



УКРАЇНА

(19) **UA**
(51) МПК(11) **128783**(13) **C2****A61K 31/7004** (2006.01)**A61K 31/7024** (2006.01)**A61K 35/17** (2015.01)**A61P 35/02** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2019 12290**
(22) Дата подання заявки: **05.06.2018**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **24.10.2024**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/516,536**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **07.06.2017**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.05.2020, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **23.10.2024, Бюл.№ 43**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2018/036067, 05.06.2018**

(72) Винахідник(и):
**Окілі Ніколь (US),
Філд Джессіка (US),
Гардай Шира (US),
Гейзер Райан (US)**
(73) Володілець (володільці):
**СІДЖЕН ІНК.,
21823 30th Drive, S.E., Bothell, Washington
98021, United States of America (US)**
(74) Представник:
**Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.
№367**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
**JESSICA J FIELD ET AL. Abstract 4005:
Understanding the mechanism of 2FF-induced
immune modulation. Cancer Research.
15.07.2016. P. 4005-4005
STEPHEN C ALLEY ET AL. Abstract DDT02-
02: SGN-2FF: A novel small molecule inhibitor
of fucosylation with preclinical antitumor
activity through multiple immune mechanisms.
PROCEEDINGS: AACR ANNUAL MEETING.
01.04.2017. P.1-2
KARLO PERICA ET AL. Adoptive T Cell
Immunotherapy For Cancer. RAMBAM
MAIMONIDES MEDICAL JOURNAL.
29.01.2015. - Vol. 6. - No. 1. P. e0004
WO 2012/019165 A2, 09.02.2012**

(54) Т-КЛІТИНИ ЗІ ЗНИЖЕНИМ ПОВЕРХНЕВИМ ФУКОЗИЛУВАННЯМ І СПОСОБИ ЇХ ОТРИМАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу надання адоптивної клітинної терапії, що включає введення суміші, яка включає Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилуванням.

UA 128783 C2

ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка вимагає пріоритет відповідно із §119 (е) 35 U.S.C. попередньої заявки на патент США 62/516,536, поданої 7 червня 2017 року, яка повністю включена в цей документ за допомогою посилання у всіх відношеннях.

ЗАЯВА ВІДНОСНО ПРАВ НА ВІНАХОДИ, ЯКІ ЗРОБЛЕНІ В РЕЗУЛЬТАТІ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ, ЩО ФЕДЕРАЛЬНО ФІНАНСУЮТЬСЯ

НЕ ЗАСТОСОВНО

ПОСИЛАННЯ НА "СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ", ТАБЛИЦЮ АБО КОМП'ЮТЕРНУ ПРОГРАМУ ЗІ СПИСОКОМ ЯК ДОДАТКА, ПРЕДСТАВЛЕНУ НА КОМПАКТ-ДИСКУ

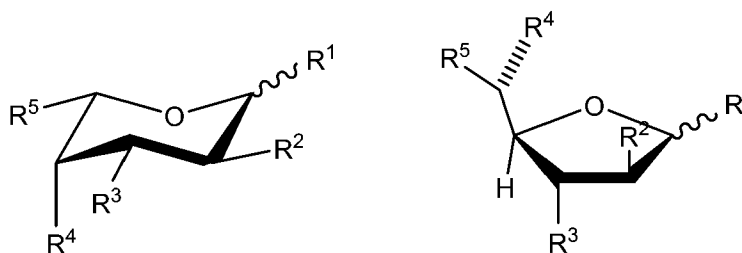
НЕ ЗАСТОСОВНО

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

При лікуванні раку застосовують три основних методи: хірургія, хіміотерапія і променева терапія. Крім того, імунотерапія стала відносно новим і поки ще експериментальним підходом, який потенційно може застосовуватися окремо або в комбінації з будь-якими існуючими методами при лікуванні раку. Одним з методів лікування в рамках імунотерапії раку є адоптивна клітинна терапія із застосуванням пухлиноспецифічних Т-клітин. Для проведення адаптивної клітинної терапії необхідні покращені стратегії, наприклад, для отримання Т-клітин, специфічних відносно цільового захворювання, наприклад визначеного типу раку, який треба лікувати у пацієнта, уникаючи при цьому нецільового впливу на непатогенні тканини.

СУТЬ ВІНАХОДУ

У одному аспекті запропоновані способи отримання Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання. У деяких аспектах способи включають культивування Т-клітин в присутності аналога фукози в середовищі для культивування клітин; де аналог фукози має формулу (I) або (II):



(I)

(II)

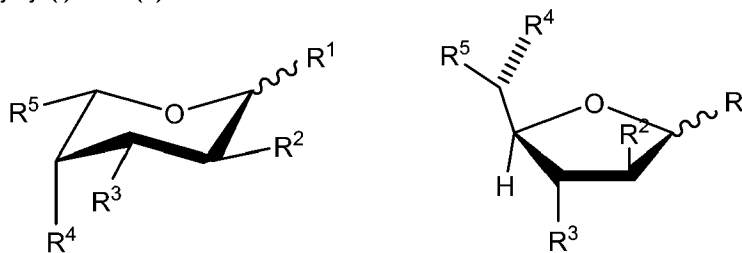
або являє собою відповідну фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою;

R^2 є галогеном; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃, або

кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -C≡CH; і

де Т-клітини мають знижене поверхнєве фукозилювання в порівнянні з Т-клітинами, що культивуються при відсутності аналога фукози.

У іншому аспекті запропоновані способи отримання Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання. У деяких аспектах способи включають введення аналога фукози тварині і отримання Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання від тварини; де аналог фукози має формулу (I) або (II):



(I)

(II)

або являє собою відповідну фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою;

R^2 є галогеном; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃, або

кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -C≡CH; і

де Т-клітини, отримані у тварини, мають знижене поверхнєве фукозилювання у порівнянні з Т-клітинами, присутніми або отриманими у контрольної тварини, якій не вводили вказаний аналог фукози.

У іншому аспекті запропоновані способи застосування адаптивної клітинної терапії у суб'єкта. У деяких аспектах способи включають введення суміші, що містить Т-клітини зі зниженим поверхнєвим фукозилюванням суб'єкту, що потребує клітинної терапії.

У іншому аспекті запропоновані способи лікування раку. У деяких аспектах способи включають введення суміші, що містить Т-клітини зі зниженим поверхнєвим фукозилюванням, суб'єкту, що потребує лікування раку.

У іншому аспекті запропоновані способи лікування раку. У деяких аспектах спосіб включає введення суміші, що містить Т-клітини зі зниженим поверхнєвим фукозилюванням, суб'єкту, що потребує лікування раку, де Т-клітини зі зниженим поверхнєвим фукозилюванням отримані згідно з будь-яким зі способів отримання таких Т-клітин.

Ці і інші аспекти, запропоновані в цьому документі, можуть бути в більш повній мірі зрозумілі при зверненні до наведеного докладного опису, необмежуваним прикладам певних варіантів здійснення і прикладеним фігурам.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

На ФІГ. 1 показаний графік, що демонструє вплив *in vivo* адаптивного перенесення спленоцитів від мишей-донорів, вакцинованих Fab KLH-A20 Id, які отримували або не отримували 2FF, на ріст в/в імплантованих клітин мишачої лімфоми A20 у інтактних мишей BALB/c.

На ФІГ. 2 показаний графік, що демонструє вплив *in vivo* 2FF на ріст п/шк імплантованих клітин мишачої лімфоми A20 у інтактних мишей BALB/c, яких використали для отримання виділених Cd3⁺ Т-клітин.

На ФІГ. 3 показаний графік, що демонструє знижене поверхнєве фукозилювання CD3⁺ Т-клітин, виділених у мишей-носіїв пухлини A20, що отримували 20 mM 2FF, як визначали за допомогою поверхнєвого фарбування LCA.

На ФІГ. 4 показаний графік, що демонструє знижене поверхнєве фукозилювання CD3⁺ Т-клітин, виділених у людей-донорів після *ex vivo* обробки 100 mM 2FF, як визначали за допомогою поверхнєвого фарбування LCA.

На ФІГ. 5А-5В показані графіки, що демонструють прогресування пухлини після перенесення аутологічних людських Т-клітин, що дозріли в присутності або відсутності 2FF, мишам NSG, що несуть відповідні LCL EBV трансформовані В-клітинні пухлини. На ФІГ. 5А показаний графік, що демонструє прогресування пухлини шляхом вимірювання штангенциркулем, і на ФІГ. 5В показаний графік, що демонструє прогресування пухлини через виживання.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Хоч в цьому документі показані і описані різні варіанти здійснення і аспекти даного винаходу, для фахівця в даній галузі техніки буде очевидно, що такі варіанти здійснення і аспекти надані виключно як приклад. Фахівцям в даній галузі будуть зрозумілі численні варіації, зміни і заміни без відхилення від винаходу. Потрібно розуміти, що різні альтернативи варіантам здійснення винаходу, описаним в цьому документі, можуть бути використані при практичному застосуванні винаходу.

Заголовки розділів, що використовуються в цьому документі, призначені тільки для організаційних цілей і не повинні розглядатися як обмежено описані об'єкти винаходу. Всі документи або частини документів, що цитуються в заявці, включаючи, крім іншого, патенти, заявки на патенти, статті, книги, довідники і наукові праці, наразі прямо включені за допомогою посилання у повному об'ємі у всіх відношеннях.

При практичному здійсненні даного винаходу, якщо не вказане інше, будуть використовуватися стандартні методи культивування тканин, імунології, молекулярної біології і клітинної біології, які відомі фахівцям в даній галузі. Див., наприклад, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; сепія Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; сепія Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins eds.

(1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; IRL Press (1986) Immobilized Cells and Enzymes; Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd edition (2002) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sohail (2004) Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC Press).

1. Визначення

При використанні в цьому документі і в прикладеній формулі винаходу, форми однини "a", "an" і "the" включають множинні посилання, якщо з контексту прямо не слідує інше. Таким чином, наприклад, посилання на "аналог фукози" включає один або більше аналогів фукози. Коли мається на увазі безліч аналогів фукози, кожен з безлічі аналогів фукози може бути ідентичним або відрізнятися.

Термін "виділяти", "виділення" або "виділений" служить для позначення того, що компонент (наприклад, сполука або клітина) відділений від всіх або від деяких компонентів, які супроводжують його в природі або в лабораторній суміші.

Термін "збагачувати", "збагачення" або "збагачений" служить для позначення того, що суміш, що містить компонент (наприклад, сполуку або клітину), оброблена з метою підвищення концентрації компонента в порівнянні з його концентрацією до обробки. Наприклад, збагачення Т-клітин з суміші клітин, що містить Т-клітини і інші типи клітин, означає, що суміш клітин оброблюють, наприклад, шляхом центрифугування, внаслідок чого концентрація або кількість Т-клітин на одиницю об'єму до збагачення, наприклад, 10^5 Т-клітин/мл, збільшується більше ніж до 10^5 Т-клітин/мл після процесу збагачення.

Термін "культура" або "клітинна культура" означає підтримання і/або ріст клітин в штучному, *in vitro* оточенні. "Система культивування клітин" використовується в цьому документі для позначення умов культивування, при яких може бути вирощена популяція клітин. "Середовище для культивування" використовується в цьому документі для позначення поживного розчину для культивування, росту або проліферації клітин.

Під "композицією", що використовується в цьому документі, маються на увазі будь-які сполуки (включаючи будь-які хімічні сполуки) і клітини, які можуть бути живими або убитими. Наприклад, відносно продукції Т-клітин зі зниженим поверхневим фукозилюванням, композиція може містити аналог фукози, яким забезпечуються клітини, що культивуються. У іншому прикладі, відносно забезпечення адоптивної клітинної терапії або лікування раку, композиція може містити групу клітин, наприклад Т-клітин, зі зниженим поверхневим фукозилюванням. Композиція, що використовується в будь-якому контексті, може містити один або більше компонентів.

Терміни "Т-лімфоцит" або "Т-клітина" стосуються типу лімфоцита, який відіграє важливу роль в клітинному імунітеті. Типи Т-клітин включають, не обмежуючись перерахованими, ефektorні Т-клітини, Т-хелпери, цитотоксичні Т-клітини, Т-клітини пам'яті, регуляторні Т-клітини, NK-клітини, інваріантні Т-клітини, що пов'язані зі слизовою, альфа-бета Т-клітини і гамма-дельта Т-клітини. Крім того, Т-клітини можуть бути додатково поділені на підтипи в залежності від присутності або рівня одного або більше конкретних маркерів на них.

Терміни "індивід" або "суб'єкт" при використанні в цьому документі стосується людей, ссавців і іншої тварини в даному винаході. У деяких випадках суб'єкт, що є людиною, може бути пацієнтом.

Під "лікуванням" відносно захворювання або стану мається на увазі те, що досягається, щонайменше, зменшення важкості симптомів, пов'язаних зі станом, що вражає індивіда, де зменшення важкості використовується в широкому значенні для позначення, щонайменше, зменшення величини параметра, наприклад, симптому, пов'язаного зі станом (наприклад, раком), що підлягає лікуванню. Таким чином, лікування також включає ситуації, де патологічний стан або, щонайменше, пов'язані з ним симптоми повністю інгібовані, наприклад, попереджено їх виникнення або вони зупинені, наприклад, усунені, внаслідок чого пацієнт більше не страждає від стану або, щонайменше, симптомів, які характеризують стан. Таким чином, лікування включає: (i) профілактику, тобто зниження ризику розвитку клінічних симптомів, включаючи запобігання розвитку клінічних симптомів, наприклад, запобігання прогресуванню захворювання до небезпечного стану; (ii) інгібування, тобто затримку розвитку або подальшого розвитку клінічних симптомів, наприклад, зменшення або повне інгібування активного захворювання, наприклад, з метою зменшення пухлинного навантаження, яке може включати видалення

ракових клітин, що виявляються; і/або (iii) полегшення, тобто регресію клінічних симптомів.

"Введення" і т.п. стосується прямого введення, яке може бути введенням в клітини *in vitro*, введення в клітини *in vivo*, введення суб'єкту медичним працівником, і/або непрямого введення, яке може бути актом призначення композиції винаходу. При використанні в цьому документі

5 стосовно клітини, стосується введення композиції в клітину. Як правило, вводять ефективну кількість, яка може бути визначена фахівцем в даній галузі. Наприклад, при введенні одного або більше аналогу фукози в клітини, що культивуються в середовищі, ефективну кількість аналога(ів) фукози визначають як кількість, яка є достатньою, щоб надати необхідний вплив, наприклад, отримання Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилування. Може

10 використовуватися будь-який спосіб введення. Сполуки (наприклад, один або більше аналогів фукози) можуть вводити в клітини, наприклад, шляхом додавання сполук в середовища для культивування клітин або введення (наприклад, з кормом) *in vivo*. Введення суб'єкту може бути виконане, наприклад, шляхом годування, внутрішньосудинної ін'єкції, прямої внутрішньопухлинної доставки і т.п.

15 Введення може означати пероральне введення, введення у вигляді супозиторію, зовнішній контакт, внутрішньовенне, внутрішньочеревинне, внутрішньом'язове, внутрішньоосередкове, інтратекальне, інтраназальне або підшкірне введення або імплантацію пристрою з уповільненим вивільненням, наприклад мініосмотичного насоса, суб'єкту. Введення будь-яким шляхом, включаючи парентеральне і черезслизове (наприклад, букальне, сублінгвальне,

20 піднебінне, в ясна, назальне, вагінальне, ректальне або трансдермальне). Парентеральне введення включає, наприклад, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньоартеріальне, внутрішньошкірне, підшкірне, внутрішньочеревинне, внутрішньошлункове і внутрішньочерепне. Інші способи доставки включають, не обмежуючись перерахованими, застосування ліпосомальних препаратів, внутрішньовенну інфузію, трансдермальні пластирі і т.д. Під

25 "спільним введенням" мається на увазі, що композицію, описану в цьому документі, вводять одночасно, безпосередньо до або відразу після застосування однієї або більше додаткових терапій, наприклад, протипухлинних терапій, таких як хіміотерапія, гормональна терапія, променева терапія або імунотерапія. Сполуки згідно з винаходом можна вводити пацієнту окремо або спільно. Під спільним введенням мається на увазі одночасне або послідовне

30 введення композиції окремо або в комбінації (більше однієї композиції). Таким чином, препарати також можна комбінувати, коли це потрібне, з іншими активними речовинами (наприклад, для зниження метаболічної деградації).

Термін "рак" при використанні в цьому документі стосується загального терміну, що охоплює первинний рак і метастатичний рак. Під "первинним раком" мається на увазі група пухлинних

35 клітин, які набули щонайменше однієї характерної ознаки ракових клітин, однак ще не інвазували сусідні тканини і утримуються в пухлині, локалізованій в ділянці первинного походження. Під "метастатичним раком" мається на увазі група пухлинних клітин, які походять з клітин первинного раку, які проникли в тканину, що оточує вказаний первинний рак, розповсюдилися по тілу, прикріпилися в новій віддаленій ділянці і вирости в нову пухлину.

40 Приклади первинного і метастатичного раку згідно з даним винаходом включають, не обмежуючись перерахованим, карциному молочної залози, рак стравоходу, рак товстої і прямої кишки, підшлункової залози, шлунку, стромальні пухлини ШКТ (шлунково-кишкової стромальної тканини), гепатоцелюлярний рак, рак печінки, легені, дрібноклітинний рак легені, рак яєчника, матки, шийки матки, сечового міхура, нирки, товстої кишки, тонкої кишки, лімфому, рак

45 передміхурової залози, яєчка, карциному щитовидної залози, злоякісної меланому, увеальну меланому, множинну мієлому, мезотеліому, остеосаркому, хондросаркому, міосаркому, гліобластому, саркому, гліому або інші пухлини головного мозку, голови/шиї, інші пухлини шлунково-кишкового тракту і ембріонально-клітинні пухлини, гемобластози, лейкоз, лімфому, наприклад, хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ), гострий лімфолейкоз (ГЛЛ), неходжкінську лімфому,

50 гострий мієлоїдний лейкоз, множинну мієлому, рефрактерну фолікулярну лімфому, мантійно-клітинну лімфому, індолентну В-клітинну лімфому, В-клітинні неоплазії, рак шкіри (включаючи меланому), рак кісток, епітеліальний рак, нирковоклітинну карциному, аденокарциному підшлункової залози, лімфому Ходжкіна, гліобластому, нейробластому, саркому Юінга, медулобластому, синовіальну саркому і/або мезотеліому.

55 "Ракова клітина" при використанні в цьому документі стосується клітини, що демонструє неопластичний клітинний фенотип, який може характеризуватися одним або більше з, наприклад, росту змінених клітин, проліферації змінених клітин, втрати залежного від щільності інгібування росту, потенціалу незалежного від прикріплення росту, здатності стимулювати ріст і/або розвиток пухлини в моделі на тваринах, що не стосуються людини, з ослабленим

60 імунітетом і/або будь-яким прийнятним індикатором клітинної трансформації. "Ракова клітина"

може використовуватися в цьому документі напереремінно з "пухлинною клітиною" або "злаякісною клітиною" і охоплює ракові клітини солідної пухлини, напівсолідної пухлини, первинної пухлини, метастатичної пухлини і т.п.

