



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019025775-6 A2



(22) Data do Depósito: 05/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) Título: CÉLULAS T COM FUCOSILAÇÃO DE SUPERFÍCIE REDUZIDA E MÉTODOS PARA FAZER E USAR AS MESMAS

(51) Int. Cl.: A61K 31/7004; A61K 31/7024; A61K 35/17; A61P 35/02; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 07/06/2017 US 62/516,536.

(71) Depositante(es): SEATTLE GENETICS, INC..

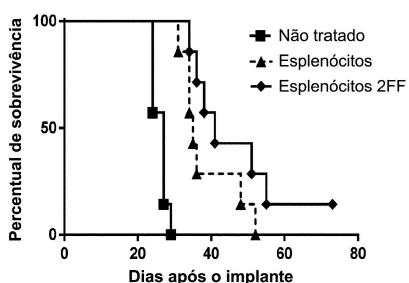
(72) Inventor(es): NICOLE OKELEY; JESSICA FIELD; SHYRA GARDAI; RYAN HEISER.

(86) Pedido PCT: PCT US2018036067 de 05/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/226701 de 13/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 05/12/2019

(57) Resumo: São fornecidos métodos de produção de células T com fucosilação de superfície reduzida e uso das mesmas na terapia celular adotiva, em particular no tratamento de câncer.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: "CÉLULAS T COM FUCOSILAÇÃO DE SUPERFÍCIE REDUZIDA E MÉTODOS PARA FAZER E USAR AS MESMAS"

REFERÊNCIAS CRUZADAS A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido é um pedido que reivindica benefício prioritário sob 35 U.S.C. O § 119 (e) do Pedido Provisório dos EUA No. 62/516.536 depositado em 7 de junho de 2017, que é incorporado neste documento por referência na íntegra para todos os fins.

DECLARAÇÃO DOS DIREITOS DAS INVENÇÕES REALIZADAS SOB PESQUISA E DESENVOLVIMENTO FEDERALMENTE PATROCINADOS

[002] NÃO APLICÁVEL

REFERÊNCIA A UMA "LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS", A UMA TABELA OU A UM PROGRAMA DE COMPUTADOR QUE LISTA UM APÊNDICE ENVIADO EM UM DISCO COMPACTO

[003] NÃO APLICÁVEL

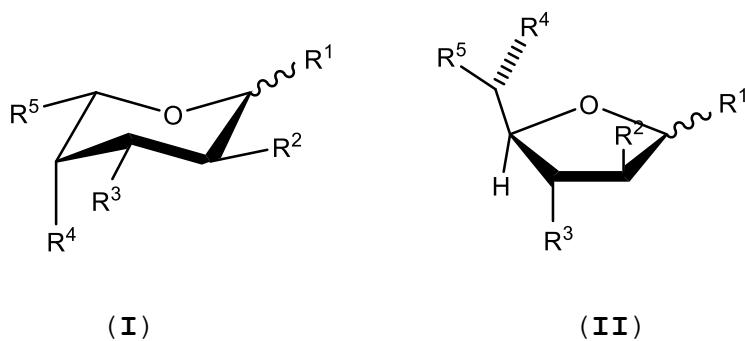
ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] Geralmente, existem três abordagens adotadas no tratamento do câncer: cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Além disso, a imunoterapia emergiu como uma abordagem relativamente nova e ainda experimental que pode ser potencialmente aplicada isoladamente ou em combinação com quaisquer abordagens existentes no tratamento do câncer. Uma das modalidades de tratamento na imunoterapia contra o câncer é a terapia celular adotiva, utilizando células T

específicas para tumores. Para fazer a terapia celular adotiva, são necessárias estratégias aprimoradas, por exemplo, para fornecer células T específicas para uma doença alvo, por exemplo, um tipo específico de câncer a ser tratado em um paciente, evitando efeitos fora do alvo em tecidos não patogênicos.

BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

[005] Em um aspecto, são fornecidos métodos para a produção de células T com fucosilação de superfície reduzida. Em alguns aspectos, os métodos incluem cultivar células T na presença de um análogo de fucose em um meio de cultura de células; em que o análogo da fucose tem a fórmula (I) ou (II):



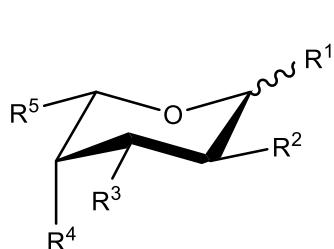
ou uma forma de sal ou solvato farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que cada uma das fórmulas (I) ou (II) pode ser o anômero alfa ou beta ou a forma de aldose correspondente;

R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-\text{OH}$ ou um grupo éster hidrolisável; e

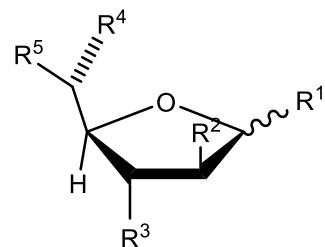
R^5 é $-CH_3$, ou

cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$; e em que as células T tendo fucosilação de superfície reduzida em relação às células T cultivadas na ausência do análogo da fucose.

[006] Em outro aspecto, são fornecidos métodos para a produção de células T com fucosilação de superfície reduzida. Em alguns aspectos, os métodos incluem o fornecimento de um análogo de fucose a um animal e a obtenção de células T com fucosilação de superfície reduzida do animal; em que o análogo da fucose tem a fórmula (I) ou (II):



(I)



(II)

ou uma forma de sal ou solvato farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que cada uma das fórmulas (I) ou (II) pode ser o anômero alfa ou beta ou a forma de aldose correspondente;

R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$, ou

cada um de R¹, R², R³ e R⁴ é independentemente -OH ou um grupo éster hidrolisável; e R⁵ é -C≡CH; e

em que as células T obtidas a partir do animal têm fucosilação de superfície reduzida em relação às células T presentes em ou obtidas a partir de um animal de controle que não foi fornecido com o referido análogo de fucose.

[007] Ainda em outro aspecto, são fornecidos métodos para fornecer uma terapia celular adotiva a um indivíduo. Em alguns aspectos, os métodos incluem a administração de uma mistura com células T com fucosilação de superfície reduzida ao indivíduo necessitado da terapia celular.

[008] Ainda em outro aspecto, são fornecidos métodos para o tratamento de um câncer. Em alguns aspectos, os métodos incluem a administração de uma mistura com células T com fucosilação de superfície reduzida ao indivíduo necessitado do tratamento do câncer.

[009] Ainda em outro aspecto, são fornecidos métodos para o tratamento de um câncer. Em alguns aspectos, o método inclui administrar uma mistura com células T com fucosilação de superfície reduzida ao indivíduo necessitado de tratamento de câncer, em que as células T com fucosilação de superfície reduzida são produzidas de acordo com quaisquer métodos para produzir essas células T.

[0010] Estes e outros aspectos das divulgações aqui fornecidas podem ser mais completamente compreendidos por referência à descrição detalhada a seguir, exemplos não limitativos de modalidades específicas e às figuras anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0011] A Figura 1 mostra um gráfico demonstrando efeitos *in vivo* da transferência adotiva de esplenócitos de camundongos doadores vacinados com KLH-A20 Id Fab que foram tratados ou não com 2FF no crescimento de células de linfoma de camundongo A20 implantadas IV em camundongos BALB/c naturais.

[0012] A Figura 2 mostra um gráfico demonstrando efeitos *in vivo* de 2FF no crescimento de células de linfoma de camundongo A20 implantadas com SQ em camundongos BALB/c naturais que foram usados para gerar células T CD3⁺ isoladas.

[0013] A Figura 3 mostra um gráfico demonstrando fucosilação de superfície reduzida de células T CD3⁺ isoladas de camundongos portadores de tumor A20 tratados com 20mM de 2FF, conforme determinado pela coloração de LCA de superfície.

[0014] A Figura 4 mostra um gráfico que demonstra a fucosilação de superfície reduzida de células T CD3⁺ isoladas de doadores humanos após tratamento *ex vivo* com 100 mM de 2FF, conforme determinado pela coloração de LCA de superfície.

[0015] As Figuras 5A-5B mostram gráficos demonstrando a progressão do tumor após as células T humanas autólogas amadurecidas na presença ou ausência de 2FF terem sido transferidas em camundongos NSG portadores de tumores de células B transformadas por LCL EBV correspondentes. A Figura 5A mostra o gráfico demonstrando a progressão do tumor através de medições de paquímetro e a Figura 5B mostra o gráfico demonstrando a progressão do tumor através da sobrevivência.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0016] Embora várias modalidades e aspectos das divulgações aqui apresentadas sejam mostradas e descritas aqui, será óbvio para os especialistas na técnica que tais modalidades e aspectos são fornecidos apenas a título de exemplo. Numerosas variações, alterações e substituições ocorrerão agora para os especialistas na técnica sem se afastar da invenção. Deve ser entendido que várias alternativas para as modalidades da invenção aqui descritas podem ser empregadas na prática da invenção.

[0017] Os títulos das seções aqui utilizados são apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando o assunto descrito. Todos os documentos ou partes de documentos citados no pedido, incluindo, sem limitação, patentes, pedidos de patente, artigos, livros, manuais e tratados, são expressamente

incorporados por referência na íntegra para qualquer finalidade.

[0018] A prática da presente divulgação empregará, a menos que indicado de outra forma, técnicas convencionais de cultura de tecidos, imunologia, biologia molecular e biologia celular, que estão dentro do conhecimento da técnica. Ver, por exemplo, Sambrook e Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a edição; a série Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; a série *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press na Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow e Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5^a edição; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Pat. No. 4.683.195; Hames e Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames e Higgins eds. (1984) *Transcription and e Translation*; IRL Press (1986) *Imobilized Cells and Enzymes*; Perbal (1984) *Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller e Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer e Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*

(Academic Press, Londres); Herzenberg et al. eds (1996), Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3a edição (2002) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sohail (2004) Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application (CRC Press).

I. Definições

[0019] Conforme usado neste documento e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o", "a" incluem os referentes plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "um análogo de fucose" inclui um ou mais análogos de fucose. Quando se pretende uma pluralidade de análogos da fucose, cada uma da pluralidade de análogos da fucose pode ser idêntica ou diferente.

[0020] O termo "isolar", "isolando" ou "isolado" pretende significar que um componente (por exemplo, um composto ou célula) é separado de todos ou de alguns dos componentes que o acompanham na natureza ou em uma mistura de laboratório.

[0021] O termo "enriquecer", "enriquecendo" ou "enriquecido" pretende significar que uma mistura tendo um componente (por exemplo, um composto ou célula) é processada para aumentar uma concentração do componente em comparação com antes do processo. Por exemplo, enriquecer células T a partir de uma mistura de células incluindo células T e outros

tipos de células significa que a mistura de células é processada, por exemplo, centrifugação, de modo que uma concentração ou número de células T por unidade de volume antes do enriquecimento, por exemplo, 10^5 células T/ml é aumentado para ser superior a 10^5 células T/ml após o processo de enriquecimento.

[0022] O termo "cultura" ou "cultura de células" significa a manutenção e/ou crescimento de células em um ambiente artificial *in vitro*. Um "sistema de cultura de células" é usado aqui para se referir a condições de cultura nas quais uma população de células pode ser cultivada. "Meio de cultura" é usado aqui para se referir a uma solução nutritiva para a cultura, crescimento ou proliferação de células.

[0023] Por "composição" usada neste documento se refere a quaisquer compostos (incluindo quaisquer compostos químicos) e células, que podem estar vivos ou mortos. Por exemplo, no contexto de produção de células T com fucosilação de superfície reduzida, a composição pode conter um análogo de fucose que é fornecido às células cultivadas. Em outro exemplo, no contexto de fornecer uma terapia celular adotiva ou tratar um câncer, a composição pode conter um grupo de células, por exemplo Células T com fucosilação de superfície reduzida. Uma composição usada em qualquer contexto pode ter um ou mais componentes.

[0024] Os termos "linfócito T" ou "célula T" se referem a um tipo de linfócito que desempenha um papel na imunidade mediada por células. Os tipos de células T incluem, mas não se limitam a, células T efetoras, células T auxiliares, células T assassinas citotóxicas, células T de memória, células T reguladoras, célula T assassinas naturais, células T invariantes associadas à mucosa, células T alfa beta, e células T gama delta. Além disso, as células T podem ser subdivididas ainda mais, dependendo da presença ou do nível de um ou mais marcadores específicos.

[0025] Os termos "indivíduo" ou "sujeito", conforme aqui utilizados, se referem a seres humanos, mamíferos e outros animais na presente divulgação. Em alguns casos, o indivíduo que é humano pode ser um paciente.

[0026] Por "tratamento" no contexto de doença ou condição, entende-se que pelo menos uma melhoria dos sintomas associados à condição que afeta um indivíduo é alcançada, onde a melhoria é usada em um sentido amplo para se referir a pelo menos uma redução na magnitude de um parâmetro, por exemplo sintoma, associado à condição (por exemplo, câncer) sendo tratada. Como tal, o tratamento também inclui situações em que a condição patológica, ou pelo menos os sintomas associados a ela, são completamente inibidos, por exemplo, impedidos de acontecer ou interrompidos, por exemplo, terminados, de modo que o hospedeiro não sofra mais da

condição ou pelo menos dos sintomas que a caracterizam. Assim, o tratamento inclui: (i) prevenção, isto é, redução do risco de desenvolvimento de sintomas clínicos, inclusive fazendo com que os sintomas clínicos não se desenvolvam, por exemplo, impedindo a progressão da doença para um estado prejudicial; (ii) inibição, isto é, interromper o desenvolvimento ou desenvolvimento adicional de sintomas clínicos, por exemplo, mitigar ou inibir completamente uma doença ativa, por exemplo, de modo a diminuir a carga do tumor, cuja diminuição pode incluir a eliminação de células cancerígenas detectáveis; e/ou (iii) alívio, isto é, causando a regressão dos sintomas clínicos.

[0027] "Administração", "administrando" e similares se referem tanto à administração direta, que pode ser a administração para células *in vitro*, administração para células *in vivo*, administração a um indivíduo por um profissional médico e/ou administração indireta, que pode ser a ato de prescrever uma composição da invenção. Quando aqui utilizado, em referência a uma célula, se refere à introdução de uma composição na célula. Tipicamente, é administrada uma quantidade eficaz, cuja quantidade pode ser determinada por um especialista na técnica. Por exemplo, quando um ou mais análogos da fucose são administrados a células cultivadas em um meio de cultura, a quantidade eficaz do (s) análogo (s) da fucose é definida como uma quantidade

que é suficiente para produzir o efeito desejado, por exemplo, produção de células T com fucosilação de superfície reduzida. Qualquer método de administração pode ser usado. Os compostos (por exemplo, um ou mais análogos da fucose) podem ser administrados às células por, por exemplo, adição dos compostos ao meio de cultura celular ou administração (por exemplo, alimentação) *in vivo*. A administração a um indivíduo pode ser conseguida por, por exemplo, alimentação, injeção intravascular, entrega intratumoral direta e similares.

[0028] Administração pode significar administração oral, administração como um supositório, contato tópico, administração intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intratecal, intranasal ou subcutânea ou implantação de um dispositivo de liberação lenta, por exemplo, uma minibomba osmótica, a um indivíduo. A administração é feita por qualquer via, incluindo parenteral e transmucosa (por exemplo, bucal, sublingual, palatal, gengival, nasal, vaginal, retal ou transdérmica). A administração parentérica inclui, por exemplo, intravenosa, intramuscular, intra-arteriolar, intradérmica, subcutânea, intraperitoneal, intraventricular e intracraniana. Outros modos de entrega incluem, entre outros, o uso de formulações lipossômicas, infusão intravenosa, adesivos transdérmicos etc. Por "coadministração", entende-se que uma composição

aqui descrita é administrada ao mesmo tempo, imediatamente antes de ou logo após a administração de uma ou mais terapias adicionais, por exemplo, terapias contra o câncer, tais como quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia ou imunoterapia. Os compostos da invenção podem ser administrados sozinhos ou podem ser coadministrados ao paciente. A coadministração pretende incluir a administração simultânea ou sequencial da composição individualmente ou em combinação (mais de uma composição). Assim, as preparações também podem ser combinadas, quando desejado, com outras substâncias ativas (por exemplo, para reduzir a degradação metabólica).

[0029] O termo "câncer", conforme usado aqui, se refere a um termo geral que engloba câncer primário e câncer metastático. Por "câncer primário" entende-se um grupo de células tumorais, que adquiriram pelo menos uma característica das células cancerígenas, mas ainda não invadiram os tecidos vizinhos e se mantêm unidas em um tumor localizado no local de origem primária. Por "câncer metastático" entende-se um grupo de células tumorais, que se originam das células de um câncer primário, que invadiram o tecido ao redor do referido câncer primário, disseminado pelo corpo, aderido a um novo local distante e desenvolvido para um novo tumor. Os exemplos de cânceres primários e metastáticos da presente invenção incluem, mas não se limitam

a, carcinoma da mama, câncer de esôfago, colorretal, pâncreas, estômago, (tecido de estroma gastrointestinal) GIST, hepatocelular, fígado, pulmão, pulmão de células pequenas, ovário, uterino, colo do útero, bexiga, rim, cólon, intestino delgado, intestino grosso, câncer gástrico, linfoma, próstata, testículo, carcinoma de tireoide, melanoma maligno, melanoma uveal, mieloma múltiplo, mesotelioma, osteossarcoma, condrossarcoma, miosarcoma, glioblastoma, sarcoma, glioma ou outros tumores cerebrais, cabeça/pescoço outros tumores gastrointestinais e de células germinativas, neoplasias hematológicas, leucemia, linfoma, por exemplo, leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia linfoide aguda (LLA), linfoma não Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiplo, linfoma folicular refratário, linfoma de células do manto, linfoma indolente de células B, malignidades de células B, cânceres de pele (incluindo melanoma), câncer ósseo, cânceres epiteliais, carcinoma de célula renal, adenocarcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, sarcoma sinovial e/ou mesotelioma.

[0030] Uma "célula cancerígena", como aqui utilizada, se refere a uma célula que exibe um fenótipo celular neoplásico, que pode ser caracterizado por um ou mais de, por exemplo, crescimento celular anormal, proliferação celular anormal, inibição do crescimento

dependente da densidade, crescimento independente da ancoragem potencial, capacidade de promover crescimento e/ou desenvolvimento de tumores em um modelo animal não humano imunocomprometido, e/ou qualquer indicador apropriado de transformação celular. "Célula cancerígena" pode ser usada aqui de forma intercambiável com "célula tumoral" ou "célula cancerosa" e abrange células cancerígenas de um tumor sólido, um tumor semissólido, um tumor primário, um tumor metastático e similares.

[0031] Um "efeito antitumoral" ou "efeito anticâncer", conforme usados aqui, se refere a um efeito biológico que pode apresentar uma diminuição no volume do tumor, uma inibição do crescimento do tumor, uma diminuição no número de células tumorais, uma diminuição na proliferação de células tumorais, uma diminuição no número de metástases, um aumento na sobrevida global ou livre de progressão, um aumento na expectativa de vida ou melhoria de vários sintomas fisiológicos associados ao tumor. Um efeito antitumoral também pode se referir à prevenção da ocorrência de um tumor, por exemplo, uma vacina.

