

живление трансплантата наблюдалось у 17 пациентов. Медиана времени до достижения уровня нейтрофилов >500/мкл составила 27 (18-44) дней, тромбоцитов >20000/мкл – 38 (15-219) дней, достижения независимости от гемотрансфузий – 59 (20-540) дней. Двое пациентов погибли до приживления, один пациент – в связи с тяжелым сепсисом *Pseudomonas aeruginosae*, другой – в связи с желудочно-кишечным кровотечением. У одного пациента наблюдалось первичное неприживление трансплантата. Один пациент погиб Д+115 в связи с развитием тромботической микроангиопатии и инфекционных осложнений на фоне терапии циклоспорином А и глюкокортикостероидами по поводу острой РТПХ 3 степени. У 55% пациентов отмечалось развитие тяжелой гипопункции трансплантата (ТГТ).

Снижение дозы руксолитиниба с 15 до 10 мг было выполнено у 8 пациентов. У одного из них ТГТ разрешилась на Д+77, у другого – после отмены руксолитиниба на Д+100. Трем пациентам потребовалось дополнительное введение CD34+ клеток, 3 – инфузия донорских лимфоцитов для лечения ТГФ. Веноокклюзионная болезнь печени легкой степени наблюдалась у 1 пациента, сепсис – 35% (7), инвазивный микоз – у 1 пациента. У 45% больных отмечалась реактивация вирусной инфекции: ЦМВ – 6, ВПГ 1 и 2 типа – 2, ВГ 6 типа – 3, ВК-вирус – 1, парвовирус В19 – 1. У трех пациентов вирусная реактивация сопровождалась геморрагическим циститом. Частота острой РТПХ II-IV составила 25% (5), тяжелой острой РТПХ III-IV степени – 15% (3), хронической РТПХ – 40% (8), средней степени тяжести (NIH) – 20% (4), легкой степени – 20% (4). У всех пациентов, достигших приживления, наблюдался полный донорский химеризм, клиничко-гематологическая, мо-

лекулярная ремиссия. 65% пациентов достигли регресса фиброза в костном мозге в среднем на Д+398 (131-748). Молекулярный и гематологический рецидив зарегистрирован у 1 пациента на Д+665.

Двухлетняя трансплантационная летальность составила 15% (95%CI 4-34%), 2-летняя общая выживаемость – 85% (95%CI 60-93%), 2-летняя бессобытийная выживаемость – 72% (95%CI 45-87%).

При анализе концентрации руксолитиниба была выявлена аккумуляция препарата с Д+7 (медиана 17,7 нг/мл) к Д+14 (медиана 43,8 нг/мл, $p=0.028$) с достижением в дальнейшем стабильной концентрации. Таким образом редукция дозы руксолитиниба с 15 до 10 мг/сут. может быть оправдана с Д+20 с учетом достижения стабильной концентрации. Возможный неблагоприятный эффект руксолитиниба на донорский стволовые клетки нивелировался благодаря перерыву в приеме препарата с Д-1 по Д+4. В связи с этим концентрация руксолитиниба не определялась на Д0 у всех пациентов.

Заключение

Посттрансплантационный циклофосфамид в комбинации с руксолитинибом представляется эффективной терапевтической опцией в качестве профилактики РТПХ и рецидива заболевания у пациентов с миелофиброзом. Снижение дозы руксолитиниба в посттрансплантационном периоде возможно позволит уменьшить частоту тяжелой гипопункции трансплантата.

Ключевые слова

Руксолитиниб, миелофиброз, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Comparative analysis of *in vitro* activity of a CD20-specific CART cells based on the human monoclonal antibody ofatumumab

Tatyana N. Belovezhets

Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Contact: Dr. Tatyana N. Belovezhets

E-mail: ochotanya@gmail.com

Introduction

Despite the armamentarium of highly efficacious therapeutic approaches to treat patients with haematological malignancies, the choice of therapies to help those with relapsing forms of leukemia and lymphoma has been limited. The goal of the present study was to design a novel CD20-specific CAR and perform a side-by-side comparison of its *in vitro* activity with that of the published CD20-specific CARs.

Materials and methods

To this end, we produced lentiviral constructs encoding two reference CARs based on the murine mAbs 1F5 and Leu16, as well as the CAR based on the sequence of a fully human mAb ofatumumab (2F2). In these CARs, structure of the hinge region was additionally varied, and alternative designs encompassing a hinge derived from human IgG or lacking a

spacer altogether were tested. T cells from a healthy donor were isolated, activated, and transduced with the pseudotyped lentiviral particles obtained with the above constructs.

