

ADAPTADORES BIESPECÍFICOS Y SU USO CON CÉLULAS CAR-T UNIVERSALES EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES QUE EXPRESAN CAIX

PRIORIDAD

[0001] La presente solicitud de patente se relaciona con, y reivindica el beneficio de prioridad de, la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos N° 63/451.450, presentada el 10 de marzo de 2023, y la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos N° 63/600.606, presentada el 17 de noviembre de 2023. El contenido de cada una de las solicitudes anteriormente mencionadas se incorpora por referencia en su totalidad a la presente divulgación.

CAMPO TÉCNICO

[0002] La presente divulgación se refiere a células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T), a tumores que expresan anhidrasa carbónica (CAIX), a adaptadores biespecíficos que enlazan las células CAR-T con células tumorales que expresan CAIX, y a métodos de tratamiento del cáncer que utilizan los mismos.

ANTECEDENTES

[0003] La anhidrasa carbónica IX (CAIX) está sobreexpresada en la mayoría de los tumores sólidos y constituye un marcador de mal pronóstico al menos en carcinomas de ovario, mama, pulmón y vejiga. CAIX también se sobreexpresa en más del 95% de los carcinomas de células renales claras.

[0004] Tradicionalmente, se ha empleado una célula T que expresa un único receptor de antígeno quimérico (CAR) para dirigirse a un receptor de superficie celular en una célula tumoral. Cuando el CAR en la célula T se une al receptor de superficie de la célula tumoral, la célula T puede destruir la célula tumoral a la cual está unida. Aunque eficaz, este enfoque puede resultar bastante costoso, dado que las células CAR-T deben producirse de manera diferenciada para distintos tipos de cáncer que expresan receptores de superficie celular diferentes.

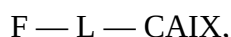
[0005] A pesar de la clara necesidad de prevenir y tratar el cáncer, este sigue siendo una causa significativa de muerte y sufrimiento en todo el mundo, ya que actualmente no existen opciones terapéuticas efectivas que puedan curar la enfermedad. Además, cuando existen medicamentos u otras terapias, tales tratamientos suelen emplear fármacos altamente potentes que conllevan riesgo de toxicidad sistémica en el sujeto subyacente, debido a que son poco selectivos frente a las células cancerígenas de interés.

[0006] Se requieren adaptadores biespecíficos que puedan facilitar el uso rentable de células CAR-T capaces de unirse a diferentes tipos de cáncer que expresan distintos receptores de

superficie celular. Esta y otras finalidades y ventajas, así como características inventivas, resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que se provee en el presente documento.

RESUMEN

[0007] Se proporciona un adaptador biespecífico para uso con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa anhidrasa carbónica IX (CAIX). El adaptador biespecífico puede comprender la siguiente estructura:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde F comprende una fluoresceína, L comprende un enlazador, y CAIX comprende un ligando de CAIX (por ejemplo, un radical de un ligando de CAIX). La fluoresceína puede comprender fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o N-hidroxisuccinimida-fluoresceína (NHS-fluoresceína). El ligando de CAIX puede ser o comprender un radical de ácido 3-((3-(ciclooctilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (*orto*-CAL). El enlazador puede comprender o consistir esencialmente en, o consistir de, polietilenglicol (PEG).

[0008] El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir de PEG₃ a PEG₉. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) PEG₆. El enlazador puede comprender (CH₂)₄.

[0009] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo comprende una fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína conjugada a un radical de un ligando de CAIX mediante un enlazador, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste de PEG.

[0010] El ligando de CAIX puede ser o comprender ácido 3-((3-(ciclooctilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (*orto*-CAL), ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico (*meta*-CAL), acetazolamida (Aza), o un derivado o análogo de cualquiera de los anteriores.

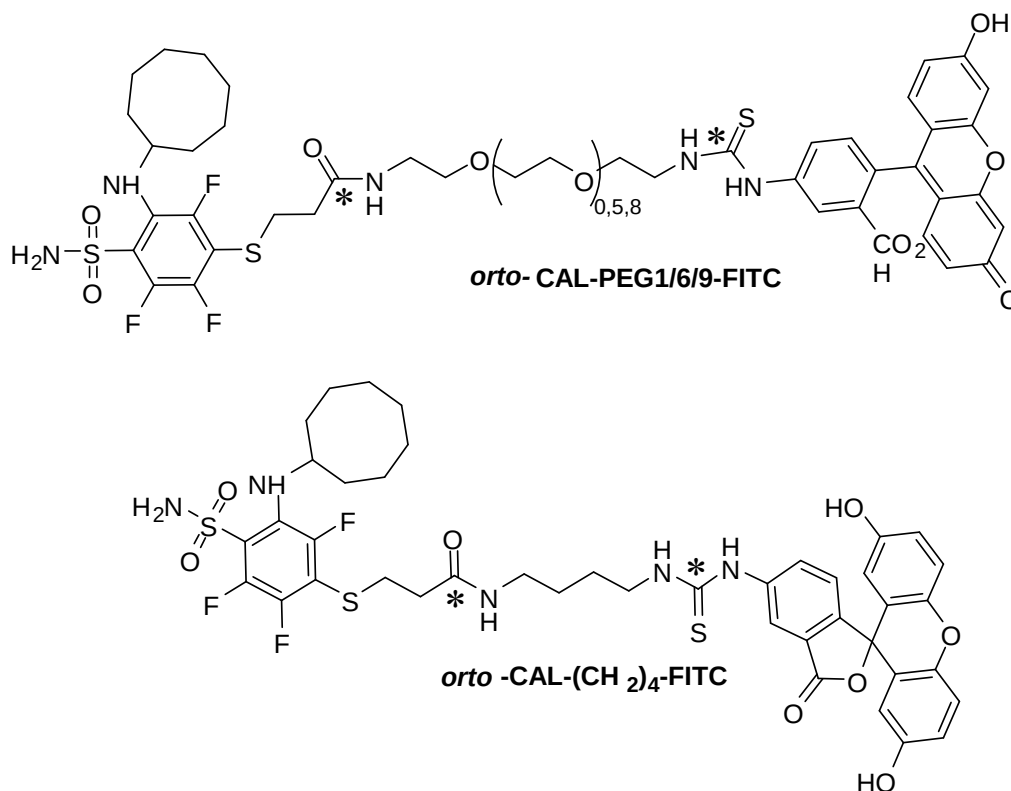
[0011] El enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir de PEG₁ a PEG₉. El ligando de CAIX puede ser o comprender *orto*-CAL o un derivado o análogo del mismo y el enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir de PEG₁ a PEG₉. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste de PEG₃ a PEG₉.

[0012] En ciertas realizaciones, el ligando de CAIX es o comprende *meta*-CAL o un derivado o análogo del mismo y el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste de PEG₃ a PEG₉.

[0013] El ligando de CAIX puede ser o comprender Aza o un derivado o análogo del mismo. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste de PEG₆. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste de PEG₉. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste de PEG₆.

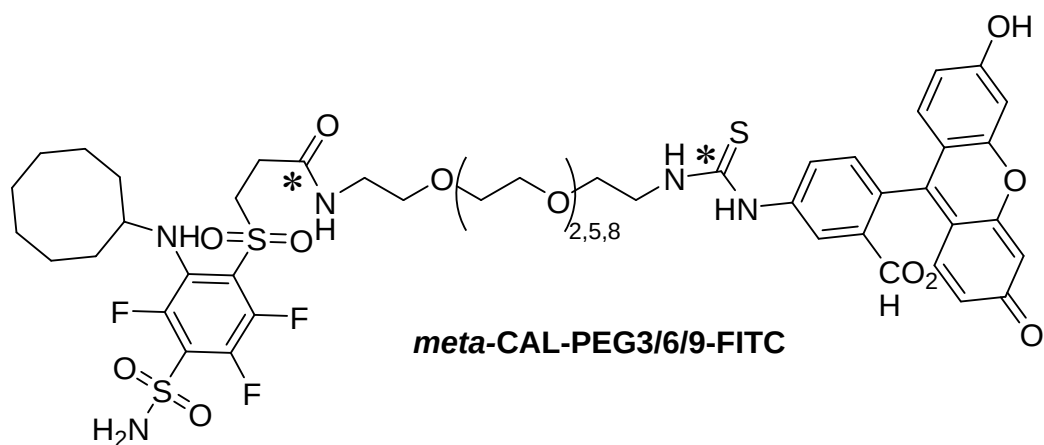
[0014] El enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir de un alquilo. El enlazador puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir de (CH₂)₄.

[0015] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico comprende una estructura de una de las siguientes fórmulas:



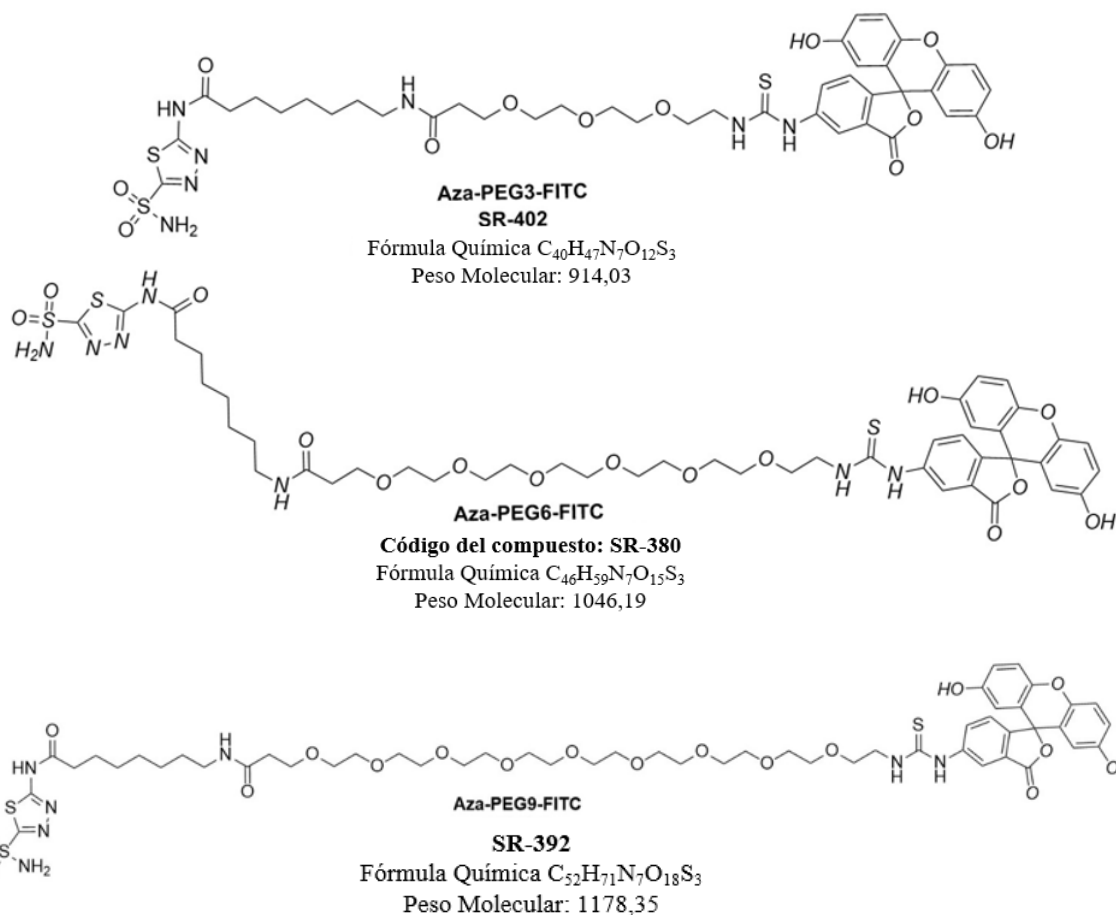
o es una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las anteriores.

[0016] El adaptador biespecífico puede comprender una estructura de las siguientes fórmulas:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de las mismas.

[0017] El adaptador biespecífico puede comprender una estructura de las siguientes fórmulas:

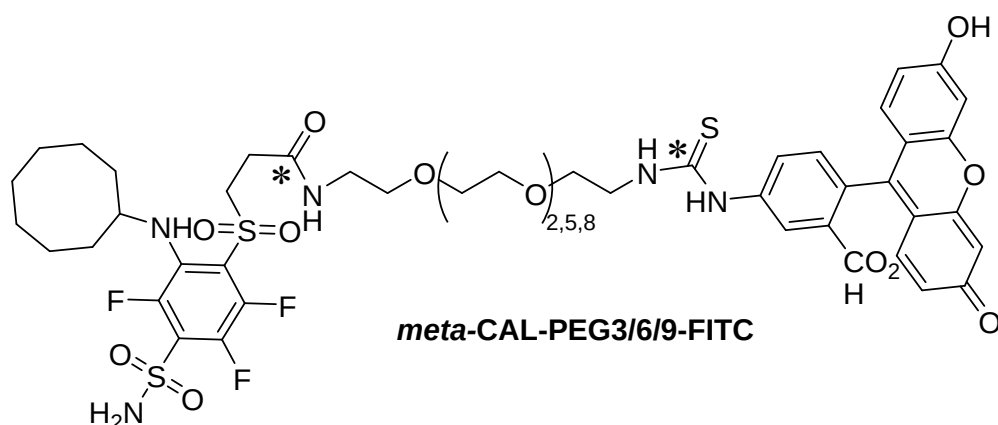


o ser una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las anteriores.

[0018] Los adaptadores biespecíficos pueden utilizarse con una célula T con receptor de antígeno quimérico (CAR)-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer. Los adaptadores biespecíficos pueden utilizarse con una célula anti-

[0019] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico es para uso con una célula CAR- anti-fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína) en el tratamiento de cáncer

que expresa CAIX. El adaptador biespecífico puede comprender fluoresceína-enlazador-ligando de CAIX (por ejemplo, fluoresceína = fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína) o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el ligando de CAIX es o comprende ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propanoico (*meta*-CAL) y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste de) PEG. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₃ a PEG₉. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₆. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₉. El adaptador biespecífico puede tener la estructura:



o ser una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0020] Se proporciona además otro adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína) en el tratamiento de cáncer que expresa CAIX. El adaptador puede comprender fluoresceína-enlazador-ligando de CAIX (por ejemplo, fluoresceína = fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína) o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el ligando de CAIX es acetazolamida (Aza) y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste de) PEG. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₁ to PEG₉.

[0021] También se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer que expresa CAIX que comprende cualquier adaptador biespecífico descrito en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0022] Además, se proporciona un método de tratamiento de un cáncer (por ejemplo, un cáncer que expresa CAIX) en un sujeto. El método puede comprender administrar al sujeto cantidades efectivas para el tratamiento del cáncer de (i) células CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína) o una composición farmacéutica que comprende células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y (ii) un adaptador biespecífico descrito en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende un adaptador biespecífico descrito en el presente documento y un vehículo o

excipiente farmacéuticamente aceptable, con lo cual el sujeto es tratado para cáncer. El receptor de antígeno quimérico (CAR) puede tener una región de reconocimiento y la región de reconocimiento puede ser una región de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-fluoresceína. El receptor de antígeno quimérico puede tener un dominio de coestimulación. El dominio de coestimulación del CAR puede ser CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), o CD278 (ICOS). El CAR puede tener un dominio de señalización de activación como, por ejemplo, una cadena CD3 ζ de célula T o un γ de receptor Fc.

[0023] La fluoresceína del adaptador biespecífico del método puede unirse con afinidad a la célula CAR-T anti-fluoresceína tras la exposición a la misma, y el ligando de CAIX del adaptador biespecífico puede enlazar la célula T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína unida a una célula cancerígena que expresa CAIX tras la unión del adaptador biespecífico a un receptor en dicha célula cancerígena que expresa CAIX con afinidad.

[0024] En el método, los pasos (i) y (ii) pueden administrarse de manera simultánea o secuencial, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías. En el método, los pasos (i) y (ii) pueden administrarse cada uno por vía intravenosa.

[0025] En ciertas realizaciones, el método puede comprender además la obtención de imágenes del cáncer en el sujeto. La obtención de imágenes del cáncer puede comprender obtención de imágenes mediante imágenes ópticas, tomografía por emisión de positrones (PET), o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

[0026] El cáncer puede ser cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, o carcinoma de células renales claras como, de manera opcional, carcinoma de células renales claras en estadio 3-4. El cáncer puede ser un cáncer que expresa CAIX.

[0027] También se proporcionan métodos para mejorar la activación de células T con receptor de antígeno quimérico. En ciertas realizaciones, un método para mejorar la activación de células T con receptor de antígeno quimérico comprende: proporcionar un adaptador biespecífico descrito en el presente documento o una composición farmacéutica descrita en el presente documento; y exponer células T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprende células T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable al adaptador biespecífico o a la composición farmacéutica; en donde la célula T con receptor de antígeno quimérico experimenta una activación mejorada contra células cancerígenas tras la exposición en comparación con una célula T con receptor de antígeno quimérico que no se expone al adaptador biespecífico.

[0028] Las células CAR-T pueden estar en la circulación sistémica en un sujeto cuando se exponen al adaptador biespecífico. Las células T con receptor de antígeno quimérico pueden

exponerse al adaptador biespecífico *in vitro* (por ejemplo, antes de la administración a un sujeto). Las células T con receptor de antígeno quimérico pueden ser células cancerígenas que expresan CAIX.

[0029] Se proporciona además un kit. El kit puede comprender (i) al menos una unidad de dosificación de un adaptador biespecífico descrito en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende el mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y (ii) al menos una unidad de dosificación de células T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprende las mismas y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde (i) y (ii) están opcionalmente en recipientes separados. El ligando de CAIX del adaptador biespecífico puede ser o comprender *orto*-CAL o un derivado o análogo del mismo. El ligando de CAIX del adaptador biespecífico puede ser o comprender *meta*-CAL o un derivado o análogo del mismo. El CAIX del adaptador biespecífico puede ser o comprender Aza o un derivado o análogo del mismo.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0030] Los anteriores y otros objetos, características, y ventajas de la presente invención serán más evidentes cuando se consideren en conjunto con la siguiente descripción y dibujos, en donde:

[0031] La **FIG. 1** muestra las estructuras químicas de adaptadores biespecíficos dirigidos a anhidrasa carbónica IX (CAIX).

[0032] La **FIG. 2A** es un gráfico de concentración (nM) de los adaptadores biespecíficos indicados frente a intensidad de fluorescencia media (MFI).

[0033] La **FIG. 2B** es un gráfico de concentración (nM) de los adaptadores biespecíficos indicados frente a intensidad de fluorescencia media (MFI).

[0034] La **FIG. 3A** es un gráfico de adaptador biespecífico frente a intensidad de fluorescencia media (MFI) de isotiocianato de fluoresceína (FITC), que muestra la unión total de adaptadores biespecíficos de CAIX a células HT29.

[0035] La **FIG. 3B** es un gráfico de adaptador biespecífico frente a intensidad de fluorescencia media (MFI) de APC-anti-FITC, que muestra la exposición en superficie de los grupos funcionales FITC en adaptadores biespecíficos de CAIX tras unirse a células HT29.

[0036] La **FIG. 3C** es un gráfico de adaptador biespecífico frente a intensidad de fluorescencia media (MFI) de FITC, que muestra la unión total de adaptadores biespecíficos de CAIX a células MDA-CAIX.

[0037] La **FIG. 3D** es un gráfico de adaptador biespecífico frente a intensidad de fluorescencia media (MFI) de APC-anti-FITC, que muestra la exposición en superficie de los grupos funcionales FITC en adaptadores biespecíficos de CAIX tras unirse a células MDA-CAIX.

[0038] La **FIG. 4A** es un gráfico de concentración (nM) frente a lisis (%), que muestra la citotoxicidad mediada por adaptador biespecífico dirigido a CAIX de células CAR-T anti-FITC hacia células MDA-CAIX.

[0039] La **FIG. 4B** es un gráfico de concentración (nM) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra la liberación de IFN γ mediada por adaptador biespecífico de células CAR-T anti-FITC.

[0040] La **FIG. 5A** es un gráfico de concentración (nM) vs. lisis (%), que muestra que adaptadores biespecíficos *meta*-CAL-FITC median la citotoxicidad de células CAR-T anti-FITC hacia células MDA-CAIX.

[0041] La **FIG. 5B** es un gráfico de concentración (nM) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra que *meta*-CAL-PEG₆-FITC and *meta*-CAL-PEG₉-FITC median niveles más altos de liberación de IFN γ de células T con receptor de antígeno quimérico anti-FITC que *meta*-CAL-PEG₃-FITC a bajas concentraciones (entre 0,001 nM and 1 nM).

[0042] La **FIG. 6A** es un gráfico de concentración (nM) vs. lisis (%), que muestra que adaptadores biespecíficos *orto*-CAL-FITC con diferentes enlazadores median la citotoxicidad de células CART-T anti-FITC hacia células MDA-CAIX.

[0043] La **FIG. 6B** es un gráfico de concentración (nM) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra que adaptadores biespecíficos *orto*-CAL-FITC median la liberación de IFN γ de células CAR-T anti-FITC.

[0044] La **FIG. 7A** muestra la línea de tiempo y el esquema de dosificación de un estudio in vivo para probar diferentes adaptadores biespecíficos de CAIX.

[0045] La **FIG. 7B** es un gráfico de días post-inyección de CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), que muestra las curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento.

[0046] La **FIG. 7C** es un gráfico de días post-inyección de CAR-T vs. cambio de peso corporal (%), que muestra los cambios de peso corporal de los ratones en diferentes grupos de tratamiento durante el curso del tratamiento.

[0047] La **FIG. 8A** es un diagrama esquemático de un diseño experimental.

[0048] La **FIG. 8B** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de FITC, que muestra la señal total de FITC en células tumorales HT29 de ratones inyectados con diferentes adaptadores biespecíficos.

[0049] La **FIG. 8C** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de APC-anti-FITC, que muestra la exposición en superficie del grupo funcional FITC en tumores HT29 de ratones inyectados con adaptadores biespecíficos de CAIX.

[0050] La **FIG. 9A** es un gráfico de ligando vs. células T / μ L de sangre, que muestra el recuento de células T en sangre.

[0051] La **FIG. 9B** es un gráfico de ligando vs. células T CD3⁺/células vivas (%), que muestra células T infiltradas en tumor.

