

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2019133286, 22.03.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
22.03.2017 US 62/474,991;  
24.01.2018 US 62/621,356

(43) Дата публикации заявки: 22.04.2021 Бюл. № 12

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 22.10.2019(86) Заявка РСТ:  
US 2018/023785 (22.03.2018)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2018/175733 (27.09.2018)Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

НОВАРТИС АГ (CH),  
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ  
ОФ ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Автор(ы):

ФРАЙЕТТА, Джозеф, А. (US),  
МИЛЕНХОРСТ, Ян, Дж. (US)A  
2019133286  
RUR U  
2 0 1 9 1 3 3 2 8 6  
A(54) БИОМАРКЕРЫ И СРЕДСТВА ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ Т-КЛЕТОК С CAR С ПОВЫШЕННОЙ  
ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

## (57) Формула изобретения

1. Клетка (например, популяция клеток), например, иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор (CAR),

где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, и

при этом клетка характеризуется измененной экспрессией и/или функцией Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов).

2. Клетка по п. 1, где клетка характеризуется сниженной или устраниной экспрессией и/или функцией Tet2-ассоциированного гена.

3. Клетка по п. 1 или 2, где клетка характеризуется повышенной или активированной экспрессией и/или функцией Tet2-ассоциированного гена.

4. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где клетка характеризуется сниженной или устраниной экспрессией и/или функцией первого Tet2-ассоциированного гена и повышенной или активированной экспрессией и/или функцией второго Tet2-ассоциированного гена.

5. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где клетка дополнительно характеризуется сниженной или устраниной экспрессией и/или функцией Tet2.

6. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где Tet2-ассоциированный ген

предусматривает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5 или все) генов, выбранных из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

7. Клетка по п. 6, где клетка характеризуется сниженной или устраниенной экспрессией и/или функцией одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5 или всех) генов, выбранных из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

8. Клетка по любому из пп. 1-4, где Tet2-ассоциированный ген предусматривает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов, выбранных из таблицы 8.

9. Клетка по п. 8, где клетка характеризуется сниженной или устраниенной экспрессией и/или функцией одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов, выбранных из таблицы 8, колонка В.

10. Клетка по п. 8 или 9, где клетка характеризуется повышенной или активированной экспрессией и/или функцией одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов, выбранных из таблицы 8, колонка А.

11. Клетка по любому из пп. 1-4, где Tet2-ассоциированный ген предусматривает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов, выбранных из таблицы 9, колонка D.

12. Клетка по п. 11, где клетка характеризуется сниженной или устраниенной экспрессией и/или функцией одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов, выбранных из таблицы 9, колонка D.

13. Клетка по п. 11 или 12, где клетка характеризуется повышенной или активированной экспрессией и/или функцией одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов, выбранных из таблицы 9, колонка D.

14. Клетка по любому из пп. 1-4, где Tet2-ассоциированный ген предусматривает один или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов в пути (например, одном или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) путях), выбранных из таблицы 9, колонка А.

15. Клетка по п. 14, где клетка характеризуется сниженной или устраниенной экспрессией и/или функцией одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов, выбранных из таблицы 9, колонка А.

16. Клетка по п. 14 или 15, где клетка характеризуется повышенной или активированной экспрессией и/или функцией одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) генов, выбранных из таблицы 9, колонка А.

17. Клетка по любому из пп. 14-16, где путь выбран из одного или нескольких (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или всех) из

- (1) пути дифференцировки лейкоцитов;
- (2) пути положительной регуляции иммунного процесса;
- (3) пути передачи сигнала трансмембранный рецепторной протеинкиназы;
- (4) пути регуляции морфогенеза анатомических структур;
- (5) пути передачи сигнала TNFA посредством NFKB;
- (6) пути положительной регуляции активности гидролаз;
- (7) пути, связанного с заживлением ран;
- (8) пути активации альфа-бета Т-клеток;
- (9) пути регуляции миграции клеточных компонентов;
- (10) пути воспалительного ответа;
- (11) пути дифференцировки миелоидных клеток;
- (12) пути продуцирования цитокинов;
- (13) пути подавления экспрессии в ответ на УФ-излучение;
- (14) пути отрицательной регуляции процесса в многоклеточном организме;
- (15) пути морфогенеза кровеносных сосудов;