"Протипухлинний ефект" або "протираковий ефект" при використанні в цьому документі стосується біологічного ефекту, який може являти собою зменшення об'єму пухлини, інгібування росту пухлини, зменшення кількості пухлинних клітин, зменшення проліферації пухлинних клітин, зменшення кількості метастазів, збільшення загального виживання або виживання без прогресування, збільшення тривалості життя або зменшення важкості різних фізіологічних симптомів, пов'язаних з пухлиною. Протипухлинний ефект також може стосуватися запобігання виникненню пухлини, наприклад, вакциною.

Термін "виживання без прогресування", який може бути скорочено позначений як ВБП, при використанні в цьому документі стосується часу від дати початку лікування до дати прогресування захворювання згідно з уточненими Критеріями об'єктивної відповіді Міжнародної робочої групи (IWG) за злаякісною лімфомою або дати настання смерті за будь-якою причиною.

Термін "загальне виживання", який може бути скорочено позначений як ЗВ, визначений як час з дати лікування до дати настання смерті.

Термін "адоптивна клітинна терапія" або "адоптивне перенесення клітин" при використанні в цьому документі стосується надання, наприклад введення або трансплантації, клітин для терапії суб'єкту, який потребує такої терапії. Клітини для терапії можуть походити від того ж суб'єкта або від іншого суб'єкта, включаючи людину і тварину, що не стосується людини. Клітини для адоптивної клітинної терапії або адоптивного перенесення клітин можуть включати Т-клітини.

Згідно із запропонованими в цьому документі способами, суб'єкту можуть призначати адоптивну клітинну терапію. Деякі приклади щодо способів і процедур, пов'язаних з адоптивною клітинною терапією, можна знайти, наприклад, в WO2015120096, WO2015164675, WO2016011210, WO2016040441, WO2017070395 і US20160158359, описи яких прямо включені за допомогою посилання в повному об'ємі. Адоптивна клітинна терапія може надати пацієнту суміш клітин, включаючи Т-клітини, особливо Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням. Кількість Т-клітин, що вводяться суб'єкту, яка може викликати необхідну фізіологічну відповідь (наприклад, інгібування або зменшення росту пухлини), визначають як ефективну кількість. Терміни ефективна кількість і ефективна доза використовуються напереремінно. Наприклад, для отримання позитивної відповіді у суб'єкта при лікуванні захворювання (наприклад, раку) ефективна кількість є кількістю, яка спричиняє зменшення, усунення або послаблення симптомів, пов'язаних з порушенням, наприклад, з метою забезпечити контроль над метастазуванням при ракові, усунення ракових клітин і/або т.п. Ефективні кількості і схеми введення Т-клітин можуть бути визначені емпірично фахівцем в даній галузі. Діапазони доз для введення є такими, які достатні для отримання потрібного ефекту, при якому виявляється вплив на один або більше симптомів захворювання або порушення (наприклад, зменшення або затримка прояву). Доза не повинна бути настільки великою, щоб викликати суттєві побічні ефекти, такі як небажані пережресні реакції, анафілактичні реакції і т.п. Як правило, доза буде змінюватися в залежності від віку, стану здоров'я, статі, типу захворювання, міри захворювання або порушення, шляху введення або від включення в схему лікування інших лікарських засобів, і може бути визначена фахівцем в даній галузі. У випадку яких-небудь протипоказань доза може бути скоректована окремим лікарем. Дози можуть змінюватися і можуть бути введені за одне або більше введень дози щодня, протягом одного або декількох днів. Наприклад, для даного параметра ефективна кількість буде демонструвати збільшення або зменшення щонайменше на 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 % або щонайменше на 100 % в порівнянні з попереднім лікуванням. Ефективність також може бути виражена як "кратне" збільшення або зменшення. Наприклад, терапевтично ефективна кількість може надавати щонайменше 1,2-кратну, 1,5-кратну, 2-кратну, 5-кратну або більшу дію в порівнянні з контролем або попереднім лікуванням. Точна доза і склад будуть залежати від мети терапії і будуть визначатися фахівцем в даній галузі за допомогою відомих способів (див., наприклад, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003) і Pickar, Dosage Calculations (1999)).

Термін "знижене поверхнєве фукозилювання" при використанні в цьому документі стосується інгібування фукози, що приєднується до поверхневих глікопротеїнів на клітинах, наприклад, Т-клітинах. Таке "інгібування фукози" відрізняється від конкурентного включення з аналогом фукози, де аналог фукози замінює фукозу на поверхневих глікопротеїнах.

"Контрольний" або "нормальний" зразок, наприклад, контрольні клітини або нормальні клітини, стосується зразка, який служить як стандарт, зазвичай відомий стандарт, для порівняння із зразком, що досліджується. Наприклад, зразок, що досліджується може бути модифікованими Т-клітинами, зокрема Т-клітинами зі зниженим поверхневим фукозилуванням. Такі Т-клітини можуть бути отримані способами, розкритими в цьому документі, наприклад, шляхом культивування Т-клітин в присутності аналога фукози або отримання Т-клітин від тварини, якій вводили аналог фукози. Такі модифіковані Т-клітини можна порівнювати з контрольними або нормальними Т-клітинами, які культивували при відсутності аналога фукози або отримували у тварини, якій не вводили аналог фукози для підтвердження зниження. Контрольне значення також може бути отримане від тієї ж особи, наприклад, з раніше отриманого зразка, до впливу або введення аналога фукози.

Термін "фармацевтично прийнятна допоміжна речовина" при використанні в цьому документі стосується будь-якої прийнятної речовини, яка надає фармацевтично прийнятну сполуку для введення суб'єкту сполуки(пук), що представляють інтерес. "Фармацевтично прийнятна допоміжна речовина" може охоплювати речовини, що називаються фармацевтично прийнятними розчинниками, фармацевтично прийнятними добавками і фармацевтично прийнятними носіями. Термін "носій" або "фармацевтично прийнятний носій" стосується розріджувача, ад'юванта або допоміжної речовини, з якою вводять аналог фукози. Такі фармацевтичні носії можуть бути рідинами, такими як вода і олії, включаючи олії мінерального, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральна олія, кунжутна олія і т.п. Носії можуть бути сольовим розчином, гуміарабіком, желатином, крохмальною пастою, тальком, кератином, колоїдним діоксидом кремнію, сечовиною і т.п. Крім того, можуть використовуватися допоміжні, стабілізуючі, мастильні речовини, загущувачі і барвники. У одному варіанті здійснення, у разі введення тварині, аналогу фукози або композиції і фармацевтично прийнятні носії є стерильними. Вода є переважним носієм, коли аналоги фукози вводять внутрішньовенно. Розчини хлориду натрію і водні розчини декстрози і гліцерину також можуть використовуватися як рідкі носії, особливо в розчинах для ін'єкцій. Прийнятні фармацевтичні носії також включають такі допоміжні речовини, як крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, борошно, крейду, силікагель, стеарат натрію, гліцерилмоностеарат, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропіленгліколь, воду, етанол і т.п. Дані композиції при необхідності також можуть містити невеликі кількості змочувальних речовин або емульгаторів або рН-буферних речовин.

При використанні в цьому документі "складноефірні групи, що здатні до гідролізу" стосується будь-якого звичайного складного ефіру, який може гідролізуватися *in vivo* з утворенням гідроксигрупи. Приклади складноефірних груп, що здатні до гідролізу, включають -OC(O)H, -OC(O)C₁-C₁₀ алкіл, -OC(O)C₂-C₁₀ алкеніл, -OC(O)C₂-C₁₀ алкініл, -OC(O)арил, -OC(O)гетероцикл, -OC(O)C₁-C₁₀ алкілен(арил), -OC(O)C₂-C₁₀ алкенілен(арил), -OC(O)C₂-C₁₀ алкінілен(арил), -OC(O)C₁-C₁₀ алкілен(гетероцикл), -OC(O)C₂-C₁₀ алкенілен(гетероцикл), -OC(O)C₂-C₁₀ алкінілен(гетероцикл), -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃ і -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, де кожний *n* є цілим числом, незалежно вибраним з 0-5.

При використанні в цьому документі "перацетат алкінілфукози" стосується будь-яких форм алкінілфукози (5-етиніларабінози) з ацетатними групами в положеннях R¹⁻⁴ (див. формулу I і II, нижче), включаючи 6-етиніл-тетрагідро-2H-піран-2,3,4,5-тетраїл-тетраацетат, включаючи (2S, 3S, 4R, 5R, 6S) і (2R, 3S, 4R, 5R, 6S) ізомери, і 5-(S)-1-гідроксипроп-2-ініл-тетрагідрофуран-2,3,4-триїл-тетраацетат, включаючи (2S, 3S, 4R, 5R) і (2R, 3S, 4R, 5R) ізомери і альдозну форму, якщо з контексту не випливає інше. Терміни "триацетат алкінілфукози", "діацетат алкінілфукози" і "моноацетат алкінілфукози" стосуються вказаних три-, ди- і моноацетатних форм алкінілфукози, відповідно.

Якщо з контексту не слідує інше, термін "алкіл" стосується незаміщеного, насиченого, нормального або розгалуженого вуглецю, що містить від 1 до 20 атомів вуглецю (і всі комбінації і підкомбінації діапазонів і конкретне число атомів вуглецю в них), якщо не визначене інше. Алкільна група з 1-3, 1-8 або 1-10 атомів вуглецю є переважною. Прикладами алкільних груп є метил, етил, н-пропів, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, 2-пентил, 3-пентил, 2-метил-2-бутил, н-гексил, н-гептил, н-октил, н-ноніл, н-децил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил і 3,3-диметил-2-бутил.

Алкільні групи, окремо або як частина іншої групи, якщо вони заміщені, можуть бути заміщені однією або більше групами, переважно 1-3 групами (і будь-якими додатковими замісниками, вибраними з галогену), що включають, без обмеження: галоген, -O-(C₁-C₈ алкіл), -

O-(C₂-C₈ алкеніл), -O-(C₂-C₈ алкініл), арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -O, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN; де кожний R' незалежно вибраний з -H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або арилу.

Якщо з контексту не слідує інше, терміни "алкеніл" і "алкініл" стосуються незаміщеного або не обов'язково заміщеного (де зазначено) нормальних і розгалужених вуглецевих ланцюгів, що містять від 2 до 20 атомів вуглецю (і всі комбінації і підкомбінації діапазонів і конкретне число атомів вуглецю в них), при цьому переважні 2-3, 2-4, 2-8 або 2-10 атомів вуглецю. Алкенільний ланцюг містить щонайменше один подвійний зв'язок в ланцюгу, і алкінільний ланцюг містить щонайменше один потрійний зв'язок в ланцюгу. Приклади алкенільних груп включають, без обмеження, етилен або вініл, аліл, 1-бутеніл, 2-бутеніл, ізобутеніл, 1-пентеніл, 2-пентеніл, 3-метил-1-бутеніл, 2-метил-2-бутеніл і 2,3-диметил-2-бутеніл. Приклади алкінільних груп включають, без обмеження, ацетиленову, пропаргіл, ацетиленіл, пропініл, 1-бутиніл, 2-бутиніл, 1-пентиніл, 2-пентиніл і 3-метил-1-бутиніл.

Алкенільні і алкінільні групи, окремо або як частина іншої групи, якщо вони заміщені, можуть бути заміщені однією або більше групами, переважно 1-3 групами (і будь-якими додатковими замісниками, вибраними з галогену), що включають, без обмеження: галоген, -O- (C₁-C₈ алкіл), -O-(C₂-C₈ алкеніл), -O-(C₂-C₈ алкініл), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -O, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN; де кожний R' незалежно вибраний з H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або арилу.

Якщо з контексту не слідує інше, термін "алкілен" стосується насиченого, незаміщеного, розгалуженого або нормального вуглеводневого радикала, що містить від 1 до 20 атомів вуглецю (і всі комбінації і підкомбінації діапазонів і конкретне число атомів вуглецю в них), переважно 1-8 або 1-10 атомів вуглецю, і що має два моновалентних радикальних центри, отриманих внаслідок видалення двох атомів водню від одного або двох різних атомів вуглецю вихідного алкану. Типові алкілени включають, без обмеження, метилен, етилен, пропілен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонілен, декален, 1,4-циклогексilen і т.п.

Алкіленові групи, окремо або як частина іншої групи, якщо вони заміщені, можуть бути заміщені однією або більше групами, переважно 1-3 групами (і будь-якими додатковими замісниками, вибраними з галогену), що включають, без обмеження: галоген, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₂-C₈ алкеніл), -O-(C₂-C₈ алкініл), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -O, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN; де кожний R' незалежно вибраний з H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або -арилу.

"Алкенілен" стосується ненасиченого, розгалуженого або нормального, або циклічного вуглеводневого радикалу алкенільної групи (як описано вище) і що має два моновалентних радикальних центри, отриманих внаслідок видалення двох атомів водню від одного або двох різних атомів вуглецю вихідного алкену. "Алкеніленова" група може бути незаміщеною або не обов'язково заміщеною (де зазначено), як описано вище для алкенільних груп. У деяких варіантах здійснення "алкеніленова" група не заміщена.

"Алкінілен" стосується ненасиченого, розгалуженого або нормального, або циклічного вуглеводневого радикалу алкінільної групи (як описано вище) і що має два моновалентних радикальних центри, отриманих внаслідок видалення двох атомів водню від одного або двох різних атомів вуглецю вихідного алкіну. "Алкініленова" група може бути незаміщеною або не обов'язково заміщеною (де зазначено), як описано вище для алкінільних груп. У деяких варіантах здійснення "алкініленова" група не заміщена.

Якщо з контексту не слідує інше, термін "арил" стосується заміщеного або незаміщеного моновалентного ароматичного вуглеводневого радикала з 6-20 атомів вуглецю (і всі комбінації і підкомбінації діапазонів і конкретне число атомів вуглецю в них), отриманого внаслідок видалення одного атома водню від одного атома вуглецю вихідної ароматичної кільцевої системи. Деякі арильні групи представлені в приблизних структурах як "Ar". Типові арильні групи включають, без обмеження, радикали, що отримані з бензолу, заміщеного бензолу, фенілу, нафталіну, антрацену, біфенілу і т.п.

Арильна група, окремо або як частина іншої групи, може бути не обов'язково заміщена однією або більше, переважно 1-5, або навіть 1-2 групами, що включають, не обмежуючись перерахованими: галоген, -C₁-C₈ алкіл, -C₂-C₈ алкеніл, -C₂-C₈ алкініл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₂-C₈ алкеніл), -O-(C₂-C₈ алкініл), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NO₂, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN; де кожний R' незалежно вибраний з H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або арилу.

Якщо з контексту не слідує інше, термін "гетероцикл" стосується заміщеної або незаміщеної моноциклічної кільцевої системи, що містить від 3 до 7 або від 3 до 10 атомів в кільці (що також називаються члени кільця), де щонайменше один атом в кільці є гетероатомом, вибраним з N,

О, Р або S (і всі комбінації і підкомбінації діапазонів і конкретне число атомів вуглецю і гетероатомів в них). Гетероцикл може містити від 1 до 4 гетероатомів в кільці, незалежно вибраних з N, О, Р або S. Один або більше атомів N, С або S в гетероциклі можуть бути окислені. Моноциклічний гетероцикл переважно містить 3-7 членів кільця (наприклад, 2-6 атомів вуглецю і 1-3 гетероатоми, що незалежно вибрані з N, О, Р або S). Кільце, яке містить гетероатом, може бути ароматичним або неароматичним. Якщо не зазначено інше, гетероцикл приєднаний до своєї бічної групи на будь-якому гетероатомі або атомі вуглецю, що призводить до стабільної структури.

Гетероцикли описані в Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), зокрема, в Розділах 1, 3, 4, 6, 7 і 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 по теперішній час), зокрема, Номери 13, 14, 16, 19 і 28; і J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960). Приклади "гетероциклічних" груп включають, як необмежуючий приклад, піридил, дигідропіридил, тетрагідропіридил (піперидил), тіазоліл, піримідиніл, фураніл, тіеніл, піроліл, піразоліл, імідазоліл, тетразоліл, фукозил, азаридиніл, азетидиніл, оксираніл, оксетаніл і тетрагідрофураніл.

Гетероциклічна група, окремо або як частина іншої групи, якщо вони заміщені, може бути заміщена однією або більше групами, переважно 1-2 групами, що включають, не обмежуючись перерахованими: -C₁-C₈ алкіл, -C₂-C₈ алкеніл, -C₂-C₈ алкініл, галоген, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₂-C₈ алкеніл), -O-(C₂-C₈ алкініл), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN; де кожний R' незалежно вибраний з H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або -арилу.

Як необмежуючий приклад, вуглець-зв'язані гетероцикли можуть бути зв'язані в наступних положеннях: положення 2, 3, 4, 5 або 6 піридин; положення 3, 4, 5 або 6 піридазину; положення 2, 4, 5 або 6 піримідину; положення 2, 3, 5 або 6 піразину; положення 2, 3, 4 або 5 фурану, тетрагідрофурану, тіофурану, тіофену, піролу або тетрагідропіролу; положення 2, 4 або 5 оксазолу, імідазолу або тіазолу; положення 3, 4 або 5 ізоксазолу, піразолу або ізотіазолу; положення 2 або 3 азиридину; або положення 2, 3 або 4 азетидину. Приклади вуглець-зв'язаних гетероциклів можуть включати 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил, 5-піридил, 6-піридил, 3-піридазиніл, 4-піридазиніл, 5-піридазиніл, 6-піридазиніл, 2-піримідиніл, 4-піримідиніл, 5-піримідиніл, 6-піримідиніл, 2-піразиніл, 3-піразиніл, 5-піразиніл, 6-піразиніл, 2-тіазоліл, 4-тіазоліл або 5-тіазоліл.

Як необмежуючий приклад азот-зв'язані гетероцикли можуть бути зв'язані в положенні 1 азиридину, азетидину, піролу, піролідину, 2-піроліну, 3-піроліну, імідазолу, імідазолідину, 2-імідазоліну, 3-імідазоліну, піразолу, піразоліну, 2-піразоліну, 3-піразоліну, піперидину, піперазину, індолу, індоліну або 1H-індазолу; положенні 2 ізоіндолу або ізоіндоліну; і положенні 4 морфоліну. Ще більш типово, азот-зв'язані гетероцикли включають 1-азиридил, 1-азетидил, 1-піроліл, 1-імідазоліл, 1-піразоліл і 1-піперидиніл.

Якщо не вказано інше, термін "карбоцикл" стосується заміщеної або незаміщеної, насиченої або ненасиченої неароматичної моноциклічної кільцевої системи, що містить від 3 до 6 атомів в кільці (і всі комбінації і підкомбінації діапазонів і конкретне число атомів вуглецю в них), де всі атоми в кільці є атомами вуглецю.

Карбоциклічні групи, окремо або як частина іншої групи, якщо вони заміщені, можуть бути заміщені, наприклад, однією або більше групами, переважно 1 або 2 групами (і будь-якими додатковими замісниками, вибраними з галогену), що включають, не обмежуючись перерахованими: галоген, C₁-C₈ алкіл, -C₂-C₈ алкеніл, -C₂-C₈ алкініл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₂-C₈ алкеніл), -O-(C₂-C₈ алкініл), арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -O-, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN; де кожний R' незалежно вибраний з H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або арилу.