Results

Positive control CAR T cells transduced with a “gold standard” CD19-specific CAR identical to the one used in Kymriah CAR T cell product were also produced (Fig. 1). Next, we asked whether the CAR T cells obtained displayed any differences in cytotoxicity against CD20-positive Raji cells. FACS-based cytotoxicity data shown in Figure 2 indicate that regardless of the CAR design, all CAR T cells were highly active. Nevertheless, this type of analysis merely represents a snapshot of cytotoxic activity at a selected time point (4 hrs), so we proceeded to measure the CAR T cell cytotoxicity in real time by running impedance-based cell prolifer-

ation assays (RTCA, iCelligence). Notably, RTCA platform typically requires that target cells be adherent, so we turned to HEK 293T cells overexpressing CD20 as a model. RTCA data collected over 24 hrs indicate that T cells expressing a hingeless version of the 2F2-based CAR outperform the cells expressing other CAR designs at time points past 4 hr, consistent with the FACS data.

Conclusion

Thus, our second-generation hingeless 2F2-based CAR is a promising candidate for *in vivo* experiments, given its

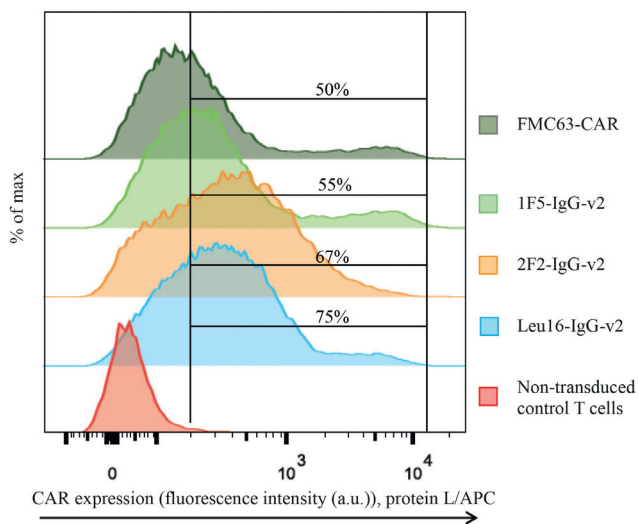


Figure 1. Primary human T cells transduced with the indicated CAR constructs display robust surface expression of the CAR

pronounced CD20-specific *in vitro* activity and the important advantage of a fully human sequence used as the antigen-recognition module.

This study was supported by the RFBR grant № 19-415-543015 p_мол_a.

Keywords

T cells, chimeric antigen receptor, CAR T cell therapy, ofatumumab.

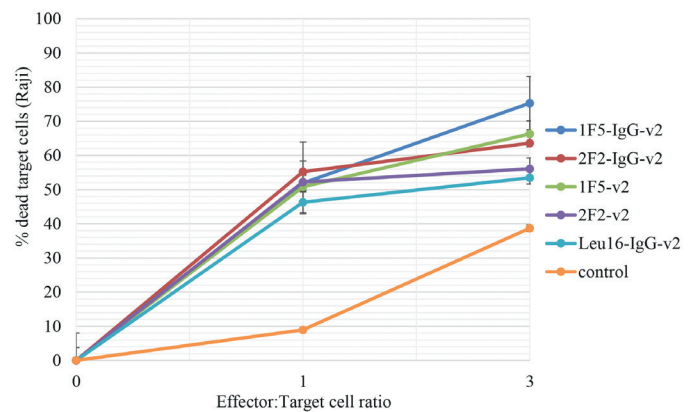


Figure 2. CAR T cells show a significant cytotoxicity against target Raji cells upon 4-hour co-incubation. As negative controls, non-transduced T cells from healthy donors were used

Сравнительный анализ *in vitro* активности Т-клеток с CD20-специфичным химерным антигенным рецептором на основе человеческого антитела офатумумаб

Татьяна Н. Беловежец

Институт молекулярной и клеточной биологии, Сибирское отделение Российской Академии наук, Новосибирск, Россия

Введение

Несмотря на широкий арсенал методов борьбы с онкогематологическими заболеваниями, терапевтический инструментарий для лечения пациентов с рецидивирующими формами лейкозов и лимфом достаточно ограничен, а долговременный прогноз выживаемости негативен. Целью данного исследования было создание и изучение активности нового химерного антигенного рецептора (CAR) со специфичностью к белку CD20 и его сравнение с другими опубликованными CAR аналогичной специфичности в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Были получены лентивирусные конструкции, кодирующие CAR с антиген-распознающими доменами от антител 1F5, Leu16 и высокоафинного человеческого антитела – офатумумаб (2F2) с различной структурой шарнирного района (IgG vs no hinge). Затем, используя

трандукцию первичных Т-клеток здорового донора, были получены Т-клетки, экспрессирующие данные CAR.

