
- Активная инфекция: положительные результаты посевов крови на бактерии, грибки или вирусы, не отвечающие на лечение, или отрицательные результаты посева, но сильные подозрения в отношении наличия активной инфекции.

Ø Количество тромбоцитов, меньшее или равное 100000/мм³, абсолютное количество нейтрофилов, меньшее или равное 1500/мм³, и уровень гемоглобина (Hgb), меньший или равный 9 г/дл, без предварительной трансфузии клеток крови.

- острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше.

Целью лимфодеплеции является обеспечение значительного увеличения количества Т-клеток с CAR после инфузии. LD-химиотерапию, состоящую из флударабина и циклофосфида в разных дозах, успешно применяли в нескольких испытаниях аутологичных Т-клеток с CAR. Обоснованием применения LD-химиотерапии является устранение регуляторных Т-клеток и других конкурирующих элементов иммунной системы, которые действуют в качестве "приемников цитокинов", повышая доступность цитокинов, таких как интерлейкин 7 (IL-7) и интерлейкин 15 (IL-15) (Dummer et al., (2002) *J Clin Invest* 110, 185-192; Gattinoni et al., (2005) *J Exp Med* 202, 907-912). Кроме того, постулируется, что наивные Т-клетки начинают пролиферировать и дифференцироваться в Т-клетки, подобные клеткам памяти, если общие количества наивных Т-клеток снижаются ниже определенного порога (Dummer et al., (2002) *J Clin Invest*, 110, 185-192). Предлагаемая доза средства LD-химиотерапии, используемая в этом протоколе, соответствует дозам, используемым в регистрационных клинических испытаниях аксикаптагена цилолейсела.

7.2 Введение СТХ130

В состав СТХ130 входят аллогенные Т-клетки, модифицированные с помощью CRISPR-Cas9, ресуспендированные в растворе криоконсерванта (CryoStor CS5) и поставляемые во флаконе для инфузий объемом 6 мл. Фиксированную дозу СТХ130 (на основе % CAR⁺ Т-клеток) вводят в виде однократной IV инфузии. Общая доза может содержаться в нескольких флаконах. Инфузия каждого флакона должна осуществляться в течение 20 минут после размораживания. Инфузию желательно осуществлять через центральный венозный катетер. Использование лейкоцитарного фильтра запрещается.

До начала инфузии СТХ130 в аптечном пункте в исследовательском центре следует обеспечить наличие 2 доз тоцилизумаба и оборудования для неотложной помощи для каждого конкретного субъекта, получающего лечение. Субъекты должны подвергаться премедикации согласно стандартной практике исследовательского центра путем перорального введения ацетаминофена (т. е. парацетамола или его эквивалента согласно формуляру исследовательского центра) и гидрохлорида дифенгидрамина IV или перорально (или другого H1-антигистаминного препарата согласно формуляру исследовательского центра) за примерно 30-60 минут до инфузии СТХ130. Не следует назначать профилактические системные кортикостероиды, поскольку они могли влиять на активность СТХ130.

Инфузию СТХ130 можно отложить, если присутствуют какие-либо из следующих признаков или симптомов:

- Новая активная неконтролируемая инфекция.
- Ухудшение клинического статуса по сравнению со статусом до начала LD-химиотерапии, что подвергает субъекта повышенному риску проявления токсичности.
- острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше.

СТХ130 вводят через по меньшей мере 48 часов (но не более чем 7 дней) после

завершения LD-химиотерапии.

7.3 Мониторинг после инфузии СТХ130

После инфузии СТХ130 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 СТХ130. 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 СТХ130. Контроль видов острой токсичности, связанной с СТХ130, должен происходить ТОЛЬКО в исследовательском центре.

Субъектов подвергали мониторингу в отношении признаков синдрома высвобождения цитокинов (CRS), синдрома лизиса опухоли (TLS), реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD) и других нежелательных явлений (АЕ) в соответствии с графиком процедур оценки (**таблица 26** и **таблица 27**). 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 СТХ130 (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 и процедуры (виды сопутствующего лечения)

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

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 СТХ130. По прошествии 3 месяцев после инфузии СТХ130 начинают сбор данных в отношении только следующих выбранных сопутствующих лекарственных препаратов: прививки, виды противоракового лечения (например, химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия), иммунодепрессанты (включая стероиды) и любые исследуемые средства.

7.4.2 Запрещенные/ограниченные лекарственные препараты и процедуры

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

- В течение 28 дней до включения в исследование и в течение 3 месяцев после

инфузии СТХ130:

- живые вакцины;
- лекарственные препараты из растительного сырья в рамках традиционной китайской медицины или растительные лекарственные средства, не принадлежащие к отпускаемым без рецепта.

- На протяжении всего исследования до начала новой противоопухолевой терапии:

- Любая иммуносупрессивная терапия, если только она не рекомендована, как описано в данном документе, для лечения CRS или синдрома нейротоксичности, связанного с иммунными эффекторными клетками (ICANS), или если она ранее обсуждалась и была одобрена медицинским наблюдателем.

- После введения СТХ130 следует 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 имелись медицинские показания для лечения новой токсичности или в виде части устранения CRS или нейротоксичности, ассоциированной с СТХ130, как описано в данном документе.

- Любая противораковая терапия (например, химиотерапия, иммунотерапия, таргетная терапия, облучение или другие исследуемые средства), кроме LD-химиотерапии до прогрессирования заболевания. Паллиативная лучевая терапия для устранения симптомов разрешается в зависимости от степени, дозы и исследовательского центра(центров), которые должны быть определены и переданы медицинскому наблюдателю для определения.

- Запрещены в течение первого месяца после инфузии СТХ130:

- Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) ввиду потенциального ухудшения симптомов CRS. Следует соблюдать осторожность при введении гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) после инфузии СТХ130, и перед введением необходимо проконсультироваться с медицинским наблюдателем.

- Запрещены в течение первых 28 дней после инфузии СТХ130 (период оценки DLT):

- Самолечение, осуществляемое субъектом с использованием жаропонижающих средств (например, ацетаминофена, аспирина).

8. КОНТРОЛЬ ТОКСИЧНОСТИ

8.1 Общее руководство

Перед LD химиотерапией следовало начать профилактику инфекции (например, противовирусными, противобактериальными, противогрибковыми средствами) в соответствии с установленным стандартом лечения пациентов с ссRCC в условиях ослабленного иммунитета.

Субъектов следует подвергать тщательному мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней после инфузии СТХ130. Сообщалось о значительной токсичности при

процедурах терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR.

Следующие общие рекомендации предусмотрены на основании предшествующего опыта применения средств терапии на основе Т-клеток с CAR к CD70.

- 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.

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

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

В дополнение к проявлениям токсичности, наблюдаемым с применением аутологичных Т-клеток с CAR, признаки GvHD тщательно подвергали мониторингу из-за аллогенной природы CTX130.

Профиль безопасности CTX130 постоянно оценивался на протяжении всего исследования.

8.2 Специфические рекомендации в отношении токсичности

8.2.1 Реакции, связанные с инфузией CTX130

В испытаниях с аутологичными Т-клетками с CAR сообщалось о реакциях, связанных с инфузией, в том числе транзиторной лихорадке, ознобе и/или тошноте, чаще всего возникающих в течение 12 часов после введения. CTX130 составлены с CryoStor CS5, общепризнанной криоконсервирующей средой, которая содержит 5% диметилсульфоксида (DMSO). Высвобождение гистамина, ассоциированное с DMSO, может приводить к побочным эффектам, таким как тошнота, рвота, диарея, приливы, приступы лихорадки, приступы озноба, головная боль, одышка или эпизоды сыпи. В наиболее тяжелых случаях он также может вызывать бронхоспазм, анафилактическую реакцию, вазодилатацию и гипотензию, а также изменения психического статуса.

Если возникала реакция в результате инфузии, то можно повторять введение ацетаминофена (парацетамола) и гидрохлорида дифенгидрамина (или другого антигистаминного средства H1) каждые 6 часов после инфузии CTX130, если это было необходимо.

При необходимости можно назначить нестероидные противовоспалительные

лекарственные средства (NSAID), если у субъекта продолжается лихорадка, которая не облегчается 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

Профилактику инфекций следует контролировать в соответствии с установленным стандартом лечения пациентов с ссRCC в условиях ослабленного иммунитета.

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 CTX130, то следует начать выполнение соответствующих посевов и медикаментозный контроль. Кроме того, следует учитывать CRS в любых случаях лихорадки после инфузии CTX130 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 CTX130. Люмбальная пункция (LP) требуется при любой нейрокогнитивной токсичности степени 3 или более высокой и настоятельно рекомендуется при явлениях степени 1 или степени 2. 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, получающие терапию с применением Т-клеток с CAR, могут подвергаться повышенному риску развития TLS, который возникал, когда опухолевые клетки выделяют свое содержимое в кровотоки либо спонтанно, либо в ответ на терапию, что приводит к характерным проявлениям гиперурикемии, гиперкалиемии, гиперфосфатемии, гипокальциемии и повышенному азоту мочевины крови. Эти электролитные и метаболические нарушения могут прогрессировать до клинических токсических эффектов, в том числе почечной недостаточности, сердечной аритмии, судорог и летального исхода вследствие полиорганной недостаточности (Howard et al., 2011). Сообщалось о TLS при злокачественных новообразованиях крови, а также при солидных опухолях. Большинство солидных опухолей представляли низкий риск в отношении TLS. Чаще всего это наблюдали у пациентов с злокачественными образованиями крови, в частности лейкозными формами, такими как ALL, острый

миелоидный лейкоз и CLL, которые имеют высокий (> 5%) риск в отношении TLS, и некожными Т-клеточными лимфомами, в частности Т-клеточными лейкозом/лимфомой у взрослых и DLBCL (Coiffier et al., 2008). Дополнительные факторы риска включают уровень лактатдегидрогеназы выше чем ULN, высокую опухолевую нагрузку и опухоли с высоким индексом репликации. Пациенты с нарушением функции почек также подвержены 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 токсическое явление, связанное с видами иммунотерапии, в том числе Т-клетками с CAR, в результате высвобождения цитокинов, в частности IL-6 и IL-1 (Norelli et al., (2018) *Nat Med* 24(6):739-748). 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) *Blood*, 124, 2296; Maude et al., (2014) *Cancer J*, 20, 119-122). CRS наблюдают в клинических испытаниях независимо от антиген-нацеленных средств, включающих CD19-, BCMA-, CD123- и мезотелин-направленные Т-клетки с CAR, а также TCR-модифицированные Т-клетки, связывающие NY-ESO 1 и нацеленные на MART 1. (Frey et al., 2014; Hattori et al., 2019; Maude et al., 2018; Neelapu et al., 2017; Raje et al., 2019; Tanyi et al., 2017). CRS является серьезным токсическим явлением, о котором сообщали при терапии с применением аутологичных Т-клеток с CAR, которое также наблюдали в исследованиях ранней фазы аллогенной терапии с применением Т-клеток с CAR (Benjamin et al., 2018).

Клиническая картина CRS может быть легкой и ограничиваться повышенными значениями температуры или может включать одну или несколько систем органов (например, сердечную, желудочно-кишечную, респираторную, кожную, центральную нервную) и множественные симптомы (например, высокие значения температуры, утомляемость, анорексию, 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 следует применять оценивание в соответствии с согласованными рекомендациями Американского общества трансплантологии и клеточной терапии (ASTCT; ранее известного как Американское общество трансплантации крови и костного мозга, ASBMT) (таблица 32А; Lee et al., 2019), и его контроль следует осуществлять в соответствии с рекомендациями в таблице 32В, которые адаптированы из опубликованных руководств (Lee et al., 2014; Lee et al., 2019). Соответственно, оценивание нейротоксичности приводили в соответствие с критериями ASTCT для ICANS.

Таблица 32А. Оценивание CRS в соответствии с едиными критериями ASTCT (Lee et al., 2019)

Параметр CRS	Степень 1	Степень 2	Степень 3	Степень 4
Лихорадка ¹ С гипотензией И/или ³ Гипоксия	Температура, равная или превышающая 38°C	Температура, равная или превышающая 38°C	Температура, равная или превышающая 38°C	Температура, равная или превышающая 38°C
	Отсутствует	Не требуется	Требуется	Требуется
	Отсутствует	сосудосуживающих средств Требуется назальная канюля с низким потоком ⁴ или продувка	сосудосуживающее средство с вазопрессином или без него ² Требуется назальная канюля с высоким потоком ⁴ , лицевая маска, маска без дыхательной	несколько сосудосуживающих средств (за исключением вазопрессина) ² Требуется положительное давление (например, CPAP, BiPAP, интубация и

			системы или маска Вентури	искусственная вентиляция легких)
--	--	--	---------------------------	----------------------------------

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

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

¹ Лихорадку определяли как температуру, равную или превышающую 38°C, не связанную с какой-либо другой причиной. У пациентов с CRS, которые затем получали жаропонижающие или антицитокиновые терапевтические средства, такие как астоцилизумаб или стероиды, лихорадка больше не учитывалась для степени тяжести последующего CRS. В данном случае оценивание CRS основано на гипотензии и/или гипоксии.

² См. **таблицу 28** в отношении информации о высоких дозах сосудосуживающих средств.

³ Степень CRS определяли по более серьезному явлению: гипотензия или гипоксия, не связанные 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.

⁴ Назальную канюлю с низким потоком определяли как доставку кислорода со скоростью ≤ 6 л/мин. Низкий поток также включает подачу кислорода посредством продувки, иногда используемую в педиатрии. Назальную канюлю с высоким потоком определяли как доставку кислорода со скоростью > 6 л/мин.

Таблица 32В. Руководство по оцениванию и контролю синдрома высвобождения цитокинов.

Тяжесть CRS ¹	Тоцилизумаб	Кортикостероиды	Контроль гипотензии
Степень 1	Тоцилизумаб ² может рассматриваться по усмотрению исследователя после консультации с медицинским наблюдателем.	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, составляющей 1 или больше, затем снижать дозу соответствующим образом.	Контроль в соответствии с установленными руководствами.
Степень 3	Как при степени 2.	Как при степени 2.	Контроль в соответствии с установленными руководствами.
Степень 4	Как при степени 2. Если отсутствовал ответ на несколько доз тоцилизумаба и стероидов, то рассматривали применение других видов антицитокиновой терапии (например,	Как при степени 2.	Контроль в соответствии с установленными руководствами.

	анакинры).		
--	------------	--	--

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

¹ См. Lee et. al., 2019.

² См. инструкцию по применению тоцилизумаба.

Таблица 33. Высокие дозы сосудосуживающих средств при контроле CRS.

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

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

** Уравнение испытания эквивалента сосудосуживающего 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, характеризующийся степенью, составляющей 2 или больше, должны подвергаться мониторингу с помощью кардиотелеметрии и пульсоксиметрии. Для субъектов, испытывающих CRS степени 3, рассматривали возможность проведения эхокардиограммы для оценки сердечной функции. При CRS степени 3 или 4 рассматривали возможность поддерживающей терапии посредством интенсивной терапии. Можно учитывать возможность наличия основной инфекции в случаях тяжелого CRS, поскольку проявление (например, лихорадка, гипотензия, гипоксия) является сходным. Разрешение CRS определяли по разрешению лихорадки (температура, равная или превышающая 38°C), гипоксии и гипотензии (Lee et al., (2018) *Biol Blood Marrow Transplant* 25(4):625-638).

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. Таким образом, субъектов подвергали мониторингу в отношении наличия признаков и симптомов нейротоксичности, ассоциированной с процедурами терапии с применением Т-клеток с CAR в текущем испытании. Нейротоксичность может возникать во время CRS, в ходе разрешения CRS или после разрешения CRS, и ее патофизиология остается неясной. На недавнем консилиуме ASTCT (ранее известном как ASBMT) дополнительно определяли ICANS как расстройство, 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). Патофизиология нейротоксичности остается неясной; однако постулируется, что она может быть связана с комбинацией высвобождения цитокинов, доставки Т-клеток с CAR в CSF и повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера (June et al., 2018).

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. Оценивание ICANS (**таблица 34**) разрабатывали на основе критериев рабочей группы по токсичности, ассоциированной с терапией с использованием Т-клеток с CAR (CARTOX), которые ранее использовали в испытаниях с применением 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 ICE (энцефалопатия, ассоциированная с иммунными эффекторными клетками) (**таблица 29**).

Оценка любого нового проявления нейротоксичности должна включать неврологическое обследование (включая инструмент для оценивания ICE, **таблица 29**), магнитно-резонансную томографию головного мозга (MRI) и исследование CSF по клиническим показаниям. Для люмбальных пункций, выполненных в период нейротоксичности, образцы CSF следует отправить в центральную лабораторию для анализа цитокинов и в отношении наличия STX130. Избыточный образец (при наличии) хранили для зондирующего исследования. Инфекционную этиологию следует исключить путем выполнения, по возможности, люмбальной пункции (особенно у субъектов с ICANS степени 3 или 4). Если MRI головного мозга невозможно провести, то все

субъекты должны 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.

Неседативную противосудорожную профилактику (например, леветирацетам) можно рассматривать, 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 уровней тромбоцитов и признаков коагулопатии и соответствующим образом осуществлять трансфузию препаратов крови для снижения риска внутримозгового кровоизлияния. В **таблице 34** представлены критерии оценивания нейротоксичности и в **таблице 35** представлено руководство по контролю.

Таблица 34. Оценивание ICANS.

Домен нейротоксичности	Степень 1	Степень 2	Степень 3	Степень 4
Балльная оценка ICE ¹	7-9	3-6	0-2	0 (субъект невосприимчив и не может пройти оценку ICE)
Подавленный уровень сознания ²	Пробуждается спонтанно	Пробуждается в ответ на голос	Пробуждается только при воздействии тактильного раздражителя	Субъект невосприимчив или требует сильных или повторяющихся тактильных раздражителей для пробуждения; ступор или кома
Судорожный припадок	N/A	N/A	Любой клинический	Опасный для жизни

			судорожный припадок, очаговый или генерализованный, который быстро разрешается, или неконвульсивные судорожные припадки на EEG, которые разрешаются посредством вмешательства	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 парепарез
Повышенное ICP/отек головного мозга	N/A	N/A	Очаговый/локальный отек при нейровизуализации ⁴	Диффузный отек головного мозга при нейровизуализации, децеребрационная или декортикационная поза, паралич VI черепного нерва, папилледема 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.

Примечание: 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 степени 3 в случае нахождения в сознании с глобальной афазией, однако субъект с балльной оценкой ICE, составляющей 0, может быть классифицирован как страдающий ICANS степени 4, если он был невосприимчив (таблица 24А для инструмента оценки ICE).

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 35. Руководство по контролю ICANS.

Тяжесть	Контроль
Степень 1	Предусмотреть поддерживающую помощь в соответствии с установленной практикой.
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, характеризующегося степенью, составляющей 1 или меньше, 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, характеризующегося степенью, составляющей 1 или меньше, затем постепенно снижать дозу в течение 3 дней.
Степень 4	Вводить 1000 мг метилпреднизолона IV в день в течение 3 дней; в случае улучшения применять 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, внутрочерепное 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 STCAE v5.0.

8.2.6 Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH)

Сообщалось о HLH после лечения с применением аутологичных Т-клеток с CAR (Barrett et al., (2014) *Curr Opin Pediatr*, 26, 43-49; 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. Там, где это возможно, избыточные образцы костного мозга должны быть отправлены в центральную лабораторию в соответствии с обычной практикой.