- (16) путем NFAT-зависимой транскрипции;
- (17) путем положительной регуляции процесса апоптоза;
- (18) путем ответа на гипоксию;
- (19) путем повышения экспрессии с помощью передачи сигнала посредством KRAS или
- (20) путем сигнального каскада, опосредованного стресс-активируемой протеинкиназой.
18. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем дифференцировки лейкоцитов, выбраны из таблицы 9, строка 1.
19. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем положительной регуляции иммунного процесса, выбраны из таблицы 9, строка 56.
20. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем передачи сигнала трансмембранный рецепторной протеинкиназы, выбраны из таблицы 9, строка 85.
21. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем регуляции морфогенеза анатомических структур, выбраны из таблицы 9, строка 128.
22. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем передачи сигнала TNFA посредством NFKB, выбраны из таблицы 9, строка 134.
23. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем положительной регуляции активности гидролаз, выбраны из таблицы 9, строка 137.
24. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем, связанным с заживлением ран, выбраны из таблицы 9, строка 141.
25. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем активации альфа-бета Т-клеток, выбраны из таблицы 9, строка 149.
26. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем регуляции миграции клеточных компонентов, выбраны из таблицы 9, строка 180.
27. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем воспалительного ответа, выбраны из таблицы 9, строка 197.
28. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем дифференцировки миелоидных клеток, выбраны из таблицы 9, строка 206.
29. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем продуцирования цитокинов, выбраны из таблицы 9, строка 221.
30. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем подавления экспрессии в ответ на УФ-излучение, выбраны из таблицы 9, строка 233.
31. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем отрицательной регуляции процесса в многоклеточном организме, выбраны из таблицы 9, строка 235.
32. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем морфогенеза кровеносных сосудов, выбраны из таблицы 9, строка 237.
33. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем NFAT-зависимой транскрипции, выбраны из таблицы 9, строка 243.
34. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем положительной регуляции процесса апоптоза, выбраны из таблицы 9, строка 250.
35. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем ответа на гипоксию, выбраны из таблицы 9, строка 256.
36. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем повышения экспрессии с помощью передачи сигнала посредством KRAS, выбраны из таблицы 9, строка 258.
37. Клетка по п. 17, где один или несколько генов, ассоциированных с путем сигнального каскада, опосредованного стресс-активируемой протеинкиназой, выбраны

из таблицы 9, строка 260.

38. Клетка по п. 1 или 2, где Tet2-ассоциированный ген предусматривает ген (например, один или несколько генов), ассоциированный с фенотипом центральных клеток памяти.

39. Клетка по п. 38, где фенотип центральных клеток памяти представляет собой фенотип центральных Т-клеток памяти.

40. Клетка по п. 38 или 39, где фенотип центральных клеток памяти предусматривает более высокий уровень экспрессии CCR7 и/или CD45RO по сравнению с уровнем экспрессии CCR7 и/или CD45RO в необученной клетке (например, необученной Т-клетке).

41. Клетка по любому из пп. 38-40, где фенотип центральных клеток памяти предусматривает более низкий уровень экспрессии CD45RA по сравнению с уровнем экспрессии CD45RA в необученной клетке (например, необученной Т-клетке).

42. Клетка по любому из пп. 38-41, где фенотип центральных клеток памяти предусматривает повышенную антигензависимую пролиферацию клетки.

43. Клетка по любому из пп. 38-42, где фенотип центральных клеток памяти предусматривает сниженный уровень экспрессии IFN- $\gamma$  и/или CD107a, например, если клетка активирована антителом к CD3 или к CD28.

44. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где клетка содержит модулятор (например, ингибитор или активатор) Tet2-ассоциированного гена.

45. Клетка по п. 41, где модулятор (например, ингибитор или активатор) представляет собой (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах Tet2-ассоциированного гена или его регуляторного элемента; (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов указанной системы редактирования генов; или (3) их комбинацию.