[0032] O termo "sobrevida livre de progressão", que pode ser abreviado como PFS, conforme usado neste documento, se refere ao período entre a data do tratamento e a data da progressão da doença de acordo com os Critérios de Resposta

do Grupo de Trabalho Internacional (IWG) revisados para Linfoma Maligno ou morte por qualquer causa.

[0033] O termo "sobrevida global", que pode ser abreviado como OS, é definido como o tempo desde a data do tratamento até a data da morte.

[0034] O termo "terapia celular adotiva" ou "transferência celular adotiva", conforme aqui utilizado, se refere a provisão, por exemplo, administração ou transplante de células para terapia em um indivíduo que precisa da terapia. As células para terapia podem se originar do mesmo indivíduo ou de outro indivíduo, incluindo um animal humano e não humano. As células para terapia celular adotiva ou transferência de células adotivas podem incluir células T.

[0035] De acordo com os métodos aqui fornecidos, um indivíduo pode ser administrado com uma terapia celular adotiva. Alguns exemplos dos métodos e procedimentos relacionados à terapia celular adotiva podem ser encontrados em, por exemplo, WO2015120096, WO2015164675, WO2016011210, WO2016040441, WO2017070395 e US20160158359, cujas divulgações são expressamente incorporadas por referência na sua totalidade. A terapia celular adotiva pode fornecer ao indivíduo uma mistura de células incluindo células T, especialmente células T com fucosilação de superfície reduzida. A quantidade de células T administradas ao indivíduo que pode produzir uma resposta fisiológica

desejada (por exemplo, inibição ou redução do crescimento do tumor) é definida como uma quantidade eficaz. Os termos quantidade eficaz e dosagem eficaz são usados de forma intercambiável. Por exemplo, para obter uma resposta favorável em um indivíduo para tratar uma doença (por exemplo, câncer), a quantidade efetiva é a quantidade que reduz, elimina ou diminui os sintomas associados ao distúrbio, por exemplo, de modo a proporcionar controle da metástase do câncer, para eliminar células cancerígenas e/ou semelhantes. Quantidades e esquemas eficazes para administrar as células T podem ser determinados empiricamente por um especialista na técnica. As faixas de dosagem para administração são aquelas grandes o suficiente para produzir o efeito desejado no qual um ou mais sintomas da doença ou distúrbio são afetados (por exemplo, reduzidos ou retardados). A dosagem não deve ser tão grande que cause efeitos colaterais adversos substanciais, tais como reações cruzadas indesejadas, reações anafiláticas e similares. Geralmente, a dosagem varia de acordo com a idade, condição, sexo, tipo de doença, extensão da doença ou distúrbio, via de administração ou se outros fármacos estão incluídos no regime e pode ser determinada por um especialista na técnica. A dosagem pode ser ajustada pelo médico em caso de contraindicações. As doses podem variar e podem ser administradas em uma ou mais doses diárias, durante um ou

vários dias. Por exemplo, para o parâmetro fornecido, uma quantidade efetiva mostrará um aumento ou diminuição de pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, ou pelo menos 100%, em comparação com um pré-tratamento. A eficácia também pode ser expressa como aumento ou diminuição de "vezes". Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ter pelo menos um efeito de 1,2 vezes, 1,5 vezes, 2 vezes, 5 vezes ou mais efeito sobre um controle ou pré-tratamento. A dose exata e a formulação dependerão do objetivo da terapia e serão verificadas por um especialista na técnica, utilizando técnicas conhecidas (ver, por exemplo, 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, 20^a Edição, Gennaro, Editor (2003) e Pickar, Dosage Calculations (1999)).

[0036] O termo "fucosilação de superfície reduzida", conforme aqui utilizado, se refere à inibição da fucose ligada às glicoproteínas de superfície nas células, por exemplo, nas células T. Essa "inibição da fucose" é distinta da incorporação competitiva por um análogo da fucose em que o análogo da fucose substitui a fucose nas glicoproteínas de superfície.

[0037] Uma amostra "de controle" ou "normal", por exemplo, células de controle ou células normais, se refere

a uma amostra que serve como referência, geralmente uma referência conhecida, para comparação com uma amostra de teste. Por exemplo, uma amostra de teste pode ser modificada por células T, em particular, células T com fucosilação de superfície reduzida. Tais células T podem ser produzidas pelos métodos aqui divulgados, por exemplo, através da cultura de células T na presença de um análogo de fucose ou obtenção de células T de um animal que foi administrado com um análogo de fucose. Estas células T modificadas podem ser comparadas com células T normais ou de controle que foram cultivadas nas ausências de um análogo de fucose ou obtidas a partir de um animal que não foi administrado com um análogo de fucose, de modo a confirmar a redução. Um valor de controle também pode ser obtido a partir do mesmo indivíduo, por exemplo, a partir de uma amostra obtida anteriormente, antes da exposição ou administração de um análogo de fucose.

[0038] O termo "excipiente farmaceuticamente aceitável", tal como aqui utilizado, se refere a qualquer substância adequada que forneça um composto farmaceuticamente aceitável para administração de um (s) composto (s) de interesse para um indivíduo. "Excipiente farmaceuticamente aceitável" pode abranger substâncias referidas como diluentes farmaceuticamente aceitáveis, aditivos farmaceuticamente aceitáveis e carreadores farmaceuticamente aceitáveis. O termo "carreador" ou

"carreador farmaceuticamente aceitável" se refere a um diluente, adjuvante ou excipiente, com o qual um análogo de fucose é administrado. Esses carreadores farmacêuticos podem ser líquidos, tais como água e óleos, incluindo aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal ou sintética, tal como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similares. Os carreadores podem ser solução salina, goma arábica, gelatina, pasta de amido, talco, queratina, sílica coloidal, ureia e similares. Além disso, podem ser utilizados agentes auxiliares, estabilizadores, espessantes, lubrificantes e corantes. Em uma modalidade, quando administrados a um animal, os análogos de fucose ou composições e carreadores farmaceuticamente aceitáveis são estéreis. A água é um carreador preferido quando os análogos da fucose são administrados por via intravenosa. Soluções salinas e soluções aquosas de dextrose e glicerol também podem ser empregadas como carreadores líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Os carreadores farmacêuticos adequados também incluem excipientes tais como amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado seco, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e similares. As presentes composições, se desejado, também

podem conter pequenas quantidades de agentes umectantes ou emulsificantes ou agentes tamponantes de pH.

[0039] Como usado aqui, "grupos éster hidrolisáveis" se referem a qualquer éster convencional, que pode ser hidrolisado *in vivo* para produzir o grupo hidroxi. Grupos éster hidrolisáveis exemplificativos incluem $-\text{OC(O)H}$, $-\text{OC(O)C}_1\text{-C}_{10}$ alquil, $-\text{OC(O)C}_2\text{-C}_{10}$ alquenil, $-\text{OC(O)C}_2\text{-C}_{10}$ alquinil, $-\text{OC(O)aril}$, $-\text{OC(O)heterociclo}$, $-\text{OC(O)C}_1\text{-C}_{10}$ alquileno(aril), $-\text{OC(O)C}_2\text{-C}_{10}$ alquenileno(aril), $-\text{OC(O)C}_2\text{-C}_{10}$ alquinileno(aril), $-\text{OC(O)C}_1\text{-C}_{10}$ alquilenileno(heterociclo), $-\text{OC(O)C}_2\text{-C}_{10}$ alquenileno(heterociclo), $-\text{OC(O)CH}_2\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{CH}_3$ e $-\text{OC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{CH}_3$, em que cada n é um número inteiro independentemente selecionado de 0 a 5.

[0040] Como usados aqui, "peracetato de alquinil fucose" se refere a qualquer uma ou todas as formas de alquinil fucose (5-eticinilarabinose) com grupos acetato nas posições R¹⁻⁴ (consulte a fórmula I e II, infra), incluindo 6-eticinil-tetra-hidro-2H-pirano-2,3,4,5-tetralil tetracetato, incluindo os isômeros (2S, 3S, 4R, 5R, 6S) e (2R, 3S, 4R, 5R, 6S) e 5-((S)-1-hidroxiprop-2-inil)-tetra-hidrofuran-2,3,4-triil-tetracetato, incluindo os isômeros (2S, 3S, 4R, 5R) e (2R, 3S, 4R, 5R) e a forma de aldose, a menos que indicado de outra forma pelo contexto. Os termos "triacetato de alquinil fucose", "diacetato de alquinil

fucose" e "monoacetato de alquinil fucose" se referem às formas indicadas de tri, di e monoacetato de alquinil fucose, respectivamente.

[0041] Salvo indicação em contrário pelo contexto, o termo "alquil" se refere a um hidrocarboneto saturado, linear ou ramificado, não substituído, com 1 a 20 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono), a menos que especificado de outra forma. É preferido um grupo alquil de 1 a 3, de 1 a 8 ou de 1 a 10 átomos de carbono. Exemplos de grupos alquil são metil, etil, n-propil, isopropil, n-butil, isobutil, sec-butil, terc-butil, n-pentil, 2-pentil, 3-pentil, 2-metil-2-butil, n-hexil, n-heptil, n-octil, n-nonil, n-decil, 3-metil-2-butil, 3-metil-1-butil, 2-metil-1-butil, 1-hexil, 2-hexil, 3-hexil, 2-metil-2-pentil, 3-metil-2-pentil, 4-metil-2-pentil, 3-metil-3-pentil, 2-metil-3-pentil, 2, 3-dimetil-2-butil e 3,3-dimetil-2-butil.

[0042] Grupos alquil, isolados ou como parte de outro grupo, quando substituídos, podem ser substituídos por um ou mais grupos, de preferência de 1 a 3 grupos (e quaisquer substituintes adicionais selecionados a partir de halogênio), incluindo, mas não se limitando a: halogênio, -O-(C₁-C₈ alquil), -O-(C₂-C₈ alquenil), -O-(C₂-C₈ alquinil), aril, -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 e -CN; onde cada R' é independentemente selecionado de -H, -C₁-C₈ alquil, -C₂-C₈ alquenil, -C₂-C₈ alquinil ou aril.

[0043] Salvo indicação em contrário pelo contexto, os termos "alquenil" e "alquinil" se referem a cadeias de carbono lineares e ramificadas não substituídas ou opcionalmente substituídas (foram indicadas) tendo de 2 a 20 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de carbono átomos), sendo preferidos de 2 a 3, de 2 a 4, de 2 a 8 ou de 2 a 10 átomos de carbono. Uma cadeia alquenil tem pelo menos uma ligação dupla na cadeia e uma cadeia alquinil tem pelo menos uma ligação tripla na cadeia. Exemplos de grupos alquenil incluem, entre outros, etileno ou vinil, alil, -1 butenil, -2 butenil, -isobutilenil, -1 pentenil, -2 pentenil, 3-metil-1- butenil, -2 metil 2 butenil e -2,3 dimetil 2 butenil. Exemplos de grupos alquinil incluem, mas não estão limitados a acetilênico, propargil, acetilenil, propinil, -1 butinil, -2 butinil, -1 pentinil, -2 pentinil e -3 metil 1 butinil.

[0044] Grupos alquenil e alquinil, isolados ou como parte de outro grupo, quando substituídos podem ser substituídos por um ou mais grupos, preferencialmente de 1 a 3 grupos (e quaisquer substituintes adicionais selecionados a partir de halogênio), incluindo mas não se

limitando a: halogênio, $-O-(C_1-C_8\text{ alquil})$, $O-(C_2-C_8\text{ alquenil})$, $-O-(C_2-C_8\text{ alquinil})$, aril, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $=O$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ e $-CN$; onde cada R' é independentemente selecionado de H, $-C_1-C_8\text{ alquil}$, $C_2-C_8\text{ alquenil}$, $-C_2-C_8\text{ alquinil}$ ou aril.

[0045] Salvo indicação em contrário no contexto, o termo "alquíleno" se refere a um radical hidrocarboneto saturado de cadeia linear ou ramificada, não substituído, com 1 a 20 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono), com de 1 a 8 ou de 1 a 10 átomos de carbono sendo preferidos e possuindo dois centros radicais monovalentes derivados pela remoção de dois átomos de hidrogênio do mesmo ou dois átomos de carbono diferentes de um alcano parental. Os alquílenos típicos incluem, mas não estão limitados a metíleno, etíleno, propíleno, butíleno, pentíleno, hexíleno, heptíleno, octíleno, noníleno, decáleno, 1,4-ciclohexíleno e similares.

[0046] Grupos alquíleno, isolados ou como parte de outro grupo, quando substituídos, podem ser substituídos por um ou mais grupos, de preferência de 1 a 3 grupos (e quaisquer substituintes adicionais selecionados a partir de halogênio), incluindo, mas não limitados a: halogênio, $-O-(C_1-C_8\text{ alquil})$, $-O-(C_2-C_8\text{ alquenil})$, $-O-(C_2-C_8\text{ alquinil})$, -

aril, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{SR}'$, $-\text{SO}_3\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, $=\text{O}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $\text{N}(\text{R}')_2$ e $-\text{CN}$; onde cada R' é independentemente selecionado de H , $-\text{C}_1\text{--C}_8$ alquil, $-\text{C}_2\text{--C}_8$ alquenil, $-\text{C}_2\text{--C}_8$ alquinil ou $-\text{aril}$.

[0047] "Alquenileno" se refere a um radical hidrocarboneto cílico ou de cadeia linear ou ramificada, insaturada, de um grupo alquenil (como descrito acima) e com dois centros radicais monovalentes derivados da remoção de dois átomos de hidrogênio dos mesmos ou dois átomos de carbono diferentes de um alceno parental. Um grupo "alquenileno" pode ser não substituído ou opcionalmente substituído (foi indicado), conforme descrito acima para grupos alquenil. Em algumas modalidades, um grupo "alquenileno" não é substituído.

[0048] "Alquinileno" se refere a um radical hidrocarboneto cílico ou de cadeia ramificada ou não saturada de um grupo alquinil (como descrito acima) e tendo dois centros radicais monovalentes derivados da remoção de dois átomos de hidrogênio do mesmo ou dois átomos de carbono diferentes de um grupo alquino parental. Um grupo "alquinileno" pode ser não substituído ou opcionalmente substituído (foi indicado), conforme descrito acima para grupos alquinil. Em algumas modalidades, um grupo "alquinileno" não é substituído.

[0049] Salvo indicação em contrário no contexto, o termo "aril" se refere a um radical hidrocarboneto aromático monovalente substituído ou não substituído de 6 a 20 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono) derivados pela remoção de um hidrogênio átomo de um único átomo de carbono de um sistema de anéis aromáticos originais. Alguns grupos aril são representados nas estruturas exemplares como "Ar". Grupos aril típicos incluem, mas não estão limitados a radicais derivados de benzeno, benzeno substituído, fenil, naftaleno, antraceno, bifenil e similares.

[0050] Um grupo aril, sozinho ou como parte de outro grupo, pode ser opcionalmente substituído por um ou mais, de preferência de 1 a 5, ou até 1 a 2 grupos, incluindo, mas não se limitando a: halogênio, $-C_1-C_8$ alquil, $-C_2-C_8$ alquenil, $-C_2-C_8$ alquinil, $-O-(C_1-C_8)$ alquil, $-O-(C_2-C_8)$ alquenil, $O-(C_2-C_8)$ alquinil, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $N(R')_2$ e $-CN$; onde cada R' é independentemente selecionado de H, $-C_1-C_8$ alquil, $-C_2-C_8$ alquenil, $-C_2-C_8$ alquinil ou aril.

[0051] Salvo indicação em contrário no contexto, o termo "heterocíclicos" se refere a um sistema de anel monocíclico substituído ou não substituído com de 3 a 7 ou de 3 a 10 átomos no anel (também conhecido como membros do

anel) em que pelo menos um átomo do anel é um heteroátomo selecionado entre N, O, P ou S (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono e heteroátomos). O heterociclo pode ter de 1 a 4 heteroátomos no anel, selecionados independentemente de N, O, P ou S. Um ou mais átomos de N, C ou S em um heterociclo podem ser oxidados. Um heterociclo monocíclico tem preferencialmente de 3 a 7 membros no anel (por exemplo, de 2 a 6 átomos de carbono e de 1 a 3 heteroátomos selecionados independentemente de N, O, P ou S). O anel que inclui o heteroátomo pode ser aromático ou não aromático. Salvo indicação em contrário, o heterociclo é ligado ao seu grupo pendente em qualquer heteroátomo ou átomo de carbono que resulte em uma estrutura estável.

[0052] Os heterociclos são descritos em Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, Nova Iorque, 1968), particularmente nos Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 e 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nova York, 1950 até o presente), em particular os volumes 13, 14, 16, 19 e 28; e J. Am. Chem. Soc. 82: 5566 (1960). Exemplos de grupos "heterociclo" incluem, a título de exemplo, e não limitativos, piridil, di-hidropiridil, tetra-hidropiridil (piperidil), tiazolil, pirimidinil, furanil, tienil,

pirrolil, pirazolil, imidazolil, tetrazolil, fucosil, azirdinil, oxetanil, tetra-hidrofuranil.

[0053] Um grupo heterociclo, sozinho ou como parte de outro grupo, quando substituído, pode ser substituído por um ou mais grupos, de preferência 1 a 2 grupos, incluindo mas não se limitando a: -C₁-C₈ alquil, -C₂-C₈ alquenil, -C₂-C₈ alquinil, halogênio, -O-(C₁-C₈) alquil), -O-(C₂-C₈) alquenil), O-(C₂-C₈) alquinil), -aril, -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 e -CN; onde cada R' é independentemente selecionado de H, -C₁-C₈ alquil, -C₂-C₈ alquenil, -C₂-C₈ alquinil ou -aril.

[0054] A título de exemplo e não de limitação, os heterociclos ligados a carbono podem ser ligados nas seguintes posições: posições 2, 3, 4, 5 ou 6 de uma piridina; posições 3, 4, 5 ou 6 de uma piridazina; posições 2, 4, 5 ou 6 de uma pirimidina; posições 2, 3, 5 ou 6 de uma pirazina; posições 2, 3, 4 ou 5 de um furano, tetra-hidrofuran, tiofuran, tiofeno, pirrol ou tetra-hidropirrol; posição 2, 4 ou 5 de um oxazol, imidazol ou tiazol; posição 3, 4 ou 5 de um isoxazol, pirazol ou isotiazol; posição 2 ou 3 de uma aziridina; ou posição 2, 3 ou 4 de uma azetidina. Exemplos de heterociclos ligados a carbono podem incluir 2-piridil, 3-piridil, 4-piridil, 5-piridil, 6-piridil, 3-piridazinil, 4-piridazinil, 5-piridazinil, 6-piridazinil, 2-pirimidinil,

4-pirimidinil, 5-pirimidinil, 6-pirimidinil, 2-pirazinil, 3-pirazinil, 5-pirazinil, 6-pirazinil, 2-tiazolil, 4-tiazolil ou 5-tiazolil.