Результаты

В качестве «золотого стандарта» был использован CAR с антигенраспознающим районом от CD19-специфичного моноклонального антитела FMC63 (Kymriah). На следующем этапе был исследован уровень специфической цитотоксичности CAR Т-клеток против CD20+ клеток-мишеней линии Raji. Полученные данные свидетельствуют о высокой активности полученных CAR Т-клеток, при этом достоверных отличий между CAR различной структуры обнаружено не было. Тем не менее, такой эксперимент показывает только «моментальную» цитотоксичность, и для того, чтобы исследовать цитотоксичность CAR Т-клеток в динамике, был проведен RTCA-анализ клеточной пролиферации в режиме реального времени. Необходимо отметить, что в классической постановке

данный метод позволяет использовать только прикрепленные клетки-мишени, поэтому вместо клеток линии Raji были использованы клетки линии НЕК 293Т, эктопически экспрессирующие CD20 (НЕК293-CD20). Собранные в течение суток данные RTCA свидетельствуют о том, что Т-клетки, экспрессирующие бесшарнирный CAR состава 2F2-no hinge-v2, проявляют наибольшую цитотоксичность, а во время первых четырех часов разницы между CAR Т-клетками не наблюдается, что соответствует данным FACS-анализа.

Выводы

Таким образом, CAR структуры 2F2-no hinge-v2 является перспективным кандидатом для проведения экспери-

ментов *in vivo*, поскольку он обеспечивает выраженную CD20-специфическую цитотоксическую активность в сочетании с полностью человеческой последовательностью антиген-распознающей области.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 19-415-543015 р_мол_а.

Ключевые слова

Т-клетки, химерные антигенные рецепторы, терапия CAR Т-клетками, офатумумаб.

Safety and efficacy of allogeneic stem cell transplantation after Nivolumab therapy for patients with relapsed/refractory classical Hodgkin lymphoma

Anastasiya V. Beynarovich, Kirill V. Lepik, Nataliya B. Mikhailova, Elena V. Kondakova, Yury R. Zalyalov, Eugeniya S. Borzenkova, Elena V. Babenko, Elena I. Darskaya, Ivan S. Moiseev, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contacts: Dr. Anastasiya V. Beynarovich
E-mail: beynarovichn@gmail.com

Introduction

The programmed-death 1 blockade with nivolumab demonstrated high efficiency in patients with relapsed and refractory Hodgkin lymphoma (rrHL) with acceptable toxicity profile. However, most of patients treated with immune checkpoint inhibitor (CPIs) will eventually progress on these therapies. Allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) is a potentially curative option for patients with rrHL. Therefore, allo-HSCT is a consideration for selected patients with HL after treatment with CPIs. There are concerns that CPIs before allo-HSCT may increase the incidence of graft-versus-host disease, immune-related adverse events, and nonrelapse mortality (NRM). At present, there is no consensus regarding the optimal transplant strategy for patients previously treated with immune checkpoint blockade. The aim of this study was evaluate outcomes in patients with rrHL who received CPIs as a bridge to allo-HSCT.

Patients and methods

We retrospectively evaluated the results of allo-HSCT in 20 patients who had been transplanted after prior PD-1 blockade between 2017 and 2019 at the R. Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation at the First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University (CIC 725). All the patients received a reduced-intensity conditioning regimen (FluBe, fludarabine 30 mg/m², bendamustine 130 mg/m² per day for 3 days), and post-transplant cyclophosphamide-based GvHD prophylaxis (PTCy). Before allo-HSCT, the patients received immune checkpoint inhibitors (CPI) as a single-agent nivolumab, or in combination with brentuximab vedotin, or chemotherapy. The best registered response to PD-1 therapy was a complete response (CR) in 9 patients, partial response in 4 patients. Five patients received transplant during the disease pro-

gression, and 2 patients were transplanted in indetermined response, according to the LYRIC criteria. The patients received a median of 20 (range, 6-32) cycles of a PD-1 inhibitor. The median time from the last dose of anti-PD-1 therapy to HSCT was 83 days (range, 50-350).

Results

At the time of analysis, median follow-up was 14 months (range, 1-26 months). All the patients showed full hematological recovery after allo-HSCT. The one-year overall survival and event-free survival were 95% and 85%, respectively, whereas the one-year cumulative incidences of relapse and non-relapse mortality were 10% and 5%, respectively. Two patients with relapse after allo-HSCT were treated with donor lymphocyte infusion (DLI) in combination with chemotherapy. At the median follow-up of 30 days, all the patients remain alive. 4/20 patients developed grade 2 GvHD, and all responded to steroids. 4/20 patients developed severe, grade 3-4 GvHD, and only one patient responded to steroids. The cumulative incidence of chronic GVHD (cGVHD) was 35%, including 3 patients with severe, steroid-refractory cGVHD. There were no other immune-related adverse events. No cases of sinusoidal obstruction syndrome were observed.

Conclusions

Our study demonstrates that HSCT after PD-1 blockade is feasible and not associated with higher mortality. We suggest that prior PD-1 blockade should not be considered a contraindication to HSCT in patients with relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. The rate of severe acute and chronic GvHD was relatively higher than previously reported for PTCy-based prophylaxis, but was manageable in the majority of cases. The time between anti-PD-1 therapy and allo-HSCT and PTCy is likely to be important in the successful outcome of the transplant.