[0052] La **FIG. 10A** muestra la línea de tiempo y el esquema de dosificación de un estudio in vivo para probar diferentes adaptadores biespecíficos de CAIX.

[0053] La **FIG. 10B** es un gráfico de días post-inyección de CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), que muestra curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento.

[0054] La **FIG. 10C** es un gráfico de días post-inyección de CAR-T vs. cambio de peso corporal (%), que muestra cambios de peso corporal de los ratones en diferentes grupos durante los tratamientos.

[0055] La **FIG. 11A** es un diagrama esquemático de diseño experimental.

[0056] La **FIG. 11B** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de FITC, que muestra la señal total de FITC en las células tumorales MDA-CAIX de ratones inyectados con diferentes adaptadores biespecíficos.

[0057] La **FIG. 11C** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de FITC después de la tinción con 100 nM *meta*-CAL-PEG₆-FITC *in vitro*, que muestra la señal total de FITC en las células tumorales. La tinción *in vitro* de las células con 100 nM *meta*-CAL-PEG₆-FITC saturaría todas las proteínas CAIX de superficie y reflejaría el nivel de proteína CAIX en las células tumorales. Los resultados indican que *orto*CAL-PEG₆-FITC medió la erradicación completa de células tumorales CAIX⁺ por células CAR-T.

[0058] La **FIG. 11D** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de APC-anti-FITC, que muestra la exposición en superficie del grupo funcional FITC en tumores MDA-CAIX de ratones tratados con adaptadores biespecíficos de CAIX.

[0059] La **FIG. 11E** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de APC-anti-FITC después de la tinción con 100 nM *meta*-CAL-PEG₆-FITC *in vitro*, que muestra la señal total de FITC en las células tumorales. La tinción *in vitro* de las células con 100 nM *meta*-CAL-PEG₆-FITC saturaría todas las proteínas CAIX de superficie y reflejaría el nivel de proteína CAIX en las células tumorales.

[0060] La **FIG. 12** es un gráfico de concentración (nM) vs. MFI normalizada, que muestra que los espaciadores PEG no tienen efectos significativos sobre la afinidad de unión de adaptadores biespecíficos acetazolamida (Aza)-FITC.

[0061] La **FIG. 13A** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de FL, que muestra la unión total de adaptadores biespecíficos Aza-FITC a células MDA-CAIX. La longitud del enlazador no afectó significativamente la unión total.

[0062] La **FIG. 13B** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de APC-anti-FITC, que muestra la exposición en superficie de grupos funcionales FITC en adaptadores biespecíficos Aza-

FITC con diferentes enlazadores PEG después de unirse a células MDA-CAIX. El aumento de la longitud del espaciador PEG incrementó la exposición en superficie de FITC después de unirse a células MDA-CAIX.

[0063] La **FIG. 14** es un gráfico de concentración (nM) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra el efecto de la longitud del enlazador sobre la liberación de IFN γ mediada por adaptador biespecífico Aza-FITC de células CAR-T anti-FITC cuando se co-cultivan con células HT29. Aza-PEG₃-FITC y Aza-PEG₉-FITC mediaron un nivel más alto de IFN γ liberado por células CAR-T anti-FITC que Aza-PEG₀-FITC. Aza-PEG₆-FITC medió el nivel más alto de IFN γ liberado por células CAR-T anti-FITC.

[0064] La **FIG. 15** es un gráfico de concentración de CA9 ligando-PEG_(n)-FITC (nM) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra que adaptadores biespecíficos dirigidos a CAIX con enlazadores óptimos mediaron la liberación de IFN γ por células CAR-T anti-FITC. *Meta*CAL-PEG₉-FITC medió el nivel más alto de IFN γ liberado por células CAR-T anti-FITC a bajas concentraciones (< 0,1 nM). Aza-PEG₆-FITC medió niveles similares de liberación de IFN γ por células CAR-T anti-FITC que *meta*CAL-PEG₉-FITC a concentraciones superiores a 0.1 nM. *Orto*CAL-PEG₆-FITC medió niveles más bajos de IFN γ liberado por células CAR-T anti-FITC.

[0065] La **FIG. 16A** muestra la línea de tiempo y el esquema de dosificación de un estudio in vivo para probar Aza-PEG₆-FITC y *orto*CAL-PEG₆-FITC.

[0066] La **FIG. 16B** es un gráfico de días post-inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), que muestra curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento. Aza-PEG₆-FITC y *orto*CAL-PEG₆-FITC inhibieron levemente el crecimiento de tumores KB. La eficacia de Aza-PEG₆-FITC es levemente mejor que la de *orto*CAL-PEG₆-FITC.

[0067] La **FIG. 16C** es un gráfico de días post-inyección de células CAR-T vs. cambio de peso corporal (%), que muestra cambios de peso corporal de ratones en diferentes grupos de tratamiento. Tanto Aza-PEG₆-FITC como *orto*CAL-PEG₆-FITC no indujeron una pérdida de peso corporal significativa.

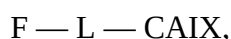
DETAILED DESCRIPTION

[0068] La presente divulgación se fundamenta, al menos en parte, en el diseño de adaptadores biespecíficos con diversas afinidades de unión a antígeno y longitudes de espaciador para optimizar la eficacia de células CAR-T universales en el tratamiento de tumores que expresan anhidrasa carbónica IX (CAIX). Dos nuevos ligandos de CAIX de alta afinidad, a saber, ácido 3-((2-(cicloctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico (*meta*-CAL) y ácido 3-((3-(cicloctilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (*orto*-CAL), fueron probados con tres o cuatro enlazadores espaciadores, respectivamente, en adaptadores biespecíficos. Los

estudios respaldaron que espaciadores PEG₆ y PEG₉ (PEG = polietilenglicol) pueden ser óptimos para dirigirse a tumores positivos para CAIX *in vivo* e *in vitro*. Cuando se emplearon en los adaptadores biespecíficos, los ligandos de CAIX de alta afinidad fueron más potentes que adaptadores con baja afinidad, tales como 5-acetamido-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida (Aza).

[0069] En vista de lo anterior, se proporciona un adaptador biespecífico o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para uso con células CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC, o N-hidroxisuccinimida (NHS)-fluoresceína) en el tratamiento de cáncer que expresa CAIX.

[0070] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico comprende la siguiente estructura:



o es una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

F comprende una porción de direccionamiento a célula CAR-T tal como, por ejemplo, fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína,

L comprende un enlazador, y

CAIX comprende un radical de un ligando de CAIX.

[0071] En ciertas realizaciones, el ligando de CAIX es o comprende ácido 3-((3-(cicloctilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoylfenil)tio)propanoico (*orto*-CAL) y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste de) PEG.

[0072] El uso de adaptadores biespecíficos puede permitir el uso de una única célula CAR-T, es decir, una célula CAR-T “universal”, que presenta, por ejemplo, una molécula en su superficie que se une a fluoresceína. Cuando la célula CAR-T universal, tal como una que presenta una molécula en su superficie que se une a fluoresceína, se usa junto con un adaptador biespecífico, tal como uno que comprende FITC conectado (por ejemplo, mediante un enlazador y/o espaciador) a una molécula que se une a un receptor de superficie celular de células tumorales, la célula T puede destruir las células tumorales a las que está unida.

[0073] Este enfoque puede reducir el costo de producir células CAR-T que pueden unirse a diferentes cánceres que expresan diferentes receptores de superficie celular. En su lugar, la célula CAR-T universal puede unirse a diferentes tipos de cáncer cambiando la parte del adaptador biespecífico que se une a un receptor de superficie celular en una célula tumoral. En consecuencia, los adaptadores biespecíficos pueden mejorar la respuesta inmune efectuada por células CAR-T unidas a células tumorales.

[0074] Porción de direccionamiento a células CAR-T

[0075] La porción de direccionamiento a célula CAR-T del adaptador biespecífico puede ser fluoresceína, FITC, NHS-fluoresceína, o cualquier otra porción a la que se pueda diseñar un CAR para reconocer y unirse con especificidad.

[0076] “Se une con especificidad”, “se une con alta afinidad”, o se une “específicamente” o “selectivamente”, cuando se refiere a un ligando/receptor, una región de reconocimiento/porción de direccionamiento, un ácido nucleico/ácido nucleico complementario, un anticuerpo/antígeno, u otro par de unión, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros biológicos. Así, bajo condiciones designadas, un ligando o región de reconocimiento especificado se une a un receptor particular (por ejemplo, uno presente en una célula cancerígena o en una célula CAR-T) o porción de direccionamiento, respectivamente, y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra (por ejemplo, aquellas asociadas con células normales y sanas). La unión específica o la unión con alta afinidad también puede significar, por ejemplo, que el compuesto de unión, ligando, anticuerpo, o composición de unión derivada del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo se une a su diana con una afinidad que a menudo es al menos 25% mayor, más a menudo al menos 50% mayor, con mayor frecuencia al menos 100% (2 veces) mayor, normalmente al menos 10 veces mayor, más normalmente al menos 20 veces mayor, y con mayor normalidad al menos 100 veces mayor que la afinidad con cualquier otro compuesto de unión. En una realización típica, una molécula que se une específicamente a una diana tendrá una afinidad que es al menos de aproximadamente 10^6 litros/mol ($K^D = 10^{-6}$ M), y preferiblemente al menos de aproximadamente 10^{10} litros/mol, según se determina, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard.

[0077] Ligandos de direccionamiento

[0078] Como se señaló anteriormente, los adaptadores biespecíficos pueden comprender un radical de un ligando de CAIX. Cuando se administran, el ligando de direccionamiento dirige el conjugado adaptador biespecífico hacia un cáncer o tumor de interés que exprese el receptor asociado. En algunas realizaciones, las porciones de direccionamiento (en su forma libre, un radical del mismo) no se unen con receptores de captación en células no objetivo.

[0079] CAIX es un ligando de molécula pequeña que se une con especificidad a un receptor que está sobreexpresado en ciertos tipos de células cancerígenas (es decir, el receptor para cada uno de estos ligandos está sobreexpresado en cánceres en comparación con la expresión de dicho receptor en tejidos normales o, potencialmente, en tejido enfermo que no experimenta el tipo de cáncer objetivo). Los receptores para el ligando de CAIX se encuentran, por ejemplo, en cáncer renal, ovárico, vulvar y de mama, y en cánceres de colon y páncreas. Su expresión también puede estar asociada con carcinoma de células renales, cáncer de pulmón y otros. En consecuencia, la expresión aumentada de CAIX puede ser un objetivo útil para la terapia.

[0080] Los adaptadores biespecíficos pueden comprender un ligando de CAIX (o un radical del mismo) unido a un enlazador, en donde el enlazador está además unido a una porción de direccionamiento a CAR. En ciertas realizaciones, el ligando de CAIX es un ligando de CAIX de

alta afinidad. A menos que se especifique lo contrario, “alta afinidad” o “mayor afinidad” con respecto a la afinidad de un ligando por un objetivo significa un ligando que tiene una puntuación de acoplamiento molecular de Schrödinger de al menos aproximadamente -8,0 kcal/mol. En ciertas realizaciones, el ligando de CAIX de alta afinidad tiene una afinidad mejorada por el receptor de CAIX en comparación con otros ligandos.

[0081] La porción de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un radical de ligando de CAIX con un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000, inferior a 7.500, inferior a 5.000, inferior a 2.500, inferior a 1.000, inferior a 750, inferior a 500; de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 g/mol, aproximadamente 1.000 a aproximadamente 7.500 g/mol, aproximadamente 750 g/mol a aproximadamente 1.500 g/mol, aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 g/mol o aproximadamente 500 a aproximadamente 2.500 g/mol.

[0082] El ligando de direccionamiento puede unirse a un tumor activado u otra célula cancerígena que sobreexpresa el receptor de CAIX. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 1 nM a aproximadamente 25 nM, tal como 1 nM a aproximadamente 25 nM o aproximadamente 1 nM a 25 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,002 nM a aproximadamente 25 nM, tal como 0,002 nM a aproximadamente 1 nM o aproximadamente 0,002 nM a 1 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 0,9 nM, tal como 0,01 nM a aproximadamente 0,9 nM o aproximadamente 0,01 nM a 0,9 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,02 nM a aproximadamente 0,8 nM, tal como 0,02 nM a aproximadamente 0,8 nM o aproximadamente 0,02 nM a 0,8 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,03 nM a aproximadamente 0,7 nM, tal como 0,03 nM a aproximadamente 0,7 nM o aproximadamente 0,03 nM a 0,7 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,04 nM a aproximadamente 0,6 nM, tal como 0,04 nM a aproximadamente 0,6 nM o aproximadamente 0,04 nM a 0,6 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,05 nM a aproximadamente 0,5 nM, tal como 0,05 nM a aproximadamente 0,5 nM o aproximadamente 0,05 nM a 0,5 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,06 nM a aproximadamente 0,4 nM, tal como 0,06 nM a

aproximadamente 0,4 nM o aproximadamente 0,06 nM a 0,4 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,07 nM a aproximadamente 0,3 nM, tal como 0,07 nM a aproximadamente 0,3 nM o aproximadamente 0,07 nM a 0,3 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,08 nM a aproximadamente 0,2 nM, tal como 0,08 nM a aproximadamente 0,2 nM o aproximadamente 0,08 nM a 0,2 nM. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión a un receptor de CAIX en el rango entre aproximadamente 0,09 nM a aproximadamente 0,1 nM, tal como 0,09 nM a aproximadamente 0,1 nM o aproximadamente 0,09 nM a 0,1 nM. Los rangos establecidos en esta sección son inclusivos de los puntos extremos indicados y de todos los incrementos de 0,001 nM comprendidos en los mismos.

[0083] El ligando de CAIX puede ser o puede comprender ácido 3-((3-(cicloctilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (*orto*-CAL) o derivados o análogos del mismo. El ligando de CAIX puede ser o puede comprender ácido 3-((2-(cicloctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico (*meta*-CAL) o derivados o análogos del mismo. El ligando de CAIX puede ser o puede comprender acetazolamida (Aza) o derivados o análogos del mismo. En ciertas realizaciones, el ligando de CAIX se selecciona del grupo que consiste en *meta*-CAL, *orto*-CAL y Aza. Cuando se administra, un conjugado adaptador biespecífico que comprende un ligando de CAIX o un radical del mismo puede dirigirse a un cáncer que exprese CAIX en un sujeto.

[0084] El adaptador biespecífico puede estar específicamente diseñado y sintetizado para lograr una afinidad particular de unión a CAIX.

[0085] Enlazadores

[0086] Los enlazadores de los adaptadores biespecíficos aquí descritos están dispuestos entre el ligando de direccionamiento (por ejemplo, un radical del mismo) y la porción de direccionamiento a célula CAR-T (por ejemplo, que comprende fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína). El enlazador puede ser cualquier enlazador adecuado.

[0087] El término “enlazador” incluye una cadena de átomos que está adaptada biofuncionalmente para formar un enlace químico y conecta la porción de direccionamiento a célula CAR-T y el ligando de direccionamiento a cáncer para formar un conjugado. A modo ilustrativo, la cadena de átomos puede incluir carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio (Si), y fósforo (P), tales como C, N, O, S, y P, o C, N, O, y S.

[0088] El enlazador puede comprender una amplia variedad de enlaces, tales como en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos en la columna vertebral contigua. El

enlazador puede comprender una forma liberable de PEG, una forma no liberable de PEG, poliprolina, un aminoácido hidrofílico, un azúcar, un peptidoglucano no natural, polivinilpirrolidona, o un copolímero tribloque que comprende un bloque central hidrofóbico de polipropilenglicol flanqueado en cada lado por un bloque hidrofílico de PEG.

[0089] El enlazador puede comprender PEG o un derivado de PEG. El enlazador puede ser (PEG)₃.

[0090] El enlazador puede ser no liberable, es decir, no lábil. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser deseable que un enlazador en un adaptador biespecífico sea liberable, es decir, lábil, tal como, por ejemplo, fotoclivable, ácido-lábil, base-lábil, o escindible por enzimas. El término “liberable” en el contexto de un enlazador significa un enlazador que incluye al menos un enlace que puede romperse fácilmente (por ejemplo, hidrolizado química o enzimáticamente) bajo condiciones fisiológicas, tal como, por ejemplo, por agente reductor-lábil, pH-lábil, ácido-lábil, base-lábil, oxidativamente lábil, metabólicamente lábil, bioquímicamente lábil, enzima-lábil o un enlace multivalente liberable basado en p-aminobencílico. Se reconoce que las condiciones fisiológicas que resultan en la ruptura del enlace no necesariamente incluyen un proceso biológico o metabólico y, en su lugar, pueden incluir una reacción química estándar, tal como una reacción de hidrólisis, por ejemplo, a pH fisiológico o como resultado de la compartimentalización en un orgánulo celular, tal como un endosoma con un pH más bajo que el pH citosólico. Un enlace escindible puede conectar dos átomos adyacentes dentro del enlazador liberable y/o conectar otras porciones de enlazador o la porción de direccionamiento y/o la porción de direccionamiento a célula CAR-T, como se describe en el presente documento, por ejemplo, en cualquiera de los extremos del enlazador liberable. En algunos casos, el enlazador liberable se rompe en dos o más fragmentos. En algunos casos, el enlazador liberable se separa de la porción de direccionamiento a célula CAR-T.

[0091] En algunas realizaciones, el enlazador está formado de tal manera que el ligando de direccionamiento a célula CAR-T (es decir, la fluoresceína) se escinde de la porción de direccionamiento a cáncer (es decir, el ligando de CAIX) solo después de que haya pasado un tiempo suficiente para que el adaptador biespecífico circule dentro de la circulación sistémica de un sujeto tras la administración (por ejemplo, para permitir tiempo para ser capturado e internalizado por la célula y/o receptor objetivo). En algunas realizaciones, el período de tiempo para la liberación variará (por ejemplo, de sujeto a sujeto (por ejemplo, basado en una variedad de factores)). En algunas realizaciones, un enlazador liberable puede diseñarse de tal manera que no se escinda/libere hasta al menos 24 horas post-administración o incluso durante un período de una semana. En algunas realizaciones, el adaptador biespecífico puede pasar de manera segura a través

del sistema del sujeto, y cualquier cantidad no capturada por las células objetivo (por ejemplo, aquellas que expresan CAIX, por ejemplo) puede ser excretada.

[0092] En contraste, el término “no liberable” en el contexto de un enlazador significa un enlazador que incluye al menos un enlace que no se rompe fácil o rápidamente bajo condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, un enlazador no liberable comprende una columna vertebral que es estable bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, la columna vertebral no es susceptible a hidrólisis (por ejemplo, hidrólisis acuosa o hidrólisis enzimática)). En algunas realizaciones, un adaptador biespecífico que comprende un enlazador no liberable no libera ningún componente del adaptador biespecífico (por ejemplo, un ligando de direccionamiento a cáncer o un ligando de direccionamiento a célula CAR-T). En algunas realizaciones, el enlazador no liberable carece de un enlace disulfuro (por ejemplo, S-S) o un éster en la columna vertebral. En algunas realizaciones, los adaptadores biespecíficos comprenden un ligando de direccionamiento a cáncer o un ligando de direccionamiento a célula CAR-T conectado por una columna vertebral que es sustancialmente estable durante toda la duración de la circulación del adaptador biespecífico (por ejemplo, durante la endocitosis en el endosoma de la célula objetivo). El enlazador no liberable puede comprender: una amida, éster, éter, amina, y/o tioéter (por ejemplo, tio-maleimida). Aunque se proporcionan ejemplos específicos, se entenderá que cualquier molécula(s) puede usarse en el enlazador no liberable siempre que se forme al menos un enlace que no se rompa fácil o rápidamente bajo condiciones fisiológicas.

[0093] Quizás más específicamente, un enlazador no liberable puede comprender un enlazador que, a pH neutro, por ejemplo, menos del diez por ciento (10%) (por ejemplo, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, menos del 0,1%, menos del 0,01%, o menos del 0,001%) se hidrolice en una solución acuosa (por ejemplo, amortiguada (por ejemplo, tampón fosfato)) dentro de un período de tiempo (por ejemplo, 24 horas). En algunas realizaciones, donde se emplea un enlazador no liberable, menos de aproximadamente el diez por ciento (10%), y preferiblemente menos del cinco por ciento (5%) o ninguno, del adaptador biespecífico administrado libera una porción a la que está conectado (por ejemplo, en circulación sistémica antes de la captación por las células/tejidos objetivo).

[0094] En algunas realizaciones, un ligando de direccionamiento a cáncer no se escinde de la porción de direccionamiento a célula CAR-T del adaptador biespecífico in vivo. Esto puede ser ventajoso ya que permite que el adaptador biespecífico se una y entregue una célula CAR-T a una célula cancerígena objetivo.

[0095] La longitud de un enlazador puede seleccionarse para optimizar la separación impuesta por el enlazador de moléculas en la superficie de la célula objetivo, lo que a su vez puede facilitar la captación de una célula CAR T unida hacia la célula objetivo (por ejemplo, cuando se administra

el adaptador biespecífico). El enlazador puede tener una longitud de cadena de al menos aproximadamente 5 nm. En ciertas realizaciones, cada enlazador tiene aproximadamente 5 nm a 15 nm de longitud. En algunas realizaciones, el enlazador tiene al menos aproximadamente 7 nm de longitud. En ciertas realizaciones, cada enlazador tiene aproximadamente 7 nm de longitud y es flexible. En ciertas realizaciones, cada enlazador tiene aproximadamente 7–10 nm de longitud. En algunas realizaciones, el enlazador tiene al menos aproximadamente 14 nm de longitud. En algunas realizaciones, el enlazador tiene aproximadamente 15 nm de longitud. En algunas realizaciones, el enlazador tiene entre aproximadamente 7 nm y aproximadamente 31 nm de longitud (tales como, aproximadamente 7 a 31, 7 a aproximadamente 31, o 7 a 31), entre aproximadamente 7 nm y aproximadamente 24 nm de longitud (tales como, aproximadamente 7 a 24, 7 a aproximadamente 24, o 7 a 24), o entre aproximadamente 7 nm y aproximadamente 20 nm de longitud (tales como, aproximadamente 7 a 20, 7 a aproximadamente 20, o 7 a 20). En algunas realizaciones, el enlazador tiene entre aproximadamente 14 nm y aproximadamente 31 nm de longitud (tales como, aproximadamente 14 a 31, 14 a aproximadamente 31, o 14 a 31), entre aproximadamente 14 nm y aproximadamente 24 nm de longitud (tales como, aproximadamente 14 a 24, 14 a aproximadamente 24, o 14 a 24), o entre aproximadamente 14 nm y aproximadamente 20 nm de longitud (tales como, aproximadamente 14 a 20, 14 a aproximadamente 20, o 14 a 20). En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de cadena de al menos 7 nm, al menos 14 nm, al menos 20 nm, al menos 25 nm, al menos 30 nm, o al menos 40 nm; o de 5 nm a 15 nm, de 5 nm a 10 nm, de 7 nm a 10 nm, de 5 nm a 20 nm, de 10 nm a 40 nm, o de 25 nm a 100 nm. En ciertas realizaciones, la longitud de cada enlazador se selecciona para facilitar la micro-aglomeración de moléculas unidas en una superficie celular para proporcionar aproximadamente 7–10 nm de separación entre ellas (tales como aproximadamente 7 nm a aproximadamente 10 nm, 7 nm a aproximadamente 10 nm, aproximadamente 7 nm a 10 nm, o 7 nm a 10 nm). Los intervalos especificados en este párrafo incluyen los puntos finales indicados y todos los incrementos de 1 nm comprendidos dentro de los intervalos indicados.