[0055] A título de exemplo e não como limitação, os heterociclos ligados a nitrogênio podem ser ligados na posição 1 de uma aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina ou 1H-indazol; posição 2 de um isoindol ou isoindolina; e posição 4 de uma morfolina. Ainda mais tipicamente, os heterociclos ligados a nitrogênio incluem 1-aziridil, 1-azetidil, 1-pirrolil, 1-imidazolil, 1-pirazolil e 1-piperidinil.

[0056] Salvo indicação em contrário, o termo "carbociclo" se refere a um sistema de anel monocíclico não aromático saturado ou insaturado, substituído ou não substituído, com 3 a 6 átomos no anel (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono) em que todos os átomos do anel são átomos de carbono.

[0057] Grupos carbociclos, isolados ou como parte de outro grupo, quando substituídos, podem ser substituídos por, por exemplo, um ou mais grupos, preferencialmente 1 ou 2 grupos (e quaisquer substituintes adicionais selecionados

a partir de halogênio), incluindo, mas não se limitando a: halogênio, $-C_1-C_8$ alquil, $-C_2-C_8$ alquenil, $-C_2-C_8$ alquinil, $-O-$ (C_1-C_8 alquil), $-O-$ (C_2-C_8 alquenil), $-O-$ (C_2-C_8 alquinil), aril, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $=O$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ e $-CN$; onde cada R' é independentemente selecionado de H , $-C_1-C_8$ alquil, $-C_2-C_8$ alquenil, $-C_2-C_8$ alquinil ou aril.

[0058] Exemplos de substituintes carbocílicos monocíclicos incluem ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, 1-ciclopent-1-enil, 1-ciclopent-2-enil, 1-ciclopent-3-enil, ciclo-hexil, 1-ciclo-hex-1-enil, 1-ciclo-hex 2-enil, 1-ciclo-hex-3-enil, ciclo-heptil, ciclo-octil, -1,3-ciclohexadienil, -1,4-ciclohexadienil, -1,3-ciclo-heptadienil, -1,3,5-ciclo-heptatrienil e -ciclooctadienil.

[0059] Quando qualquer variável ocorre mais de uma vez em qualquer constituinte ou fórmula, sua definição em cada ocorrência é independente de sua definição. Combinações de substituintes e/ou variáveis são permitidas apenas se tais combinações resultarem em compostos estáveis.

[0060] A menos que indicado de outra forma pelo contexto, um hífen (-) designa o ponto de ligação à molécula pendente. Por conseguinte, o termo $"-(C_1-C_{10})$ alquíleno aril" ou $"-C_1-C_{10}$ alquíleno (aril)" se refere a um radical C_1-C_{10} alquíleno, conforme definido aqui, em que o radical alquíleno

está ligado à molécula pendente em qualquer um dos átomos de carbono do radical alquíleno e um dos átomos de hidrogênio ligados a um átomo de carbono do radical alquíleno é substituído por um radical aril como aqui definido.

[0061] Quando um grupo particular é "substituído", esse grupo pode ter um ou mais substituintes, preferencialmente de um a cinco substituintes, mais preferencialmente de um a três substituintes, mais preferencialmente de um a dois substituintes, selecionados independentemente da lista de substituintes. O grupo pode, no entanto, geralmente ter qualquer número de substituintes selecionados a partir de halogênio.

[0062] Pretende-se que a definição de qualquer substituinte ou variável em um local particular em uma molécula seja independente de suas definições em outras partes dessa molécula. Entende-se que os substituintes e os padrões de substituição nos compostos desta invenção podem ser selecionados por um especialista na técnica para fornecer compostos que são ativos e quimicamente estáveis e que podem ser facilmente sintetizados por técnicas conhecidas na técnica, bem como aqueles métodos aqui estabelecidos.

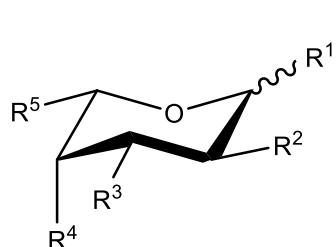
[0063] O termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estadual ou listado na Farmacopeia dos EUA ou em outra farmacopeia geralmente reconhecida para uso em animais

e, mais particularmente, em humanos. O termo "ingrediente farmaceuticamente compatível" se refere a um diluente, adjuvante, excipiente ou carreador farmaceuticamente aceitável com o qual o análogo da fucose é administrado.

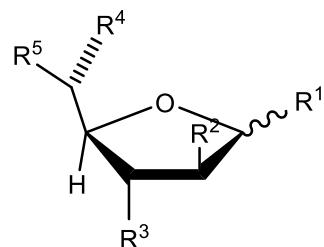
[0064] Os análogos da fucose são tipicamente substancialmente puros de contaminantes indesejados. Isto significa que o análogo tem tipicamente pelo menos cerca de 50% p/p (peso/peso) de pureza, além de estar substancialmente livre de proteínas interferentes e outros contaminantes. Às vezes, os agentes têm pelo menos cerca de 80% p/p e, mais preferencialmente pelo menos 90% ou cerca de 95% p/p de pureza. Utilizando técnicas de purificação convencionais, pode ser obtido um produto homogêneo de pelo menos 99% p/p.

II. Análogos de Fucose

[0065] Em qualquer uma das várias modalidades deste documento, o análogo da fucose pode ter a seguinte fórmula (I) ou (II):



(I)



(II)

ou uma forma de sal ou solvato farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que cada uma das fórmulas (I) ou

(II) pode ser o anômero alfa ou beta ou a forma de aldose correspondente;

em que R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$,

ou

em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é alquinil.

[0066] Em algumas modalidades, R^2 é $-F$.

[0067] Em algumas modalidades, R^5 é $-C\equiv CH$.

[0068] Em algumas modalidades, o análogo da fucose tem a fórmula (I) ou (II), em que R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$, ou em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$.

[0069] Em algumas modalidades, o análogo da fucose tem a fórmula (I) ou (II), em que R^2 é $-F$; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$, ou em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$.

[0070] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II), R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é

$-\text{CH}_3$. Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II), R^2 é $-\text{F}$; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-\text{OH}$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-\text{CH}_3$.

[0071] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II), cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-\text{OH}$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$.

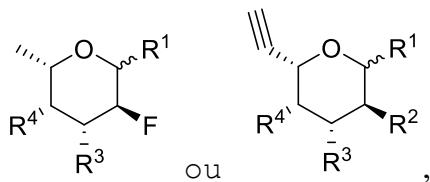
[0072] Em algumas modalidades, o grupo éster hidrolisável é $-\text{OC(O)C}_1\text{-C}_{10}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas, o grupo éster hidrolisável é $-\text{OC(O)CH}_3$.

[0073] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^2 é $-\text{F}$, cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC(O)C}_1\text{-C}_{10}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas das fórmulas (I) ou (II) em que R^2 é $-\text{F}$, cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC(O)CH}_3$. Em uma modalidade específica da fórmula (I) ou (II), R^2 é $-\text{F}$ e cada um de R^1 , R^3 e R^4 é $-\text{OH}$.

[0074] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$, cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC(O)C}_1\text{-C}_{10}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$, cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC(O)CH}_3$. Em uma modalidade específica

da fórmula (I) ou (II), R⁵ é -C≡CH e cada um de R¹, R², R³ e R⁴ é -OH. Em outra modalidade específica da fórmula (I) ou (II), R⁵ é -C≡CH e cada um de R¹, R², R³ e R⁴ é -OAc.

[0075] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose tem a fórmula:



ou uma forma de aldose das mesmas, em que cada um de R¹, R², R³ e R⁴ é como definido e descrito aqui.

[0076] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose é 2-desoxi-2-fluoro-L-fucose.

[0077] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose é peracetato de alquinil fucose. O peracetato de alquinil fucose pode ser tetracetato de alquinil fucose, triacetato de alquinil fucose, diacetato de alquinil fucose, monoacetato de alquinil fucose ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade exemplificada, o análogo da fucose é tetracetato de (3S, 4R, 5R, 6S)-6-eteniltetra-hidro-2H- piran-2,3,4,5-tetracil ou triacetato de 5-((S)-1- hidroxiprop-2-in-1- il) tetra-hidrofuran-2,3,4-triil.

[0078] Em qualquer uma das várias modalidades, o oxigênio do anel endocílico do análogo da fucose das fórmulas (I) e (II) pode ser substituído por enxofre.

[0079] Também são aqui fornecidas as formas de sal e solvato farmaceuticamente aceitáveis dos compostos das fórmulas I e II. Por conseguinte, em qualquer uma das várias modalidades aqui proporcionadas, as formas farmaceuticamente aceitáveis de sal ou solvato dos compostos divulgados podem ser usadas. Os solvatos normalmente não alteram significativamente a atividade fisiológica dos compostos e, como tal, podem funcionar como equivalentes farmacológicos. Um tipo de solvato é um hidrato.

[0080] Em alguns aspectos, o análogo da fucose é solúvel em tampão de formulação (por exemplo, tampão de formulação aquoso) a uma concentração de pelo menos 10 mM. Em algumas modalidades, o análogo da fucose é solúvel no tampão de formulação a uma concentração de pelo menos 100 mM. Em alguns aspectos, o análogo da fucose é solúvel no tampão de formulação (por exemplo, tampão de formulação aquoso) a uma concentração de pelo menos 100 μ g/ml, pelo menos 1mg/ml, pelo menos 50mg/ml, pelo menos cerca de 100mg/ml, pelo menos cerca de 200mg/ml ou pelo menos cerca de 300mg/ml.

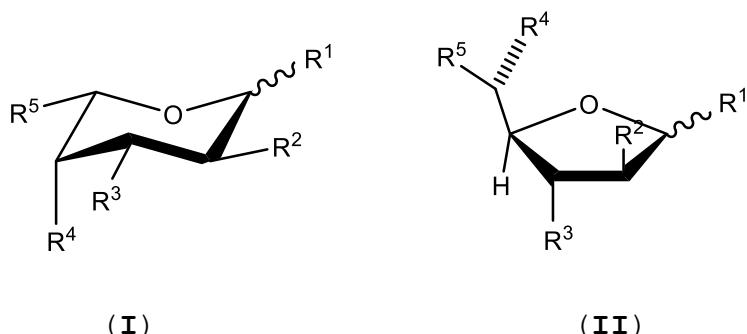
III. Método de Produção de Células T com Fucosilação de Superfície Reduzida

[0081] Em alguns aspectos, métodos de produção de células T com fucosilação de superfície reduzida são aqui fornecidos.

II-1. Métodos de produção in vitro ou ex vivo

[0082] Em alguns aspectos, são fornecidos métodos *in vitro* ou *ex vivo* de produção de células T com fucosilação de superfície reduzida. Os métodos podem incluir cultivar células T na presença de um análogo de fucose aqui divulgado em um meio de cultura de células e coletar as células T com fucosilação de superfície reduzida. As células T produzidas pelo método podem ter fucosilação de superfície reduzida em comparação com células T cultivadas na ausência de um análogo da fucose. Tais células T produzidas pelos métodos aqui divulgados podem ser usadas para fins terapêuticos, tais como uma terapia celular adotiva ou tratamento de câncer. Portanto, pelo menos em algumas modalidades, as células T com fucosilação de superfície reduzida são referidas como "células T terapêuticas".

[0083] Em algumas modalidades, o análogo da fucose usado nos métodos pode ser a fórmula (I) ou (II):



ou uma forma de sal ou solvato farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que cada uma das fórmulas (I) ou

(II) pode ser o anômero alfa ou beta ou a forma de aldose correspondente;

em que R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$,

ou

em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é alquinil.

[0084] Em algumas modalidades, R^2 é $-F$.

[0085] Em algumas modalidades, R^5 é $-C\equiv CH$.

[0086] Em algumas modalidades, o análogo da fucose usado nos métodos tem a fórmula (I) ou (II), em que R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$, ou em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$.

[0087] Em algumas modalidades, o análogo de fucose usado nos métodos tem a fórmula (I) ou (II), em que R^2 é $-F$; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$, ou em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$.

[0088] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II), R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é

$-\text{CH}_3$. Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II), R^2 é $-\text{F}$; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-\text{OH}$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-\text{CH}_3$.

[0089] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II), cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado a partir de $-\text{OH}$, ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$.

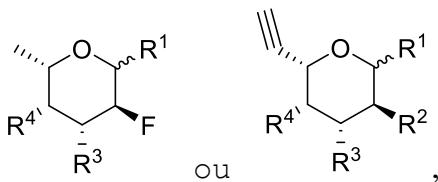
[0090] Em algumas modalidades, o grupo éster hidrolisável é $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1\text{--C}_{10}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas, o grupo éster hidrolisável é $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$.

[0091] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^2 é $-\text{F}$, cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1\text{--C}_{10}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^2 é $-\text{F}$, cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. Em uma modalidade específica da fórmula (I) ou (II), R^2 é $-\text{F}$ e cada um de R^1 , R^3 e R^4 é $-\text{OH}$.

[0092] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$, cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1\text{--C}_{10}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$, cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. Em uma modalidade específica

da fórmula (I) ou (II), R⁵ é -C≡CH e cada um de R¹, R², R³ e R⁴ é -OH. Em outra modalidade específica da fórmula (I) ou (II), R⁵ é -C≡CH e cada um de R¹, R², R³ e R⁴ é -OAc.

[0093] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose usado nos métodos tem a fórmula:



ou uma forma de aldose das mesmas, em que cada um de R¹, R², R³ e R⁴ é como definido e descrito aqui.

[0094] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose é 2-desoxi-2-fluoro-L-fucose.

[0095] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose é peracetato de alquinil fucose. O peracetato de alquinil fucose pode ser tetracetato de alquinil fucose, triacetato de alquinil fucose, diacetato de alquinil fucose, monoacetato de alquinil fucose ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade exemplificada, o análogo da fucose é tetracetato de (3S, 4R, 5R, 6S)-6-eteniltetra-hidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraíl ou triacetato de 5-((S)-1-hidroxiprop-2-in-1-il) tetra-hidrofuran-2,3,4-triíl.

[0096] Em qualquer uma das várias modalidades, o oxigênio do anel endocílico do análogo da fucose das fórmulas (I) e (II) pode ser substituído por enxofre.

[0097] Em algumas modalidades, os métodos aqui apresentados podem incluir uma etapa de cultura de células T na presença de um análogo de fucose em um meio de cultura de refugo. Em algumas modalidades, existem outros tipos de células, por exemplo glóbulos vermelhos presentes nos meios de cultura. As células T a serem cultivadas podem ser obtidas a partir de um indivíduo (por exemplo, um humano ou um animal não humano). Alternativamente, as células T a serem cultivadas podem ser de uma população de células previamente cultivadas e/ou armazenadas.

[0098] Em algumas modalidades, os métodos divulgados neste documento produzem células T que possuem fucosilação de superfície reduzida que pode ser usada em uma terapia celular adotiva para um indivíduo necessitado dessa terapia. Nas modalidades em que as células T e as populações de células são isoladas de uma amostra, tal como uma amostra biológica, por exemplo, uma obtida ou derivada de um indivíduo, o indivíduo pode ser um paciente que precisa de uma terapia celular ou para o qual a terapia celular será administrada, ou seja, uma fonte de autólogo. Alternativamente, as células T e as populações de células podem ser isoladas de um doador que não é um paciente que precisa de uma célula adotiva, isto é, uma fonte alogênica. O doador pode ser um ser humano saudável ou outro paciente que sofra da mesma condição ou doença que o paciente que

necessita de terapia celular ou para o qual a terapia celular será administrada está tendo.

[0099] Em algumas modalidades, as células obtidas de um indivíduo podem ser uma mistura de células primárias, por exemplo, células humanas primárias. As amostras incluem tecido, fluido e outras amostras colhidas diretamente do indivíduo, bem como amostras resultantes de uma ou mais etapas de processamento, tais como separação, centrifugação, lavagem, incubação e/ou cultura. A amostra biológica pode ser uma amostra obtida diretamente de uma fonte biológica ou de uma amostra que é processada. As amostras biológicas incluem, mas não estão limitadas a fluidos corporais, tais como sangue, plasma, soro, tecidos e amostras de órgãos, tal como baço, incluindo amostras processadas delas derivadas. Exemplos de amostras incluem sangue total, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), leucócitos, medula óssea, timo, biópsia de tecido, tumor, leucemia, linfoma, linfonodo, tecido linfoide associado ao intestino, tecido linfoide associado à mucosa, baço, outros tecidos linfoideos, fígado, pulmão, estômago, intestino, cólon, rim, pâncreas, mama, osso, próstata, colo do útero, testículos, ovários, amígdalas ou outro órgão e/ou células deles derivadas. As amostras incluem, no contexto da terapia celular, por exemplo, terapia celular adotiva, amostras de fontes autólogas e alogênicas. As células em algumas

modalidades podem ser obtidas a partir de uma fonte xenogênica, por exemplo, de camundongo, rato, primata não humano e porco.

[00100] Em algumas modalidades, as células a serem cultivadas de acordo com os métodos aqui apresentados podem ser derivadas de linhagens celulares existentes, por exemplo, linhagens de células T.

[00101] Em algumas modalidades, o isolamento das células ou populações para cultura pode incluir uma ou mais etapas de preparação e separação. Em algumas modalidades, as células podem ser lavadas, centrifugadas e/ou incubadas na presença de um ou mais reagentes, por exemplo, para remover componentes indesejados, enriquecer para componentes desejados, lisar ou remover células sensíveis a reagentes específicos. Em algumas modalidades, as células são separadas com base em uma ou mais propriedades, tais como densidade, propriedades aderentes, tamanho, sensibilidade, perfil de expressão de marcador de superfície e/ou resistência a componentes específicos.

[00102] Em algumas modalidades em que as células sanguíneas são coletadas de um indivíduo, as células sanguíneas coletadas podem ser lavadas, por exemplo, para remover a fração plasmática e colocar as células em um tampão ou meio apropriado para as etapas de processamento subsequentes. Em algumas modalidades, as células podem ser

ressuspensas em uma variedade de tampões biocompatíveis conhecidos na técnica após a lavagem. Em certas modalidades, os componentes de uma amostra de células sanguíneas podem ser removidos e as células podem ser ressuspensas em meios de cultura. Em algumas modalidades, os métodos podem incluir métodos de separação de células com base na densidade, tal como a preparação de glóbulos brancos a partir de sangue periférico através da lise dos glóbulos vermelhos e centrifugação.

[00103] Em algumas modalidades, os métodos podem incluir uma etapa de segregar diferentes tipos de células com base na expressão ou na presença na célula de uma ou mais moléculas específicas, tais como marcadores de superfície, por exemplo, proteínas de superfície. Em algumas modalidades, qualquer método conhecido para separação com base em tais marcadores pode ser usado. Em algumas modalidades, a separação pode ser uma separação baseada em afinidade ou imunoafinidade. Por exemplo, o isolamento em alguns aspectos inclui a separação de células e populações de células com base na expressão ou no nível de expressão das células de um ou mais marcadores, tipicamente marcadores de superfície celular, por exemplo, por incubação com um anticorpo ou parceiro de ligação que se liga especificamente a tais marcadores, seguidos geralmente por etapas de lavagem e separação de células que se ligaram ao anticorpo ou

parceiro de ligação, daquelas células que não se ligaram ao anticorpo ou parceiro de ligação.