46. Клетка по п. 45, где система редактирования генов выбрана из группы, состоящей из системы CRISPR/Cas9, системы на основе нуклеазы с "цинковыми пальцами", системы TALEN и системы на основе мегануклеазы.

47. Клетка по п. 45 или 46, где система редактирования генов связывается с целевой последовательностью в раннем экзоне или интроне Tet2-ассоциированного гена.

48. Клетка по любому из пп. 45-47, где система редактирования генов связывается с целевой последовательностью Tet2-ассоциированного гена, и при этом целевая последовательность находится выше экзона 4, например, в экзоне 1, экзоне 2 или экзоне 3.

49. Клетка по любому из пп. 45-48, где система редактирования генов связывается с целевой последовательностью в позднем экзоне или интроне Tet2-ассоциированного гена.

50. Клетка по любому из пп. 45-49, где система редактирования генов связывается с целевой последовательностью Tet2-ассоциированного гена, и при этом целевая последовательность находится ниже третьего от последнего экзона, например, находится во втором от последнего экзоне, в предпоследнем экзоне или в последнем экзоне.

51. Клетка по любому из пп. 45-50, где система редактирования генов представляет собой систему CRISPR/Cas, содержащую молекулу gRNA, содержащую нацеливающую последовательность, которая гибридизируется с целевой последовательностью Tet2-ассоциированного гена.

52. Клетка по п. 44, где модулятор (например, ингибитор) представляет собой siRNA или shRNA, специфическую в отношении Tet2-ассоциированного гена, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную siRNA или shRNA.

53. Клетка по п. 52, где siRNA или shRNA содержит последовательность, комплементарную последовательности mRNA Tet2-ассоциированного гена.

54. Клетка по п. 44, где модулятор (например, ингибитор или активатор) представляет

R U 2 0 1 9 1 3 3 2 8 6 A

собой малую молекулу.

55. Клетка по п. 44, где модулятор (например, ингибитор или активатор) представляет собой белок.

56. Клетка по п. 55, где модулятор (например, ингибитор) представляет собой доминантно-негативного партнера по связыванию белка, кодируемого Tet2-ассоциированным геном, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанного доминантно-негативного партнера по связыванию.

57. Клетка по п. 55, где модулятор (например, ингибитор) представляет собой доминантно-негативный (например, каталитически неактивный) вариант белка, кодируемого Tet2-ассоциированным геном, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный доминантно-негативный вариант.

58. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где клетка содержит ингибитор первого Tet2-ассоциированного гена и активатор второго Tet2-ассоциированного гена.

59. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где клетка дополнительно содержит ингибитор Tet2.

60. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где антигенсвязывающий домен связывается с опухолевым антигеном, выбранным из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легуманина, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы, представляющей собой теломеразу человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5 и IGLL1.

61. Клетка по п. 60, где опухолевый антиген представляет собой CD19.

62. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где антигенсвязывающий домен представляет собой антитело или фрагмент антитела, описанные, например, в WO 2012/079000 или WO 2014/153270.

63. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где трансмембранный домен содержит: аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 12, или последовательность, на 95-99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 12; или последовательность под SEQ ID NO: 12.

64. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где антигенсвязывающий домен присоединен к трансмембранному домену посредством шарнирной области, где указанная шарнирная область содержит SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6 или последовательность, на 95-99% идентичную им.

65. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где внутриклеточный сигнальный

R U 2 0 1 9 1 3 3 2 8 6 A

R  
U  
2  
0  
1  
9  
1  
3  
3  
2  
8  
6  
A

домен содержит первичный сигнальный домен и/или костимулирующий сигнальный домен, при этом первичный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из CD3-дзета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, общей гамма-цепи FcR (FCER1G), FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD79a, CD79b, Fc-гамма RIa, DAP10 или DAP12.

66. Клетка по п. 65, где первичный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20, или последовательность, на 95-99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20; или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

67. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен или первичный сигнальный домен и костимулирующий сигнальный домен, где костимулирующий сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антигена 1, ассоциированного с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, и NKG2D.

68. Клетка по п. 67, где костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16, или последовательность, на 95-99% идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16.