Приклади моноциклічних карбоциклічних замісників включають циклопропіл, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-еніл, 1-циклопент-2-еніл, 1-циклопент-3-еніл, циклогексил, 1-циклогекс-1-еніл, 1-циклогекс-2-еніл, 1-циклогекс-3-еніл, циклогептил, циклооктил, -1,3-циклогексадієніл, -1,4-циклогексадієніл, -1,3-циклогептадієніл, -1,3,5-циклогептатриєніл і -циклооктадієніл.

Коли яка-небудь змінна зустрічається більше одного разу в якому-небудь елементі або в якій-небудь формулі, її визначення при кожній появі не залежить від її визначення в будь-якому іншому випадку. Комбінації замісників і/або змінних допустимі тільки в тому випадку, якщо такі комбінації призводять до стабільних сполук.

Якщо з контексту не слідує інше, дефіс (-) означає положення приєднання до молекули замісника. Таким чином, термін "-(C₁-C₁₀ алкілен)арил" або "-C₁-C₁₀ алкілен(арил)" стосується C₁-C₁₀ алкіленового радикалу, як визначено в цьому документі, де алкіленовий радикал

приєднаний до молекули замісника на будь-якому з атомів вуглецю алкіленового радикала, при цьому один з атомів водню, зв'язаних з атомом вуглецю алкіленового радикала, замінений арильним радикалом, як визначено в цьому документі.

5 Якщо конкретна група є "заміщеною", така група може мати один або більше замісників, переважно від одного до п'яти замісників, більш переважно від одного до трьох замісників, найбільш переважно від одного до двох замісників, незалежно вибраних зі списку замісників. Така група, проте, може звичайно мати будь-яку кількість замісників, вибраних з галогену.

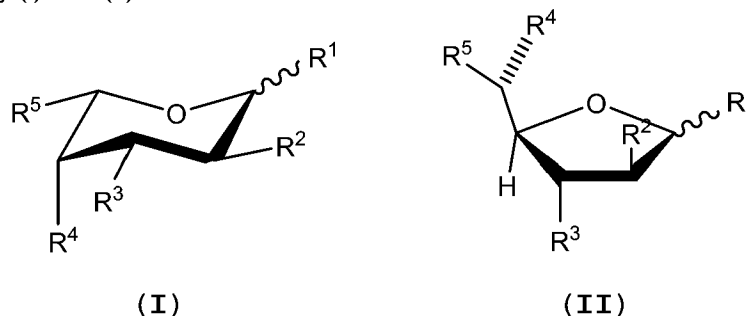
10 Передбачається, що визначення будь-якого замісника або змінної в конкретному положенні в молекулі не залежить від їх визначень в іншому положенні цієї молекули. Потрібно розуміти, що замісники і характер заміщення на сполуках даного винаходу можуть бути вибрані середнім фахівцем в даній галузі так, щоб були отримані сполуки, які є активними і хімічно стабільними, і які можуть бути з легкістю синтезовані за допомогою методик, відомих з рівня техніки, а також способів, представлених в цьому документі.

15 Термін "фармацевтично прийнятний" означає схвалений регулюючим органом федерального або регіонального уряду або перерахований в Фармакопеї США або іншій загальноновизнаній фармакопеї для ветеринарного застосування і, зокрема, медичного застосування. Термін "фармацевтично сумісний компонент" стосується фармацевтично прийнятного розріджувача, ад'юванта, допоміжної речовини або розчинника, з яким вводять аналог фукози.

20 Аналоги фукози, як правило, по суті не містять небажані домішки. Це означає, що аналог, як правило, має щонайменше приблизно 50 % в/в (вага/вага) чистоту, а також по суті не містить небажаних білків і інших домішок. Іноді такі сполуки мають щонайменше приблизно 80 % в/в і, більш переважно щонайменше 90 % або приблизно 95 % в/в чистоту. За допомогою звичайних методик очищення може бути отриманий гомогенний, щонайменше 99 % в/в, продукт.

25 II. Аналоги фукози

У будь-якому з різних варіантів здійснення в цьому документі аналог фукози може мати наступну формулу (I) або (II):



30 або являти собою відповідну фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою;

де R^2 є галогеном; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃,

або

35 де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є алкінілом.

У деяких варіантах здійснення R^2 є -F.

У деяких варіантах здійснення R^5 є -C≡CH.

40 У деяких варіантах здійснення аналог фукози має формулу (I) або (II), де R^2 є галогеном; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃, або де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -C≡CH.

45 У деяких варіантах здійснення аналог фукози має формулу (I) або (II), де R^2 є -F; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃, або де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -C≡CH.

50 У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), R^2 є галогеном; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃. У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), R^2 є -F; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃.

У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4

незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є $-C\equiv CH$.

У деяких варіантах здійснення складноефірна група, що здатна до гідролізу є $-OC(O)C_1-C_{10}$ алкілом. У деяких вибраних варіантах здійснення складноефірна група, що здатна до гідролізу є $-OC(O)CH_3$.

5 У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R^2 є -F, кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і $-OC(O)C_1-C_{10}$ алкілу. У деяких вибраних варіантах здійснення формул (I) або (II), де R^2 є -F, кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і $-OC(O)CH_3$. У одному певному варіанті здійснення формули (I) або (II), R^2 є -F, і кожний з R^1 , R^3 і R^4 -ОН.

10 У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R^5 є $-C\equiv CH$, кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і $-OC(O)C_1-C_{10}$ алкілу. У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R^5 є $-C\equiv CH$, кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і $-OC(O)CH_3$. У одному певному варіанті здійснення формули (I) або (II), R^5 є $-C\equiv CH$, і кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 є -ОН. У іншому певному варіанті здійснення формули (I) або (II), R^5 є $-C\equiv CH$, і кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 є -OAc.

15 У деяких вибраних варіантах здійснення аналог фукози має формулу:

Або



20 або являє собою відповідну альдозну форму, де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 є таким, як визначено і описано в цьому документі.

У деяких вибраних варіантах здійснення аналогом фукози є 2-дезоксид-2-фтор-L-фукоза.

У деяких вибраних варіантах здійснення аналогом фукози є перацетат алкінілфукози. Перацетат алкінілфукози може бути тетраацетатом алкінілфукози, триацетатом алкінілфукози, діацетатом алкінілфукози, моноацетатом алкінілфукози або їх комбінаціями. У одному прикладі здійснення аналогом фукози є (3S, 4R, 5R, 6S)-6-етинілтетрагідро-2H-піран-2,3,4,5-тетраїл-тетраацетат або 5-(S)-1-гідроксипроп-2-ін-1-он)тетрагідрофуран-2,3,4-триїл-триацетат.

У будь-якому з різних варіантів здійснення внутрішньокільцевий атом кисню в аналогу фукози формули (I) і (II) може бути замінений сіркою.

30 Також в цьому документі запропонована фармацевтично прийнятна сіль і сольватована форма сполук формул I і II. Таким чином, в будь-якому з різних варіантів здійснення, запропонованих в цьому документі, може використовуватися фармацевтично прийнятна сіль або сольватовані форми розкритих сполук. Сольвати, як правило, не спричиняють значної зміни фізіологічної активності сполук і в такому вигляді можуть функціонувати як фармакологічні еквіваленти. Одним типом сольвату є гідрат.

35 У деяких аспектах аналог фукози розчинений в буфері лікарської форми (наприклад, у водному буфері лікарської форми) в концентрації щонайменше 10 мМ. У деяких варіантах здійснення аналог фукози розчинено в буфері лікарської форми в концентрації щонайменше 100 мМ. У деяких аспектах аналог фукози розчинено в буфері лікарської форми (наприклад, водному буфері лікарської форми) в концентрації щонайменше 100 мкг/мл, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 50 мкг/мл, щонайменше приблизно 100 мкг/мл, щонайменше приблизно 200 мкг/мл або щонайменше приблизно 300 мкг/мл.

III. Спосіб отримання Т-клітин зі зниженим поверхневим фукозилюванням

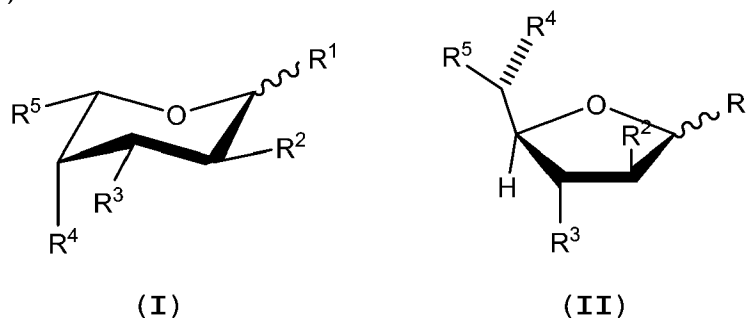
У деяких аспектах в цьому документі запропоновані способи отримання Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання.

45 II-1. Способи отримання in vitro або ex vivo

У деяких аспектах запропоновані способи in vitro або ex vivo отримання Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання. Такі способи можуть включати культивування Т-клітин в присутності аналога фукози, розкритого в цьому документі, в середовищі культивування клітин і збір Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання. Т-клітини, отримані таким способом, можуть мати знижене поверхнєве фукозилювання в порівнянні з Т-клітинами, що культивуються при відсутності аналога фукози. Такі Т-клітини, отримані способами, розкритими в цьому документі, можуть застосовуватися в терапевтичних цілях, таких як адоптивна клітинна

терапія або лікування раку. Таким чином, щонайменше в деяких варіантах здійснення, Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилування, називаються "терапевтичними Т-клітинами".

У деяких варіантах здійснення аналог фукози, що застосовується в способах, може мати формулу (I) або (II):



або являти собою відповідну фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою;

де R^2 є галогеном; кожний з R^1 , R^3 , і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃, або

де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є алкінілом.

У деяких варіантах здійснення R^2 є -F.

У деяких варіантах здійснення R^5 є -C≡CH.

У деяких варіантах здійснення аналог фукози, що застосовується в способах, має формулу (I) або (II), де R^2 є галогеном; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃, або де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -C≡CH.

У деяких варіантах здійснення аналог фукози, що застосовується в способах, має формулу (I) або (II), де R^2 є -F; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃, або де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -C≡CH.

У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), R^2 є галогеном; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃. У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), R^2 є -F; кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R^5 є -CH₃.

У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II) кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з -ОН або складноефірної групи, що здатна до гідролізу; і R^5 є -C≡CH.

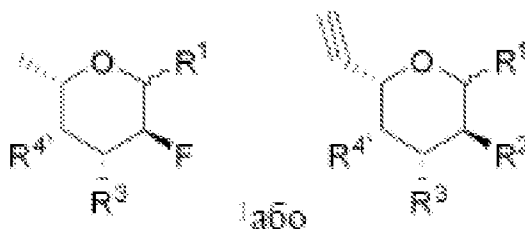
У деяких варіантах здійснення складноефірна група, що здатна до гідролізу є -OC(O)C₁-C₁₀ алкілом. У деяких вибраних варіантах здійснення складноефірна група, що здатна до гідролізу є -OC(O)CH₃.

У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R^2 є -F, кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і -OC(O)C₁-C₁₀ алкілу. У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R^2 є -F, кожний з R^1 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і -OC(O)CH₃. У одному певному варіанті здійснення формули (I) або (II), R^2 є -F, і кожний з R^1 , R^3 і R^4 є -ОН.

У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R^5 є -C≡CH, кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і -OC(O)C₁-C₁₀ алкілу. У деяких вибраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R^5 є -C≡CH, кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і -OC(O)CH₃. У одному певному варіанті здійснення формули (I) або (II), R^5 є -C≡CH, і кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 є -ОН. У іншому певному варіанті здійснення формули (I) або (II) R^5 є -C≡CH, і кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 є -OAc.

У деяких вибраних варіантах здійснення аналог фукози, що застосовується в способах, має формулу:

Або



або являє собою відповідну альдозну форму, де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 є таким, як визначено і описано в цьому документі.

У деяких вибраних варіантах здійснення аналогом фукози є 2-дезоксид-2-фтор-*L*-фукоза.

5 У деяких вибраних варіантах здійснення аналогом фукози є перацетат алкінілфукози. Перацетат алкінілфукози може бути тетраацетатом алкінілфукози, триацетатом алкінілфукози, діацетатом алкінілфукози, моноацетатом алкінілфукози або їх комбінаціями. У одному прикладі здійснення аналогом фукози є (3*S*, 4*R*, 5*R*, 6*S*)-6-етинілтетрагідро-2*H*-піран-2,3,4,5-тетраїл-тетраацетат або 5-(*S*)-1-гідроксипроп-2-ін-1-он)тетрагідрофуран-2,3,4-триїл-триацетат.

10 У будь-якому з різних варіантів здійснення внутрішньокільцевий кисень в аналогу фукози формули (I) і (II) може бути замінений сіркою.

У деяких варіантах здійснення способи, розкриті в цьому документі, можуть включати стадію культивування Т-клітин в присутності аналога фукози в середовищі культивування клітин. У деяких варіантах здійснення в середовищі культивування присутні інші типи клітин, наприклад, еритроцити. Т-клітини, що культивуються, можуть бути отримані у суб'єкта (наприклад, людини або тварини, що не стосується людини). У альтернативі Т-клітини, що культивуються, можуть бути отримані з раніше культивованої і/або збереженої популяції клітин.

У деяких варіантах здійснення способи, розкриті в цьому документі, дозволяють отримувати Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилування, які можуть застосовуватися в адаптивній клітинній терапії у суб'єкта, що потребує такої терапії. У варіантах здійснення, де Т-клітини і популяції клітин виділені із зразка, такого як біологічний зразок, наприклад, зразок, отриманий або зразок, що походить від суб'єкта, суб'єкт може бути пацієнтом, який потребує клітинної терапії, або якому буде призначена клітинна терапія, тобто аутологічним джерелом. У альтернативі Т-клітини і популяції клітин можуть бути виділені від донора, який не є пацієнтом, який потребує адаптивної клітинної терапії, тобто алогенним джерелом. Донор може бути здоровою людиною або іншим пацієнтом, що страждає на такий же патологічний стан або захворювання, яке має пацієнт, який потребує клітинної терапії, або якому буде призначена клітинна терапія.

У деяких варіантах здійснення клітини, отримані у суб'єкта, можуть бути сумішшю первинних клітин, наприклад первинних клітин людини. Зразки включають тканину, рідину і інші зразки, взяті безпосередньо у суб'єкта, а також зразки, отримані внаслідок однієї або більше стадії обробки, такі як розділення, центрифугування, промивка, інкубування і/або культивування. Біологічний зразок може бути зразком, отриманим безпосередньо з біологічного джерела, або зразком, який оброблений. Біологічні зразки включають, без обмеження, фізіологічні рідини, такі як кров, плазму, сироватку, зразки тканини і органів, таких як селезінка, включаючи оброблені зразки, отримані з них. Приклади зразків включають суцільну кров, мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК), лейкоцити, кістковий мозок, тимус, зразки біопсії тканини, пухлину, лейкоз, лімфому, лімфатичний вузол, лімфоїдну тканину кишечника, лімфоїдну тканину слизової оболонки, селезінку, інші лімфоїдні тканини, печінку, легеню, шлунок, кишечник, товсту кишку, нирку, підшлункову залозу, молочну залозу, кістку, передміхурову залозу, шийку матки, яєчки, яєчники, мигдалик або інший орган і/або клітини, що отримані з них. Зразки в контексті клітинної терапії, наприклад адаптивної клітинної терапії, включають зразки з аутологічних і алогенних джерел. Клітини в деяких варіантах здійснення можуть бути отримані з ксеногенного джерела, наприклад, миші, щура, примата, що не стосується людини і свині.

45 У деяких варіантах здійснення клітини, що культивуються згідно зі способами, розкритими в цьому документі, можуть бути отримані з існуючих клітинних ліній, наприклад, ліній Т-клітин.

У деяких варіантах здійснення виділення клітин або популяцій для культивування може включати одну або більше стадії підготовки і розділення. У деяких варіантах здійснення клітини можуть промивати, центрифугувати і/або інкубувати в присутності одного або більше реагенту, наприклад, для видалення небажаних компонентів, збагачення потрібними компонентами, лізису або видалення клітин, чутливих до певних реагентів. У деяких варіантах здійснення клітини розділяють на основі однієї або більше властивостей, таких як щільність, здатність до адгезії, розмір, чутливість, профіль експресії поверхневих маркерів і/або стійкість до певних

компонентів.

У деяких варіантах здійснення, де клітини крові забирають у суб'єкта, зібрані клітини крові можуть промивати, наприклад, для видалення плазматичної фракції, і вміщувати клітини у відповідний буфер або середовище для подальших стадій обробки. У деяких варіантах здійснення клітини можуть ресуспендувати в різних біологічно сумісних буферах, відомих в даній галузі, після промивання. У деяких варіантах здійснення можуть видаляти компоненти зразка клітин крові, і клітини можуть ресуспендувати в середовищах для культивування. У деяких варіантах здійснення способи можуть включати способи розділення клітин на основі щільності, такі як отримання лейкоцитів з периферичної крові шляхом лізису еритроцитів і центрифугування.

У деяких варіантах здійснення способи можуть включати стадію розділення різних типів клітин за експресією або присутністю в клітині однієї або більше специфічних молекул, таких як поверхневі маркери, наприклад, поверхневі білки. У деяких варіантах здійснення може використовуватися будь-який відомий спосіб розділення на основі таких маркерів. У деяких варіантах здійснення розділення може бути афінним або імуноафінним розділенням. Наприклад, виділення в деяких аспектах включає розділення клітин і популяцій клітин за експресією або рівню експресії на клітинах одного або більше маркерів, як правило, маркерів клітинної поверхні, наприклад, шляхом інкубування з антитілом або партнером зі зв'язування, які специфічно зв'язуються з такими маркерами, зазвичай з подальшими стадіями промивання і розділення клітин, що зв'язалася з антитілом або партнером зі зв'язування, від клітин, що не зв'язалися з антитілом або партнером зі зв'язування.

У деяких варіантах здійснення один або декілька підтипів Т-клітин можуть бути додатково збагачені. У деяких варіантах здійснення підтипи Т-клітин можна визначити по присутності або рівню одного або більше конкретних маркерів, таких як поверхневі маркери, на Т-клітинах. У деяких випадках такими маркерами є маркери, які відсутні або експресуються на відносно низьких рівнях в певних популяціях Т-клітин (таких як клітини, що не є клітинами пам'яті), але присутні або експресуються на відносно більш високих рівнях в деяких інших популяціях Т-клітин (таких як клітини пам'яті). У одному варіанті здійснення клітини (такі як CD8⁺ клітини або Т-клітини, наприклад, CD3⁺ клітини) збагачені (тобто позитивно відібрані) клітинами, які є позитивними або експресують на поверхні високі рівні CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127 і/або CD62L, і/або збіднені (наприклад, негативно відібрані) клітинами, які є позитивними або експресують на поверхні високі рівні CD45RA. У деяких варіантах здійснення клітини збагачені або збіднені клітинами, які є позитивними або які експресують на поверхні високі рівні CD122, CD95, CD25, CD27 і/або IL7-Ra (CD127). У деяких прикладах CD8⁺ Т-клітини збагачені клітинами, позитивними на CD45RO (або негативно на CD45RA) і CD62L.