[00104] Em algumas modalidades, um ou mais subtipos de células T podem ser ainda mais enriquecidos. Em algumas modalidades, os subtipos de células T podem ser determinados pela presença ou nível de um ou mais marcadores particulares, tais como marcadores de superfície nas células T. Em alguns casos, esses marcadores são aqueles ausentes ou expressos em níveis relativamente baixos em certas populações de células T (tais como células que não são de memória), mas estão presentes ou expressos em níveis relativamente mais altos em certas outras populações de células T (tais como células de memória). Em uma modalidade, as células (tais como as células CD8⁺ ou as células T, por exemplo, células CD3⁺) são enriquecidas para (ou seja, selecionadas positivamente para) células que são positivas ou expressam altos níveis de superfície de CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127 e/ou CD62L e/ou esgotado de (por exemplo, selecionado negativamente para) células que são positivas ou expressam altos níveis de superfície de CD45RA. Em algumas modalidades, as células são enriquecidas ou esgotadas de células positivas ou expressando altos níveis de superfície de CD122, CD95, CD25, CD27 e/ou IL7-Ra (CD127). Em alguns exemplos, as células T CD8⁺ são enriquecidas para células positivas para CD45RO (ou negativas para CD45RA) e para CD62L.

[00105] Em algumas modalidades, uma população de células desejada aqui descrita pode ser coletada e enriquecida (ou esgotada) por citometria de fluxo, na qual as células coradas para vários marcadores de superfície celular são transportadas em uma corrente fluídica. Em algumas modalidades, as populações primárias de células T ou as células T produzidas podem ser coletadas e enriquecidas (ou esgotadas) por meio de classificação em escala preparativa (FACS). Em algumas modalidades, os anticorpos ou parceiros de ligação são marcados com um ou mais marcadores detectáveis, para facilitar a separação para seleção positiva e/ou negativa. Por exemplo, a separação pode ser baseada na ligação a anticorpos marcados com fluorescência. Em alguns exemplos, a separação de células com base na ligação de anticorpos ou outros parceiros de ligação específicos para um ou mais marcadores de superfície celular é realizada em uma corrente fluídica, tal como por classificação celular ativada por fluorescência (FACS), incluindo escala preparativa (FACS) e/ou chips de sistemas microeletromecânicos (MEMS), por exemplo, em combinação com um sistema de detecção citométrica de fluxo. Tais métodos permitem a seleção positiva e negativa com base em vários marcadores simultaneamente.

[00106] A separação não precisa resultar em 100% de enriquecimento ou remoção de uma determinada população de

células ou células que expressam um determinado marcador. Por exemplo, a seleção ou enriquecimento para células de um tipo específico, tais como aquelas que expressam um marcador, se refere ao aumento do número ou porcentagem dessas células, mas não precisa resultar em uma ausência completa de células que não expressam o marcador. Por exemplo, em algumas modalidades, uma seleção de população de células T CD3⁺ enriquece para a referida população, mas também pode conter uma porcentagem residual ou pequena de outras células não selecionadas, que podem, em alguns casos, incluir a outra de células T não CD3⁺ e/ou população de células não-T ainda estando presentes na população enriquecida. Em algumas modalidades, as células T tendo redução da fucosilação da superfície podem ter células T periféricas humanas.

[00107] Em algumas modalidades, a separação ou enriquecimento de tipos específicos de células pode ser realizada antes ou após uma etapa de cultura de uma população de células em um meio de cultura. Portanto, em alguns exemplos, uma mistura de células primárias isoladas de uma amostra pode ser processada para separar ou enriquecer células T e remover (por exemplo, reduzir um número de) outros tipos de células ou componentes (por exemplo, plaquetas e glóbulos vermelhos). Então a população enriquecida de células T pode prosseguir para a cultura. Alternativamente, em outros exemplos, uma mistura de células

contendo células T e outros tipos de células ou componentes isolados de uma amostra pode ser cultivada em um meio de cultura, sem separar ou enriquecer substancialmente as células T. Depois de a população celular atingir um número desejado ou a etapa de cultura estar substancialmente completa, as células cultivadas podem ser processadas para separar ou enriquecer células T para uma utilização posterior, por exemplo, para a terapia celular adotiva ou o tratamento contra o câncer.

[00108] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos podem incluir uma ou mais das várias etapas para cultivar células e populações de células. Em algumas modalidades, os métodos podem incluir uma ou mais etapas de cultura de uma população de células isoladas de uma amostra ou obtidas de uma linhagem celular existente. Em algumas modalidades alternativas, os métodos podem incluir uma ou mais etapas de cultura de uma população de células que foi separada de uma mistura de células como obtida e isolada de uma amostra ou obtida de uma linhagem celular existente. Em algumas dessas modalidades, a maioria da população de células (por exemplo, pelo menos 20% ou mais da população total de células) a serem cultivadas pode incluir células T que foram separadas ou enriquecidas a partir de uma população anterior de células.

[00109] Em algumas modalidades, uma pluralidade de células a serem cultivadas pode ser geralmente cultivada em

um vaso, tal como a mesma unidade, câmara, cavidade, coluna, tubo, conjunto de tubos, válvula, frasco, prato de cultura, saco ou outro recipiente para cultura ou cultivo de células.

[00110] As etapas de cultura podem incluir pelo menos um ou mais dos seguintes itens: cultura, cultivo, estimulação, ativação, propagação, incluindo incubação na presença de condições estimulantes, por exemplo, condições projetadas para induzir proliferação, expansão, ativação e/ou sobrevivência de células na população.

[00111] As condições podem incluir um ou mais meios específicos, temperatura, conteúdo de oxigênio, conteúdo de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons e/ou fatores estimuladores, tais como citocinas, quimiocinas,抗原s, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células. Em algumas modalidades, um ou mais agentes que são projetados para modificar as características das células podem ser adicionados a um meio de cultura. Por exemplo, um ou mais análogos da fucose podem ser adicionados a um meio de cultura de modo a modificar um nível de fucosilação na superfície das células, em particular as células T.

[00112] Em algumas modalidades, os métodos aqui divulgados incluem a modificação de células T cultivando as

células T na presença de um análogo de fucose. O análogo da fucose pode ser adicionado a um meio de cultura de células. Em certas modalidades, o meio de cultura de células pode conter o análogo da fucose a uma concentração de cerca de 1ng/mL a vários mg/mL de meio de cultura. Em algumas modalidades, o meio de cultura pode conter o análogo da fucose em uma concentração de cerca de 1ng/mL, cerca de 10ng/mL, cerca de 50ng/mL, cerca de 100ng/mL, cerca de 100ng/mL, cerca de 150ng/mL, cerca de 200ng/mL, cerca de 250ng/mL, cerca de 300ng/mL, cerca de 350ng/mL, cerca de 400ng/mL, cerca de 450ng/mL, cerca de 500ng/mL, cerca de 550ng/mL, cerca de 550ng/mL, cerca de 600ng/mL, cerca de 650ng/mL, cerca de 700ng/mL, cerca de 750ng/mL, cerca de 800ng/mL, cerca de 950ng/mL, cerca de 1 μ g/mL, cerca de 1 μ g/mL, cerca de 10 μ g/mL, cerca de 50 μ g/mL, cerca de 100 μ g/mL, cerca de 150 μ g/mL, cerca de 200 μ g/mL, cerca de 250 μ g/mL, cerca de 300 μ g/mL, cerca de 350 μ g/mL, cerca de 350 μ g/mL, cerca de 400 μ g/mL, cerca de 450 μ g/mL, cerca de 450 μ g/mL, cerca de 500 μ g/mL, cerca de 550 μ g/mL, cerca de 600 μ g/mL, cerca de 650 μ g/mL, cerca de 700 μ g/mL, cerca de 750 μ g/mL, cerca de 800 μ g/mL, cerca de 950 μ g/mL, cerca de 950 μ g/mL, cerca de 1mg/mL, cerca de 2mg/mL, cerca de 3mg/mL, cerca de 4mg/mL, cerca de 5mg/mL de meio de cultura ou mais, ou qualquer valor intermediário dos anteriores. Em algumas outras modalidades, o meio de cultura de células pode conter

o análogo da fucose de cerca de 1nM a vários mM em sua concentração final em um meio de cultura de células. Em algumas modalidades, o meio de cultura pode conter o análogo da fucose em uma concentração de cerca de 1nM, cerca de 10nM, cerca de 50nM, cerca de 100nM, cerca de 150nM, cerca de 200nM, cerca de 250nM, cerca de 300nM, cerca de 350nM, cerca de 400nM, cerca de 450nM, cerca de 500nM, cerca de 550nM, cerca de 600nM, cerca de 650nM, cerca de 700nM, cerca de 750nM, cerca de 800nM, cerca de 950nM, cerca de 1µM, cerca de 10µM, cerca de 50µM, cerca de 100µM, cerca de 150µM, cerca de 200µM, cerca de 250µM, cerca de 300µM, cerca de 350µM, cerca de 400µM, cerca de 450µM, cerca de 500µM, cerca de 550µM, cerca de 600µM, cerca de 650µM, cerca de 700µM, cerca de 750µM, cerca de 800µM, cerca de 950µM, cerca de 1 mM, cerca de 2 mM, cerca de 3 mM, cerca de 4mM, cerca de 5mM ou mais, ou qualquer valor intermediário dos anteriores no seu final concentração em um meio de cultura celular.

[00113] Em algumas modalidades, os métodos aqui apresentados incluem células T ativadoras com um ou mais agentes ativadores de células T para produzir uma população de células T ativadas. Qualquer combinação de um ou mais agentes ativadores de células T pode ser usada para produzir uma população de células T ativadas, incluindo, mas não se limitando a, um anticorpo ou fragmento funcional do mesmo que tem como alvo uma molécula estimuladora ou coestimuladora

de células T (por exemplo, anticorpo anti-CD2, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD28 ou fragmentos funcionais dos mesmos em uma concentração de cerca de 1ng/mL a cerca de 100ng/mL), uma citocina de célula T (por exemplo, qualquer tipo isolado, selvagem ou citocinas recombinantes, tais como: interleucina 1 (IL-1), interleucina 2, (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 7 (IL-7), interleucina 15 (IL-15), fator de necrose tumoral α (TNF α) em uma concentração de cerca de 1ng/mL a cerca de 100ng/mL) ou qualquer outro mitogênio adequado (por exemplo, acetato de tetradecanoil forbol (TPA), fito-hemaglutinina (PHA), concanavalina A (conA), lipopolissacarídeo (LPS), mitógeno de ervilha (PWM) em qualquer concentração desejada) ou ligante natural a uma molécula estimuladora ou coestimuladora de células T em qualquer concentração desejada. Em algumas modalidades preferidas, um anticorpo anti-CD3 (ou fragmento funcional do mesmo), um anticorpo anti-CD28 (ou fragmento funcional do mesmo) ou uma combinação de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 podem ser usados de acordo com a etapa de estimulação da população de linfócitos T.

[00114] Em algumas modalidades, as células são cultivadas por aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 dias ou mais dias antes da conclusão da cultura. Em algumas modalidades, as células podem ser subcultivadas uma ou mais vezes, isto

é, pelo menos algumas das células cultivadas são transferidas de um meio de cultura anterior para um novo meio de cultura antes que a cultura seja concluída. Em alguma outra modalidade, as células podem ser cultivadas uma vez antes da conclusão da cultura. Quaisquer agentes adicionados ao meio de cultura podem ser fornecidos às células uma ou mais vezes durante todo o período de cultura.

[00115] Em algumas modalidades, a concentração de células T cultivadas úteis para os métodos aqui descritos pode ser de cerca de 1,0 a $10,0 \times 10^6$ células/mL. Em certas modalidades, a concentração de células T cultivadas pode ser de cerca de 1,0 a $2,0 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $3,0 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $4,0 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $5,0 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $6,0 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $7,0 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $8,0 \times 10^6$ células/mL, de 1,0 a $9,0 \times 10^6$ células/mL ou de cerca de 1,0 a $10,0 \times 10^6$ células/mL. Em certas modalidades, a concentração de células T cultivadas pode ser de cerca de 1,0 a $2,0 \times 10^6$ células/mL. Em certas modalidades, a concentração de células T cultivadas pode ser de cerca de 1,0 a $1,2 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $1,4 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $1,6 \times 10^6$ células/mL, de cerca de 1,0 a $1,8 \times 10^6$ células/mL, ou de cerca de 1,0 a $2,0 \times 10^6$ células/mL. Em certas modalidades, a concentração de linfócitos pode ser pelo menos cerca de $1,0 \times 10^6$

células/mL, pelo menos cerca de $1,1 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $1,2 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $1,3 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $1,4 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $1,5 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $1,6 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $1,7 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $1,8 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $1,9 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $2,0 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $4,0 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $6,0 \times 10^6$ células/mL, pelo menos cerca de $8,0 \times 10^6$ células/mL, ou pelo menos cerca de $10,0 \times 10^6$ células/mL.

[00116] As células T cultivadas pelos métodos descritos acima podem ter fucosilação de superfície reduzida. Em alguns aspectos, a fucosilação de superfície reduzida pode se referir à redução ou inibição do nível de fucosilação que está naturalmente presente na superfície das células T normais. Em algumas modalidades, a redução da fucosilação da superfície nas células T não inclui a substituição da fucose naturalmente presente na superfície da célula T pelo análogo da fucose que é fornecido artificialmente às células T.

[00117] As células T cultivadas pelos métodos descritos acima podem ter fucosilação de superfície reduzida. Em algumas modalidades, a fucosilação de superfície média nas células T cultivadas e produzidas pelos

métodos fornecidos pode ter pelo menos cerca de 5% de redução em comparação com a fucosilação de superfície média das células T cultivadas na ausência de um análogo da fucose, ou seja, células T de controle. Em algumas modalidades, a fucosilação média da superfície nas células T cultivadas e produzidas pelos métodos fornecidos pode ter pelo menos cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 99%, cerca de 100% de redução em relação à média da fucosilação da superfície das células T de controle que foram cultivadas na ausência de um análogo da fucose. O nível de fucosilação da superfície nas células T pode ser determinado por técnicas disponíveis na técnica, por exemplo, citometria de fluxo.

[00118] Em algumas modalidades, a etapa de cultura pode ser concluída e as células cultivadas podem prosseguir para uma etapa de coleta (ou colheita) de pelo menos algumas das células cultivadas. A etapa de cultura pode ser concluída quando o número de células cultivadas atingir o número desejado, após a passagem de um período planejado de cultura e/ou se a fucosilação de superfície média nas células T da cultura atingir o nível desejado (por exemplo, pelo menos 5

% de redução ou mais em relação à fucosilação de superfície média das células T de controle).

[00119] Depois de concluída a etapa de cultura, as células podem ser colhidas por técnicas disponíveis na técnica. A etapa de colheita pode incluir uma ou mais etapas, tais como centrifugação, lavagem, remoção de células ou componentes indesejados e isolamento do tipo de célula desejado, conforme descrito em outras partes deste documento.

[00120] Em algumas modalidades, a população de células produzidas pelos métodos descritos neste documento, que incluem células T com fucosilação de superfície reduzida, pode opcionalmente ser criopreservada, de modo que as células possam ser usadas em uma data posterior, por exemplo, para administração em uma terapia celular adotiva ou tratamento de câncer, ou formulação de uma composição farmacêutica para a terapia ou tratamento. Tal método pode incluir uma etapa de lavagem e concentração da população de células T desejadas, isto é, células T com fucosilação de superfície reduzida com uma solução diluente. Em algumas modalidades, a solução diluente pode conter solução salina normal, solução salina a 0,9%, PlasmaLyte A, 5% de dextrose/solução salina NaCl a 0,45%, albumina sérica humana (HSA) ou uma combinação das mesmas. Em algumas modalidades, o HSA pode ser adicionado às células lavadas e concentradas para melhorar a viabilidade

celular e a recuperação celular após o descongelamento. Em outra modalidade, a solução de lavagem pode ser solução salina normal e as células concentradas e lavadas podem ser suplementadas com HSA (5%). Em algumas modalidades, uma mistura de criopreservação pode ser gerada. A mistura de criopreservação pode incluir a população diluída de células na solução diluente e uma solução conservante criogênica adequada. Em alguns aspectos, a solução criopreservativa pode ser qualquer solução conservante de crio adequado disponível na técnica, misturada com a solução diluente das células T produzidas. Em algumas modalidades, o método também inclui uma etapa de congelamento da mistura de criopreservação. Em um aspecto, a mistura de criopreservação é congelada em um freezer de taxa controlada usando um ciclo de congelamento definido a qualquer concentração celular desejada, por exemplo, entre cerca de 10^6 a 10^8 por ml de mistura de criopreservação. O método também pode incluir uma etapa de armazenamento da mistura de criopreservação em nitrogênio líquido na fase de vapor.

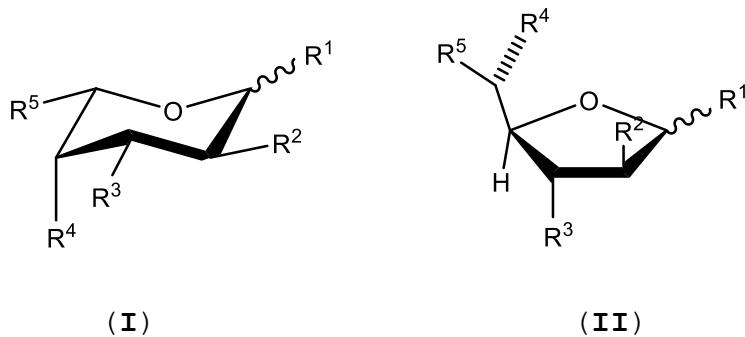
[00121] Em algumas modalidades, as células T produzidas pelos métodos aqui fornecidos, por exemplo, as células T com redução da fucosilação da superfície podem ser usadas em uma terapia celular adotiva ou tratamento de câncer. Por exemplo, as células T produzidas podem ser administradas a um indivíduo necessitado da terapia ou

tratamento. Em algumas modalidades, as células T produzidas pelos métodos aqui fornecidos, por exemplo, as células T com redução da fucosilação da superfície podem ser usadas para formular uma composição farmacêutica que pode ser usada em uma terapia celular adotiva ou tratamento de câncer.

II-2. Métodos de produção in vivo

[00122] Em alguns aspectos, métodos in vivo de produção de células T com fucosilação de superfície reduzida são aqui fornecidos. Os métodos podem incluir o fornecimento de um análogo de fucose a um animal e a obtenção de células T com fucosilação de superfície reduzida do animal. As células T produzidas por esses métodos podem ter uma fucosilação de superfície reduzida em relação às células T presentes ou obtidas de um animal que não foi fornecido com um análogo da fucose. Tais células T produzidas pelos métodos aqui divulgados podem ser usadas para fins terapêuticos, tal como uma terapia celular adotiva ou tratamento de câncer. Portanto, pelo menos em algumas modalidades, as células T com fucosilação de superfície reduzida são referidas como "células T terapêuticas".

