

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992875** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.03.25

(22) Дата подачи заявки
2018.06.05

(51) Int. Cl. *A61K 31/7004* (2006.01)
A61K 31/7024 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **Т-КЛЕТКИ СО СНИЖЕННЫМ ПОВЕРХНОСТНЫМ ФУКОЗИЛИРОВАНИЕМ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/516,536**

(32) **2017.06.07**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/036067**

(87) **WO 2018/226701 2018.12.13**

(71) Заявитель:
СИЭТЛ ДЖЕНЕТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Окили Николь, Филд Джессика,
Гардай Шира, Хейзер Райан (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены способы получения Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование, и их применение в адоптивной клеточной терапии, в частности, при лечении рака.

A1

201992875

201992875

A1

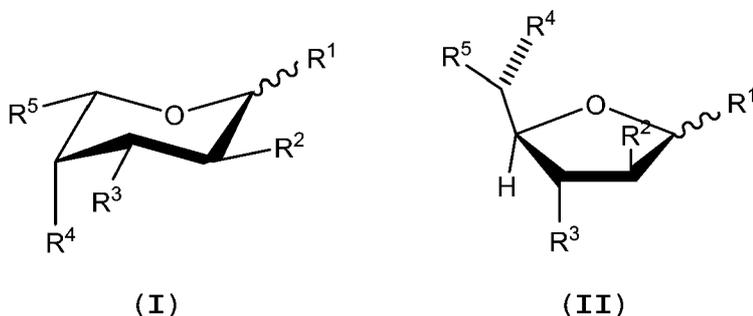
сольватированную форму, где каждая формула (I) или (II) может быть альфа или бета-аномером или соответствующей альдозной формой;

R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является $-OH$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-CH_3$, или

каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является $-OH$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-C\equiv CH$; и

где T-клетки имеют сниженное поверхностное фукозилирование по сравнению с T-клетками, культивируемыми в отсутствие аналога фукозы.

[0006] В другом аспекте предложены способы получения T-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование. В некоторых аспектах способы включают введение аналога фукозы животному и получение T-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование от животного; где аналог фукозы имеет формулу (I) или (II):



или представляет собой соответствующую фармацевтически приемлемую соль или сольватированную форму, где каждая формула (I) или (II) может быть альфа или бета-аномером или соответствующей альдозной формой;

R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является $-OH$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-CH_3$, или

каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является $-OH$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-C\equiv CH$; и

где T-клетки, полученные у животного, имеют сниженное поверхностное фукозилирование по сравнению с T-клетками, присутствующими или полученными у контрольного животного, которому не вводили указанный аналог фукозы.

[0007] В другом аспекте предложены способы применения адоптивной клеточной терапии у субъекта. В некоторых аспектах способы включают введение смеси, содержащей T-клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, нуждающемуся в клеточной терапии субъекту.

[0008] В другом аспекте предложены способы лечения рака. В некоторых аспектах способы включают введение смеси, содержащей T-клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, нуждающемуся в лечении рака субъекту.

[0009] В другом аспекте предложены способы лечения рака. В некоторых аспектах способ включает введение смеси, содержащей T-клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, нуждающемуся в лечении рака субъекту, где T-клетки со сниженным

поверхностным фукозилированием получены согласно любому из способов получения таких Т-клеток.

[0010] Эти и другие аспекты, предложенные в настоящем документе, могут быть в более полной мере поняты при обращении к следующему подробному описанию, неограничивающим примерам определенных вариантов осуществления и прилагаемым фигурам.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0011] На ФИГ. 1 показан график, демонстрирующий влияние *in vivo* адоптивного переноса спленоцитов от мышей–доноров, вакцинированных Fab KLH–A20 Id, которые получали или не получали 2FF, на рост *in vivo* имплантированных клеток мышины лимфомы A20 у интактных мышей BALB/c.

[0012] На ФИГ. 2 показан график, демонстрирующий влияние *in vivo* 2FF на рост п/к имплантированных клеток мышины лимфомы A20 у интактных мышей BALB/c, которых использовали для получения выделенных Cd3⁺ Т-клеток.

[0013] На ФИГ. 3 показан график, демонстрирующий сниженное поверхностное фукозилирование CD3⁺ Т-клеток, выделенных у мышей–носителей опухоли A20, получавших 20 мМ 2FF, как определяли с помощью поверхностного окрашивания LCA.

[0014] На ФИГ. 4 показан график, демонстрирующий сниженное поверхностное фукозилирование CD3⁺ Т-клеток, выделенных у людей–доноров после *ex vivo* обработки 100 мМ 2FF, как определяли с помощью поверхностного окрашивания LCA.

[0015] На ФИГ. 5А–5В показаны графики, демонстрирующие прогрессирование опухоли после переноса аутологичных человеческих Т-клеток, созревших в присутствии или отсутствие 2FF, мышам NSG, несущим соответствующие LCL EBV трансформированные В-клеточные опухоли. На ФИГ. 5А показан график, демонстрирующий прогрессирование опухоли путем измерения штангенциркулем, и на ФИГ. 5В показан график, демонстрирующий прогрессирование опухоли через выживаемость.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016] Хотя в настоящем документе показаны и описаны различные варианты осуществления и аспекты настоящего изобретения, для специалиста в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления и аспекты предоставлены исключительно в качестве примера. Специалистам в данной области будут ясны многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении изобретения.

[0017] Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие описанные объекты изобретения. Все документы или части документов, цитируемых в заявке, включая, помимо прочего, патенты, заявки на патенты, статьи, книги, справочники

и научные труды, настоящим прямо включены посредством отсылки в полном объеме во всех отношениях.

[0018] При практическом осуществлении настоящего изобретения, если не указано иное, будут использоваться стандартные методы культивирования тканей, иммунологии, молекулярной биологии и клеточной биологии, которые известны специалистам в данной области. См., например, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; серия Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; серия *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; IRL Press (1986) *Immobilized Cells and Enzymes*; Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3rd edition (2002) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sohail (2004) *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application* (CRC Press).

I. Определения

[0019] При использовании в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа "a", "an" и "the" включают множественные ссылки, если из контекста прямо не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "аналог фукозы" включает один или более аналогов фукозы. Когда подразумевается множество аналогов фукозы, каждый из множества аналогов фукозы может быть идентичным или отличаться.

[0020] Термин "выделять", "выделение" или "выделенный" служит для обозначения того, что компонент (например, соединение или клетка) отделен от всех или от некоторых компонентов, которые сопровождают его в природе или в лабораторной смеси.

[0021] Термин "обогащать", "обогащение" или "обогащенный" служит для обозначения того, что смесь, содержащая компонент (например, соединение или клетку), обработана с целью повышения концентрации компонента по сравнению с его концентрацией до обработки. Например, обогащение Т-клеток из смеси клеток, содержащей Т-клетки и другие типы клеток, означает, что смесь клеток обрабатывают, например, путем центрифугирования, в результате чего концентрация или количество Т-клеток на единицу объема до обогащения, например, 10^5 Т-клеток/мл, увеличивается больше чем до 10^5 Т-клеток/мл после процесса обогащения.

[0022] Термин "культура" или "клеточная культура" означает поддержание и/или

рост клеток в искусственном, *in vitro* окружении. "Система культивирования клеток" используется в настоящем документе для обозначения условий культивирования, при которых может быть выращена популяция клеток. "Среда для культивирования" используется в настоящем документе для обозначения питательного раствора для культивирования, роста или пролиферации клеток.

[0023] Под "композицией", используемой в настоящем документе, подразумеваются любые соединения (включая любые химические соединения) и клетки, которые могут быть живыми или убитыми. Например, в отношении продукции Т-клеток со сниженным поверхностным фукозилированием, композиция может содержать аналог фукозы, которым обеспечиваются культивируемые клетки. В другом примере, в отношении обеспечения адоптивной клеточной терапии или лечения рака, композиция может содержать группу клеток, например Т-клеток, со сниженным поверхностным фукозилированием. Композиция, используемая в любом контексте, может содержать один или более компонентов.

[0024] Термины "Т-лимфоцит" или "Т-клетка" относятся к типу лимфоцита, который играет важную роль в клеточном иммунитете. Типы Т-клеток включают, без ограничения перечисленными, эффекторные Т-клетки, Т-хелперы, цитотоксические Т-киллеры, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки, НК-клетки, связанные со слизистой инвариантные Т-клетки, альфа-бета Т-клетки и гамма-дельта Т-клетки. Кроме того, Т-клетки могут быть дополнительно подразделены на подтипы в зависимости от присутствия или уровня одного или более конкретных маркеров на них.

[0025] Термины "индивид" или "субъект" при использовании в настоящем документе относятся к людям, млекопитающим и другим животным в настоящем изобретении. В некоторых случаях субъект, являющийся человеком, может быть пациентом.

[0026] Под "лечением" в отношении заболевания или состояния подразумевается, что достигается, по меньшей мере, уменьшение тяжести симптомов, связанных с состоянием, поражающим индивида, где уменьшение тяжести используется в широком смысле для обозначения, по меньшей мере, уменьшения величины параметра, например, симптома, связанного с состоянием (например, раком), подлежащим лечению. Таким образом, лечение также включает ситуации, где патологическое состояние или, по меньшей мере, связанные с ним симптомы полностью ингибированы, например, предотвращено их возникновение или они остановлены, например, устранены, в результате чего пациент больше не страдает от состояния или, по меньшей мере, симптомов, которые характеризуют состояние. Таким образом, лечение включает: (i) профилактику, то есть снижение риска развития клинических симптомов, включая предотвращение развития клинических симптомов, например, предотвращение прогрессирования заболевания до опасного состояния; (ii) ингибирование, то есть задержку развития или дальнейшего развития клинических симптомов, например, уменьшение или полное ингибирование активного заболевания, например, с целью

уменьшения опухолевой нагрузки, которое может включать удаление обнаруживаемых раковых клеток; и/или (iii) облегчение, то есть регрессию клинических симптомов.

[0027] "Введение" и т.п. относится к прямому введению, которое может быть введением в клетки *in vitro*, введением в клетки *in vivo*, введением субъекту медицинским работником, и/или к непрямому введению, которое может быть актом назначения композиции изобретения. При использовании в настоящем документе в отношении клетки, относится к введению композиции в клетку. Как правило, вводят эффективное количество, которое может быть определено специалистом в данной области. Например, при введении одного или более аналогов фукозы в клетки, культивируемые в среде, эффективное количество аналога(ов) фукозы определяют как количество, которое является достаточным, чтобы оказать требуемое воздействие, например, получение T-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование. Может использоваться любой способ введения. Соединения (например, один или более аналогов фукозы) могут вводить в клетки, например, путем добавления соединений в среды для культивирования клеток или введения (например, с кормом) *in vivo*. Введение субъекту может быть выполнено, например, путем кормления, внутрисосудистой инъекции, прямой внутриопухолевой доставки и т.п.

[0028] Введение может означать пероральное введение, введение в виде суппозитория, наружный контакт, внутривенное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутриочаговое, интратекальное, интраназальное или подкожное введение или имплантацию устройства с замедленным высвобождением, например миниосмотического насоса, субъекту. Введение любым путем, включая парентеральное и чресслизистое (например, буккальное, подъязычное, небное, в десну, назальное, вагинальное, ректальное или трансдермальное). Парентеральное введение включает, например, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, внутрикожное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрижелудочковое и внутричерепное. Другие способы доставки включают, без ограничения перечисленными, применение липосомальных препаратов, внутривенную инфузию, трансдермальные пластыри и т.д. Под "совместным введением" подразумевается, что композицию, описанную в настоящем документе, вводят одновременно, непосредственно до или сразу после применения одной или более дополнительных терапий, например, противоопухолевых терапий, таких как химиотерапия, гормональная терапия, лучевая терапия или иммунотерапия. Соединения согласно изобретению можно вводить пациенту отдельно или совместно. Под совместным введением подразумевается одновременное или последовательное введение композиции отдельно или в комбинации (больше одной композиции). Таким образом, препараты также можно комбинировать, когда это нужно, с другими активными веществами (например, для снижения метаболической деградации).

[0029] Термин "рак" при использовании в настоящем документе относится к общему термину, охватывающему первичный рак и метастатический рак. Под "первичным раком" подразумевается группа опухолевых клеток, которые приобрели по

меньшей мере один характерный признак раковых клеток, однако еще не инвазировали соседние ткани и удерживаются в опухоли, локализованной в участке первичного происхождения. Под "метастатическим раком" подразумевается группа опухолевых клеток, которые происходят из клеток первичного рака, которые проникли в ткань, окружающую указанный первичный рак, распространились по телу, прикрепилась в новом удаленном участке и выросли в новую опухоль. Примеры первичного и метастатического рака согласно настоящему изобретению включают, без ограничения перечисленным, карциному молочной железы, рак пищевода, рак толстой и прямой кишки, поджелудочной железы, желудка, стромальные опухоли ЖКТ (желудочно-кишечной стромальной ткани), гепатоцеллюлярный рак, рак печени, легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак яичника, матки, шейки матки, мочевого пузыря, почки, толстой кишки, тонкой кишки, лимфому, рак предстательной железы, яичка, карциному щитовидной железы, злокачественную меланому, увеальную меланому, множественную миелому, мезотелиому, остеосаркому, хондросаркому, миосаркому, глиобластому, саркому, глиому или другие опухоли головного мозга, головы/шеи, другие опухоли желудочно-кишечного тракта и эмбрионально-клеточные опухоли, гемобластозы, лейкоз, лимфому, например, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), острый лимфолейкоз (ОЛЛ), неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, рефрактерную фолликулярную лимфому, мантийно-клеточную лимфому, индолентную В-клеточную лимфому, В-клеточные неоплазии, рак кожи (включая меланому), рак костей, эпителиальный рак, почечноклеточную карциному, аденокарциному поджелудочной железы, лимфому Ходжкина, глиобластому, нейробластому, саркому Юинга, медуллобластому, синовиальную саркому и/или мезотелиому.

[0030] "Раковая клетка" при использовании в настоящем документе относится к клетке, демонстрирующей неопластический клеточный фенотип, который может характеризоваться одним или более из, например, роста измененных клеток, пролиферации измененных клеток, потери зависимого от плотности ингибирования роста, потенциала независимого от прикрепления роста, способности стимулировать рост и/или развитие опухоли в модели на не относящихся к человеку животных с ослабленным иммунитетом и/или любым подходящим индикатором клеточной трансформации. "Раковая клетка" может использоваться в настоящем документе попеременно с "опухолевой клеткой" или "злокачественной клеткой" и охватывает раковые клетки солидной опухоли, полусолидной опухоли, первичной опухоли, метастатической опухоли и т.п.

[0031] "Противоопухолевый эффект" или "противораковый эффект" при использовании в настоящем документе относится к биологическому эффекту, который может представлять собой уменьшение объема опухоли, ингибирование роста опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение пролиферации опухолевых клеток, уменьшение количества метастазов, увеличение общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования, увеличение продолжительности жизни или

уменьшение тяжести различных физиологических симптомов, связанных с опухолью. Противоопухолевый эффект также может относиться к предотвращению возникновения опухоли, например, вакциной.

[0032] Термин "выживаемость без прогрессирования", который может быть сокращено обозначен как ВБП, при использовании в настоящем документе относится ко времени от даты начала лечения до даты прогрессирования заболевания согласно уточненным Критериям объективного ответа Международной рабочей группы (IWG) по злокачественной лимфоме или даты наступления смерти по любой причине.

[0033] Термин "общая выживаемость", который может быть сокращено обозначен как ОВ, определен как время с даты лечения до даты наступления смерти.

[0034] Термин "адоптивная клеточная терапия" или "адоптивный перенос клеток" при использовании в настоящем документе относится к предоставлению, например введению или трансплантации, клеток для терапии субъекту, который нуждается в такой терапии. Клетки для терапии могут происходить от того же субъекта или от другого субъекта, включая человека и животное, не относящееся к человеку. Клетки для адоптивной клеточной терапии или адоптивного переноса клеток могут включать Т-клетки.