[0096] Un enlazador puede comprender al menos un enlace carbono-carbono y/o al menos un enlace amida. El enlazador puede comprender una o más configuraciones L o D, aminoácidos naturales o no naturales, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

[0097] En ciertas realizaciones, un enlazador es un grupo que comprende una o más unidades estructurales conectadas covalentemente.

[0098] El enlazador puede diseñarse para optimizar la biodistribución, la biodisponibilidad y la PK/PD (por ejemplo, del adaptador biespecífico) y/o para incrementar la captación (por ejemplo, de una célula CAR-T conectada al mismo y/o del propio adaptador biespecífico) según se

describió previamente hacia el tejido objetivo conforme a metodologías comúnmente conocidas en la técnica o que se desarrollen en lo sucesivo, tales como mediante PEGilación y similares.

[0099] En algunas realizaciones, los enlazadores pueden comprender uno o más espaciadores (por ejemplo, para facilitar un tiempo de liberación particular, facilitar un incremento en la captación hacia un tejido objetivo y/o optimizar la biodistribución, la biodisponibilidad y/o la PK/PD de un adaptador biespecífico provisto en el presente documento). Un espaciador puede comprender una o más cadenas alquílicas, PEGs, péptidos, azúcares, peptidoglucanos, enlazadores “clicables” (por ejemplo, triazoles), enlazadores rígidos tales como poliprolinas y polipiperidinas, y similares.

[0100] En algunas realizaciones, un enlazador del adaptador biespecífico comprende PEG, un derivado de PEG, o cualquier otro enlazador conocido en la técnica o que se desarrolle en lo sucesivo que pueda lograr el propósito establecido en el presente documento. En algunas realizaciones, el enlazador se repite n veces, donde n es un número entero positivo. Por ejemplo, y sin limitación, n puede ser cualquier número entero seleccionado de un rango de 1–16, 1–32, 1–64, o 1–96. El número de repeticiones en el enlazador (es decir, n) puede seleccionarse para lograr la funcionalidad, el tamaño y/o la potencia deseados del conjugado y/o en vista de la aplicación deseada. En algunas realizaciones, el enlazador comprende uno o más espaciadores (por ejemplo, los cuales también pueden usarse para diseñar específicamente características del adaptador biespecífico).

[0101] En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₁–PEG₉. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₂–PEG₈. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₃–PEG₉. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₄–PEG₈. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₅–PEG₇. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₃–PEG₁₈. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₄–PEG₁₇. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₅–PEG₁₆. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₆–PEG₁₅. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₇–PEG₁₄. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₈–PEG₁₃. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₉–PEG₁₂. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₁₀–PEG₁₁. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₃ a PEG₉, tales como PEG₃, PEG₄, PEG₅, PEG₆, PEG₇, PEG₈, o PEG₉. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de)

PEG₆. El enlazador puede comprender un alquilo. El enlazador puede ser, comprender, o consistir esencialmente en (CH₂)₄. Todos los intervalos indicados en este párrafo incluyen los puntos finales indicados.

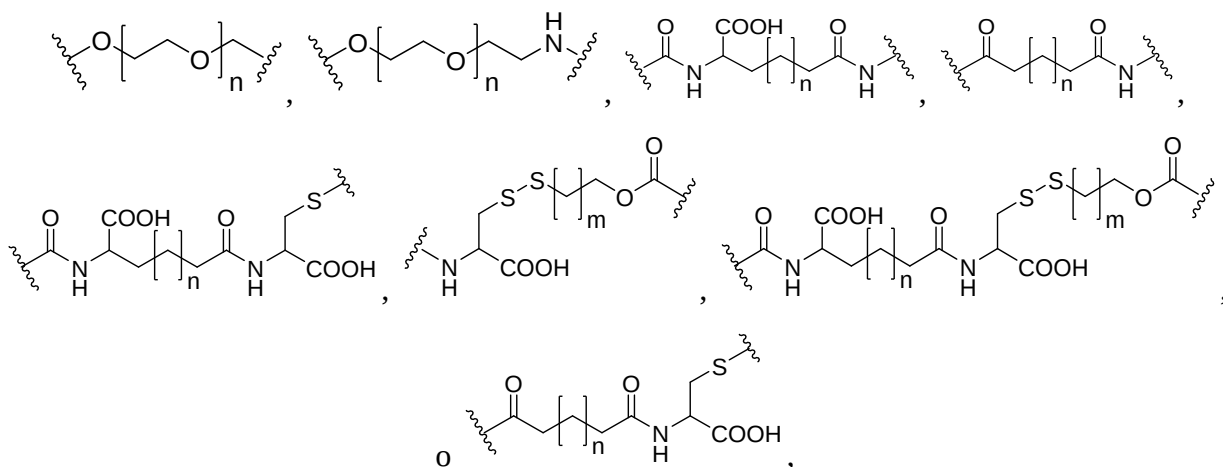
[0102] El enlazador puede ser o comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₁. El enlazador puede ser o comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₆. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₃. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₄. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₁₂. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG₁₆.

[0103] En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador hidrolizable. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador no hidrolizable. En algunas realizaciones, el enlazador es un heteroalquilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el enlazador es un heteroalquilo sustituido que comprende al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en alquilo, hidroxilo, oxo, PEG, carboxilato y halo. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un espaciador (por ejemplo, según se describe en otra parte del presente documento).

[0104] En algunas realizaciones, el enlazador es un heteroalquilo sustituido con al menos un enlace disulfuro en su esqueleto. En algunas realizaciones, el enlazador es un péptido con al menos un enlace disulfuro en su esqueleto.

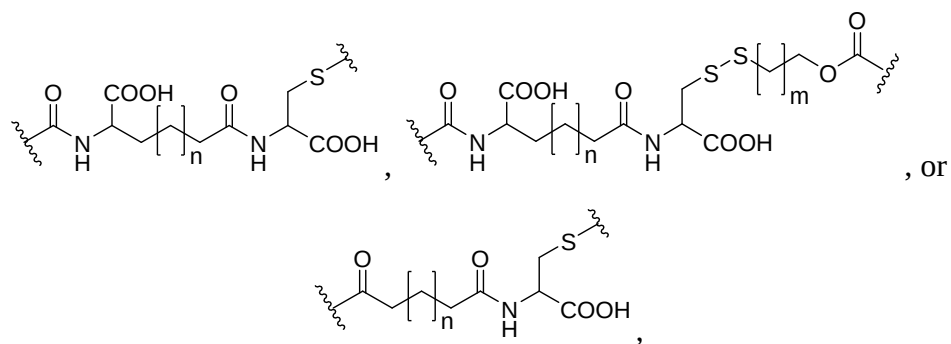
[0105] En algunas realizaciones, el enlazador comprende -CONH-CH(COOH)-CH₂-S-S-CH₂-CRaRb-O-CO-, -CONH-CH(COOH)CRaRb-O-CO-, -C(O)NHCH(COOH)(CH₂)₂-CONH-CH(COOH)CRaRb-O-CO- o -C(O)NHCH(COOH)(CH₂)₂-CONH-CH(COOH)-CH₂-S-S-CH₂-CRaRb-O-CO-, en donde Ra y Rb son independientemente H, alquilo, o heteroalquilo (por ejemplo, PEG).

[0106] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una estructura de:



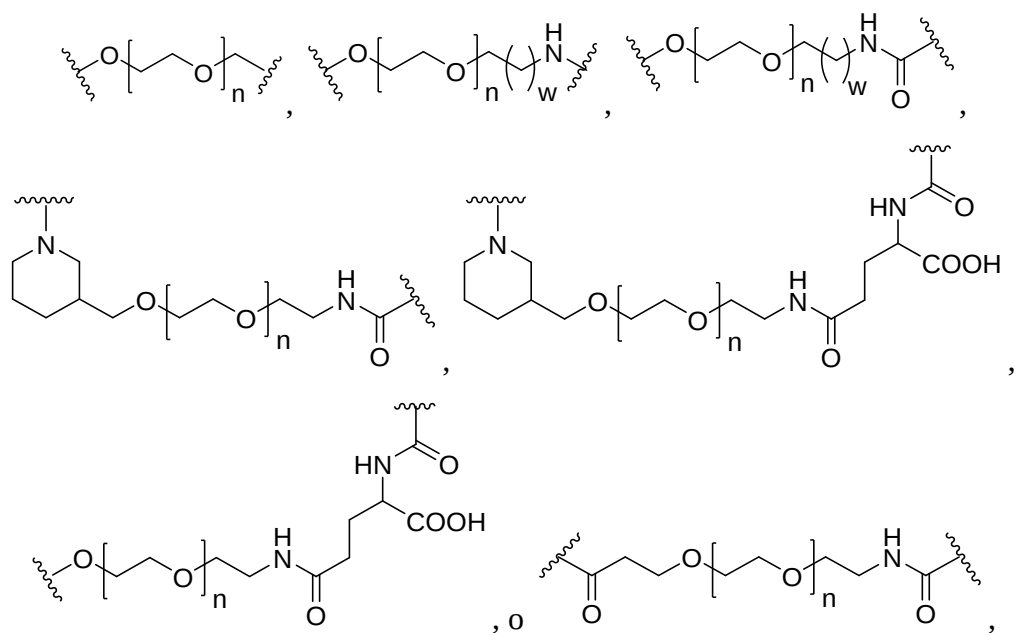
en donde n o m (cuando corresponda) es 0 a 10.

[0107] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una estructura de:



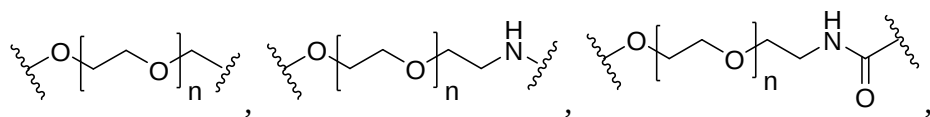
en donde n y m son cada uno independientemente 0 a 10.

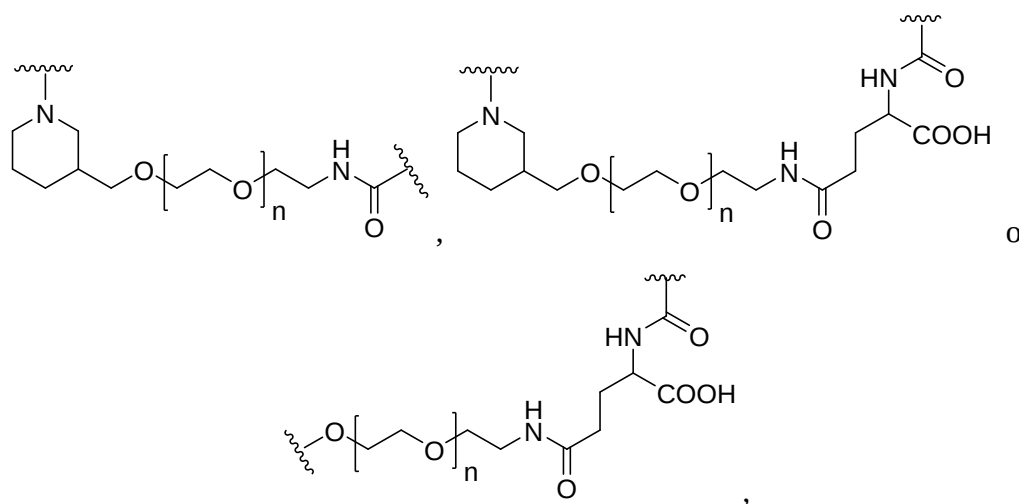
[0108] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una estructura de:



en donde n es 1 a 32. En al menos una realización ejemplar, n es 1 a 30 y w es 0 a 5 (cuando corresponda).

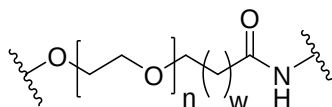
[0109] En algunas realizaciones, el enlazador comprende la estructura de:





en donde n es 1 a 16.

[0110] I En ciertas realizaciones, el enlazador puede comprender la estructura de:

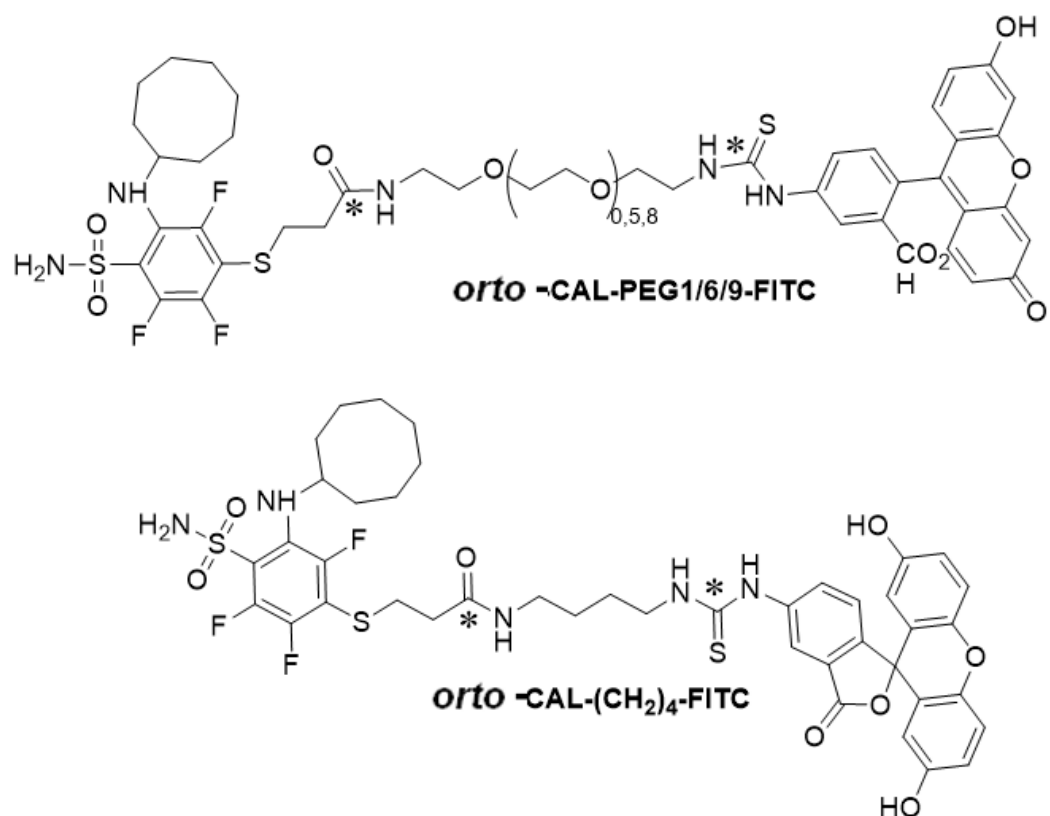


en donde n es 1 a 30 y w es 0 a 5.

[0111] Adaptadores biespecíficos

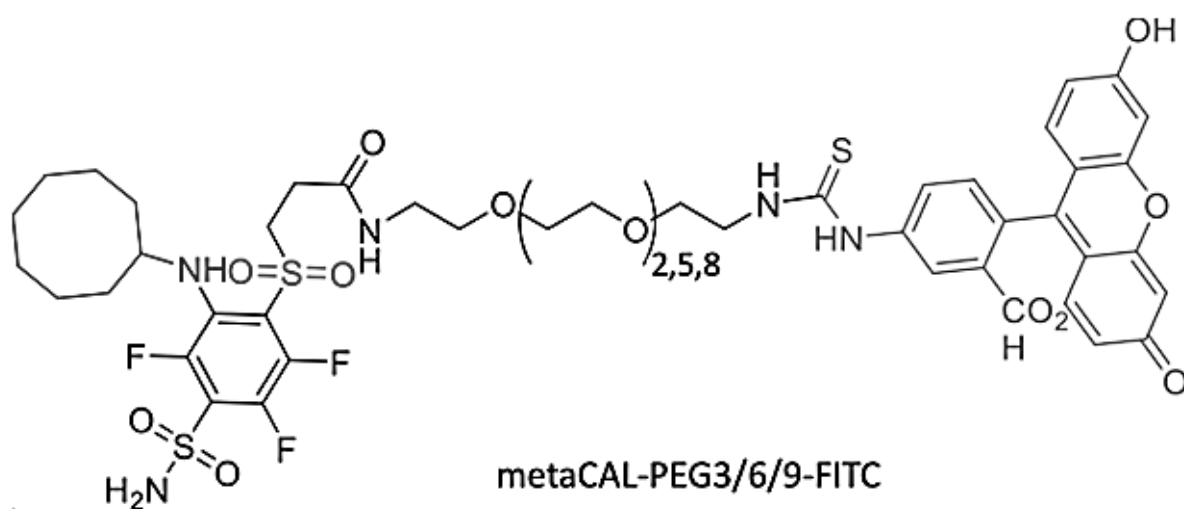
[0112] El adaptador biespecífico, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, puede ser para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa CAIX y comprender un ligando fluoresceína–enlazador–CAIX. El adaptador biespecífico puede tener una estructura de las fórmulas mostradas en la **FIG. 1**.

[0113] El adaptador biespecífico puede tener la estructura de las siguientes fórmulas:



o puede ser una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las estructuras anteriores.

[0114] El adaptador biespecífico puede tener la estructura de la siguiente fórmula o ser una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma:



[0115] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico es para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa CAIX, en donde la fluoresceína del mismo comprende FITC, el radical del ligando de CAIX es *orto*-CAL, y el enlazador comprende (o

consiste esencialmente en o consiste de) PEG, o en donde el adaptador es una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de lo anterior.

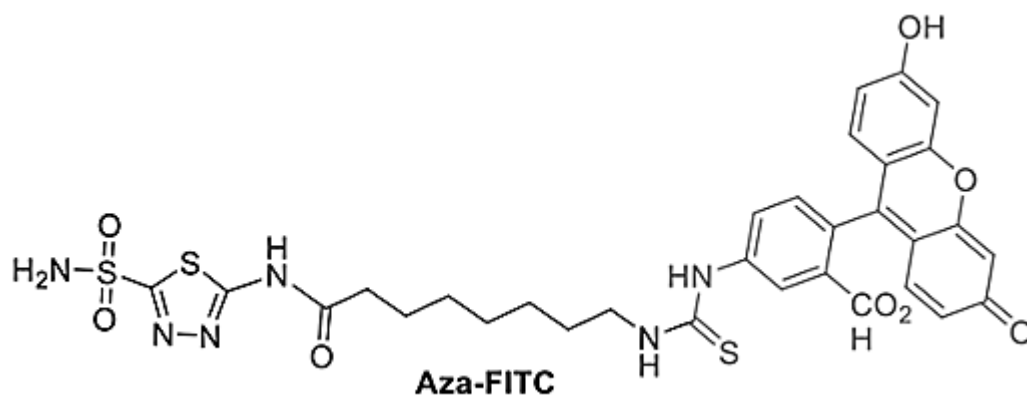
[0116] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico es para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa CAIX, en donde la fluoresceína del mismo comprende FITC, el radical del ligando de CAIX es *orto*-CAL, y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste de) PEG₁, PEG₆, o PEG₉, o en donde el adaptador es una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de lo anterior.

[0117] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico es para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa CAIX, en donde la fluoresceína del mismo comprende FITC, el radical del ligando de CAIX es *orto*-CAL, y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste de) (CH₂)₄, o en donde el adaptador es una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de lo anterior.