[00123] Em algumas modalidades, o análogo da fucose usado nos métodos pode ser a fórmula (I) ou (II) :



ou uma forma de sal ou solvato farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que cada uma das fórmulas (**I**) ou (**II**) pode ser o anômero alfa ou beta ou a forma de aldose correspondente;

em que R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$,

ou

em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente - OH ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é alquinil.

[00124] Em algumas modalidades, R^2 é $-F$.

[00125] Em algumas modalidades, R^5 é $-C\equiv CH$.

[00126] Em algumas modalidades, o análogo da fucose usado nos métodos tem a fórmula **(I)** ou **(II)**, em que R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$, ou em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$.

[00127] Em algumas modalidades, o análogo de fucose usado nos métodos tem a fórmula **(I)** ou **(II)**, em que R^2 é $-F$; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$, ou em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$.

[00128] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula **(I)** ou **(II)**, R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$. Em algumas modalidades selecionadas da fórmula **(I)** ou **(II)**, R^2 é $-F$; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$.

[00129] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula **(I)** ou **(II)**, cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado a partir de $-OH$, ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$.

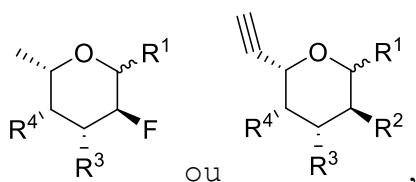
[00130] Em algumas modalidades, o grupo éster hidrolisável é $-OC(O)C_{1-C_{10}}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas, o grupo éster hidrolisável é $-OC(O)CH_3$.

[00131] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula **(I)** ou **(II)** em que R^2 é $-F$, cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-OH$ e $-OC(O)C_{1-C_{10}}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas da fórmula **(I)** ou **(II)** em que R^2 é $-F$, cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-OH$

e $-\text{OC(O)CH}_3$. Em uma modalidade específica da fórmula (I) ou (II), R^2 é $-\text{F}$ e cada um de R^1 , R^3 e R^4 é $-\text{OH}$.

[00132] Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$, cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC(O)C}_1\text{--C}_{10}$ alquil. Em algumas modalidades selecionadas da fórmula (I) ou (II) em que R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$, cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{OH}$ e $-\text{OC(O)CH}_3$. Em uma modalidade específica da fórmula (I) ou (II), R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$ e cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é $-\text{OH}$. Em outra modalidade específica da fórmula (I) ou (II), R^5 é $-\text{C}\equiv\text{CH}$ e cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é $-\text{OAc}$.

[00133] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose usado nos métodos tem a fórmula:



ou uma forma de aldose das mesmas, em que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é como definido e descrito aqui.

[00134] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose é 2-desoxi-2-fluoro-L-fucose.

[00135] Em algumas modalidades selecionadas, o análogo da fucose é peracetato de alquinil fucose. O peracetato de alquinil fucose pode ser tetracetato de alquinil fucose, triacetato de alquinil fucose, diacetato de

alquinil fucose, monoacetato de alquinil fucose ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade exemplificada, o análogo da fucose é tetracetato de (3S, 4R, 5R, 6S)-6- etiniltetra-hidro-2H- piran-2,3,4,5-tetracil ou triacetato de 5-((S)-1- hidroxiprop-2-in-1-il) tetra-hidrofuran-2,3,4-triil.

[00136] Em qualquer uma das várias modalidades, o oxigênio do anel endocílico do análogo da fucose das fórmulas **(I)** e **(II)** pode ser substituído por enxofre.

[00137] Os métodos aqui fornecidos podem conter uma etapa de fornecer um análogo de fucose a um animal. O fornecimento de um análogo de fucose para um animal pode ser feito através de várias formas de administração. O análogo da fucose em algumas modalidades pode ser administrado a um animal usando técnicas de administração padrão, incluindo administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual ou supositório. Em algumas modalidades, as populações celulares são administradas parentericamente. O termo "parenteral", como aqui utilizado, inclui administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, retal, vaginal e intraperitoneal. Em algumas modalidades, as populações de células são administradas a um indivíduo usando administração sistêmica periférica por injeção intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. Em algumas modalidades, o

análogo da fucose pode ser administrado por via oral a um animal.

[00138] Em algumas modalidades, os métodos aqui divulgados produzem células T que possuem fucosilação de superfície reduzida que podem ser usadas em uma terapia celular adotiva ou em um tratamento de câncer para um indivíduo necessitado dessa terapia ou tratamento.

[00139] Em algumas modalidades, a terapia celular, por exemplo, terapia celular adotiva ou tratamento de câncer usando células T, pode ser realizada por transferência autóloga, na qual as células são isoladas e/ou preparadas de outro modo a partir de um indivíduo que deve receber a terapia celular ou tratamento, ou de uma amostra derivada de tal indivíduo. Assim, em alguns aspectos, um análogo de fucose pode ser fornecido ou administrado a um indivíduo, por exemplo, paciente, necessitando de um tratamento e as células T resultantes com fucosilação de superfície reduzida, após isolamento e processamento, são administradas ao mesmo indivíduo.

[00140] Em algumas modalidades, a terapia celular, por exemplo, terapia celular adotiva ou tratamento de câncer usando células T, pode ser realizada por transferência alogênica, na qual as células são isoladas e/ou preparadas de outro indivíduo que não seja o indivíduo a receber ou quem finalmente recebe terapia ou tratamento celular, por

exemplo, um primeiro indivíduo. Em tais modalidades, as células são então administradas a um indivíduo diferente, por exemplo, um segundo indivíduo, da mesma espécie. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo indivíduos são geneticamente idênticos. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo indivíduos são geneticamente semelhantes. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo indivíduos são geneticamente diferentes. Em alguma modalidade, o primeiro e o segundo indivíduos não pertencem a uma mesma espécie, por exemplo, o primeiro indivíduo é um humano e o segundo indivíduo é um animal não humano. As células T obtidas a partir do segundo indivíduo podem ser isoladas e processadas para a terapia ou tratamento do primeiro indivíduo.

[00141] Uma quantidade eficaz de um análogo de fucose pode ser fornecida a um animal. A quantidade eficaz pode se referir a uma quantidade do análogo de fucose que é suficiente para fornecer um resultado desejado, isto é, produção de células T com fucosilação de superfície reduzida. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de análogo de fucose pode estar na faixa de cerca de 1 a cerca de 500mg/kg de peso corporal do análogo de fucose. Em algumas modalidades em que um análogo de fucose é fornecido ou administrado por via oral, por exemplo, via alimentação com água ou alimento, a dosagem oral de análogo de fucose administrada a um animal pode ser de cerca de 1mg/kg a cerca de 1 g/kg do peso corporal

do animal, mais tipicamente cerca de 5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg, 30mg/kg, 40mg/kg ou de 50mg/kg a cerca de 1 g/kg do peso corporal do animal. Em alguns aspectos, a dosagem administrada a um animal é de cerca de 1g, cerca de 5g, ou de cerca de 10g a cerca de 150g por dia, ou de cerca de 1g, cerca de 5g, cerca de 10g, cerca de 15g ou de cerca de 20g a cerca de 60g por dia. Em algumas modalidades, um análogo de fucose pode ser fornecido com comida ou água em qualquer quantidade desejada que seja adequada para induzir a redução da fucosilação da superfície no animal alimentado com o análogo de fucose.

[00142] Um análogo de fucose usado nos métodos aqui descritos em algumas modalidades pode ser coadministrado a um animal com um ou mais excipientes ou carreadores farmaceuticamente aceitáveis adicionais, simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem.

[00143] Em algumas modalidades, um análogo de fucose ou uma composição do mesmo pode ser administrado por um certo período, por exemplo, um a vários dias, uma a várias semanas, um a vários meses ou mais, com ou sem interrupção. Em algumas modalidades, um análogo de fucose ou uma composição do mesmo pode ser administrado uma programação diária, semanal, quinzenal ou mensal.

[00144] Em algumas modalidades, a provisão ou administração de um análogo de fucose para um animal pode

ser concluída quando um resultado desejado é alcançado, por exemplo, a fucosilação de superfície média das células T obtidas do animal é reduzida por qualquer número de porcentagem, por exemplo entre cerca de 5% e cerca de 95% em relação às células T de controle.

[00145] Os métodos aqui fornecidos podem incluir uma etapa de obtenção de uma mistura de células, por exemplo, células T do animal fornecidas com um análogo de fucose. As células obtidas podem incluir células T com fucosilação de superfície reduzida.

[00146] As células T cultivadas pelos métodos descritos acima podem ter fucosilação de superfície reduzida. Em alguns aspectos, a fucosilação de superfície reduzida pode se referir à redução ou inibição do nível de fucosilação que está naturalmente presente na superfície das células T normais. Em algumas modalidades, a redução da fucosilação da superfície nas células T não inclui a substituição da fucose naturalmente presente na superfície da célula T pelo análogo da fucose que é fornecido artificialmente às células T.

[00147] As células T produzidas pelos métodos descritos acima podem ter fucosilação de superfície reduzida. Em algumas modalidades, a fucosilação de superfície média nas células T obtida de um animal que foi fornecido com um análogo de fucose pode ter pelo menos cerca

de 5% de redução em comparação com a fucosilação de superfície média das células T presentes ou obtidas de um animal que não foi fornecido com um análogo de fucose, isto é, células T de controle. Em algumas outras modalidades, a fucosilação média da superfície nas células T obtida de um animal que foi fornecido com um análogo da fucose pode ter pelo menos cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35 %, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 85%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 99%, cerca de 100% de redução em relação à média da fucosilação de superfície das células T de controle presentes ou obtidas a partir de um animal que não recebeu um análogo da fucose por pelo menos várias horas, vários dias, várias semanas, vários meses ou mais antes das células T de controle serem testadas ou obtidas. O nível de fucosilação da superfície nas células T pode ser determinado por técnicas disponíveis na técnica, por exemplo, por citometria de fluxo.

[00148] Em algumas modalidades, as células T e as populações de células podem ser isoladas a partir de uma amostra, tal como uma amostra biológica de ou derivada de um animal fornecido com um análogo de fucose. As amostras podem incluir tecido, fluido e outras amostras colhidas diretamente do animal. A amostra biológica pode ser uma

amostra obtida diretamente de uma fonte biológica ou de uma amostra que é processada. As amostras biológicas incluem, mas não estão limitadas a fluidos corporais, tais como sangue, plasma, soro, tecidos e amostras de órgãos, tal como baço, incluindo amostras processadas delas derivadas. Exemplos de amostras incluem sangue total, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), leucócitos, medula óssea, timo, biópsia de tecido, tumor, leucemia, linfoma, linfonodo, tecido linfoide associado ao intestino, tecido linfoide associado à mucosa, baço, outros tecidos linfoideos, fígado, pulmão, estômago, intestino, cólon, rim, pâncreas, mama, osso, próstata, colo do útero, testículos, ovários, amígdalas ou outro órgão e/ou células derivadas dos mesmos.

[00149] Em algumas modalidades, depois que as células T e as populações de células são obtidas de um animal, pode haver uma ou mais etapas de processamento, tais como separação, centrifugação, lavagem, incubação e/ou cultura das células obtidas. Em algumas modalidades, a população de células obtida contendo células T pode ser processada para isolar ou enriquecer células T e remover (ou reduzir) vários outros tipos de células (por exemplo, glóbulos vermelhos) e/ou componentes (por exemplo, plaquetas). Em algumas modalidades, a população celular obtida ou as células T enriquecidas adicionais podem ser cultivadas em um meio de

cultura de células usando técnicas disponíveis na técnica, de modo a manter as células e/ou aumentar o número de células suficiente para uma utilização posterior, por exemplo, terapia celular adotiva ou tratamento do câncer, ou formulação de composições farmacêuticas. Em algumas modalidades, as células T com fucosilação de superfície reduzida como obtida a partir do animal ou cultivadas após o isolamento do animal podem ser armazenadas para uso posterior, por exemplo pelas técnicas de criopreservação disponíveis na técnica ou conforme descrito em outras partes deste artigo,

[00150] Em algumas modalidades, as células T com redução da fucosilação da superfície que são produzidas pelos métodos de produção *in vivo* aqui descritos podem ser usadas em uma terapia celular adotiva ou no tratamento de câncer. Em algumas modalidades, as células T produzidas como obtidas de um animal ou cultivadas posteriormente após o isolamento do animal podem ser administradas a um indivíduo necessitado de tal terapia ou tratamento. Em algumas modalidades, as células T produzidas como obtidas a partir de um animal ou cultivadas posteriormente após o isolamento do animal podem ser usadas para formular uma composição farmacêutica que pode ser usada em uma terapia celular adotiva ou no tratamento de câncer. Em algumas modalidades, o animal é um humano.

[00151] Os métodos de produção aqui descritos podem ainda compreender uma etapa de modificação de uma população de células T. Por exemplo, a população de células T pode ser transduzidas com um vetor viral compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica o receptor da superfície celular para produzir uma população de células T transduzidas. Vários vírus recombinantes têm sido utilizados como vetores virais para fornecer material genético a uma célula. Os vetores virais que podem ser utilizados de acordo com a etapa de transdução podem ser qualquer vetor viral ecotrópico ou anfotrópico, incluindo, mas não se limitando a, vetores retrovirais recombinantes, vetores lentivirais recombinantes, vetores adenovirais recombinantes e vetores virais adenoassociados recombinantes (AAV). Qualquer meio de crescimento adequado e/ou suplementos para o crescimento de vetores virais podem ser utilizados no inóculo do vetor viral de acordo com os métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, o vetor viral compreende um gene heterólogo que codifica um receptor de superfície celular. Em uma modalidade particular, o receptor da superfície celular é capaz de se ligar a um antígeno na superfície de uma célula alvo, por exemplo, na superfície de uma célula tumoral.

IV. Composições Farmacêuticas para Terapia Celular Adotiva ou Tratamento de Câncer

[00152] Populações celulares ou células T com fucosilação de superfície reduzida que são produzidas pelos métodos de produção descritos acima podem ser formuladas para uso em terapia celular adotiva ou no tratamento de câncer. As células T desejadas (ou células T terapêuticas), ou seja, células T com fucosilação de superfície reduzida ou uma mistura de células com essas células T podem ser formuladas como composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz das células T desejadas e um ou mais ingredientes farmaceuticamente compatíveis (aceitáveis). Em alguns aspectos, composições farmacêuticas das células T terapêuticas e excipientes farmacêuticos podem ser fornecidas nas quais uma quantidade eficaz das células T está em mistura com os excipientes, adequados para administração a um indivíduo. Em aspectos preferidos, as células terapêuticas T e a sua composição farmacêutica são formuladas para administração a um humano. Por conseguinte, as presentes divulgações fornecem uma composição farmacêutica compreendendo células T com fucosilação de superfície reduzida formulada para administração a um humano. A composição formulada pode geralmente compreender um ou mais excipientes ou carreadores farmaceuticamente compatíveis (aceitáveis).

[00153] Os materiais utilizados na preparação das composições farmacêuticas podem ser não tóxicos nas quantidades utilizadas. Será evidente para os versados na técnica que a dosagem ideal do (s) ingrediente (s) ativo (s) na composição farmacêutica dependerá de uma variedade de fatores. Os fatores relevantes incluem, sem limitação, o tipo de animal (por exemplo, humano), o modo de administração, a composição empregada e a gravidade da doença ou condição a ser tratada.

[00154] As composições farmacêuticas de acordo com as divulgações deste documento podem estar na forma de um líquido, por exemplo, um elixir, xarope, solução, emulsão ou suspensão. Em algumas modalidades, o líquido pode ser útil para entrega por injeção. Em uma composição para administração por injeção (como descrito acima), um ou mais dentre um surfactante, conservante, agente umectante, agente dispersante, agente de suspensão, tampão, estabilizador e agente isotônico também podem ser incluídos.

[00155] As composições farmacêuticas aqui descritas podem estar em qualquer forma que permita que a composição seja administrada a um animal (por exemplo, um humano). As vias de administração típicas incluem, sem limitação, oral, parenteral e sublingual. A administração parenteral inclui injeções subcutâneas, injeções intraperitoneais, injeção intravenosa, intramuscular, intraesternal ou técnicas de

infusão. Estas composições farmacêuticas podem ser formuladas de modo a permitir que as células T com fucosilação de superfície reduzida sejam eficazes após a administração da composição a um indivíduo necessitado da terapia ou tratamento.

V. Métodos Terapêuticos

[00156] Em alguns aspectos, métodos para fornecer uma terapia celular adotiva a um indivíduo são aqui fornecidos. Os métodos podem incluir a administração de células T com fucosilação de superfície reduzida ao indivíduo necessitado da terapia celular.

[00157] Em algumas modalidades, os métodos divulgados neste documento fornecem uma terapia celular adotiva para um indivíduo. A provisão de uma terapia celular adotiva para um indivíduo pode incluir uma etapa de administração de uma mistura de células, que inclui células T com fucosilação de superfície reduzida (isto é, células T terapêuticas) a um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo pode estar em necessidade de tal terapia. Em algumas modalidades, a provisão de uma terapia celular adotiva para um indivíduo também pode incluir uma etapa de produção das células T terapêuticas para a terapia de acordo com qualquer um dos métodos *in vitro* e *in vivo* descritos em outras partes deste artigo.

[00158] Em algumas modalidades, uma terapia celular adotiva pode ser selecionada do grupo que consiste em imunoterapia com linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), terapia celular autóloga, terapia celular autóloga projetada (eACTTM), transplante de células T alogênico, transplante de células não T e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a terapia celular adotiva pode incluir amplamente qualquer método de seleção, enriquecimento *in vitro* e administração a um paciente de células T autólogas ou halogênicas que reconhecem e são capazes de se ligar a células tumorais. A imunoterapia com TIL é um tipo de terapia de células T adotiva, em que os linfócitos capazes de se infiltrar no tecido tumoral são isolados, enriquecidos *in vitro* e administrados a um paciente. As células TIL podem ser autólogas ou alogênicas. A terapia celular autóloga é uma terapia adotiva de células T que envolve o isolamento de células T capazes de atingir células tumorais de um paciente, enriquecendo as células T *in vitro* e administrando as células T de volta ao mesmo paciente. O transplante alogênico de células T pode incluir o transplante de células T de ocorrência natural expandidas *ex vivo* ou células T geneticamente modificadas. A terapia de células autólogas projetadas é uma terapia de células T adotiva em que os linfócitos de um paciente são isolados, geneticamente modificados para expressar uma molécula de direcionamento de

tumor, expandidos *in vitro* e administrados de volta ao paciente. O transplante de células não T pode incluir terapias autólogas ou alogênicas com células não T, tais como, mas não limitadas a células assassinas naturais (NK).

[00159] Em alguns aspectos, métodos de tratamento de um câncer são fornecidos neste documento. Os métodos podem incluir a administração de células T com fucosilação de superfície reduzida a um indivíduo necessitado de tal tratamento. Em algumas modalidades, os métodos também podem incluir uma etapa de produção das células T terapêuticas para o tratamento de acordo com qualquer um dos métodos *in vitro* e *in vivo* descritos em outras partes deste artigo.