У деяких варіантах здійснення необхідна популяція клітин, описана в цьому документі, може бути зібрана і збагачена (або збіднена) за допомогою проточної цитометрії, в якій клітини, забарвлені на безліч маркерів клітинної поверхні, переносяться в потоці рідини. У деяких варіантах здійснення популяції первинних Т-клітин або отримані Т-клітини можуть бути зібрані і збагачені (або збіднені) шляхом препаративного сортування (FACS). У деяких варіантах здійснення антитіла або партнери із зв'язування помічені одним або декількома маркерами, що детектуються, для полегшення розділення для позитивного і/або негативного відбору. Наприклад, розділення може базуватися на скріпленні з флуоресцентно міченими антитілами. У деяких прикладах розділення клітин на основі зв'язування антитіл або інших партнерів зі зв'язування, специфічних до одного або декількох маркерів клітинної поверхні, здійснюють в потоці рідини, наприклад, за допомогою сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS), включаючи препаративний масштаб (FACS) і/або чіпи мікроелектромеханічних систем (MEMS), наприклад, в комбінації з проточно-цитометричною системою виявлення. Такі способи дозволяють проводити позитивний і негативний відбір на безліч маркерів одночасно.

Розділення не повинно призводити до 100 % збагачення або видалення конкретної клітинної популяції або клітин, що експресують певний маркер. Наприклад, відбір або збагачення клітинами певного типу, такими як клітини, що експресують маркер, стосується збільшення кількості або відсотка таких клітин, але не призводить обов'язково до повної відсутності клітин, що не експресують такий маркер. Наприклад, в деяких варіантах здійснення відбір популяції CD3⁺ Т-клітин збагачує вказану популяцію, але також може містити деякий залишковий або невеликий відсоток інших невідібраних клітин, які можуть, в деяких випадках, включати інші клітини, що не є CD3⁺ Т-клітинами, і/або не-Т-клітинну популяцію, які все ще присутні в збагаченій популяції. У деяких варіантах здійснення Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, можуть містити периферичні Т-клітини людини.

У деяких варіантах здійснення розділення або збагачення конкретних типів клітин можна

провести до або після етапу культивування популяції клітин в середовищі культивування. Таким чином, в деяких зразках суміш первинних клітин, виділених із зразка, може бути оброблена з метою розділення або збагачення Т-клітин і видалення (наприклад, зменшення кількості) інших типів клітин або компонентів (наприклад, тромбоцитів і еритроцитів). Потім збагачену популяцію Т-клітин можна культивувати. У альтернативі, в інших прикладах, суміш клітин, що містять Т-клітини і інші типи клітин або компонентів, виділених із зразка, можна культивувати в середовищі культивування без суттєвого розділення або збагачення Т-клітин. Після того, як популяція клітин досягне необхідної кількості або стадія культивування буде по суті завершена, клітини, що культивуються, можуть бути оброблені з метою розділення або збагачення Т-клітин для подальшого застосування, наприклад, адоптивної клітинної терапії або лікування раку.

У деяких варіантах здійснення запропоновані способи можуть включати один або більше різних етапів культивування клітин і популяцій клітин. У деяких варіантах здійснення способи можуть включати один або більше етапів культивування популяції клітин, що виділені із зразка або отримані з існуючої клітинної лінії. У деяких альтернативних варіантах здійснення способи можуть включати один або більше етапів культивування популяції клітин, яка була виділена з суміші клітин, отриманої і виділеної із зразка або отриманої з існуючої клітинної лінії. У деяких з таких варіантів здійснення велика частина популяції клітин (наприклад, щонайменше 20 % або більше від всієї популяції клітин), що підлягає культивуванню, може включати Т-клітини, які були виділені або збагачені з більш ранньої популяції клітин.

У деяких варіантах здійснення безліч клітин, що підлягають культивуванню, зазвичай можна культивувати в ємності, такій як той же блок, камера, лунка, колонка, пробірка, набір трубок, клапан, флакон, чашка для культивування, пакет або інший контейнер для культури або культивування клітин.

Етапи культивування можуть включати щонайменше одне або більше з наступного: культуру, культивування, стимуляцію, активацію, розмноження, в тому числі при інкубуванні в присутності стимулюючих умов, наприклад, умов, призначених для індукції проліферації, розмноження, активації і/або виживання клітин в популяції.

Умови можуть включати одне або більше з конкретних середовищ, температури, вмісту кисню, вмісту діоксиду вуглецю, часу, засобів, наприклад, поживних речовин, амінокислот, антибіотиків, іонів і/або стимулюючих факторів, таких як цитокіни, хемокини, антигени, партнери із зв'язування, злиті білки, рекомбінантні розчинні рецептори і будь-які інші засоби, призначені для активації клітин. У деяких варіантах здійснення один або більше засобів, які призначені для зміни характеристик клітин, можуть бути додані в середовище культивування. Наприклад, один або більше аналогів фукози можуть бути додані в середовище культивування для зміни рівня фукозилування на поверхні клітин, зокрема Т-клітин.

У деяких варіантах здійснення способи, розкриті в цьому документі, включають модифікацію Т-клітин шляхом культивування Т-клітин в присутності аналога фукози. Аналог фукози може бути доданий в середовище культивування клітин. У деяких варіантах здійснення середовище культивування клітин може містити аналог фукози в концентрації від приблизно 1 нг/мл до декількох мг/мл середовища культивування. У деяких варіантах здійснення середовище культивування може містити аналог фукози в концентрації приблизно 1 нг/мл, приблизно 10 нг/мл, приблизно 50 нг/мл, приблизно 100 нг/мл, приблизно 150 нг/мл, приблизно 200 нг/мл, приблизно 250 нг/мл, приблизно 300 нг/мл, приблизно 350 нг/мл, приблизно 400 нг/мл, приблизно 450 нг/мл, приблизно 500 нг/мл, приблизно 550 нг/мл, приблизно 600 нг/мл, приблизно 650 нг/мл, приблизно 700 нг/мл, приблизно 750 нг/мл, приблизно 800 нг/мл, приблизно 950 нг/мл, приблизно 1 мкг/мл, приблизно 10 мкг/мл, приблизно 50 мкг/мл, приблизно 100 мкг/мл, приблизно 150 мкг/мл, приблизно 200 мкг/мл, приблизно 250 мкг/мл, приблизно 300 мкг/мл, приблизно 350 мкг/мл, приблизно 400 мкг/мл, приблизно 450 мкг/мл, приблизно 500 мкг/мл, приблизно 550 мкг/мл, приблизно 600 мкг/мл, приблизно 650 мкг/мл, приблизно 700 мкг/мл, приблизно 750 мкг/мл, приблизно 800 мкг/мл, приблизно 950 мкг/мл, приблизно 1 мг/мл, приблизно 2 мг/мл, приблизно 3 мг/мл, приблизно 4 мг/мл, приблизно 5 мг/мл середовища культивування або більше, або такій, що відповідає будь-якому проміжному значенню з попереднього. У деяких інших варіантах здійснення середовище культивування клітин може містити аналог фукози в кінцевій концентрації від приблизно 1 нМ до декількох мМ в середовищі культивування клітин. У деяких варіантах здійснення середовище культивування може містити аналог фукози в концентрації приблизно 1 нМ, приблизно 10 нМ, приблизно 50 нМ, приблизно 100 нМ, приблизно 150 нМ, приблизно 200 нМ, приблизно 250 нМ, приблизно 300 нМ, приблизно 350 нМ, приблизно 400 нМ, приблизно 450 нМ, приблизно 500 нМ, приблизно 550 нМ, приблизно 600 нМ, приблизно 650 нМ, приблизно 700 нМ, приблизно 750 нМ, приблизно 800 нМ, приблизно 950 нМ, приблизно 1 мкМ, приблизно 10 мкМ, приблизно 50 мкМ, приблизно

100 мкМ, приблизно 150 мкМ, приблизно 200 мкМ, приблизно 250 мкМ, приблизно 300 мкМ, приблизно 350 мкМ, приблизно 400 мкМ, приблизно 450 мкМ, приблизно 500 мкМ, приблизно 550 мкМ, приблизно 600 мкМ, приблизно 650 мкМ, приблизно 700 мкМ, приблизно 750 мкМ, приблизно 800 мкМ, приблизно 950 мкМ, приблизно 1 мМ, приблизно 2 мМ, приблизно 3 мМ, приблизно 4 мМ, приблизно 5 мМ або більше, або такій, що відповідає будь-якому проміжному значенню з попереднього, в її кінцевій концентрації в середовищі культивування клітин.

У деяких варіантах здійснення способи, розкриті в цьому документі, включають активацію Т-клітин одним або більше засобами, що активують Т-клітини, з отриманням популяції активованих Т-клітин. Для отримання популяції активованих Т-клітин може використовуватися будь-яка комбінація одного або більше відповідних засобів, що активують Т-клітини, що включає, без обмеження, антитіло або його функціональний фрагмент, який направлено взаємодіє з молекулою, що стимулює або коstimулює Т-клітини (наприклад, антитілом проти CD2, антитілом проти CD3, антитілом проти CD28 або їх функціональними фрагментами в концентрації від приблизно 1 нг/мл до приблизно 100 нг/мл), Т-клітинним цитокином (наприклад, будь-яким виділеним цитокином, цитокином дикого типу або рекомбінантним цитокином, таким як: інтерлейкін 1 (IL-1), інтерлейкін 2, (IL-2), інтерлейкін 4 (IL-4), інтерлейкін 5 (IL-5), інтерлейкін 7 (IL-7), інтерлейкін 15 (IL-15), фактор некрозу пухлини α (ФНП α) в концентрації від приблизно 1 нг/мл до приблизно 100 нг/мл) або будь-яким іншим прийнятним мітогеном (наприклад, тетрадеканоїлфорболацетат (TPA), фітогемаглютинін (PHA), конканавалін А (conA), ліпополісахарид (LPS), мітоген фітолакі (PWM) в будь-якій необхідній концентрації) або природним лігандом молекули, що стимулює або коstimулює Т-клітини, в будь-якій необхідній концентрації. У деяких переважних варіантах здійснення антитіло проти CD3 (або його функціональний фрагмент), антитіло проти CD28 (або його функціональний фрагмент) або комбінація антитіл проти CD3 і проти CD28 можуть використовуватися відповідно до етапу стимуляції популяції Т-лімфоцитів.

У деяких варіантах здійснення клітини культивують протягом або протягом приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 дні або більше до завершення культивування. У деяких варіантах здійснення клітини можуть субкультивувати один або більше разів, тобто щонайменше деякі клітини, що культивуються, переносять з попереднього середовища культивування в нове середовище культивування до завершення культивування. У деякому іншому варіанті здійснення клітини можуть культивувати один раз до завершення культивування. Будь-які засоби, що додаються в середовище культивування, можна додавати до клітин один або більше разів протягом всього періоду культивування.

У деяких варіантах здійснення концентрація Т-клітин, що культивуються, що застосовується в способах, може становити приблизно $1,0\text{-}10,0 \times 10^6$ клітин/мл. У деяких варіантах здійснення концентрація Т-клітин, що культивуються може становити приблизно $1,0\text{-}2,0 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}3,0 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}4,0 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}5,0 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}6,0 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}7,0 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}8,0 \times 10^6$ клітин/мл, $1,0\text{-}9,0 \times 10^6$ клітин/мл або приблизно $1,0\text{-}10,0 \times 10^6$ клітин/мл. У деяких варіантах здійснення концентрація Т-клітин, що культивуються може становити приблизно $1,0\text{-}2,0 \times 10^6$ клітин/мл. У деяких варіантах здійснення концентрація Т-клітин, що культивуються може становити приблизно $1,0\text{-}1,2 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}1,4 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}1,6 \times 10^6$ клітин/мл, приблизно $1,0\text{-}1,8 \times 10^6$ клітин/мл або приблизно $1,0\text{-}2,0 \times 10^6$ клітин/мл. У деяких варіантах здійснення концентрація лімфоцитів може складати щонайменше приблизно $1,0 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,1 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,2 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,3 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,4 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,5 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,6 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,7 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,8 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $1,9 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $2,0 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $4,0 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $6,0 \times 10^6$ клітин/мл, щонайменше приблизно $8,0 \times 10^6$ клітин/мл або щонайменше приблизно $10,0 \times 10^6$ клітин/мл.

Т-клітини, що культивуються способами, описаними вище, можуть мати знижене поверхнєве фукозилювання. У деяких аспектах знижене поверхнєве фукозилювання може стосуватися зниження або інгібування рівня фукозилювання, який присутній в природному стані на поверхні нормальних Т-клітин. У деяких варіантах здійснення зниження поверхнєвого фукозилювання на Т-клітинах не включає заміну природно присутньої фукози на поверхні Т-клітини аналогом фукози, який штучно введений в Т-клітини.

Т-клітини, що культивуються способами, описаними вище, можуть мати знижене поверхнєве фукозилювання. У деяких варіантах здійснення середнє поверхнєве фукозилювання на Т-

клітинах, що культивуються і отриманих запропонованими способами, може включати щонайменше приблизно 5 % зниження в порівнянні із середнім поверхневим фукозилюванням Т-клітин, що культивуються при відсутності аналога фукози, тобто контрольними Т-клітинами. У деяких варіантах здійснення середнє поверхнєве фукозилювання на Т-клітинах, що культивуються і отриманих запропонованими способами, може включати щонайменше приблизно 10 %, приблизно 15 %, приблизно 20 %, приблизно 25 %, приблизно 30 %, приблизно 35 %, приблизно 40 %, приблизно 45 %, приблизно 50 %, приблизно 55 %, приблизно 60 %, приблизно 65 %, приблизно 70 %, приблизно 75 %, приблизно 80 %, приблизно 85 %, приблизно 90 %, приблизно 95 %, приблизно 97 %, приблизно 99 %, приблизно 100 % зниження в порівнянні із середнім поверхневим фукозилюванням контрольних Т-клітин, які культивували при відсутності аналога фукози. Рівень поверхневого фукозилювання на Т-клітинах може бути визначений за допомогою методик, доступних з рівня техніки, наприклад, проточної цитометрії.

У деяких варіантах здійснення етапу культивування може бути завершений, при цьому можна приступати до етапу збору клітин, що культивуються, щонайменше, деяких клітин, що культивуються досягає необхідного значення, коли запланований період культивування закінчується, і/або якщо середнє поверхнєве фукозилювання на Т-клітинах, що культивуються досягає потрібного рівня (наприклад, щонайменше 5 % зниження або більше в порівнянні із середнім поверхневим фукозилюванням контрольних Т-клітин).

Після завершення етапу культивування, клітини можуть бути зібрані методиками, доступними з рівня техніки. Етап збору може включати одну або більше стадій, такі як центрифугування, промивка, видалення небажаних клітин або компонентів і виділення клітин потрібного типу, як описано в іншій частині цього документа.

У деяких варіантах здійснення популяція клітин, отримана способами, описаними в цьому документі, які включають Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, може бути необов'язково піддана кріоконсервації, щоб клітини можна було використати пізніше, наприклад, для введення при адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку, або для виробництва фармацевтичної композиції для терапії або лікування. Такий спосіб може включати стадію промивання і концентрування популяції необхідних Т-клітин, тобто Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, розчином розріджувача. У деяких варіантах здійснення розчин розріджувача може містити фізіологічний розчин, 0,9 % фізіологічний розчин, PlasmaLyte A, розчин 5 % декстрази/0,45 % NaCl, людський сироватковий альбумін (HSA) або їх комбінацію. У деяких варіантах здійснення HSA можна додавати до промитих і концентрованих клітин для поліпшення життєздатності клітин і відновлення клітин після розмороження. У іншому варіанті здійснення промивальний розчин може бути нормальним фізіологічним розчином, і до промитих і концентрованих клітин можуть додавати HSA (5 %). У деяких варіантах здійснення може бути приготована суміш для кріоконсервації. Суміш для кріоконсервації може включати популяцію клітин, розведену в розчині розріджувача, і відповідний розчин кріоконсерванта. У деяких аспектах розчин кріоконсерванта може бути будь-яким прийнятним розчином кріоконсерванта, доступним з рівня техніки, змішаним з розчином розріджувача отриманих Т-клітин. У деяких варіантах здійснення спосіб також включає етап заморожування суміші для кріоконсервації. У одному аспекті суміш для кріоконсервації заморожують в морозильній камері з регульованою швидкістю при використанні певного циклу заморожування при будь-якій необхідній концентрації клітин, наприклад, від приблизно 10^6 до 10^8 на мл суміші для кріоконсервації. Спосіб також може включати етап зберігання кріоконсерваційної суміші в паровій фазі рідкого азоту.

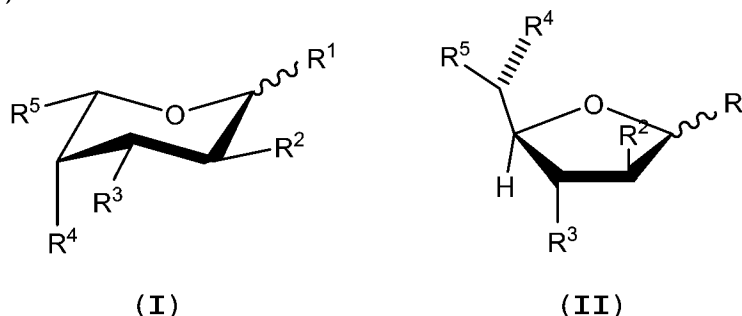
У деяких варіантах здійснення, Т-клітини, отримані способами, запропонованими в цьому документі, наприклад, Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, можуть застосовуватися в адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку. Наприклад, отримані Т-клітини можуть вводити суб'єкту, що потребує терапії або лікування. У деяких варіантах здійснення, Т-клітини, отримані способами, запропонованими в цьому документі, наприклад, Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, можуть застосовуватися для виготовлення фармацевтичної композиції, яка може застосовуватися в адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку.

II-2. Способи отримання *in vivo*

У деяких аспектах в цьому документі запропоновані способи *in vivo* отримання Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання. Способи можуть включати надання аналога фукози тварині і отримання Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, у тварини. Т-клітини, отримані цими способами, можуть мати знижене поверхнєве фукозилювання в порівнянні з Т-клітинами, присутніми в організмі, або отриманими від тварини, якій не був

наданий аналог фукози. Такі Т-клітини, отримані способами, розкритими в цьому документі, можуть застосовуватися в терапевтичних цілях, таких як адоптивна клітинна терапія або лікування раку. Таким чином, щонайменше, в деяких варіантах здійснення, Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилування, називаються "терапевтичними Т-клітинами".

5 У деяких варіантах здійснення аналог фукози, що застосовується в способах, може мати формулу (I) або (II):



або являє собою відповідну фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою;

10 де R² є галогеном; кожний з R¹, R³ і R⁴ незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R⁵ є -CH₃, або

де кожний з R¹, R², R³ і R⁴ незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R⁵ є алкінілом.

У деяких варіантах здійснення R² є -F.

У деяких варіантах здійснення R⁵ є -C≡CH.

У деяких варіантах здійснення аналог фукози, що застосовується в способах, має формулу (I) або (II), де R² є галогеном; кожний з R¹, R³ і R⁴ незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R⁵ є -CH₃, або де кожний з R¹, R², R³ і R⁴ незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R⁵ є -C≡CH.

У деяких варіантах здійснення аналог фукози, що застосовується в способах, має формулу (I) або (II), де R² є -F; кожний з R¹, R³ і R⁴ незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R⁵ є -CH₃, або де кожний з R¹, R², R³ і R⁴ незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R⁵ є -C≡CH.