69. Клетка по п. 67 или 68, где костимулирующий сигнальный домен содержит последовательность под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16.

70. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16 и последовательность под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20, при этом последовательности, образующие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в одной и той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи.

71. Клетка по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая лидерную последовательность, предусматривающую последовательность под SEQ ID NO: 2.

72. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку (например, популяцию иммунных эффекторных клеток).

73. Клетка по п. 72, где иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку или NK-клетку.

74. Клетка по п. 72 или 73, где иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

75. Клетка по п. 73 или 74, где Т-клетка представляет собой CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или их комбинацию.

76. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где клетка представляет собой клетку человека.

77. Клетка по любому из предыдущих пунктов, где клетка содержит ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

78. Клетка по п. 77, где ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1 представляет собой (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах гена IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1 или его регуляторного элемента; (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов указанной системы редактирования генов; или (3) их комбинацию.

79. Клетка по п. 78, где система редактирования генов выбрана из группы, состоящей из системы CRISPR/Cas9, системы на основе нуклеазы с "цинковыми пальцами", системы TALEN и системы на основе мегануклеазы.

80. Клетка по п. 78 или 79, где система редактирования генов связывается с целевой последовательностью в раннем экзоне или инtronе гена IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

81. Клетка по любому из пп. 78-80, где система редактирования генов связывается с целевой последовательностью гена IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1, и при этом целевая последовательность находится выше экзона 4, например, в экзоне 1, экзоне 2 или экзоне 3, например, в экзоне 3.

82. Клетка по любому из пп. 78-81, где система редактирования генов связывается с целевой последовательностью в позднем экзоне или инtronе гена IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

83. Клетка по любому из пп. 78-82, где система редактирования генов связывается с целевой последовательностью гена IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1, и при этом целевая последовательность находится ниже третьего от последнего экзона, например, находится во втором от последнего экзоне, в предпоследнем экзоне или в последнем экзоне.

84. Клетка по любому из пп. 78-83, где система редактирования генов представляет собой систему CRISPR/Cas, содержащую молекулу gRNA, содержащую нацеливающую последовательность, которая гибридизируется с целевой последовательностью гена IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

85. Клетка по п. 84, где ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1 представляет собой siRNA или shRNA, специфическую в отношении IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную siRNA или shRNA.

86. Клетка по п. 85, где siRNA или shRNA содержит последовательность, комплементарную последовательности mRNA IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

87. Клетка по п. 77, где ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1 представляет собой малую молекулу.

88. Клетка по п. 77, где ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1 представляет собой белок, например, представляет собой доминантно-негативного партнера по связыванию белка, кодируемого геном IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанного доминантно-негативного партнера по связыванию.

89. Клетка по п. 77, где ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1 представляет собой белок, например, представляет собой доминантно-негативный (например, каталитически неактивный) вариант белка, кодируемого геном IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный доминантно-негативный вариант.

90. Способ повышения терапевтической эффективности CAR-экспрессирующей клетки, например, клетки по любому из предыдущих пунктов, например, CAR19-

R U 2 0 1 9 1 3 3 2 8 6 A

экспрессиющей клетки (например, CTL019 или CTL119), предусматривающий стадию обеспечения изменения (например, снижения или повышения) экспрессии и/или функции Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов) в указанной клетке, где Tet2-ассоциированный ген выбран из одного или нескольких (например, 2, 3, 4 или всех) из

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;
- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка А; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

91. Способ по п. 90, предусматривающий обеспечение изменения (например, снижения) экспрессии и/или функции одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

92. Способ по п. 90 или 91, дополнительно предусматривающий обеспечение изменения (например, снижения) экспрессии и/или функции Tet2.