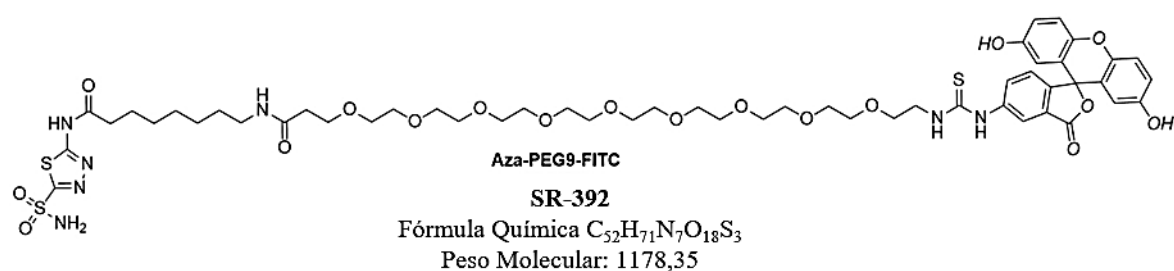
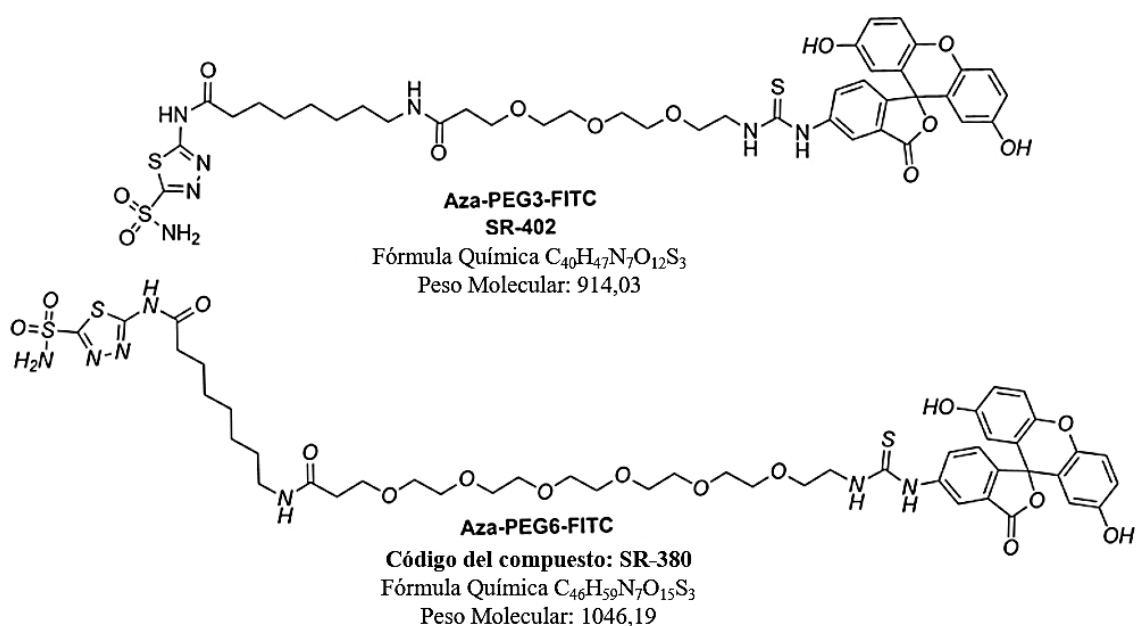
[0118] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico es para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa CAIX, en donde la fluoresceína del mismo comprende FITC, el radical del ligando de CAIX es *meta*-CAL, y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste de) PEG₃, PEG₆, o PEG₉, o en donde el adaptador es una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de lo anterior.

[0119] También se proporciona un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa CAIX, en donde la fluoresceína del mismo comprende fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína, el radical del ligando de CAIX es Aza, y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste de) PEG, o en donde el adaptador es una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de lo anterior. Allí, el enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₁ a PEG₉. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₆. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir de) PEG₉.

[0120] El adaptador biespecífico puede tener una estructura de las siguientes fórmulas o ser una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de las mismas:



[0121] El adaptador biespecífico puede tener una estructura de las siguientes fórmulas, o comprender una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de las mismas:



[0122] El adaptador biespecífico puede contener uno o más centros quirales o puede, en otro caso, ser capaz de existir como múltiples estereoisómeros. En consecuencia, varias realizaciones del adaptador biespecífico pueden incluir estereoisómeros puros, así como mezclas de estereoisómeros, tales como enantiómeros, diastereómeros, y mezclas enriquecidas enantioméricamente o diastereoméricamente. El adaptador biespecífico puede ser capaz de existir como isómeros geométricos, tales como isómeros geométricos puros o mezclas de isómeros geométricos.

[0123] Los conjugados de adaptador biespecífico pueden sintetizarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Varios métodos de síntesis se ejemplifican en los Ejemplos.

[0124] Sales

[0125] Los adaptadores biespecíficos del presente documento pueden presentarse como una sal farmacéuticamente aceptable. Una “sal farmacéuticamente aceptable” de un adaptador biespecífico se refiere a aquellas sales cuyos contraiones pueden usarse en productos farmacéuticos. Tales sales incluyen (i) sales de adición de ácido, que pueden obtenerse por reacción de la base libre del conjugado progenitor con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido hidrobromídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido perclórico, y similares, o con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido (D) o (L) málico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido malónico, y similares, y (ii) sales formadas cuando un protón ácido presente en el conjugado progenitor es reemplazado por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion de tierra alcalina, o un ion de aluminio, o se coordina con una base orgánica, tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trimetamina, N-metilglucamina, y similares.

[0126] En diversas realizaciones, las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Ejemplos ilustrativos incluyen sales de arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y zinc. También pueden formarse hemisales de ácidos y bases, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio.

[0127] Las sales farmacéuticamente aceptables pueden sintetizarse a partir del conjugado adaptador biespecífico progenitor que contiene una porción básica o ácida mediante métodos químicos convencionales. En algunos casos, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos conjugados con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de ambos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, cuya divulgación se incorpora por la presente como referencia.

[0128] El adaptador biespecífico, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, puede existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluidas las formas hidratadas. Las formas solvatadas pueden ser equivalentes a las formas no solvatadas. En cada realización del presente documento, se entenderá que las fórmulas incluyen y representan no solo todas las sales farmacéuticamente aceptables de los adaptadores biespecíficos, sino que también

incluyen todos y cualesquiera hidratos y/o solvatados de las fórmulas de conjugado o de sus sales. El término “solvato” significa un compuesto, o una sal del mismo, que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. Cuando el disolvente es agua, el solvato es un hidrato.

[0129] Ciertos grupos funcionales, tales como hidroxilo, amino y similares, pueden formar complejos y/o conjugados de coordinación con agua y/o diversos disolventes. En consecuencia, se debe entender que las fórmulas incluyen y representan esos diversos hidratos y/o solvatados. También se incluyen las formas no hidratadas y/o no solvatadas de los adaptadores biespecíficos.

[0130] Composiciones farmacéuticas

[0131] A la luz de lo anterior, también se proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) para el tratamiento de cáncer (por ejemplo, un cáncer que expresa CAIX) que comprende al menos un adaptador biespecífico y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. “Vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como, pero sin limitarse a, un agente amortiguador, un agente conservante, un agente anestésico, un agente solubilizante, un agente isotónico, un agente humectante y un estabilizador. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia regulatoria, como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (U.S. Food and Drug Administration), o listados en la Farmacopea de los EE. UU. para uso en animales (por ejemplo, mamíferos, como humanos). El vehículo puede ser una solución salina tamponada con fosfato, agua, o una emulsión tal como una emulsión aceite/agua o agua/aceite.

[0132] También se proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa CAIX que comprende cualquiera de los adaptadores biespecíficos del presente documento (por ejemplo, una fluoresceína-enlazador-CAIX) y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0133] Los adaptadores biespecíficos pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un hospedador mamífero, tal como un paciente humano, en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración elegida. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse para y administrarse por vías oral o parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, epidural, intraventricular cerebral, intrauretral, in esternal, intracraneal, intratumoral, intramuscular, tópica, por inhalación y/o subcutánea. En efecto, en al menos una realización, un adaptador biespecífico y/o una composición según se describe en el presente documento pueden administrarse directamente en el torrente sanguíneo, en músculo, o en un órgano interno.

[0134] Por ejemplo, en al menos una realización, los adaptadores biespecíficos presentes pueden administrarse sistémicamente (por ejemplo, por vía oral) en combinación con un vehículo

farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Para la administración terapéutica oral, el adaptador biespecífico puede combinarse con uno o más excipientes y utilizarse en forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar y puede estar entre aproximadamente 1 a aproximadamente 99% en peso del/de los ingrediente(s) activo(s) y un aglutinante, excipientes, un desintegrante, un lubricante y/o un edulcorante (según se conocen en la técnica). La cantidad de conjugado activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosis eficaz.

[0135] Los adaptadores biespecíficos y las composiciones farmacéuticas del presente documento pueden formularse como formulaciones parenterales. Las formulaciones parenterales son típicamente soluciones acuosas, que pueden contener vehículos o excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes amortiguadores (preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero pueden formularse más adecuadamente como una solución estéril no acuosa o como una forma seca para utilizarse en conjunción con un vehículo adecuado tal como agua estéril y apirógena o solución salina estéril. La preparación bajo condiciones estériles, por liofilización para producir un polvo liofilizado estéril para una formulación parenteral, puede lograrse utilizando métodos bien conocidos en la técnica. La solubilidad del adaptador biespecífico, o de una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, para formulación parenteral puede incrementarse mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes potenciadores de solubilidad.

[0136] Los adaptadores/composiciones biespecíficos también pueden administrarse por infusión o inyección (por ejemplo, utilizando inyector con aguja (incluidos microagujas) y/o inyectores sin aguja). Las soluciones de la composición pueden ser acuosas, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico y/o pueden contener vehículos o excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes amortiguadores (preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una solución estéril no acuosa o como una forma seca para utilizarse en conjunción con un vehículo adecuado tal como agua estéril y apirógena o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Por ejemplo, pueden prepararse dispersiones en glicerol, PEGs líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener además un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

[0137] Las formas farmacéuticas de dosificación adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden los ingredientes activos y que están adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables o infundibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En

todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. El vehículo o disolvente líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquida que comprende, por ejemplo y sin limitación, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, PEG(s) líquido(s) y similares), aceites vegetales, ésteres glicéricos no tóxicos y/o mezclas adecuadas de los mismos. En al menos una realización, la fluidez adecuada puede mantenerse mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La acción de microorganismos puede prevenirse mediante la adición de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En ciertos casos, será deseable incluir uno o más agentes isotónicos tales como azúcares, tampones o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante la incorporación de agentes formulados para retrasar la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0138] Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el(los) adaptador(es) biespecífico(s) y/o la composición en la cantidad requerida del disolvente apropiado con uno o más de los otros ingredientes establecidos anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier otro ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente esterilizadas por filtración.

[0139] Para administración tópica, puede ser deseable administrar los adaptadores biespecíficos a la piel como composiciones o formulaciones en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los vehículos sólidos pueden incluir sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. De manera similar, los vehículos líquidos útiles pueden comprender agua, alcoholes o glicoles o mezclas agua-alcohol/glicol, en las que los conjugados presentes pueden disolverse o dispersarse a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Adicional o alternativamente, pueden añadirse coadyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse desde almohadillas absorbentes, utilizarse para impregnar vendajes y/o otros apósitos, pulverizarse sobre el área objetivo usando pulverizadores tipo bomba o aerosoles, o simplemente aplicarse directamente a un área deseada del sujeto.

[0140] Espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados también pueden

emplearse con vehículos líquidos para formar pastas, geles, ungüentos, jabones y similares untables para su aplicación directa sobre la piel del sujeto.

[0141] La cantidad del adaptador biespecífico (o sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo) que se administrará a un sujeto puede variar significativamente, dependiendo del cáncer que se esté tratando, la vía de administración y la distribución tisular. Tal como se usa en el presente documento, los términos “terapéuticamente eficaz”, “dosis terapéuticamente eficaz”, “cantidad terapéuticamente eficaz”, “cantidad profilácticamente eficaz” o “dosis profilácticamente eficaz” significan (a menos que se indique específicamente lo contrario) una cantidad de un adaptador biespecífico que, cuando se administra ya sea una vez o a lo largo de un ciclo de tratamiento, afecta la salud, el bienestar o la mortalidad de un sujeto (por ejemplo, y sin limitación, retrasa el inicio y/o reduce la gravedad de uno o más de los síntomas asociados con un cáncer). Las dosis útiles de los adaptadores biespecíficos pueden determinarse comparando su actividad *in vitro* y la actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos de extrapolación de dosis eficaces en ratones y otros animales a sujetos humanos son conocidos en la técnica. En efecto, la dosis del adaptador biespecífico puede variar significativamente dependiendo de la condición del sujeto hospedador, el cáncer que se esté tratando, cuán avanzada esté la patología, la vía de administración del adaptador biespecífico y la distribución tisular, y la posibilidad de co-uso de otros tratamientos terapéuticos (tales como radioterapia o fármacos adicionales en terapias combinadas como, por ejemplo, terapia con células CAR T). La cantidad de la composición requerida para su uso en el tratamiento (por ejemplo, la cantidad o dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz) variará no solo con la aplicación particular, sino también con la sal seleccionada (si corresponde) y las características del sujeto (tales como, por ejemplo, edad, condición, sexo, superficie corporal y/o masa del sujeto, tolerancia a fármacos) y, en última instancia, estará a discreción del médico, clínico u otro profesional tratante.

[0142] La cantidad a administrar a un sujeto puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 30 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 25 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 20 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 15 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 9 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 8 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 7 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 6 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 5 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 4 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 3 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 2 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 1 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta

aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 20 mg, aproximadamente 0,3 mg hasta aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 20 mg, o aproximadamente 0,8 mg hasta aproximadamente 3 mg. El técnico ordinario experto en la materia apreciará fácilmente que la dosis puede variar dentro de los diversos intervalos proporcionados anteriormente en función de los factores señalados y puede quedar a discreción del médico tratante.

[0143] Las cantidades o dosis terapéuticamente eficaces o profilácticamente eficaces pueden variar, por ejemplo, desde aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal del paciente hasta aproximadamente 30,0 mg/kg de peso corporal del paciente, o desde aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal del paciente hasta aproximadamente 5,0 mg/kg de peso corporal del paciente, incluyendo pero sin limitarse a 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg y 5,0 mg/kg, todos los cuales son kg de peso corporal del paciente. La cantidad total terapéuticamente o profilácticamente eficaz del adaptador biespecífico puede administrarse en dosis únicas o divididas y puede, a discreción del profesional, quedar fuera del rango típico dado en el presente documento.

[0144] En otra realización, el adaptador biespecífico puede administrarse en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de aproximadamente 0,5 g/m² a aproximadamente 500 mg/m², de aproximadamente 0,5 g/m² a aproximadamente 300 mg/m², o de aproximadamente 100 g/m² a aproximadamente 200 mg/m². En otras realizaciones, las cantidades pueden ser de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m², de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 300 mg/m², de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m², de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m², de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 50 mg/m², de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 600 mg/m², de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 6,0 mg/m², de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 4,0 mg/m², o de aproximadamente 0,5 mg/m² a aproximadamente 2,0 mg/m². La cantidad total puede administrarse en dosis únicas o divididas y puede, a discreción del médico, quedar fuera del rango típico dado en el presente documento. Estas cantidades se basan en metros de superficie corporal. Todos los intervalos especificados en este párrafo incluyen los puntos finales indicados e incluyen todos los incrementos de 0,5 g/m² comprendidos en cada intervalo especificado.

[0145] En otras realizaciones, la cantidad del adaptador biespecífico (o sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo) que se administrará a un sujeto puede variar, por

ejemplo, desde aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 3.000 nmol/kg de peso corporal del sujeto, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 2.000 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 1.000 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 900 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 800 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 700 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 600 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 500 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 400 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 300 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 200 nmol/kg, aproximadamente 50 nmol/kg hasta aproximadamente 100 nmol/kg, aproximadamente 100 nmol/kg hasta aproximadamente 300 nmol/kg, aproximadamente 100 nmol/kg hasta aproximadamente 500 nmol/kg, aproximadamente 100 nmol/kg hasta aproximadamente 1.000 nmol/kg, o aproximadamente 100 nmol/kg hasta aproximadamente 2.000 nmol/kg de peso corporal del sujeto. En otras realizaciones, la dosis puede ser aproximadamente 100 nmol/kg, aproximadamente 150 nmol/kg, aproximadamente 200 nmol/kg, aproximadamente 250 nmol/kg, aproximadamente 300 nmol/kg, aproximadamente 350 nmol/kg, aproximadamente 400 nmol/kg, aproximadamente 450 nmol/kg, aproximadamente 500 nmol/kg, aproximadamente 600 nmol/kg, aproximadamente 700 nmol/kg, aproximadamente 800 nmol/kg, aproximadamente 900 nmol/kg, aproximadamente 1.000 nmol/kg, aproximadamente 2.000 nmol/kg, o aproximadamente 3.000 nmol/kg de peso corporal del sujeto. En otras realizaciones, puede administrarse entre aproximadamente 20 µg/kg hasta aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal del sujeto. La cantidad puede estar entre aproximadamente 0.2 mg/kg hasta aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corporal del sujeto o aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal del sujeto. Todos los intervalos especificados en este párrafo incluyen los puntos finales indicados e incluyen todos los incrementos de 1 nmol/kg o 10 µg/kg, según corresponda, comprendidos en cada intervalo especificado.

[0146] Usos y métodos

[0147] Además, se proporciona un método de tratamiento de cáncer en un sujeto (por ejemplo, un cáncer que expresa CAIX). El método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para tratar el cáncer de (i) células CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) o una composición farmacéutica que comprende las mismas y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y (ii) un adaptador biespecífico o una composición farmacéutica que comprende el mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0148] Los términos “tratar”, “tratamiento”, “tratado” y “tratamiento” se refieren al tratamiento terapéutico. Tal tratamiento puede tener un efecto profiláctico. El cáncer se trata cuando los

síntomas o signos de cáncer se mejoran, tales como una reducción en el tamaño de un tumor, eliminación total o parcial de un tumor, estabilización del cáncer tal como inhibiendo la progresión del cáncer (por ejemplo, aumento en el tamaño de un tumor o aumento en el número de tumores, como por metástasis), o cualquier otro efecto sobre el cáncer que un médico consideraría que constituye tratamiento terapéutico (o profiláctico).

[0149] El término “sujeto”, tal como se usa en el presente documento, significa un animal, tal como un mamífero, y en particular un humano. En aplicaciones veterinarias, el sujeto puede ser un animal de laboratorio, agrícola, doméstico o silvestre. Ejemplos de tales animales incluyen, pero no se limitan a, un roedor, un conejo, un mono, un chimpancé, un perro, un gato, una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra, un oso, un panda, un león, un tigre, un leopardo, un elefante, una cebrá, una jirafa, un gorila, un delfín o una ballena.

[0150] Las células CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) son células T (alternativamente, pueden utilizarse células NK) diseñadas para expresar un CAR que reconoce y se une a fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) en el adaptador biespecífico.

[0151] El CAR es una proteína de fusión que comprende al menos tres dominios, que incluyen (i) una región de reconocimiento (por ejemplo, una región de fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo), que reconoce y se une a fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) con especificidad, (ii) un dominio de coestimulación, que mejora la proliferación y supervivencia de los linfocitos T, y (iii) un dominio de señalización de activación, que genera una señal de activación de linfocitos T citotóxicos.

[0152] Pueden utilizarse regiones scFv de anticuerpos que se unan a fluoresceína (por ejemplo, en FITC) y prepararse a partir de (i) un anticuerpo conocido en la técnica que se une a fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína), (ii) un anticuerpo anti-fluoresceína preparado de nuevo, o (iii) variantes de secuencia derivadas de las regiones scFv de dichos anticuerpos, por ejemplo, regiones scFv que tengan al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región scFv de la que derivan. La porción de unión del CAR puede ser, por ejemplo, un scFv de un anticuerpo, un fragmento Fab, Fv, Fc o (Fab')₂.

[0153] “Porcentaje (%) de identidad de secuencia” con referencia a una secuencia de polipéptido o nucleótido se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o ácidos nucleicos, respectivamente, en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos en la secuencia de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, de ser necesario, para lograr el máximo

porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La alineación para efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia puede lograrse de diversas maneras dentro de la pericia de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático de acceso público. Por ejemplo, la determinación de identidad o similitud porcentual entre secuencias puede realizarse, por ejemplo, usando el programa GAP (Genetics Computer Group, software; disponible ahora vía Accelrys en línea), y las alineaciones pueden realizarse usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW (software VNTI, InforMax Inc.). Además, puede buscarse una base de datos de secuencias usando la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de interés. Los algoritmos para búsqueda en bases de datos suelen basarse en el software BLAST (Altschul et al., 1990), pero los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluidos cualesquiera algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan. En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad puede determinarse a lo largo de la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico o aminoácido.

[0154] En varias realizaciones, el CAR tiene una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína, que puede unirse a fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína (véase, por ejemplo, el anticuerpo anti-fluoresceína E2 descrito en Vaughan et al., *Nature Biotechnol* 14(3): 309-314 (1996), y el constructo de CAR ejemplar, que expresa un CAR que comprende el anticuerpo anti-fluoresceína E2, mostrado en la Fig. 1 y descrito en la página 66, línea 16, hasta la página 69, línea 12, de la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2019/144091, ambos incorporados por la presente como referencia por sus enseñanzas al respecto). El CAR tiene un dominio de coestimulación, y el dominio de coestimulación puede ser CD28 (cluster de diferenciación 28), CD2 (cluster de diferenciación 2), CD137 (cluster de diferenciación 137; 4-1BB), un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), CD134 (cluster de diferenciación 134; OX40), un miembro de la superfamilia de receptores del TNF (TNFR), CD27 (cluster de diferenciación 27), CD30 (cluster de diferenciación 30), CD150 (cluster de diferenciación 150), DAP10, NKG2D, CD278 (cluster de diferenciación 278; ICOS), una molécula coestimuladora de la superfamilia CD28 expresada en células T activadas, la familia de receptores relacionados con la molécula de activación linfocítica (SLAM) (como 2B4), o cualquier combinación de los anteriores. También pueden utilizarse variantes de secuencia de los dominios de coestimulación, que tengan la misma o similar actividad que el dominio en el que se modelan, sin afectar adversamente el método. El CAR tiene un dominio de señalización de activación, y el dominio de señalización de activación puede ser una cadena CD3 ζ de células T, la proteína receptora delta de CD3, la proteína receptora mbl, la proteína receptora B29, o un receptor Fc γ . También pueden utilizarse variantes de

secuencia de los dominios de señalización de activación, que tengan la misma o similar actividad que el dominio en el que se modelan, sin afectar adversamente el método. Tales dominios de coestimulación y variantes de dichos dominios de coestimulación y dominios de señalización de activación pueden tener al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que derivan.

[0155] En una realización de un CAR que comprende un fragmento de anticuerpo anti-fluoresceína E2, el CAR comprende un dominio bisagra de IgG4 y un dominio transmembrana de CD28. El dominio de coestimulación es CD137 (4-1BB), y el dominio de señalización de activación es CD3ζ.

[0156] En ciertas realizaciones, un CAR comprende un scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína como región de reconocimiento, un dominio de coestimulación CD137 (4-1BB) y CD3ζ como dominio de señalización de activación.