[00160] Em alguns aspectos, as células T usadas na terapia celular adotiva ou no tratamento do câncer de acordo com os métodos divulgados neste documento são células T terapêuticas que possuem fucosilação de superfície reduzida em relação às células T de controle. Em alguns aspectos, a fucosilação de superfície reduzida pode se referir à redução ou inibição do nível de fucosilação que está naturalmente presente na superfície das células T normais. Em algumas modalidades, a redução da fucosilação da superfície nas células T não inclui a substituição da fucose naturalmente presente na superfície da célula T pelo análogo da fucose que é fornecido artificialmente às células T.

[00161] Como descrito anteriormente, em algumas modalidades, as células T com fucosilação de superfície reduzida usada na terapia celular adotiva ou no tratamento do câncer podem se originar do mesmo indivíduo que receberá a terapia ou tratamento, ou seja, terapia ou tratamento autólogo, ou de um indivíduo diferente do indivíduo que receberá a terapia ou tratamento, ou seja, terapia ou tratamento alogênico.

[00162] Em alguns aspectos, as células T usadas na terapia celular adotiva ou no tratamento do câncer de acordo com os métodos divulgados neste documento são células T terapêuticas que possuem fucosilação de superfície reduzida em relação às células T de controle. Em algumas modalidades, em particular onde uma terapia ou tratamento autólogo é administrado a um paciente humano, as células T derivadas do mesmo paciente podem ser processadas de acordo com os métodos *in vitro* ou *in vivo* aqui divulgados para produzir as células T terapêuticas. Em tais modalidades, as células T de controle podem se referir a (1) uma população de células T presentes ou obtidas de um humano normal e saudável ou (2) uma população de células T que estavam presentes ou obtidas do mesmo paciente antes da produção de células T terapêuticas. Em algumas outras modalidades, em particular quando uma terapia ou tratamento alogênico é administrado a um paciente humano, as células T derivadas de um doador que não é o

paciente podem ser processadas de acordo com os métodos *in vitro* ou *in vivo* aqui divulgados para produzir o T terapêutico células. Em tais modalidades, as células T de controle podem se referir a uma população de células T que estavam presentes ou obtidas do doador antes da produção de células T terapêuticas. Em algumas outras modalidades, onde uma terapia ou tratamento alogênico é administrado a um paciente humano e as células T terapêuticas usadas na terapia ou tratamento se originam de um animal não humano (ou seja, um animal doador), as células T de controle podem se referir a (1) uma população de células T presentes ou obtidas de um animal não humano normal e saudável ou (2) uma população de células T que estavam presentes ou obtidas do animal doador antes da produção de células T terapêuticas.

[00163] Em algumas modalidades, a fucosilação de superfície média nas células terapêuticas T usadas na terapia celular adotiva ou no tratamento de câncer de acordo com os métodos divulgados neste documento pode ter pelo menos cerca de 5% de redução em comparação com a fucosilação de superfície média das células T de controle. Em algumas outras modalidades, a fucosilação média da superfície nas células T obtida de um animal que foi fornecido com um análogo da fucose pode ter pelo menos cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35 %, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%,

cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 85%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 99%, cerca de 100% de redução em relação à fucosilação de superfície média das células T de controle. O nível de fucosilação da superfície nas células T pode ser determinado por técnicas disponíveis na técnica, por exemplo, citometria de fluxo.

[00164] Em alguns aspectos, os métodos aqui divulgados para fornecer uma terapia celular adotiva ou tratar um câncer pretendem tratar quaisquer doenças, condições e distúrbios, incluindo, mas não limitados a carcinoma da mama, câncer de esôfago, colorretal, pâncreas, estômago, GIST hepatocelular, fígado, pulmão, pulmão de células pequenas, ovário, uterino, colo do útero, bexiga, rim, cólon, intestino delgado, intestino grosso, câncer gástrico, linfoma, próstata, testículo, carcinoma da tireoide, melanoma maligno, melanoma uveal, mieloma múltiplo, mesotelioma, osteossarcoma, condrossarcoma, miosarcoma, glioblastoma, sarcoma, glioma ou outros tumores cerebrais, cabeça/pescoço outros tumores gastrointestinais e de células germinativas, neoplasias hematológicas, leucemia, linfoma, por exemplo, leucemia linfocítica crônica (LLC), LLA, linfoma de não-Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiplo, linfoma folicular refratário, linfoma de células do manto, linfoma indolente de células B,

malignidades de células B, cânceres de pele (incluindo melanoma), câncer ósseo, cânceres epiteliais, carcinoma de células renais, adenocarcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, sarcoma sinovial e/ou mesotelioma.

[00165] Em alguns aspectos, os métodos aqui divulgados para fornecer uma terapia celular adotiva ou tratar um câncer têm uma etapa de administração de células T com fucosilação de superfície reduzida, isto é, células T terapêuticas para um indivíduo. Em algumas modalidades, as células T terapêuticas podem ser formuladas, opcionalmente com um ou mais ingredientes farmaceuticamente aceitáveis, na forma de composições farmacêuticas como aqui descritas para serem administradas a um animal (por exemplo, um humano). Em alguns aspectos, as células T terapêuticas ou suas composições farmacêuticas podem ser administradas, sem limitação, oral, parentérica e sublingual. A administração parenteral inclui injeções subcutâneas, injeções intraperitoneais, injeção intravenosa, intramuscular, intraesternal ou técnicas de infusão. Estas composições farmacêuticas podem ser formuladas de modo a permitir que as células T com fucosilação de superfície reduzida sejam eficazes após a administração da composição a um animal.

[00166] Em algumas modalidades, as células T terapêuticas ou composições farmacêuticas contendo as

células T terapêuticas podem ser administradas (por exemplo, injetadas) em um local ou nas proximidades de células cancerígenas, isto é, administração local. Por exemplo, se um câncer é encontrado em um órgão (por exemplo, um fígado), as composições farmacêuticas podem ser injetadas nas quais as células cancerígenas são encontradas no fígado ou nas proximidades das células cancerígenas (por exemplo, entre vários milímetros a vários centímetros de um limite das células cancerígenas). Em modalidades alternativas, as células T terapêuticas ou composições farmacêuticas podem ser administradas (por exemplo, injetadas) ao sistema circulante de um paciente (por exemplo, vasos sanguíneos), ou seja, uma administração sistemática, de modo que as células T terapêuticas possam atingir um local alvo onde células patológicas estão presentes através do sistema circulatório do paciente. Em algumas modalidades, as células T terapêuticas podem ainda ter um componente que se liga especificamente a um antígeno da superfície celular de uma célula ou doença a ser direcionada, tal como uma célula tumoral ou uma célula cancerígena. Portanto, as células T terapêuticas podem atingir e exibir efeito terapêutico para atingir células com especificidade após serem entregues através do sistema circulatório.

[00167] Em algumas modalidades, células T com fucosilação de superfície reduzida, isto é, células T

terapêuticas ou composições farmacêuticas das mesmas, podem ser administradas em uma quantidade que é eficaz para obter um resultado ou efeito desejado, por exemplo tratar a doença ou condição, tal como uma quantidade farmaceuticamente eficaz. Assim, em algumas modalidades, os métodos de administração incluem a administração das células T terapêuticas ou composições farmacêuticas das mesmas em quantidades efetivas a um indivíduo necessitado de terapia celular adotiva ou tratamento de câncer. A eficácia terapêutica em algumas modalidades pode ser monitorada por avaliação periódica dos indivíduos tratados. Para administrações repetidas por vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas da doença. Em algumas modalidades, outros regimes de dosagem podem ser úteis e podem ser determinados. A dosagem desejada pode ser administrada por uma única administração das células T terapêuticas ou composições farmacêuticas das mesmas, por múltiplas administrações ou por administração contínua.

[00168] Em algumas modalidades, células T com fucosilação de superfície reduzida, isto é, células T terapêuticas ou composições farmacêuticas das mesmas, podem ser administradas em uma quantidade que é eficaz para obter um resultado ou efeito desejado, por exemplo tratamento da doença ou condição a um indivíduo necessitado de tal terapia

ou tratamento. O resultado ou efeito desejado destinado a alcançar pela administração das células T terapêuticas ou composições farmacêuticas das mesmas, de acordo com os métodos aqui descritos, pode incluir um ou mais dos seguintes resultados em comparação com antes da administração:

(i) uma redução nas lesões (lesões alvo e/ou não alvo, medidas por tomografia computadorizada ou exame físico para lesões aparentes), de pelo menos cerca de 99%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 25 %, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 10% ou pelo menos cerca de 5%, por exemplo, de cerca de 30% a cerca de 99%, de cerca de 80% a cerca de 90%, de cerca de 70% a cerca de 90%, de cerca de 60% a cerca de 90%, de cerca de 50% a cerca de 90%, de cerca de 40% a cerca de 90%, de cerca de 35% a cerca de 90%, de cerca de 30% a cerca de 90%, de cerca de 25% a cerca de 90%, de cerca de 5% a cerca de 85% ou de cerca de 10% a cerca de 80% (mudança % real ou mudança % mediana em comparação com antes da administração da célula T terapêutica ou composições farmacêuticas da mesma);

(ii) uma dissipação (isto é, redução) de metástases de câncer, medida por biópsia, ressonância magnética ou outros

métodos adequados, de pelo menos cerca de 99%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 10% ou pelo menos cerca de 5%, por exemplo, de cerca de 30% a cerca de 99%, de cerca de 80% a cerca de 90%, de cerca de 70% a cerca de 90%, de cerca de 60% a cerca de 90%, de cerca de 50% a cerca de 90%, de cerca de 40% a cerca de 90%, de cerca de 35% a cerca de 90%, de cerca de 30% a cerca de 90%, de cerca de 25% a cerca de 90%, de cerca de 5% a cerca de 85%, ou de cerca de 10% a cerca de 80% (mudança % real ou mudança % mediana em comparação com antes da administração da célula T terapêutica ou composições farmacêuticas da mesma);

(iii) uma redução na carga do tumor (por exemplo, número de células cancerígenas, tamanho de um tumor ou quantidade de câncer no corpo) de pelo menos cerca de 99%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 10% ou pelo menos cerca de

5%, por exemplo, de cerca de 30% a cerca de 99%, de cerca de 80% a cerca de 90%, de cerca de 70% a cerca de 90%, de cerca de 60% a cerca de 90%, de cerca de 50% a cerca de 90%, de cerca de 40% a cerca de 90%, de cerca de 35% a cerca de 90%, de cerca de 30% a cerca de 90%, de cerca de 25% a cerca de 90%, de cerca de 5% a cerca de 85%, ou de cerca de 10% a cerca de 80% (mudança % real ou mudança % mediana em comparação com antes da administração da célula T terapêutica ou composições farmacêuticas da mesma);

(iv) um aumento na sobrevida livre de progressão (PFS), de pelo menos cerca de 99%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 15%, em pelo menos cerca de 10% ou pelo menos cerca de 5%, por exemplo, de cerca de 30% a cerca de 99%, de cerca de 80% a cerca de 90%, de cerca de 70% a cerca de 90%, de cerca de 60% a cerca de 90%, de cerca de 50% a cerca de 90%, de cerca de 40% a cerca de 90%, de cerca de 35% a cerca de 90%, de cerca de 30% a cerca de 90%, de cerca de 25% a cerca de 90%, de cerca de 5% a cerca de 85% ou de cerca de 10% a cerca de 80% (mudança % real ou mudança % mediana em comparação com

antes da administração da célula T terapêutica ou composições farmacêuticas da mesma); e/ou

(v) um aumento na sobrevida global (OS) de pelo menos cerca de 99%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 10%, ou pelo menos cerca de 5%, por exemplo, de cerca de 30% a cerca de 99%, de cerca de 80% a cerca de 90%, de cerca de 70% a cerca de 90%, de cerca de 60% a cerca de 90%, de cerca de 50% a cerca de 90%, de cerca de 40% a cerca de 90%, de cerca de 35% a cerca de 90%, de cerca de 30% a cerca de 90%, de cerca de 25% a cerca de 90%, de cerca de 5% a cerca de 85% ou de cerca de 10% a cerca de 80% (mudança % real ou mudança % mediana comparada à sobrevida global esperada).

[00169] Em algumas modalidades, as células T com fucosilação de superfície reduzida (isto é, células T terapêuticas) ou composições farmacêuticas podem ser administradas em uma quantidade farmaceuticamente eficaz, isto é, uma quantidade que é eficaz para obter um resultado ou efeito desejado, por exemplo tratar a doença ou condição. Em alguns aspectos, a quantidade farmaceuticamente eficaz pode incluir uma dose ou um número desejado de células T

terapêuticas e/ou uma proporção desejada dessas células T com outros tipos de células. Assim, a dosagem de células em algumas modalidades é baseada em um número total de células (ou número por kg de peso corporal) e uma proporção desejada das populações ou subtipos individuais, tal como a proporção de CD3⁺ para não CD3⁺. Em algumas modalidades, a dosagem de células é baseada em um número total desejado (ou número por kg de peso corporal) de células nas populações individuais ou nos tipos de células individuais contidos nas composições farmacêuticas. Em algumas modalidades, a dosagem é baseada em uma combinação de tais características, tal como um número desejado de células totais, proporção desejada e número total desejado de células T terapêuticas nas populações individuais.

[00170] Em algumas modalidades, a dose ou quantidade desejada é um número desejado de células T terapêuticas ou um número desejado de células T terapêuticas por unidade de peso corporal do indivíduo ao qual as células são administradas, por exemplo, células/kg. Em alguns aspectos, a dose ou quantidade desejada é igual ou superior a um número mínimo de células T terapêuticas ou número mínimo de células T terapêuticas por unidade de peso corporal.

[00171] Em certas modalidades, as células T terapêuticas podem ser administradas a um indivíduo em um intervalo de cerca de cem a cerca de 100 bilhões de células,

tal como, por exemplo, de cerca de várias centenas a cerca de milhares de células, de cerca de milhares a cerca de 1 milhão de células, de cerca de 1 milhão a cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, cerca de cem células, cerca de 500 células, cerca de 1 mil células, cerca de 5 mil células, cerca de 1 milhão de células, cerca de 5 milhões de células, cerca de 25 milhões de células, cerca de 500 milhões de células, cerca de 1 bilhão de células, cerca de 5 bilhões de células, cerca de 20 bilhões de células, cerca de 30 bilhões de células, cerca de 40 bilhões de células, ou um intervalo definido por dois dos valores anteriores), tal como de cerca de 10 a 100 bilhões de células (por exemplo, cerca de 20 milhões de células, cerca de 30 milhões de células, cerca de 40 milhões de células, cerca de 60 milhões de células, cerca de 70 milhões de células, cerca de 80 milhões de células, cerca de 90 milhões de células, cerca de 10 bilhões de células, cerca de 25 bilhões de células, cerca de 50 bilhões de células, cerca de 75 bilhões de células, cerca de 90 bilhões de células, ou um intervalo definido por dois dos valores anteriores) e, em alguns casos, de cerca de 100 milhões de células a cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, cerca de 120 milhões de células, cerca de 250 milhões de células, cerca de 350 milhões de células, cerca de 450 milhões células, cerca de 650 milhões de células, cerca de 800 milhões de células, cerca de 900 milhões de

células, cerca de 3 bilhões de células, cerca de 30 bilhões de células, cerca de 45 bilhões de células) ou qualquer valor entre esses intervalos. As doses ou quantidades eficazes anteriores de células T terapêuticas podem ser por administração individual ou por toda a duração da terapia ou tratamento.

[00172] Em algumas modalidades, a dose ou quantidade de células T terapêuticas pode estar dentro de um intervalo de ou entre cerca de 10^4 e cerca de 10^9 células/quilogramas (kg) de peso corporal, tal como entre 10^5 e 10^6 células/kg de peso corporal, por exemplo, cerca de 1×10^5 células/kg, $1,5 \times 10^5$ células/kg, 2×10^5 células/kg ou 1×10^6 células/kg de peso corporal. Por exemplo, em algumas modalidades, as células T terapêuticas são administradas em, ou dentro de um certo intervalo de erro de, entre cerca de 10^4 e cerca de 10^9 células T/quilograma (kg) de peso corporal, tal como entre 10^5 e 10^6 Células T/kg de peso corporal, por exemplo, a ou cerca de 1×10^5 células T/kg, $1,5 \times 10^5$ células T/kg, 2×10^5 células T/kg ou 1×10^6 células T/kg de peso corporal. As doses ou quantidades eficazes anteriores de células T terapêuticas podem ser por administração individual ou por toda a duração da terapia ou tratamento.

[00173] Em algumas modalidades, células T com fucosilação de superfície reduzida, isto é, células T terapêuticas ou uma composição farmacêutica das mesmas,

podem ser administradas diariamente, semanalmente, quinzenalmente ou mensalmente, de acordo com o efeito desejado. Em alguns aspectos, as células T terapêuticas ou suas composições farmacêuticas podem ser administradas de cerca de 1 a 5, de cerca de 1 a cerca de 10, de cerca de 1 a cerca de 15 ou mais ciclos, em que cada ciclo tem duração de um mês. As doses em cada ciclo podem ser administradas diariamente (incluindo uma vez ao dia, duas vezes ao dia ou mais de duas vezes ao dia), a cada dois dias, duas vezes por semana, semanalmente, a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou mensalmente. Um ciclo pode opcionalmente incluir um período de descanso. Alternativamente, um período de descanso pode ser incluído entre os ciclos. Em alguns aspectos, a administração será para a duração da doença.

[00174] Em alguns aspectos, os métodos aqui divulgados podem ainda compreender a administração de células T com fucosilação da superfície, isto é, células T terapêuticas ou composições farmacêuticas das mesmas e um agente terapêutico adicional ou sais ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis das mesmas. As células T terapêuticas ou suas composições farmacêuticas e o agente terapêutico podem atuar de forma aditiva ou, mais preferencialmente, sinérgica. Em uma modalidade preferida, as células T terapêuticas ou suas composições farmacêuticas podem ser administradas simultaneamente com a administração

de um ou mais agentes terapêuticos, que podem fazer parte da mesma composição ou em uma composição diferente daquela que compreende as células T terapêuticas. Em outra modalidade, as células T terapêuticas ou suas composições farmacêuticas podem ser administradas antes ou após a administração do (s) agente (s) terapêutico (s).

[00175] Em alguns aspectos, a quantidade de células T com fucosilação de superfície reduzida, isto é, células T terapêuticas ou composições farmacêuticas que sejam eficazes nos métodos aqui descritos, dependerá da natureza do distúrbio ou condição e pode ser determinada por técnicas clínicas padrão. Além disso, os ensaios *in vitro* ou *in vivo* podem opcionalmente ser empregados para ajudar a identificar faixas de dosagem ideais. A dose precisa a ser empregada nas composições também dependerá da via de administração e da gravidade da doença ou distúrbio, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico e as circunstâncias de cada paciente.

VI. Kits para Uso Terapêutico

[00176] Em alguns aspectos, são fornecidos kits para uso em terapia celular adotiva ou tratamento de câncer. Tais kits podem incluir uma composição farmacêutica que compreende células T com fucosilação de superfície reduzida, isto é, células T terapêuticas e um carreador farmaceuticamente aceitável.