[0035] Согласно предложенным в настоящем документе способам, субъекту могут назначать адоптивную клеточную терапию. Некоторые примеры касательно способов и процедур, связанных с адоптивной клеточной терапией, можно найти, например, в WO2015120096, WO2015164675, WO2016011210, WO2016040441, WO2017070395 и US20160158359, описания которых прямо включены посредством отсылки в полном объеме. Адоптивная клеточная терапия может предоставить пациенту смесь клеток, включая Т-клетки, в особенности Т-клетки со сниженным поверхностным фукозилированием. Количество Т-клеток, вводимых субъекту, которое может вызывать требуемый физиологический ответ (например, ингибирование или уменьшение роста опухоли), определяют как эффективное количество. Термины эффективное количество и эффективная доза используются попеременно. Например, для получения положительного ответа у субъекта при лечении заболевания (например, рака) эффективное количество является количеством, которое вызывает уменьшение, устранение или ослабление симптомов, связанных с нарушением, например, с целью обеспечить контроль над метастазированием при раке, устранение раковых клеток и/или т.п. Эффективные количества и схемы введения Т-клеток могут быть определены эмпирически специалистом в данной области. Диапазоны доз для введения являются такими, которые достаточны для получения нужного эффекта, при котором оказывается влияние на один или более симптомов заболевания или нарушения (например, уменьшение или задержка появления). Доза не должна быть настолько большой, чтобы вызывать существенные побочные эффекты, такие как нежелательные перекрестные реакции, анафилактические реакции и т.п. Как правило, доза будет изменяться в зависимости от возраста, состояния здоровья, пола, типа заболевания, степени заболевания или нарушения, пути введения или

от включения в схему лечения других лекарственных средств, и может быть определена специалистом в данной области. В случае каких-либо противопоказаний доза может быть скорректирована отдельным врачом. Дозы могут изменяться и могут быть введены за одно или более введений дозы ежедневно, в течение одного или нескольких дней. Например, для данного параметра эффективное количество будет демонстрировать увеличение или уменьшение по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или по меньшей мере на 100% по сравнению с предварительным лечением. Эффективность также может быть выражена как "кратное" увеличение или уменьшение. Например, терапевтически эффективное количество может оказывать по меньшей мере 1,2-кратное, 1,5-кратное, 2-кратное, 5-кратное или большее действие по сравнению с контролем или предварительным лечением. Точная доза и состав будут зависеть от цели терапии и будут определяться специалистом в данной области с помощью известных способов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1–3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003) и Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

[0036] Термин "сниженное поверхностное фукозилирование" при использовании в настоящем документе относится к ингибированию фукозы, присоединяемой к поверхностным гликопротеинам на клетках, например, T-клетках. Такое "ингибирование фукозы" отличается от конкурентного включения с аналогом фукозы, где аналог фукозы заменяет фукозу на поверхностных гликопротеинах.

[0037] "Контрольный" или "нормальный" образец, например, контрольные клетки или нормальные клетки, относится к образцу, который служит в качестве стандарта, обычно известного стандарта, для сравнения с исследуемым образцом. Например, исследуемый образец может быть модифицированными T-клетками, в частности T-клетками со сниженным поверхностным фукозилированием. Такие T-клетки могут быть получены способами, раскрытыми в настоящем документе, например, путем культивирования T-клеток в присутствии аналога фукозы или получения T-клеток от животного, которому вводили аналог фукозы. Такие модифицированные T-клетки можно сравнивать с контрольными или нормальными T-клетками, которые культивировали в отсутствие аналога фукозы или получали у животного, которому не вводили аналог фукозы для подтверждения снижения. Контрольное значение также может быть получено от того же лица, например, из ранее полученного образца, до воздействия или введения аналога фукозы.

[0038] Термин "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" при использовании в настоящем документе относится к любому подходящему веществу, которое предоставляет фармацевтически приемлемое соединение для введения представляющих интерес соединения(й) субъекту. "Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" может охватывать вещества, называемые фармацевтически приемлемыми разбавителями, фармацевтически приемлемыми добавками и

фармацевтически приемлемыми носителями. Термин "носитель" или "фармацевтически приемлемый носитель" относится к разбавителю, адьюванту или вспомогательному веществу, с которым вводят аналог фукозы. Такие фармацевтические носители могут быть жидкостями, такими как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Носители могут быть солевым раствором, гуммиарабиком, желатином, крахмальной пастой, тальком, кератином, коллоидным диоксидом кремния, мочевиной и т.п. Кроме того, могут использоваться вспомогательные, стабилизирующие, смазывающие вещества, загустители и красители. В одном варианте осуществления, в случае введения животному, аналоги фукозы или композиции и фармацевтически приемлемые носители являются стерильными. Вода является предпочтительным носителем, когда аналоги фукозы вводят внутривенно. Растворы хлорида натрия и водные растворы декстрозы и глицерина также могут использоваться в качестве жидких носителей, особенно в растворах для инъекций. Подходящие фармацевтические носители также включают такие вспомогательные вещества, как крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерилмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Настоящие композиции при необходимости также могут содержать небольшие количества смачивающих веществ или эмульгаторов или pH-буферных веществ.

[0039] При использовании в настоящем документе "гидролизуемые сложноэфирные группы" относятся к любому обычному сложному эфиру, который может гидролизаться *in vivo* с образованием гидроксигруппы. Примеры гидролизуемых сложноэфирных групп включают $-\text{OC}(\text{O})\text{H}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_2-\text{C}_{10}$ алкенил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_2-\text{C}_{10}$ алкинил, $-\text{OC}(\text{O})$ арил, $-\text{OC}(\text{O})$ гетероцикл, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен(арил), $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_2-\text{C}_{10}$ алкенилен(арил), $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_2-\text{C}_{10}$ алкинилен(арил), $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен(гетероцикл), $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_2-\text{C}_{10}$ алкенилен(гетероцикл), $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_2-\text{C}_{10}$ алкинилен(гетероцикл), $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ и $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$, где каждый n является целым числом, независимо выбранным из 0–5.

[0040] При использовании в настоящем документе "ацетат алкинилфукозы" относится к любым формам алкинилфукозы (5-этиниларабинозы) с ацетатными группами в положениях R^{1-4} (см. формулу I и II, ниже), включая 6-этинил-тетрагидро-2H-пиран-2,3,4,5-тетраил-тетраацетат, включая (2S,3S,4R,5R,6S) и (2R,3S,4R,5R,6S) изомеры, и 5-(S)-1-гидроксипроп-2-инил-тетрагидрофуран-2,3,4-триил-тетраацетат, включая (2S,3S,4R,5R) и (2R,3S,4R,5R) изомеры и альдозную форму, если из контекста не следует иное. Термины "триацетат алкинилфукозы", "диацетат алкинилфукозы" и "моноацетат алкинилфукозы" относятся к указанным три-, ди- и моноацетатным формам алкинилфукозы, соответственно.

[0041] Если из контекста не следует иное, термин "алкил" относится к незамещенному, насыщенному, нормальному или разветвленному углеводороду,

содержащему от 1 до 20 атомов углерода (и все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретное число атомов углерода в них), если не определено иное. Алкильная группа из 1–3, 1–8 или 1–10 атомов углерода является предпочтительной. Примерами алкильных групп являются метил, этил, н–пропил, изопропил, н–бутил, изобутил, втор–бутил, трет–бутил, н–пентил, 2–пентил, 3–пентил, 2–метил–2–бутил, н–гексил, н–гептил, н–октил, н–нонил, н–децил, 3–метил–2–бутил, 3–метил–1–бутил, 2–метил–1–бутил, 1–гексил, 2–гексил, 3–гексил, 2–метил–2–пентил, 3–метил–2–пентил, 4–метил–2–пентил, 3–метил–3–пентил, 2–метил–3–пентил, 2,3–диметил–2–бутил и 3,3–диметил–2–бутил.

[0042] Алкильные группы, отдельно или в качестве части другой группы, если они замещены, могут быть замещены одной или более группами, предпочтительно 1–3 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включающими, без ограничения: галоген, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкил})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенил})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкинил})$, арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $=O$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$; где каждый R' независимо выбран из $-H$, $-C_1-C_8 \text{ алкила}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенила}$, $-C_2-C_8 \text{ алкинила}$ или арила.

[0043] Если из контекста не следует иное, термины "алкенил" и "алкинил" относятся к незамещенному или необязательно замещенному (где указано) нормальным и разветвленным углеродным цепям, содержащим от 2 до 20 атомов углерода (и все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретное число атомов углерода в них), при этом предпочтительны 2–3, 2–4, 2–8 или 2–10 атомов углерода. Алкенильная цепь содержит по меньшей мере одну двойную связь в цепи, и алкинильная цепь содержит по меньшей мере одну тройную связь в цепи. Примеры алкенильных групп включают, без ограничения, этилен или винил, аллил, 1–бутенил, 2–бутенил, –изобутенил, 1–пентенил, 2–пентенил, 3–метил–1–бутенил, 2–метил–2–бутенил и 2,3–диметил–2–бутенил. Примеры алкинильных групп включают, без ограничения, ацетиленовую, пропаргил, ацетиленил, пропилил, 1–бутинил, 2–бутинил, 1–пентинил, 2–пентинил и 3–метил–1–бутинил.

[0044] Алкенильные и алкинильные группы, отдельно или в качестве части другой группы, если они замещены, могут быть замещены одной или более группами, предпочтительно 1–3 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включающими, без ограничения: галоген, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкил})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенил})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкинил})$, –арил, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $=O$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$; где каждый R' независимо выбран из H , $-C_1-C_8 \text{ алкила}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенила}$, $-C_2-C_8 \text{ алкинила}$ или арила.

[0045] Если из контекста не следует иное, термин "алкилен" относится к насыщенному, незамещенному, разветвленному или нормальному углеводородному радикалу, содержащему от 1 до 20 атомов углерода (и все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретное число атомов углерода в них), предпочтительно 1–8 или 1–10 атомов углерода, и имеющему два моновалентных радикальных центра, полученных в

результате удаления двух атомов водорода от одного или двух разных атомов углерода исходного алкана. Типичные алкилены включают, без ограничения, метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен, декален, 1,4-циклогексилен и т.п.

[0046] Алкиленовые группы, отдельно или в качестве части другой группы, если они замещены, могут быть замещены одной или более группами, предпочтительно 1–3 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включающими, без ограничения: галоген, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкил})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенил})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкинил})$, $-арил$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $=O$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$; где каждый R' независимо выбран из H , $-C_1-C_8 \text{ алкила}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенила}$, $-C_2-C_8 \text{ алкинила}$ или $-арила$.

[0047] "Алкенилен" относится к ненасыщенному, разветвленному или нормальному, или циклическому углеводородному радикалу алкенильной группы (как описано выше) и имеющему два моновалентных радикальных центра, полученных в результате удаления двух атомов водорода от одного или двух разных атомов углерода исходного алкена. "Алкениленовая" группа может быть незамещенной или необязательно замещенной (где указано), как описано выше для алкенильных групп. В некоторых вариантах осуществления "алкениленовая" группа не замещена.

[0048] "Алкинилен" относится к ненасыщенному, разветвленному или нормальному, или циклическому углеводородному радикалу алкинильной группы (как описано выше) и имеющему два моновалентных радикальных центра, полученных в результате удаления двух атомов водорода от одного или двух разных атомов углерода исходного алкина. "Алкиниленовая" группа может быть незамещенной или необязательно замещенной (где указано), как описано выше для алкинильных групп. В некоторых вариантах осуществления "алкиниленовая" группа не замещена.

[0049] Если из контекста не следует иное, термин "арил" относится к замещенному или незамещенному моновалентному ароматическому углеводородному радикалу из 6–20 атомов углерода (и все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретное число атомов углерода в них), полученному в результате удаления одного атома водорода от одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представлены в примерных структурах как "Ar". Типичные арильные группы включают, без ограничения, радикалы, полученные из бензола, замещенного бензола, фенила, нафталина, антрацена, бифенила и т.п.

[0050] Арильная группа, отдельно или в качестве части другой группы, может быть необязательно замещена одной или более, предпочтительно 1–5, или даже 1–2 группами, включающими, без ограничения перечисленными: галоген, $-C_1-C_8 \text{ алкил}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенил}$, $-C_2-C_8 \text{ алкинил}$, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкил})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенил})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкинил})$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$; где каждый R' независимо

выбран из H, $-C_1-C_8$ алкила, $-C_2-C_8$ алкенила, $-C_2-C_8$ алкинила или арила.

[0051] Если из контекста не следует иное, термин "гетероцикл" относится к замещенной или незамещенной моноциклической кольцевой системе, содержащей от 3 до 7 или от 3 до 10 атомов в кольце (также называемых членами кольца), где по меньшей мере один атом в кольце является гетероатомом, выбранным из N, O, P или S (и все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретное число атомов углерода и гетероатомов в них). Гетероцикл может содержать от 1 до 4 гетероатомов в кольце, независимо выбранных из N, O, P или S. Один или более атомов N, S или S в гетероцикле могут быть окислены. Моноциклический гетероцикл предпочтительно содержит 3–7 членов кольца (например, 2–6 атомов углерода и 1–3 гетероатома, независимо выбранных из N, O, P или S). Кольцо, которое содержит гетероатом, может быть ароматическим или неароматическим. Если не указано иное, гетероцикл присоединен к своей боковой группе на любом гетероатоме или атоме углерода, что приводит к стабильной структуре.

[0052] Гетероциклы описаны в Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в частности, в Главах 1, 3, 4, 6, 7 и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 по настоящее время), в частности, Номера 13, 14, 16, 19 и 28; и J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960). Примеры "гетероциклических" групп включают, в качестве неограничивающего примера, пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, фукозил, азаридинил, азетидинил, оксиранил, оксетанил и тетрагидрофуранил.

[0053] Гетероциклическая группа, отдельно или в качестве части другой группы, если они замещены, может быть замещена одной или более группами, предпочтительно 1–2 группами, включающими, без ограничения перечисленными: $-C_1-C_8$ алкил, $-C_2-C_8$ алкенил, $-C_2-C_8$ алкинил, галоген, $-O-(C_1-C_8$ алкил), $-O-(C_2-C_8$ алкенил), $-O-(C_2-C_8$ алкинил), $-арил$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ и $-CN$; где каждый R' независимо выбран из H, $-C_1-C_8$ алкила, $-C_2-C_8$ алкенила, $-C_2-C_8$ алкинила или $-арила$.

[0054] В качестве неограничивающего примера, углерод–связанные гетероциклы могут быть связаны в следующих положениях: положение 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина; положение 3, 4, 5 или 6 пиридазина; положение 2, 4, 5 или 6 пиримидина; положение 2, 3, 5 или 6 пиразина; положение 2, 3, 4 или 5 фурана, тетрагидрофурана, тиофурана, тиофена, пиррола или тетрагидропиррола; положение 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола; положение 3, 4 или 5 изоксазола, пиразола или изотиазола; положение 2 или 3 азиридина; или положение 2, 3 или 4 азетидина. Примеры углерод–связанных гетероциклов могут включать 2–пиридил, 3–пиридил, 4–пиридил, 5–пиридил, 6–пиридил, 3–пиридазинил, 4–пиридазинил, 5–пиридазинил, 6–пиридазинил, 2–пиримидинил, 4–пиримидинил, 5–пиримидинил, 6–пиримидинил, 2–пиразинил, 3–пиразинил, 5–пиразинил, 6–пиразинил, 2–

тиазолил, 4-тиазолил или 5-тиазолил.

[0055] В качестве неограничивающего примера азот-связанные гетероциклы могут быть связаны в положении 1 азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина или 1Н-индазола; положении 2 изоиндола или изоиндолина; и положении 4 морфолина. Еще более типично, азот-связанные гетероциклы включают 1-азиридил, 1-азетидил, 1-пирролил, 1-имидазолил, 1-пиразолил и 1-пиперидинил.

[0056] Если не указано иное, термин "карбоцикл" относится к замещенной или незамещенной, насыщенной или ненасыщенной неароматической моноциклической кольцевой системе, содержащей от 3 до 6 атомов в кольце (и все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретное число атомов углерода в них), где все атомы в кольце являются атомами углерода.

[0057] Карбоциклические группы, отдельно или в качестве части другой группы, если они замещены, могут быть замещены, например, одной или более группами, предпочтительно 1 или 2 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включающими, без ограничения перечисленными: галоген, C₁-C₈ алкил, -C₂-C₈ алкенил, -C₂-C₈ алкинил, -O-(C₁-C₈ алкил), -O-(C₂-C₈ алкенил), -O-(C₂-C₈ алкинил), арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ и -CN; где каждый R' независимо выбран из H, -C₁-C₈ алкила, -C₂-C₈ алкенила, -C₂-C₈ алкинила или арила.

[0058] Примеры моноциклических карбоциклических заместителей включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил, 1-циклогекс-3-енил, циклогептил, циклооктил, -1,3-циклогексадиенил, -1,4-циклогексадиенил, -1,3-циклогептадиенил, -1,3,5-циклогептатриенил и -циклооктадиенил.

[0059] Когда какая-либо переменная встречается больше одного раза в каком-либо элементе или в какой-либо формуле, ее определение при каждом появлении не зависит от ее определения в любом другом случае. Комбинации заместителей и/или переменных допустимы только в том случае, если такие комбинации приводят к стабильным соединениям.

[0060] Если из контекста не следует иное, дефис (-) обозначает положение присоединения к молекуле заместителя. Таким образом, термин "-(C₁-C₁₀ алкилен)арил" или "-C₁-C₁₀ алкилен(арил)" относится к C₁-C₁₀ алкиленовому радикалу, как определено в настоящем документе, где алкиленовый радикал присоединен к молекуле заместителя на любом из атомов углерода алкиленового радикала, при этом один из атомов водорода, связанных с атомом углерода алкиленового радикала, заменен арильным радикалом, как определено в настоящем документе.

[0061] Если конкретная группа является "замещенной", такая группа может иметь

один или более заместителей, предпочтительно от одного до пяти заместителей, более предпочтительно от одного до трех заместителей, наиболее предпочтительно от одного до двух заместителей, независимо выбранных из списка заместителей. Такая группа, впрочем, может обычно иметь любое количество заместителей, выбранных из галогена.