[0157] Los constructos que codifican CAR se preparan utilizando técnicas de ingeniería genética. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001), que se incorpora por la presente como referencia. A modo de ejemplo, puede prepararse un plásmido o vector de expresión viral (por ejemplo, un vector lentiviral, un vector retroviral, sleeping beauty y piggyback (sistemas transposón/transposasa que incluyen un sistema de administración génica de CAR no mediado por virus)) para codificar una proteína de fusión que comprenda una región de reconocimiento, uno o más dominios de coestimulación y un dominio de señalización de activación en marco de lectura y enlazados en dirección 5' a 3'. Otros arreglos pueden ser aceptables e incluir una región de reconocimiento, un dominio de señalización de activación y uno o más dominios de coestimulación. La colocación de la región de reconocimiento en la proteína de fusión será generalmente tal que se logre la exposición de la región en el exterior de la célula. El CAR también puede incluir elementos adicionales, tales como un péptido señal para asegurar la correcta exportación de la proteína de fusión a la superficie celular, un dominio transmembrana para asegurar que la proteína de fusión se mantenga como una proteína integral de membrana, y un dominio bisagra que confiera flexibilidad a la región de reconocimiento y permita una unión fuerte a la porción de direccionamiento al CAR.

[0158] Los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) pueden diseñarse genéticamente para expresar constructos de CAR transfectando una población de linfocitos T con un vector de expresión que codifique el constructo de CAR. Métodos adecuados para preparar una población

transducida de linfocitos T que expresen un constructo de CAR son bien conocidos por el técnico experto y se describen en Sambrook et al. (2001), *supra*.

[0159] Los linfocitos T pueden ser autólogos, aunque pueden usarse células heterólogas, como cuando el paciente que está siendo tratado ha recibido quimioterapia a dosis altas o radioterapia para destruir el sistema inmunitario del paciente. En varias realizaciones, pueden utilizarse células alogénicas.

[0160] Los linfocitos T pueden obtenerse de un paciente por medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden obtenerse células T recolectando sangre periférica del paciente, sometiendo la sangre a centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y, posteriormente, utilizando un kit de aislamiento negativo de células T (como EasySep™ T Cell Isolation Kit) para aislar una población de células T citotóxicas de la sangre periférica. En varias realizaciones, la población de linfocitos T citotóxicos no necesita ser pura y puede contener otras células, tales como otras células T, monocitos, macrófagos, células asesinas naturales y células B. La población de células que se recolecta puede comprender al menos aproximadamente 90 % del tipo celular seleccionado, tal como al menos aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % del tipo celular seleccionado.

[0161] Después de obtener los linfocitos T, las células pueden cultivarse en condiciones que promuevan la activación de las células. Las condiciones de cultivo pueden ser tales que las células puedan administrarse a un paciente sin preocupación por reactividad frente a componentes del medio de cultivo. Por ejemplo, las condiciones de cultivo pueden no incluir productos de suero bovino, tales como albúmina sérica bovina (BSA). La activación puede lograrse introduciendo activadores conocidos en el medio de cultivo, tales como anticuerpos anti-CD3 en el caso de células T citotóxicas. Otros activadores adecuados incluyen anticuerpos anti-CD28. La población de linfocitos puede cultivarse en condiciones que promuevan la activación durante aproximadamente 1 a aproximadamente 4 días. El nivel apropiado de activación puede determinarse por tamaño celular, tasa de proliferación o marcadores de activación determinados por citometría de flujo.

[0162] Después de que la población de linfocitos T citotóxicos se ha cultivado en condiciones que promueven la activación, las células pueden transfectarse con un vector de expresión que codifique un CAR. Tras la transfección, las células pueden administrarse inmediatamente al paciente o las células pueden cultivarse durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más días, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 12 días, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 13 días, entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días, o entre aproximadamente 8 y aproximadamente 15 días, por ejemplo, para permitir tiempo para que las células se recuperen de la transfección. Las condiciones de

cultivo adecuadas pueden ser similares a las condiciones bajo las cuales las células se cultivaron para la activación, con o sin el agente que se utilizó para promover la activación.

[0163] Cuando las células han sido transfectadas y activadas, puede prepararse una composición que comprenda las células CAR-T y administrarse al sujeto. Pueden utilizarse medios de cultivo que carezcan de cualquier producto animal, tales como BSA. Pueden utilizarse condiciones de cultivo tisular típicamente utilizadas en la técnica para evitar la contaminación con bacterias, hongos y micoplasma. Las células pueden sedimentarse en pellet, lavarse y resuspenderse en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0164] Composiciones ejemplares que comprenden células CAR-T incluyen composiciones que comprenden las células en solución salina estéril de 290 mOsm, criomedios infundibles (que contienen Plasma-Lyte A, dextrosa, cloruro de sodio, albúmina sérica humana (HSA) y dimetilsulfóxido (DMSO)) en 0,9 % de NaCl con 2 % de HSA, o en cualquier otro material infundible estéril de 290 mOsm. Dependiendo de la identidad del medio de cultivo, las células CAR-T pueden administrarse en el medio de cultivo como la composición o concentrarse y resuspenderse en el medio de cultivo antes de la administración.

[0165] La composición de células CAR-T puede administrarse al sujeto por cualquier medio adecuado, tal como administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intratecal.

[0166] El número total de células CAR-T y la concentración de las células en la composición administrada al sujeto variarán según diversos factores, incluidos el tipo de células CAR-T que se utilicen, la especificidad de unión del CAR, la identidad de la porción de direccionamiento al CAR (en los ejemplos aquí, FITC) y la identidad del ligando de molécula pequeña/ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico (por ejemplo, un ligando de CAIX), la identidad del cáncer, la localización del cáncer en el sujeto, los medios utilizados para administrar las composiciones al sujeto, y la salud, edad y peso del sujeto tratado. Composiciones adecuadas que comprenden células CAR-T transducidas incluyen aquellas que tienen un volumen de entre aproximadamente 5 ml y aproximadamente 200 ml, que contienen de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{15} células CAR-T transducidas. Las composiciones típicas comprenden un volumen de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 125 ml y contienen de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{10} células CAR-T. Una composición ejemplar comprende aproximadamente 1×10^9 células CAR-T en un volumen de aproximadamente 100 ml. Puede administrarse al sujeto una dosis única o múltiples dosis de las células CAR-T. Las composiciones pueden comprender aproximadamente 1 millón (M), 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M, 8 M, 9 M, 10 M, 11 M, 12 M, 12,5 M, 13 M, 14 M o 15 M células CAR-T, por ejemplo, por kg de peso corporal del paciente. Cuando la composición de células CAR-T se administra por

inyección en el torrente sanguíneo del sujeto, las células CAR-T en el torrente sanguíneo del sujeto constituyen al menos 5 %, 7 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 % de las células T totales del sujeto en el torrente sanguíneo aproximadamente a las cuatro semanas después de la inyección; al menos 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 50 % de las células T totales del sujeto en el torrente sanguíneo aproximadamente a las dos semanas después de la inyección; o al menos 85 %, 90 % o 95 % de las células T totales del sujeto aproximadamente a la una semana después de la inyección.

[0167] El adaptador biespecífico (o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo) o una composición farmacéutica que comprenda el mismo, o una combinación de estos y las células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprenda las células CAR-T anti-fluoresceína, pueden administrarse al paciente utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los términos “administrar”, “administrando”, “administrado” y “administración” se refieren a métodos de introducir el adaptador biespecífico (o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo) o una composición farmacéutica que comprenda el adaptador biespecífico (o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo) y métodos de introducir las células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprenda las células CAR-T anti-fluoresceína. Ejemplos de vías de administración adecuadas incluyen, sin limitarse a, oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea y transdérmica. Los componentes pueden administrarse directamente en el torrente sanguíneo, en músculo o en un órgano interno. Las vías adecuadas para la administración parenteral incluyen, sin limitarse a, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intratecal, epidural, intraventricular cerebral, intrauretral, in esternal, intracraneal, intratumoral, intramuscular y subcutánea. Puede hacerse uso de inyectores con aguja, incluidas microagujas, inyectores sin aguja e infusiones. Los componentes pueden administrarse en formas de dosificación unitaria y/o formulaciones que contengan vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales no tóxicos (o vehículos o adyuvantes).

[0168] En el método, las células CAR-T anti-fluoresceína (o una composición farmacéutica que comprenda células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable) y el adaptador biespecífico pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías. Cuando se administran simultáneamente por la misma vía, las formulaciones pueden ser iguales o diferentes. En varias realizaciones, el adaptador biespecífico puede administrarse al sujeto después de las células CAR-T. El momento entre la administración de las células CAR-T y la administración del adaptador biespecífico puede variar ampliamente dependiendo de factores que incluyen el tipo de células CAR-T que se utilicen, la especificidad de unión del CAR, la identidad de la porción de direccionamiento al CAR (en los ejemplos aquí, una fluoresceína) y el ligando de molécula pequeña/porción de direccionamiento del adaptador biespecífico (es decir, ligandos de CAIX), la identidad del cáncer, la localización

del cáncer en el sujeto, los medios utilizados para administrar al sujeto las células CAR-T y el adaptador biespecífico, así como la salud, edad y peso del paciente.

[0169] El(los) adaptador(es) biespecífico(s) puede(n) administrarse antes o después de las células CAR-T, por ejemplo, dentro de aproximadamente 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 o 24 horas, o dentro de aproximadamente 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 o más días. La tasa de lisis tumoral puede regularse ajustando la tasa de administración del adaptador biespecífico, por ejemplo (por ejemplo, como función del esquema de dosificación, como continuo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, una vez por semana, dos veces por semana o tres veces por semana). Por “continuo” se entiende durante al menos una hora, al menos cuatro horas, al menos seis horas, al menos ocho horas, al menos 10 horas, al menos 12 horas o al menos 24 horas, o un régimen de administración diaria o semanal, tal como una vez/día, dos veces/día, tres veces/día, día por medio, una vez/semana, dos veces/semana, tres veces/semana o cualquier otro régimen adecuado. En el método, las células CAR-T anti-fluoresceína (o una composición farmacéutica que comprenda células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable) y el adaptador biespecífico pueden administrarse por vía intravenosa. El cáncer puede ser cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga o carcinoma de células renales de células claras (por ejemplo, carcinoma de células renales de células claras en estadio 3-4). El cáncer puede ser cáncer endometrial o glioma (por ejemplo, glioma en estadio 3-4).

[0170] El síndrome de liberación de citocinas (CRS) puede controlarse variando la dosis del adaptador biespecífico. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2017/177149.

[0171] Tales métodos de terapia combinada pueden realizarse utilizando cualquier célula diseñada adecuada para el tratamiento de cáncer y pueden incluir el uso de más de uno de estos tipos de agentes. En ciertas realizaciones, la célula diseñada utilizada en esta terapia combinada son células T CAR y también pueden (o alternativamente) comprender células madre diseñadas y otras células.

[0172] Las células diseñadas utilizadas en combinación con los adaptadores biespecíficos o composiciones pueden ser cualesquiera células T CAR, células madre u otras células diseñadas o una combinación de las mismas. Varias terapias de células adoptivas (también denominadas inmunoterapia celular) son conocidas en la técnica para uso en el tratamiento de cáncer, y la inmunoterapia con células T, en particular, ha recibido mucha atención. Algunos ejemplos no limitantes de tales terapias incluyen terapia con receptor de células T (TCR) diseñado, terapia con células T CAR y terapia con células asesinas naturales (NK).

[0173] En ciertos enfoques, la administración tanto de los conjugados de adaptador biespecífico como de la terapia celular diseñada resulta en una inhibición del crecimiento del cáncer mayor que aditiva.

[0174] Cuando se coadministran múltiples agentes terapéuticos y/o terapias, las dosis pueden ajustarse en consecuencia, como se reconoce en la técnica pertinente. “Coadministración” y terapia combinada no se limitan a la administración simultánea, sino que también incluyen regímenes de tratamiento en los que un adaptador biespecífico dirigido se administra al menos una vez durante un curso de tratamiento que implica administrar una terapia celular a un sujeto.

[0175] Los métodos de tratamiento de cáncer del presente documento pueden comprender administrar cualquiera de los adaptadores biespecíficos al paciente y administrar cualquiera de las composiciones de células diseñadas o terapia de células diseñadas al paciente.

[0176] En ciertas realizaciones, se proporciona un método de tratamiento de cáncer en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para tratar el cáncer de: (i) células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprenda células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y (ii) cualquier adaptador biespecífico o cualquier composición farmacéutica que comprenda el mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los pasos (i) y (ii) pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0177] Las células CAR-T anti-fluoresceína pueden comprender cualesquiera células CAR-T adecuadas para su uso según se describe. En ciertas realizaciones, las células CAR-T anti-fluoresceína comprenden una región de reconocimiento que comprende una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína; un dominio de coestimulación, en donde el dominio de coestimulación es CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40) o CD278 (ICOS); y/o un dominio de señalización de activación que es una cadena CD3 ζ de células T o un receptor Fc γ .

[0178] En ciertas realizaciones, tanto los pasos (i) como (ii) del método se administran por vía intravenosa.

[0179] La fluoresceína del adaptador biespecífico puede unir con afinidad a la célula CAR-T anti-fluoresceína cuando se expone a la misma, y el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico puede enlazar la célula CAR-T anti-fluoresceína unida a una célula cancerígena objetivo cuando el ligando dirigido del adaptador biespecífico se une con afinidad a un receptor en dicha célula cancerígena objetivo. De este modo, los conjugados y composiciones del presente documento facilitan una eficacia mejorada de la terapia con células CAR-T.

[0180] En ciertas realizaciones, el receptor en la célula cancerígena objetivo es un CAIX sobreexpresado. El cáncer puede ser un cáncer que expresa CAIX y al menos un adaptador biespecífico de (ii) puede comprender un radical de un ligando de CAIX.

[0181] También se proporcionan métodos para tratar un cáncer que expresa CAIX en un sujeto. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para tratar el cáncer de (i) células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprenda células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y (ii) cualquier adaptador biespecífico o una composición farmacéutica que comprenda un adaptador biespecífico y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se señaló anteriormente, el CAR puede tener una región de reconocimiento, y la región de reconocimiento es una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína. En ciertas realizaciones, el CAR comprende: un dominio de coestimulación, y el dominio de coestimulación es CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40) o CD278 (ICOS); y/o un dominio de señalización de activación y el dominio de señalización de activación es una cadena CD3 ζ de células T o un receptor Fc γ .

[0182] Los métodos del presente documento pueden comprender además la obtención de imágenes del cáncer en el sujeto. La obtención de imágenes del cáncer puede comprender obtención de imágenes por imagen óptica, por ejemplo, tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

[0183] En los métodos descritos en el presente documento, el cáncer adicionalmente puede ser objeto de obtención de imágenes antes de la administración al sujeto del adaptador biespecífico, o de sus sales o hidratos farmacéuticamente aceptables, o de la composición celular diseñada (por ejemplo, una composición de linfocitos citotóxicos que expresan un CAR o una composición de células CAR-NK). El cáncer, adicional o alternativamente, puede ser objeto de obtención de imágenes durante o después de la administración para evaluar, por ejemplo, la metástasis y la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, la obtención de imágenes puede realizarse por imagen PET, imagen por resonancia magnética (MRI) o imagen SPECT/tomografía computarizada (CT). El método de obtención de imágenes puede ser cualquier método de imagen adecuado conocido en la técnica.

[0184] El cáncer puede ser cualquier cáncer. “Cáncer” tiene su significado llano y ordinario cuando se lee a la luz de la presente memoria y puede incluir, sin limitarse a, un grupo de enfermedades que implican crecimiento celular anormal con potencial de invadir o diseminarse (es decir, metastatizar) a otras partes del cuerpo. Ejemplos incluyen, sin limitarse a, un cáncer de cerebro, tiroides, pulmón, páncreas, riñón, estómago, estroma gastrointestinal, endometrio, mama, cuello uterino, ovario, colon o próstata, leucemias, linfomas, otros cánceres hematológicos y cáncer de cabeza y cuello. En ciertas realizaciones, el cáncer que se trata es un tumor. En ciertas realizaciones, el cáncer es maligno. En ciertas realizaciones, el cáncer es cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, glioma como, opcionalmente, glioma en estadio 3-4, o carcinoma

de células renales de células claras como, opcionalmente, carcinoma de células renales de células claras en estadio 3-4.

[0185] En algunos aspectos de estas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa CAIX.

[0186] En algunas realizaciones, el cáncer es objeto de obtención de imágenes antes de la administración de (i) y (ii) al sujeto. La obtención de imágenes puede realizarse por PET, MRI o SPECT/CT, por ejemplo.

[0187] En ciertas realizaciones, se proporciona un uso de un adaptador biespecífico, una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del adaptador biespecífico, o una composición en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un sujeto. El adaptador biespecífico puede ser cualquier conjugado. El medicamento puede estar destinado a usarse en combinación con la administración de una terapia celular diseñada al sujeto, tal como, por ejemplo, terapia con células T CAR, en la que las células T CAR expresan anti-fluoresceína.

[0188] Aún más, se proporciona un método para mejorar la activación de células CAR-T. El método puede comprender proporcionar un adaptador biespecífico del presente documento, una composición farmacéutica que comprenda el mismo, o una combinación de los anteriores (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anteriores); y exponer células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprenda células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable al(los) adaptador(es) biespecífico(s), a la composición farmacéutica o a la combinación; en donde la célula CAR-T experimenta una activación mejorada tras la exposición en comparación con una célula CAR-T no expuesta al adaptador biespecífico. Las células CAR-T anti-fluoresceína pueden estar en la circulación sistémica en un sujeto cuando se exponen al adaptador biespecífico, a la composición farmacéutica o a la combinación, por ejemplo. Alternativamente, las células CAR-T anti-fluoresceína pueden exponerse *in vitro* al adaptador biespecífico, a la composición farmacéutica o a la combinación (por ejemplo, antes de la administración a un sujeto).

[0189] Kits

[0190] Aún más, se proporciona un kit. El kit puede comprender (i) un adaptador biespecífico o una composición farmacéutica que comprenda el mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y (ii) células CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, células CAR-T anti-FITC) o una composición farmacéutica que comprenda las mismas y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico (o la composición farmacéutica que comprenda el mismo) y las células CAR-T (o la composición farmacéutica que comprenda las mismas) se almacenan en recipientes separados.

[0191] General

[0192] Los expertos en la técnica reconocerán que pueden realizarse numerosas modificaciones a las implementaciones específicas descritas anteriormente. Las implementaciones no deben limitarse a las realizaciones particulares descritas. Otras implementaciones pueden ser posibles.

[0193] Si bien los adaptadores biespecíficos y las composiciones farmacéuticas se ilustran y describen en detalle en la descripción precedente, la misma debe considerarse como ilustrativa y no limitativa de carácter, entendiéndose que solo se han mostrado y descrito ciertas realizaciones y que se desea proteger todos los cambios y modificaciones que caen dentro del espíritu de la invención.

[0194] Se pretende que el alcance de los presentes adaptadores biespecíficos, composiciones y métodos esté definido por las siguientes reivindicaciones. No obstante, esta divulgación puede practicarse de manera distinta a como se explica e ilustra específicamente sin apartarse de su espíritu o alcance. Los expertos en la técnica comprenderán que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones descritas en el presente documento al practicar las reivindicaciones sin apartarse del espíritu y alcance definidos en las siguientes reivindicaciones.

[0195] Cualquier uso de encabezamientos de sección tiene la intención de facilitar la lectura del documento y no debe interpretarse como limitante. Además, la información pertinente a un encabezamiento de sección puede aparecer dentro o fuera de esa sección particular.

[0196] Todas las publicaciones, patentes, publicaciones de solicitudes de patentes, artículos de revistas, libros de texto y otras publicaciones a las que se hace referencia en este documento son indicativas del nivel de habilidad de aquellos en la técnica a la que se refiere la divulgación. Todas esas publicaciones se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida como si cada publicación individual estuviera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada por referencia. En el caso de usos inconsistentes entre este documento y aquellos documentos incorporados por referencia, el uso en la referencia incorporada debe considerarse complementario al de este documento; para inconsistencias irreconciliables, prevalece el uso en este documento.

[0197] Diversas técnicas y mecanismos describirán a veces una conexión o enlace entre dos componentes. Palabras tales como unido, enlazado, acoplado, conectado y términos similares con sus morfemas flexivos se utilizan indistintamente, a menos que la diferencia se señale o resulte de otro modo clara por el contexto. Estas palabras y expresiones no significan necesariamente conexiones directas, sino que incluyen conexiones a través de componentes intermedios. Debe señalarse que una conexión entre dos componentes no significa necesariamente una conexión directa y sin impedimentos, ya que una variedad de otros componentes puede residir entre los dos componentes de interés. En consecuencia, una conexión no significa necesariamente una conexión directa y sin impedimentos a menos que se indique lo contrario.

[0198] Ciertas definiciones

[0199] Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos y frases tendrán los significados establecidos a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende para un experto ordinario en la técnica.

[0200] El término “aproximadamente” o “cerca de” significa dentro de un rango aceptable para el valor particular según lo determine un experto ordinario en la técnica, lo cual dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, por ejemplo, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar un rango de hasta 20 %, preferiblemente hasta 10 %, más preferiblemente hasta 5 % y aún más preferiblemente hasta 1 % de un valor dado. A modo de ejemplo adicional, “aproximadamente” o “cerca de” puede significar dentro de 90 %, dentro de 95 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,99 %, 99,999 % o al menos aproximadamente 99,999 % o más de un valor indicado o de un límite indicado de un rango. Alternativamente, en particular con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces, de un valor. A menos que se indique lo contrario, el término “aproximadamente” significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular, tal como $\pm 1-20$ %, preferiblemente $\pm 1-10$ % y más preferiblemente $\pm 1-5$ %.

[0201] Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese rango indicado, está abarcado. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños, y también están abarcados, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, también se incluyen los rangos que excluyen uno o ambos de esos límites.

[0202] Una frase que se refiere a “al menos uno de” una lista de elementos se refiere a cualquier combinación de esos elementos, incluidos miembros individuales. Como ejemplo, “al menos uno de a, b o c” pretende cubrir: a, b, c, a-b, a-c, b-c y a-b-c.

[0203] Los términos “un”, “una” o “el/la” se usan para incluir uno o más de uno, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. El término “o” se usa para referirse a un “o” no exclusivo, a menos que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que la fraseología o terminología empleada en el presente documento, y no definida de otro modo, es únicamente para fines de descripción y no de limitación.

[0204] El término “o” se usa para referirse a un “o” no exclusivo, a menos que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que la fraseología o terminología empleada en el presente

documento, y no definida de otro modo, es únicamente para fines de descripción y no de limitación.