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 совпадение с CRS, контролировать в соответствии с CRS степени 3 с соответствующей интенсивностью осуществления мониторинга согласно руководству по лечению CRS в **таблице 32В**. Следовать установленным руководствам в отношении дополнительного лечения HLH.

8.2.7 Случаи цитопении

Сообщалось о нейтропении степени 3 и тромбоцитопении, которые иногда

продолжались более 28 дней после инфузии Т-клеток с CAR у субъектов, которых лечили с применением аутологичных продуктов на основе Т-клеток с CAR (Kymriah, указание по применению препарата в США [USPI], 2017; Raje et al., (2019) *N Engl J Med* 380, 1726-37; Yescarta USPI, 2017). 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 может возникнуть оппортунистическая инфекция, такая как реактивация вирусной инфекции, которую следует учитывать при появлении клинических симптомов.

Во время повышения дозы уровень G-CSF можно рассматривать в случаях нейтропении степени 4 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 надлежащей лабораторной практикой (GLP) на мышях 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 1×10^5 TCR+ клеток/кг, применяли для всех уровней доз. Этот предел основан на опубликованных отчетах 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 управляется антигенами, и вероятно происходила только в случае TCR- клеток, маловероятно, что количество TCR+ клеток значительно превышало количество инфузированных 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 36**.

Таблица 36. 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 кровавистый 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 контролю острой GvHD указаны в **таблице 37**. Для обеспечения сопоставимости между субъектами в конце испытания, эти рекомендации можно выполнять, за исключением конкретных клинических сценариев, в которых их соблюдение может подвергнуть субъекта риску.

Таблица 37. 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.

	<p>Постепенное снижение дозы стероида можно начинать после того, как наблюдается улучшение после ≥ 3 дней применения стероидов.</p> <p>Постепенное снижение дозы должно составлять 50% от общей суточной дозы стероида один раз в 5 дней.</p> <p>GI: в дополнение к стероидам начать введение средств против диареи согласно стандартной практике.</p>
--	--

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 степени 3 или через 2 недели при устойчивой GvHD степени 2. 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 могут 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. Виды целевой внеопухолевого токсичности

Активность CTX130 против активированных T- и B-лимфоцитов, дендритных клеток

Активированные T- и B-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. В данном документе раскрыт контроль инфекций и случаев цитопении.

Активность CTX130 в отношении остеобластов

Активность CTX130 выявляли в доклинических исследованиях в культуре клеток первичных остеобластов человека. Таким образом, костный обмен подвергали мониторингу 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). 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, 15, 22 и 28, а также в месяцы 3, 6 и 12 исследования, как раскрыто в данном документе. 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.

Активность СТХ130 в отношении эпителия, подобного эпителию почечных канальцев

Активность СТХ130 в отношении эпителиальных клеток, подобных клеткам почечных канальцев, выявляли в неклинических исследованиях СТХ130 в первичном эпителии человеческой почки. Следовательно, субъекты должны подвергаться мониторингу в отношении острого повреждения канальцев посредством осуществления мониторинга 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 $\geq 1,5$ раза выше исходного значения в течение предыдущих 7 дней. Креатинин сыворотки крови оценивали ежедневно в течение первых 7 дней после инфузии СТХ130, через день между днем 8 и днем 15 лечения, а затем два раза в неделю до дня 28, как раскрыто в данном документе. 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.

8.2.10. Неконтролируемая пролиферация Т-клеток

После распознавания целевого опухолевого антигена *in vivo* наблюдали активацию и размножение Т-клеток с CAR (Grupp et al NEJM 2013). Аутологичные Т-клетки с CAR выявляли в периферической крови, костном мозге, спинномозговой жидкости, асците и других компартментах (Badbaran et al Cancer 2020). Если у субъекта появлялись признаки неконтролируемой пролиферации Т-клеток, то образец клинического исследования следовало отправить в центральную лабораторию для гаплотипирования с определением происхождения Т-клеток.

9. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ

9.1 Определение параметров нежелательных явлений

9.1.1 Нежелательные явления

Руководство Международной конференции по гармонизации (ICH) по надлежащей клинической практике (GCP) E6(R2) определяет АЕ как:

"любое неблагоприятное медицинское явление у пациента или субъекта клинического исследования, которому вводили фармацевтический продукт и которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с этим лечением. Таким образом, АЕ могло являться любым неблагоприятным и непреднамеренным признаком (в том числе, например, аномальными лабораторными данными), симптомом или заболеванием, временно ассоциированным с использованием лекарственного (исследуемого) продукта, независимо от того, считается ли он связанным с лекарственным (исследуемым) продуктом".

Дополнительные критерии, определяющие АЕ, также включали любое клинически значимое ухудшение характера, тяжести, частоты или продолжительности ранее существовавшего состояния у субъекта. Нежелательные явления могут возникать до, на

протяжении или после лечения и могут возникать либо в связи с лечением (т. е. возникающие после инфузии СТХ130), либо в отсутствие лечения. АЕ, не связанное с лечением, представляло собой любой новый признак или симптом, заболевание или другое неблагоприятное медицинское событие, которое возникало после получения письменного информированного согласия, но до того, как субъект получал СТХ130.

Избирательное или заранее запланированное лечение или медицинские/хирургические процедуры (которые были запланированы до включения субъекта в исследование) по поводу задокументированного ранее существовавшего состояния, которое не ухудшилось по сравнению с исходным уровнем, не считалось АЕ (серьезным или несерьезным). Однако неблагоприятное медицинское явление, происходящее во время заранее запланированной процедуры или планового лечения, должно было регистрироваться как АЕ или SAE. Госпитализация для инфузий в связи с исследуемым лечением, или мер предосторожности в соответствии с установленной политикой, или как определено в этом протоколе исследования не считались АЕ. Кроме того, если субъекту была запланирована госпитализация после инфузии СТХ130, то продление этой госпитализации только для наблюдения не следовало регистрировать как SAE, если только оно не было ассоциировано со значимым с медицинской точки зрения явлением, которое соответствовало другим критериям SAE.

9.1.1.1 Аномальные результаты лабораторных исследований

Аномальные результаты лабораторных исследований считались клинически значимыми и о них следовало сообщать как о нежелательном явлении. Когда это было возможно, о них следовало сообщать как о клиническом диагнозе, а не как о самом аномальном значении. Аномальные результаты лабораторных исследований, не имеющие клинического значения, не требовали регистрации как АЕ.

9.1.1.2 Прогрессирование заболевания

Прогрессирование заболевания являлось результатом и не должно было регистрироваться как АЕ. Если субъекту требовались госпитализация или вмешательство, квалифицирующее АЕ как серьезное, то о симптоме следовало сообщать как о SAE (например, разрыв селезенки из-за местного прогрессирования).

9.1.2 Серьезные нежелательные явления

Серьезным нежелательным явлением (SAE) являлось любое неблагоприятное медицинское событие, которое при любой дозе:

- приводило в результате к летальному исходу;
- являлось опасным для жизни.

Это определение подразумевало, что субъект подвергается непосредственной опасности летального исхода в результате явления, которое произошло. Оно не включало явление, которое, если бы оно произошло в более тяжелой форме, могло бы привести к летальному исходу.

• Требовались стационарная госпитализация или продление имеющейся госпитализации.

Как правило, госпитализация означала, что субъект находился в больнице или отделении интенсивной терапии (обычно с пребыванием в течение по меньшей мере ночи) для наблюдения и/или лечения, которые не были бы уместны в амбулаторных условиях.

- Приводило в результате к стойкой или значительной инвалидности/нетрудоспособности.

- Приводило в результате к врожденной аномалии/врожденному дефекту.

- Другие важные/значимые медицинские явления.

Медицинские и научные суждения должны были использоваться при принятии решения о том, уместно ли экстренное уведомление в других ситуациях, таких как важные медицинские явления, которые могли не представлять непосредственной опасности для жизни или приводить в результате к летальному исходу или госпитализации, но могли поставить субъекта под угрозу или могли потребовать вмешательства для предупреждения одного из других результатов, перечисленных в определении выше.

9.1.3 Нежелательные явления, представляющие особый интерес

AESI (серьезное или несерьезное) представляет собой научную и медицинскую проблему, связанную с продуктом или программой, для которых может быть уместным постоянный мониторинг и быстрое информирование.

Основываясь на опубликованном клиническом опыте использования аутологичных Т-клеток с CAR, относящихся к тому же фармакологическому классу, нижеследующие явления идентифицированы как нежелательные явления, представляющие особый интерес (AESI).

1. Реакции, связанные с инфузией CTX130.
2. Инфекции и инвазии, характеризующиеся степенью, составляющей 3 или больше.
3. Синдром лизиса опухоли (TLS).
4. Синдром высвобождения цитокинов (CRS).
5. Синдром нейротоксичности, ассоциированный с иммунными эффекторными клетками (ICANS)
6. Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH).
7. Реакция "трансплантат против хозяина" (GvHD).
8. Неконтролируемая пролиферация Т-клеток

В дополнение к AESI, перечисленным выше, о любом новом аутоиммунном заболевании, которое по мнению исследователя возможно связано или связано с CTX130, следовало сообщать в любое время после инфузии CTX130.

9.2 Оценка нежелательных явлений

9.2.1 Оценка причинно-следственной связи

Следовало оценить взаимосвязь между каждым АЕ и CTX130, LD химиотерапией и любой процедурой исследования, предусмотренной протоколом (все оценивали индивидуально). Следовало учитывать следующее: (1) временная связь между временем явления и применением лечения или процедуры, (2) вероятный биологический механизм и

(3) другие потенциальные причины явления (например, сопутствующая терапия, основное заболевание) при оценке причинно-следственной связи.

Оценку родства производили на основе следующих определений.

- **Связанные:** существующая четкая причинно-следственная связь между исследуемым лечением или процедурой и АЕ.

- **Возможно, связанные:** имеющиеся некоторые данные, свидетельствующие о наличии причинно-следственной связи между исследуемым лечением или процедурой и АЕ, но также существующие альтернативные потенциальные причины.

- **Не связанные:** отсутствие каких-либо доказательств причинно-следственной связи между исследуемым лечением или процедурой и АЕ.

Если связь между АЕ/SAE и СТХ130 определяли как "возможную", то явление считалось связанным с СТХ130 для целей регуляторной отчетности.

Явление считалось "не связанным" с использованием СТХ130, если удовлетворялся любой из следующих тестов.

- Необоснованная временная связь между введением СТХ130 и началом явления (например, явление произошло либо до, либо слишком длительное время после введения СТХ130, чтобы АЕ можно было считать связанным с продуктом).

- Причинно-следственная связь между IP и явлением была биологически неправдоподобна.

- Присутствовало явно более вероятное альтернативное объяснение явления (например, типичная неблагоприятная реакция на сопутствующее лекарственное средство и/или типичное явление, связанное с заболеванием).

Отдельные отчеты о АЕ/SAE считались "связанными" с использованием IP, если критерии "не связанных" не выполнялись. Если оценивали, что SAE не было связано с каким-либо исследовательским вмешательством, то в индивидуальной регистрационной форме (CRF) должна была указываться альтернативная этиология.

9.2.1.1 Связь с протокольными процедурами и/или другими причинами

Могла предоставляться оценка связи SAE с протокольными процедурами, если было установлено, что SAE не связано с лечением с помощью СТХ130 или LD химиотерапии. Альтернативная этиология в форме отчета о SAE должна была предоставляться на основе критериев, определенных ниже.

- Процедура/вмешательство, связанные с протоколом: событие произошло в результате процедуры или вмешательства, необходимых во время исследования (например, забор крови, вымывание существующего лекарственного препарата), альтернативная этиология которого отсутствует в медицинской карте субъекта. Это применимо к SAE, возникающим не в связи с лечением (т. е. SAE, возникающие до введения СТХ130), а также к SAE, возникающим в результате лечения.

9.2.2 Оценка серьезности

Серьезность оценивали в соответствии с NCI CTCAE 5.0, за исключением CRS, ICANS и GvHD, которые классифицировались в соответствии с критериями из **таблицы**

32, таблицы 34 и таблицы 36, соответственно. Определение тяжести явлений, для которых степень тяжести СТСАЕ или критерии, указанные в протоколе, недоступны, должно было осуществляться на основе медицинского заключения (и задокументировано в CRF) с использованием категорий тяжести от 1 до 5, описанных в **таблице 38**.

9.2.3 Результат нежелательного явления

Результат АЕ или SAE классифицировали и сообщали о нем следующим образом.

- Фатальное.
- Отсутствие восстановления/отсутствие разрешения.
- Восстановленное/разрешенное.
- Восстановленное/разрешенное с последствиями.
- Восстановление/разрешение.
- Неизвестно.

При регистрации и сообщении о летальном исходе и фатальных явлениях/явлениях степени 5 следовало учитывать, что летальный исход являлся субъективным результатом, а фатальный результат являлся результатом явления, и следовало описывать SAE, которое было причиной летального исхода. Субъекты, исключенные из исследования из-за АЕ, находились под наблюдением до тех пор, пока не был определен результат.

Таблица 38. Серьезность нежелательного явления

Степень 1	Легкие; бессимптомные или легкие симптомы; только клинические или диагностические наблюдения; вмешательство не показано
Степень 2	Умеренное; показаны минимальное, местное или неинвазивное вмешательство; ограничение соответствующего возрасту инструментального ADL ¹
Степень 3	Тяжелое или значимое с медицинской точки зрения, но не представляющее непосредственной опасности для жизни; показаны госпитализация или продление госпитализации; инвалидизирующее; ограничение самообслуживания ADL ²
Степень 4	Опасные для жизни последствия; показано срочное вмешательство
Степень 5	Летальный исход, связанный с АЕ

ADL: ежедневные действия; АЕ: нежелательное явление.

¹ Инструментальные ADL относились к приготовлению пищи, покупке продуктов или одежды, пользование телефоном, управление деньгами и т. д.

² ADL, представляющие собой уход за собой, относятся к купанию, одеванию и раздеванию, самостоятельному кормлению, пользованию туалетом, приему лекарственных препаратов и отсутствию прикованности к постели.

См. также **таблицы 32А, 32В, 34 и 36** и критерии выявления нежелательных

явлений для, например, CRS, ICANS и GvHD, раскрытых в данном документе.

10. ПРАВИЛА ОСТАНОВКИ И ПРЕКРАЩЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1 Правила прекращения для испытания

Исследование могло быть приостановлено, если происходило 1 или несколько из следующих событий.

- Опасная для жизни (степень 4) токсичность, связанная с СТХ130, которая являлась неконтролируемой, неожиданной и не была связана с LD химиотерапией.
- Летальный исход, связанный с СТХ130, в течение 30 дней после инфузии.
- После того, как по меньшей мере 15 субъектов получали СТХ130, возникновение GvHD, характеризующееся степенью, большей 2, которое являлось устойчивым к стероидам, у > 20% субъектов.
- После того, как в исследование было включено не менее 15 субъектов, определение неожиданного, клинически значимого или неприемлемого риска для субъектов, который имел место у > 35% субъектов (например, нейротоксичность степени 3, не разрешающаяся в течение 7 дней до степени, составляющей 2 или меньше).
- Новое злокачественное новообразование (в отличие от рецидива/прогрессирования ранее подвергаемого лечению злокачественного новообразования).

Часть В (расширение когорты) представляло собой несравнительное исследование с одной группой, проведенное с использованием оптимальной схемы стадии Simon 2. На первой стадии 22 субъекта должны были получать лечение с применением СТХ130. Если ≥ 7 субъектов достигали объективного ответа (CR или PR) после инфузии СТХ130, то могло быть принято решение о расширении набора для включения в исследование дополнительных 48 получавших лечение субъектов (всего 70) на второй стадии. Если принималось решение о прекращении испытания после первой стадии, то включение в исследование могло быть приостановлено, все имеющиеся данные анализировали, а органы здравоохранения уведомляли по мере необходимости.

Если включение в исследование окончательно приостанавливали, то субъекты, которые уже были включены в исследование, не могли продолжать LD химиотерапию и инфузию СТХ130. Субъекты, которые уже получали лечение с помощью СТХ130, оставались в исследовании и продолжали наблюдаться в соответствии с протоколом исследования или должны были перейти в долгосрочное исследование безопасности.

10.2 Правила остановки для отдельных субъектов

Правила остановки для отдельных субъектов были следующими.

- Любое медицинское состояние, которое могло подвергнуть субъекта риску во время продолжения лечения, связанного с исследованием, или последующего наблюдения.
- Если обнаруживали, что субъект не соответствовал критериям соответствия требованиям или имел серьезное отклонение от протокола до начала LD химиотерапии.

10.3 Определение окончания исследования

Окончание исследования определяли как время, когда последний субъект завершал визит в месяц 60 (последняя оценка, определяемая протоколом) или считался утраченным для последующего наблюдения, отзывал согласие или умирал.

10.4 Прекращение исследования

Это исследование могло быть прекращено в любое время из соображений безопасности, несоответствия ожидаемым целям включения в исследование и/или по административным причинам. В случае досрочного прекращения этого исследования субъекты, получавшие СТХ130, должны были участвовать в отдельном долгосрочном последующем наблюдении в течение не более 15 лет после инфузии СТХ130.

11. СТАТИСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

11.1 Общие способы

Данные исследования обобщали по расположению, демографическим и исходным характеристикам, безопасности и клинической противоопухолевой активности.

Категориальные данные обобщали посредством частотного распределения (количество и процент субъектов), а непрерывные данные обобщали посредством описательной статистики (среднее значение, стандартное отклонение [SD], медиана, минимум и максимум).

Субъектов, получавших лечение во время фазы повышения дозы, объединяли с теми, кто получил ту же дозу СТХ130 во время фазы расширения, если не указывалось иное. Все сводки, списки, фигуры и анализы выполняли по уровню дозы.

Время первичного анализа определяли как время, когда 71 субъект в части В завершал 3-месячную оценку ответа заболевания или выбывал из наблюдения, выбывал из исследования или умирал, в зависимости от того, что происходило раньше (определено в полном наборе для анализа [FAS]). Данные исследования анализировали и представляли в отчете о первичном клиническом исследовании (CSR) на основе времени первичного анализа. Предоставляли дополнительные данные, собранные со времени первичного анализа до окончания исследования. Полная информация о статистическом анализе указана в плане статистического анализа (SAP).

11.2 Цели исследования и гипотезы

Основной целью части А являлась оценка безопасности повышения дозы СТХ130 у субъектов с неоперабельной или метастатической ссRCC.

Основной целью части В являлась оценка эффективности СТХ130 у субъектов с неоперабельной или метастатической ссRCC, измеренная с помощью ORR в соответствии с RECIST версии 1.1.

11.3 Конечные точки исследования

11.3.1 Первичные конечные точки

Часть А (повышение дозы): Частота возникновения случаев дозолимитирующей токсичности (DLT) и определение RPBD.

Часть В (расширение когорты): Частота объективного ответа (ORR) определяли как полный ответ (CR) + частичный ответ (PR) в соответствии с Критериями оценки

ответа при солидных опухолях (RECIST 1.1).