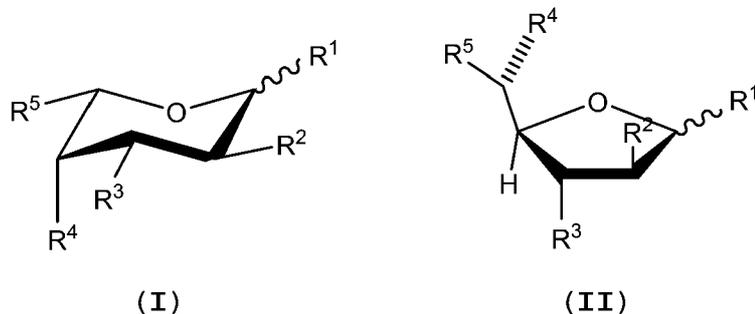
[0062] Предполагается, что определение любого заместителя или переменной в конкретном положении в молекуле не зависит от их определений в другом положении этой молекулы. Следует понимать, что заместители и характер замещения на соединениях настоящего изобретения могут быть выбраны средним специалистом в данной области так, чтобы были получены соединения, которые являются активными и химически стабильными, и которые могут быть с легкостью синтезированы с помощью методик, известных в уровне техники, а также способов, представленных в настоящем документе.

[0063] Термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального или регионального правительства или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для ветеринарного применения и, в частности, медицинского применения. Термин "фармацевтически совместимый компонент" относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или растворителю, с которым вводят аналог фукозы.

[0064] Аналоги фукозы, как правило, по существу не содержат нежелательные примеси. Это означает, что аналог, как правило, обладает по меньшей мере приблизительно 50% в/в (вес/вес) чистотой, а также по существу не содержит нежелательных белков и других примесей. Иногда такие соединения обладают по меньшей мере приблизительно 80% в/в и, более предпочтительно по меньшей мере 90% или приблизительно 95% в/в чистотой. С помощью обычных методик очистки может быть получен гомогенный, по меньшей мере 99% в/в, продукт.

II. Аналоги фукозы

[0065] В любом из различных вариантов осуществления в настоящем документе аналог фукозы может иметь следующую формулу (I) или (II):



или представлять собой соответствующую фармацевтически приемлемую соль или сольватированную форму, где каждая формула (I) или (II) может быть альфа или бета-аномером или соответствующей альдозной формой;

где R² является галогеном; каждый из R¹, R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –СН₃,

или

где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является $-\text{OH}$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является алкинилом.

[0066] В некоторых вариантах осуществления R^2 является $-\text{F}$.

[0067] В некоторых вариантах осуществления R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$.

[0068] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы имеет формулу (I) или (II), где R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является $-\text{OH}$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-\text{CH}_3$, или где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является $-\text{OH}$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$.

[0069] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы имеет формулу (I) или (II), где R^2 является $-\text{F}$; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является $-\text{OH}$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-\text{CH}_3$, или где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является $-\text{OH}$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$.

[0070] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является $-\text{OH}$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-\text{CH}_3$. В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), R^2 является $-\text{F}$; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является $-\text{OH}$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-\text{CH}_3$.

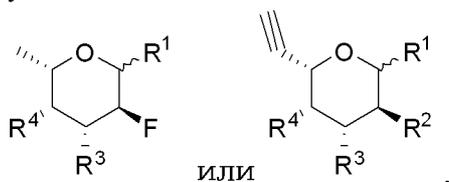
[0071] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является $-\text{OH}$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$.

[0072] В некоторых вариантах осуществления гидролизуемая сложноэфирная группа является $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилом. В некоторых выбранных вариантах осуществления гидролизуемая сложноэфирная группа является $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$.

[0073] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^2 является $-\text{F}$, каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{OH}$ и $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкила. В некоторых выбранных вариантах осуществления формул (I) или (II), где R^2 является $-\text{F}$, каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{OH}$ и $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. В одном определенном варианте осуществления формулы (I) или (II), R^2 является $-\text{F}$, и каждый из R^1 , R^3 и R^4 $-\text{OH}$.

[0074] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$, каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{OH}$ и $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкила. В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$, каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{OH}$ и $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. В одном определенном варианте осуществления формулы (I) или (II), R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$, и каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является $-\text{OH}$. В другом определенном варианте осуществления формулы (I) или (II), R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$, и каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является $-\text{OAc}$.

[0075] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналог фукозы имеет формулу:



или представляет собой соответствующую альдозную форму, где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является таким, как определено и описано в настоящем документе.

[0076] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналогом фукозы является 2-дезоксидезокси-2-фтор-L-фукоза.

[0077] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналогом фукозы является перацетат алкинилфукозы. Перацетат алкинилфукозы может быть тетраацетатом алкинилфукозы, триацетатом алкинилфукозы, диацетатом алкинилфукозы, моноацетатом алкинилфукозы или их комбинациями. В одном примере осуществления аналогом фукозы является (3S,4R,5R,6S)-6-этинилтетрагидро-2H-пиран-2,3,4,5-тетраил-тетраацетат или 5-(S)-1-гидроксипроп-2-ин-1-ил)тетрагидрофуран-2,3,4-триил-триацетат.

[0078] В любом из различных вариантов осуществления внутрикольцевой атом кислорода в аналоге фукозы формулы (I) и (II) может быть заменен серой.

[0079] Также в настоящем документе предложена фармацевтически приемлемая соль и сольватированная форма соединений формул I и II. Таким образом, в любом из различных вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе, может использоваться фармацевтически приемлемая соль или сольватированные формы раскрытых соединений. Сольваты, как правило, не вызывают значительного изменения физиологической активности соединений и в таком виде могут функционировать как фармакологические эквиваленты. Одним типом сольвата является гидрат.

[0080] В некоторых аспектах аналог фукозы растворим в буфере лекарственной формы (например, в водном буфере лекарственной формы) в концентрации по меньшей мере 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы растворим в буфере лекарственной формы в концентрации по меньшей мере 100 мМ. В некоторых аспектах аналог фукозы растворим в буфере лекарственной формы (например, в водном буфере лекарственной формы) в концентрации по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 100 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 200 мг/мл или по меньшей мере приблизительно 300 мг/мл.

III. Способ получения Т-клеток со сниженным поверхностным фукозиллированием

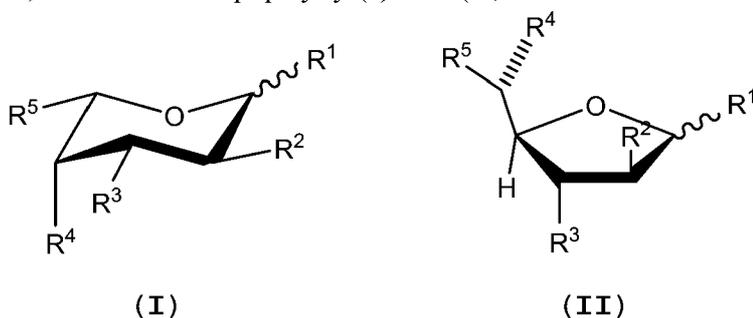
[0081] В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы получения Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозиллирование.

II-1. Способы получения in vitro или ex vivo

[0082] В некоторых аспектах предложены способы in vitro или ex vivo получения

T-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование. Такие способы могут включать культивирование T-клеток в присутствии аналога фукозы, раскрытого в настоящем документе, в среде культивирования клеток и сбор T-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование. T-клетки, полученные таким способом, могут иметь сниженное поверхностное фукозилирование по сравнению с T-клетками, культивируемыми в отсутствие аналога фукозы. Такие T-клетки, полученные способами, раскрытыми в настоящем документе, могут применяться в терапевтических целях, таких как адоптивная клеточная терапия или лечение рака. Таким образом, по меньшей мере в некоторых вариантах осуществления, T-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, именуется "терапевтическими T-клетками".

[0083] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы, применяемый в способах, может иметь формулу (I) или (II):



или представлять собой соответствующую фармацевтически приемлемую соль или сольватированную форму, где каждая формула (I) или (II) может быть альфа или бета-аномером или соответствующей альдозной формой;

где R² является галогеном; каждый из R¹, R³, и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –СН₃,

или

где каждый из R¹, R², R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является алкинилом.

[0084] В некоторых вариантах осуществления R² является –F.

[0085] В некоторых вариантах осуществления R⁵ является –С≡СН.

[0086] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы, применяемый в способах, имеет формулу (I) или (II), где R² является галогеном; каждый из R¹, R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –СН₃, или где каждый из R¹, R², R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –С≡СН.

[0087] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы, применяемый в способах, имеет формулу (I) или (II), где R² является –F; каждый из R¹, R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –СН₃, или где каждый из R¹, R², R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –С≡СН.

[0088] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), R²

является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является $-OH$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-CH_3$. В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), R^2 является $-F$; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является $-OH$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-CH_3$.

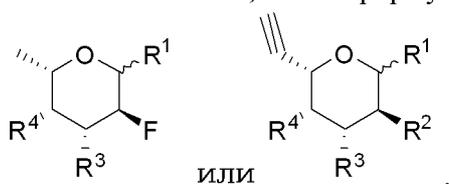
[0089] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II) каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбран из $-OH$ или гидролизуемой сложноэфирной группы; и R^5 является $-C\equiv CH$.

[0090] В некоторых вариантах осуществления гидролизуемая сложноэфирная группа является $-OC(O)C_1-C_{10}$ алкилом. В некоторых выбранных вариантах осуществления гидролизуемая сложноэфирная группа является $-OC(O)CH_3$.

[0091] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^2 является $-F$, каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-OH$ и $-OC(O)C_1-C_{10}$ алкила. В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^2 является $-F$, каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-OH$ и $-OC(O)CH_3$. В одном определенном варианте осуществления формулы (I) или (II), R^2 является $-F$, и каждый из R^1 , R^3 и R^4 является $-OH$.

[0092] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^5 является $-C\equiv CH$, каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-OH$ и $-OC(O)C_1-C_{10}$ алкила. В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^5 является $-C\equiv CH$, каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-OH$ и $-OC(O)CH_3$. В одном определенном варианте осуществления формулы (I) или (II), R^5 является $-C\equiv CH$, и каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является $-OH$. В другом определенном варианте осуществления формулы (I) или (II) R^5 является $-C\equiv CH$, и каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является $-OAc$.

[0093] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналог фукозы, применяемый в способах, имеет формулу:



или представляет собой соответствующую альдозную форму, где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является таким, как определено и описано в настоящем документе.

[0094] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналогом фукозы является 2-дезоксидезокси-2-фтор-L-фукоза.

[0095] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналогом фукозы является перацетат алкинилфукозы. Перацетат алкинилфукозы может быть тетраацетатом алкинилфукозы, триацетатом алкинилфукозы, диацетатом алкинилфукозы, моноацетатом алкинилфукозы или их комбинациями. В одном примере осуществления аналогом фукозы является (3S,4R,5R,6S)-6-этинилтетрагидро-2H-пиран-2,3,4,5-тетраил-тетраацетат или 5-(S)-1-гидроксипроп-2-ин-1-ил)тетрагидрофуран-2,3,4-триил-триацетат.

[0096] В любом из различных вариантов осуществления внутрикольцевой кислород в аналоге фукозы формулы (I) и (II) может быть заменен серой.

[0097] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, могут включать стадию культивирования T-клеток в присутствии аналога фукозы в среде культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления в среде культивирования присутствуют другие типы клеток, например, эритроциты. Культивируемые T-клетки могут быть получены у субъекта (например, человека или не относящегося к человеку животного). В альтернативе культивируемые T-клетки могут быть получены из ранее культивируемой и/или сохраненной популяции клеток.

[0098] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, позволяют получать T-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, которые могут применяться в адоптивной клеточной терапии у субъекта, нуждающегося в такой терапии. В вариантах осуществления, где T-клетки и популяции клеток выделены из образца, такого как биологический образец, например, образец, полученный или происходящий от субъекта, субъект может быть пациентом, который нуждается в клеточной терапии, или которому будет назначена клеточная терапия, т.е. аутологичным источником. В альтернативе T-клетки и популяции клеток могут быть выделены от донора, который не является пациентом, который нуждается в адоптивной клеточной терапии, т.е. аллогенным источником. Донор может быть здоровым человеком или другим пациентом, страдающим таким же патологическим состоянием или заболеванием, которое имеет пациент, который нуждается в клеточной терапии, или которому будет назначена клеточная терапия.

[0099] В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные у субъекта, могут быть смесью первичных клеток, например первичных клеток человека. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате одной или более стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, промывка, инкубирование и/или культивирование. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, который обработан. Биологические образцы включают, без ограничения, физиологические жидкости, такие как кровь, плазму, сыворотку, образцы ткани и органов, таких как селезенка, включая обработанные образцы, полученные из них. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты, костный мозг, тимус, образцы биопсии ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, лимфоидную ткань кишечника, лимфоидную ткань слизистой оболочки, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалину или другой орган и/или клетки, полученные из них. Образцы в контексте клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии, включают образцы из аутологичных и аллогенных источников. Клетки в некоторых вариантах

осуществления могут быть получены из ксеногенного источника, например, мыши, крысы, не относящегося к человеку примата и свиньи.

[0100] В некоторых вариантах осуществления клетки, культивируемые согласно способам, раскрытым в настоящем документе, могут быть получены из существующих клеточных линий, например, линий Т-клеток.

[0101] В некоторых вариантах осуществления выделение клеток или популяций для культивирования может включать одну или более стадий подготовки и разделения. В некоторых вариантах осуществления клетки могут промывать, центрифугировать и/или инкубировать в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения нужными компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к определенным реагентам. В некоторых вариантах осуществления клетки разделяют на основе одного или более свойств, таких как плотность, способность к адгезии, размер, чувствительность, профиль экспрессии поверхностных маркеров и/или устойчивость к определенным компонентам.

[0102] В некоторых вариантах осуществления, где клетки крови забирают у субъекта, собранные клетки крови могут промывать, например, для удаления плазматической фракции, и помещать клетки в подходящий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки могут ресуспендировать в различных биологически совместимых буферах, известных в данной области, после промывки. В некоторых вариантах осуществления могут удалять компоненты образца клеток крови, и клетки могут ресуспендировать в средах для культивирования. В некоторых вариантах осуществления способы могут включать способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования.

[0103] В некоторых вариантах осуществления способы могут включать стадию разделения различных типов клеток по экспрессии или присутствию в клетке одной или более специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки. В некоторых вариантах осуществления может использоваться любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления разделение может быть афинным или иммуноафинным разделением. Например, выделение в некоторых аспектах включает разделение клеток и популяций клеток по экспрессии или уровню экспрессии на клетках одного или более маркеров, как правило, маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубирования с антителом или партнером по связыванию, которые специфично связываются с такими маркерами, обычно с последующими стадиями промывки и разделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связавшихся с антителом или партнером по связыванию.

[0104] В некоторых вариантах осуществления один или несколько подтипов Т-клеток могут быть дополнительно обогащены. В некоторых вариантах осуществления подтипы Т-клеток можно определить по присутствию или уровню одного или более

конкретных маркеров, таких как поверхностные маркеры, на Т-клетках. В некоторых случаях такими маркерами являются маркеры, которые отсутствуют или экспрессируются на относительно низких уровнях в определенных популяциях Т-клеток (таких как клетки, не являющиеся клетками памяти), но присутствуют или экспрессируются на относительно более высоких уровнях в некоторых других популяциях Т-клеток (таких как клетки памяти). В одном варианте осуществления клетки (такие как CD8⁺ клетки или Т-клетки, например, CD3⁺ клетки) обогащены (т.е. положительно отобраны) клетками, которые являются положительными или экспрессируют на поверхности высокие уровни CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127 и/или CD62L, и/или обеднены (например, отрицательно отобраны) клетками, которые являются положительными или экспрессируют на поверхности высокие уровни CD45RA. В некоторых вариантах осуществления клетки обогащены или обеднены клетками, положительными или экспрессирующим на поверхности высокие уровни CD122, CD95, CD25, CD27 и/или IL7-Ra (CD127). В некоторых примерах CD8⁺ Т-клетки обогащены клетками, положительными на CD45RO (или отрицательными на CD45RA) и CD62L.

[0105] В некоторых вариантах осуществления требуемая популяция клеток, описанная в настоящем документе, может быть собрана и обогащена (или обеднена) с помощью проточной цитометрии, в которой клетки, окрашенные на множество маркеров клеточной поверхности, переносятся в потоке жидкости. В некоторых вариантах осуществления популяции первичных Т-клеток или полученные Т-клетки могут быть собраны и обогащены (или обеднены) путем препаративной сортировки (FACS). В некоторых вариантах осуществления антитела или партнеры по связыванию помечены одним или несколькими детектируемыми маркерами для облегчения разделения для положительного и/или отрицательного отбора. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно меченными антителами. В некоторых примерах разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных к одному или нескольким маркерам клеточной поверхности, осуществляют в потоке жидкости, например, с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), включая препаративный масштаб (FACS) и/или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в комбинации с проточно-цитометрической системой обнаружения. Такие способы позволяют производить положительный и отрицательный отбор на множество маркеров одновременно.

[0106] Разделение не должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих определенный маркер. Например, отбор или обогащение клетками определенного типа, такими как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процента таких клеток, но не приводит обязательно к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих такой маркер. Например, в некоторых вариантах осуществления отбор популяции CD3⁺ Т-клеток обогащает указанную популяцию, но также может содержать некоторый остаточный или небольшой процент других неотобранных клеток, которые могут, в

некоторых случаях, включать другие клетки, не являющиеся CD3⁺ Т-клетками, и/или не-Т-клеточную популяцию, которые все еще присутствуют в обогащенной популяции. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное флуоресценционное окрашивание, могут содержать периферические Т-клетки человека.