[0205] Los términos y expresiones empleados se utilizan como términos de descripción y no de limitación. Cuando ciertos términos se definen y, de otro modo, se describen o discuten en otro lugar en la “Descripción detallada”, todas esas definiciones, descripciones y discusiones están destinadas a atribuirse a tales términos. Tampoco existe intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualesquiera equivalentes de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas. Además, si bien pueden utilizarse subencabezados en la “Descripción detallada”, tal uso es únicamente para facilitar la referencia y no pretende limitar ninguna divulgación realizada en una sección a esa sección únicamente; más bien, cualquier divulgación realizada bajo un subencabezado pretende constituir una divulgación bajo todos y cada uno de los demás subencabezados.

[0206] Se reconoce que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente en el contexto de realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos divulgados en el presente documento. Tales modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la invención según se reivindica en el presente documento.

EJEMPLOS

[0207] Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente divulgación. Los ejemplos no tienen la intención de limitar de ninguna manera el alcance de la invención reivindicada.

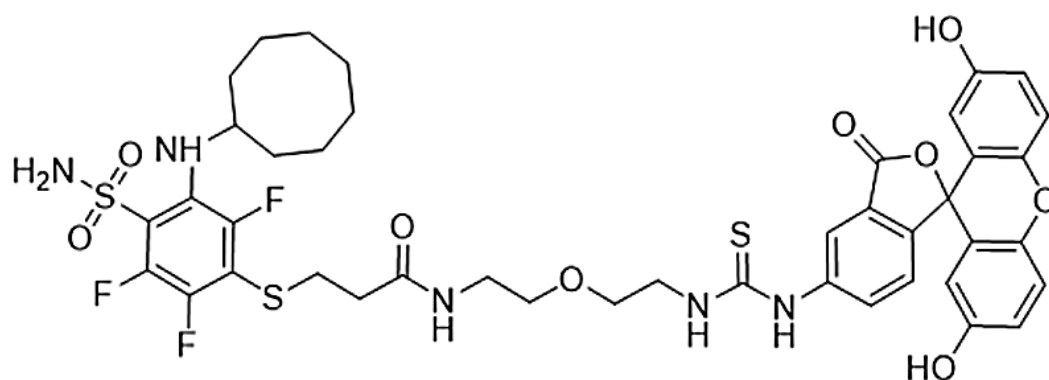
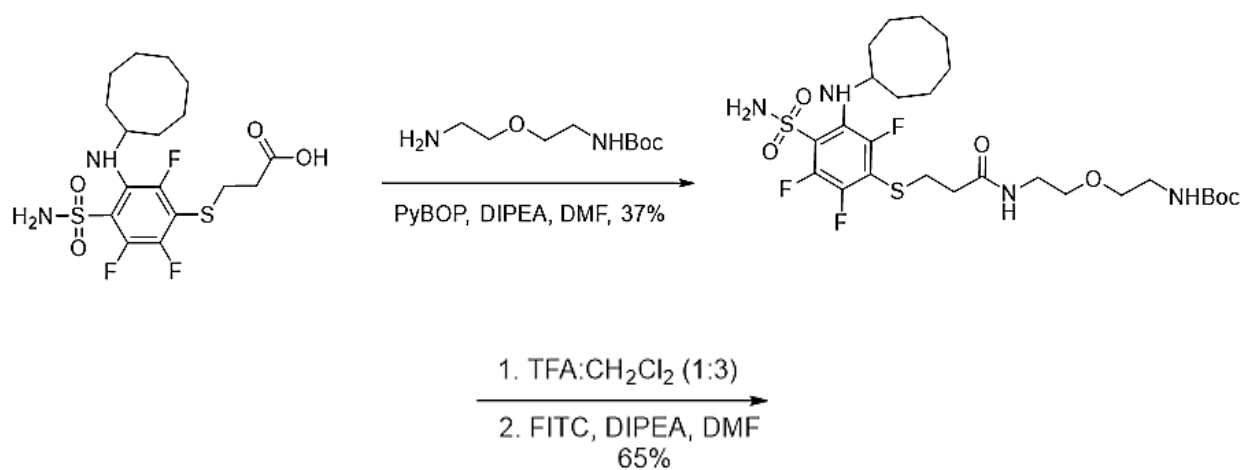
Ejemplo 1

*Procedimiento general para la síntesis de orto-CAIX-PEG₁-FITC y
Conjugados orto-(CH₂)₄-FITC*

[0208] Los conjugados orto-CAIX-PEG₁-FITC and orto-(CH₂)₄-FITC pueden sintetizarse de acuerdo con el Esquema 1.

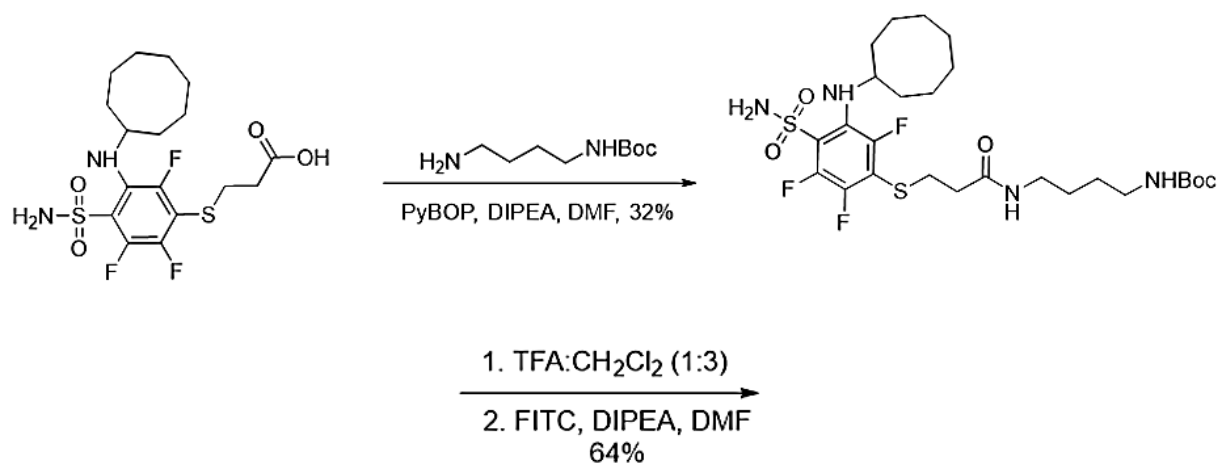
Esquema 1

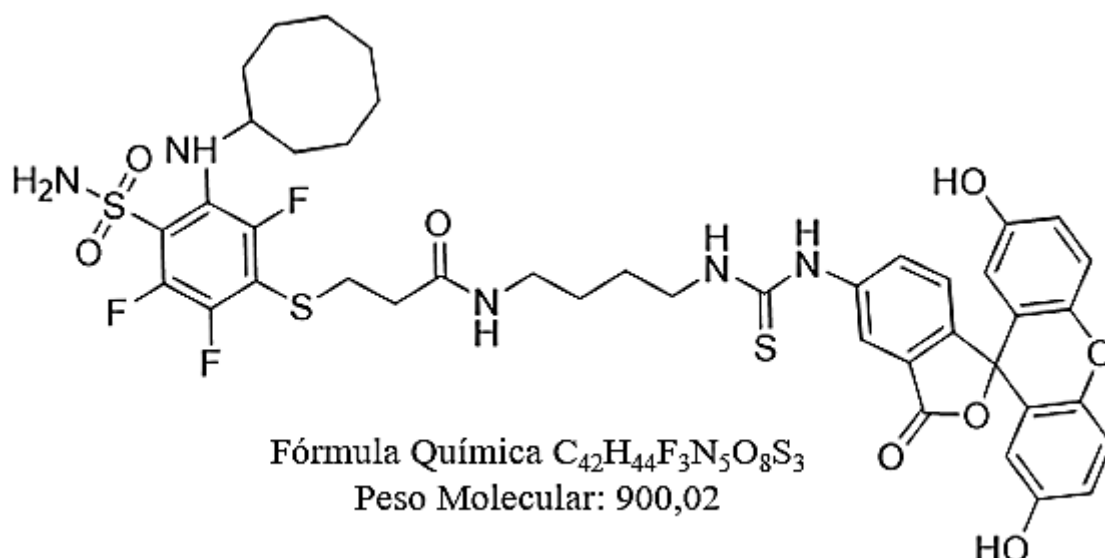
orto-CAIX-PEG₁-FITC



Fórmula Química C₄₂H₄₄F₃N₅O₉S₃
Peso Molecular: 916,02

orto-(CH₂)₄-FITC





[0209] Se añadieron PyBOP (1,2 eq) + DIPEA (2,0 eq) a una solución agitada del compuesto ácido (1,0 eq) en dimetilformamida (DMF). Tras 10 minutos de agitación, se añadieron BocNH-PEG₁-NH₂ o BocNH(CH₂)₄NH₂ (1,2 eq) a la mezcla de reacción anterior, y se continuó la agitación durante 2 horas adicionales. Tras la conversión completa de los materiales de partida (medida por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS)), la mezcla de reacción se diluyó con agua, luego se extrajo con diclorometano (DCM) (2 × 20 mL), los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y el filtrado se evaporó a presión reducida; luego se obtuvo el residuo crudo y se purificó por combiflash usando (A = acetato de amonio 10 mM, pH = 7,5, B = acetonitrilo) durante 40 minutos usando el método 5-95. Las fracciones deseadas obtenidas se mantuvieron en el liofilizador durante 48 horas para dar el producto acoplado como sólidos blancos.

[0210] A los sólidos liofilizados (0,0133 mmol) en DCM (3 mL) se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (1 mL) y se continuó la agitación durante 30 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida para proporcionar la amina libre como un sólido gomoso de color marrón. La amina obtenida se utilizó en el siguiente paso sin purificación. A una solución agitada de amina (1 eq) en DMF (500 µL) se añadieron N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) (10 eq) seguida de isotiocianato de fluoresceína isómero 1 (1 eq) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (U-HPLC) usando (A = acetato de amonio 10 mM, pH = 7,5, B = acetonitrilo) durante 60 minutos usando el método 5-35 y las fracciones deseadas obtenidas se mantuvieron rápidamente en el liofilizador durante 48 horas para proporcionar los compuestos orto-CAIX-FITC deseados como sólidos amarillos.

Ejemplo 2

Afinidades de unión de adaptadores biespecíficos dirigidos a anhidrasa carbónica IX

[0211] Células MDA–anhidrasa carbónica IX (CAIX) (0,2 million) se incubaron con adaptadores biespecíficos diluidos en serie al doble comenzando con 250 nM en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 2 % de suero fetal bovino (FBS) durante una hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez para eliminar los adaptadores no unidos. La intensidad fluorescente de los adaptadores unidos a las células se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 2A-2B**.

[0212] Para *orto*-CAL, la afinidad de unión a células CAIX⁺ disminuyó con el aumento de la longitud del enlazador. Para *meta*-CAL, la afinidad de unión a células CAIX⁺ disminuyó ligeramente con el aumento de la longitud del enlazador, pero todos los adaptadores biespecíficos *meta*-CAL presentaron mayor unión.

Ejemplo 3

Unión total y exposición superficial de adaptadores biespecíficos de CAIX

[0213] Células HT29 o células MDA-CAIX se incubaron con 1 μ M de adaptadores biespecíficos con diferentes ligandos a CAIX y diferentes enlazadores de polietilenglicol (PEG) en medio RPMI completo (RPMI + 10 % FBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron los compuestos libres, y la intensidad fluorescente de isotiocianato de fluoresceína (FITC) se analizó por citometría de flujo.

[0214] Para analizar la exposición superficial de la porción de FITC, las células teñidas se incubaron con anticuerpo alofococianina (APC)-anti-FITC sobre hielo durante 30 minutos. Luego las células se lavaron y la intensidad fluorescente de APC se analizó por citómetro de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 3A-3D**. Como se muestra en la **FIG. 3A**, *meta*-CAL-PEG₃ y Aza-FITC tuvieron mejor unión total a células HT29 que los otros adaptadores. Como se muestra en la **FIG. 3B**, los tres adaptadores *meta*-CAL-FITC tuvieron mejor unión superficial y exposición de FITC en células HT29. Como se muestra en la **FIG. 3C**, *meta*-CAL-FITC con diferentes enlazadores y Aza-FITC tuvieron mejor unión total a células MDA-CAIX. Como se muestra en la **FIG. 3D**, todos los adaptadores *meta*-CAL-FITC tuvieron mejor unión superficial y exposición de FITC que los otros adaptadores ensayados en células MDA-CAIX.

Ejemplo 4

Adaptadores biespecíficos dirigidos a CAIX que median citotoxicidad de células CAR-T anti-FITC y liberación de IFN γ en células MDA-CAIX

[0215] Las células CAR-T anti-FITC se incubaron con un número igual de células MDA-CAIX en presencia de adaptadores biespecíficos a diferentes concentraciones. El número de células MDA-CAIX se determinó al final del co-cultivo, y el porcentaje de lisis celular se calculó usando

la siguiente fórmula: $[(\text{número de células no tratadas} - \text{número de células tratadas}) / \text{número de células no tratadas}] \times 100 \%$.

[0216] La secreción de interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) de células CAR-T anti-FITC se analizó mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) usando los sobrenadantes del medio co-cultivado al final del co-cultivo. Los resultados se muestran en las FIGS. 4A-4B.

[0217] Como se muestra en la **FIG. 4A**, la eficacia de meta-CAL-PEG₆-FITC es mayor que la de orto-CAL-PEG₆-FITC y Aza-FITC entre 0,001 nM y 10 nM. Como se muestra en la **FIG. 4B**, meta-CAL-PEG₆-FITC medió un mayor nivel de liberación de $\text{IFN}\gamma$ de células CAR-T anti-FITC que orto-CAL-PEG₆-FITC y Aza-FITC cuando la concentración del adaptador estaba entre 0,001 nM y 1 nM.

Ejemplo 5

Efecto de la longitud del enlazador en la citotoxicidad mediada por adaptadores biespecíficos meta-CAL-FITC de células CAR-T anti-FITC y liberación de $\text{IFN}\gamma$ cuando se co-cultivaron con células MDA-CAIX

[0218] Las células CAR-T anti-FITC se incubaron con un número igual de células MDA-CAIX en presencia de los adaptadores biespecíficos a diferentes concentraciones. El número de células MDA-CAIX se determinó al final del co-cultivo, y el porcentaje de lisis celular se calculó usando la siguiente fórmula: $[(\text{número de células no tratadas} - \text{número de células tratadas}) / \text{número de células no tratadas}] \times 100 \%$.

[0219] La secreción de $\text{IFN}\gamma$ de células CAR-T anti-FITC se analizó mediante ELISA usando los sobrenadantes del medio co-cultivado al final del co-cultivo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 5A-5B**. Como se muestra en la **FIG. 5A**, meta-CAL-PEG₆-FITC y meta-CAL-PEG₉-FITC tuvieron mayor eficacia que meta-CAL-PEG₃-FITC a bajas concentraciones (entre 0,001 nM y 0,1 nM). Como se muestra en la **FIG. 5B**, meta-CAL-PEG₆-FITC y meta-CAL-PEG₉-FITC mediaron niveles más altos de liberación de $\text{IFN}\gamma$ de células CAR-T anti-FITC que meta-CAL-PEG₃-FITC a bajas concentraciones (entre 0,001 nM y 1 nM).

Ejemplo 6

Efecto de la longitud del enlazador en la citotoxicidad mediada por adaptadores biespecíficos orto-CAL-FITC de células CAR-T anti-FITC y liberación de $\text{IFN}\gamma$ cuando se co-cultivaron con células MDA-CAIX

[0220] Las células CAR-T anti-FITC se incubaron con un número igual de células MDA-CAIX en presencia de los adaptadores biespecíficos a diferentes concentraciones. El número de células MDA-CAIX se determinó al final del co-cultivo y el porcentaje de lisis celular se calculó usando

la siguiente fórmula: $[(\text{número de células no tratadas} - \text{número de células tratadas})/\text{número de células no tratadas}] \times 100 \%$.

[0221] La secreción de IFN γ de células CAR-T anti-FITC se analizó mediante ELISA usando los sobrenadantes del medio co-cultivado al final del estudio de co-cultivo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 6A-6B**.

[0222] Como se muestra en la **FIG. 6A**, los adaptadores biespecíficos *orto*-CAL-FITC tuvieron eficacias similares, aunque los espaciadores de PEG más largos fueron ligeramente mejores que el espaciador (CH₂)₄. Como se muestra en la **FIG. 6B**, los adaptadores biespecíficos *orto*-CAL-FITC mostraron eficacia similar, aunque los espaciadores de PEG más largos fueron ligeramente mejores que el espaciador (CH₂)₄.

Ejemplo 7

Eficacia in vivo de adaptadores biespecíficos dirigidos a CAIX en modelo tumoral HT29

[0223] Se implantaron células HT29 ($1,5 \times 10^6$) en cada ratón NOD scid gamma (NSG) mediante inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm³, los grupos de tratamiento fueron inyectados con 1×10^7 células CAR-T anti-FITC y adaptadores biespecíficos como se muestra en la **FIG. 7A**. El volumen tumoral y el peso corporal se monitorearon regularmente. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$. Los resultados se muestran en las **FIGS. 7B-7C**.

[0224] Como se muestra en la **FIG. 7B**, Aza-FITC y *meta*-CAL-PEG₃-FITC inhibieron ligeramente el crecimiento del tumor HT29, mientras que *meta*-CAL-PEG₉-FITC inhibió significativamente el crecimiento del tumor HT29. Como se muestra en la **FIG. 7C**, solo los ratones tratados con *meta*-CAL-PEG₉-FITC perdieron peso corporal. La pérdida de peso corporal podría deberse a la liberación de citocinas de células CAR-T expandidas, lo cual es una indicación de mejor funcionalidad de *meta*-CAL-PEG₉-FITC. La toxicidad puede minimizarse optimizando la dosificación del adaptador.

Ejemplo 8

Retención y exposición en superficie de adaptadores biespecíficos CAIX en células tumorales HT29

[0225] Los ratones portadores de tumores HT29 fueron inyectados con adaptadores biespecíficos CAIX a 500 nmol/kg. Después de la inyección (24 horas más tarde), los tumores fueron disecados y digeridos en células individuales. La retención total de los adaptadores biespecíficos se determinó por la intensidad de fluorescencia FITC analizada por citometría de flujo. Para analizar la exposición de FITC de los adaptadores biespecíficos en la superficie de las células tumorales,

las células tumorales digeridas se tiñeron con anticuerpo APC-anti-FITC en hielo durante 30 minutos. Después de lavar el anticuerpo no unido, la intensidad de fluorescencia de APC se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 8B-8C**.

[0226] Como se muestra en la **FIG. 8B**, todos los compuestos tuvieron muy baja retención en el tumor HT29; esto podría deberse a la baja expresión de CAIX en las células tumorales HT29. Como se muestra en la **FIG. 8C**, *meta*-CAL-FITC con diferentes enlazadores tuvo mejor retención en superficie y exposición de FITC que los otros compuestos. *Meta*-CAL-PEG₆-FITC y *meta*-CAL-PEG₉-FITC tuvieron mejor exposición de FITC que *meta*-CAL-PEG₃-FITC *in vivo*.

Ejemplo 9

Conteo de células T en la sangre y tumores HT29 de ratones al final de los tratamientos

[0227] Al final del estudio *in vivo* en el modelo tumoral sólido HT29 descrito en las **FIGS. 7A-7C**, se recogió sangre de los ratones, y los glóbulos rojos en la sangre se lisaron utilizando un tampón de lisis de glóbulos rojos (BioLegend, San Diego, CA). Las células restantes se tiñeron con anticuerpo anti-humano CD3 en hielo durante 30 minutos. El número de células T se analizó por citometría de flujo. Para analizar las células T infiltradas en el tumor, los tumores fueron disecados y digeridos a células individuales. Las células digeridas se tiñeron con colorante de viabilidad celular Zombie Violet (BioLegend, San Diego, CA) y anticuerpo anti-humano CD3. El porcentaje de células T CD3⁺ en células vivas totales se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 9A-9B**.

[0228] Como se muestra en la **FIG. 9A**, la sangre de los ratones tratados con *meta*-CAL-PEG₉-FITC tuvo más células T que la sangre de otros grupos de tratamiento. Como se muestra en la **FIG. 9B**, hubo más células T infiltradas en tumores de ratones tratados con *meta*-CAL-PEG₉-FITC.

Ejemplo 10

Eficacia in vivo de adaptadores biespecíficos dirigidos a CAIX en modelo tumoral MDA-CAIX

[0229] Se implantaron células MDA-CAIX (5×10^6) en cada ratón NSG mediante inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm³, los grupos de tratamiento fueron inyectados con 1×10^7 células CAR-T anti-FITC y los adaptadores biespecíficos indicados como se muestra en la **FIG. 10A**. El volumen tumoral y el peso corporal se monitorearon regularmente. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$. Los resultados se muestran en las **FIGS. 10B-10C**.

[0230] Como se muestra en la **FIG. 10B**, *meta*-CAL-PEG₃-FITC inhibió ligeramente el crecimiento de los tumores MDA-CAIX, mientras que *orto*-CAL-PEG₆-FITC inhibió

significativamente el crecimiento de los tumores MDA-CAIX. Como se muestra en la **FIG. 10C**, ninguno de los adaptadores biespecíficos mostró toxicidad en los ratones durante el tratamiento.