11.2.2 Части А и В, вторичные конечные точки

11.2.2.1 *Эффективность согласно Критериям ответа RECIST 1.1*

- ORR: доля субъектов, достигших наилучшего общего ответа CR или PR в соответствии с RECIST версии 1.1, по оценке исследователя.
- Наилучший общий ответ: CR, PR, SD, прогрессирующее заболевание (PD) или не поддающееся оценке (NE).
- Время ответа (TTR): время между датой инфузии СТХ130 и первым рентгенологически задокументированным ответом (PR/CR).
- Продолжительность ответа (DoR): время между первым объективным ответом PR/CR и датой прогрессирования заболевания или смерти по любой причине. Это сообщалось только для субъектов, у которых были явления PR/CR.
- Выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS): разница между датой инфузии СТХ130 и датой прогрессирования заболевания или летального исхода по любой причине. Субъекты, которые не характеризовались прогрессированием и все еще участвовали в исследовании на момент даты прекращения сбора данных, подвергали цензуре на момент даты последней оценки RECIST.
- Общая выживаемость (OS): время между датой инфузии СТХ130 и летального исхода по любой причине. Субъектов, которые были живыми на момент даты прекращения сбора данных, подвергали цензуре на момент последней даты, на которую известно, что субъект был живым.

11.2.2.2 *Безопасность*

Частота возникновения и тяжесть АЕ и клинически значимых лабораторных отклонений суммировали и сообщали о них в соответствии с СТСАЕ версии 5.0, за исключением CRS, которые оценивались в соответствии с критериями Ли (Lee et al., (2014) *Blood* 124, 188-195), нейротоксичность, которая оценивалась в соответствии с ICANS (Lee et al., (2018) *Biol Blood Marrow Transplant* 25(4):625-638), и СТСАЕ версии 5.0, и GvHD, которые оценивались в соответствии с критериями MAGIC (Harris et al., (2016) *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, 4-10).

11.2.2.3 *Фармакокинетика*

Уровни СТХ130 в крови и других тканях с течением времени оценивали с помощью анализа ПЦР, с помощью которого измеряли количество копий конструкции CAR на мкг ДНК. Также можно выполнять дополнительные анализы с использованием проточной цитометрии для подтверждения присутствия белка CAR на клеточной поверхности.

Такие анализы можно применять для подтверждения присутствия СТХ130 в крови и для дальнейшего определения характеристик других клеточных иммунофенотипов.

11.2.3 Части А и В, конечные точки исследования

- Уровни СТХ130 в тканях. Распространение и персистенция СТХ130 в биопсии опухоли или CSF можно оценивать в любом из этих образцов, собранных в соответствии с

протоколом.

- Частота возникновения антител к СТХ130.
- Иммунопрофилирование популяций лимфоцитов.
- Профиль цитокинов после введения продукта СТХ130.
- Влияние антицитокиновой терапии на эффективность лечения CRS, пролиферацию СТХ130 и клинический ответ.
- Частота возникновения и тип последующей (после СТХ130) противораковой терапии.
- Время до CR: время между датой инфузии СТХ130 и задокументированным CR.
- Время до прогрессирования заболевания, определяемое как время между датой инфузии СТХ130 и первыми признаками прогрессирования заболевания.
- Первая или вторая последующая выживаемость без терапии: между датой инфузии СТХ130 и датой первой последующей терапии, или летальным исходом по любой причине, или PFS.
- Изменение PRO от исходного уровня, измеренное с помощью опросников EORTC QLQ-C30, EQ-5D-5L, FKSI-19 и FACT-G.
- Изменение когнитивных показателей от исходного уровня согласно оценке ICE.
- Другие геномные, белковые, метаболические или фармакодинамические конечные точки.

11.3 Наборы для анализа

Для представления и оценки данных применяли следующие наборы для анализа.

Часть А (повышение дозы)

- **Набор для оценки DLT** включал всех субъектов, которые получали СТХ130 и либо завершивших период оценки DLT после начальной инфузии, либо прекративших лечение ранее после перенесенного 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 получаемым лечением, где полученное лечение определяли как назначенные уровень дозы/схема, если они были получены хотя бы один раз, или первый полученный уровень дозы/схема, если назначенное лечение никогда не получали. SAS был основным набором для анализа данных безопасности.

- **Полный набор для анализа (FAS):** все субъекты, которые были включены в исследование, и получили инфузию СТХ130, 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.

11.4 Размер выборки и учет мощности

Размер выборки части А (увеличение дозы) составлял от примерно 6 до 18 субъектов, подлежащих оценке, в зависимости от количества оцениваемых уровней доз и возникновения DLT.

Часть В (расширение когорты) представляла собой несравнительное исследование с одной группой, проведенное с использованием оптимальной схемы стадии Simon 2. На первой стадии в исследование включали по меньшей мере 23 субъекта, которые получали лечение с помощью CTX130. Если ≥ 5 субъектов достигали объективного ответа (CR или PR), то могло быть принято решение о расширении исследования, включив в него дополнительных 48 получавших лечение субъектов (всего 71) на второй стадии; в противном случае регистрацию приостанавливали. Размер выборки из 71 субъекта имел мощность критерия 80% ($\alpha=0,05$, 2-сторонний тест), чтобы отвергнуть нулевую гипотезу о том, что ORR равнялся частоте ответов 15% согласно анамнезу (Barata et al., 2018; Nadal et al., 2016; Powles et al., 2018), что предполагало то, что истинный ORR составлял 30%.

11.5 Статистический анализ

Часть А

Перечисляли дозолимитирующие токсические эффекты и их частоту возникновения обобщали с помощью Медицинского словаря для регуляторной деятельности (MedDRA), первичного системно-органный класса (SOC) и/или предпочтительного термина (PT), наихудшей оценки на основе СТСАЕ версии 5.0, типа АЕ и уровня дозы. Набор для оценки DLT являлся основным аналитическим набором для оценки DLT в части А.

Часть В

Первичную конечную точку ORR оценивали для субъектов, которые получали CTX130 в RPBD в обеих частях А и В. FAS являлся основным набором для анализа эффективности. Частоту объективных ответов суммировали и рассчитывали 95% доверительные интервалы (CI).

Также проводили анализ чувствительности ORR, основанный на обзоре исследователем оценок заболевания.

Общий анализ эффективности

Конечные точки времени до явления анализировали с применением способов Каплана-Мейера, где это уместно. Рассчитывали оценки медианы и других квантилей (включая 25-й процентиль и 75-й процентиль) на основе способа Каплана-Мейера и предоставляли соответствующие 95% CI. Рассчитывали выживаемость в определенные моменты времени на основе способа Каплана-Мейера. Конечные точки времени до явления, которые необходимо было проанализировать, включали следующее.

- Продолжительность ответа: DoR рассчитывали только среди ответивших как дату первого проявления ответа до даты задокументированного прогрессирования заболевания или летального исхода, в зависимости от того, что наступало раньше. Субъектов без прогрессирования заболевания или летального исхода подвергали цензуре в отношении даты последней оцениваемой оценки ответа.

- Выживаемость без прогрессирования: определяли как продолжительность от первой даты исследуемого лечения до задокументированного объективного прогрессирования опухоли или смерти. Субъектов без прогрессирования заболевания или

летального исхода подвергали цензуре в отношении даты последней оцениваемой оценки ответа.

- Общую выживаемость: определяли как время между датой введения СТХ130 и летальным исходом по любой причине. Субъектов, которые были живыми на момент даты прекращения сбора данных, подвергали цензуре на момент последней даты, на которую известно, что субъект был живым.

Общий анализ безопасности

SAS использовали для всех перечней и сводок данных по безопасности. Данные по безопасности обобщали по уровню дозы.

Неблагоприятные события

АЕ классифицировали в соответствии с СТСАЕ версии 5.0, за исключением CRS (критерии ASTCT), нейротоксичности (ICANS и СТСАЕ версии 5.0) и GvHD (критерии MAGIC). Частоту возникновения нежелательных явлений, возникающих при лечении (TEAE), суммировали в соответствии с MedDRA согласно SOC и/или PT, тяжести (на основе СТСАЕ версии 5.0) и отношению к исследуемому лечению. Получали сводки всех TEAE.

Перечисляли все АЕ, независимо от времени начала и окончания, и в списке был представлен флажок, указывающий имело место ли это TEAE или нет.

Лабораторные аномалии

- Для лабораторных тестов, охватываемых СТСАЕ версии 5.0, лабораторные данные классифицировали соответствующим образом. Для лабораторных тестов, охваченных СТСАЕ, класс 0 присваивали всем неотсутствующим значениям, не оцененным как 1 или выше.

- Следующие сводки создавали отдельно для гематологических и биохимических лабораторных тестов:

- описательная статистика фактических значений (и/или изменений от исходного уровня) или частоты клинических лабораторных параметров с течением времени;
- таблицы наихудших оценок СТСАЕ при лечении;
- перечень всех лабораторных данных с помеченными значениями для отображения соответствующих градаций СТСАЕ и классификаций относительно лабораторных нормальных диапазонов.

В дополнение к вышеупомянутым таблицам и перечням в SAP могут быть указаны графические отображения ключевых параметров безопасности, такие как диаграммы рассеяния фактических или измененных в лабораторных тестах с течением времени или диаграммах.

11.5 Промежуточный анализ

11.5.1 Промежуточный анализ эффективности

Один промежуточный анализ в отношении бесполезности выполняли и проверяли с помощью DSMB. Промежуточный анализ проводили не позднее, чем после того, как 22 субъекта получали лечение и имелось 3 месяца, чтобы оценить данные об ответе. Если

истинная частота ответов на CTX130 не отличалась от стандартного лечения, то вероятность остановки этого анализа из-за бесполезности составляла 70%.

11.6.3 Анализ биомаркеров

Частота возникновения антител к CTX130, уровни CAR⁺ Т-клеток CTX130 в крови и уровни цитокинов в сыворотке крови.

Опухоль, кровь, возможно костный мозг и аспират (только у субъектов с развившейся после лечения HLH) и возможно образцы CSF (только у субъектов с развившейся после лечения нейротоксичностью) собирали для идентификации геномных, метаболических и/или протеомных биомаркеров, которые могли указывать на клинический ответ, устойчивость, безопасность, заболевание, фармакодинамическую активность или механизм действия CTX130.

Анализ уровней CTX130 (фармакокинетический анализ)

Анализ уровней трансдуцированных CD70-направленных CAR⁺ Т-клеток будут проводить на образцах крови, собранных в соответствии с графиком, описанным в **таблице 26** и **таблице 27**. У субъектов, испытывающих признаки или симптомы CRS, дополнительные образцы крови следует брать каждые 48 часов между запланированными сборами. График увеличения количества и персистенции CTX130 в крови описывали с использованием анализа полимеразной цепной реакции (ПЦР), с помощью которого измеряли количество копий конструкции CAR. Также можно выполнять дополнительные анализы с применением более чувствительной геномной технологии или проточной цитометрии для подтверждения присутствия белка CAR на клеточной поверхности.

Образцы для анализа уровней CTX130 следовало отправлять в центральную лабораторию из крови, CSF (только у субъектов с развившейся после лечения нейротоксичностью), костного мозга (только у субъектов с развившейся после лечения HLH) или биопсии опухоли, выполненной после инфузии CTX130. Увеличение количества и персистенцию CTX130 в крови, CSF, костном мозге или опухолевой ткани можно оценивать в любом из этих образцов, собранных в соответствии с протоколом.

Цитокины

Цитокины, в том числе без ограничения CRP, IL-1 β , sIL-1R α , IL-2, sIL-2R α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17a, интерферон γ , фактор некроза опухоли α и GM-CSF анализировали в центральной лаборатории. Корреляционный анализ, проведенный во множестве предшествующих клинических испытаниях Т-клеток с CAR, идентифицировал данные цитокины и другие в качестве потенциальных прогностических маркеров тяжелого CRS, как обобщено в недавнем обзоре (Wang et al., 2018). Кровь для выявления цитокинов будут собирать в определенные моменты времени, как описано в **таблице 26** и **таблице 27**. У субъектов, испытывающих признаки или симптомы CRS, первоначальный сбор образцов необходимо проводить с началом симптомов и дополнительные образцы следует отбирать каждые 12 часов (\pm 5 часов) до разрешения.

Антитело к CTX130

Конструкция CAR состоит из гуманизированного scFv. Кровь собирали на

протяжении всего исследования для оценки потенциальной иммуногенности после раскрытия информации, представленной в данном исследовании.

Биомаркеры для поискового исследования

Зондирующее исследование можно проводить для выявления молекулярных (геномных, метаболических и/или протеомных) биомаркеров и иммунофенотипов, которые могут свидетельствовать о клиническом ответе, резистентности, безопасности, заболевании, фармакодинамической активности и/или механизме действия лечения или предсказывать их. Образцы будут собираться в соответствии с **таблицей 26** и **таблицей 27**. В отношении инструкции по сбору образцов крови, опухолей, костного мозга и CSF см. Руководство по зондирующему исследованию.

Исследование дополнительных биомаркеров может включать оценку клеток и продуктов крови, опухолевой ткани и других тканей, полученных от субъекта. С помощью этих оценок можно оценивать ДНК, РНК, белки и другие биологические молекулы, полученные из этих тканей. Такие оценки помогают понять факторы, связанные с заболеванием пациента, ответом на СТХ130 и механизмом действия IP.

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 трое субъектов начинали лимфодеплецирующую терапию в течение 24 часов после завершения стадии 1. Все субъекты, соответствующие критериям, завершали период скрининга (стадия 1) и получали LD химиотерапию в течение менее чем 8 дней, при этом два субъекта завершали скрининг и начинали получать дозу LD химиотерапии в течение 72 часов. Все субъекты, получавшие LD химиотерапию, переходили на получение дозы DL1 СТХ130 в течение 2-3 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 наблюдали DTL в параллельном исследовании с использованием СТХ130 для лечения субъектов с Т- или В-клеточным злокачественным образованием. См., например, заявку на патент США № 62/934945, поданную 13 ноября 2019 г., и заявку на патент США № 63/034510, поданную 4 июня 2020 г. Кроме того, терапия с применением аллогенных Т-клеток с CAR проявляла требуемые фармакокинетические характеристики у подвергнутых лечению субъектов-людей, включая увеличение количества и персистенцию Т-клеток с CAR после инфузии. Значительное распределение, увеличение количества и персистенцию Т-клеток с CAR наблюдали уже в DL1. Не более чем 87-кратное увеличение количества СТХ130 в периферической крови по сравнению с T₀ наблюдали у одного субъекта с RCC, обследованного на день исследования, и персистенцию клеток СТХ130 можно обнаружить у субъектов с DL1 через по меньшей мере 28 дней после инфузии. Аналогичные закономерности распределения, увеличения количества и персистенции Т-клеток с CAR наблюдали в соответствующем исследовании злокачественных образований

T- или В-клеток, где наблюдали 20-кратное увеличение количества СТХ130, а клетки СТХ130 выявляли в течение 14 дней после инфузии.

Субъекты, соответствующие критериям, в данном исследовании имели светлоклеточную RCC, некоторые с незначительными фракциями саркоидной дифференцировки. Результаты, полученные от первых двух субъектов с RCC, суммированы ниже.

- У первого субъекта, получившего дозу DL1, наблюдали стабилизацию RCC в ее опухолевых очагах без каких-либо новых очагов или прогрессирования имеющихся очагов согласно данным компьютерной томографии через 42 дня после инфузии СТХ130. Кроме того, литический метастаз в кости продемонстрировал явные признаки рекальцификации при том же СТ-сканировании. Субъект оставался в стабильном состоянии в отношении заболевания через 12 недель.

- У второго субъекта, получавшего дозу DL1, наблюдали по меньшей мере частичный ответ через 42 дня в соответствии с RECIST 1.1 с резким уменьшением субплеврального целевого очага и трех нецелевых очагов в грудной клетке.

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 отдельно. 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 CD70+ солидной опухоли, где способ включает

(i) подвергание пациента-человека, у которого имеется CD70+ солидная опухоль, первой процедуре лечения с применением лимфодеплеции; и

(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 в количестве 30 мг/м^2 и циклофосфида в количестве 500 мг/м^2 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) значительное ухудшение клинического статуса,
- (b) потребность в дополнительном кислороде для поддержания уровня насыщения более чем 90%,
- (c) неконтролируемая сердечная аритмия,
- (d) гипотензия, требующая поддержки вазопрессорными средствами,
- (e) активная инфекция и
- (f) острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где стадию (i) выполняют 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 1×10^6 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) активная неконтролируемая инфекция,
- (b) ухудшение клинического статуса по сравнению с клиническим статусом до стадии (i) и
- (c) острая неврологическая токсичность, характеризующаяся степенью, составляющей 2 или больше.

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 включает синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность, синдром лизиса опухоли, GvHD, внеопухолевую токсичность, специфическую в отношении мишени, и неконтролируемую пролиферацию Т-клеток, где необязательно нейротоксичность представляет собой нейротоксичность, ассоциированную с иммунными эффекторными клетками (ICANS), и где необязательно внеопухолевая токсичность, специфическая в отношении мишени, предусматривает активность популяции генетически сконструированных Т-клеток в отношении активированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток, остеобластов и/или эпителия, подобного эпителию почечных канальцев.

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, где необязательно вторую дозу вводят пациенту-человеку по прошествии от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет, необязательно приблизительно 8-10 недель или приблизительно 14-18 недель после первой дозы.

10. Способ по п. 9, дополнительно включающий (vi) подвергание пациента-человека третьей процедуре лечения с применением лимфодеплеции и (vii) введение пациенту-человеку третьей дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток, где необязательно третья доза имеет место по прошествии от приблизительно 8 недель до приблизительно 2 лет, необязательно приблизительно 8-10 недель или приблизительно 14-18 недель после второй дозы.

11. Способ по п. 9 или п. 10, где после стадии (ii) и/или после стадии (v) у пациента-человека не проявляются одно или несколько из следующего:

- (a) дозозимитирующая токсичность (DLT),
- (b) CRS, характеризующийся степенью, составляющей 3 или больше, степень которого не понижается до степени, составляющей 2 или меньше, в течение 72 часов после стадии (ii) и/или стадии (v),
- (c) GvHD, характеризующаяся степенью, превышающей 1,
- (d) ICANS, характеризующийся степенью, составляющей 3 или больше,
- (e) активная инфекция,
- (f) гемодинамическая нестабильность и
- (g) дисфункция органов.

12. Способ по любому из пп. 9-11, где вторая процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (iv), третья процедура лечения с применением лимфодеплеции на стадии (vi) или обе из них предусматривают совместное введение пациенту-человеку флударабина в количестве 30 мг/м² и циклофосфида в количестве 500 мг/м² в день внутривенно в течение 1-3 дней.

13. Способ по любому из пп. 9-12, где стадию (v) осуществляют по прошествии 2-7 дней после стадии (iv), и/или где стадию (vii) осуществляют по прошествии 2-7 дней

после стадии (vi).

14. Способ по любому из пп. 9-13, где стадию (v) и/или стадию (vii) осуществляют посредством введения популяции генетически сконструированных Т-клеток пациенту-человеку внутривенно во второй дозе и/или третьей дозе, которые составляют от приблизительно 1×10^6 CAR⁺ клеток до приблизительно 1×10^9 CAR⁺ клеток.

15. Способ по п. 14, где вторая доза и/или третья доза составляют от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 9×10^8 CAR⁺ клеток.

16. Способ по любому из пп. 9-15, где у пациента-человека произошло достижение частичного ответа (PR) или полного ответа (CR) после стадии (ii) и стадии (v), если это применимо, и впоследствии наблюдалось прогрессирование в течение 2 лет.

17. Способ по любому из пп. 9-15, где у пациента-человека произошло достижение PR или стабильного заболевания (SD) после стадии (ii) и стадии (v), если это применимо.

18. Способ по любому из пп. 9-15, где у пациента-человека подтверждено наличие CD70⁺ солидной опухоли при рецидиве до стадии (v) и стадии (vii), если это применимо.