[0107] В некоторых вариантах осуществления разделение или обогащение конкретных типов клеток можно проводить до или после этапа культивирования популяции клеток в среде культивирования. Таким образом, в некоторых образцах смесь первичных клеток, выделенных из образца, может быть обработана с целью разделения или обогащения Т-клеток и удаления (например, уменьшения количества) других типов клеток или компонентов (например, тромбоцитов и эритроцитов). Затем обогащенную популяцию Т-клеток можно культивировать. В альтернативе, в других примерах, смесь клеток, содержащих Т-клетки и другие типы клеток или компонентов, выделенных из образца, можно культивировать в среде культивирования без существенного разделения или обогащения Т-клеток. После того, как популяция клеток достигнет требуемого количества или стадия культивирования будет по существу завершена, культивируемые клетки могут быть обработаны с целью разделения или обогащения Т-клеток для последующего применения, например, адоптивной клеточной терапии или лечения рака.

[0108] В некоторых вариантах осуществления предложенные способы могут включать один или более различных этапов культивирования клеток и популяций клеток. В некоторых вариантах осуществления способы могут включать один или более этапов культивирования популяции клеток, выделенных из образца или полученных из существующей клеточной линии. В некоторых альтернативных вариантах осуществления способы могут включать один или более этапов культивирования популяции клеток, которая была выделена из смеси клеток, полученной и выделенной из образца или полученной из существующей клеточной линии. В некоторых из таких вариантов осуществления большая часть популяции клеток (например, по меньшей мере 20% или больше от всей популяции клеток), подлежащая культивированию, может включать Т-клетки, которые были выделены или обогащены из более ранней популяции клеток.

[0109] В некоторых вариантах осуществления множество клеток, подлежащих культивированию, обычно можно культивировать в емкости, такой как тот же блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, пакет или другой контейнер для культуры или культивирования клеток.

[0110] Этапы культивирования могут включать по меньшей мере одно или более из следующего: культуру, культивирование, стимуляцию, активацию, размножение, в том числе при инкубировании в присутствии стимулирующих условий, например, условий, предназначенных для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции.

[0111] Условия могут включать одно или более из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих

факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие средства, предназначенные для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления одно или более средств, которые предназначены для изменения характеристик клеток, могут быть добавлены в среду культивирования. Например, один или более аналогов фукозы могут быть добавлены в среду культивирования для изменения уровня фукозилирования на поверхности клеток, в частности Т-клеток.

[0112] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, включают модификацию Т-клеток путем культивирования Т-клеток в присутствии аналога фукозы. Аналог фукозы может быть добавлен в среду культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления среда культивирования клеток может содержать аналог фукозы в концентрации от приблизительно 1 нг/мл до нескольких мг/мл среды культивирования. В некоторых вариантах осуществления среда культивирования может содержать аналог фукозы в концентрации приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 150 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 250 нг/мл, приблизительно 300 нг/мл, приблизительно 350 нг/мл, приблизительно 400 нг/мл, приблизительно 450 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл, приблизительно 550 нг/мл, приблизительно 600 нг/мл, приблизительно 650 нг/мл, приблизительно 700 нг/мл, приблизительно 750 нг/мл, приблизительно 800 нг/мл, о приблизительно 950 нг/мл, приблизительно 1 мкг/мл, приблизительно 10 мкг/мл, приблизительно 50 мкг/мл, приблизительно 100 мкг/мл, приблизительно 150 мкг/мл, приблизительно 200 мкг/мл, приблизительно 250 мкг/мл, приблизительно 300 мкг/мл, приблизительно 350 мкг/мл, приблизительно 400 мкг/мл, приблизительно 450 мкг/мл, приблизительно 500 мкг/мл, приблизительно 550 мкг/мл, приблизительно 600 мкг/мл, приблизительно 650 мкг/мл, приблизительно 700 мкг/мл, приблизительно 750 мкг/мл, приблизительно 800 мкг/мл, о приблизительно 950 мкг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл среды культивирования или больше, или соответствующей любому промежуточному значению из предыдущего. В некоторых других вариантах осуществления среда культивирования клеток может содержать аналог фукозы в конечной концентрации от приблизительно 1 нМ до нескольких мМ в среде культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления среда культивирования может содержать аналог фукозы в концентрации приблизительно 1 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 150 нМ, приблизительно 200 нМ, приблизительно 250 нМ, приблизительно 300 нМ, приблизительно 350 нМ, приблизительно 400 нМ, приблизительно 450 нМ, приблизительно 500 нМ, приблизительно 550 нМ, приблизительно 600 нМ, приблизительно 650 нМ, приблизительно 700 нМ, приблизительно 750 нМ, приблизительно 800 нМ, приблизительно 950 нМ, приблизительно 1 мкМ, приблизительно 10 мкМ, приблизительно 50 мкМ,

приблизительно 100 мкМ, приблизительно 150 мкМ, приблизительно 200 мкМ, приблизительно 250 мкМ, приблизительно 300 мкМ, приблизительно 350 мкМ, приблизительно 400 мкМ, приблизительно 450 мкМ, приблизительно 500 мкМ, приблизительно 550 мкМ, приблизительно 600 мкМ, приблизительно 650 мкМ, приблизительно 700 мкМ, приблизительно 750 мкМ, приблизительно 800 мкМ, приблизительно 950 мкМ, приблизительно 1 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ, приблизительно 5 мМ или больше, или соответствующей любому промежуточному значению из предыдущего, в ее конечной концентрации в среде культивирования клеток.

[0113] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, включают активацию Т-клеток одним или более средствами, активирующими Т-клетки, с получением популяции активированных Т-клеток. Для получения популяции активированных Т-клеток может использоваться любая комбинация одного или более подходящих средств, активирующих Т-клетки, включающая, без ограничения, антитело или его функциональный фрагмент, который направленно взаимодействует с молекулой, стимулирующей или костимулирующей Т-клетки (например, антителом против CD2, антителом против CD3, антителом против CD28 или их функциональными фрагментами в концентрации от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 100 нг/мл), Т-клеточным цитокином (например, любым выделенным цитокином, цитокином дикого типа или рекомбинантным цитокином, таким как: интерлейкин 1 (IL-1), интерлейкин 2, (IL-2), интерлейкин 4 (IL-4), интерлейкин 5 (IL-5), интерлейкин 7 (IL-7), интерлейкин 15 (IL-15), фактор некроза опухоли α (ФНО α) в концентрации от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 100 нг/мл) или любым другим подходящим митогеном (например, тетрадеcanoилфорболацетат (ТРА), фитогемагглютинин (РНА), конканавалин А (conA), липополисахарид (LPS), митоген фитолаки (PWM) в любой требуемой концентрации) или природным лигандом молекулы, стимулирующей или костимулирующей Т-клетки, в любой требуемой концентрации. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело против CD3 (или его функциональный фрагмент), антитело против CD28 (или его функциональный фрагмент) или комбинация антител против CD3 и против CD28 могут использоваться в соответствии с этапом стимуляции популяции Т-лимфоцитов.

[0114] В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в течение или в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 дня или больше до завершения культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки могут субкультивировать один или более раз, т.е. по меньшей мере некоторые культивируемые клетки переносят из предыдущей среды культивирования в новую среду культивирования до завершения культивирования. В некотором другом варианте осуществления клетки могут культивировать один раз до завершения культивирования. Любые средства, добавляемые в среду культивирования, можно добавлять к клеткам один или более раз в течение всего периода культивирования.

[0115] В некоторых вариантах осуществления концентрация культивируемых Т-клеток, применяемая в способах, может составлять приблизительно $1,0-10,0 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация культивируемых Т-клеток может составлять приблизительно $1,0-2,0 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-3,0 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-4,0 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-5,0 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-6,0 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-7,0 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-8,0 \times 10^6$ клеток/мл, $1,0-9,0 \times 10^6$ клеток/мл или приблизительно $1,0-10,0 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация культивируемых Т-клеток может составлять приблизительно $1,0-2,0 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация культивируемых Т-клеток может составлять приблизительно $1,0-1,2 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-1,4 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-1,6 \times 10^6$ клеток/мл, приблизительно $1,0-1,8 \times 10^6$ клеток/мл или приблизительно $1,0-2,0 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация лимфоцитов может составлять по меньшей мере приблизительно $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,1 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,2 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,3 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,4 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,6 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,7 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,8 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $1,9 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $6,0 \times 10^6$ клеток/мл, по меньшей мере приблизительно $8,0 \times 10^6$ клеток/мл или по меньшей мере приблизительно $10,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[0116] Т-клетки, культивируемые способами, описанными выше, могут иметь сниженное поверхностное фукозилирование. В некоторых аспектах сниженное поверхностное фукозилирование может относиться к снижению или ингибированию уровня фукозилирования, который присутствует в естественном состоянии на поверхности нормальных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления снижение поверхностного фукозилирования на Т-клетках не включает замену естественной присутствующей фукозы на поверхности Т-клетки аналогом фукозы, который искусственно введен в Т-клетки.

[0117] Т-клетки, культивируемые способами, описанными выше, могут иметь сниженное поверхностное фукозилирование. В некоторых вариантах осуществления среднее поверхностное фукозилирование на Т-клетках, культивируемых и полученных предложенными способами, может включать по меньшей мере приблизительно 5% снижение по сравнению со средним поверхностным фукозилированием Т-клеток, культивируемых в отсутствие аналога фукозы, т.е. контрольными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления среднее поверхностное фукозилирование на Т-клетках, культивируемых и полученных предложенными способами, может включать по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%,

приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 99%, приблизительно 100% снижение по сравнению со средним поверхностным фукозилированием контрольных Т-клеток, которые культивировали в отсутствие аналога фукозы. Уровень поверхностного фукозилирования на Т-клетках может быть определен с помощью методик, доступных в уровне техники, например, проточной цитометрии.

[0118] В некоторых вариантах осуществления этап культивирования может быть завершен, при этом можно приступить к этапу сбора культивируемых клеток, по меньшей мере, некоторых культивируемых клеток. Этап культивирования может быть завершен, когда количество культивируемых клеток достигает требуемого значения, когда запланированный период культивирования истекает, и/или если среднее поверхностное фукозилирование на культивируемых Т-клетках достигает нужного уровня (например, по меньшей мере 5% снижения или больше по сравнению со средним поверхностным фукозилированием контрольных Т-клеток).

[0119] После завершения этапа культивирования, клетки могут быть собраны методиками, доступными в уровне техники. Этап сбора может включать одну или более стадий, таких как центрифугирование, промывка, удаление нежелательных клеток или компонентов и выделение клеток нужного типа, как описано в другой части этого документа.

[0120] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, полученная способами, описанными в настоящем документе, которые включают Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, может быть необязательно подвергнута криоконсервации, чтобы клетки можно было использовать позднее, например, для введения при адоптивной клеточной терапии или лечении рака, или для производства фармацевтической композиции для терапии или лечения. Такой способ может включать стадию промывки и концентрирования популяции требуемых Т-клеток, то есть Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование, раствором разбавителя. В некоторых вариантах осуществления раствор разбавителя может содержать физиологический раствор, 0,9% физиологический раствор, PlasmaLyte A, раствор 5% декстрозы/0,45% NaCl, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления HSA можно добавлять к промытым и концентрированным клеткам для улучшения жизнеспособности клеток и восстановления клеток после размораживания. В другом варианте осуществления промывочный раствор может быть номальным физиологическим раствором, и к промытым и концентрированным клеткам могут добавлять HSA (5%). В некоторых вариантах осуществления может быть приготовлена смесь для криоконсервации. Смесь для криоконсервации может включать популяцию клеток, разведенную в растворе

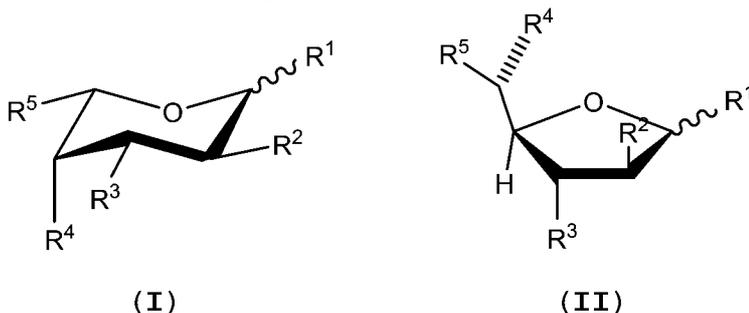
разбавителя, и подходящий раствор криоконсерванта. В некоторых аспектах раствор криоконсерванта может быть любым подходящим раствором криоконсерванта, доступным в уровне техники, смешанным с раствором разбавителя полученных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ также включает этап замораживания смеси для криоконсервации. В одном аспекте смесь для криоконсервации замораживают в морозильной камере с регулируемой скоростью при использовании определенного цикла замораживания при любой требуемой концентрации клеток, например, от приблизительно 10^6 до 10^8 на мл смеси для криоконсервации. Способ также может включать этап хранения криоконсервационной смеси в паровой фазе жидкого азота.

[0121] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, могут применяться в адоптивной клеточной терапии или лечении рака. Например, полученные Т-клетки могут вводить субъекту, нуждающемуся в терапии или лечении. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, могут применяться для изготовления фармацевтической композиции, которая может применяться в адоптивной клеточной терапии или лечении рака.

II-2. Способы получения *in vivo*

[0122] В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы *in vivo* получения Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование. Способы могут включать предоставление аналога фукозы животному и получение Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование, у животного. Т-клетки, полученные этими способами, могут иметь сниженное поверхностное фукозилирование по сравнению с Т-клетками, присутствующими в организме, или полученными от животного, которому не был предоставлен аналог фукозы. Такие Т-клетки, полученные способами, раскрытыми в настоящем документе, могут применяться в терапевтических целях, таких как адоптивная клеточная терапия или лечение рака. Таким образом, по меньшей мере, в некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, именуется "терапевтическими Т-клетками".

[0123] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы, применяемый в способах, может иметь формулу (I) или (II):



или представляет собой соответствующую фармацевтически приемлемую соль или

сольватированную форму, где каждая формула (I) или (II) может быть альфа или бета-аномером или соответствующей альдозной формой;

где R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – CH_3 ,

или

где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является алкинилом.

[0124] В некоторых вариантах осуществления R^2 является –F.

[0125] В некоторых вариантах осуществления R^5 является – $C\equiv CH$.

[0126] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы, применяемый в способах, имеет формулу (I) или (II), где R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – CH_3 , или где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – $C\equiv CH$.

[0127] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы, применяемый в способах, имеет формулу (I) или (II), где R^2 является –F; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – CH_3 , или где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – $C\equiv CH$.

[0128] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – CH_3 . В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II) R^2 является –F; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – CH_3 .

[0129] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II) каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбран из –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группы; и R^5 является – $C\equiv CH$.

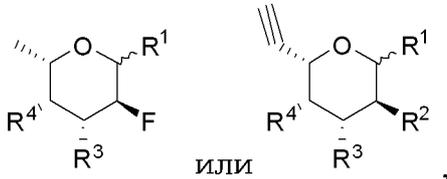
[0130] В некоторых вариантах осуществления гидролизуемая сложноэфирная группа является – $OC(O)C_1-C_{10}$ алкилом. В некоторых выбранных вариантах осуществления гидролизуемая сложноэфирная группа является – $OC(O)CH_3$.

[0131] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^2 является –F, каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из –ОН и – $OC(O)C_1-C_{10}$ алкила. В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^2 является –F, каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из –ОН и – $OC(O)CH_3$. В одном определенном варианте осуществления формулы (I) или (II), R^2 является –F, и каждый из R^1 , R^3 и R^4 является –ОН.

[0132] В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^5 является – $C\equiv CH$, каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из –ОН и – $OC(O)C_1-C_{10}$ алкила. В некоторых выбранных вариантах осуществления формулы (I) или (II), где R^5 является – $C\equiv CH$, каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбран из

группы, состоящей из $-\text{OH}$ и $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. В одном определенном варианте осуществления формулы (I) или (II) R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$, и каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является $-\text{OH}$. В другом определенном варианте осуществления формулы (I) или (II) R^5 является $-\text{C}\equiv\text{CH}$, и каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является $-\text{OAc}$.

[0133] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналог фукозы, применяемый в способах, имеет формулу:



или представляет собой соответствующую альдозную форму, где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 является таким, как определено и описано в настоящем документе.

[0134] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналогом фукозы является 2-дезоксидезокси-2-фтор-L-фукоза.

[0135] В некоторых выбранных вариантах осуществления аналог фукозы является перацетатом алкинилфукозы. Перацетат алкинилфукозы может быть тетраацетатом алкинилфукозы, триацетатом алкинилфукозы, диацетатом алкинилфукозы, моноацетатом алкинилфукозы или их комбинациями. В одном примере осуществления аналогом фукозы является (3S,4R,5R,6S)-6-этинилтетрагидро-2H-пиран-2,3,4,5-тетраил-тетраацетат или 5-(S)-1-гидроксипроп-2-ин-1-ил)тетрагидрофуран-2,3,4-триил-триацетат.

[0136] В любом из различных вариантов осуществления внутрикольцевой атом кислорода в аналоге фукозы формулы (I) и (II) может быть заменен серой.