У деяких вібраних варіантах здійснення формули (I) або (II), R² є галогеном; кожний з R¹, R³ і R⁴ незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R⁵ є -CH₃. У деяких вібраних варіантах здійснення формули (I) або (II) R² є -F; кожний з R¹, R³ і R⁴ незалежно є -ОН або складноефірною групою, що здатна до гідролізу; і R⁵ є -CH₃.

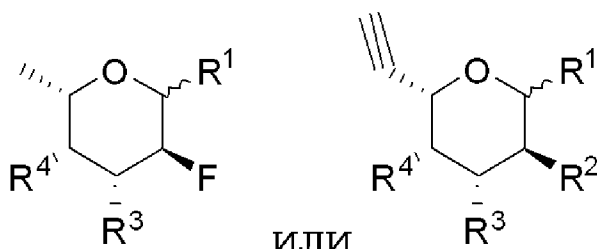
У деяких вібраних варіантах здійснення формули (I) або (II) кожний з R¹, R², R³ і R⁴ незалежно вибраний з -ОН або гідролізованою складноефірною групи; і R⁵ є -C≡CH.

У деяких варіантах здійснення складноефірна група, що здатна до гідролізу є -OC(O)C₁-C₁₀ алкілом. У деяких вібраних варіантах здійснення складноефірна група, що здатна до гідролізу є -OC(O)CH₃.

35 У деяких вібраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R² є -F, кожний з R¹, R³ і R⁴ незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і -OC(O)C₁-C₁₀ алкілу. У деяких вібраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R² є -F, кожний з R¹, R³ і R⁴ незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і -OC(O)CH₃. У одному певному варіанті здійснення формули (I) або (II), R² є -F, і кожний з R¹, R³ і R⁴ є -ОН.

40 У деяких вібраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R⁵ є -C≡CH, кожний з R¹, R², R³ і R⁴ незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і -OC(O)C₁-C₁₀ алкілу. У деяких вібраних варіантах здійснення формули (I) або (II), де R⁵ є -C≡CH, кожний з R¹, R², R³ і R⁴ незалежно вибраний з групи, що складається з -ОН і -OC(O)CH₃. У одному певному варіанті здійснення формули (I) або (II) R⁵ є -C≡CH, і кожний з R¹, R², R³ і R⁴ є -ОН. У іншому певному варіанті здійснення формули (I) або (II) R⁵ є -C≡CH, і кожний з R¹, R², R³ і R⁴ є -OAc.

45 У деяких вібраних варіантах здійснення аналог фукози, що застосовується в способах, має формулу:



або являє собою відповідну альдозну форму, де кожний з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 є таким, як визначено і описано в цьому документі.

У деяких вибраних варіантах здійснення аналогом фукози є 2-дезоксид-2-фтор- α -L-фукоза.

У деяких вибраних варіантах здійснення аналог фукози є перацетатом алкінілфукози. Peraцетат алкінілфукози може бути тетраацетатом алкінілфукози, триацетатом алкінілфукози, діацетатом алкінілфукози, моноацетатом алкінілфукози або їх комбінаціями. У одному прикладі здійснення аналогом фукози є (3S, 4R, 5R, 6S)-6-етинілтетрагідро-2H-піран-2,3,4,5-тетраїл-тетраацетат або 5-(S)-1-гідроксипроп-2-ін-1-он)тетрагідрофуран-2,3,4-триїл-триацетат.

У будь-якому з різних варіантів здійснення внутрішньокільцевий атом кисню в аналогу фукози формули (I) і (II) може бути замінений сіркою.

Способи, запропоновані в цьому документі, можуть включати етап надання аналога фукози тварині. Надання аналога фукози тварині може бути здійснене різними способами введення. Аналог фукози в деяких варіантах здійснення можна вводити тварині із застосуванням

стандартних методів введення, включаючи пероральне, внутрішньовенне, внутрішньочеревинне, підшкірне, легеневе, трансдермальне, внутрішньом'язове, інтраназальне, букальне, сублінгвальне або супозиторне введення. У деяких варіантах здійснення популяції клітин вводять парентерально. Термін "парентеральний" при використанні в цьому документі включає внутрішньовенне, внутрішньом'язове, підшкірне, ректальне, вагінальне і внутрішньочеревинне введення. У деяких варіантах здійснення популяції клітин вводять суб'єкту із застосуванням периферичної системної доставки шляхом внутрішньовенної, внутрішньочеревинної або підшкірної ін'єкції. У деяких варіантах здійснення аналог фукози може бути введений тваринному перорально.

У деяких варіантах здійснення способи, розкриті в цьому документі, дають Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилування, які можуть застосовуватися в адаптивній клітинній терапії або лікуванні раку у суб'єкта, що перебуває такої терапії або лікування.

У деяких варіантах здійснення клітинна терапія, наприклад, адаптивна клітинна терапія або лікування раку, із застосуванням Т-клітин може бути проведена шляхом аутологічного перенесення, при якому клітини виділяють і/або іншим чином готують при виділенні у суб'єкта, який повинен отримати клітинну терапію або лікування, або із зразка, отриманого у такого суб'єкта. Таким чином, в деяких аспектах аналог фукози може бути наданий або введений суб'єкту, наприклад, пацієнту, що потребує лікування, і отримані внаслідок Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилуванням після виділення і обробки вводять тому ж суб'єкту.

У деяких варіантах здійснення клітинна терапія, наприклад, адаптивна клітинна терапія або лікування раку, із застосуванням Т-клітин може бути проведена шляхом алогенного перенесення, при якому клітини виділяють і/або іншим чином готують при виділенні у суб'єкта, який не є суб'єктом, який повинен отримувати або який, зрештою, отримує клітинну терапію або лікування, наприклад, у першого суб'єкта. У таких варіантах здійснення клітини потім вводять іншому суб'єкту, наприклад, другому суб'єкту, що стосується того ж виду. У деяких варіантах здійснення перший і другий суб'єкти генетично ідентичні. У деяких варіантах здійснення перший і другий суб'єкти генетично подібні. У деяких варіантах здійснення перший і другий суб'єкти не стосуються одного виду, наприклад, перший суб'єкт є людиною, а другий суб'єкт є твариною, що не стосується людини. Т-клітини, отримані у другого суб'єкта, можуть бути виділені і оброблені для терапії або лікування першого суб'єкта.

Ефективна кількість аналога фукози може бути надана тварині. Ефективна кількість може стосуватися кількості аналога фукози, яка є достатньою, щоб забезпечити потрібний результат, тобто отримання Т-клітин зі зниженим поверхневим фукозилуванням. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість аналога фукози може складати від приблизно 1 до приблизно 500 мг аналога фукози/кг маси тіла. У деяких варіантах здійснення, де аналог фукози надають або вводять перорально, наприклад, при годуванні кормом або з водою, доза аналога фукози при пероральному введенні, що вводиться тварині, може складати від приблизно 1 мг/кг до приблизно 1 г/кг маси тіла тваринного, більш типово від приблизно 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30

мг/кг, 40 мг/кг або 50 мг/кг до приблизно 1 г/кг маси тіла тварини. У деяких аспектах доза, що вводиться тварині, складає від приблизно 1 г, приблизно 5 г або приблизно 10 г до приблизно 150 г в день, або від приблизно 1 г, приблизно 5 г, приблизно 10 г, приблизно 15 г або приблизно 20 г до приблизно 60 г в день. У деяких варіантах здійснення аналог фукози можна надати з кормом або водою в будь-якій необхідній кількості, яка є прийнятною для того, щоб спричинити зниження поверхневого фукозилювання у тварини, що одержує аналог фукози з кормом.

Аналог фукози, що застосовується в способах, описаних в цьому документі, в деяких варіантах здійснення можна вводити тварині спільно з однією або більше додатковими фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною або носієм, одночасно або послідовно в будь-якому порядку.

У деяких варіантах здійснення аналог фукози або його композицію можуть вводити протягом деякого періоду, наприклад, від одного до декількох днів, від одного до декількох тижнів, від одного до декількох місяців або довше, з перервою або без. У деяких варіантах здійснення аналог фукози або його композицію можуть вводити по схемі введення разів на день, раз на тиждень, раз на два тижні або раз на місяць.

У деяких варіантах здійснення надання або введення аналога фукози тварині може бути закінчено при досягненні необхідного результату, наприклад, середнє поверхнєве фукозилювання Т-клітин, отриманих у тварини, знижене на будь-яке відсоткове значення, наприклад, від приблизно 5 % до приблизно 95 % в порівнянні з контрольними Т-клітинами.

Способи, запропоновані в цьому документі, можуть включати етап отримання суміші клітини, наприклад, Т-клітин, отриманих у тварини, що отримувала аналог фукози. Отримані клітини можуть включати Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням.

Т-клітини, що культивуються способами, описаними вище, можуть мати знижене поверхнєве фукозилювання. У деяких аспектах знижене поверхнєве фукозилювання може стосуватися зниження або інгібування рівня фукозилювання, який в природному стані присутній на поверхні нормальних Т-клітин. У деяких варіантах здійснення зниження поверхневого фукозилювання на Т-клітинах не включає заміну природно присутньої фукози на поверхні Т-клітини аналогом фукози, який штучно введений в Т-клітини.

Т-клітини, отримані способами, описаними вище, можуть мати знижене поверхнєве фукозилювання. У деяких варіантах здійснення середнє поверхнєве фукозилювання на Т-клітинах, отриманих у тварини, що отримувала аналог фукози, може включати щонайменше приблизно 5 % зниження в порівнянні із середнім поверхневим фукозилюванням Т-клітин, присутніх або отриманих у тварини, що не отримувала аналог фукози, тобто контрольних Т-клітин. У деяких інших варіантах здійснення середнє поверхнєве фукозилювання на Т-клітинах, отриманих у тварини, що отримувала аналог фукози, може включати щонайменше приблизно 10 %, приблизно 15 %, приблизно 20 %, приблизно 25 %, приблизно 30 %, приблизно 35 %, приблизно 40 %, приблизно 45 %, приблизно 50 %, приблизно 55 %, приблизно 60 %, приблизно 65 %, приблизно 70 %, приблизно 75 %, приблизно 80 %, приблизно 85 %, приблизно 90 %, приблизно 95 %, приблизно 97 %, приблизно 99 %, приблизно 100 % зниження в порівнянні із середнім поверхневим фукозилюванням контрольних Т-клітин, які присутні або отримані у тварини, що не отримувала аналог фукози протягом щонайменше за декілька годин, декілька днів, декілька тижнів, декілька місяців або більше до дослідження або отримання контрольних Т-клітин. Рівень поверхневого фукозилювання на Т-клітинах може бути визначений за допомогою методів, доступних з рівня техніки, наприклад, проточної цитометрії.

У деяких варіантах здійснення Т-клітини і популяції клітин можуть бути виділені із зразка, такого як біологічний зразок, який отриманий або який походить від тварини, що отримувала аналог фукози. Зразки можуть включати тканину, рідину і інші зразки, взяті безпосередньо у тварини. Біологічний зразок може бути зразком, отриманим безпосередньо з біологічного джерела, або зразком, який оброблений. Біологічні зразки включають, без обмеження, фізіологічні рідини, такі як кров, плазму, сироватку, зразки тканин і органів, таких як селезінка, включаючи оброблені зразки, отримані з них. Приклади зразків включають суцільну кров, моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК), лейкоцити, кістковий мозок, тимус, зразки біопсії тканини, пухлину, лейкоз, лімфому, лімфатичний вузол, лімфоїдну тканину кишечника, лімфоїдну тканину слизової оболонки, селезінку, інші лімфоїдні тканини, печінку, легеню, шлунок, кишечник, товсту кишку, нирку, підшлункову залозу, молочну залозу, кістку, передміхурову залозу, шийку матки, яєчки, яєчники, мигдалики або інший орган і/або клітини, отриманий з них.

У деяких варіантах здійснення, після отримання Т-клітин і популяції клітин у тварини, може бути присутня одна або більше стадій обробки, такі як розділення, центрифугування, промивка,

інкубування і/або культивування отриманих клітин. У деяких варіантах здійснення отримана популяція клітин, що містить Т-клітини, може бути оброблена для виділення або збагачення Т-клітин і видалення (або зменшення кількості) інших типів клітин (наприклад, еритроцитів) і/або компонентів (наприклад, тромбоцитів). У деяких варіантах здійснення отриману популяцію клітин або додатково збагачені Т-клітини можуть культивувати в середовищі культивування клітин при використанні методик, доступних з рівня техніки, для підтримання клітин і/або збільшення кількості клітин, достатньої для подальшого застосування, наприклад, адоптивної клітинної терапії або лікування раку, або для виготовлення фармацевтичних композицій. У деяких варіантах здійснення Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням, отримані у тварини або додатково культивовані після виділення у тварини, можуть зберігатися для подальшого застосування, наприклад, при використанні методів кріоконсервації, доступних з рівня техніки або описаних в іншій частині цього документа.

У деяких варіантах здійснення Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, які отримані способами отримання *in vivo*, описаними в цьому документі, можуть застосовуватися в адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку. У деяких варіантах здійснення отримані Т-клітини, отримані у тварини або додатково культивовані після виділення у тварини, можуть бути введені суб'єкту, що потребує такої терапії або лікування. У деяких варіантах здійснення отримані Т-клітини, отримані у тварини або додатково культивовані після виділення у тварини, можуть застосовуватися для виготовлення фармацевтичної композиції, яка може застосовуватися в адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку. У деяких варіантах здійснення тварина є людиною.

Способи отримання, описані в цьому документі, можуть додатково включати стадію модифікації популяції Т-клітин. Наприклад, популяція Т-клітин може бути трансдукована вірусним вектором, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує рецептор клітинної поверхні, з отриманням популяції трансдукованих Т-клітин. Декілька рекомбінантних вірусів використовувалися як вірусні вектори для доставки генетичного матеріалу в клітину. Вірусні вектори, які можна використати відповідно зі стадією трансдукції, можуть бути будь-яким екотропним або амфотропним вірусним вектором, що включає, не обмежуючись перерахованим, рекомбінантні ретровірусні вектори, рекомбінантні лентівірусні вектори, рекомбінантні аденовірусні вектори і рекомбінантні вектори на основі аденоасоційованого вірусу (AAV). Будь-які прийнятні середовища і/або добавки для вирощування вірусних векторів можуть використовуватися в інокуляції вірусного вектора відповідно зі способами, відомими в даній галузі. У одному варіанті здійснення вірусний вектор містить гетерологічний ген, що кодує рецептор клітинної поверхні. У одному конкретному варіанті здійснення рецептор клітинної поверхні здатний зв'язувати антиген на поверхні клітини-мішені, наприклад, на поверхні пухлинної клітини.

IV. Фармацевтичні композиції для адоптивної клітинної терапії або лікування раку

Популяції клітин або Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, які отримані вищеописаними способами отримання, можуть бути включені в композицію для застосування в адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку. Необхідні Т-клітини (або терапевтичні Т-клітини), тобто Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, або суміш клітин, що містить такі Т-клітини, можуть бути включені в фармацевтичні композиції, що включають терапевтично або профілактично ефективну кількість необхідних Т-клітин і один або більше фармацевтично сумісних (прийнятних) компоненти. У деяких аспектах можуть бути запропоновані фармацевтичні композиції терапевтичних Т-клітин і фармацевтичних допоміжних речовин, в яких ефективна кількість Т-клітин знаходиться в суміші з допоміжними речовинами, прийнятними для введення суб'єкту. У переважних аспектах терапевтичні Т-клітини і їх фармацевтична композиція виготовлені у формі для введення людині. Таким чином, в даному описі запропонована фармацевтична композиція, що включає Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням, що виготовлена у формі для введення людині. Готова композиція зазвичай може включати одну або більше фармацевтично сумісних (прийнятних) допоміжних речовин або носіїв.

Матеріали, що використовуються при виготовленні фармацевтичних композицій, можуть бути нетоксичними в кількостях, що застосовуються. Середнім фахівцям в даній галузі буде очевидно, що оптимальна доза діючої речовини (речовин) у фармацевтичній композиції буде залежати від безлічі факторів. Відповідні фактори включають, без обмеження, тип тварини (наприклад, людину), спосіб введення, композицію, що застосовується і важкість захворювання або стану, що піддається лікуванню.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можуть бути у формі рідини, наприклад, настоянки, сиропу, розчину, емульсії або суспензії. У деяких варіантах здійснення

рідина може підходити для доставки шляхом ін'єкції. У композиції для введення шляхом ін'єкції (як описано вище) також може бути включене одне або більше з поверхово-активної речовини, консерванту, змочувальної речовини, диспергуючої речовини, суспендуючої речовини, буфера, стабілізатора і ізотонічної речовини.

Фармацевтичні композиції, описані в цьому документі, можуть бути в будь-якій формі, яка дозволяє вводити композицію тварині (наприклад, людині). Типові шляхи введення включають, не обмежуючись перерахованими, пероральний, парентеральний і сублінгвальний. Парентеральне введення включає підшкірні ін'єкції, внутрішньочеревинні ін'єкції, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньогрудинну ін'єкцію або методи інфузії. Ці фармацевтичні композиції можуть бути виготовлені в формі, що дозволяє Т-клітинам зі зниженим поверхневим фукозилюванням бути ефективними при введенні композиції суб'єкту, що потребує терапії або лікування.

V. Терапевтичні способи

У деяких аспектах в цьому документі запропоновані способи проведення адаптивної клітинної терапії у суб'єкта. Способи можуть включати введення Т-клітин зі зниженим поверхневим фукозилюванням суб'єкту, що потребує клітинної терапії.

У деяких варіантах здійснення способи, розкриті в цьому документі, передбачають адаптивну клітинну терапію у суб'єкта. Проведення адаптивної клітинної терапії у суб'єкта може включати етап введення суб'єкту суміші клітин, яка включає Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання (тобто терапевтичні Т-клітини). У деяких варіантах здійснення суб'єкт може потребувати такої терапії. У деяких варіантах здійснення проведення адаптивної клітинної терапії у суб'єкта також може включати етап отримання терапевтичних Т-клітин для терапії згідно з будь-яким зі способів *in vitro* і *in vivo*, описаних в іншій частині цього документа.

У деяких варіантах здійснення адаптивна клітинна терапія може бути вибрана з групи, що складається з імунотерапії інфільтруючими пухлину лімфоцитами (TIL), терапії аутологічними клітинами, терапії генно-інженерно модифікованими аутологічними клітинами (eACTTM), трансплантації алогенних Т-клітин, не-Т-клітинної трансплантації і будь-якої їх комбінації. У деяких варіантах здійснення адаптивна клітинна терапія може в широкому значенні включати будь-який спосіб відбору, збагачення *in vitro* і введення пацієнту аутологічних або алогенних Т-клітин, які розпізнають і здатні зв'язувати пухлинні клітини. Імунотерапія TIL є типом адаптивної Т-клітинної терапії, при якій лімфоцити, які здатні проникати в пухлинну тканину, виділяють, збагачують *in vitro* і вводять пацієнту. Клітини TIL можуть бути або аутологічними, або алогенними. Аутологічна клітинна терапія - це адаптивна Т-клітинна терапія, яка включає виділення у пацієнта Т-клітин, здатних направлено впливати на пухлинні клітини, збагачення Т-клітин *in vitro* і введення Т-клітин знову тому ж пацієнту. Алогенна трансплантація Т-клітин може включати трансплантацію природних Т-клітин, розмнжених *ex vivo*, або генно-інженерно модифікованих Т-клітин. Терапія генно-інженерно модифікованими аутологічними клітинами є адаптивною Т-клітинною терапією, в якій власні лімфоцити пацієнта виділяють, генетично модифікують для експресії молекули, що направлено взаємодіє з пухлиною, розмнжують *in vitro* і вводять знову пацієнту. Не-Т-клітинна трансплантація може включати аутологічну або алогенну терапію з використанням клітин, що не є Т-клітинами, таких як, без обмеження, природні кілерні (NK) клітини.