19. Способ по любому из пп. 9-18, где у пациента-человека наблюдается стабильное заболевание или прогрессирование заболевания.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где первая доза, вторая доза и/или третья доза популяции генетически сконструированных Т-клеток составляют 1×10^6 CAR⁺ клеток, 3×10^7 CAR⁺ клеток, 1×10^8 CAR⁺ клеток или 1×10^9 CAR⁺ клеток, при этом 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.

21. Способ по любому из пп. 9-20, где первая доза популяции генетически сконструированных Т-клеток является такой же, как вторая и/или третья дозы популяции генетически сконструированных Т-клеток.

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

23. Способ по любому из пп. 1-22, где пациент-человек является взрослым.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где пациент-человек подвергался предшествующей противораковой терапии.

25. Способ по любому из пп. 1-23, где CD70⁺ солидная опухоль является рецидивирующей или рефрактерной.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где у пациента-человека имеются CD70⁺ опухолевые клетки.

27. Способ по п. 26, где у пациента-человека имеются CD70⁺ опухолевые клетки в биологическом образце, полученном от пациента-человека.

28. Способ по п. 26 или п. 27, где до стадии (i) способ дополнительно включает идентификацию пациента-человека, у которого имеются CD70⁺ опухолевые клетки.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где для пациента-человека предусмотрена

антицитокиновая терапия.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где для пациента-человека предусмотрена аутологичная или аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток после лечения с помощью популяции генетически сконструированных Т-клеток.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где пациент-человек характеризуется одним или несколькими из следующих признаков:

(a) оценка общего состояния пациента по шкале Карновского (KPS), составляющая 80% или больше, и

(b) приемлемое функционирование органов,

(c) отсутствие лечения с применением предшествующей терапии с применением средства, нацеливающегося на CD70, или адоптивной терапии с применением Т-клеток или НК-клеток,

(d) отсутствие противопоказаний к терапии с применением лимфодеплеции,

(e) отсутствие проявления наличия злокачественного новообразования со стороны центральной нервной системы (ЦНС),

(f) отсутствие предшествующих нарушений со стороны центральной нервной системы,

(g) отсутствие плеврального выпота, или асцита, или перикардального выпота,

(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,

(l) отсутствие случаев применения вакцины от заболеваний печени или лекарственных препаратов на основе растительного сырья и

(m) отсутствие случаев прохождения трансплантации паренхиматозных органов или получения трансплантата костного мозга.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где пациента-человека подвергают мониторингу в течение по меньшей мере 28 дней в отношении развития токсичности после каждого введения популяции генетически сконструированных Т-клеток.

33. Способ по п. 32, где для пациента-человека предусмотрен контроль токсичности, если наблюдается развитие токсичности.

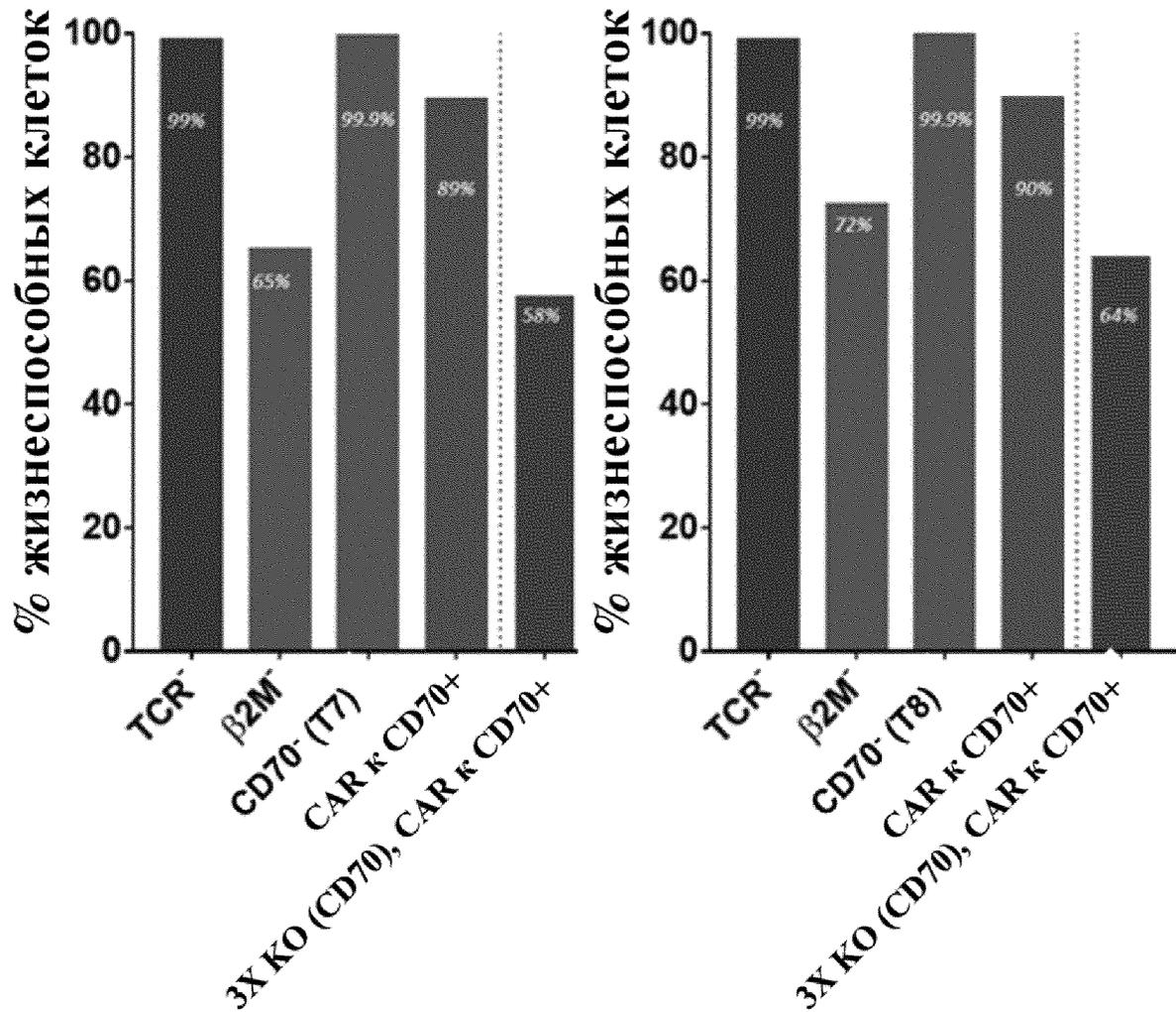
34. Способ по любому из пп. 1-33, где CAR, который связывает CD70, содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен CD8, костимулирующий домен 4-1BB и цитоплазматический сигнальный домен CD3 ζ , и при этом внеклеточный домен представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), который связывает CD70.

35. Способ по п. 34, где scFv содержит вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), предусматривающий SEQ ID NO: 49, и вариабельный домен легкой цепи (V_L), предусматривающий SEQ ID NO: 50.

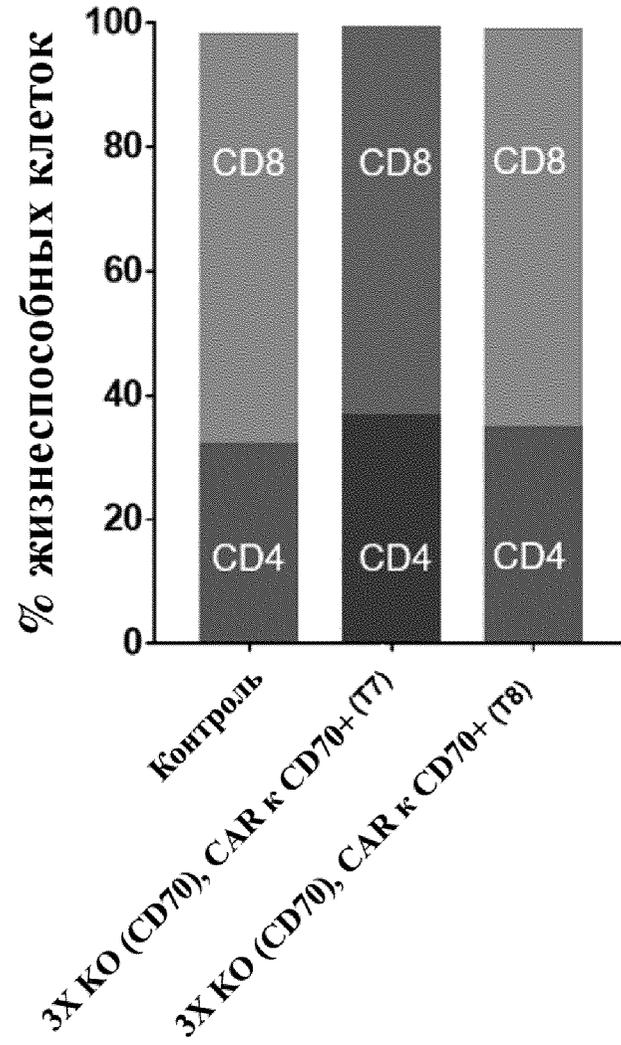
36. Способ по п. 35, где scFv предусматривает SEQ ID NO: 48.

37. Способ по любому из пп. 34-36, где CAR предусматривает SEQ ID NO: 46.
38. Способ по любому из пп. 1-37, где нарушенный ген *TRAC* получен с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9, которая содержит направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.
39. Способ по п. 38, где нарушенный ген *TRAC* характеризуется делецией области, на которую нацеливается спейсерная последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9 или ее часть.
40. Способ по любому из пп. 1-39, где нарушенный ген $\beta 2M$ получен с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9, которая содержит направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 12 или 13.
41. Способ по любому из пп. 1-40, где нарушенный ген CD70 получен с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9, которая содержит направляющую РНК, содержащую спейсерную последовательность под SEQ ID NO: 4 или 5.
42. Способ по любому из пп. 1-41, где CD70+ солидная опухоль представляет собой рак легкого, рак желудка, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и/или их комбинацию.