[0137] Способы, предложенные в настоящем документе, могут включать этап предоставления аналога фукозы животному. Предоставление аналога фукозы животному может быть осуществлено различными способами введения. Аналог фукозы в некоторых вариантах осуществления можно вводить животному с применением стандартных методов введения, включая пероральное, внутривенное, внутривентральное, подкожное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, подъязычное или суппозиторное введение. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток вводят парентерально. Термин "парентеральный" при использовании в настоящем документе включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутривентральное введение. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток вводят субъекту с применением периферической системной доставки путем внутривенной, внутривентральной или подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы может быть введен животному перорально.

[0138] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, дают T-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, которые могут применяться в адоптивной клеточной терапии или лечении рака у субъекта, нуждающегося в такой терапии или лечении.

[0139] В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия, например,

адоптивная клеточная терапия или лечение рака, с применением Т-клеток может быть проведена путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом подготавливают при выделении у субъекта, который должен получить клеточную терапию или лечение, или из образца, полученного у такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах аналог фукозы может быть предоставлен или введен субъекту, например, пациенту, нуждающемуся в лечении, и полученные в результате Т-клетки со сниженным поверхностным фукозилированием после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

[0140] В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия, например, адоптивная клеточная терапия или лечение рака, с применением Т-клеток может быть проведена путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом подготавливают при выделении у субъекта, который не является субъектом, который должен получать или который, в конечном счете, получает клеточную терапию или лечение, например, у первого субъекта. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например, второму субъекту, носящему к тому же виду. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически подобны. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически отличаются. В некотором варианте осуществления первый и второй субъекты не относятся к одному виду, например, первый субъект является человеком, а второй субъект является не относящимся к человеку животным. Т-клетки, полученные у второго субъекта, могут быть выделены и обработаны для терапии или лечения первого субъекта.

[0141] Эффективное количество аналога фукозы может быть предоставлено животному. Эффективное количество может относиться к количеству аналога фукозы, которое является достаточным, чтобы обеспечить нужный результат, т.е. получение Т-клеток со сниженным поверхностным фукозилированием. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество аналога фукозы может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг аналога фукозы/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления, где аналог фукозы предоставляют или вводят перорально, например, при кормлении кормом или с водой, доза аналога фукозы при пероральном введении, вводимая животному, может составлять от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 1 г/кг массы тела животного, более типично от приблизительно 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг или 50 мг/кг до приблизительно 1 г/кг массы тела животного. В некоторых аспектах доза, вводимая животному, составляет от приблизительно 1 г, приблизительно 5 г или приблизительно 10 г до приблизительно 150 г в день, или от приблизительно 1 г, приблизительно 5 г, приблизительно 10 г, приблизительно 15 г или приблизительно 20 г до приблизительно 60 г в день. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы можно предоставить с кормом или водой в любом требуемом количестве, которое является подходящим для того, чтобы вызвать снижение поверхностного фукозилирования у животного, получающего аналог фукозы с

кормом.

[0142] Аналог фукозы, применяемый в способах, описанных в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления можно вводить животному совместно с одним или более дополнительными фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем, одновременно или последовательно в любом порядке.

[0143] В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы или его композицию могут вводить в течение некоторого периода, например, от одного до нескольких дней, от одной до нескольких недель, от одного до нескольких месяцев или дольше, с перерывом или без. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы или его композицию могут вводить по схеме введения раз в день, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц.

[0144] В некоторых вариантах осуществления предоставление или введение аналога фукозы животному может быть закончено при достижении требуемого результата, например, среднее поверхностное фукозилирование Т-клеток, полученных у животного, снижено на любое процентное значение, например, от приблизительно 5% до приблизительно 95% по сравнению с контрольными Т-клетками.

[0145] Способы, предложенные в настоящем документе, могут включать этап получения смеси клетки, например, Т-клеток, полученных у животного, получавшего аналог фукозы. Полученные клетки могут включать Т-клетки со сниженным поверхностным фукозилированием.

[0146] Т-клетки, культивируемые способами, описанными выше, могут иметь сниженное поверхностное фукозилирование. В некоторых аспектах сниженное поверхностное фукозилирование может относиться к снижению или ингибированию уровня фукозилирования, который в естественном состоянии присутствует на поверхности нормальных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления снижение поверхностного фукозилирования на Т-клетках не включает замену естественной присутствующей фукозы на поверхности Т-клетки аналогом фукозы, который искусственно введен в Т-клетки.

[0147] Т-клетки, полученные способами, описанными выше, могут иметь сниженное поверхностное фукозилирование. В некоторых вариантах осуществления среднее поверхностное фукозилирование на Т-клетках, полученных у животного, получавшего аналог фукозы, может включать по меньшей мере приблизительно 5% снижение по сравнению со средним поверхностным фукозилированием Т-клеток, присутствующих или полученных у животного, не получавшего аналог фукозы, т.е. контрольных Т-клеток. В некоторых других вариантах осуществления среднее поверхностное фукозилирование на Т-клетках, полученных у животного, получавшего аналог фукозы, может включать по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно

95%, приблизительно 97%, приблизительно 99%, приблизительно 100% снижение по сравнению со средним поверхностным фукозилированием контрольных Т-клеток, которые присутствуют или получены у животного, не получавшего аналог фукозы в течение по меньшей мере за несколько часов, несколько дней, несколько недель, несколько месяцев или больше до исследования или получения контрольных Т-клеток. Уровень поверхностного фукозилирования на Т-клетках может быть определен с помощью методов, доступных в уровне техники, например, проточной цитометрии.

[0148] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки и популяции клеток могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, полученный или происходящий от животного, получавшего аналог фукозы. Образцы могут включать ткань, жидкость и другие образцы, забранные непосредственно у животного. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, который обработан. Биологические образцы включают, без ограничения, физиологические жидкости, такие как кровь, плазму, сыворотку, образцы тканей и органов, таких как селезенка, включая обработанные образцы, полученные из них. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты, костный мозг, тимус, образцы биопсии ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, лимфоидную ткань кишечника, лимфоидную ткань слизистой оболочки, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалину или другой орган и/или клетки, полученные из них.

[0149] В некоторых вариантах осуществления, после получения Т-клеток и популяции клеток у животного, может присутствовать один или более стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, промывка, инкубирование и/или культивирование полученных клеток. В некоторых вариантах осуществления полученная популяция клеток, содержащая Т-клетки, может быть обработана для выделения или обогащения Т-клеток и удаления (или уменьшения количества) других типов клеток (например, эритроцитов) и/или компонентов (например, тромбоцитов). В некоторых вариантах осуществления полученную популяцию клеток или дополнительно обогащенные Т-клетки могут культивировать в среде культивирования клеток при использовании методик, доступных в уровне техники, для поддержания клеток и/или увеличения количества клеток, достаточного для последующего применения, например, адоптивной клеточной терапии или лечения рака, или для изготовления фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, полученные у животного или дополнительно культивируемые после выделения у животного, могут хранить для последующего применения, например, при использовании методов криоконсервации, доступных в уровне техники или описанных в другой части настоящего документа.

[0150] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, имеющие сниженное

поверхностное фукозилирование, которые получены способами получения *in vivo*, описанными в этом документе, могут применяться в адоптивной клеточной терапии или лечении рака. В некоторых вариантах осуществления полученные Т-клетки, полученные у животного или дополнительно культивируемые после выделения у животного, могут быть введены субъекту, нуждающемуся в такой терапии или лечении. В некоторых вариантах осуществления полученные Т-клетки, полученные у животного или дополнительно культивируемые после выделения у животного, могут применяться для изготовления фармацевтической композиции, которая может применяться в адоптивной клеточной терапии или лечении рака. В некоторых вариантах осуществления животное является человеком.

[0151] Способы получения, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать стадию модификации популяции Т-клеток. Например, популяция Т-клеток может быть трансдуцирована вирусным вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует рецептор клеточной поверхности, с получением популяции трансдуцированных Т-клеток. Несколько рекомбинантных вирусов использовались в качестве вирусных векторов для доставки генетического материала в клетку. Вирусные векторы, которые можно использовать в соответствии со стадией трансдукции, могут быть любым экотропным или амфотропным вирусным вектором, включающим, без ограничения перечисленным, рекомбинантные ретровирусные векторы, рекомбинантные лентивирусные векторы, рекомбинантные аденовирусные векторы и рекомбинантные векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Любые подходящие среды и/или добавки для выращивания вирусных векторов могут использоваться в инокуляте вирусного вектора в соответствии со способами, известными в данной области. В одном варианте осуществления вирусный вектор содержит гетерологичный ген, кодирующий рецептор клеточной поверхности. В одном конкретном варианте осуществления рецептор клеточной поверхности способен связывать антиген на поверхности клетки-мишени, например, на поверхности опухолевой клетки.

IV. Фармацевтические композиции для адоптивной клеточной терапии или лечения рака

[0152] Популяции клеток или Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, которые получены вышеописанными способами получения, могут быть включены в композицию для применения в адоптивной клеточной терапии или лечении рака. Требуемые Т-клетки (или терапевтические Т-клетки), т.е. Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, или смесь клеток, содержащая такие Т-клетки, могут быть включены в фармацевтические композиции, включающие терапевтически или профилактически эффективное количество требуемых Т-клеток и один или более фармацевтически совместимых (приемлемых) компонентов. В некоторых аспектах могут быть предложены фармацевтические композиции терапевтических Т-клеток и фармацевтических вспомогательных веществ, в которых эффективное

количество Т–клеток находится в смеси со вспомогательными веществами, подходящими для введения субъекту. В предпочтительных аспектах терапевтические Т–клетки и их фармацевтическая композиция изготовлены в форме для введения человеку. Таким образом, в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, включающая Т–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, изготовленная в форме для введения человеку. Готовая композиция обычно может включать одно или более фармацевтически совместимых (приемлемых) вспомогательных веществ или носителей.

[0153] Материалы, используемые при изготовлении фармацевтических композиций, могут быть нетоксичными в применяемых количествах. Средним специалистам в данной области будет очевидно, что оптимальная доза действующего вещества (веществ) в фармацевтической композиции будет зависеть от множества факторов. Соответствующие факторы включают, без ограничения, тип животного (например, человек), способ введения, применяемую композицию и тяжесть заболевания или состояния, подвергаемого лечению.

[0154] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть в форме жидкости, например, настойки, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. В некоторых вариантах осуществления жидкость может подходить для доставки путем инъекции. В композиции для введения путем инъекции (как описано выше) также может быть включено одно или более из поверхностно–активного вещества, консерванта, смачивающего вещества, диспергирующего вещества, суспендирующего вещества, буфера, стабилизатора и изотонического вещества.

[0155] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть в любой форме, которая позволяет вводить композицию животному (например, человеку). Типичные пути введения включают, без ограничения перечисленными, пероральный, парентеральный и подкожный. Парентеральное введение включает подкожные инъекции, внутрибрюшинные инъекции, внутривенную, внутримышечную, внутригрудинную инъекцию или методы инфузии. Эти фармацевтические композиции могут быть изготовлены в форме, позволяющей Т–клеткам со сниженным поверхностным фукозилированием быть эффективными при введении композиции субъекту, нуждающемуся в терапии или лечении.

V. Терапевтические способы

[0156] В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы проведения адоптивной клеточной терапии у субъекта. Способы могут включать введение Т–клеток со сниженным поверхностным фукозилированием субъекту, нуждающемуся в клеточной терапии.

[0157] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают адоптивную клеточную терапию у субъекта. Проведение адоптивной клеточной терапии у субъекта может включать этап введения субъекту смеси клеток, которая включает Т–клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование (т.е. терапевтические Т–клетки). В некоторых вариантах осуществления

субъект может нуждаться в такой терапии. В некоторых вариантах осуществления проведение адоптивной клеточной терапии у субъекта также может включать этап получения терапевтических Т-клеток для терапии согласно любому из способов *in vitro* и *in vivo*, описанных в другой части настоящего документа.

[0158] В некоторых вариантах осуществления адоптивная клеточная терапия может быть выбрана из группы, состоящей из иммунотерапии инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), терапии аутологичными клетками, терапии генно-инженерно модифицированными аутологичными клетками (eACTTM), трансплантации аллогенных Т-клеток, не-Т-клеточной трансплантации и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления адоптивная клеточная терапия может в широком смысле включать любой способ отбора, обогащения *in vitro* и введения пациенту аутологичных или аллогенных Т-клеток, которые распознают и способны связывать опухолевые клетки. Иммунотерапия TIL является типом адоптивной Т-клеточной терапии, при которой лимфоциты, способные проникать в опухолевую ткань, выделяют, обогащают *in vitro* и вводят пациенту. Клетки TIL могут быть либо аутологичными, либо аллогенными. Аутологичная клеточная терапия – это адоптивная Т-клеточная терапия, которая включает выделение у пациента Т-клеток, способных направленно воздействовать на опухолевые клетки, обогащение Т-клеток *in vitro* и введение Т-клеток обратно тому же пациенту. Аллогенная трансплантация Т-клеток может включать трансплантацию природных Т-клеток, размноженных *ex vivo*, или генно-инженерно модифицированных Т-клеток. Терапия генно-инженерно модифицированными аутологичными клетками является адоптивной Т-клеточной терапией, в которой собственные лимфоциты пациента выделяют, генетически модифицируют для экспрессии молекулы, направленно взаимодействующей с опухолью, размножают *in vitro* и вводят обратно пациенту. Не-Т-клеточная трансплантация может включать аутологичную или аллогенную терапию с использованием клеток, не являющихся Т-клетками, таких как, без ограничения, естественные киллерные (NK) клетки.

[0159] В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы лечения рака. Такие способы могут включать введение Т-клеток со сниженным поверхностным фукозилированием субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления способы также могут включать этап получения терапевтических Т-клеток для лечения согласно любому из способов *in vitro* и *in vivo*, описанных в другой части настоящего документа.

[0160] В некоторых аспектах Т-клетки, применяемые в адоптивной клеточной терапии или лечении рака согласно способам, раскрытым в настоящем документе, являются терапевтическими Т-клетками, которые имеют сниженное поверхностное фукозилирование по сравнению с контрольными Т-клетками. В некоторых аспектах сниженное поверхностное фукозилирование может относиться к снижению или ингибированию уровня фукозилирования, которое в естественном состоянии присутствует на поверхности нормальных Т-клеток. В некоторых вариантах

осуществления сниженное поверхностное фукозилирование на Т–клетках не включает замену естественно присутствующей фукозы на поверхности Т–клетки аналогом фукозы, который искусственно введен в Т–клетки.

[0161] Как описано ранее, в некоторых вариантах осуществления Т–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, применяемые в адоптивной клеточной терапии или лечении рака, могут происходить от того же субъекта, который будет получать терапию или лечение, т.е. аутологичную терапию или лечение, или от субъекта, который отличается от субъекта, который будет получать терапию или лечение, т.е. аллогенную терапию или лечение.

[0162] В некоторых аспектах Т–клетки, применяемые в адоптивной клеточной терапии или лечении рака в соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе, являются терапевтическими Т–клетками, которые имеют сниженное поверхностное фукозилирование по сравнению с контрольными Т–клетками. В некоторых вариантах осуществления, в частности, когда аутологичная терапия или лечение назначены пациенту–человеку, Т–клетки, полученные от одного и того же пациента, могут быть обработаны в соответствии со способами *in vitro* или *in vivo*, раскрытыми в настоящем документе, с получением терапевтических Т–клеток. В таких вариантах осуществления контрольные Т–клетки могут относиться к: (1) популяции Т–клеток, присутствующей или полученной от нормального, здорового человека, или (2) популяции Т–клеток, которые присутствовали или были получены от того же пациента до получения терапевтических Т–клеток. В некоторых других вариантах осуществления, в частности, когда аллогенная терапия или лечение назначены пациенту–человеку, Т–клетки, полученные от донора, который не является пациентом, могут быть обработаны в соответствии со способами *in vitro* или *in vivo*, раскрытыми в настоящем документе, с получением терапевтических Т–клеток. В таких вариантах осуществления контрольные Т–клетки могут относиться к популяции Т–клеток, которые присутствовали или были получены от донора до получения терапевтических Т–клеток. В некоторых других вариантах осуществления, когда аллогенная терапия или лечение назначены пациенту–человеку, а терапевтические Т–клетки, используемые в терапии или лечении, происходят от животного, не относящегося к человеку (т.е. животного–донора), контрольные Т–клетки могут относиться к: (1) популяции Т–клеток, присутствующей или полученной от нормального, здорового животного, не относящегося к человеку, или (2) популяции Т–клеток, которые присутствовали или были получены от животного–донора до получения терапевтических Т–клеток.

[0163] В некоторых вариантах осуществления среднее поверхностное фукозилирование на терапевтических Т–клетках, применяемых в адоптивной клеточной терапии или лечении рака согласно способам, раскрытым в настоящем документе, может включать по меньшей мере приблизительно 5% снижение по сравнению со средним поверхностным фукозилированием контрольных Т–клеток. В некоторых других вариантах осуществления среднее поверхностное фукозилирование на Т–клетках, полученных от

животного, получавшего аналог фукозы, может включать по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 99%, приблизительно 100% снижение по сравнению со средним поверхностным фукозилацией контрольных Т-клеток. Уровень поверхностного фукозилации на Т-клетках может быть определен с помощью методов, доступных в уровне техники, например, проточной цитометрии.