[00177] Em algumas modalidades, o kit pode incluir instruções para uso em qualquer um dos métodos terapêuticos aqui descritos. As instruções incluídas podem fornecer uma descrição da administração das composições farmacêuticas a um indivíduo para atingir a atividade pretendida, por exemplo, tratamento de uma doença ou condição, tal como câncer, em um indivíduo. Em algumas modalidades, as instruções relacionadas ao uso das composições farmacêuticas descritas aqui podem incluir informações sobre dosagem, esquema de dosagem e via de administração para o tratamento pretendido. Os recipientes podem ser doses unitárias, embalagens a granel (por exemplo, embalagens com várias doses) ou doses de subunidades. As instruções fornecidas nos kits da divulgação são geralmente instruções escritas em um rótulo ou bula. O rótulo ou bula indica que as composições farmacêuticas são usadas para tratar, retardar o início e/ou aliviar uma doença ou distúrbio em um indivíduo.

[00178] Em algumas modalidades, os kits aqui fornecidos estão em embalagens adequadas. A embalagem adequada inclui, mas não está limitada a frascos, garrafas, jarros, embalagens flexíveis e similares. Também são contempladas embalagens para uso em combinação com um dispositivo específico, tal como um inalador, um dispositivo de administração nasal ou um dispositivo de infusão. Em algumas modalidades, um kit pode ter uma porta de acesso

estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica).

VII. Exemplos

[00179] Os exemplos a seguir ilustram certas modalidades específicas da invenção e não pretendem limitar o escopo da invenção.

[00180] As modalidades deste documento são ilustradas adicionalmente pelos seguintes exemplos e protocolos detalhados. No entanto, os exemplos destinam-se apenas a ilustrar modalidades e não devem ser interpretados para limitar o escopo daqui. O conteúdo de todas as referências e patentes publicadas e pedidos de patente citados ao longo deste pedido é aqui incorporado por referência.

[00181] Exemplo 1 - Estudo de linfoma de camundongo

A20 com transferência adotiva de esplenócitos

[00182] O imunógeno, KLH-A20 Id Fab, foi gerado como se segue. As regiões variáveis de cadeia pesada e leve de Ig do tumor A20 foram clonadas por amplificação por PCR e ligadas a um vetor de expressão de IgG de camundongo para produção de A20 Id em células HEK293F17. O anticorpo murino A20 Id foi purificado por Proteína A. O anticorpo concentrado (KPO4 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0) foi tratado com quatro volumes de resina de papaina imobilizada (com cisteína 20 mM) a 37 °C durante a noite. A resina foi removida e o

sobrenadante incubado com resina de proteína A durante a noite (4 °C), seguido de filtração para remover o anticorpo Fc ligado à resina. O escoamento contendo Fab foi coletado, dialisado e concentrado em solução de PBS, pH 7,4. A conjugação de Fab foi realizada usando KLH de maricultura (mcKLH) e NHS-PEG12-maleimida. O mcKLH em solução de PBS, pH 8,0 (10mg/mL), foi misturado e incubado com NHS-PEG12-maleimida (125 mM final, 37 °C, 20 min). O produto mcKLHPEG12-maleimida foi trocado por tampão em uma coluna PD10 (solução de PBS, pH 7,4) e concentrado a 5mg/mL. O Fab A20 Id (4mg/mL) foi reduzido com (tris (2-carboxietil) fosfina (5 mM) em tampão contendo EDTA 2 mM (30 min, 37 °C). O agente redutor foi removido através da coluna PD10 (PBS solução, pH 7,4, EDTA 5 mM) e o Fab reduzido foi concentrado para 5mg/mL, misturado com KLH-PEG12-maleimida (razão molar 3:1, Fab:KLH) e incubados à temperatura ambiente (1 h) O agente de reticulação em excesso de maleimida foi extinto com N-acetilcisteína e removido por coluna PD10 (solução de PBS, pH 7,4).

[00183] Camundongos doadores para uma transferência adotiva de esplenócitos foram produzidos como descrito abaixo. As células A20 (ATCC) foram cultivadas em RPMI 1640 com 10% de FBS, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 50µM de 2-mercaptoetanol e penicilina (100U/ml) / estreptomicina (100µg/ml) (PS). Os camundongos (BALB/c,

Harlan) foram injetados por via subcutânea com o conjugado KLH-A20 Id Fab (50 μ g) com adjuvante TiterMax (1:1) no dia -21 com um reforço no dia -7. O grupo de tratamento 2FF recebeu água potável contendo 20 mM 2FF a partir do dia -14, enquanto o grupo não tratado recebeu água pura. Uma semana após a segunda vacinação (dia 0), todos os camundongos receberam células tumorais A20 irradiadas (nível 4 do irradiador RS2000, 17 min, $2,5 \times 10^6$ células por camundongo i.v.). O tratamento com 2FF continuou até o dia 14. Os esplenócitos colhidos de cada grupo de camundongos doadores (dia 14) foram transferidos adotivamente (uma vez) para camundongos naturais (50×10^6 células/camundongo). Um grupo recebeu células de camundongos doadores que receberam 2FF e um grupo de camundongos recebeu células de camundongos doadores que não foram tratados com 2FF (n = 7/grupo). Ambos foram então desafiados com células A20 vivas no dia após a transferência ($2,5 \times 10^6$ células). Um grupo controle não recebeu tratamento. Os esplenócitos transferidos de camundongos doadores que não receberam 2FF forneceram maior sobrevivência em comparação com animais naturais (aumentaram de 27 dias para 35 dias de sobrevida mediana), enquanto os esplenócitos transferidos de camundongos doadores que receberam 2FF forneceram um aumento adicional na sobrevida mediana para 43 dias. Isto sugere que a transferência adotiva de células de animais tratados com 2FF pode fornecer

atividade antitumoral aprimorada sobre a transferência adotiva de células de animais que não receberam 2FF.

[00184] Exemplo 2 - Estudo de linfoma de camundongo

A20 com transferência adotiva de células T CD3+

[00185] 20 camundongos Balb/c foram implantados com células A20 (0,2 mL de 5×10^6 células s.c./camundongo), um grupo de camundongos constituído por 10 animais recebeu 2FF (20 mM em água potável) desde o dia 0 até o término do estudo. Deixou-se crescer tumores de linfoma A20 e os camundongos foram sacrificados após 20 dias. Como mostrado anteriormente, os camundongos que receberam 20mM de 2FF tiveram um atraso significativo na progressão do tumor em comparação com os animais do grupo controle (Figura 2).

Redução da fucosilação de superfície em células T CD3+ após tratamento com 2FF

[00186] Os camundongos do grupo não tratado e tratado com 2FF foram sacrificados e os baços foram retirados para enriquecimento de células T CD3. Em resumo, os baços foram coletados em RPMI contendo 2% de FBS e as suspensões celulares passadas por um filtro de nylon de 70 μm lavado com 2% de RPMI. As células foram suspensas em 10 ml de tampão de lise ACK e incubadas por 5 min neste tampão para se livrar dos glóbulos vermelhos. As células foram centrifugadas a 300xg por 5 minutos e ressuspensas em PBS contendo 2% de FBS e 1 mM de EDTA. As células T foram isoladas usando o kit de

isolamento de células T de camundongo EasySep, conforme recomendação do fabricante. Resumidamente, as células foram ressuspensas a 10^8 células/mL, às quais foram adicionados 50 μ L/mL de soro de camundongo. As células foram então transferidas para um tubo de poliestireno de 5 mL e 50 μ L de coquetel de isolamento foram adicionados à amostra, seguido de incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. As esferas rápidas foram submetidas a vórtice e foram adicionados 75 μ L/ml, seguidos de incubação em temperatura ambiente por 2,5 minutos. O volume da amostra foi adicionado a 2,5 mL e incubado com o ímã de isolamento celular por 2,5 minutos. O ímã foi invertido e as células T CD3+ foram coletadas e lavadas duas vezes em RPMI e ressuspensas em $21,2 \times 10^6$ células/ml. As células foram verificadas quanto ao seu estado de fucosilação por citometria de fluxo e os isolados de animais tratados com 2FF exibiram uma redução significativa na fucosilação da superfície (Figura 3).

Atividade antitumoral de células T com fucosilação de superfície reduzida

[00187] Para avaliar a atividade antitumoral das células T purificadas, foram implantados 4 grupos de camundongos Balb/c com células A20 (0,2 mL de 5×10^6 células s.c./camundongo). Um grupo não recebeu tratamento, os outros três grupos foram tratados quando as células A20 atingiram 100 mm^3 e foram tratados com 20mM 2FF diários na água potável,

2 x 10⁶ células T isoladas de tumores de controle com camundongos injetados IP, ou 2 x 10⁶ células T isoladas de camundongos portadores de tumor 2FF injetados IP. Os animais foram monitorizados quanto à progressão subsequente do tumor. Os animais que receberam 2FF diariamente em suas águas ou células T CD3+ isoladas de animais tratados com tumor 2FF apresentaram atraso significativo do crescimento do tumor e, em alguns casos, regressão tumoral quando comparados a animais não tratados ou aqueles que receberam células T de camundongos não tratados com tumor.

[00188] Esses dados indicam que a atividade antitumoral 2FF no modelo de linfoma A20 não é mediada apenas pelas respostas das células T, mas as células T de camundongos portadores de tumores tratados com 2FF são surpreendentemente suficientes para gerar uma resposta antitumoral e essa resposta está a par com tratamento 2FF sistêmico. Esses achados abrem a possibilidade de usar 2FF para amplificar a atividade das células T em situações terapêuticas em que as células T autólogas de pacientes com câncer são expandidas *ex vivo* e reinstaladas em pacientes, ou transformadas com TCRs em抗ígenos tumorais específicos ou construtos CAR.

[00189] Exemplo 3 - Expansão *ex vivo* de células T periféricas humanas com 2FF para eficácia antitumoral *in vivo*

[00190] As células T foram isoladas a partir de 10 mL de sangue total, o qual foi centrifugado primeiro a 1200 rpm (300 x g) por 10 min (sem paradas). A camada superior contendo plaquetas foi removida cuidadosamente sem interromper a camada de glóbulos brancos. Em seguida, o Coquetel de Enriquecimento de Células T Humanas RosetteSep™ (células T Pan das tecnologias StemCell) foi adicionado ao sangue restante (500 µL/10 mL de sangue). Este foi incubado por 20 min e, em seguida, 1 mL de FBS foi adicionado juntamente com 10 mL de PBS. Histopaque (20-25 mL) colocado em um Falcon de 50 mL, a solução de sangue/PBS preparada foi revestida muito lentamente. Isto foi centrifugado sem parada (25 °C, 1500 rpm, 25 min). A camada superior foi removida e as células T na camada de revestimento buffy foram então removidas para um novo tubo de 50 mL. As células T foram lavadas com PBS, ressuspensas em 1 mL de tampão de lise AKT e adicionadas a 25 mL, incubadas por 5 min, levadas a 50 mL com PBS e depois sedimentadas. Esta etapa de lise dos glóbulos vermelhos foi repetida uma segunda vez.

[00191] Para a cultura *in vitro* da cultura primária de células T humanas, as células T isoladas foram ressuspensas em meio de célula T (meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal de bezerro (FCS), penicilina a 1% e movido para dois frascos T25, um com e um sem 2-desoxi-2-fluoro-L-fucose 100µM. Contas revestidas com anticorpo CD3/CD28 (20

$\mu\text{L}/\text{frasco}$) foram adicionadas para ativar as células T. Após 24 horas, foi adicionada interleucina 2 (IL2) (100ng/ μL). Cada vez que as células foram passadas, foram adicionados novos IL2 e 2-desoxi-2-fluoro-L-fucose. Após 10 dias de cultura, as células T expandidas cultivadas em 2FF foram avaliadas quanto a alterações na fucosilação da superfície por citometria de fluxo (Figura 4). O tratamento de células T humanas primárias com 2FF resulta em uma redução de cerca de 85% na fucosilação da superfície, conforme monitorado pela coloração da superfície da lente culinaris aglutinina (LCA) e indica que as células estão prontas para transferência *in vivo*.

[00192] Exemplo 4 - Células T autólogas amadurecidas e diferenciadas com 2FF *ex vivo* podem conferir atividade antitumoral

[00193] As células mononucleares do sangue periférico foram isoladas a partir das camadas de sangue venoso de voluntários saudáveis (Astarte Biologics) usando um gradiente de densidade histopaque (Sigma). As células T foram isoladas posteriormente usando o Coquetel de Enriquecimento de células T Humanas EasySep (STEMCELL), seguindo as instruções do fabricante. As esferas revestidas com anticorpo $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ (Miltenyi Biotec), usadas na proporção de 1:8 conta: célula, foram usadas para ativar as células T no dia 0. As células T foram ativadas em RPMI 10% FCS + IL-

2 (100ng/µL, sistemas de P&D) +/- 100µM de 2FF. Cada vez que as células foram passadas novas IL-2 e 2FF foram adicionadas.

[00194] As linhagens celulares linfoblastoides transformadas pelo vírus Epstein Barr (EBV) (LCL) foram implantadas subcutaneamente em camundongos NSG. Quando os volumes tumorais de LCL atingiram 300 mm³, os camundongos receberam 2,0 x 10⁶ células T periféricas autólogas, que foram expandidas e amadureceram na presença ou na ausência de 2FF por injeção de veias da cauda. A atividade antitumoral de células T autólogas na progressão de LCL foi monitorada por medições de paquímetro quinzenais. Os camundongos foram sacrificados quando os tumores diminuíram ou retrocederam completamente por mais de uma semana.

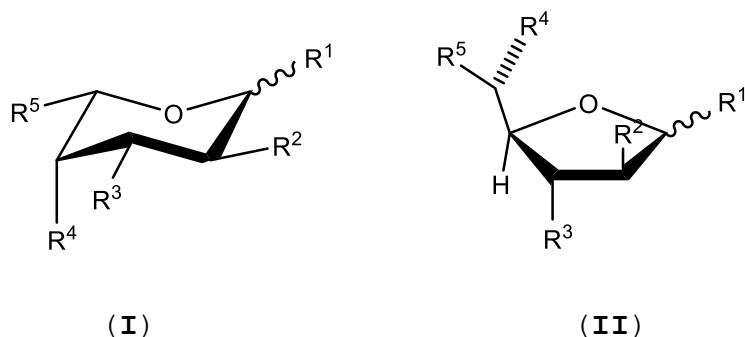
[00195] A transferência de células T autólogas resultou em atividade antitumoral, e essa atividade foi significativamente aumentada (ver Figura 5A), assim como a sobrevivência (ver Figura 5B) quando as células T foram amadurecidas com 2FF antes da transferência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir células T com fucosilação de superfície reduzida, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende:

cultivar células T na presença de um análogo de fucose em um meio de cultura celular; em que

o referido análogo de fucose é selecionado do grupo que consiste nas fórmulas (I) ou (II):



ou um sal ou forma solvatada farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que cada uma das fórmulas (I) ou (II) pode ser o anômero alfa ou beta ou a forma de aldose correspondente;

R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e

R^5 é $-CH_3$, ou

cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$; e

em que as referidas células T com fucosilação de superfície reduzida em relação às células T cultivadas na ausência do referido análogo de fucose.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma etapa de isolamento das células T com fucosilação de superfície reduzida.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que R^2 é $-F$; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-OH$ e $-OC(O)C_{1-10}$ alquil.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-OH$ e $-OC(O)CH_3$.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é

independentemente -OH ou um grupo éster hidrolisável; e R⁵ é -C≡CH.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o análogo da fucose é 2-desoxi-2-fluoro-L-fucose.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o análogo da fucose é peracetato de alquinil fucose.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T com fucosilação de superfície reduzida são células T compreendendo pelo menos 5% de redução da fucosilação de superfície em relação às células T cultivadas na ausência do referido análogo da fucose.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura compreende anticorpos CD3 e CD28.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o meio de cultura compreende ainda interleucina 2 (IL2).

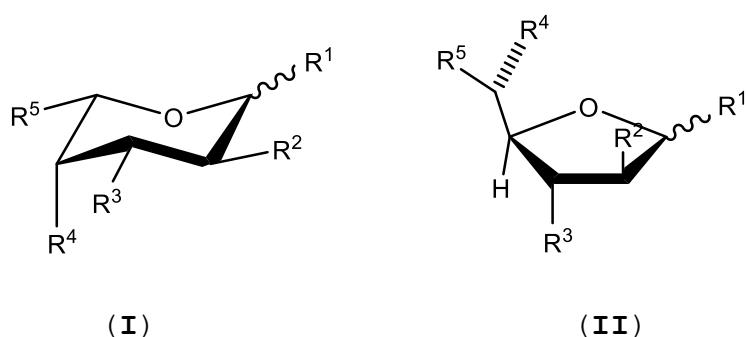
13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T compreendem células T periféricas humanas.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T produzidas com fucosilação de superfície reduzida são configuradas para serem usadas em uma terapia celular adotiva.

15. Método para produzir células T com fucosilação de superfície reduzida, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende:

fornecer um análogo de fucose para um animal; e
obter células T com fucosilação de superfície reduzida
do animal.

o referido análogo de fucose é selecionado do grupo que consiste nas fórmulas (I) ou (II):



ou uma forma de sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que cada uma das fórmulas (I) ou (II) pode ser o anômero alfa ou beta ou a forma de aldose correspondente;

R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente $-OH$ ou um grupo éster hidrolisável; e

R^5 é $-CH_3$, ou

cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é independentemente -OH ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-C\equiv CH$; e em que as referidas células T obtidas do animal têm fucosilação de superfície reduzida em relação às células T presentes em ou obtidas de um animal de controle que não foi fornecido com o referido análogo de fucose.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que R^2 é halogênio; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente -OH ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, **caracterizado** pelo fato de que R^2 é -F; cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente -OH ou um grupo éster hidrolisável; e R^5 é $-CH_3$.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 a 17, **caracterizado** pelo fato de que cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em -OH e $-OC(O)C_1-C_{10}$ alquil.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 a 18, **caracterizado** pelo fato de que cada um de R^1 , R^3 e R^4 é independentemente selecionado do grupo que consiste em -OH e $-OC(O)CH_3$.

20. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que cada um de R^1 , R^2 , R^3 e R^4 é

independentemente -OH ou um grupo éster hidrolisável; e R⁵ é -C≡CH.

21. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o análogo da fucose é 2-desoxi-2-fluoro-L-fucose.

22. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o análogo da fucose é peracetato de alquinil fucose.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 a 22, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T com fucosilação de superfície reduzida são células T compreendendo pelo menos 5% de redução da fucosilação de superfície em relação às células T cultivadas na ausência do referido análogo da fucose.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 a 23, **caracterizado** pelo fato de que as células T são obtidas a partir de um baço do animal.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 a 24, **caracterizado** pelo fato de que o referido análogo de fucose é fornecido ao animal através da alimentação.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 a 25, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda o enriquecimento de células T a partir das células T obtidas do animal.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 a 26, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T produzidas com fucosilação de superfície reduzida são configuradas para serem usadas em uma terapia celular adotiva.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 15 a 27, **caracterizado** pelo fato de que o animal é um humano.