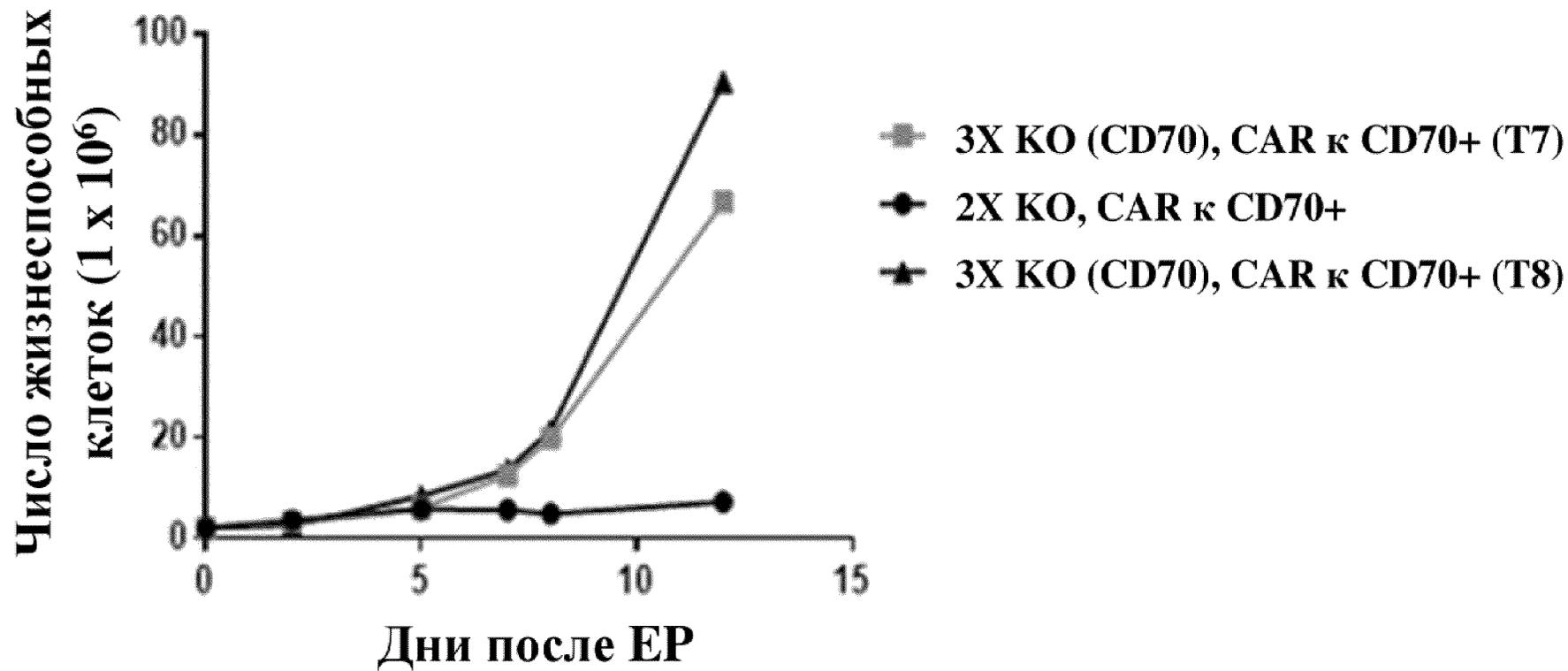
По доверенности



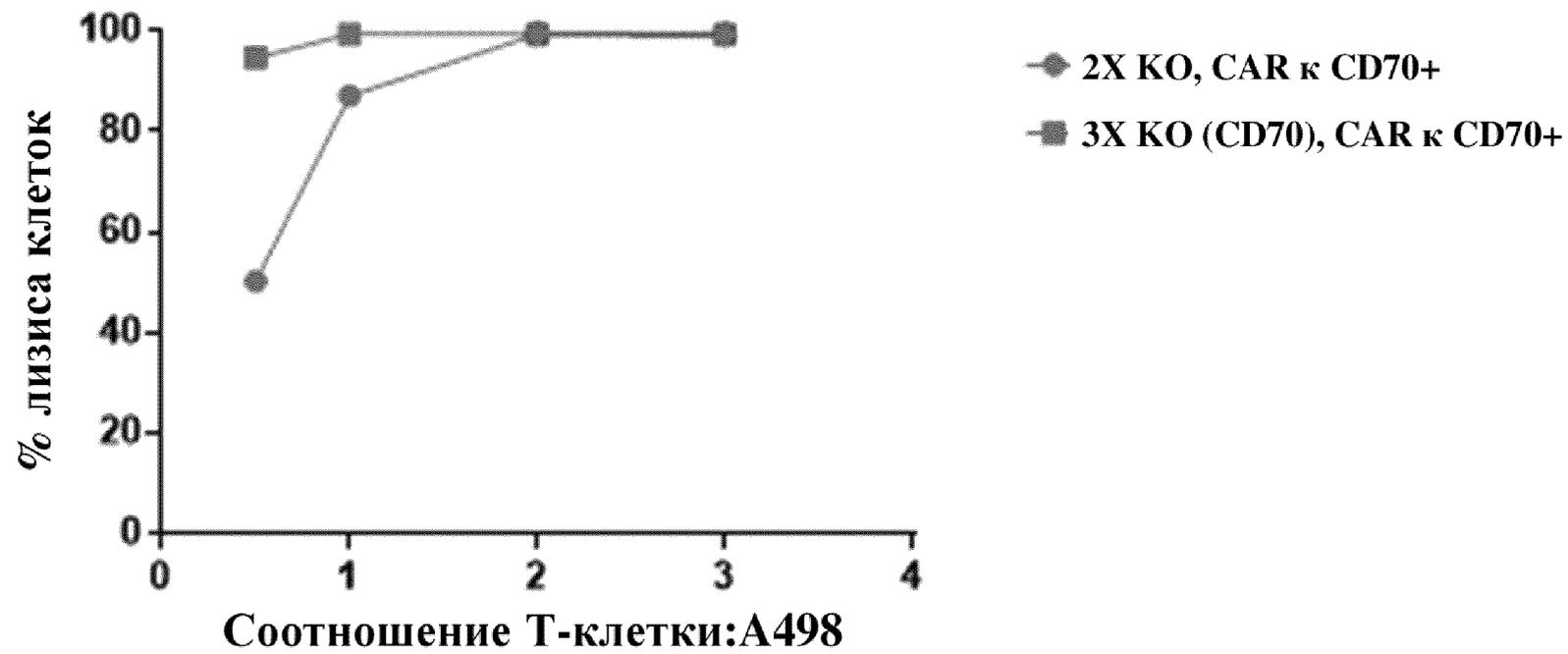
ФИГ. 1



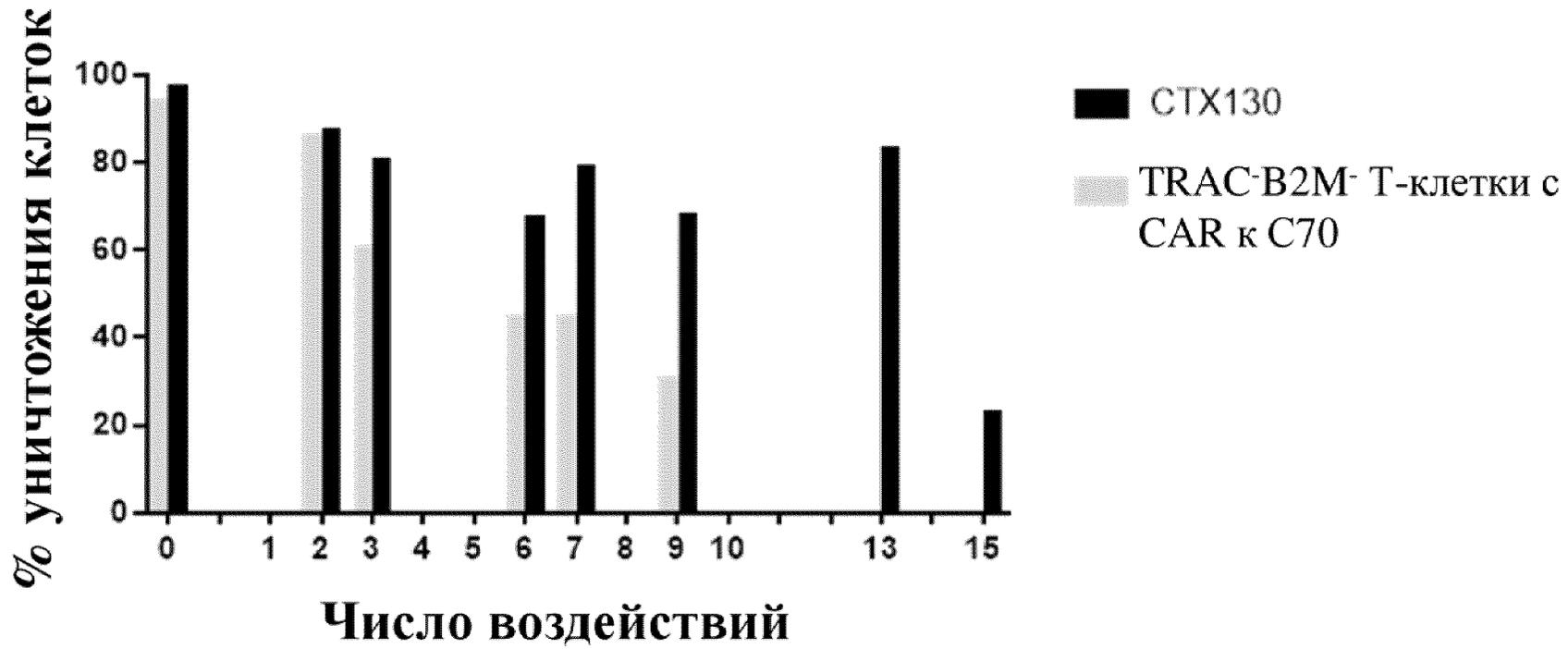
ФИГ. 2



ФИГ. 3

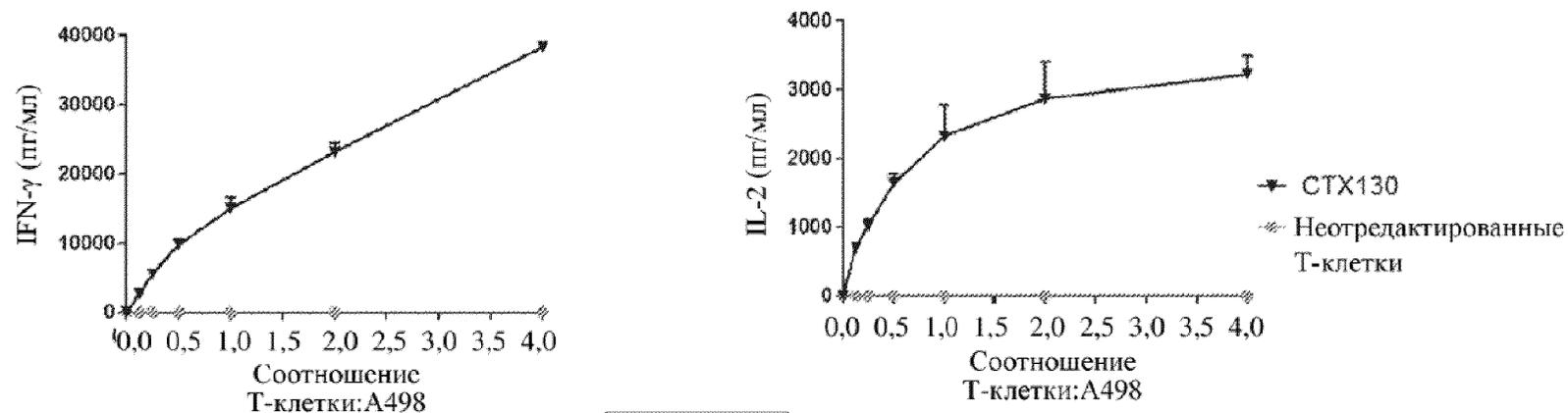


ФИГ. 4



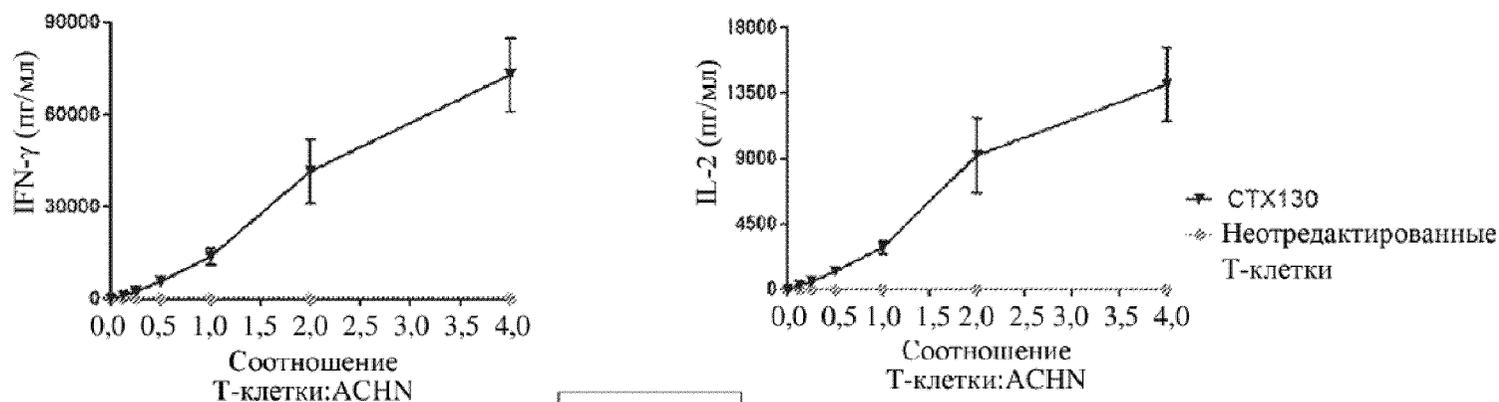
ФИГ. 5

Клетки A498 (CD70⁺)



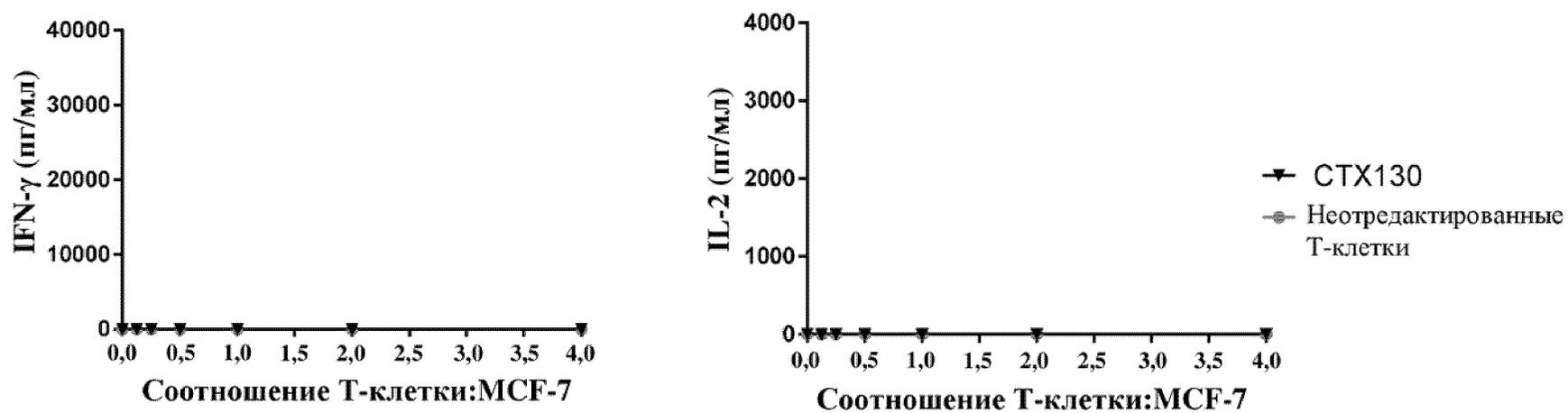
ФИГ. 6А

Клетки АСНН (CD70⁺)

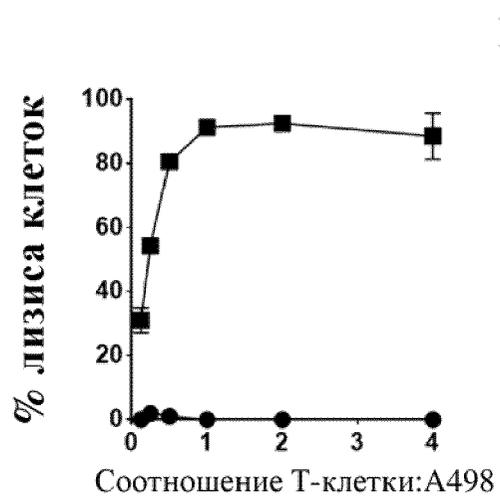


ФИГ. 6В

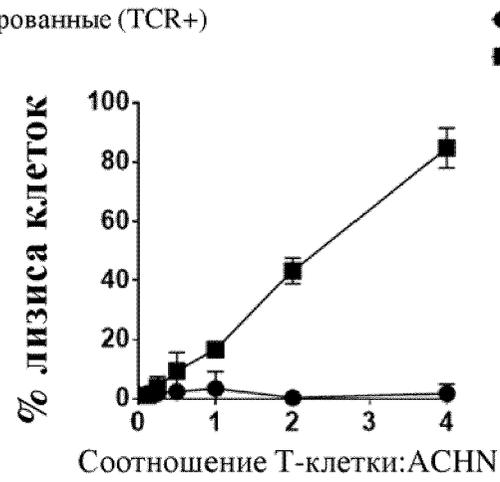
MCF7 (CD70⁻)