[0164] В некоторых аспектах способы, раскрытые в настоящем документе для обеспечения адоптивной клеточной терапии или лечения рака, предназначены для лечения любых заболеваний, состояний и нарушений, включающих, без ограничения перечисленными, рак молочной железы, рак пищевода, колоректальный, поджелудочной железы, желудка, стромальные опухоли ЖКТ, гепатоцеллюлярный, печени, легкого, мелкоклеточный легкого, яичника, матки, шейки матки, мочевого пузыря, почки, толстой кишки, тонкой кишки, рак желудка, лимфому, предстательной железы, яичка, карциному щитовидной железы, злокачественную меланому, увеальную меланому, множественную миелому, мезотелиому, остеогенную саркому, хондросаркому, миосаркому, глиобластому, саркому, глиому или другие опухоли головного мозга, головы/шеи, другие желудочно-кишечные опухоли и эмбрионально-клеточные опухоли, гемобластозы, лейкоз, лимфому, например, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), ОЛЛ, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, рефрактерную фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, индолентную В-клеточную лимфому, В-клеточные неоплазии, раковые опухоли кожи (включая меланому), раковые опухоли кости, эпителиальные раковые опухоли, почечно-клеточную карциному, аденокарциному поджелудочной железы, лимфому Ходжкина, глиобластому, нейробластому, саркому Юинга, медуллобластому, синовиальную саркому и/или мезотелиому.

[0165] В некоторых аспектах способы, раскрытые в настоящем документе для обеспечения адоптивной клеточной терапии или лечения рака, включают этап введения субъекту Т-клеток со сниженным поверхностным фукозилацией, то есть терапевтических Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтические Т-клетки могут быть изготовлены, необязательно с одним или более фармацевтически приемлемыми ингредиентами, в форме фармацевтических композиций, как описано в настоящем документе, для введения животному (например, человеку). В некоторых аспектах терапевтические Т-клетки или их фармацевтические композиции можно вводить, без ограничения, перорально, парентерально и подъязычно. Парентеральное введение включает подкожные инъекции, внутривенные инъекции, внутримышечные, внутригрудные инъекции или инфузии. Такие фармацевтические композиции могут быть изготовлены в такой форме, которая позволяет Т-клеткам со

сниженным поверхностным фукозилированием быть эффективными при введении композиции животному.

[0166] В некоторых вариантах осуществления терапевтические Т-клетки или фармацевтические композиции, содержащие терапевтические Т-клетки, можно вводить (например, путем инъекции) в участок локализации или вблизи от раковых клеток, то есть местное введение. Например, если рак обнаружен в органе (например, в печени), фармацевтические композиции можно вводить путем инъекции в участки, в которых раковые клетки находятся в печени или в непосредственной близости от раковых клеток (например, от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров от границы локализации раковых клеток). В альтернативных вариантах осуществления терапевтические Т-клетки или фармацевтические композиции можно вводить (например, путем инъекции) в кровеносную систему пациента (например, в кровеносные сосуды), то есть вводить системно таким образом, чтобы терапевтические Т-клетки могли достигать целевого участка(ов), в котором присутствуют патологические клетки, через кровеносную систему пациента. В некоторых вариантах осуществления терапевтические Т-клетки могут дополнительно содержать компонент, который специфично связывает антиген клеточной поверхности клетки или заболевания, на которое нужно воздействовать, например, опухолевую клетку или раковую клетку. Таким образом, терапевтические Т-клетки могут достигать и оказывать терапевтическое действие в отношении клеток-мишеней со специфичностью после доставки через кровеносную систему.

[0167] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, т.е. терапевтические Т-клетки, или их фармацевтические композиции, могут вводить в количестве, которое является эффективным для получения требуемого результата или эффекта, например, лечения заболевания или состояния, таком как фармацевтически эффективное количество. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, способы введения включают введение терапевтических Т-клеток или их фармацевтических композиций в эффективных количествах субъекту, нуждающемуся в адоптивной клеточной терапии или лечении рака. Терапевтическую эффективность в некоторых вариантах осуществления можно контролировать путем периодического обследования субъектов, проходящих лечение. При повторных введениях за несколько дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют, пока не будет наблюдаться требуемая супрессия симптомов заболевания. В некоторых вариантах осуществления могут быть подходящими и могут быть определены другие схемы применения. Нужная доза может быть доставлена при однократном введении терапевтических Т-клеток или их фармацевтических композиций, при многократном введении или при непрерывном введении.

[0168] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, то есть терапевтические Т-клетки, или их фармацевтические композиции можно вводить в количестве, которое является эффективным для достижения требуемого результата или эффекта, например, для лечения

заболевания или состояния, субъекту, нуждающемуся в такой терапии или лечении. Требуемый результат или эффект, который предполагается достичь путем введения терапевтических Т-клеток или их фармацевтических композиций в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, может включать одно или более из следующих результатов по сравнению с ситуацией до введения:

(i) уменьшение очагов (целевых и/или нецелевых очагов, измеренных с помощью компьютерной томографии или физикального обследования на предмет видимых повреждений, по меньшей мере приблизительно на 99%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 10% или по меньшей мере приблизительно на 5%, например, от приблизительно 30% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 50% до приблизительно 90%, от приблизительно 40% до приблизительно 90%, от приблизительно 35% до приблизительно 90%, от приблизительно 30% до приблизительно 90%, от приблизительно 25% до приблизительно 90%, от приблизительно 5% до приблизительно 85% или от приблизительно 10% до приблизительно 80% (фактическое изменение в % или среднее изменение в % по сравнению с ситуацией до введения терапевтических Т-клеток или их фармацевтических композиций);

(ii) исчезновение (то есть уменьшение) метастазов рака, измеренное с помощью биопсии, магнитно-резонансной томографии или других подходящих методов, по меньшей мере приблизительно на 99%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 10% или по меньшей мере приблизительно на 5%, например, от приблизительно 30% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 50% до приблизительно 90%, от приблизительно 40% до приблизительно 90%, от приблизительно 35% до приблизительно 90%, от приблизительно 30% до приблизительно 90%, от приблизительно 25% до приблизительно 90%, от приблизительно 5% до приблизительно 85% или от

приблизительно 10% до приблизительно 80% (фактическое изменение в % или среднее изменение в % по сравнению с ситуацией до введения терапевтической Т-клетки или ее фармацевтической композиции);

(iii) уменьшение опухолевой нагрузки (например, количества раковых клеток, размера опухоли или количества рака в организме) по меньшей мере приблизительно на 99%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 10% или, по меньшей мере приблизительно на 5%, например, от приблизительно 30% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 50% до приблизительно 90%, от приблизительно 40% до приблизительно 90%, от приблизительно 35% до приблизительно 90%, от приблизительно 30% до приблизительно 90%, от приблизительно 25% до приблизительно 90%, от приблизительно 5% до приблизительно 85% или от приблизительно 10% до приблизительно 80% (фактическое изменение в % или среднее изменение в % по сравнению с ситуацией до введения терапевтических Т-клеток или их фармацевтических композиций);

(iv) увеличение выживаемости без прогрессирования (ВБП) по меньшей мере приблизительно на 99%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 15% при по меньшей мере приблизительно на 10% или, по меньшей мере приблизительно на 5%, например, от приблизительно 30% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 50% до приблизительно 90%, от приблизительно 40% до приблизительно 90%, от приблизительно 35% до приблизительно 90%, от приблизительно 30% до приблизительно 90%, от приблизительно 25% до приблизительно 90%, от приблизительно 5% до приблизительно 85% или от приблизительно 10% до приблизительно 80% (фактическое изменение в % или среднее изменение в % по сравнению с ситуацией до введения терапевтических Т-клеток или их фармацевтических композиций); и/или

(v) увеличение общей выживаемости (ОВ) по меньшей мере приблизительно на

99%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 10% или по меньшей мере приблизительно на 5%, например, от приблизительно 30% до приблизительно 99%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от приблизительно 60% до приблизительно 90%, от приблизительно 50% до приблизительно 90%, от приблизительно 40% до приблизительно 90%, от приблизительно 35% до приблизительно 90%, от приблизительно 30% до приблизительно 90%, от приблизительно 25% до приблизительно 90%, от приблизительно 5% до приблизительно 85% или от приблизительно 10% до приблизительно 80% (фактическое изменение в % или среднее изменение в % по сравнению с ожидаемой общей выживаемостью).

[0169] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование (т.е. терапевтические Т-клетки) или их фармацевтические композиции, можно вводить в фармацевтически эффективном количестве, то есть в количестве, которое является эффективным для достижения требуемого результата или эффекта, например, для лечения заболевания или состояния. В некоторых аспектах фармацевтически эффективное количество может включать требуемую дозу или количество терапевтических Т-клеток и/или требуемое соотношение таких Т-клеток с другими типами клеток. Таким образом, доза клеток в некоторых вариантах осуществления основана на общем количестве клеток (или количестве на кг массы тела) и требуемом соотношении отдельных популяций или подтипов, таких как отношение $CD3^+$ к $не-CD3^+$. В некоторых вариантах осуществления доза клеток основана на требуемом общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток в отдельных популяциях или отдельных типах клеток, содержащихся в фармацевтических композициях. В некоторых вариантах осуществления доза основана на комбинации таких признаков, как требуемое общее количество клеток, требуемое соотношение и требуемое общее количество терапевтических Т-клеток в отдельных популяциях.

[0170] В некоторых вариантах осуществления требуемая доза или количество является требуемым количеством терапевтических Т-клеток или требуемым количеством терапевтических Т-клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, например, клеток/кг. В некоторых аспектах требуемая доза или количество соответствует или выше минимального количества терапевтических Т-клеток или минимального количества терапевтических Т-клеток на единицу массы тела.

[0171] В некоторых вариантах осуществления терапевтические Т-клетки могут вводить субъекту в диапазоне от приблизительно ста до приблизительно 100 миллиардов

клеток, таком как, например, от приблизительно нескольких сотен до приблизительно нескольких тысяч клеток, от приблизительно нескольких тысяч до приблизительно 1 миллиона клеток, от приблизительно 1 миллиона до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 1 сотня клеток, приблизительно 5 сотен клеток, приблизительно 1 тысяча клеток, приблизительно 5 тысяч клеток, приблизительно 1 миллион клеток, приблизительно 5 миллионов клеток, приблизительно 25 миллионов клеток, приблизительно 500 миллионов клеток, приблизительно 1 миллиард клеток, приблизительно 5 миллиардов клеток, приблизительно 20 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 40 миллиардов клеток или в диапазоне, определенном любыми двумя из предыдущих значений), таком как от приблизительно 10 миллионов до приблизительно 100 миллиардов клеток (например, приблизительно 20 миллионов клеток, приблизительно 30 миллионов клеток, приблизительно 40 миллионов клеток, приблизительно 60 миллионов клеток, приблизительно 70 миллионов клеток, приблизительно 80 миллионов клеток, приблизительно 90 миллионов клеток, приблизительно 10 миллиардов клеток, приблизительно 25 миллиардов клеток, приблизительно 50 миллиардов клеток, приблизительно 75 миллиардов клеток, приблизительно 90 миллиардов клеток или в диапазоне, определенном любыми двумя из предыдущих значений) и в некоторых случаях от приблизительно 100 миллионов клеток до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 120 миллионов клеток, приблизительно 250 миллионов клеток, приблизительно 350 миллионов клеток, приблизительно 450 миллионов клеток, приблизительно 650 миллионов клеток, приблизительно 800 миллионов клеток, приблизительно 900 миллионов клеток, приблизительно 3 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 45 миллиардов клеток) или любое промежуточное значение в указанных диапазонах. Предыдущие эффективные дозы или количества терапевтической Т-клетки могут быть указаны на отдельное назначение или на полную продолжительность терапии или лечения.

[0172] В некоторых вариантах осуществления доза или количество терапевтических Т-клеток могут находиться в диапазоне от или приблизительно от 10^4 и до или приблизительно до 10 клеток/килограмм (кг) массы тела, таком как от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, например, от или приблизительно от 1×10^5 клеток/кг, $1,5 \times 10^5$ клеток/кг, 2×10^5 клеток/кг или 1×10^6 клеток/кг массы тела. Например, в некоторых вариантах осуществления, терапевтические Т-клетки вводят в количестве, или в пределах некоторого диапазона ошибки, от или приблизительно от 10^4 до или приблизительно до 10^9 Т-клеток/килограмм (кг) массы тела, таком как от 10^5 до 10^6 Т-клеток/кг массы тела, например, в количестве, равном или приблизительно равном 1×10^5 Т-клеток/кг, $1,5 \times 10^5$ Т-клеток/кг, 2×10^5 Т-клеток/кг или 1×10^6 Т-клеток/кг массы тела. Предыдущие эффективные дозы или количества терапевтической Т-клетки могут быть указаны на отдельное введение или на полную продолжительность терапии или лечения.

[0173] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки со сниженным

поверхностным фукозилированием, т.е. терапевтические Т–клетки, или их фармацевтическую композицию могут вводить по схеме введения один раз в день, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц, в зависимости от требуемого эффекта. В некоторых аспектах терапевтические Т–клетки или их фармацевтические композиции могут вводить в течение от приблизительно 1 до 5, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 15 или большего количества курсов, где продолжительности каждого курса составляет месяц. Дозы в каждом курсе могут вводить ежедневно (включая один раз в день, два раза в день или больше двух раз в день), через день, два раза в неделю, раз в неделю, раз в две недели, один раз в три недели или раз в месяц. Курс может необязательно включать период восстановления. В альтернативе период восстановления может быть включен между циклами. В некоторых аспектах введение будут производить в течение всей продолжительности заболевания.

[0174] В некоторых аспектах способы, раскрытые в настоящем документе, могут дополнительно включать введение Т–клеток, имеющих поверхностное фукозилирование, т.е. терапевтических Т–клеток, или их фармацевтических композиций и дополнительного лекарственного средства или его фармацевтически приемлемых солей или сольватов. Терапевтические Т–клетки или их фармацевтические композиции и лекарственное средство могут действовать аддитивно или, более предпочтительно, синергически. В предпочтительном варианте осуществления терапевтические Т–клетки или их фармацевтические композиции могут вводить одновременно с введением одного или более лекарственных средств, которые могут быть частью той же композиции или присутствовать в другой композиции, отличной от той, которая включает терапевтические Т–клетки. В другом варианте осуществления терапевтические Т–клетки или их фармацевтические композиции могут вводить до или после введения лекарственного средства (средств).

[0175] В некоторых аспектах количество Т–клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование, т.е. терапевтических Т–клеток, или их фармацевтических композиций, которое является эффективным в способах, описанных в настоящем документе, будет зависеть от природы нарушения или состояния, и может быть определено с помощью стандартных клинических методов. Кроме того, анализы *in vitro* или *in vivo* необязательно могут использоваться для содействия в определении оптимальных диапазонов доз. Точная доза, которая будет использоваться в композициях, также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания или нарушения и должна быть определена согласно решению практикующего специалиста и обстоятельств каждого пациента.

VI. Наборы для терапевтического применения

[0176] В некоторых аспектах предложены наборы для применения в адоптивной клеточной терапии или лечении рака. Такие наборы могут включать фармацевтическую композицию, которая включает Т–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, т.е. терапевтические Т–клетки, и фармацевтически приемлемый

носитель.

[0177] В некоторых вариантах осуществления набор может включать инструкции по применению в любом из терапевтических способов, описанных в настоящем документе. Включенные в набор инструкции могут предоставить описание введения фармацевтических композиций субъекту для достижения предполагаемой активности, например, для лечения заболевания или состояния, такого как рак, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления инструкции, касающиеся применения фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, могут включать информацию по введению доз, схеме применения и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут быть единичными дозами, недозированными упаковками (например, многодозовыми пакетами) или субъективными дозами. Инструкции, поставляемые в наборах согласно изобретению, представляют собой, как правило, письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что фармацевтические композиции применяются для лечения, задержки возникновения и/или облегчения заболевания или нарушения у субъекта.

[0178] В некоторых вариантах осуществления наборы, предложенные в настоящем документе, находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, без ограничения перечисленными, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т.п. Также предусмотрены упаковки для применения в сочетании с определенным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения или инфузионное устройство. В некоторых вариантах осуществления набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может быть пакетом для внутривенного раствора или флаконом с пробкой, прокалываемой иглой для подкожной инъекции).

VII. Примеры

[0179] Следующие примеры иллюстрируют некоторые определенные варианты осуществления изобретения и не предназначены для ограничения объема изобретения.

[0180] В настоящем документе варианты осуществления далее проиллюстрированы следующими примерами и подробными методиками. Впрочем, примеры предназначены просто для иллюстрации вариантов осуществления и не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего изобретения. Содержание всех источников и опубликованных патентов и заявок на патент, цитируемых по всему тексту заявки, настоящим включено посредством отсылки.