93. Способ повышения терапевтической эффективности CAR-экспрессиющей клетки, например, клетки по любому из предыдущих пунктов, например, CAR19-экспрессиющей клетки (например, CTL019 или CTL119), предусматривающий стадию приведения указанной клетки в контакт с модулятором (например, ингибитором или активатором) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов), выбранного из (например, 2, 3, 4 или всех из)

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;
- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка А; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

94. Способ по п. 93, где указанная стадия предусматривает приведение указанных клеток в контакт с ингибитором IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

95. Способ по п. 93 или 94, где ингибитор выбран из группы, состоящей из (1) системы редактирования генов, нацеливающейся на один или несколько сайтов в пределах Tet2-ассоциированного гена или его регуляторного элемента; (2) нукleinовой кислоты (например, siRNA или shRNA), которая ингибирует экспрессию Tet2-ассоциированного гена; (3) белка (например, доминантно-негативного, например, каталитически неактивного), кодируемого Tet2-ассоциированным геном, или партнера по связыванию белка, кодируемого Tet2-ассоциированным геном; (4) малой молекулы, которая ингибирует экспрессию и/или функцию Tet2-ассоциированного гена; (5) нукleinовой кислоты, кодирующей что-либо из (1) - (3); и (6) любой комбинации (1) - (5).

96. Способ по любому из пп. 93-95, дополнительно предусматривающий приведение указанной клетки в контакт с ингибитором Tet2.

97. Способ по любому из пп. 93-96, где указанное приведение в контакт осуществляют *ex vivo*.

98. Способ по любому из пп. 93-97, где приведение в контакт осуществляют *in vivo*.

99. Способ по п. 98, где приведение в контакт осуществляют *in vivo* до доставки нукleinовой кислоты, кодирующей CAR, в клетку.

100. Способ по п. 98, где приведение в контакт осуществляют *in vivo* после того, как клетки были введены субъекту, нуждающемуся в этом.

R  
U  
2  
0  
1  
9  
1  
3  
3  
2  
8  
6  
A

101. Способ лечения рака у субъекта, при этом способ предусматривает введение указанному субъекту эффективного количества клетки по любому из пп. 1-89.

102. Способ по п. 101, дополнительно предусматривающий введение указанному субъекту модулятора (например, ингибитора или активатора) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов), выбранного из одного или нескольких (например, 2, 3, 4 или всех) из

(i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;

(ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;

(iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;

(iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка А; или

(v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

103. Способ по п. 101 или 102, дополнительно предусматривающий введение указанному субъекту ингибитора IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

104. Способ по любому из пп. 101-103, дополнительно предусматривающий введение указанному субъекту ингибитора Tet2.

105. Клетка для применения в способе лечения субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение указанному субъекту эффективного количества клетки по любому из пп. 1-89.

106. Клетка для применения по п. 105, где способ дополнительно предусматривает введение указанному субъекту модулятора (например, ингибитора или активатора) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов), выбранного из (например, 2, 3, 4 или всех из)

(i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;

(ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;

(iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;

(iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка А; или

(v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

107. Клетка для применения по п. 105 или 106, где способ дополнительно предусматривает введение указанному субъекту ингибитора IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

108. Клетка для применения по любому из пп. 105-107, где способ дополнительно предусматривает введение указанному субъекту ингибитора Tet2.

109. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения в способе лечения субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ предусматривает введение указанному субъекту средства терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки и модулятора (например, ингибитора или активатора) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов), выбранного из (например, 2, 3, 4 или всех из)

(i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;

(ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;

(iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;

(iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка А; или

(v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

110. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по

п. 109, где модулятор представляет собой ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

111. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по п. 109 или 110, где способ дополнительно предусматривает введение указанному субъекту ингибитора Tet2.

112. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по любому из пп. 109-111, где субъект получает предварительное лечение с помощью модулятора (например, ингибитора) до начала применения средства терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки.

113. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по любому из пп. 109-112, где субъект получает одновременное лечение с помощью модулятора (например, ингибитора) и средства терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки.

114. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по любому из пп. 109-113, где субъект получает лечение с помощью модулятора (например, ингибитора) после применения средства терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки.

115. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по любому из пп. 109-114, где у субъекта имеется заболевание, ассоциированное с экспрессией опухолевого антигена, например, пролиферативное заболевание, предраковое состояние, рак и не связанное с раком показание, ассоциированное с экспрессией опухолевого антигена.

116. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по п. 115, где рак представляет собой гематологический рак или солидную опухоль.

117. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по п. 115 или 116, где рак представляет собой гематологический рак, выбранный из одного или нескольких из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острых форм лейкоза, острого лимфоидного лейкоза (ALL), В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (В-ALL), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (T-ALL), хронического миелоидного лейкоза (CML), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, бластической неоплазии из плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лейкоза ворсистых клеток, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, лимфомы MALT, лимфомы из клеток мантийной зоны, лимфомы маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодистрофического синдрома, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, плазмобластной лимфомы, неоплазии из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема или предлейкоза.

118. Средство терапии на основе CAR-экспрессирующей клетки для применения по п. 115 или 116, где рак выбран из группы, состоящей из рака толстой кишки, рака прямой кишки, почечно-клеточной карциномы, рака печени, немелкоклеточной карциномы легкого, рака тонкого кишечника, рака пищевода, меланомы, рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рака яичника, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичка, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака парашитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, солидных опухолей детского возраста, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника,

карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, ангиогенеза опухоли, опухоли спинного мозга, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, форм рака, вызванных влиянием окружающей среды, комбинаций указанных форм рака и метастатических поражений при указанных формах рака.

119. Способ лечения субъекта, при этом способ предуспматривает введение указанному субъекту модулятора (например, ингибитора или активатора) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов), выбранного из (например, 2, 3, 4 или всех из)

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;
- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка A; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти,

при этом указанный субъект получил, получает или будет получать средство терапии, содержащее CAR-экспрессирующую клетку.

120. Способ по п. 119, где модулятор представляет собой ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

121. Способ по п. 119 или 120, дополнительно предусматривающий введение указанному субъекту ингибитора Tet2.

122. Модулятор (например, ингибитор или активатор) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов) для применения в лечении субъекта,

где Tet2-ассоциированный ген выбран из (например, 2, 3, 4 или всех из)

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;
- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка A; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти, и

при этом указанный субъект получил, получает или будет получать средство терапии, содержащее CAR-экспрессирующую клетку.

123. Модулятор для применения по п. 122, где модулятор представляет собой ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

124. Модулятор для применения по п. 122 или 123, где субъект получил, получает или будет получать ингибитор Tet2.

125. Способ получения CAR-экспрессирующей клетки, предусматривающий введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в клетку таким образом, чтобы указанная нуклеиновая кислота (или ее часть, кодирующая CAR) интегрировалась в геном клетки в пределах Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов) (например, в пределах интрона или экзона Tet2-ассоциированного гена), вследствие чего обеспечивается изменение (например, снижение или устранение) экспрессии и/или функции Tet2-ассоциированных генов,

где Tet2-ассоциированный ген выбран из (например, 2, 3, 4 или всех из)

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;

- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка A; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

126. Способ по п. 125, где Tet2-ассоциированный ген выбран из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

127. Способ получения CAR-экспрессиющей клетки, предусматривающий приведение указанной CAR-экспрессиющей клетки *ex vivo* в контакт с модулятором (например, ингибитором или активатором) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов), выбранного из (например, 2, 3, 4 или всех из)

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;
- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка A; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

128. Способ по п. 127, где Tet2-ассоциированный ген выбран из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

129. Вектор, содержащий последовательность, кодирующую CAR, и последовательность, кодирующую модулятор (например, ингибитор или активатор) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов), выбранного из (например, 2, 3, 4 или всех из)

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;
- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка A; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

130. Вектор по п. 129, где модулятор (например, ингибитор) представляет собой (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах гена или его регуляторного элемента; (2) нуклеиновую кислоту (например, siRNA или shRNA), которая ингибирует экспрессию Tet2-ассоциированного гена; (3) белок (например, доминантно-негативный, например, каталитически неактивный), кодируемый Tet2-ассоциированным геном, или партнера по связыванию белка, кодируемого Tet2-ассоциированным геном; и (4) нуклеиновую кислоту, кодирующую что-либо из (1)-(3), или их комбинации.

131. Вектор по п. 129 или 130, где модулятор представляет собой ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

132. Вектор по любому из пп. 129-131, где последовательность, кодирующая CAR, и последовательность, кодирующая ингибитор, разделены сайтом 2A.