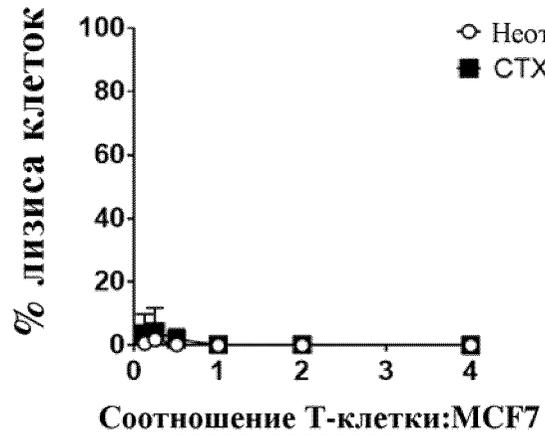
ФИГ. 6С



ФИГ. 7А

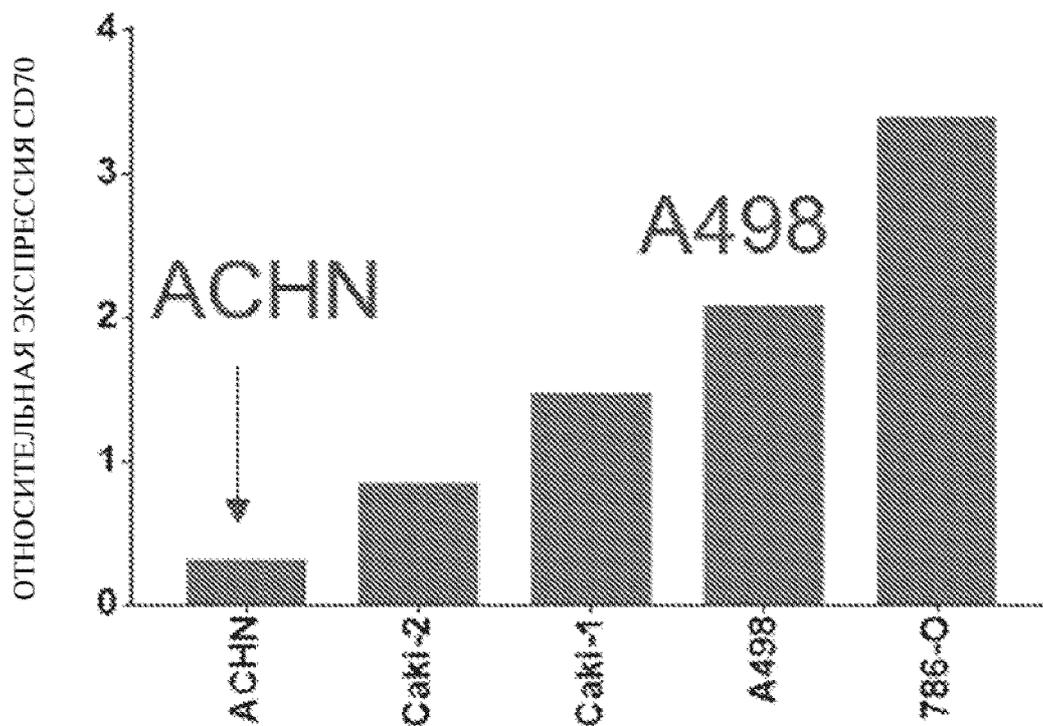


ФИГ. 7В

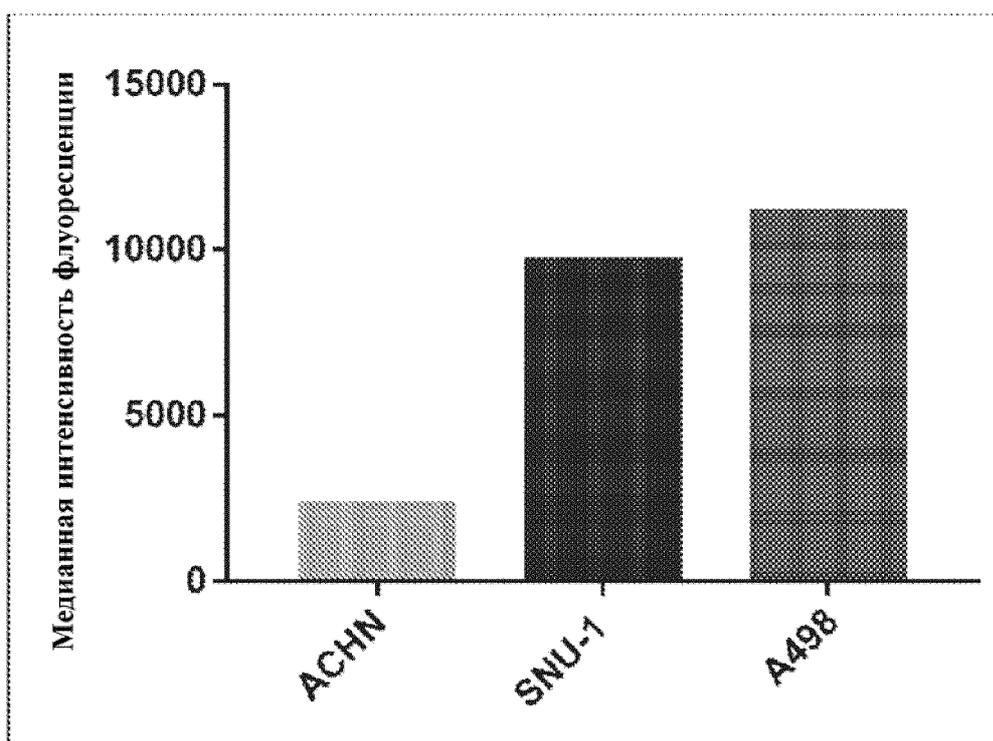


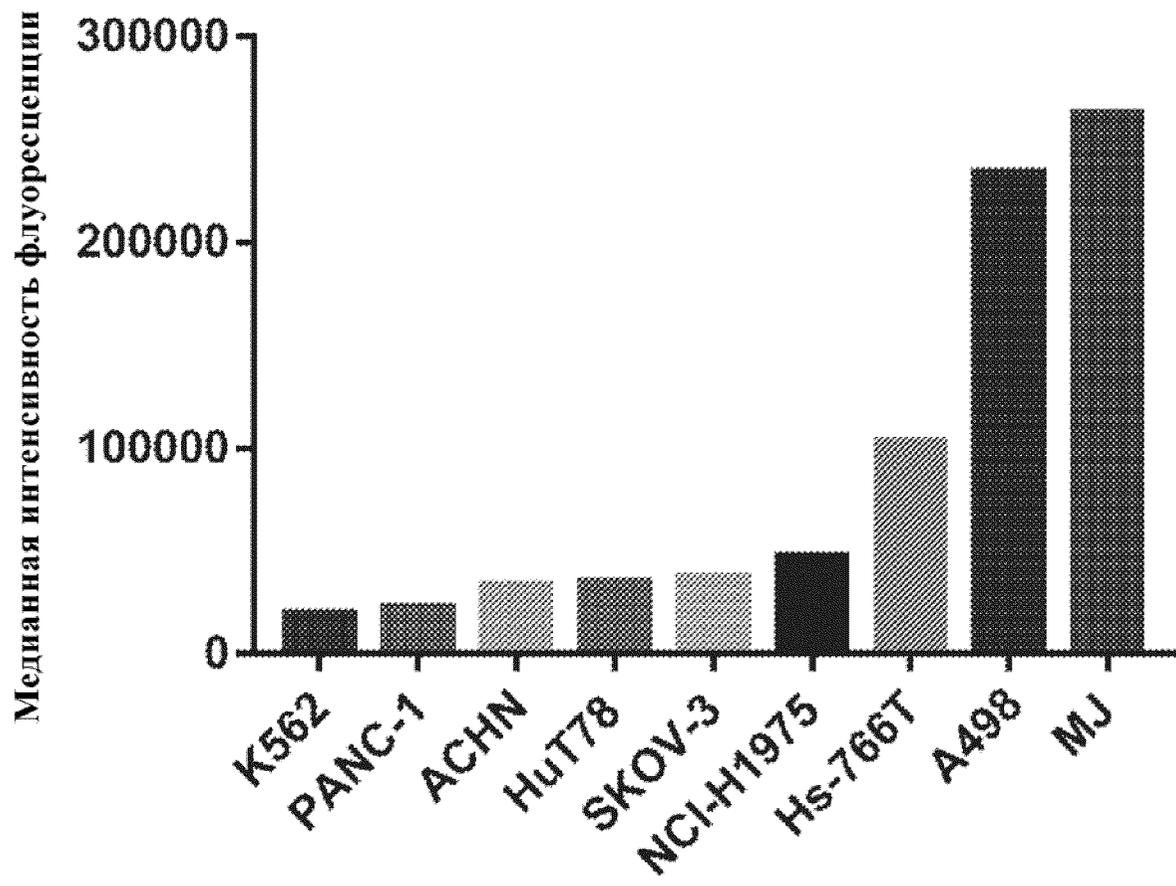
ФИГ. 7С

ФИГ. 8А

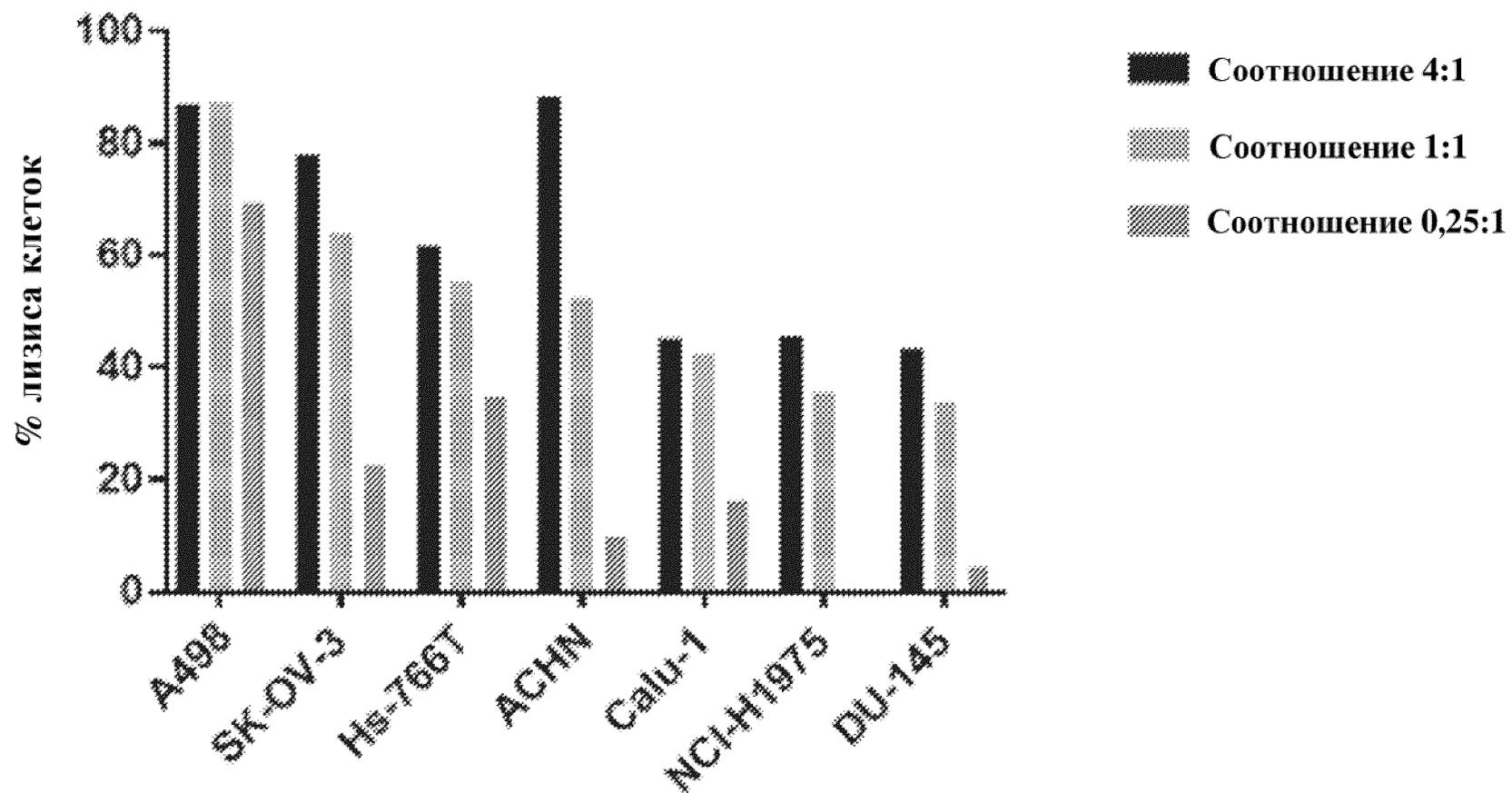


ФИГ. 8В

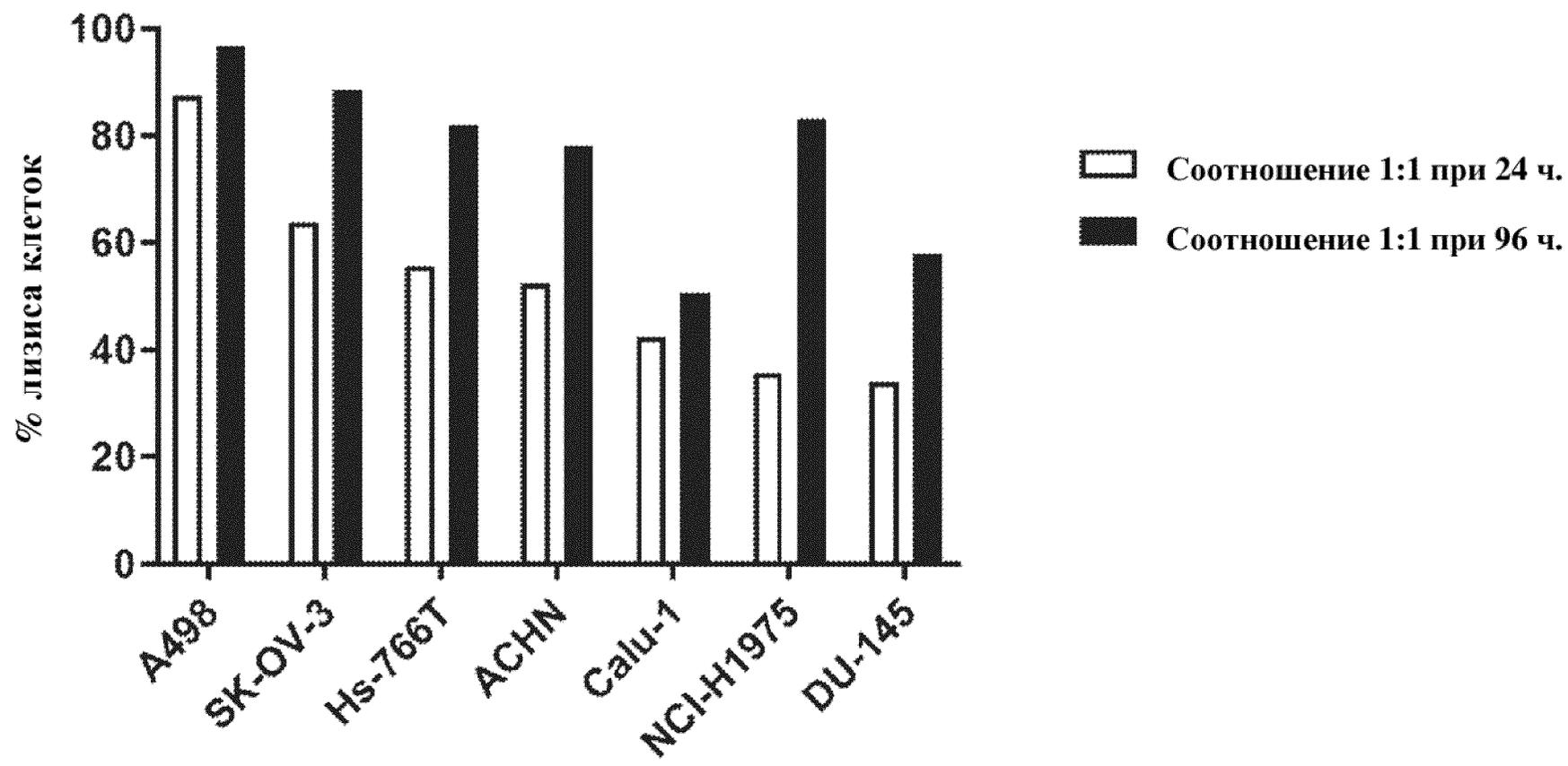




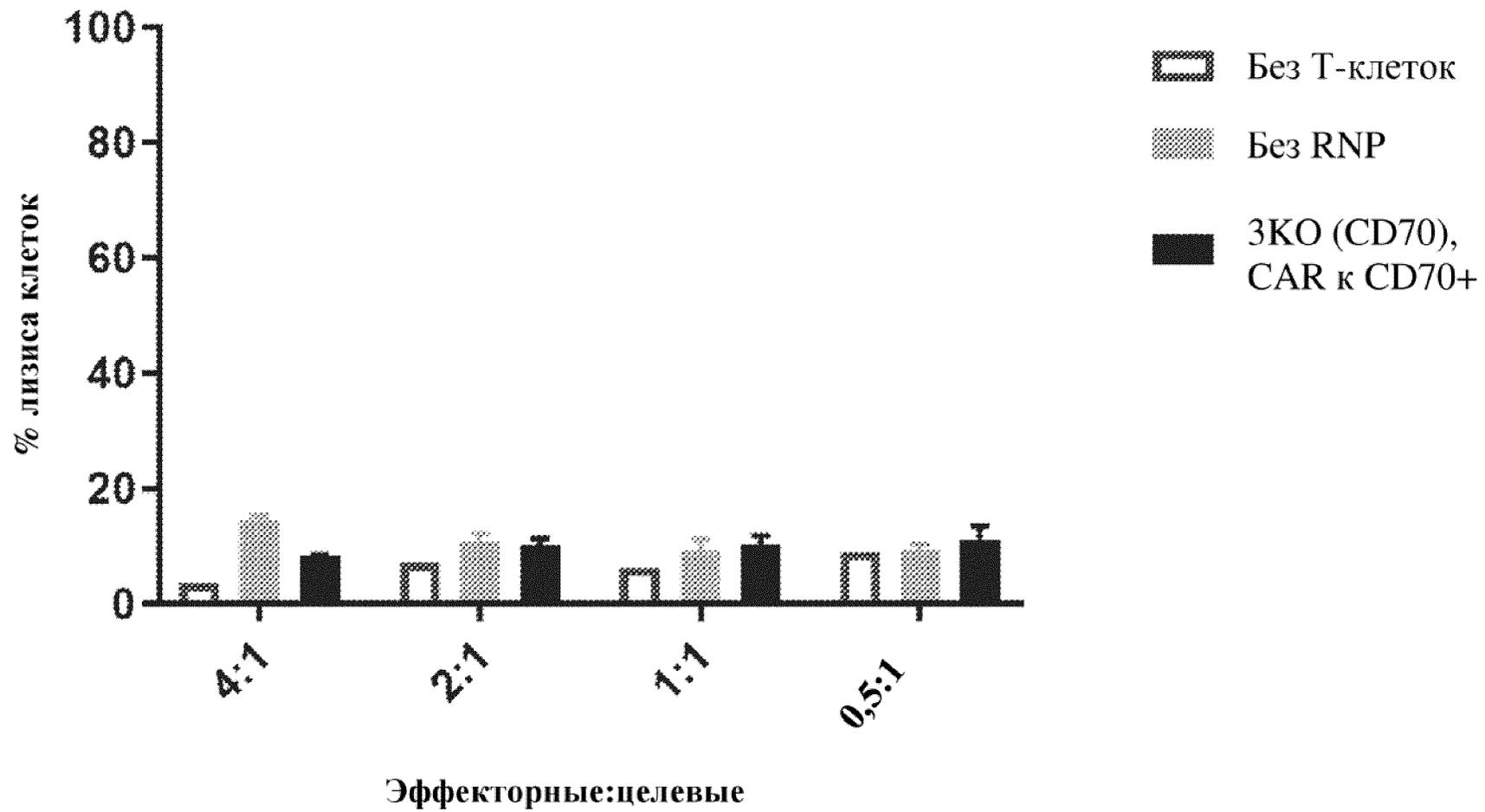
ФИГ. 8С



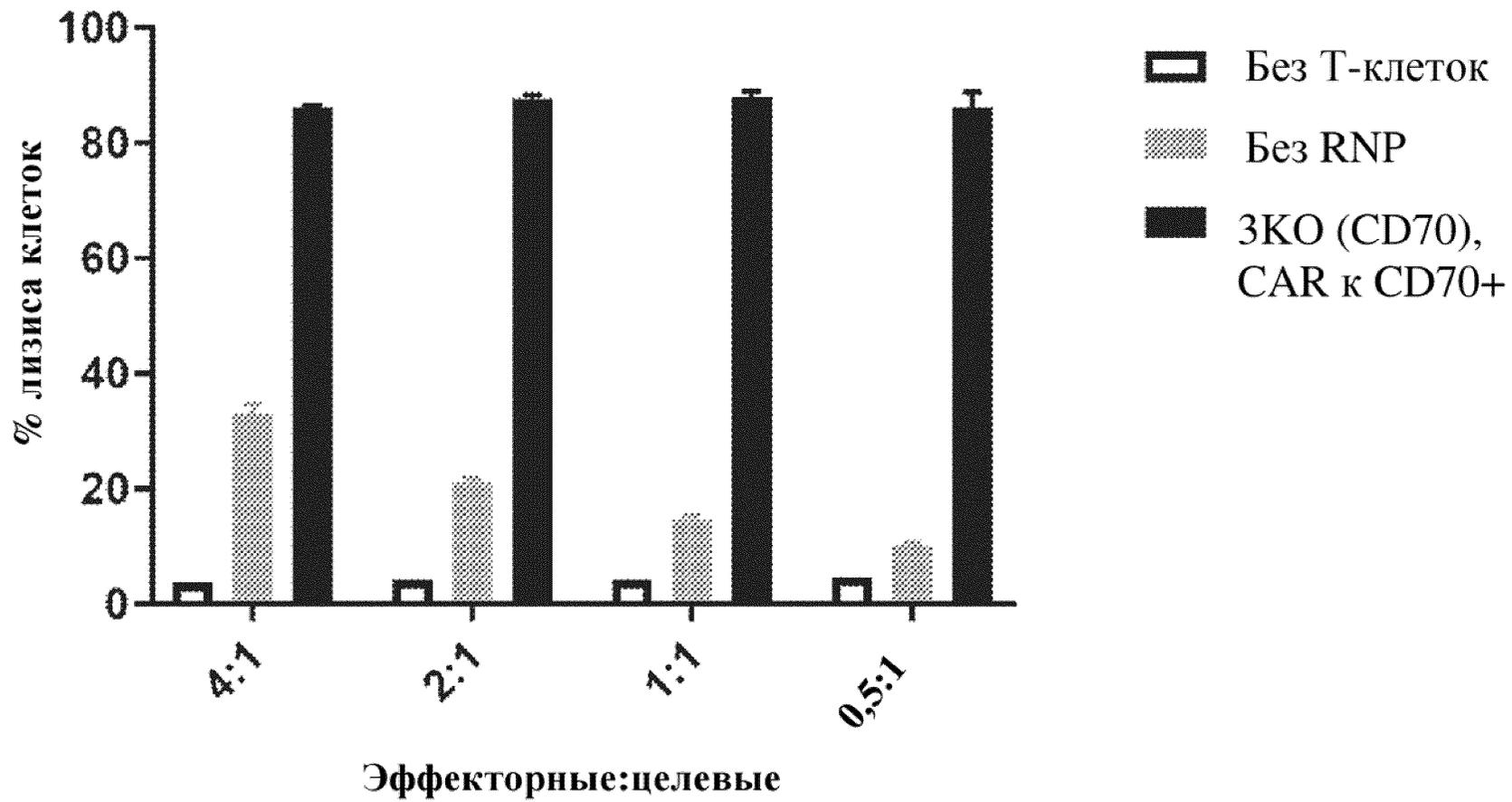
ФИГ. 8D



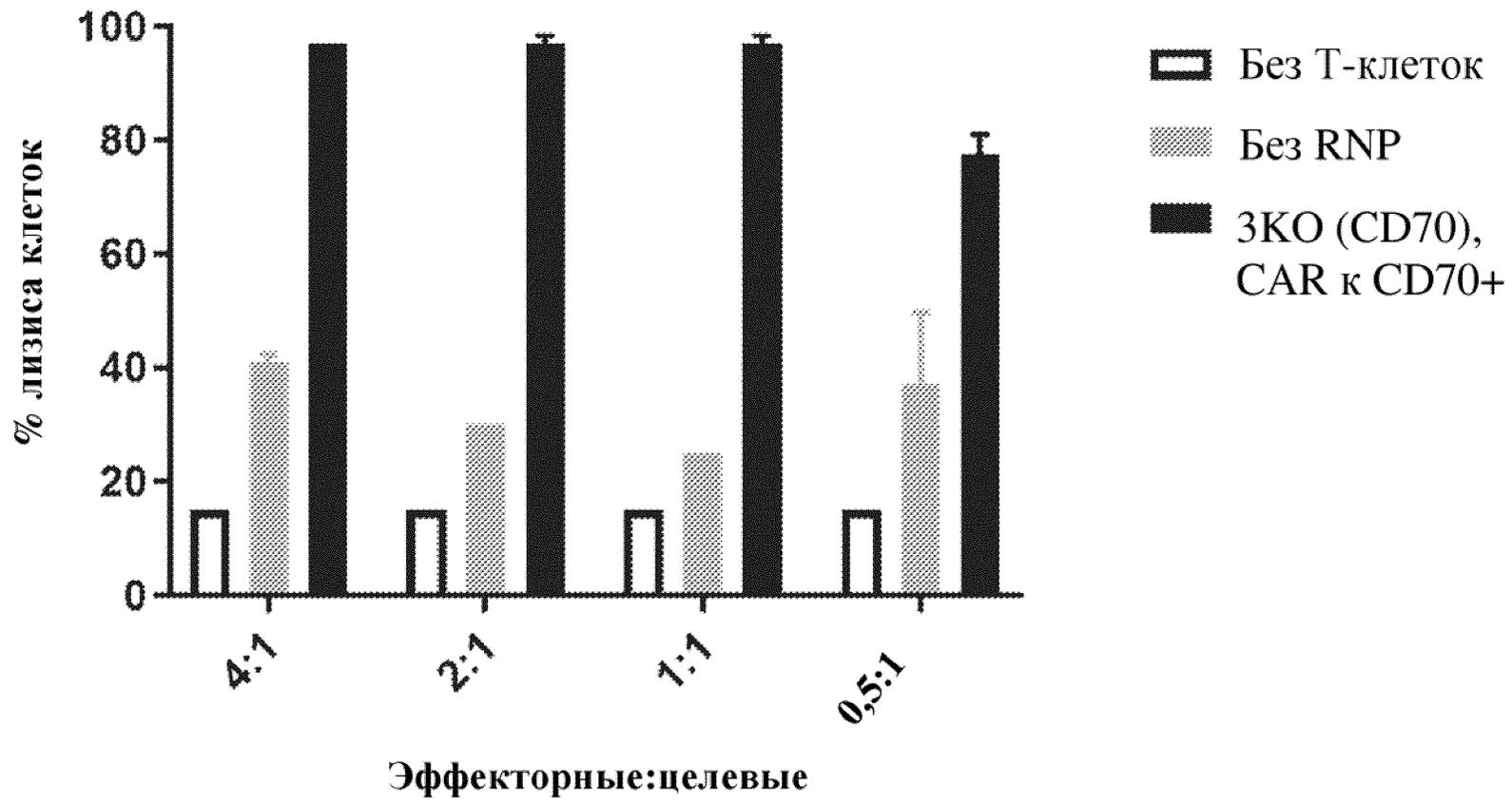
ФИГ. 8E



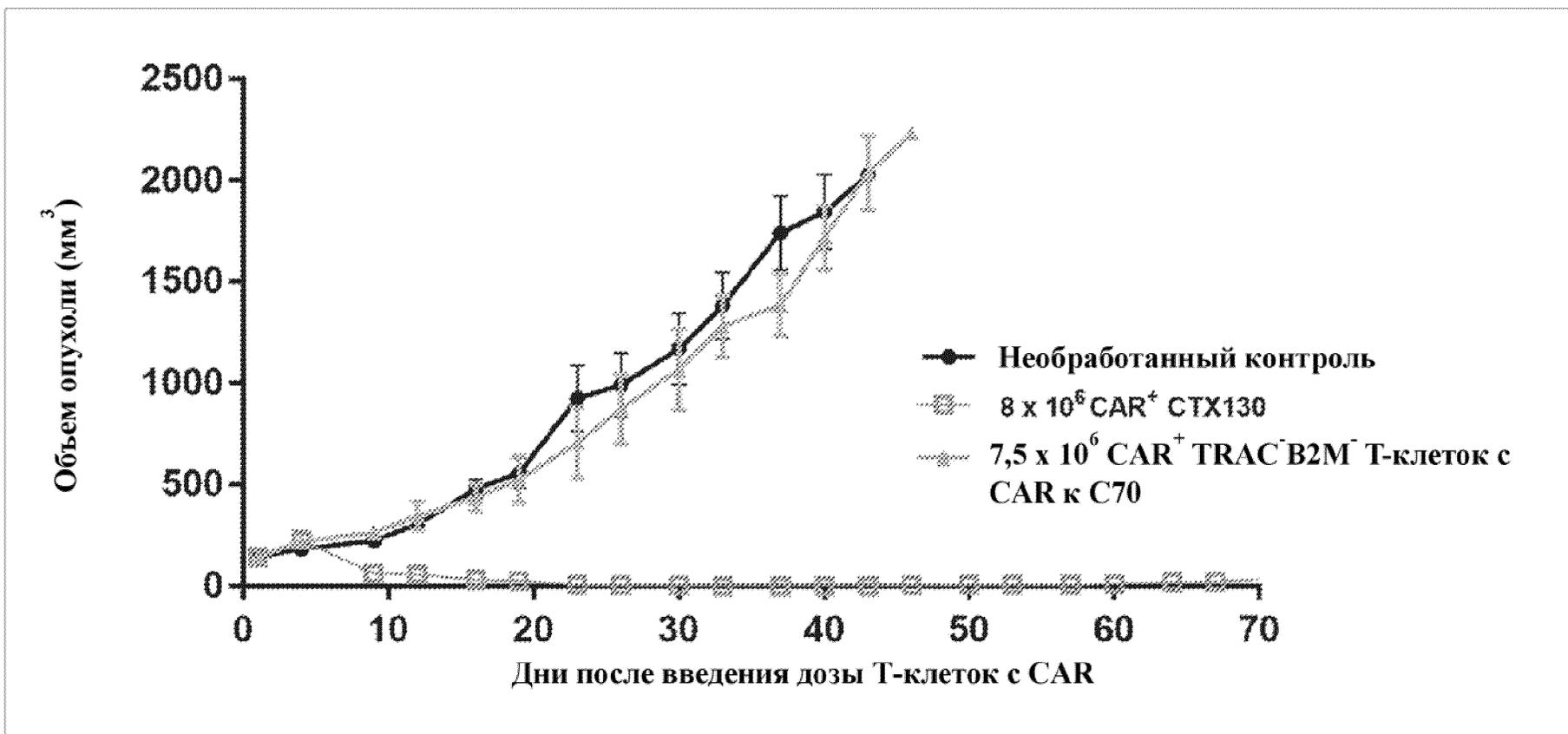