[0181] Пример 1 – Исследование на мышинной лимфоме A20 с адаптивным переносом спленоцитов

[0182] Иммуноген, KLN-A20 Id Fab, был получен следующим образом. Специфичные к опухоли A20 переменные области тяжелой и легкой цепи Ig клонировали путем с помощью ПЦР амплификации и лигировали в вектор экспрессии мышинного IgG для продукции A20 Id в клетках НЕК293F17. Мышиное антитело к A20 Id очищали с использованием белка А. Концентрированное антитело (20 мМ КРО₄, 10 мМ ЭДТА, рН 7,0) обрабатывали четырьмя объемами иммобилизированной смолы с папаином

(с 20 мМ цистеина) при 37°C в течение ночи. Смолу удаляли и инкубировали супернатант со смолой с белком А в течение ночи (4°C) с последующей фильтрацией для удаления связанного со смолой Fc антитела. Содержащий Fab элюат собирали, диализировали и концентрировали в растворе PBS, pH 7,4. Конъюгирование Fab проводили при использовании полученного в аквакультуре KLH (mcKLH) и NHS-ПЭГ12-малеимида. mcKLH в растворе PBS, pH 8,0 (10 мг/мл), смешивали и инкубировали с NHS-ПЭГ12-малеимид (конечная концентрация 125 мМ, 37°C, 20 мин). Продукт mcKLHПЭГ12-малеимид подвергали замене буфера на колонке PD10 (раствор PBS, pH 7,4) и концентрировали до 5 мг/мл. A20 Id Fab (4 мг/мл) восстанавливали трис(2-карбокситил)фосфином (5 мМ) в содержащем 2 мМ ЭДТА буфере (30 мин, 37°C). Восстановитель удаляли при использовании колонки PD10 (раствор PBS, pH 7,4, 5 мМ ЭДТА) и восстановленный Fab концентрировали до 5 мг/мл, смешивали с KLH-ПЭГ12-малеимидом (молярное отношение Fab:KLH 3:1) и инкубировали при комнатной температуре (1 ч). Избыток малеимидного кросслинкера нейтрализовали N-ацетилцистеином и удаляли на колонке PD10 (раствор PBS, pH 7,4).

[0183] Мышей-доноров для адоптивного переноса спленоцитов получали, как описано ниже. Клетки A20 (ATCC) культивировали в RPMI 1640 с 10% FBS, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола и пенициллином (100 Ед/мл)/стрептомицином (100 мкг/мл) (PS). Мышам (BALB/c, Harlan) подкожно вводили конъюгат KLH-A20 Id Fab (50 мкг) с адьювантом TiterMax (1:1) в день 21 с бустерной инъекцией в день 7. Группа лечения 2FF получала питьевую воду, содержащую 20 мМ 2FF, начиная со дня 14, тогда как контрольная группа получала простую воду. Через одну неделю после второй вакцинации (день 0) все мыши получали облученные опухолевые клетки A20 (уровень 4 облучателя RS2000, 17 мин, $2,5 \times 10^6$ клеток на мышь, в/в). Лечение 2FF продолжали до дня 14. Спленоциты, полученные от каждой группы мышей-доноров (день 14), адоптивно переносили (однократно) интактным мышам (50×10^6 клеток/мышь). Одна группа получала клетки от мышей-доноров, которые получали 2FF, и одна группа мышей получала клетки от мышей-доноров, которым не вводили 2FF (n=7/группа). Затем обе группы заражали живыми клетками A20 на следующий день после переноса ($2,5 \times 10^6$ клеток). Контрольная группа не получала лечения. Спленоциты, перенесенные от мышей-доноров, которые не получали 2FF, обеспечивали более длительную выживаемость по сравнению с интактными животными (увеличение с 27 дней до 35-дневной медианной выживаемости), тогда как спленоциты, перенесенные от мышей-доноров, которые получали 2FF, обеспечивали еще большее увеличение средней выживаемости до 43 дней. Это указывает на то, что адоптивный перенос клеток от животных, получавших 2FF, может обеспечить повышенную противоопухолевую активность по сравнению с адоптивным переносом клеток от животных, которые не получали 2FF.

[0184] Пример 2 – Исследование на мышинной лимфоме A20 с адоптивным переносом CD3+ T-клеток

[0185] 20 мышам Balb/c имплантировали клетки A20 (0,2 мл 5×10^6 клеток

п/к/мышь), одна группа мышей, состоявшая из 10 животных, получала 2FF (20 мМ в питьевой воде) со дня 0 до завершения исследования. Опухолям лимфомы А20 позволяли вырасти и через 20 дней мышей умерщвляли. Как показано ранее, у мышей, получавших 20 мМ 2FF, наблюдали значительную задержку прогрессирования опухоли по сравнению с животными в контрольной группе (Фиг. 2).

Сниженное поверхностное фукозилирование на CD3⁺ Т-клетках после лечения 2FF

[0186] Мышей из контрольной и получавшей 2FF группы умерщвляли и забирали селезенку для обогащения CD3⁺ Т-клеток. В кратце, селезенки собирали в RPMI, содержащей 2% FBS, суспензию клеток пропускали через нейлоновый клеточный фильтр с ячейками 70 мкм и промывали 2% RPMI. Клетки суспендировали в 10 мл буфера для лизиса АСК и инкубировали в течение 5 мин в этом буфере для удаления эритроцитов. Клетки центрифугировали при 300×g в течение 5 минут и ресуспендировали в PBS, содержащем 2% FBS и 1 мМ ЭДТА. Т-клетки выделяли при использовании набора для выделения мышинных Т-клеток EasySep согласно рекомендациям производителя. Коротко, клетки ресуспендировали при плотности 10⁸ клеток/мл и добавляли 50 мкл/мл крысиной сыворотки. Затем клетки переносили в полистирольную пробирку на 5 мл и добавляли к образцу 50 мкл смеси для выделения с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 10 минут. Сферы RapidSpheres встряхивали на вортексе и добавляли 75 мкл/мл с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 2,5 минут. Объем образцов доводили до 2,5 мл и инкубировали с магнитом для выделения клоток в течение 2,5 минут. Магнит переворачивали, CD3⁺ Т-клетки собирали и два раза промывали в RPMI и ресуспендировали при плотности 21,2×10⁶ клеток/мл. Состояние фукозилирования клеток проверяли с помощью проточной цитометрии, при этом клетки, выделенные у получавших 2FF животных, показали значительное снижение поверхностного фукозилирования (Фиг. 3).

Противоопухолевая активность Т-клеток со сниженным поверхностным фукозилированием

[0187] Для оценки противоопухолевой активности очищенных Т-клеток, 4 группам мышей Balb/c имплантировали клетки А20 (0,2 мл 5×10⁶ клеток (п/к)/мышь). Одна группа не получала лечения, другие три группы получали лечение, когда клетки А20 достигали 100 мм³, и давали либо ежедневно 20 мМ 2FF в питьевой воде, в/б вводили 2×10⁶ Т-клеток, выделенных у контрольных мышей с опухолями, либо в/б вводили 2×10⁶ Т-клеток, выделенных у 2FF мышей с опухолями. Животных наблюдали на последующее прогрессирование опухоли. Животные, которые ежедневно получали 2FF в своей воде или CD3⁺ Т-клетки, выделенные у животных опухоленосителей, получавших 2FF, демонстрировали значительное замедление роста опухоли, а в некоторых случаях – регрессию опухоли, по сравнению с контрольными животными, не получавшими лечения, или животными, получавшими Т-клетки от контрольных мышей опухоленосителей.

[0188] Эти данные указывают, что противоопухолевая активность 2FF в модели на

лимфоме A20 опосредована не только Т-клеточными ответами, но и то, что Т-клетки от мышей опухоленосителей, получавших 2FF, неожиданно оказались достаточными для стимуляции противоопухолевого ответа, причем этот ответ находится на одном уровне с системным лечением 2FF. Эти данные раскрывают возможность применения 2FF для усиления активности Т-клеток в терапевтических ситуациях, когда аутологичные Т-клетки от онкологических пациентов размножают *ex vivo* и повторно вводят пациентам или трансформируют TCR к специфическим опухолевым антигенам или конструкциями CAR.

[0189] Пример 3 – Размножение *ex vivo* человеческих периферических Т-клеток с 2FF для противоопухолевой эффективности *in vivo*

[0190] Т-клетки выделяли из 10 мл цельной крови, которую центрифугировали сначала при 1200 об/мин (300×g) в течение 10 мин (без торможения). Верхний слой, содержащий тромбоциты, осторожно собирали, не нарушая слой лейкоцитов. Затем смесь Человек RosetteSepTM Human T-Cell Enrichment Cocktail для обогащения Т-клеток (пан-Т-клетки, производства StemCell technologies) добавляли к оставшейся крови (500 мкл/10 мл крови). Смесь инкубировали в течение 20 мин, затем добавляли 1 мл FBS вместе с 10 мл PBS. Histopaque (20–25 мл) вносили в пробирку Falcon на 50 мл, после чего очень медленно наслаивали подготовленный раствор крови/PBS. Полученную смесь центрифугировали без торможения (25°C, 1500 об/мин, 25 мин). Верхний слой удаляли, затем Т-клетки в слое лейкоцитарной пленки собирали в новую пробирку на 50 мл. Т-клетки промывали PBS, ресуспендировали в 1 мл буфера для лизиса АКТ и доводили до объема 25 мл, инкубировали в течение 5 мин, доводили до 50 мл PBS, и затем центрифугировали. Этот этап лизиса эритроцитов повторяли еще раз.

[0191] Для культивирования *in vitro* культуры первичных Т-клеток человека выделенные Т-клетки ресуспендировали в среде для Т-клеток (среде RPMI с добавкой 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), 1% пенициллина) и переносили в две колбы T25, одну с и одну без 100 мкМ 2-дезоксидезокси-2-фтор-L-фукозы. Для активации Т-клеток добавляли сферы, покрытые антителом к CD3/CD28 (20 мкл/колба). Через 24 часа добавляли интерлейкин 2 (IL2) (100 нг/мкл). При каждом пассаже клеток добавляли новый IL2 и 2-дезоксидезокси-2-фтор-L-фукозу. После 10 дней культивирования размноженные Т-клетки, культивируемые в 2FF, оценивали на наличие изменений поверхностного фукозилирования с помощью проточной цитометрии (Фиг. 4). Обработка первичных человеческих Т-клеток 2FF приводит к снижению поверхностного фукозилирования примерно на 85%, как контролируют при поверхностном окрашивании агглютинином чечевицы (LCA), и указывает на то, что клетки готовы к переносу *in vivo*.

[0192] Пример 4 – Аутологичные Т-клетки, созревшие и дифференцированные с 2FF *ex vivo*, могут придавать противоопухолевую активность

[0193] Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из лейкоцитарных пленок венозной крови здоровых добровольцев (Astarte Biologics) при использовании

градиента плотности гистопак (Sigma). Затем Т-клетки выделяли при использовании смеси EasySep Human T cell Enrichment Cocktail (STEMCELL) согласно инструкциям производителя. Покрытые антителом к α CD3/ α CD28 сферы (Miltenyi Biotec), используемые в соотношении сфера:клетка 1:8, использовали для активации Т-клеток в день 0. Т-клетки активировали в RPMI 10% FCS +IL-2 (100 нг/мкл, R&D Systems) +/-100 мМ 2FF. При каждом пассаже клеток добавляли новый IL-2 и 2FF.

[0194] Трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (EBV) лимфобластоидные клеточные линии (LCL) имплантировали подкожно мышам NSG. Когда объемы опухолей LCL достигали 300 мм³, мышам вводили $2,0 \times 10^6$ аутологичных периферических Т-клеток, которые были размножены и созрели в присутствии или отсутствии 2FF, путем инъекции в хвостовую вену. Противоопухолевую активность аутологичных Т-клеток в отношении прогрессирования LCL контролировали путем измерения с помощью штангенциркуля раз в две недели. Мышей умерщвляли после уменьшения или полного исчезновения опухолей в течение больше чем 1 недели.

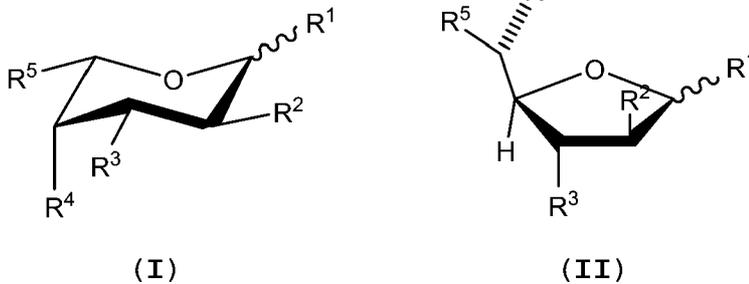
[0195] Перенос аутологичных Т-клеток приводил к противоопухолевой активности, которая была значительно увеличена (см. ФИГ. 5А), как и выживаемость (см. ФИГ. 5В), если Т-клетки созрели с 2FF до переноса.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование, включающий:

культивирование Т-клеток в присутствии аналога фукозы в среде культивирования клеток; где

указанный аналог фукозы выбран из группы, состоящей из формул (I) или (II):



или представляет собой соответствующую фармацевтически приемлемую соль или сольватированную форму, где каждая формула (I) или (II) может быть альфа или бета-аномером или соответствующей альдозной формой;

R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – CH_3 , или

каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – $C\equiv CH$; и

где указанные Т-клетки имеют сниженное поверхностное фукозилирование по сравнению с Т-клетками, культивируемыми в отсутствие указанного аналога фукозы.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий этап выделения Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование.

3. Способ по п.1 или 2, где R^2 является галогеном; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – CH_3 .

4. Способ по любому из пп.1–3, где R^2 является –F; каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – CH_3 .

5. Способ по любому из пп.1–4, где каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из –ОН и – $OC(O)C_1-C_{10}$ алкила.

6. Способ по любому из пп.1–5, где каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из –ОН и – $OC(O)CH_3$.

7. Способ по п.1 или 2, где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является – $C\equiv CH$.

8. Способ по п.1, где аналогом фукозы является 2-дезоксидезокси-2-фтор-L-фукоза.

9. Способ по п.1, где аналогом фукозы является перацетат алкинилфукозы.

10. Способ по любому из пп.1–9, где указанные Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, являются Т-клетками, включающими по меньшей мере

5% снижение поверхностного фукозилирования по сравнению с Т-клетками, культивируемыми в отсутствие указанного аналога фукозы.

11. Способ по любому из пп.1–10, где среда культивирования включает антитела к CD3 и CD28.

12. Способ по п.11, где среда культивирования дополнительно включает интерлейкин 2 (IL2).

13. Способ по любому из пп.1–12, где указанные Т-клетки включают человеческие периферические Т-клетки.

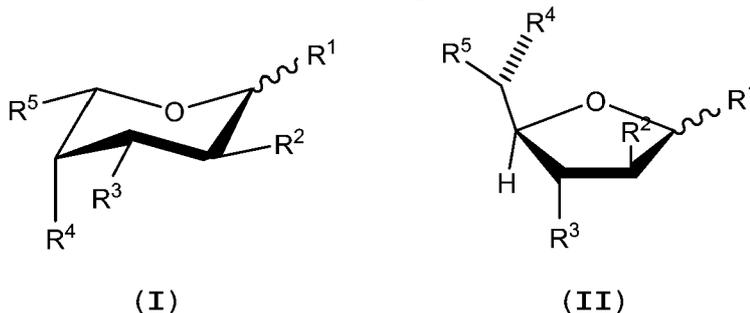
14. Способ по любому из пп.1–13, где указанные полученные Т-клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, предназначены для применения в адоптивной клеточной терапии.

15. Способ получения Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование, включающий:

предоставление аналога фукозы животному; и

получение Т-клеток, имеющих сниженное поверхностное фукозилирование, у животного,

указанный аналог фукозы выбран из группы, состоящей из формул (I) или (II):



или представляет собой соответствующую фармацевтически приемлемую соль или сольватированную форму, где каждая формула (I) или (II) может быть альфа или бета-аномером или соответствующей альдозной формой;

R² является галогеном; каждый из R¹, R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –СН₃, или

каждый из R¹, R², R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –С≡СН; и

где указанные Т-клетки, полученные у животного, имеют сниженное поверхностное фукозилирование по сравнению с Т-клетками, присутствующими или полученными у контрольного животного, не получавшего указанный аналог фукозы.

16. Способ по п.15, где R² является галогеном; каждый из R¹, R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –СН₃.

17. Способ по п.15 или 16, где R² является –F; каждый из R¹, R³ и R⁴ независимо является –ОН или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R⁵ является –СН₃.

18. Способ по любому из пп.15–17, где каждый из R¹, R³ и R⁴ независимо выбран из группы, состоящей из –ОН и –ОС(О)С₁–С₁₀ алкила.

19. Способ по любому из пп.15–18, где каждый из R^1 , R^3 и R^4 независимо выбран из группы, состоящей из $-OH$ и $-OC(O)CH_3$.

20. Способ по п.15, где каждый из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо является $-OH$ или гидролизуемой сложноэфирной группой; и R^5 является $-C\equiv CH$.

21. Способ по п.15, где аналогом фукозы является 2–дезоксидезокси–2–фтор–L–фукоза.

22. Способ по п.15, где аналогом фукозы является перацетат алкинилфукозы.

23. Способ по любому из пп.15–22, где указанные T–клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, являются T–клетками, включающими по меньшей мере 5% снижение поверхностного фукозилирования по сравнению с T–клетками, культивируемыми в отсутствие указанного аналога фукозы.

24. Способ по любому из пп.15–23, где T–клетки получены из селезенки животного.

25. Способ по любому из пп.15–24, где указанный аналог фукозы предоставлен животному посредством кормления.