У деяких аспектах в цьому документі запропоновані способи лікування раку. Такі способи можуть включати введення Т-клітин зі зниженим поверхневим фукозилюванням суб'єкту, що потребує такого лікування. У деяких варіантах здійснення способи також можуть включати етап отримання терапевтичних Т-клітин для лікування згідно з будь-яким зі способів *in vitro* і *in vivo*, описаних в іншій частині цього документа.

У деяких аспектах Т-клітини, що застосовуються в адаптивній клітинній терапії або лікуванні раку згідно зі способами, розкритими в цьому документі, є терапевтичними Т-клітинами, які мають знижене поверхнєве фукозилювання в порівнянні з контрольними Т-клітинами. У деяких аспектах знижене поверхнєве фукозилювання може стосуватися зниження або інгібування рівня фукозилювання, яке в природному стані присутнє на поверхні нормальних Т-клітин. У деяких варіантах здійснення знижене поверхнєве фукозилювання на Т-клітинах не включає заміну природно присутньої фукози на поверхні Т-клітини аналогом фукози, який штучно введений в Т-клітини.

Як описано раніше, в деяких варіантах здійснення Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням, що застосовуються в адаптивній клітинній терапії або лікуванні раку, можуть походити від того ж суб'єкта, який буде отримувати терапію або лікування, тобто аутологічну терапію або лікування, або від суб'єкта, який відрізняється від суб'єкта, який буде отримувати терапію або лікування, тобто алогенну терапію або лікування.

У деяких аспектах Т-клітини, що застосовуються в адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку відповідно зі способами, розкритими в цьому документі, є терапевтичними Т-клітинами, які мають знижене поверхнєве фукозилювання в порівнянні з контрольними Т-клітинами. У деяких варіантах здійснення, зокрема, коли аутологічна терапія або лікування призначені пацієнту-людині, Т-клітини, отримані від одного і того ж пацієнта, можуть бути оброблені відповідно зі способами *in vitro* або *in vivo*, розкритими в цьому документі, з отриманням терапевтичних Т-клітин. У таких варіантах здійснення контрольні Т-клітини можуть стосуватися: (1) популяції Т-клітин, присутньої або отриманої від нормальної, здорової людини, або (2) популяції Т-клітин, які були присутні або були отримані від того ж пацієнта до отримання терапевтичних Т-клітин. У деяких інших варіантах здійснення, зокрема, коли алогенна терапія або лікування призначені пацієнту-людині, Т-клітини, отримані від донора, який не є пацієнтом, можуть бути оброблені відповідно зі способами *in vitro* або *in vivo*, розкритими в цьому документі, з отриманням терапевтичних Т-клітин. У таких варіантах здійснення контрольні Т-клітини можуть стосуватися популяції Т-клітин, які були присутні або були отримані від донора до отримання терапевтичних Т-клітин. У деяких інших варіантах здійснення, коли алогенна терапія або лікування призначені пацієнту-людині, а терапевтичні Т-клітини, що використовуються в терапії або лікуванні, походять від тварини, що не стосується людини (тобто тварини-донора), контрольні Т-клітини можуть стосуватися: (1) популяції Т-клітин, присутньої або отриманої від нормальної, здорової тварини, що не стосується людини, або (2) популяції Т-клітин, які були присутні або були отримані від тварини-донора до отримання терапевтичних Т-клітин.

У деяких варіантах здійснення середнє поверхнєве фукозилювання на терапевтичних Т-клітинах, що застосовуються в адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку згідно зі способами, розкритими в цьому документі, може включати щонайменше приблизно 5 % зниження порівняно із середнім поверхневим фукозилюванням контрольних Т-клітин. У деяких інших варіантах здійснення середнє поверхнєве фукозилювання на Т-клітинах, отриманих від тварини, що отримувала аналог фукози, може включати щонайменше приблизно 10 %, приблизно 15 %, приблизно 20 %, приблизно 25 %, приблизно 30 %, приблизно 35 %, приблизно 40 %, приблизно 45 %, приблизно 50 %, приблизно 55 %, приблизно 60 %, приблизно 65 %, приблизно 70 %, приблизно 75 %, приблизно 80 %, приблизно 85 %, приблизно 90 %, приблизно 95 %, приблизно 97 %, приблизно 99 %, приблизно 100 % зниження порівняно із середнім поверхневим фукозилюванням контрольних Т-клітин. Рівень поверхневого фукозилювання на Т-клітинах може бути визначений за допомогою методів, доступних з рівня техніки, наприклад, проточної цитометрії.

У деяких аспектах способи, розкриті в цьому документі для забезпечення адоптивної клітинної терапії або лікування раку, призначені для лікування будь-яких захворювань, станів і порушень, що включає, не обмежуючись перерахованими, рак молочної залози, рак стравоходу, колоректальний, підшлункової залози, шлунку, стромальні пухлини ШКТ, гепатоцелюлярний, печінки, легені, дрібноклітинний легені, яєчника, матки, шийки матки, сечового міхура, нирки, товстої кишки, тонкої кишки, рак шлунку, лімфому, передміхурової залози, яєчка, карциному щитовидної залози, злоякісної меланому, увеальну меланому, множинну мієлому, мезотеліому, остеогенну саркому, хондросаркому, міосаркому, гліобластому, саркому, гліому або інші пухлини головного мозку, голови/шиї, інші шлунково-кишкові пухлини і ембріонально-клітинні пухлини, гемобластози, лейкоз, лімфому, наприклад, хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ), ГЛЛ, неходжкінську лімфому, гострий мієлоїдний лейкоз, множинну мієлому, рефрактерну фолікулярну лімфому, мантийноклітинну лімфому, індолентну В-клітинну лімфому, В-клітинні неоплазії, ракові пухлини шкіри (включаючи меланому), ракові пухлини кістки, епітеліальні ракові пухлини, ниркоподібно-клітинну карциному, аденокарциному підшлункової залози, лімфому Ходжкіна, гліобластому, нейробластому, саркому Юінга, медулобластому, синовіальну саркому і/або мезотеліому.

У деяких аспектах способи, розкриті в цьому документі для забезпечення адоптивної клітинної терапії або лікування раку, включають етап введення суб'єкту Т-клітин зі зниженим поверхневим фукозилюванням, тобто терапевтичних Т-клітин. У деяких варіантах здійснення терапевтичні Т-клітини можуть бути виготовлені, необов'язково з одним або більше фармацевтично прийнятними інгредієнтами, в формі фармацевтичних композицій, як описано в цьому документі, для введення тварині (наприклад, людині). У деяких аспектах терапевтичні Т-клітини або їх фармацевтичні композиції можна вводити, без обмеження, перорально, парентерально і сублінгвально. Парентеральне введення включає підшкірні ін'єкції, внутрішньочеревинні ін'єкції, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньогрудні ін'єкції або інфузії. Такі фармацевтичні композиції можуть бути виготовлені в такій формі, яка дозволяє Т-клітинам зі зниженим поверхневим фукозилюванням бути ефективними при введенні композиції

тварині.

У деяких варіантах здійснення терапевтичні Т-клітини або фармацевтичні композиції, що містять терапевтичні Т-клітини, можна вводити (наприклад, шляхом ін'єкції) в ділянку локалізації або поблизу ракових клітин, тобто місцеве введення. Наприклад, якщо рак виявлений в органі (наприклад, в печінці), фармацевтичні композиції можна вводити шляхом ін'єкції в ділянки, в яких ракові клітини знаходяться в печінці або в безпосередній близькості від ракових клітин (наприклад, від декількох міліметрів до декількох сантиметрів від ділянки локалізації ракових клітин). У альтернативних варіантах здійснення терапевтичні Т-клітини або фармацевтичні композиції можна вводити (наприклад, шляхом ін'єкції) в кровоносну систему пацієнта (наприклад, в кровоносні судини), тобто вводити системно таким чином, щоб терапевтичні Т-клітини могли досягати цільової ділянки(ок), в якій присутні патологічні клітини, через кровоносну систему пацієнта. У деяких варіантах здійснення терапевтичні Т-клітини можуть додатково містити компонент, який специфічно зв'язує антиген клітинної поверхні клітини або захворювання, на яке треба впливати, наприклад, пухлинну клітину або ракову клітину. Таким чином, терапевтичні Т-клітини можуть досягати і надавати терапевтичну дію відносно клітин-мішеней зі специфічністю після доставки через кровоносну систему.

У деяких варіантах здійснення Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, тобто терапевтичні Т-клітини, або їх фармацевтичні композиції, можуть вводити в кількості, яка є ефективною для отримання необхідного результату або ефекту, наприклад, лікування захворювання або стану, такий як фармацевтично ефективна кількість. Таким чином, в деяких варіантах здійснення, способи введення включають введення терапевтичних Т-клітин або їх фармацевтичних композицій в ефективних кількостях суб'єкту, що потребує адоптивної клітинної терапії або лікування раку. Терапевтичну ефективність в деяких варіантах здійснення можна контролювати шляхом періодичного обстеження суб'єктів, що проходять лікування. При повторних введеннях за декілька днів або довше, в залежності від стану, лікування повторюють, поки не буде спостерігатися необхідна супресія симптомів захворювання. У деяких варіантах здійснення можуть бути прийнятними і можуть бути визначені інші схеми застосування. Потрібна доза може бути доставлена при однократному введенні терапевтичних Т-клітин або їх фармацевтичних композицій, при багаторазовому введенні або при безперервному введенні.

У деяких варіантах здійснення Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, тобто терапевтичні Т-клітини, або їх фармацевтичні композиції можна вводити в кількості, яка є ефективною для досягнення необхідного результату або ефекту, наприклад, для лікування захворювання або стану, суб'єкту, що потребує такої терапії або лікування. Необхідний результат або ефект, який необхідно досягнути шляхом введення терапевтичних Т-клітин або їх фармацевтичних композицій відповідно зі способами, описаними в цьому документі, може включати один або більше з наступних результатів в порівнянні з ситуацією до введення:

(i) зменшення осередків (цільових і/або нецільових осередків, вимірених за допомогою комп'ютерної томографії або фізикального обстеження на предмет видимих пошкоджень, щонайменше приблизно на 99 %, щонайменше приблизно на 95 %, щонайменше приблизно на 90 %, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 70 %, щонайменше приблизно на 60 %, щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 45 %, щонайменше приблизно на 40 %, щонайменше приблизно на 35 %, щонайменше приблизно на 30 %, щонайменше приблизно на 25 %, щонайменше приблизно на 20 %, щонайменше приблизно на 15 %, щонайменше приблизно на 10 % або щонайменше приблизно на 5 %, наприклад, від приблизно 30 % до приблизно 99 %, від приблизно 80 % до приблизно 90 %, від приблизно 70 % до приблизно 90 %, від приблизно 60 % до приблизно 90 %, від приблизно 50 % до приблизно 90 %, від приблизно 40 % до приблизно 90 %, від приблизно 35 % до приблизно 90 %, від приблизно 30 % до приблизно 90 %, від приблизно 25 % до приблизно 90 %, від приблизно 5 % до приблизно 85 % або від приблизно 10 % до приблизно 80 % (фактична зміна в % або середня зміна у % в порівнянні з ситуацією до введення терапевтичних Т-клітин або їх фармацевтичних композицій);

(ii) зникнення (тобто зменшення) метастазів раку, виміряне за допомогою біопсії, магнітно-резонансної томографії або інших прийнятних методів, щонайменше приблизно на 99 %, щонайменше приблизно на 95 %, щонайменше приблизно на 90 %, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 70 %, щонайменше приблизно на 60 %, щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 45 %, щонайменше приблизно на 40 %, щонайменше приблизно на 35 %, щонайменше приблизно на 30 %, щонайменше приблизно на 25 %, щонайменше приблизно на 20 %, щонайменше приблизно на 15 %, щонайменше приблизно на 10 % або щонайменше приблизно на 5 %, наприклад, від приблизно 30 % до приблизно 99 %, від приблизно 80 % до приблизно 90 %, від приблизно 70 % до приблизно 90 %

90 %, від приблизно 60 % до приблизно 90 %, від приблизно 50 % до приблизно 90 %, від приблизно 40 % до приблизно 90 %, від приблизно 35 % до приблизно 90 %, від приблизно 30 % до приблизно 90 %, від приблизно 25 % до приблизно 90 %, від приблизно 5 % до приблизно 85 % або від приблизно 10 % до приблизно 80 % (фактична зміна в % або середня зміна у % в порівнянні з ситуацією до введення терапевтичної Т-клітини або її фармацевтичної композиції);

(iii) зменшення пухлинного навантаження (наприклад, кількості ракових клітин, розміру пухлини або кількості раку в організмі) щонайменше приблизно на 99 %, щонайменше приблизно на 95 %, щонайменше приблизно на 90 %, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 70 %, щонайменше приблизно на 60 %, щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 45 %, щонайменше приблизно на 40 %, щонайменше приблизно на 35 %, щонайменше приблизно на 30 %, щонайменше приблизно на 25 %, щонайменше приблизно на 20 %, щонайменше приблизно на 15 %, щонайменше приблизно на 10 % або, щонайменше приблизно на 5 %, наприклад, від приблизно 30 % до приблизно 99 %, від приблизно 80 % до приблизно 90 %, від приблизно 70 % до приблизно 90 %, від приблизно 60 % до приблизно 90 %, від приблизно 50 % до приблизно 90 %, від приблизно 40 % до приблизно 90 %, від приблизно 35 % до приблизно 90 %, від приблизно 30 % до приблизно 90 %, від приблизно 25 % до приблизно 90 %, від приблизно 5 % до приблизно 85 % або від приблизно 10 % до приблизно 80 % (фактична зміна в % або середня зміна у % в порівнянні з ситуацією до введення терапевтичних Т-клітин або їх фармацевтичних композицій);

(iv) збільшення виживання без прогресування (ВБП) щонайменше приблизно на 99 %, щонайменше приблизно на 95 %, щонайменше приблизно на 90 %, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 70 %, щонайменше приблизно на 60 %, щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 45 %, щонайменше приблизно на 40 %, щонайменше приблизно на 35 %, щонайменше приблизно на 30 %, щонайменше приблизно на 25 %, щонайменше приблизно на 20 %, щонайменше приблизно на 15 % при щонайменше приблизно на 10 % або, щонайменше приблизно на 5 %, наприклад, від приблизно 30 % до приблизно 99 %, від приблизно 80 % до приблизно 90 %, від приблизно 70 % до приблизно 90 %, від приблизно 60 % до приблизно 90 %, від приблизно 50 % до приблизно 90 %, від приблизно 40 % до приблизно 90 %, від приблизно 35 % до приблизно 90 %, від приблизно 30 % до приблизно 90 %, від приблизно 25 % до приблизно 90 %, від приблизно 5 % до приблизно 85 % або від приблизно 10 % до приблизно 80 % (фактична зміна в % або середня зміна у % в порівнянні з ситуацією до введення терапевтичних Т-клітин або їх фармацевтичних композицій); і/або

(v) збільшення загального виживання (ЗВ) щонайменше приблизно на 99 %, щонайменше приблизно на 95 %, щонайменше приблизно на 90 %, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 70 %, щонайменше приблизно на 60 %, при щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 45 %, щонайменше приблизно на 40 %, щонайменше приблизно на 35 %, щонайменше приблизно на 30 %, щонайменше приблизно на 25 %, щонайменше приблизно на 20 %, щонайменше приблизно на 15 %, щонайменше приблизно на 10 % або щонайменше приблизно на 5 %, наприклад, від приблизно 30 % до приблизно 99 %, від приблизно 80 % до приблизно 90 %, від приблизно 70 % до приблизно 90 %, від приблизно 60 % до приблизно 90 %, від приблизно 50 % до приблизно 90 %, від приблизно 40 % до приблизно 90 %, від приблизно 35 % до приблизно 90 %, від приблизно 30 % до приблизно 90 %, від приблизно 25 % до приблизно 90 %, від приблизно 5 % до приблизно 85 % або від приблизно 10 % до приблизно 80 % (фактична зміна в % або середня зміна у % в порівнянні з очікуваним загальним виживанням).

У деяких варіантах здійснення Т-клітини, що мають знижене поверхнєве фукозилювання (тобто терапевтичні Т-клітини) або їх фармацевтичні композиції, можна вводити в фармацевтично ефективній кількості, тобто в кількості, яка є ефективною для досягнення необхідного результату або ефекту, наприклад, для лікування захворювання або стану. У деяких аспектах фармацевтично ефективна кількість може включати необхідну дозу або кількість терапевтичних Т-клітин і/або необхідне співвідношення таких Т-клітин з іншими типами клітин. Таким чином, доза клітин в деяких варіантах здійснення базується на загальній кількості клітин (або кількості на кг масу тіла) і необхідному співвідношенні окремих популяцій або підтипів, такому як відношення CD3⁺ до не-CD3⁺. У деяких варіантах здійснення доза клітин заснована на необхідній загальній кількості (або кількості на кг масу тіла) клітин в окремих популяціях або окремих типів клітин, що містяться в фармацевтичних композиціях. У деяких варіантах здійснення доза базується на комбінації таких ознак, як необхідна загальна кількість клітин, необхідне співвідношення і необхідна загальна кількість терапевтичних Т-клітин в окремих популяціях.

У деяких варіантах здійснення необхідна доза або кількість є необхідною кількістю терапевтичних Т-клітин або необхідною кількістю терапевтичних Т-клітин на одиницю маси тіла суб'єкта, якому вводять клітини, наприклад, клітин/кг. У деяких аспектах необхідна доза або кількість відповідає або вище мінімальної кількості терапевтичних Т-клітин або мінімальної кількості терапевтичних Т-клітин на одиницю маси тіла.