ФИГ. 8F



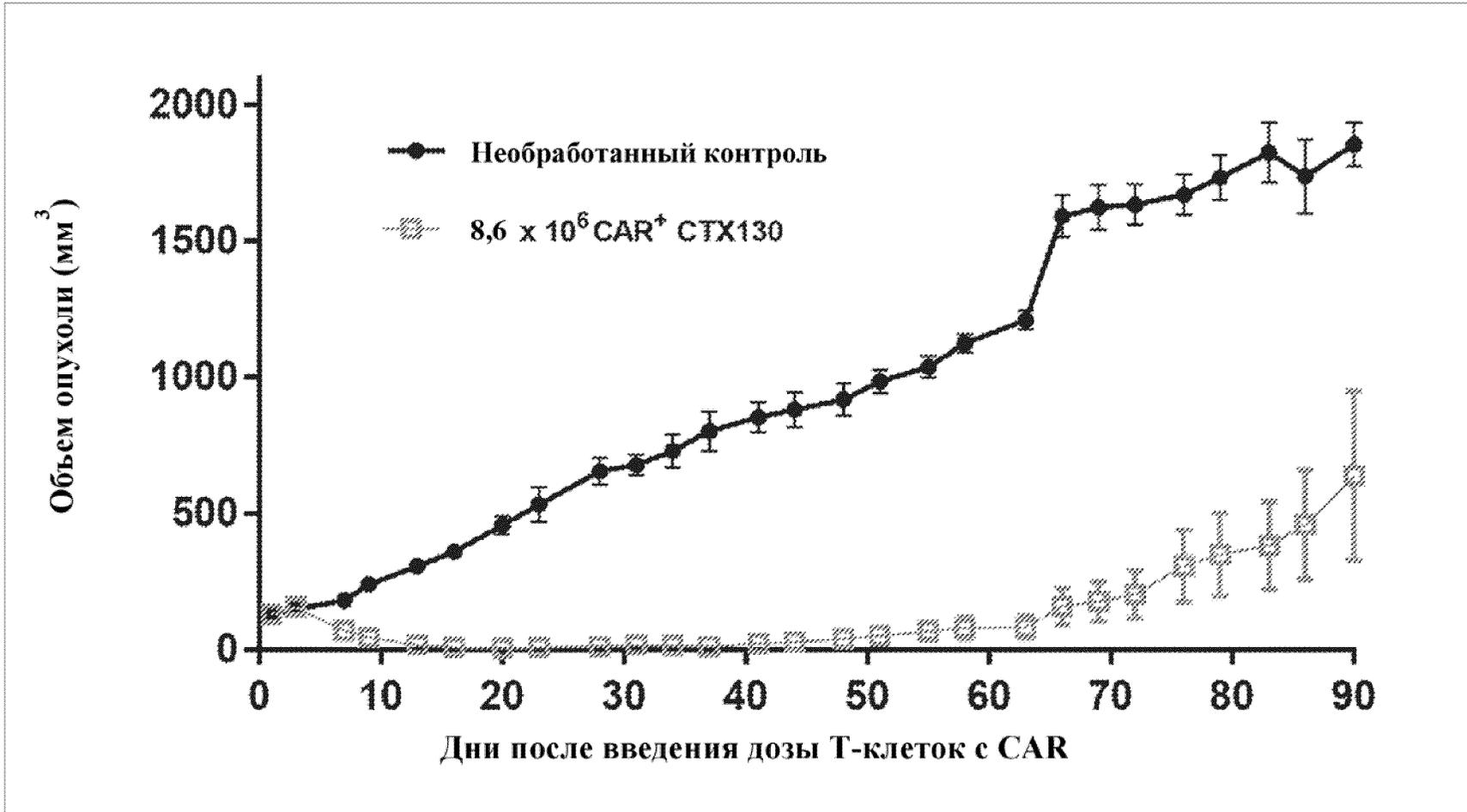
ФИГ. 8G



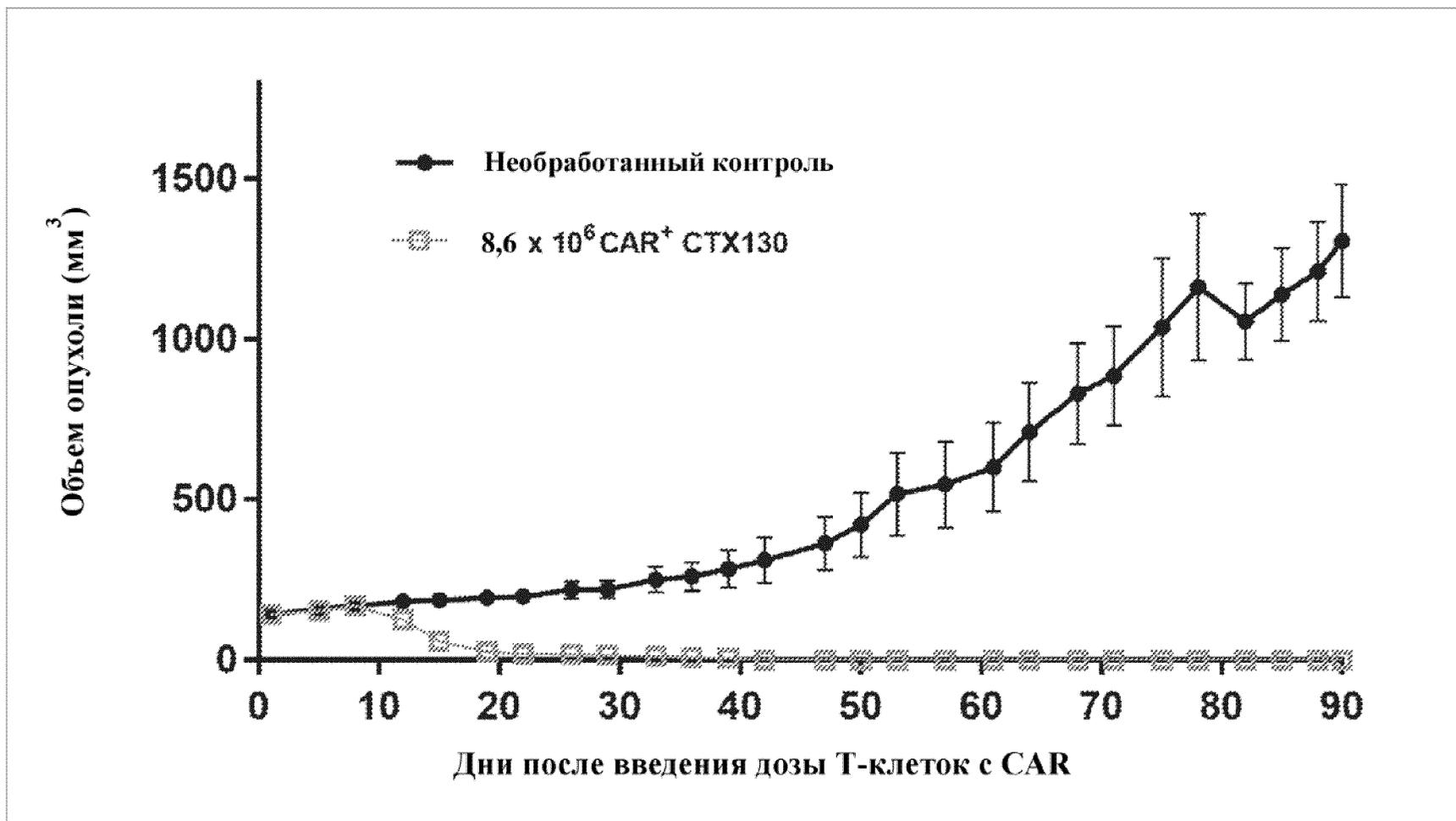
ФИГ. 8H



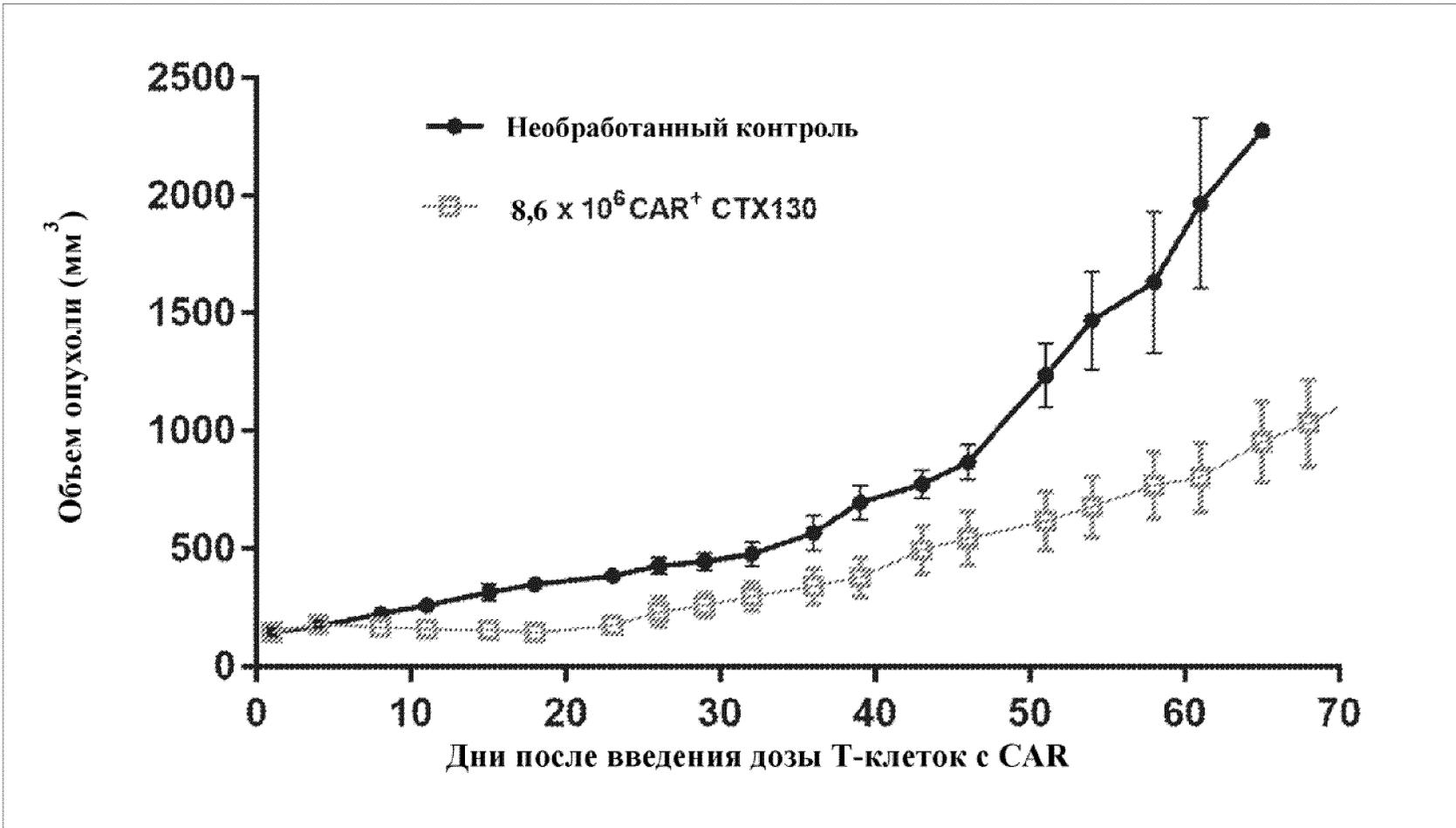
ФИГ. 9А



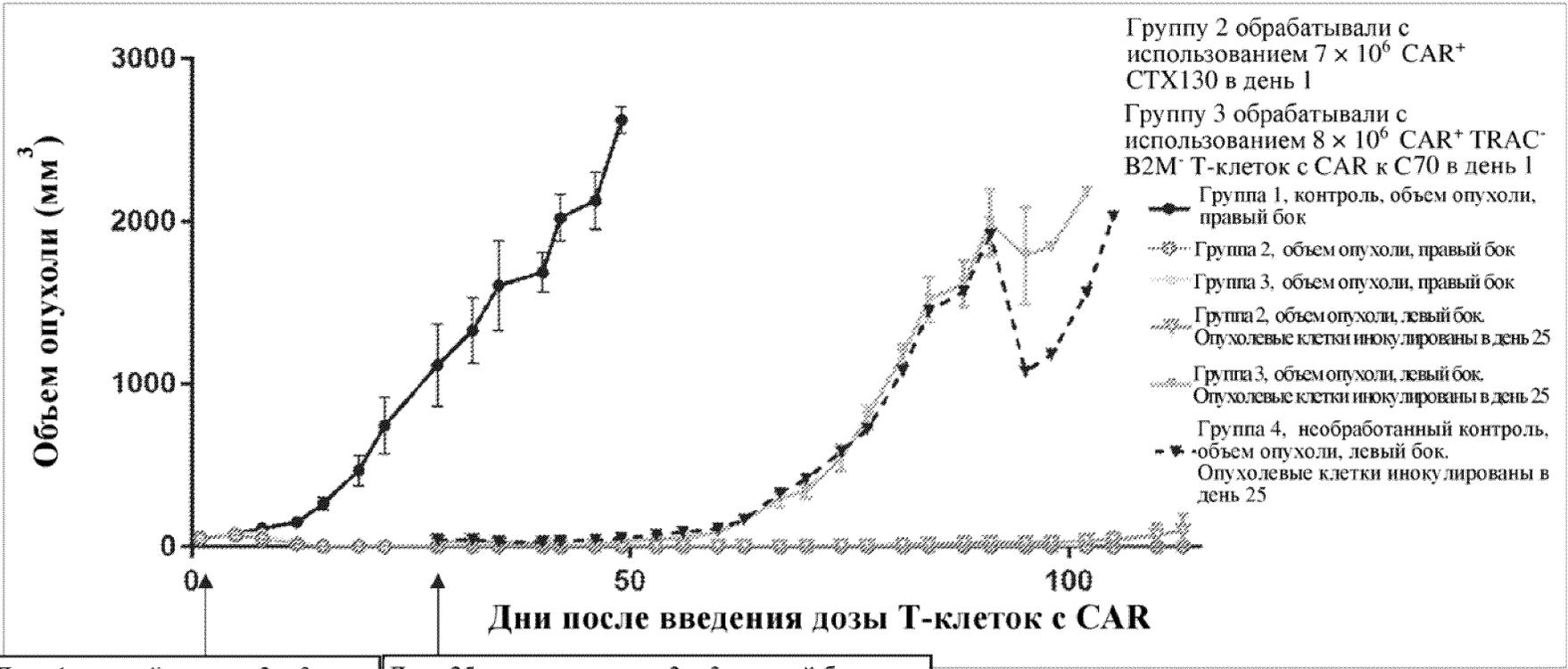
ФИГ. 9В



ФИГ. 9С



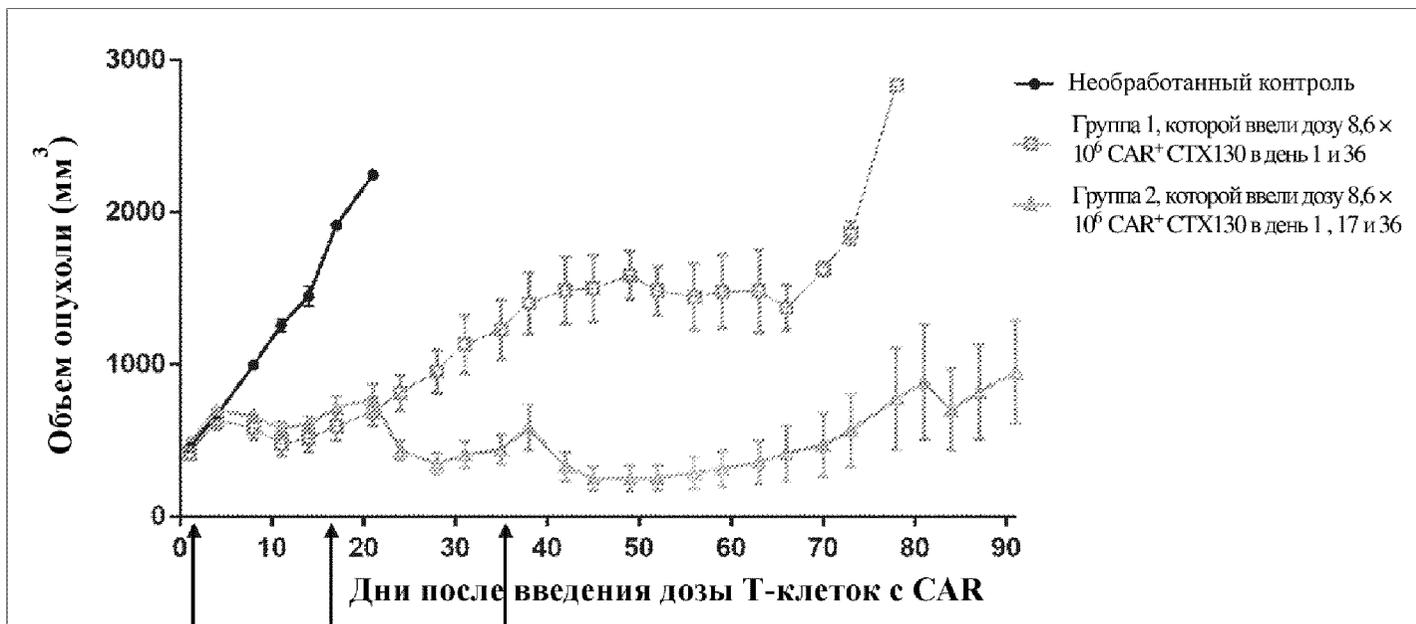
ФИГ. 9D



День 1: мышей группы 2 и 3 с подкожными опухолями размером в среднем 50 mm^3 на их правом боку (незаштрихованные круги и круги серого цвета) обрабатывали с использованием 7×10^6 CAR⁺ STX130 и 8×10^6 CAR⁺ TRAC⁻ B2M⁻ T-клеток с CAR к CD70