26. Способ по любому из пп.15–25, дополнительно включающий обогащение T–клеток из T–клеток, полученных у животного.

27. Способ по любому из пп.15–26, где указанные полученные T–клетки, имеющие сниженное поверхностное фукозилирование, предназначены для применения в адоптивной клеточной терапии.

28. Способ по любому из пп.15–27, где животным является человек.

29. Способ предоставления адоптивной клеточной терапии субъекту, включающий: введение смеси, включающей T–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, субъекту, нуждающемуся в клеточной терапии.

30. Способ по п.29, где указанные T–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием получены согласно способу по любому из пп.1–28.

31. Способ по п.29, где указанные T–клетки включают по меньшей мере 5% снижение поверхностного фукозилирования по сравнению с нормальными T–клетками.

32. Способ по любому из пп.29–31, где субъектом является человек.

33. Способ по любому из пп.29–32, где указанные T–клетки включают человеческие периферические T–клетки.

34. Способ по любому из пп.29–33, где указанные T–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием происходят от указанного субъекта.

35. Способ по любому из пп.29–33, где указанные T–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием происходят от животного, отличающегося от указанного субъекта.

36. Способ по любому из пп.29–35, где указанная смесь по существу не содержит эритроцитов.

37. Способ по любому из пп.29–36, где клеточная терапия предназначена для лечения рака.

38. Способ по любому из пп.29–37, где смесь вводят локально (в область

локализации или вблизи от раковых клеток).

39. Способ по любому из пп.29–38, где смесь вводят системно (пути введения).

40. Способ лечения рака, включающий:

введение смеси, включающей Т–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием, субъекту, нуждающемуся в указанном лечении рака.

41. Способ по п.40, где указанные Т–клетки со сниженным поверхностным фукозилированием получены согласно способу по любому из пп.1–28.

42. Способ по п.40, где указанные Т–клетки включают по меньшей мере 5% снижение поверхностного фукозилирования по сравнению с нормальными Т–клетками.

43. Способ по любому из пп.40–42, где субъектом является человек.

44. Способ по любому из пп.40–43, где указанные Т–клетки включают человеческие периферические Т–клетки.

45. Способ по любому из пп.40–44, где указанные Т–клетки с модифицированным поверхностным фукозилированием происходят от указанного субъекта.

46. Способ по любому из пп.40–44, где указанные Т–клетки с модифицированным поверхностным фукозилированием происходят от животного, отличающегося от указанного субъекта.

47. Способ по любому из пп.40–46, где указанная смесь по существу не содержит эритроцитов.

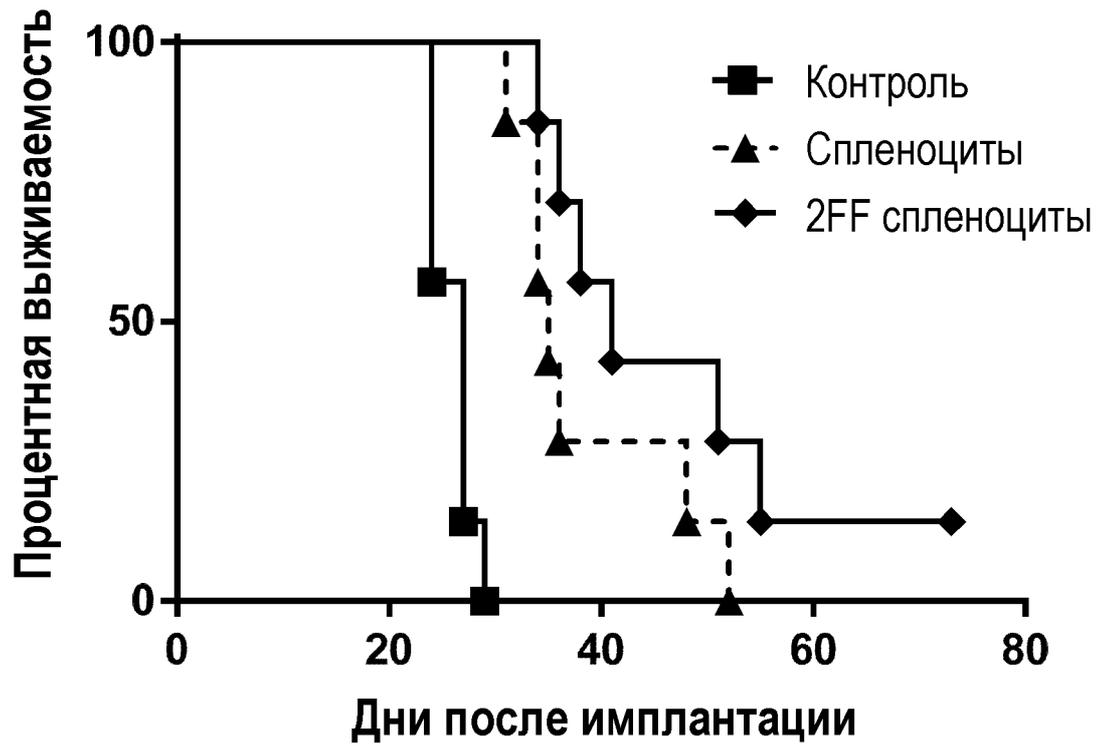
48. Способ по любому из пп.40–47, где клеточная терапия предназначена для лечения рака.

49. Способ по любому из пп.40–48, где смесь вводят локально.

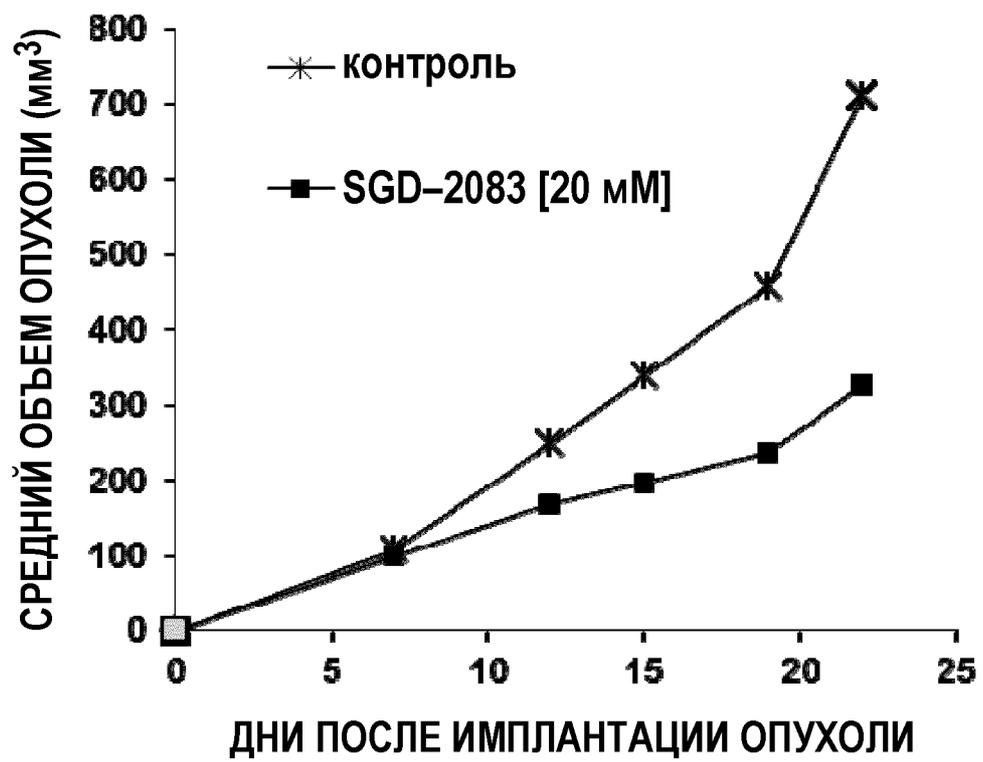
50. Способ по любому из пп.40–49, где смесь вводят системно.

По доверенности

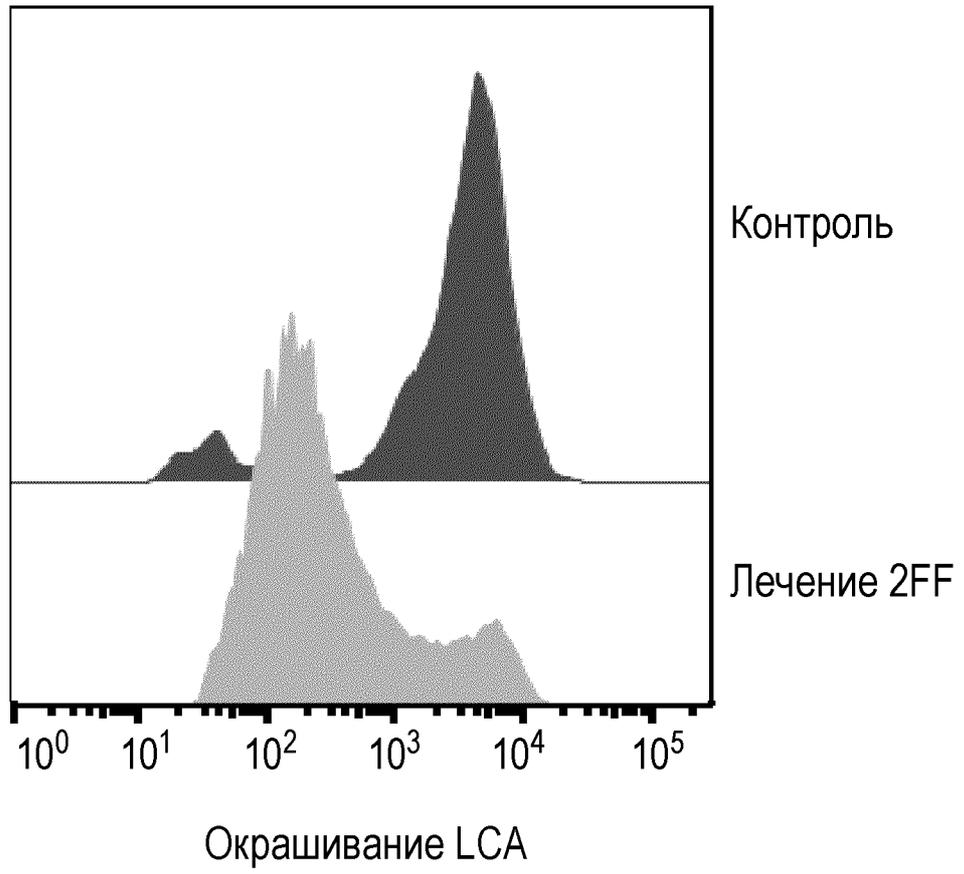
ФИГ.1



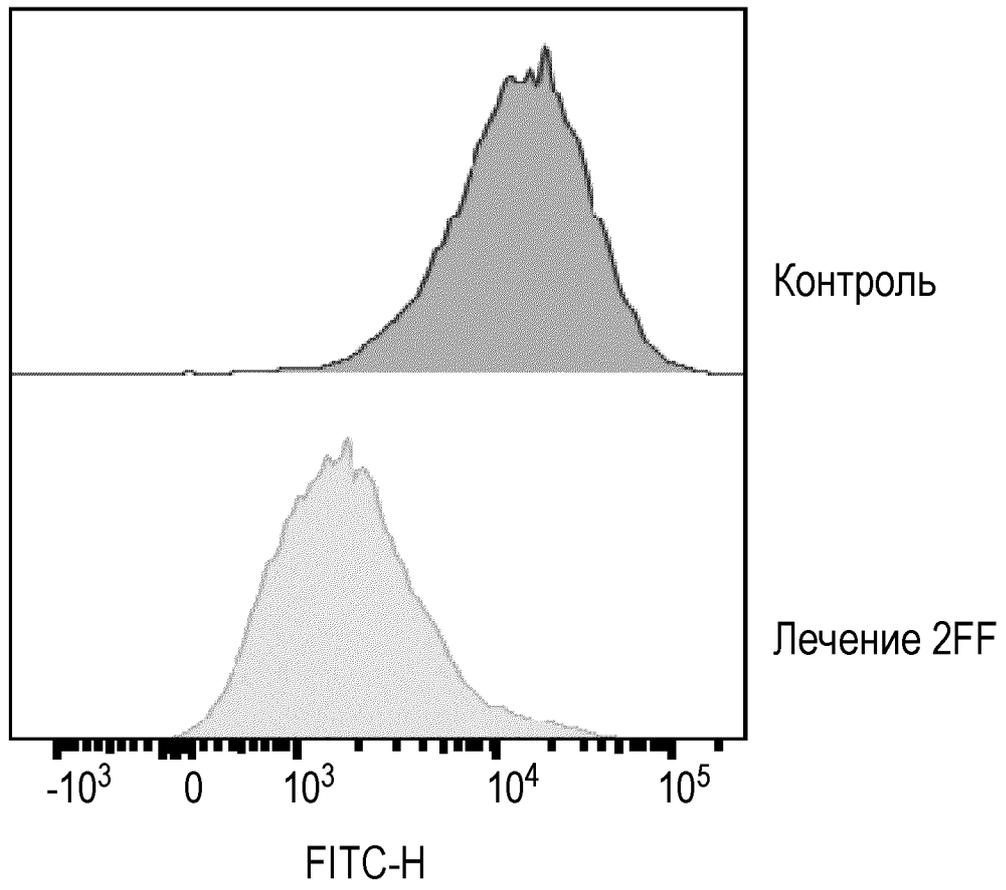
ФИГ.2



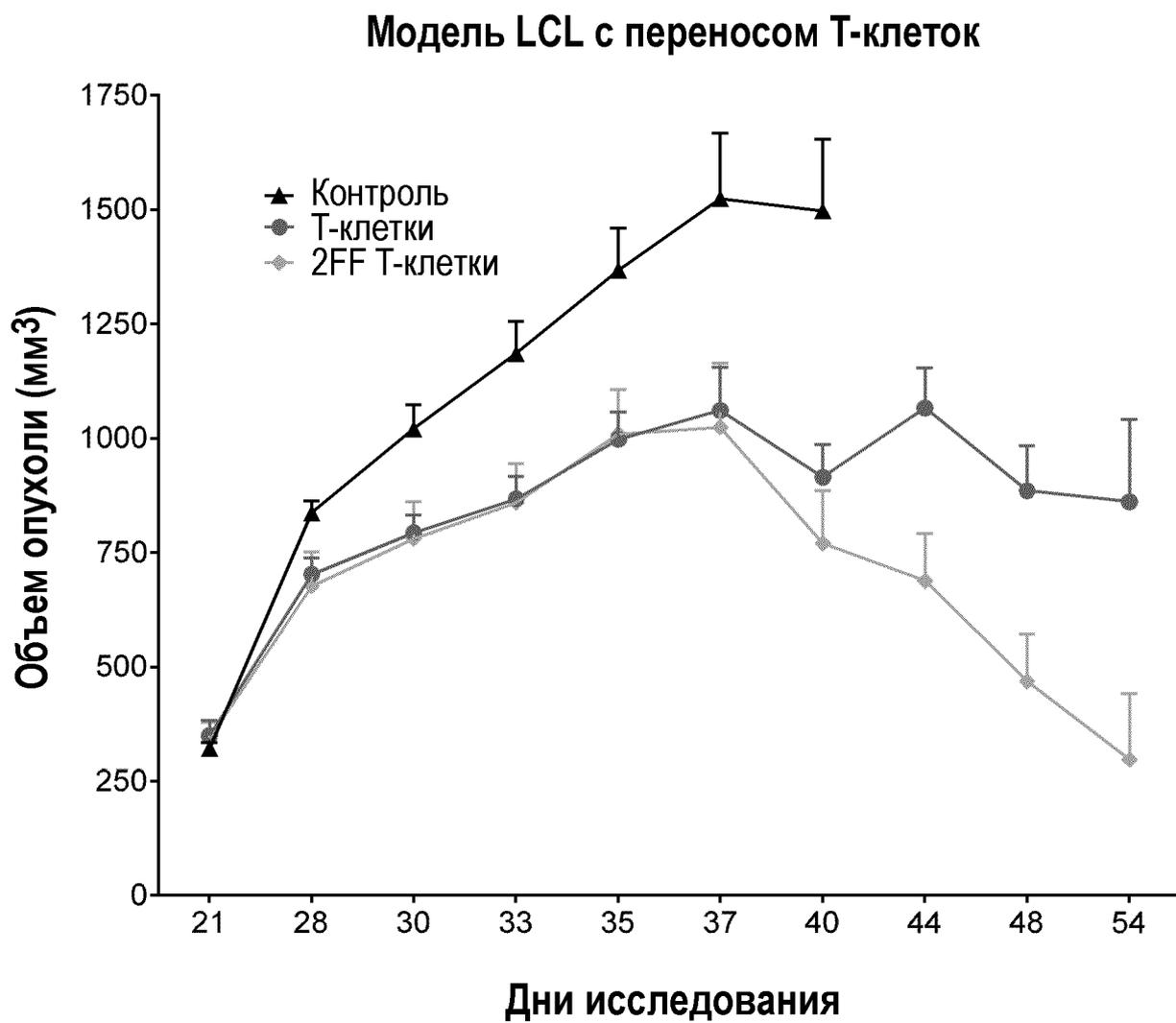
ФИГ.3



ФИГ.4



ФИГ.5А



ФИГ.5В