Ejemplo 11

Retención y exposición en superficie de adaptadores biespecíficos CAIX en células tumorales MDA-CAIX

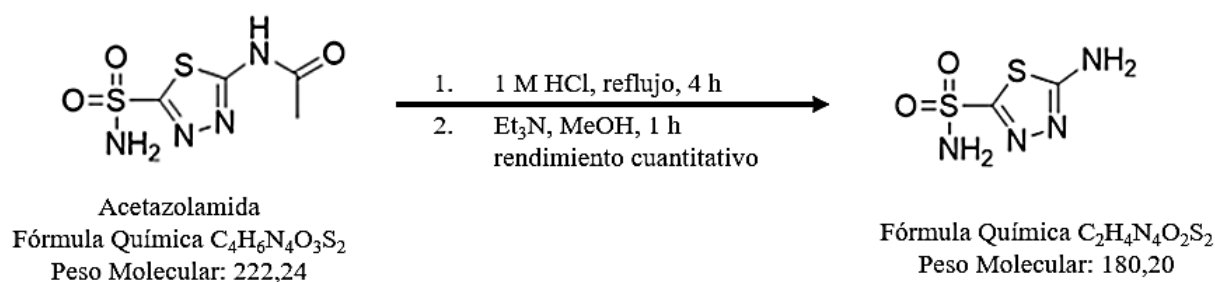
[0231] Los tumores MDA-CAIX de ratones en diferentes grupos de tratamiento fueron disecados y digeridos en células individuales 24 horas después de las últimas inyecciones con adaptadores biespecíficos CAIX a 500 nmol/kg. La retención total de los adaptadores biespecíficos se determinó por la intensidad de fluorescencia FITC analizada por citometría de flujo. Para estimar los niveles de proteína CAIX en las células tumorales, las células se tiñeron con 100 nM *meta*-CAL-PEG₆-FITC durante 1 hora a temperatura ambiente y se analizaron por citometría de flujo. La exposición de FITC de los adaptadores biespecíficos en la superficie de las células tumorales se analizó por citometría de flujo después de teñir con anticuerpo APC-anti-FITC en hielo durante 30 minutos. La exposición en superficie de FITC también se analizó en las células teñidas con 100 nM *meta*-CAL-PEG₆-FITC. Los resultados se muestran en las **FIGS. 11B-11E**.

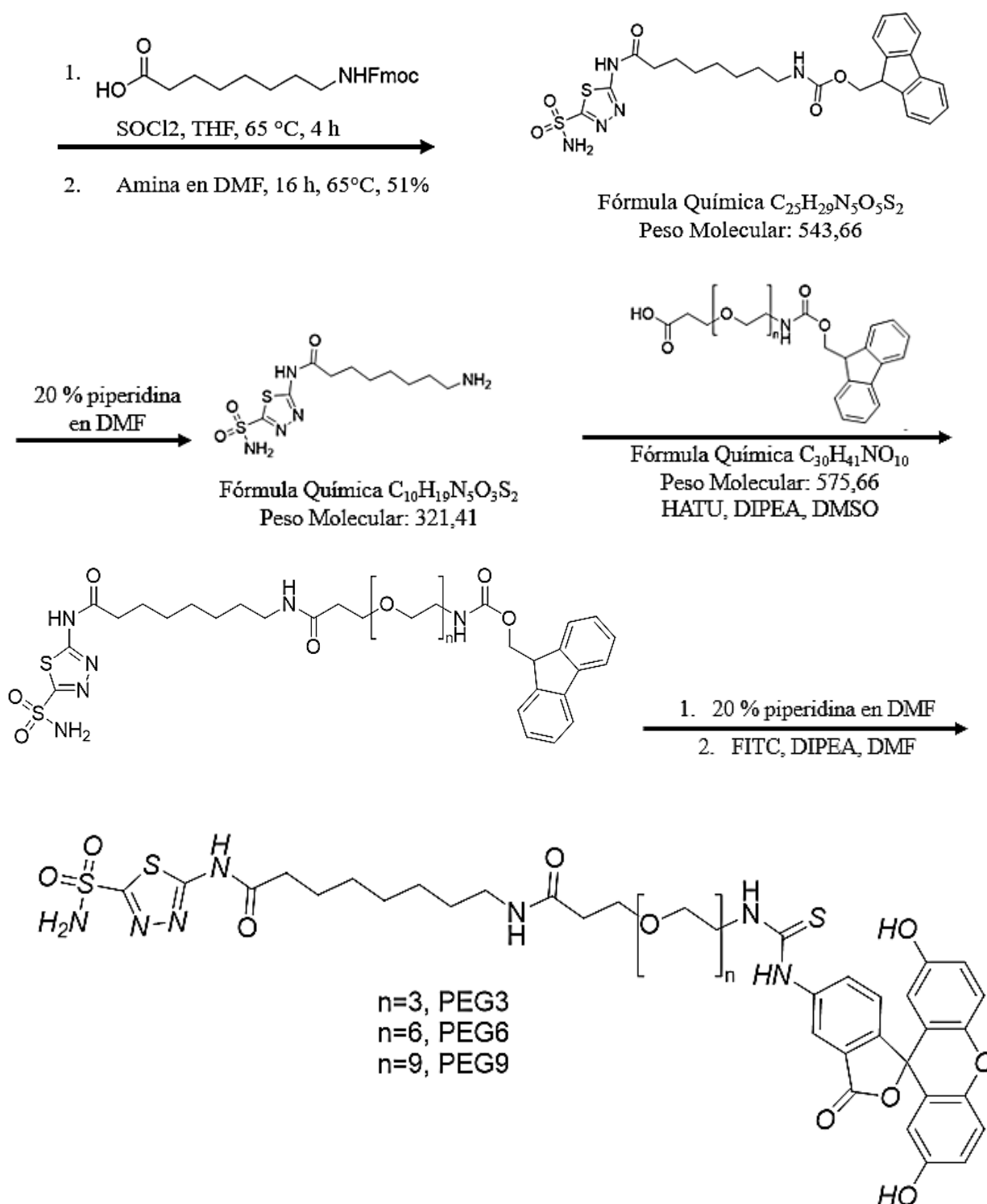
[0232] Como se muestra en la **FIG. 11B**, los tumores tratados con Aza-FITC y *meta*-CAL-FITC con enlazadores PEG₃ o PEG₆ tuvieron una retención total de FITC similar en las células. Como se muestra en la **FIG. 11C**, las células tumorales tratadas con Aza-FITC tuvieron niveles de CAIX ligeramente superiores a los tumores tratados con *meta*-CAL-FITC con PEG₃ o PEG₆. Como se muestra en la **FIG. 11D**, *meta*-CAL-PEG₆-FITC tuvo una retención en superficie y exposición de FITC ligeramente mejores que los otros compuestos. Como se muestra en la **FIG. 11E**, las células tumorales de ratones tratados con *orto*-CAL-PEG₆-FITC no mostraron prácticamente ninguna tinción con anticuerpo anti-FITC, lo que indica que las células tumorales que expresaban CAIX habían sido eliminadas por las células CAR-T.

Ejemplo 12

Procedimiento general para la síntesis de conjugados de acetazolamida (Aza)-PEG-FITC

Esquema 2





Ejemplo 13

Efectos de la longitud del enlazador en la afinidad de unión de los adaptadores biespecíficos Aza-FITC

[0233] Las células MDA-CAIX (0,2 millones) se incubaron con adaptadores biespecíficos diluidos en serie 1:4 comenzando con 1000 nM en PBS que contenía 2% FBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez para eliminar los adaptadores no unidos. La

intensidad fluorescente de los adaptadores unidos a las células se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **FIG. 12**, que es un gráfico de concentración (nM) frente a MFI normalizado que muestra que los espaciadores PEG no tienen efectos significativos en la afinidad de unión de los adaptadores biespecíficos de acetazolamida (Aza)-FITC.

Ejemplo 14

Efectos de la longitud del enlazador en la unión total y exposición superficial de adaptadores biespecíficos Aza-FITC

[0234] Las células MDA-CAIX se incubaron con 500 nM de adaptadores biespecíficos Aza-FITC con diferentes espaciadores PEG en medio completo RPMI (RPMI + 10% FBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los compuestos libres se lavaron y la intensidad fluorescente de FITC se analizó mediante citometría de flujo. Para analizar la exposición superficial del grupo funcional FITC, las células teñidas se incubaron con anticuerpo APC-anti-FITC en hielo durante 30 minutos. Luego, las células se lavaron y la intensidad fluorescente de APC se analizó mediante citómetro de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 13A-13B**. La **FIG. 13A** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de FL, que muestra la unión total de adaptadores biespecíficos Aza-FITC a células MDA-CAIX. La longitud del enlazador no afectó significativamente la unión total. La **FIG. 13B** es un gráfico de adaptador biespecífico vs. MFI de APC-anti-FITC, que muestra la exposición superficial de los grupos FITC en adaptadores biespecíficos Aza-FITC con diferentes enlazadores PEG después de unirse a células MDA-CAIX. El incremento de la longitud del espaciador PEG mejoró la exposición superficial de FITC tras la unión a células MDA-CAIX.

Ejemplo 15

Efectos de la longitud del enlazador en la liberación de IFN γ mediada por adaptadores biespecíficos Aza-FITC de células CAR-T anti-FITC cuando se co-cultivan con células HT29

[0235] Las células CAR-T anti-FITC se incubaron con células HT29 en una proporción 1:5 en presencia de los adaptadores biespecíficos a diferentes concentraciones durante 40 horas. La secreción de IFN γ de las células CAR-T anti-FITC se analizó mediante ELISA usando los sobrenadantes del medio de co-cultivo al final del estudio. Los resultados se muestran en la **FIG. 14**, que es un gráfico de concentración (nM) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra el efecto de la longitud del enlazador en la liberación de IFN γ mediada por adaptadores biespecíficos Aza-FITC de células CAR-T anti-FITC cuando se co-cultivan con células HT29.

[0236] Aza-PEG₃-FITC y Aza-PEG₉-FITC mediaron un nivel más alto de liberación de IFN γ de las células CAR-T anti-FITC que Aza-PEG₀-FITC. Aza-PEG₆-FITC medió el nivel más alto de liberación de IFN γ de las células CAR-T anti-FITC.

Ejemplo 16

Adaptadores biespecíficos dirigidos a CAIX con enlazadores óptimos que median la liberación de IFN γ de células CAR-T anti-FITC

[0237] Las células CAR-T anti-FITC se incubaron con células HT29 en una proporción 1:5 en presencia de los adaptadores biespecíficos a diferentes concentraciones durante 40 horas. La secreción de IFN γ de células CAR-T anti-FITC se analizó mediante ELISA usando los sobrenadantes del medio de co-cultivo al final del estudio. Los resultados se muestran en la **FIG. 15**, que es un gráfico de concentración de ligando CAIX-PEG(n)-FITC (nM) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra que los adaptadores biespecíficos dirigidos a CAIX con enlazadores óptimos median la liberación de IFN γ de células CAR-T anti-FITC. *Meta*-CAL-PEG₉-FITC medió el nivel más alto de liberación de IFN γ de células CAR-T anti-FITC a bajas concentraciones (< 0,1 nM). Aza-PEG₆-FITC medió niveles similares de liberación de IFN γ de células CAR-T anti-FITC que *meta*-CAL-PEG₉-FITC a concentraciones mayores de 0,1 nM. *Orto*-CAL-PEG₆-FITC medió niveles más bajos de liberación de IFN γ de células CAR-T anti-FITC.

Ejemplo 17

Eficacia in vivo de Aza-PEG₆-FITC y orto-CAL-PEG₆-FITC

[0238] Se implantaron células KB (1 millón) en cada ratón NSG mediante inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 50 mm³, los grupos de tratamiento fueron inyectados con 10 millones de células CAR-T anti-FITC y los adaptadores biespecíficos indicados como se muestra en la **FIG. 16A**. El volumen tumoral y el peso corporal se monitorearon regularmente. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: (longitud × ancho²)/2. Los resultados se muestran en las **FIGS. 16B-16C**.

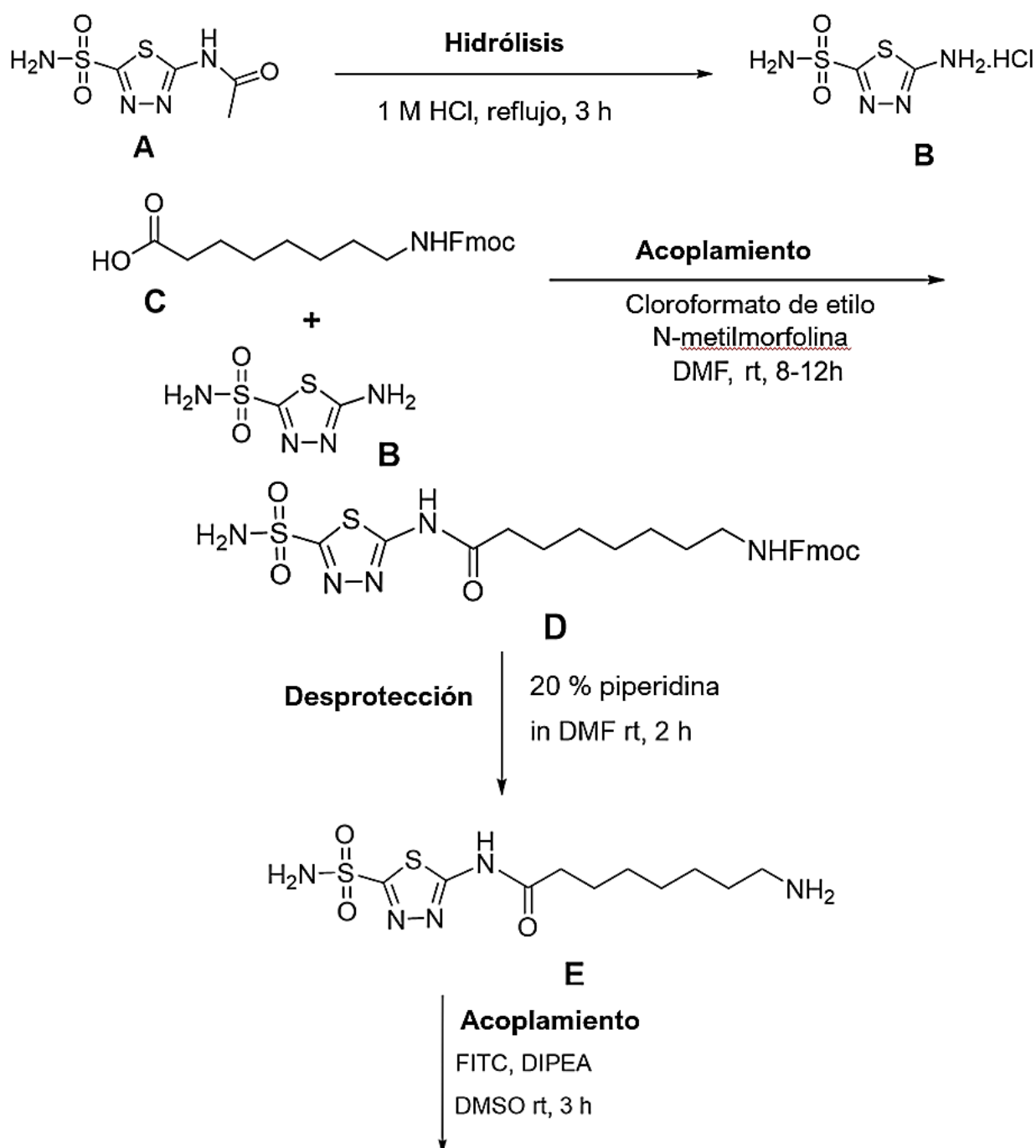
[0239] La **FIG. 16B** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T frente a volumen tumoral (mm³), que muestra las curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento. Aza-PEG₆-FITC y orto-CAL-PEG₆-FITC inhibieron ligeramente el crecimiento de los tumores KB. La eficacia de Aza-PEG₆-FITC es ligeramente mejor que la de orto-CAL-PEG₆-FITC. La **FIG. 16C** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. cambio de peso corporal (%), que muestra los cambios de peso corporal de los ratones en diferentes grupos de tratamiento. Ni Aza-PEG₆-FITC ni orto-CAL-PEG₆-FITC indujeron pérdida significativa de peso corporal.

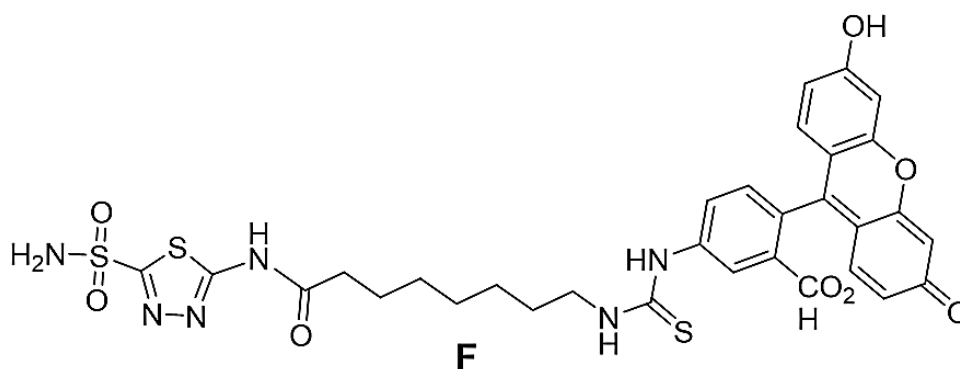
Ejemplo 18

Síntesis de Aza-FITC

[0240] Síntesis de 5-amino-2-sulfamoi-1,3,4-tiadiazol monohidrocloruro B: Se añadió ácido clorhídrico (1 M acuoso) (70 mL, 70,00 mmol, 5,2 equiv) a acetazolamida **A** (3 g, 13,34 mmol, 1,0 equiv) y la mezcla se agitó durante 3 horas a reflujo (Esquema 3). Posteriormente, el agua se evaporó mediante rotavapor. El material crudo (disuelto en una pequeña cantidad de metanol con la ayuda de TEA para carga sólida) se purificó por cromatografía en columna ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 100/0 a 70/30) para obtener el producto **B** (2,768 g, 96%).

Esquema 3





[0241] Síntesis de (9H-fluoren-9-il)metil (8-oxo-8-((5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino)octil)carbamato D: Se añadió N-metilmorfolina (0,063 mL, 1,1 equiv) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón a una solución agitada de ácido N-Fmoc-8-aminooctanoico **C** (0,200 g, 1 equiv) y etilcloroformiato (0,055 mL, 1,1 equiv) en DMF recién secado (1,5 mL), y posteriormente se agitó durante 30 minutos (Esquema 3). Luego se añadió 5-amino-2-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol **B** (0,568 g, 1,5 equiv) a temperatura ambiente y la agitación se continuó toda la noche bajo argón. La reacción se monitorizó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) y se purificó mediante cromatografía líquida preparativa de alta resolución (HPLC) (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = acetonitrilo (ACN); método: 0% B a 80% B en 40 minutos a 13 mL/minuto). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el (9H-fluoren-9-il)metil (8-oxo-8-((5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino)octil)carbamato **D**.

[0242] Síntesis de 8-amino-N-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)octanamida E: (9H-fluoren-9-il)metil (8-oxo-8-((5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino)octil)carbamato **D** (0,080 g) se disolvió en 20% piperidina en DMF (1,0 mL) a temperatura ambiente y se continuó la agitación durante 2 horas bajo argón (Esquema 3). La reacción se monitorizó por LCMS y se purificó mediante HPLC preparativo (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 0% B a 50% B en 30 minutos a 13 mL/minuto). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando la 8-amino-N-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)octanamida **E**.

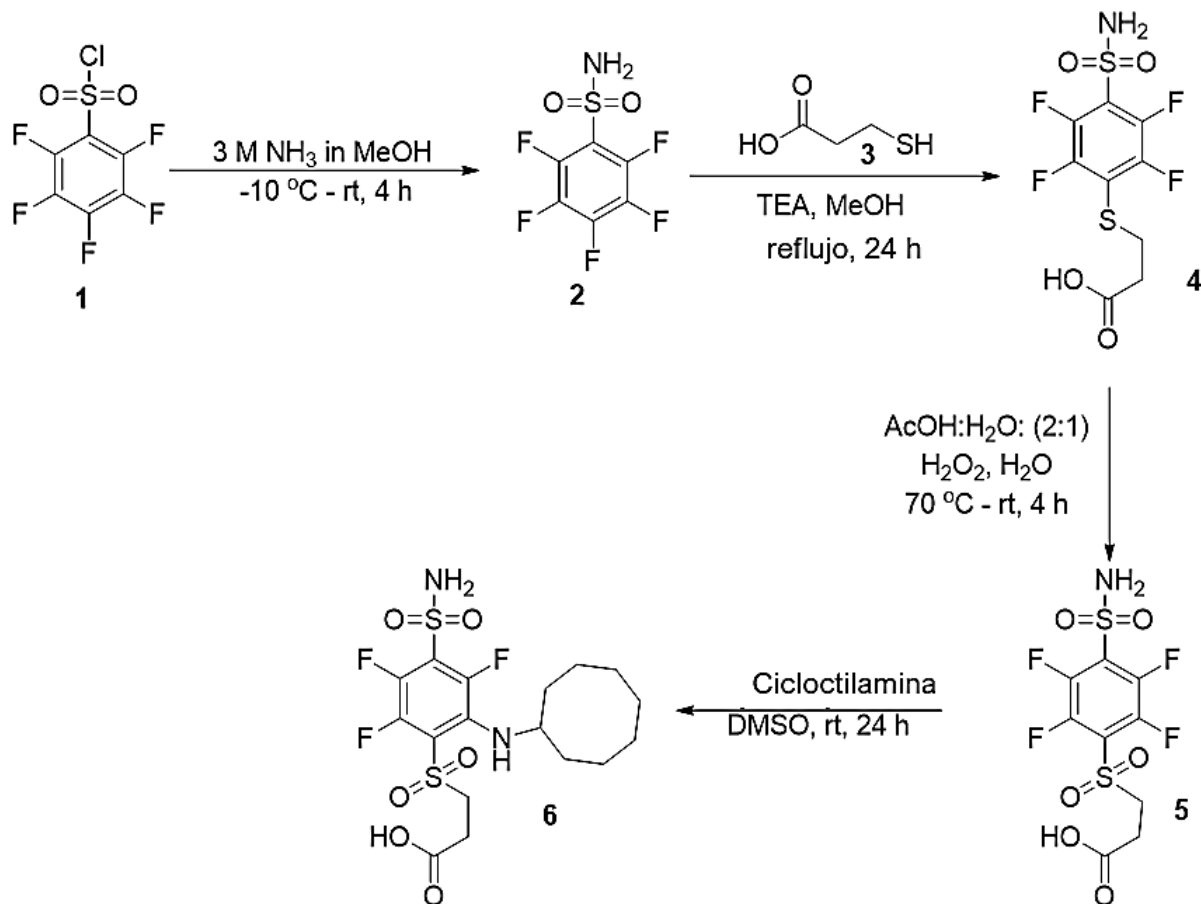
[0243] Síntesis de Aza-FITC F: Se añadió DIPEA (3,0 equiv) a temperatura ambiente a una solución agitada de 8-amino-N-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)octanamida **E** (0,0160 g) y FITC (0,019 g, 1,0 equiv, añadido por porciones 0,80 equiv + 0,20 equiv a lo largo de 1 hora) en dimetilsulfóxido (DMSO) (1 mL) y se agitó continuamente durante 3 horas bajo argón. La reacción se monitorizó mediante LCMS y se purificó por HPLC preparativo (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 0% B a 60% B en 40 minutos a 13 mL/minuto). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el Aza-FITC