133. Система редактирования генов, которая является специфической в отношении последовательности Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов) или его регуляторного элемента, где Tet2-ассоциированный ген выбран из (например, 2, 3, 4 или всех из)

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;

R  
U  
2  
0  
1  
9  
1  
3  
3  
2  
8  
6  
A

- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка A; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

134. Система редактирования генов по п. 133, где система редактирования генов является специфической в отношении последовательности гена IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

135. Система редактирования генов по п. 133 или 134, где система редактирования генов представляет собой систему редактирования генов CRISPR/Cas, систему на основе нуклеазы с "цинковыми пальцами", систему TALEN или систему на основе мегануклеазы.

136. Система редактирования генов по любому из пп. 133-135, где система редактирования генов представляет собой систему редактирования генов CRISPR/Cas.

137. Система редактирования генов по п. 136, содержащая:  
молекулу gRNA, содержащую нацеливающую последовательность, специфическую в отношении последовательности Tet2-ассоциированного гена или его регуляторного элемента, и белок Cas9;

молекулу gRNA, содержащую нацеливающую последовательность, специфическую в отношении последовательности Tet2-ассоциированного гена или его регуляторного элемента, и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas9;

нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу gRNA, содержащую нацеливающую последовательность, специфическую в отношении последовательности Tet2-ассоциированного гена или его регуляторного элемента, и белок Cas9; или

нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу gRNA, содержащую нацеливающую последовательность, специфическую в отношении последовательности Tet2-ассоциированного гена или его регуляторного элемента, и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas9.

138. Система редактирования генов по любому из пп. 133-137, дополнительно содержащая ДНК-матрицу.

139. Система редактирования генов по п. 138, где ДНК-матрица содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, например, CAR, описанный в данном документе.

140. Композиция для получения *ex vivo* CAR-экспрессирующей клетки, содержащей модулятор (например, ингибитор или активатор) Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов), выбранного из (например, 2, 3, 4 или всех из)

- (i) одного или нескольких из IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1;
- (ii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 8;
- (iii) одного или нескольких генов, перечисленных в таблице 9, колонка D;
- (iv) одного или нескольких генов, ассоциированных с одним или несколькими путями, перечисленными в таблице 9, колонка A; или
- (v) одного или нескольких генов, ассоциированных с фенотипом центральных клеток памяти.

141. Композиция по п. 140, где модулятор представляет собой ингибитор IFNG, NOTCH2, CD28, ICOS, IL2RA или PRDM1.

142. Композиция по п. 140 или 141, где модулятор (например, ингибитор) представляет собой (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах Tet2-ассоциированного гена или его регуляторного элемента; (2) нуклеиновую кислоту (например, siRNA или shRNA), которая ингибирует экспрессию Tet2-ассоциированного гена; (3) белок (например, доминантно-негативный, например,

катализитически неактивный), кодируемый геном, или партнера по связыванию белка, кодируемого Tet2-ассоциированным геном; или (4) нуклеиновую кислоту, кодирующую что-либо из (1)-(3), или их комбинации.

143. Композиция по п. 142, дополнительно содержащая ингибитор Tet2.

144. Популяция клеток, содержащая одну или несколько клеток по любому из пп. 1-89, где популяция клеток содержит более высокую (например, в по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз выше) процентную долю Tscm-клеток (например, CD45RA+ CD62L+CCR7+ (необязательно CD27+CD95+) Т-клеток), чем популяция клеток, которая не содержит одной или нескольких клеток, в которых экспрессия и/или функция Tet2-ассоциированного гена (например, одного или нескольких Tet2-ассоциированных генов) в указанной клетке была снижена или устранена.

145. Популяция клеток, содержащая одну или несколько клеток по любому из пп. 1-89, где по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) популяции клеток характеризуются фенотипом центральных Т-клеток памяти.

146. Популяция клеток по п. 145, где фенотип центральных клеток памяти представляет собой фенотип центральных Т-клеток памяти.

147. Популяция клеток по п. 145 или 146, где по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) популяции клеток экспрессируют CD45RO и/или CCR7.