29. Método para fornecer uma terapia celular adotiva a um indivíduo, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende: administrar uma mistura compreendendo células T com fucosilação de superfície reduzida ao indivíduo necessitado da terapia celular.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T com fucosilação de superfície reduzida são produzidas conforme o método definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 28.

31. Método, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T compreendem pelo menos 5% de redução da fucosilação de superfície em relação às células T normais.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 31, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é um humano.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 32, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T compreendem células T periféricas humanas.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 33, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T com fucosilação de superfície reduzida se originaram a partir do referido indivíduo.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 33, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T com fucosilação de superfície reduzida se originaram de um animal diferente do referido indivíduo.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 35, **caracterizado** pelo fato de que a referida mistura está substancialmente livre de glóbulos vermelhos.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 36, **caracterizado** pelo fato de que a terapia celular é configurada para tratar um câncer.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 37, **caracterizado** pelo fato de que a mistura é administrada localmente (na ou nas proximidades de células cancerígenas).

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 38, **caracterizado** pelo fato de que a

mistura é administrada sistematicamente (vias de administração).

40. Método para tratamento de um câncer, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende: administrar uma mistura compreendendo células T com fucosilação de superfície reduzida a um indivíduo necessitado do referido tratamento contra o câncer.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T com fucosilação de superfície reduzida são produzidas conforme o método definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 28.

42. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T compreendem pelo menos 5% de redução da fucosilação da superfície em relação às células T normais.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 40 a 42, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é um humano.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 43, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T compreendem células T periféricas humanas.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 44, **caracterizado** pelo fato de que as

referidas células T com fucosilação de superfície modificada se originaram a partir do referido indivíduo.

46. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 44, **caracterizado** pelo fato de que as referidas células T com fucosilação de superfície modificada se originaram a partir de um animal diferente do referido indivíduo.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 46, **caracterizado** pelo fato de que a referida mistura está substancialmente livre de glóbulos vermelhos.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 47, **caracterizado** pelo fato de que a terapia celular está configurada para tratar um câncer.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 48, **caracterizado** pelo fato de que a mistura é administrada localmente.

50. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 40 a 49, **caracterizado** pelo fato de que a mistura é administrada sistematicamente.

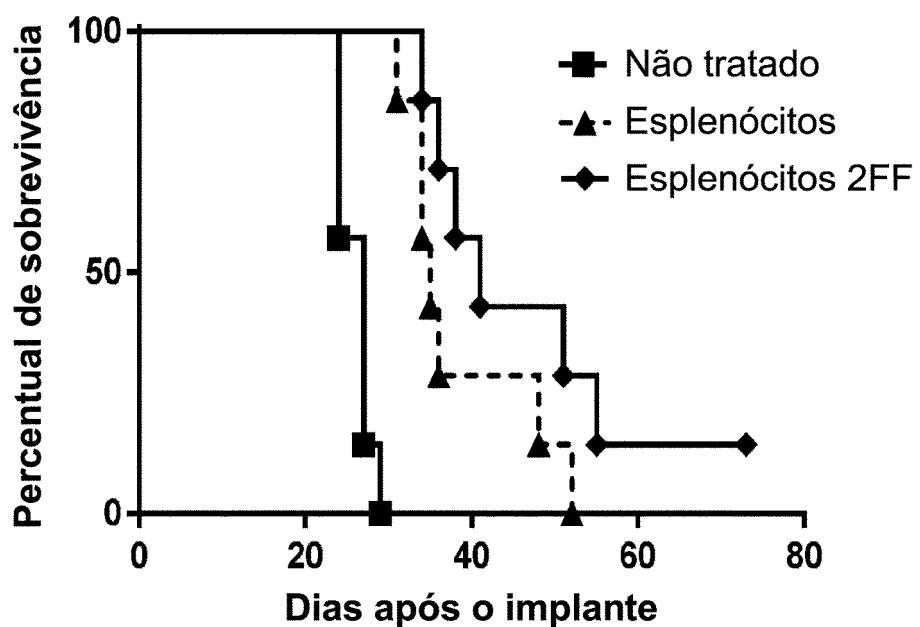
FIG. 1

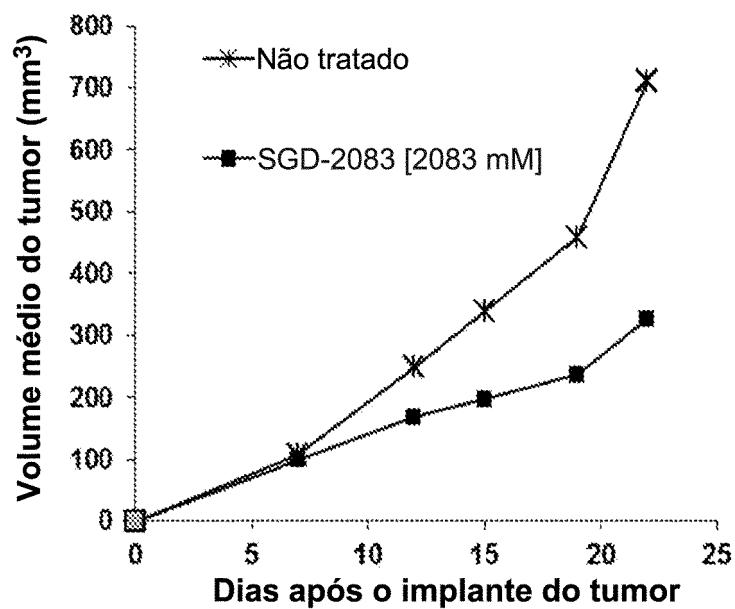
FIG. 2

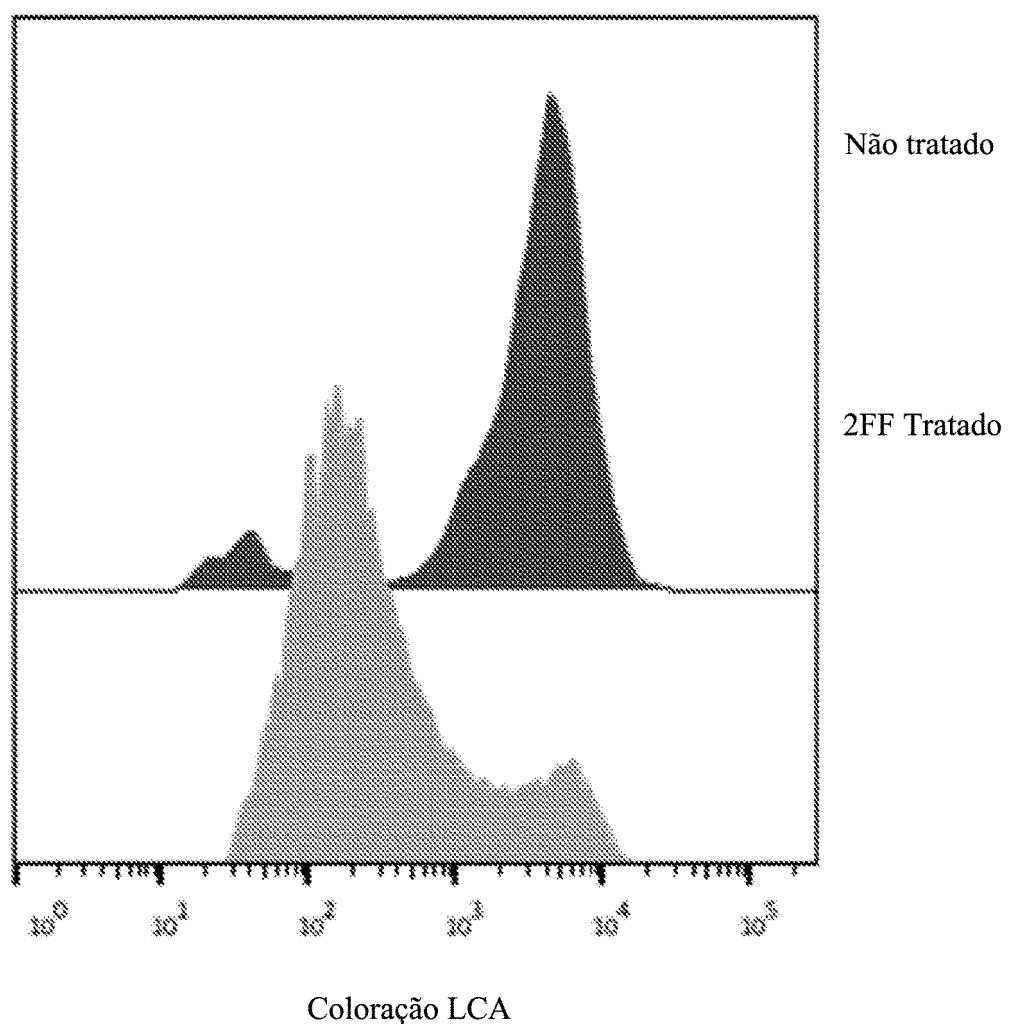
FIG. 3

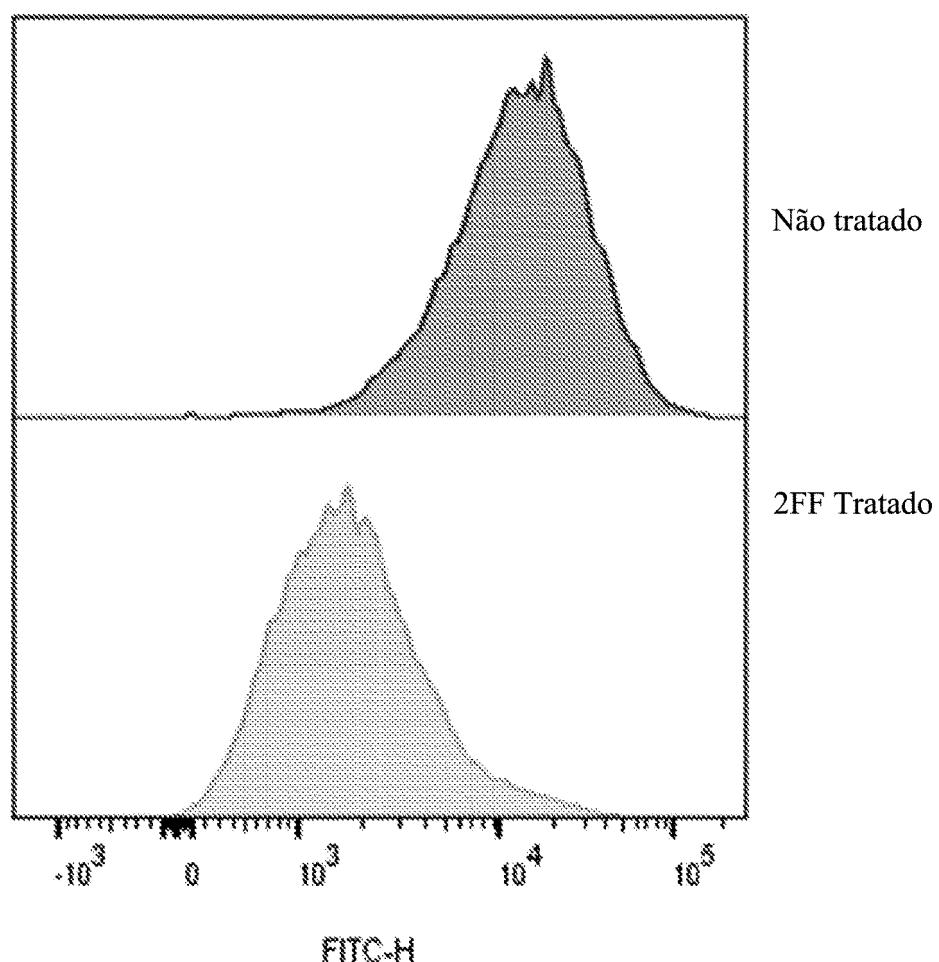
FIG. 4

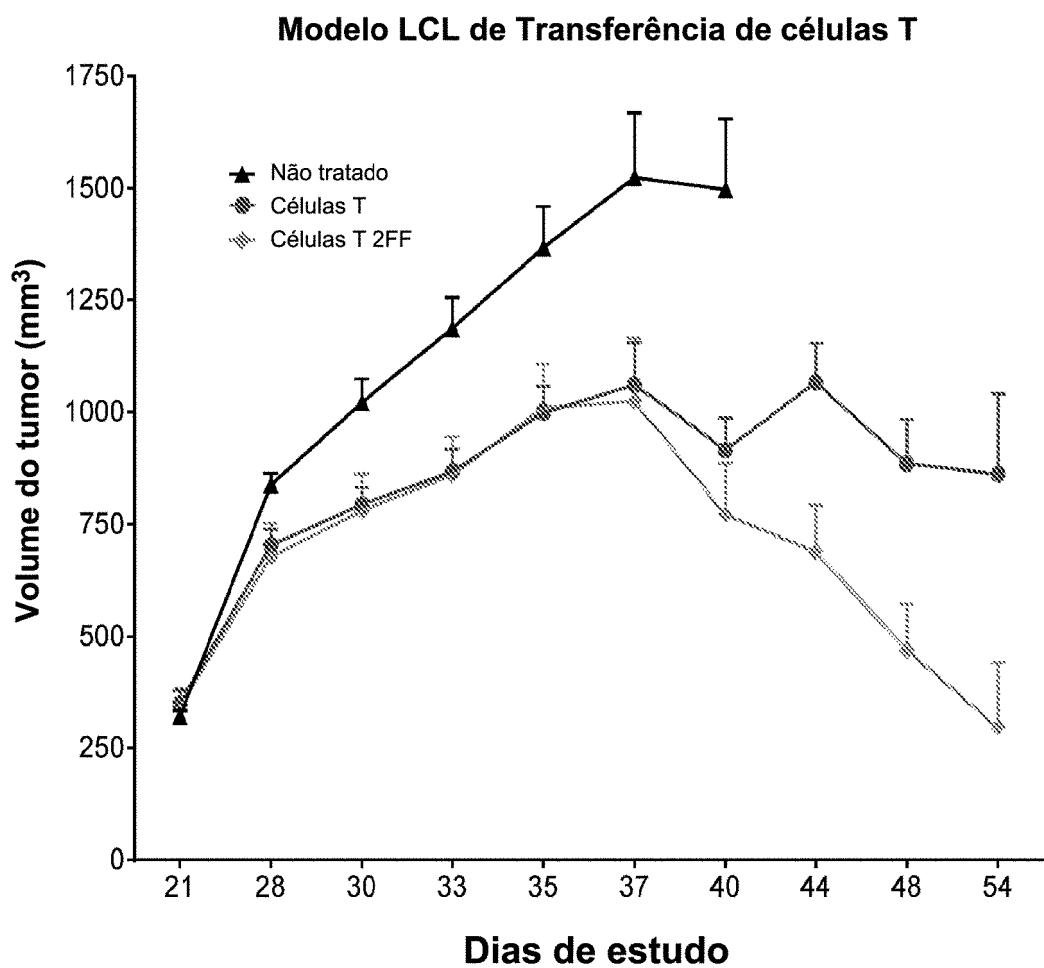
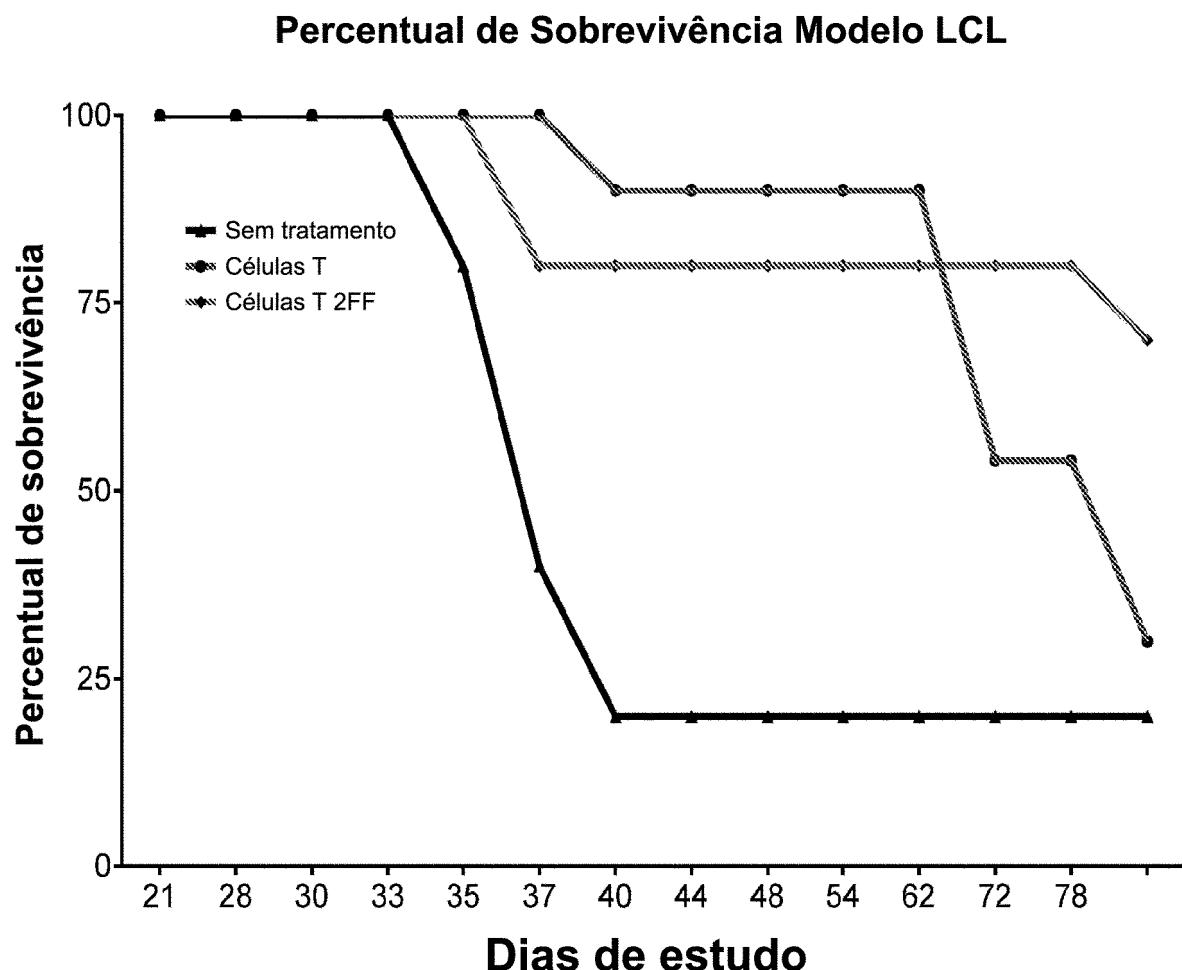
FIG. 5A

FIG. 5B

Resumo da Patente de Invenção para: **"CÉLULAS T COM FUCOSILAÇÃO DE SUPERFÍCIE REDUZIDA E MÉTODOS PARA FAZER E USAR AS MESMAS"**

São fornecidos métodos de produção de células T com fucosilação de superfície reduzida e uso das mesmas na terapia celular adotiva, em particular no tratamento de câncer.