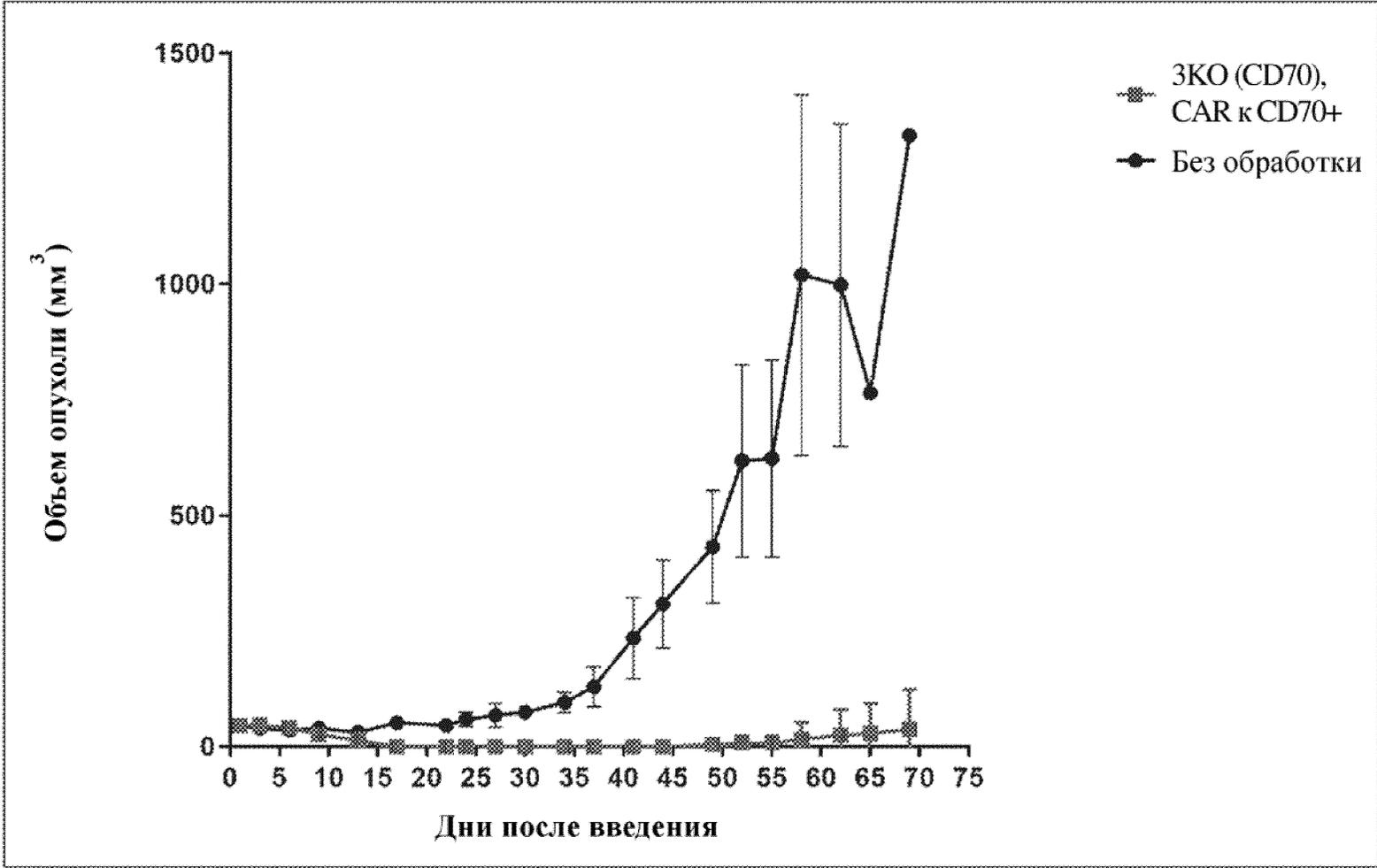
День 25: мышам группы 2 и 3 в левый бок осуществляли подкожную инокуляцию опухолевых клеток (незаштрихованные треугольники и треугольники серого цвета) с противоположной стороны от исходных опухолей на правом боку (незаштрихованные круги и круги серого цвета). Новой контрольной группе 4 осуществляли инокуляцию подобным образом.

ФИГ. 10

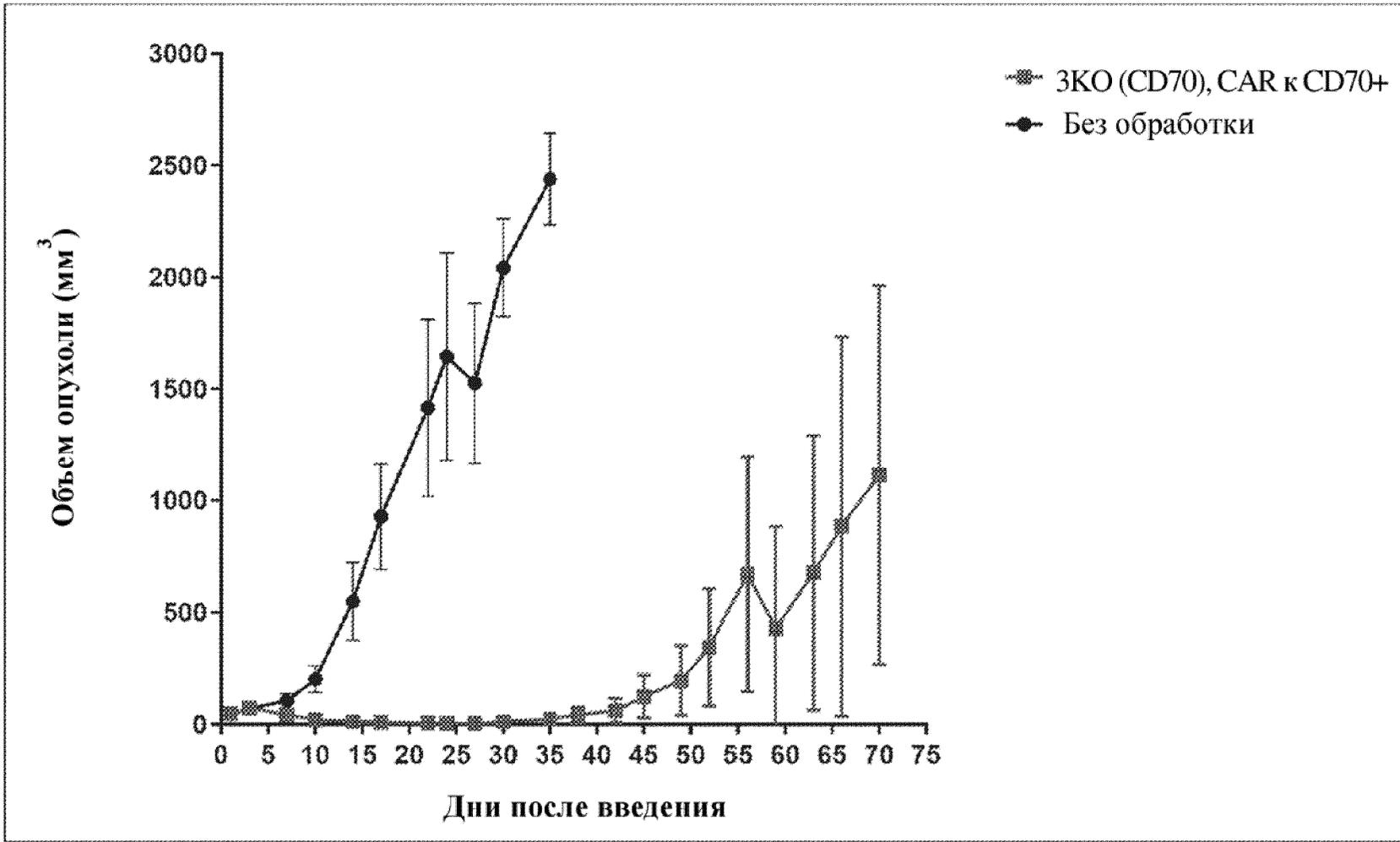


<p>День 1 Мышей группы 1 и 2 с подкожными опухолями размером в среднем 453 мм^3 (незаштрихованные квадраты и треугольники) обрабатывали с использованием $8,6 \times 10^6$ CAR⁺ STX130</p>	<p>День 17 Мышей группы 2 обрабатывали с использованием второй дозы $8,6 \times 10^6$ CAR⁺ STX130</p>	<p>День 36 Мышей группы 2 обрабатывали с использованием третьей дозы $8,6 \times 10^6$ CAR⁺ STX130. Мышей группы 1 обрабатывали с использованием второй дозы $8,6 \times 10^6$ CAR⁺ STX130.</p>
---	---	---

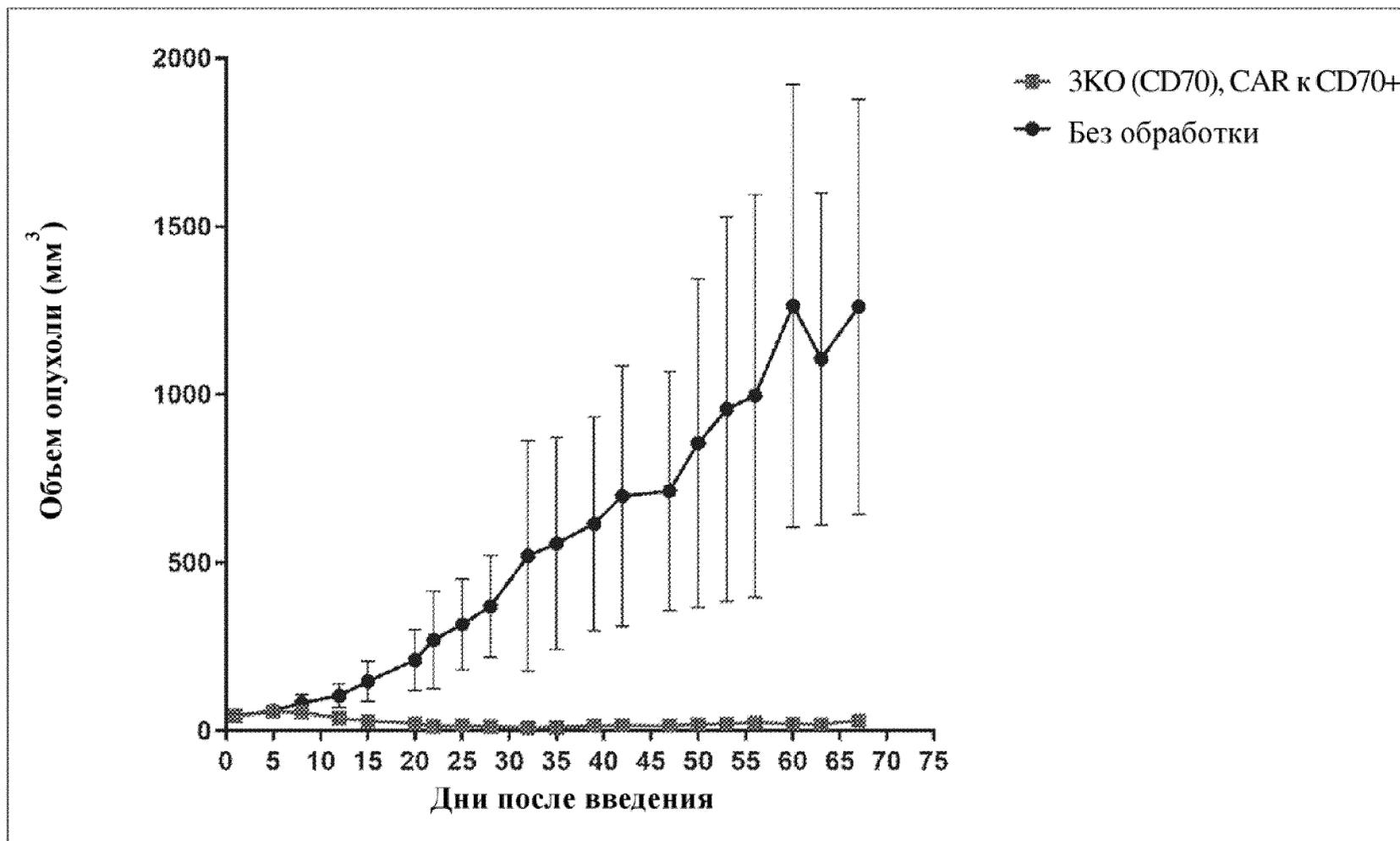
ФИГ. 11



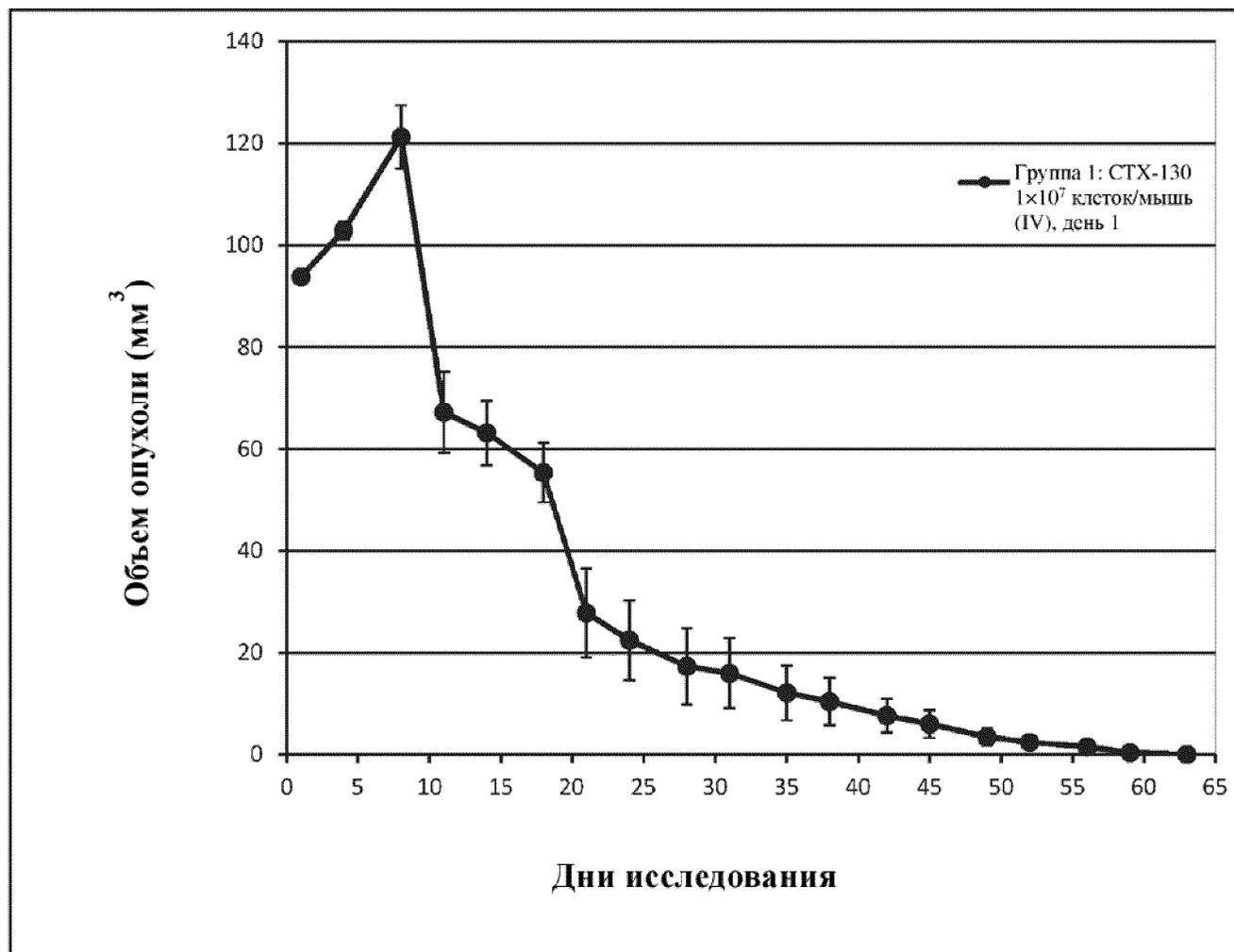
ФИГ. 12А



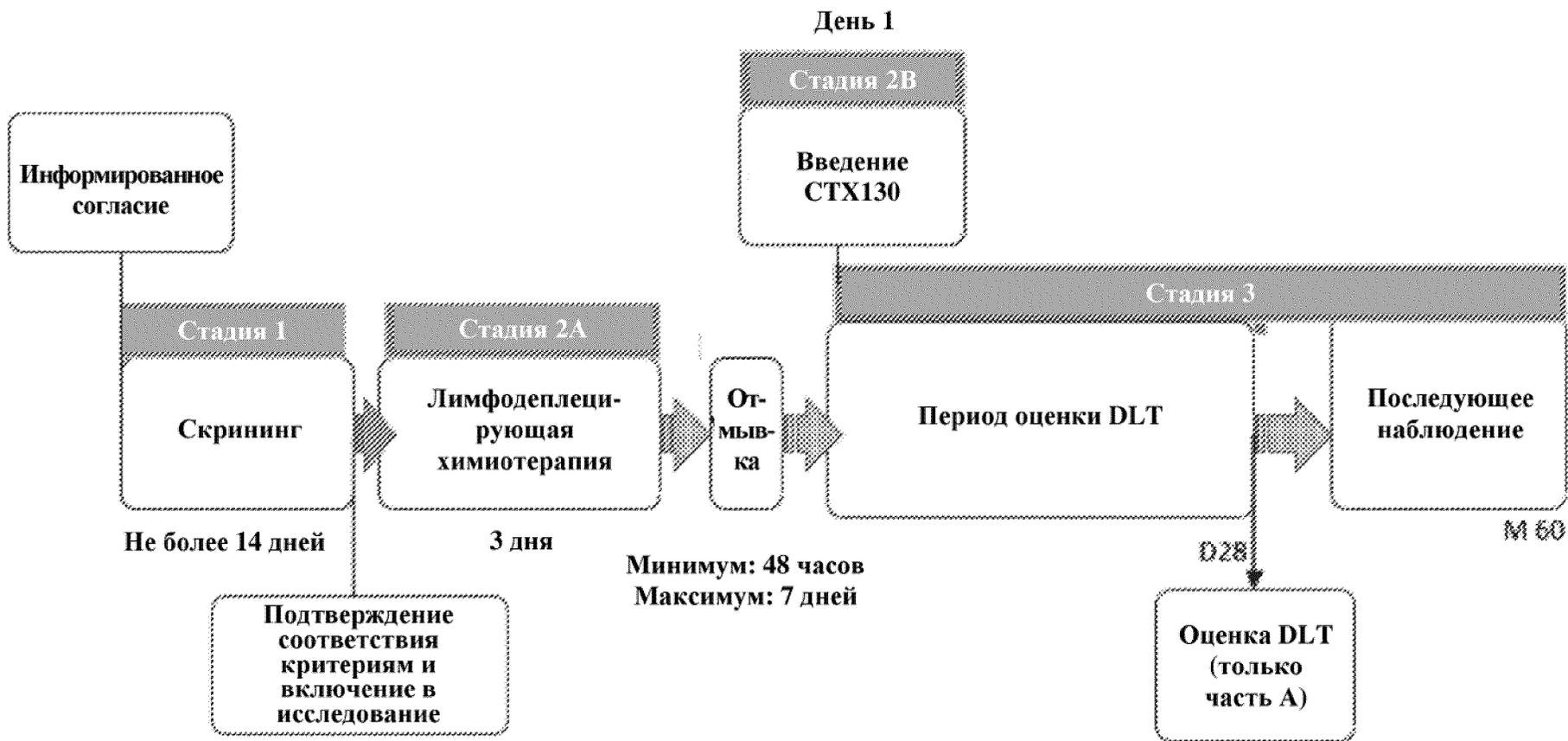
ФИГ. 12В



ФИГ. 12С



ФИГ. 12D



ФИГ. 13