У деяких варіантах здійснення терапевтичні Т-клітини можуть вводити суб'єкту в діапазоні від приблизно ста до приблизно 100 мільярдів клітин, такому як, наприклад, від приблизно декількох сотень до приблизно декількох тисяч клітин, від приблизно декількох тисяч до приблизно 1 мільйона клітин, від приблизно 1 мільйона до приблизно 50 мільярдів клітин (наприклад, приблизно 1 сотня клітин, приблизно 5 сотень клітин, приблизно 1 тисяча клітин, приблизно 5 тисяч клітин, приблизно 1 мільйон клітин, приблизно 5 мільйонів клітин, приблизно 25 мільйонів клітин, приблизно 500 мільйонів клітин, приблизно 1 мільярд клітин, приблизно 5 мільярдів клітин, приблизно 20 мільярдів клітин, приблизно 30 мільярдів клітин, приблизно 40 мільярдів клітин або в діапазоні, визначеному будь-якими двома з попередніх значень), такому як від приблизно 10 мільйонів до приблизно 100 мільярдів клітин (наприклад, приблизно 20 мільйонів клітин, приблизно 30 мільйонів клітин, приблизно 40 мільйонів клітин, приблизно 60 мільйонів клітин, приблизно 70 мільйонів клітин, приблизно 80 мільйонів клітин, приблизно 90 мільйонів клітин, приблизно 10 мільярдів клітин, приблизно 25 мільярдів клітин, приблизно 50 мільярдів клітин, приблизно 75 мільярдів клітин, приблизно 90 мільярдів клітин або в діапазоні, визначеному будь-якими двома з попередніх значень) і в деяких випадках від приблизно 100 мільйонів клітин до приблизно 50 мільярдів клітин (наприклад, приблизно 120 мільйонів клітин, приблизно 250 мільйонів клітин, приблизно 350 мільйонів клітин, приблизно 450 мільйонів клітин, приблизно 650 мільйонів клітин, приблизно 800 мільйонів клітин, приблизно 900 мільйонів клітин, приблизно 3 мільярди клітин, приблизно 30 мільярдів клітин, приблизно 45 мільярдів клітин) або будь-яке проміжне значення у вказаних діапазонах. Попередні ефективні дози або кількості терапевтичної Т-клітини можуть бути вказані на окреме призначення або на повну тривалість терапії або лікування.

У деяких варіантах здійснення доза або кількість терапевтичних Т-клітин можуть знаходитися в діапазоні від або приблизно від 10^4 і до або приблизно до 10 клітин/кілограм (кг) маси тіла, такому як від 10^5 до 10^6 клітин/кг маси тіла, наприклад, від або приблизно від 1×10^5 клітин/кг, $1,5 \times 10^5$ клітин/кг, 2×10^5 клітин/кг або 1×10^6 клітин/кг маси тіла. Наприклад, в деяких варіантах здійснення, терапевтичні Т-клітини вводять в кількості, або в межах деякого діапазону помилки, від або приблизно від 10^4 до або приблизно до 10^9 Т-клітин/кілограм (кг) маси тіла, такому як від 10^5 до 10^6 Т-клітин/кг маси тіла, наприклад, в кількості, рівній або приблизно рівній 1×10^5 Т-клітин/кг, $1,5 \times 10^5$ Т-клітин/кг, 2×10^5 Т-клітин/кг або 1×10^6 Т-клітин/кг маси тіла. Попередні ефективні дози або кількості терапевтичної Т-клітини можуть бути вказані на окреме введення або на повну тривалість терапії або лікування.

У деяких варіантах здійснення Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням, тобто терапевтичні Т-клітини, або їх фармацевтичну композицію можуть вводити по схемі введення один раз на день, раз на тиждень, раз на два тижні або разів на місяць, в залежності від необхідного ефекту. У деяких аспектах терапевтичні Т-клітини або їх фармацевтичні композиції можуть вводити протягом від приблизно 1 до 5, від приблизно 1 до приблизно 10, від приблизно 1 до приблизно 15 або більшої кількості курсів, де тривалість кожного курсу складає місяць. Дози в кожному курсі можуть вводити щодня (включаючи один раз на день, два рази на день або більше двох разів на день), через день, два рази на тиждень, раз на тиждень, раз на два тижні, один раз на три тижні або раз на місяць. Курс може необов'язково включати період відновлення. У альтернативі період відновлення може бути включений між циклами. У деяких аспектах введення будуть виконувати протягом всієї тривалості захворювання.

У деяких аспектах способи, розкриті в цьому документі, можуть додатково включати введення Т-клітин, що мають поверхнєве фукозилювання, тобто терапевтичних Т-клітин, або їх фармацевтичних композицій і додаткового лікарського засобу або його фармацевтично прийнятних солей або сольватів. Терапевтичні Т-клітини або їх фармацевтичні композиції і лікарський засіб можуть діяти адитивно або, більш переважно, синергічно. У переважному варіанті здійснення терапевтичні Т-клітини або їх фармацевтичні композиції можуть вводити одночасно з введенням одного або більше лікарських засобів, які можуть бути частиною тієї ж композиції або бути присутніми в іншій композиції, що відрізняється від тієї, яка включає терапевтичні Т-клітини. У іншому варіанті здійснення терапевтичні Т-клітини або їх фармацевтичні композиції можуть вводити до або після введення лікарського засобу (засобів).

У деяких аспектах кількість Т-клітин, що мають знижене поверхнєве фукозилювання, тобто терапевтичних Т-клітин, або їх фармацевтичних композицій, яка є ефективною в способах,

описаних в цьому документі, буде залежати від природи порушення або стану, і може бути визначене за допомогою стандартних клінічних методів. Крім того, аналізи *in vitro* або *in vivo* необов'язково можуть використовуватися для сприяння у визначенні оптимальних діапазонів доз. Точна доза, яка буде використовуватися в композиціях, також буде залежати від шляху введення і важкості захворювання або порушення і повинна бути визначена згідно з рішенням практикуючого фахівця і обставин кожного пацієнта.

VI. Набори для терапевтичного застосування

У деяких аспектах запропоновані набори для застосування в адоптивній клітинній терапії або лікуванні раку. Такі набори можуть включати фармацевтичну композицію, яка включає Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням, тобто терапевтичні Т-клітини, і фармацевтично прийнятний носій.

У деяких варіантах здійснення набір може включати інструкції до застосування в будь-якому з терапевтичних способів, описаних в цьому документі. Включені в набір інструкції можуть надати опис введення фармацевтичних композицій суб'єкту для досягнення передбачуваної активності, наприклад, для лікування захворювання або стану, такого як рак, у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення інструкції, що стосуються застосування фармацевтичних композицій, описаних в цьому документі, можуть включати інформацію по введенню доз, схеми застосування і шляху введення для передбачуваного лікування. Контейнери можуть бути одиничними дозами, недозованими упаковками (наприклад, багатодозовими пакетами) або субодиничними дозами. Інструкції, що поставляються в наборах згідно з винаходом, являють собою, як правило, письмові інструкції на етикетці або вкладиші в упаковку. На етикетці або вкладиші в упаковку зазначено, що фармацевтичні композиції застосовуються для лікування, затримки виникнення і/або полегшення захворювання або порушення у суб'єкта.

У деяких варіантах здійснення набори, запропоновані в цьому документі, знаходяться у прийнятній упаковці. Прийнятна упаковка включає, не обмежуючись перерахованими, флакони, пляшки, банки, гнучку упаковку і т.п. Також передбачені упаковки для застосування в поєднанні з певним пристроєм, таким як інгалятор, пристрій для назального введення або інфузійний пристрій. У деяких варіантах здійснення набір може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може бути пакетом для внутрішньовенного розчину або флаконом з пробкою, що прокалюється голкою для підшкірної ін'єкції).

VII. Приклади

Наступні приклади ілюструють деякі варіанти здійснення винаходу і не призначені для обмеження об'єму винаходу.

У цьому документі варіанти здійснення далі проілюстровані наступними прикладами і доданими методиками. Проте, приклади призначені просто для ілюстрації варіантів здійснення і не повинні розглядатися як обмеження об'єму даного винаходу. Зміст всіх джерел і опублікованих патентів і заявок на патент, що цитуються по всьому тексту заявки, наразі включено за допомогою посилання.

Приклад 1 - Дослідження на мишачій лімфомі A20 з адоптивним перенесенням спленоцитів

Імуноген, KLH-A20 Id Fab, був отриманий наступним чином. Специфічні до пухлини A20 варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюга Ig клонували шляхом за допомогою ПЛР ампліфікації і лігували у вектор експресії мишачого IgG для продукції A20 Id в клітинах HEK293F17. Мишаче антитіло до A20 Id очищували з використанням білка А. Концентроване антитіло (20 мМ KPO₄, 10 мМ EDTA, pH 7,0) оброблювали чотирма об'ємами іммобілізованої смоли з папаїном (з 20 мМ цистеїну) при 37 °C протягом ночі. Смолу видаляли і інкубували супернатант зі смолою з білком А протягом ночі (4 °C) з подальшою фільтрацією для видалення зв'язаного зі смолою Fc антитіла. Елюат, який містить Fab, збирали, діалізували і концентрували в розчині PBS, pH 7,4. Кон'югування Fab проводили при використанні отриманого в аквакультури KLH (mCKLH) і NHS-ПЕГ12-малеїміду. mCKLH в розчині PBS, pH 8,0 (10 мг/мл), змішували і інкубували з NHS-ПЕГ12-малеїмід (кінцева концентрація 125 мМ, 37 °C, 20 хв). Продукт mCKLH-ПЕГ12-малеїмід піддавали заміні буфера на колонці PD10 (розчин PBS, pH 7,4) і концентрували до 5 мг/мл. A20 Id Fab (4 мг/мл) відновлювали тріс(2-карбоксіетил)фосфіном (5 мМ) в буфері, який містить 2 мМ EDTA (30 хв., 37 °C). Відновник видаляли використовуючи колонку PD10 (розчин PBS, pH 7,4, 5 мМ EDTA) і відновлений Fab концентрували до 5 мг/мл, змішували з KLH-ПЕГ12-малеїмідом (молярне відношення Fab:KLH 3:1) і інкубували при кімнатній температурі (1 год.). Надлишок малеїмідного крослінкера нейтралізували N-ацетилцистеїном і видаляли на колонці PD10 (розчин PBS, pH 7,4).

Мишей-донорів для адоптивного перенесення спленоцитів отримували, як описано нижче. Клітини A20 (ATCC) культивували в RPMI 1640 з 10 % FBS, 10 мМ HEPES, 1 мМ піруват натрію, 50 мкМ 2-меркаптоетанолу і пеніциліном (100 Од/мл)/стрептоміцином (100 мкг/мл) (PS).

Мишам (BALB/c, Harlan) підшкірно вводили кон'югат KLH-A20 Id Fab (50 мкг) з ад'ювантом TiterMax (1:1) в день 21 з бустерною ін'єкцією в день 7. Група лікування 2FF отримувала питну воду, що містить 20 мМ 2FF, починаючи з дня 14, тоді як контрольна група отримувала просту воду. Через один тиждень після другої вакцинації (день 0) всі миші отримували опромінені пухлинні клітини A20 (рівень 4 опромінювача RS2000, 17 хв, $2,5 \times 10^6$ клітин на мишу, в/в). Лікування 2FF продовжували до дня 14. Спленоцити, отримані від кожної групи мишей-донорів (день 14), адаптивно переносили (однократно) інтактним мишам (50×10^6 клітин/миша). Одна група отримувала клітини від мишей-донорів, які отримували 2FF, і одна група мишей отримувала клітини від мишей-донорів, яким не вводили 2FF ($n=7$ /група). Потім обидві групи заражали живими клітинами A20 на наступний день після перенесення ($2,5 \times 10^6$ клітин). Контрольна група не отримувала лікування. Спленоцити, перенесені від мишей-донорів, які не отримували 2FF, забезпечували більш тривале виживання порівняно з інтактними тваринами (збільшення з 27 днів до 35-денного медіанного виживання), тоді як спленоцити, перенесені від мишей-донорів, які отримували 2FF, забезпечували ще більше збільшення середнього виживання до 43 днів. Це вказує на те, що адаптивне перенесення клітин від тварин, що отримували 2FF, може забезпечити підвищену протипухлинну активність порівняно з адаптивним перенесенням клітин від тварин, які не отримували 2FF.

Приклад 2 - Дослідження на мишачій лімфомі A20 з адаптивним перенесенням CD3⁺ Т-клітин

20 мишам Balb/c імплантували клітини A20 (0,2 мл 5×10^6 клітин п/ш/миша), одна група мишей, що складалася з 10 тварин, отримувала 2FF (20 мМ в питній воді) з дня 0 до завершення дослідження. Пухлинам лімфоми A20 дозволяли вирости і через 20 днів мишей умертвляли. Як показано раніше, у мишей, що отримували 20 мМ 2FF, спостерігали значну затримку прогресування пухлини порівняно з тваринами в контрольній групі (Фіг. 2).

Знижене поверхнєве фукозилювання на CD3⁺ Т-клітинах після лікування 2FF

Мишей з контрольної і групи, що отримувала 2FF, умертвляли і забирали селезінку для збагачення CD3 Т-клітин. Коротко кажучи, селезінки збирали в RPMI, що містить 2 % FBS, суспензію клітин пропускали через нейлоновий клітинний фільтр з комірками 70 мкм і промивали 2 % RPMI. Клітини суспендували в 10 мл буфери для лізису ACK і інкубували протягом 5 хв. в цьому буфері для видалення еритроцитів. Клітини центрифугували при $300 \times g$ протягом 5 хвилин і ресуспендували в PBS, що містить 2 % FBS і 1 мМ ЕДТА. Т-клітини виділяли при використанні набору для виділення мишачих Т-клітин EasySep згідно з рекомендаціями виробника. Коротко, клітини ресуспендували при щільності 10^8 клітин/мл і додавали 50 мкл/мл щурячої сироватки. Потім клітини переносили в полістирольну пробірку на 5 мл і додавали до зразка 50 мкл суміші для виділення з подальшим інкубуванням при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Сфери RapidSpheres струшували на вортексі і додавали 75 мкл/мл з подальшим інкубуванням при кімнатній температурі протягом 2,5 хвилин. Об'єм зразків доводили до 2,5 мл і інкубували з магнітом для виділення кліток протягом 2,5 хвилин. Магніт перевертали, CD3⁺ Т-клітини збирали і два рази промивали в RPMI і ресуспендували при щільності $21,2 \times 10^6$ клітин/мл. Стан фукозилювання клітин перевіряли за допомогою проточної цитометрії, при цьому клітини, виділені у тварин, що отримували 2FF, показали значне зниження поверхневого фукозилювання (Фіг. 3).

Протипухлинна активність Т-клітин зі зниженим поверхневим фукозилюванням

Для оцінки протипухлинної активності очищених Т-клітин, 4 групам мишей Balb/c імплантували клітини A20 (0,2 мл 5×10^6 клітин (п/ш/миша). Одна група не отримувала лікування, інші три групи отримували лікування, коли клітини A20 досягали 100 мм^3 , і давали або щодня 20 мМ 2FF в питній воді, в/ч вводили 2×10^6 Т-клітин, виділених у контрольних мишей з пухлинами, або в/ч вводили 2×10^6 Т-клітин, виділених у 2FF мишей з пухлинами. Тварин спостерігали на подальше прогресування пухлини. Тварини, які щодня отримували 2FF в своїй воді або CD3⁺ Т-клітини, виділені у тваринних пухлиноносіїв, що отримували 2FF, демонстрували значне сповільнення росту пухлини, а в деяких випадках - регресію пухлини, порівняно з контрольними тваринами, що не отримували лікування, або тваринами, що отримували Т-клітини від контрольних мишей пухлиноносіїв.

Ці дані вказують, що протипухлинна активність 2FF в моделі на лімфомі A20 опосередкована не тільки Т-клітинними відповідями, але і те, що Т-клітини від мишей пухлиноносіїв, що отримували 2FF, несподівано виявилися достатніми для стимуляції протипухлинної відповіді, причому ця відповідь знаходиться на одному рівні з системним лікуванням 2FF. Ці дані розкривають можливість застосування 2FF для посилення активності Т-клітин в терапевтичних ситуаціях, коли аутологічні Т-клітини від онкологічних пацієнтів розмножують *ex vivo* і повторно вводять пацієнтам або трансформують TCR до специфічних

пухлинних антигенів або конструкцій CAR.

Приклад 3 - Розмноження *ex vivo* людських периферичних Т-клітин з 2FF для протипухлинної ефективності *in vivo*

Т-клітини виділяли з 10 мл суцільної крові, яку центрифугували спочатку при 1200 об/хв (300×g) протягом 10 хв (без гальмування). Верхній шар, що містить тромбоцити, обережно збирали, не порушуючи шар лейкоцитів. Потім суміш RosetteSep™ Human T-Cell Enrichment Cocktail для збагачення Т-клітин (пан-Т-клітини, виробництва StemCell technologies) додавали до крові, що залишилася (500 мкл/10 мл крові). Суміш інкубували протягом 20 хв, потім додавали 1 мл FBS разом з 10 мл PBS. Histopaque (20-25 мл) вносили в пробірку Falcon на 50 мл, після чого дуже повільно нашаровували підготовлений розчин крові/PBS. Отриману суміш центрифугували без гальмування (25 °C, 1500 об/хв, 25 хвилин). Верхній шар видаляли, потім Т-клітини в шарі лейкоцитарної плівки збирали в нову пробірку на 50 мл. Т-клітини промивали PBS, ресуспендували в 1 мл буферу для лізису АКТ і доводили до об'єму 25 мл, інкубували протягом 5 хв, доводили до 50 мл PBS, і потім центрифугували. Цей етап лізису еритроцитів повторювали ще раз.

Для культивування *in vitro* культури первинних Т-клітин людини, виділені Т-клітини ресуспендували в середовищі для Т-клітин (середовищі RPMI з добавкою 10 % фетальної телячої сироватки (FCS), 1 % пеніциліну) і переносили в дві колби T25, одну з і одну без 100 мкМ 2-дезоксидефтор-Л-фукозою. Для активації Т-клітин додавали сфери, покриті антитілом до CD3/CD28 (20 мкл/колба). Через 24 години додавали інтерлейкін 2 (IL2) (100 нг/мкл). При кожному пасажі клітин додавали новий IL2 і 2-дезоксидефтор-Л-фукозу. Після 10 днів культивування розмножені Т-клітини, що культивуються в 2FF, оцінювали на наявність змін поверхневого фукозилування за допомогою проточної цитометрії (Фіг. 4). Обробка первинних людських Т-клітин 2FF призводить до зниження поверхневого фукозилування приблизно на 85 %, як контролюють при поверхневому фарбуванні аглютиніном сочевиці (LCA), і вказує на те, що клітини готові до перенесення *in vivo*.

Приклад 4 - Аутологічні Т-клітини, дозрілі і диференційовані з 2FF *ex vivo*, можуть надавати протипухлинну активність

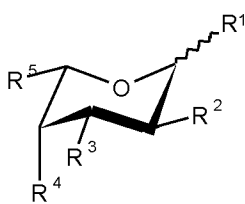
Мононуклеарні клітини периферичної крові виділяли з лейкоцитарних плівок венозної крові здорових добровольців (Astarte Biologics) при використанні градієнта щільності гістопак (Sigma). Потім Т-клітини виділяли при використанні суміші EasySep Human T cell Enrichment Cocktail (STEMCELL) згідно з інструкціями виробника. Покриті антитілом до αCD3/αCD28 сфери (Miltenyi Biotec), що використовуються в співвідношенні сфера:клітина 1:8, використали для активації Т-клітин в день 0. Т-клітини активували в RPMI 10 % FCS+IL-2 (100 нг/мкл, R&D Systems) +/-100 мМ 2FF. При кожному пасажі клітин додавали новий IL-2 і 2FF.

Трансформовані вірусом Епштейна-Барр (EBV) лімфобластоїдні клітинні лінії (LCL) імплантували підшкірно мишам NSG. Коли об'єми пухлин LCL досягали 300 мм³, мишам вводили 2,0×10⁶ аутологічних периферичних Т-клітин, які були розмножені і дозрівали в присутності або відсутності 2FF, шляхом ін'єкції в хвостову вену. Протипухлинну активність аутологічних Т-клітин відносно прогресування LCL контролювали шляхом вимірювання за допомогою штангенциркуля раз на два тижні. Мишей умертвляли після зменшення або повного зникнення пухлин протягом більше 1 тижня.

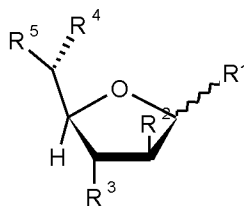
Перенесення аутологічних Т-клітин призводило до протипухлинної активності, яка була значно збільшена (див. ФІГ. 5А), як і виживання (див. ФІГ. 5В), якщо Т-клітини дозрівали з 2FF до перенесення.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб надання адаптивної клітинної терапії суб'єкту, який включає:
введення суміші, яка включає Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилуванням, суб'єкту, який потребує клітинної терапії, де вказані Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилуванням отримані способом, який включає:
(i) культивування Т-клітин у присутності аналога фукози в середовищі культивування клітин; де вказаний аналог фукози вибраний із групи, яка складається із формул (I) або (II):



, (I)



, (II)

або являє собою їхню фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою; R² є галогеном; кожний із R¹, R³ і R⁴, незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R⁵ є -CH₃, або

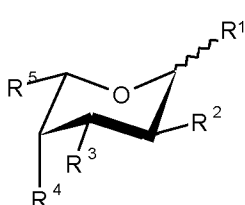
кожний із R¹, R², R³ і R⁴, незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R⁵ є -C≡CH; і

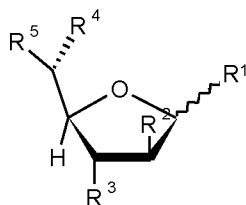
де вказані Т-клітини мають знижене поверхнєве фукозилювання порівняно з Т-клітинами, культивованими за відсутності вказаного аналога фукози; або

(ii) збагачення Т-клітин, отриманих від тварини, якій надали аналог фукози;

де Т-клітини, отримані від тварини, мають знижене поверхнєве фукозилювання, де вказаний аналог фукози вибраний із групи, яка складається із формул (I) або (II):



, (I)



, (II)

або являє собою їхню фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою; R² є галогеном;

кожний із R¹, R³ і R⁴, незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R⁵ є -CH₃, або

кожний із R¹, R², R³ і R⁴, незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R⁵ є -C≡CH; і

де вказані Т-клітини, отримані у тварини, мають знижене поверхнєве фукозилювання порівняно з Т-клітинами, присутніми або отриманими у контрольній тварини, яка не отримувала вказаний аналог фукози.

2. Спосіб за п. 1, де вказані Т-клітини включають щонайменше 5 % зниження поверхневого фукозилювання порівняно з нормальними Т-клітинами.

3. Спосіб за п. 1 або 2, де суб'єктом є людина.

4. Спосіб за будь-яким із пп. 1-3, де вказані Т-клітини включають людські периферичні Т-клітини.

5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, де вказані Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням походять від вказаного суб'єкта.

6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, де вказані Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням походять від тварини, що відрізняється від вказаного суб'єкта.

7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, де вказана суміш, по суті, не містить еритроцитів.

8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, де клітинна терапія призначена для лікування раку.

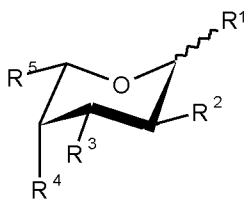
9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, де суміш вводять локально.

10. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, де суміш вводять системно.

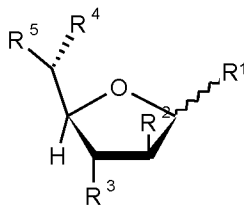
11. Спосіб лікування раку, який включає:

введення суміші, яка включає Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням, суб'єкту, який потребує вказаного лікування раку, де вказані Т-клітини зі зниженим поверхневим фукозилюванням отримані способом, який включає:

(i) культивування Т-клітин у присутності аналога фукози в середовищі культивування клітин; де вказаний аналог фукози вибраний із групи, яка складається із формул (I) або (II):



, (I)



, (II)

або являє собою їхню фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою;

R^2 є галогеном;

кожний із R^1 , R^3 і R^4 , незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R^5 є -CH₃, або

кожний із R^1 , R^2 , R^3 і R^4 , незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R^5 є -C≡CH; і

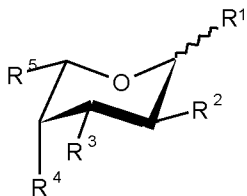
де вказані Т-клітини мають знижене поверхнєве фукозилювання порівняно з Т-клітинами,

культивованими за відсутності вказаного аналога фукози; або

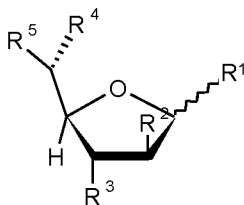
(ii) збагачення Т-клітин, отриманих від тварини, якій надали аналог фукози;

де Т-клітини, отримані від тварини, мають знижене поверхнєве фукозилювання, де

вказаний аналог фукози вибраний із групи, яка складається із формул (I) або (II):



, (I)



, (II)

або являє собою їхню фармацевтично прийнятну сіль або сольватовану форму, де кожна формула (I) або (II) може бути альфа- або бета-аномером або відповідною альдозною формою;

R^2 є галогеном;

кожний із R^1 , R^3 і R^4 , незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R^5 є -CH₃, або

кожний із R^1 , R^2 , R^3 і R^4 , незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R^5 є -C≡CH; і

де вказані Т-клітини, отримані у тварини, мають знижене поверхнєве фукозилювання порівняно з Т-клітинами, присутніми або отриманими у контрольній тварини, яка не отримувала вказаний аналог фукози.

12. Спосіб за п. 11, де вказані Т-клітини включають щонайменше 5 % зниження поверхневого фукозилювання порівняно з нормальними Т-клітинами.

13. Спосіб за будь-яким із пп. 11 або 12, де суб'єктом є людина.

14. Спосіб за будь-яким із пп. 11-13, де вказані Т-клітини включають людські периферичні Т-клітини.

15. Спосіб за будь-яким із пп. 11-14, де вказані Т-клітини з модифікованим поверхневим фукозилюванням походять від вказаного суб'єкта.

16. Спосіб за будь-яким із пп. 11-14, де вказані Т-клітини з модифікованим поверхневим фукозилюванням походять від тварини, що відрізняється від вказаного суб'єкта.

17. Спосіб за будь-яким із пп. 11-16, де вказана суміш, по суті, не містить еритроцитів.

18. Спосіб за будь-яким із пп. 11-17, де клітинна терапія призначена для лікування раку.

19. Спосіб за будь-яким із пп. 11-18, де суміш вводять локально.

20. Спосіб за будь-яким із пп. 11-18, де суміш вводять системно.

21. Спосіб за будь-яким із пп. 1-20, де варіант (i) додатково включає етап виділення Т-клітин, які мають знижене поверхнєве фукозилювання.

22. Спосіб за будь-яким із пп. 1-21, де R^2 є галогеном;

кожний із R^1 , R^3 і R^4 , незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R^5 є -CH₃.

23. Спосіб за будь-яким із пп. 1-22, де R^2 є -F;

кожний із R^1 , R^3 і R^4 , незалежно, є -ОН або гідролізованою складноефірною групою; і

R^5 є $-CH_3$.

24. Спосіб за будь-яким із пп. 1-23, де кожний із R^1 , R^3 і R^4 , незалежно, вибраний із групи, яка складається із $-OH$ і $-OC(O)C_1-C_{10}$ алкілу.

5 25. Спосіб за будь-яким із пп. 1-24, де кожний із R^1 , R^3 і R^4 , незалежно, вибраний із групи, яка складається із $-OH$ і $-OC(O)CH_3$.

26. Спосіб за будь-яким із пп. 1-25, де кожний із R^1 , R^2 , R^3 і R^4 , незалежно, є $-OH$ або гідролізованою складноефірною групою; і R^5 є $-C\equiv CH$.

27. Спосіб за будь-яким із пп. 1-26, де аналогом фукози є 2-дезоксид-2-фтор-L-фукоза.

10 28. Спосіб за будь-яким із пп. 1-27, де аналогом фукози є перацетат алкінілфукози.

29. Спосіб за будь-яким із пп. 1-28, де середовище культивування з варіанта (i) включає антитіла до CD3 і CD28.

30. Спосіб за будь-яким із пп. 1-29, де середовище культивування з варіанта (i) додатково включає інтерлейкін-2 (IL2).

15 31. Спосіб за будь-яким із пп. 1-30, де вказані Т-клітини з варіанта (i) включають людські периферичні Т-клітини.

32. Спосіб за будь-яким із пп. 1-28, де Т-клітини з варіанта (ii) отримані із селезінки тварини.

33. Спосіб за будь-яким із пп. 1-28 і 32, де вказаний аналог фукози з варіанта (ii) наданий тварині шляхом годування.

20 34. Спосіб за будь-яким із пп. 1-28, 32 і 33, де твариною з варіанта (ii) є людина.

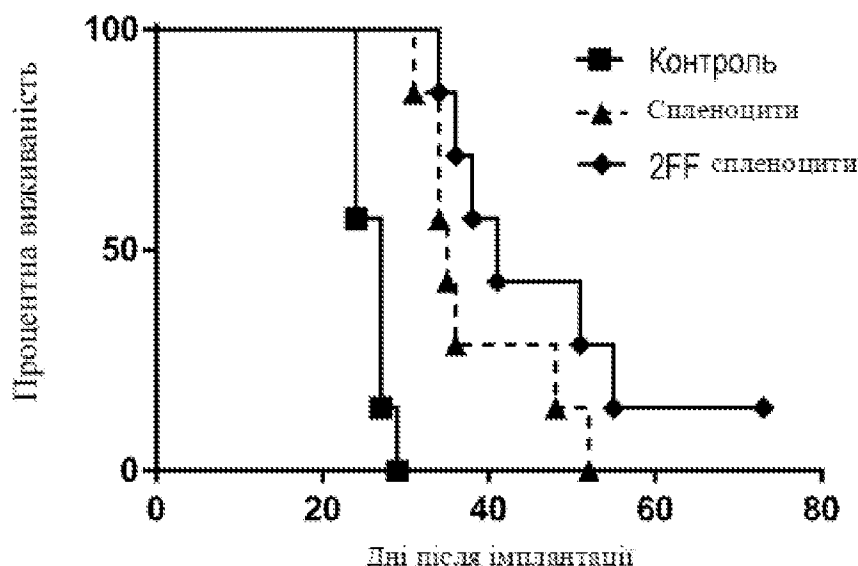


Fig. 1

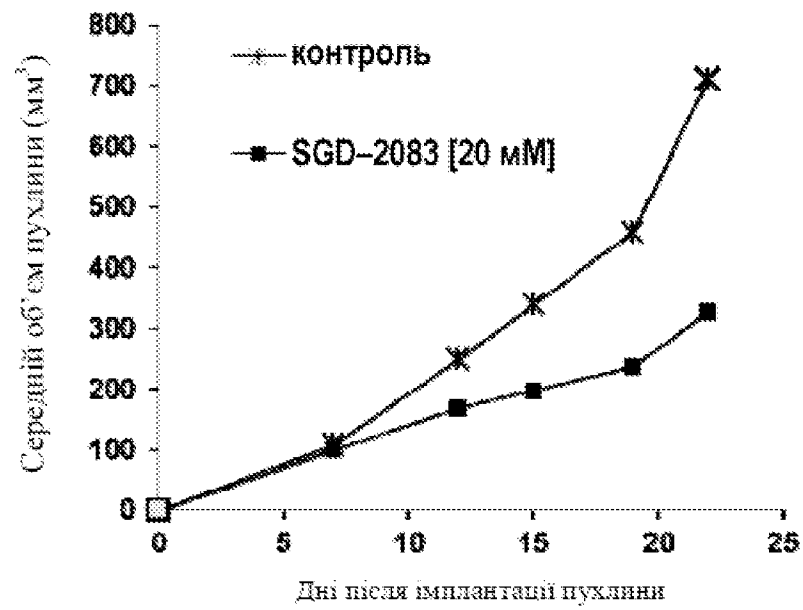


Fig. 2

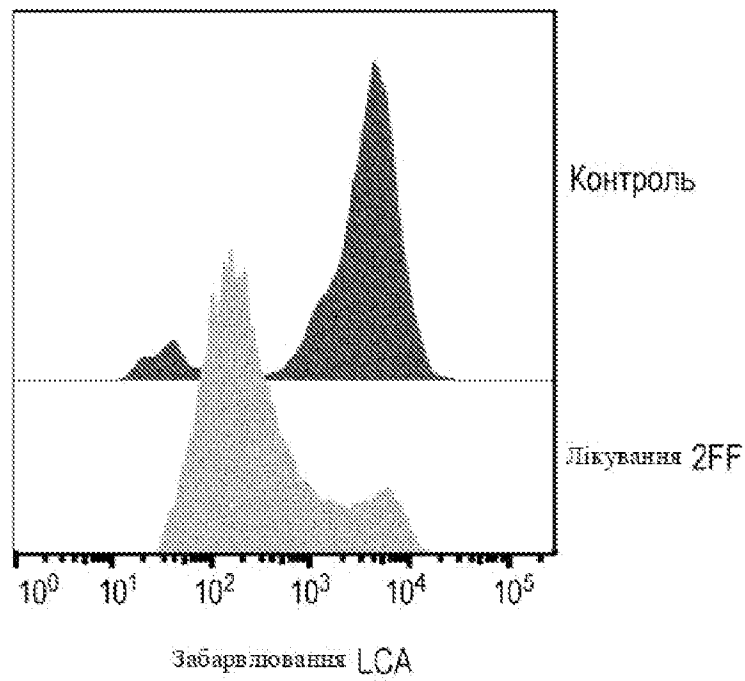
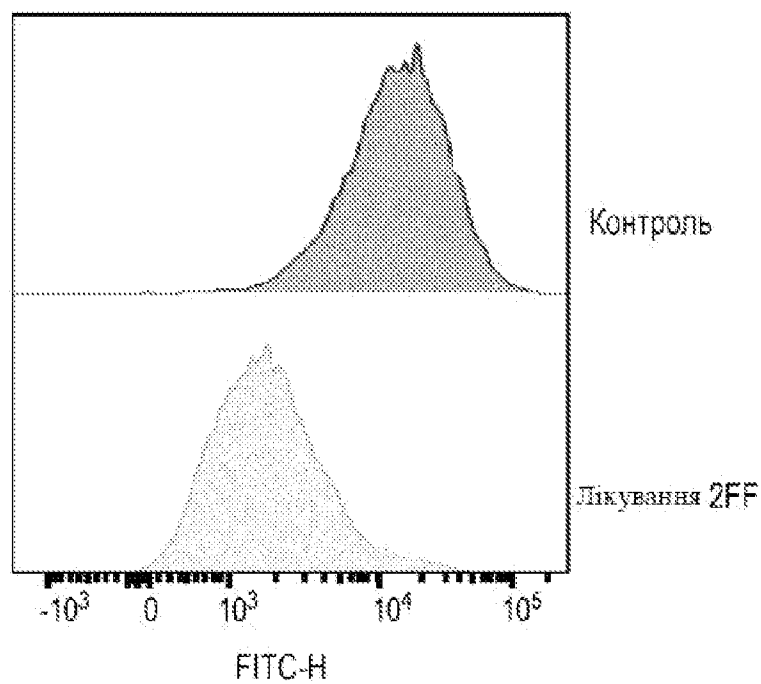
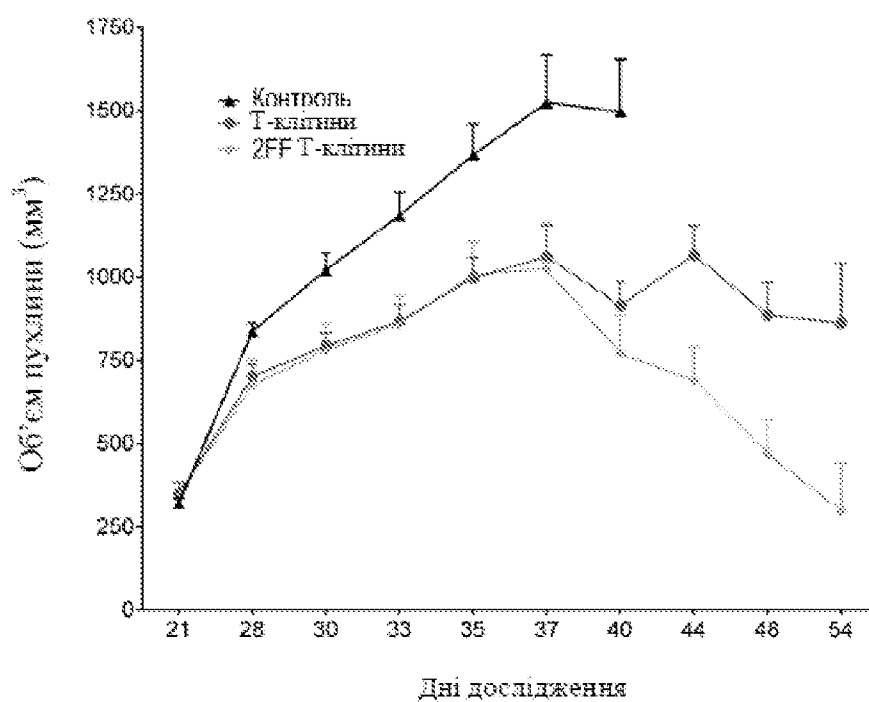


Fig. 3

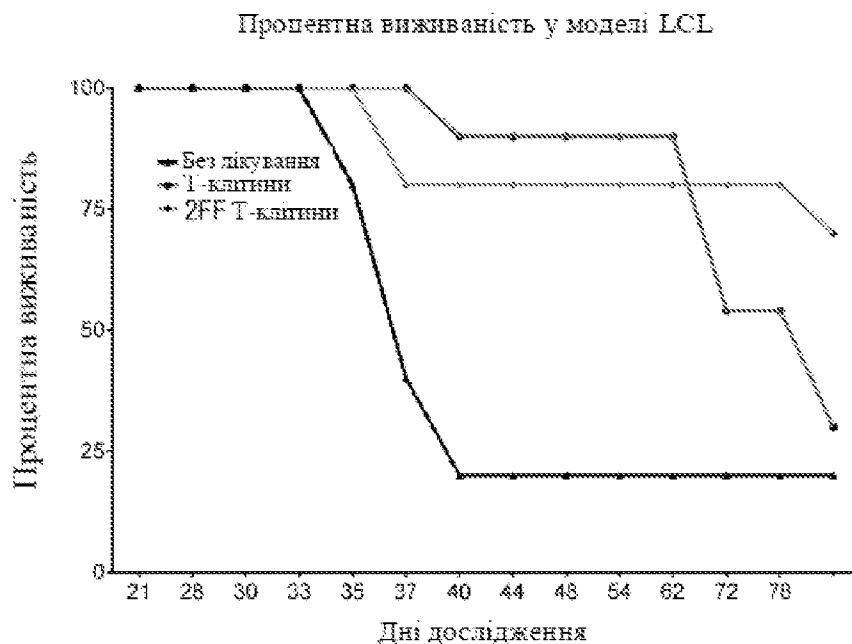


Фіг. 4

Модель LCL з перенесенням Т-клітин



Фіг. 5А



Фіг. 5В