F. LCMS (ESI) (m/z): (M + H)⁺ calculado para C₃₁H₃₀N₆O₈S₃ + H = 711.13 (m/z) encontrado: (M + H)⁺ 710.80.

Ejemplo 19

Síntesis de conjugados de CAL-PEGs-FITC

Esquema 4



[0244] Síntesis del conjugado *meta*-CAL-P₃-FITC

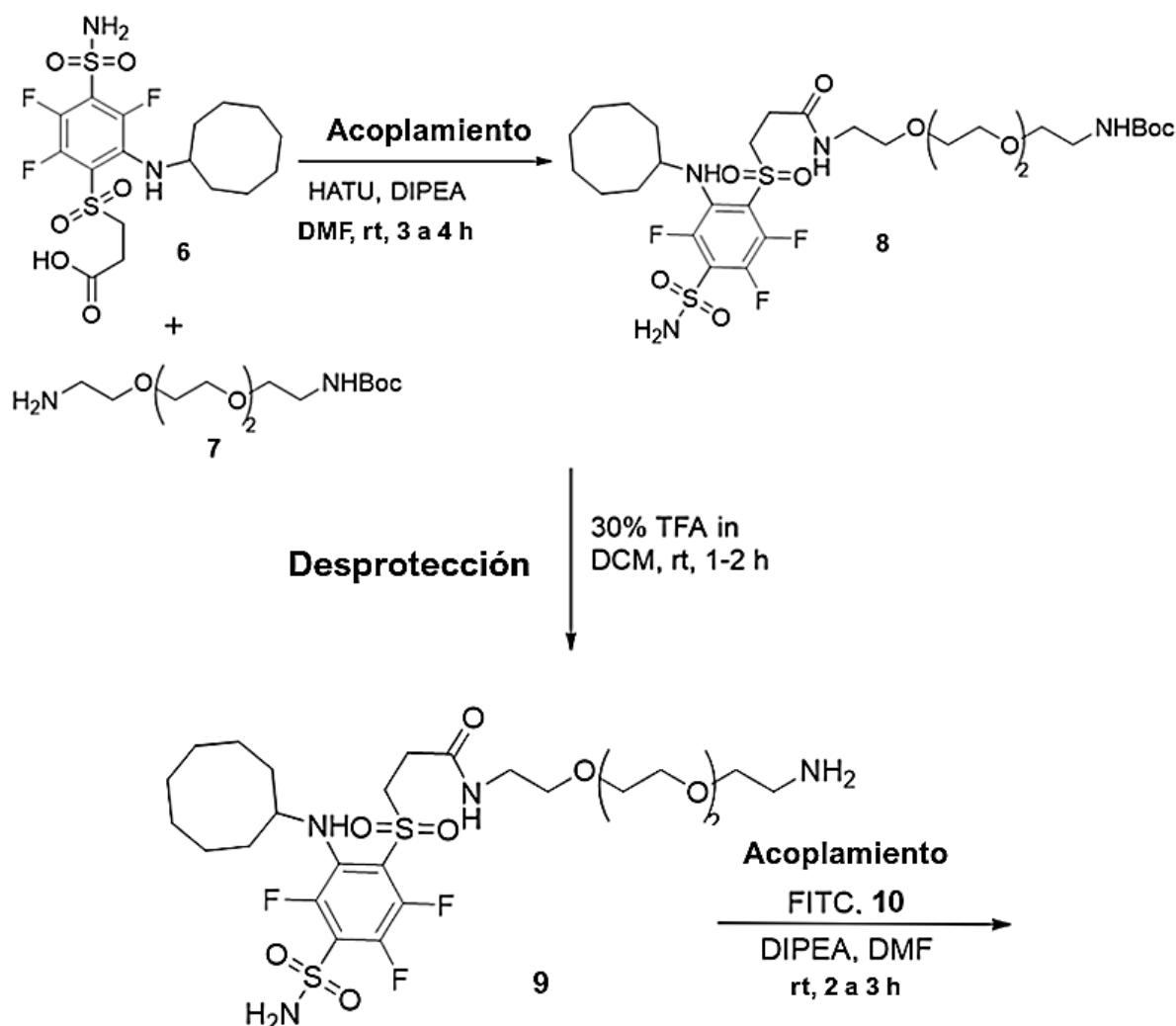
[0245] *meta*-CAL-PEG₃ NHBoc (8). El ligando *meta*-CA 6 se sintetizó mediante el procedimiento conocido descrito en la literatura. Más específicamente, a una solución agitada de ligando *meta*-CA 6 (0,039 g, 1,0 equiv), t-Boc-N-amido-PEG₃ amina 7 (0,027 g, 1,1 equiv) y hexafluorofosfato de azabenzotriazol tetrametil uranio (HATU) (0,036 g, 1,15 equiv) en DMF (1,5 mL), se añadió DIPEA (0,0173 mL, 1,2 equiv) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, y la solución se agitó durante 3 a 4 horas como se menciona en el Esquema 5. La reacción se monitorizó mediante LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el *meta*-CAL-PEG₃ NHBoc 8.

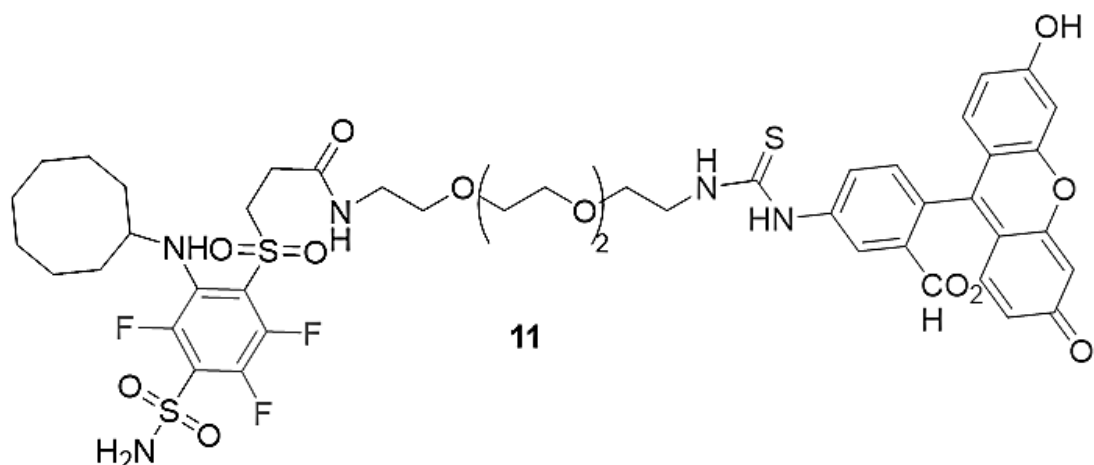
[0246] *meta*-CAL-PEG₃ NH₂ (9). *meta*-CAL-PEG₃ NHBoc 8 (0,050 g) se disolvió en 30% TFA en DCM húmedo (1,5 mL) a temperatura ambiente y se agitó durante 1 a 2 horas (Esquema 5). La

reacción se monitorizó por LCMS y los volátiles se eliminaron por rotavapor. El residuo se disolvió en DCM y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM: Metanol: TFA = 89:10:1). Además, la impureza traza se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (TLC) (DCM: Metanol: TFA = 89:10:1) para obtener *meta*-CAL-PEG₃NH₂ **9**.

[0247] *meta*-CAL-P₃-FITC (11**).** *meta*-CAL-PEG₃NH₂ **8** (0,041 g, 1,0 equiv) se disolvió en DMF (1,0 mL) bajo atmósfera de argón, después de lo cual se añadió FITC **10** (0,024 g, 1,0 equiv, añadido por porciones 0,80 equiv + 0,20 equiv en el transcurso de 2 horas) y DIPEA (1,0 equiv) a temperatura ambiente en condiciones oscuras (Esquema 5). La mezcla de reacción se agitó durante una hora adicional. La reacción se monitorizó por LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = agua milli-Q (TFA) pH = 3, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante tres horas y se liofilizó para obtener el conjugado *meta*-CAL-P₃-FITC **11**. La pureza del compuesto *meta*-CAL-P₃-FITC conjugado **11** se analizó mediante LCMS.

Esquema 5





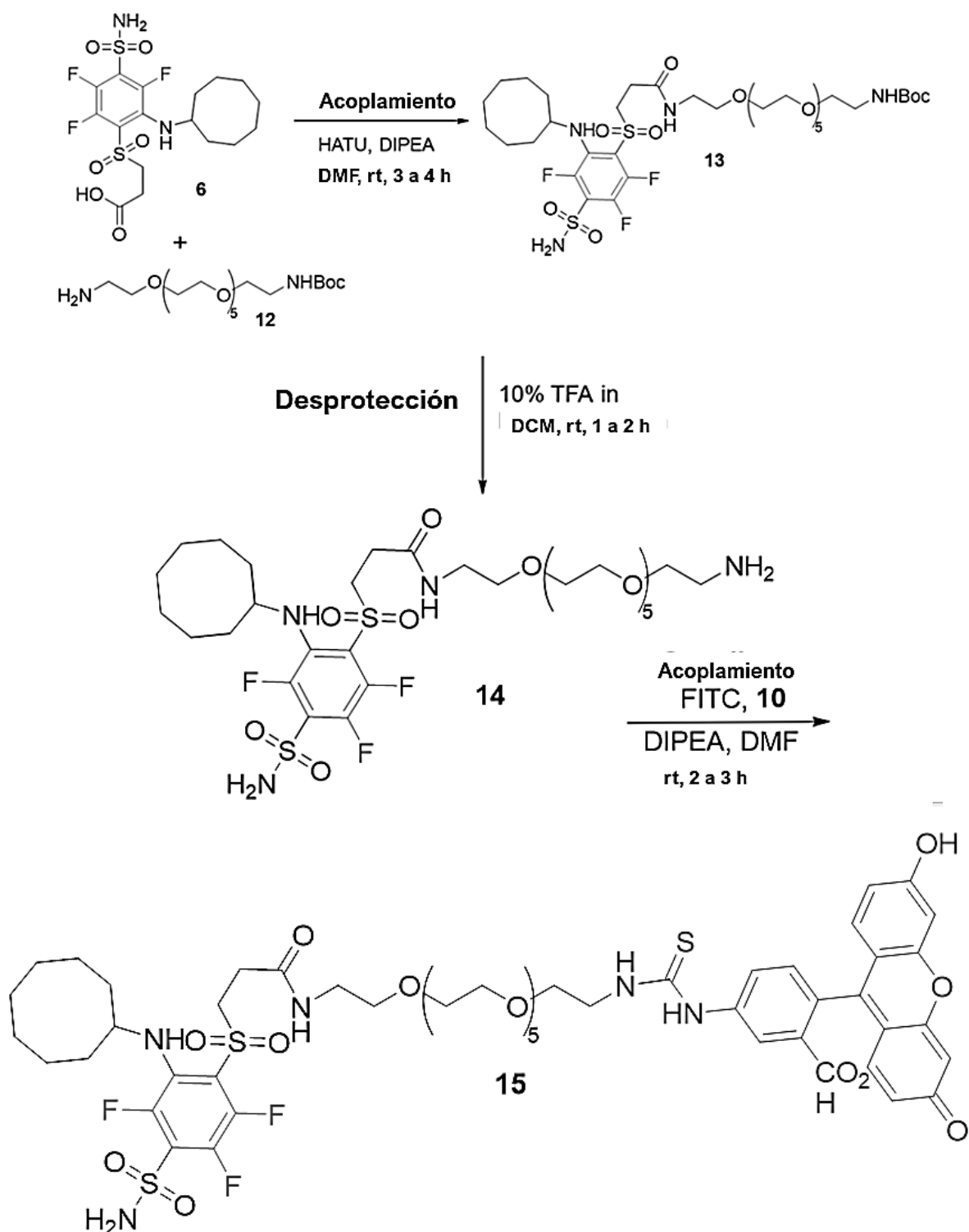
[0248] Síntesis del conjugado *meta*-CAL-P6-FITC

[0249] *meta*-CAL-PEG₆ NHBoc (13**).** Se añadió DIPEA (0,0177 mL, 1,2 equiv) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón a una solución agitada de ligando *meta*-CA 6 (0,040 g, 1,0 equiv), t-Boc-N-amido-PEG₆ amina **12** (0,039 g, 1,1 equiv) y HATU (0,037 g, 1,15 equiv) en DMF (1,5 mL), y la solución se agitó durante 3 a 4 horas como se menciona en el Esquema 6. La reacción se monitorizó mediante LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el *meta*-CAL-PEG₆ NHBoc **13**.

[0250] *meta*-CAL-PEG₆ NH₂ (14**).** *meta*-CAL-PEG₆ NHBoc **13** (0,056 g, 1,0 equiv) se disolvió en 30% TFA en DCM húmedo (1,5 mL) a temperatura ambiente y se agitó durante 1 a 2 horas (Esquema 6). La reacción se monitorizó por LCMS y los volátiles se eliminaron por rotavapor. El residuo se disolvió en DCM y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM: Metanol: TFA = 94:5:1). Además, la impureza traza se purificó mediante TLC preparativa (DCM: Metanol: TFA = 94:5:1) para obtener *meta*-CAL-PEG₆ NH₂ **14**.

[0251] *meta*-CAL-P₆-FITC (15**).** *meta*-CAL-PEG₆NH₂ **14** (0,057 g, 1,0 equiv) se disolvió en DMF (1,0 mL) bajo atmósfera de argón, después de lo cual se añadieron FITC 10 (0,028 g, 1,0 equiv, añadido por porciones 0,80 equiv + 0,20 equiv en el transcurso de 2 horas) y DIPEA (1,0 equiv) a temperatura ambiente en condiciones oscuras (Esquema 6). La mezcla de reacción se agitó durante una hora adicional. La reacción se monitorizó mediante LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = agua milli-Q (TFA) pH = 3, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante tres horas y se liofilizó para obtener el conjugado *meta*-CAL-P₆-FITC **15**. La pureza del compuesto *meta*-CAL-P₆-FITC conjugado **15** se analizó mediante LCMS.

Esquema 6

[0252] Síntesis del conjugado *meta*-CAL-P9-FITC

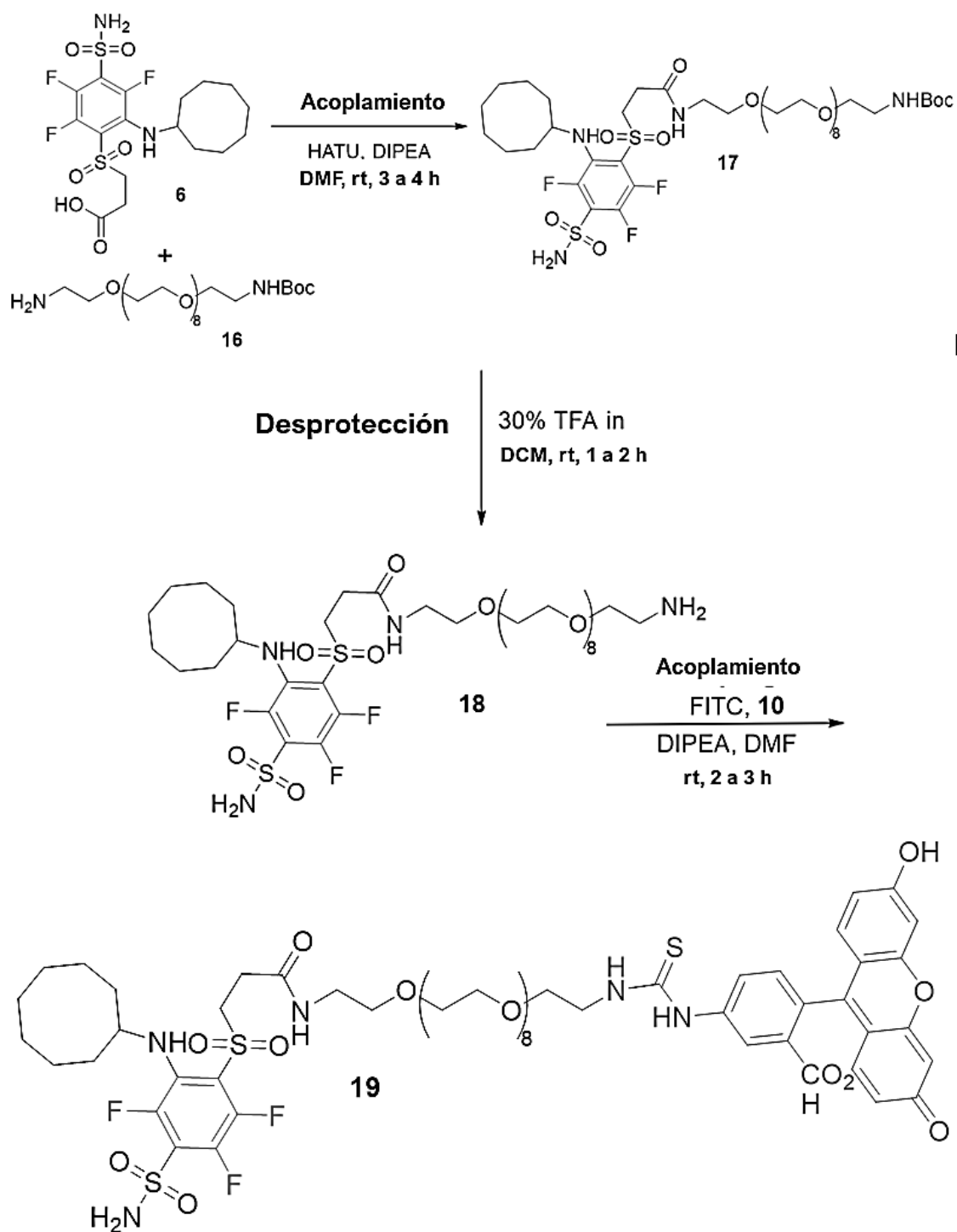
[0253] *meta*-CAL-PEG₉ NHBoc (**17**). A una solución agitada de ligando *meta*-CA **6** (0,031 g, 1,0 equiv), t-Boc-N-amido-PEG₉ amina **16** (0,040 g, 1,1 equiv) y HATU (0,028 g, 1,15 equiv) en DMF (1,0 mL) se añadió DIPEA (0,014 mL, 1,2 equiv) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, y la solución se agitó durante 3 a 4 horas como se menciona en el Esquema 7. La reacción

se monitorizó mediante LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el *meta*-CAL-PEG₉ NHBoc **17**.

[0254] *meta*-CAL-PEG₉ NH₂ (18). *meta*-CAL-PEG₉ NHBoc **17** (0,067 g, 1,0 equiv) se disolvió en 30% TFA en DCM húmedo (1,5 mL) a temperatura ambiente y se agitó durante 1 a 2 horas (Esquema 7). La reacción se monitorizó por LCMS y los volátiles se eliminaron por rotavapor. El residuo se disolvió en DCM y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM: Metanol: TFA = 94:5:1). Además, la impureza traza se purificó mediante TLC preparativa (DCM: Metanol: TFA = 94:5:1) para obtener *meta*-CAL-PEG₉ NH₂ **18**.

[0255] *meta*-CAL-P₉-FITC (19). *meta*-CAL-PEG₉NH₂ **18** (0,041 g, 1,0 equiv) se disolvió en DMF (1,0 mL) bajo atmósfera de argón, tras lo cual se añadieron FITC **10** (0,017 g, 1,0 equiv, añadido por porciones 0,80 equiv + 0,20 equiv durante 2 horas) y DIPEA (1,0 equiv) a temperatura ambiente en condiciones oscuras (Esquema 7). La mezcla de reacción se agitó durante una hora adicional. La reacción se monitorizó mediante LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = agua milli-Q (TFA) pH = 3, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante tres horas y se liofilizó para obtener el conjugado *meta*-CAL-P₉-FITC **19**. La pureza del compuesto *meta*-CAL-P₉-FITC **19** se analizó mediante LCMS.

Esquema 7



[0256] Síntesis del conjugado *orto*-CAL-P6-FITC

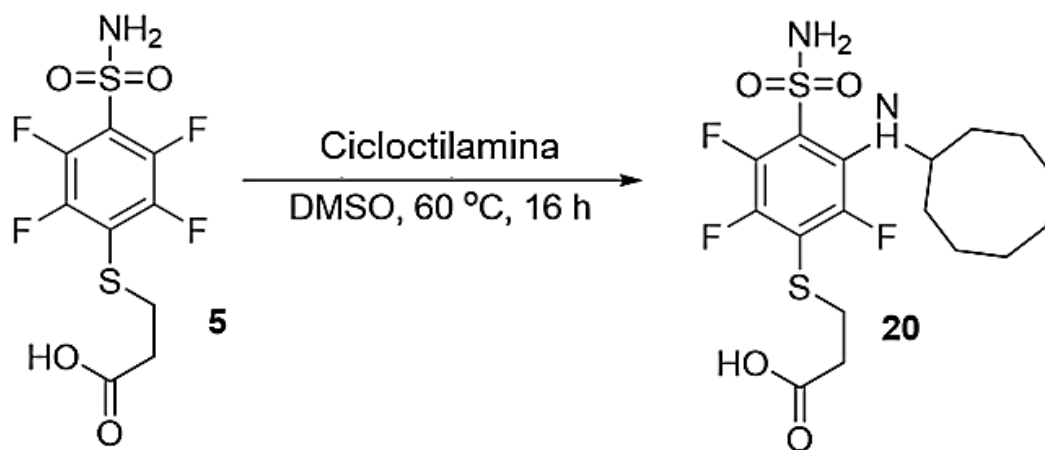
[0257] *orto*-CAL-PEG₆ NHBoc (**21**). A una solución agitada de ligando *orto*-CA **20** (0,033 g, 1,0 equiv), t-Boc-N-amido-PEG₆ amina **12** (0,032 g, 1,1 equiv) y HATU (0,033 g, 1,15 equiv) en DMF (1,5 mL) se añadió DIPEA (0,015 mL, 1,2 equiv) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, y la solución se agitó durante 3 a 4 horas como se menciona en el Esquema 8. La reacción se monitorizó mediante LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50

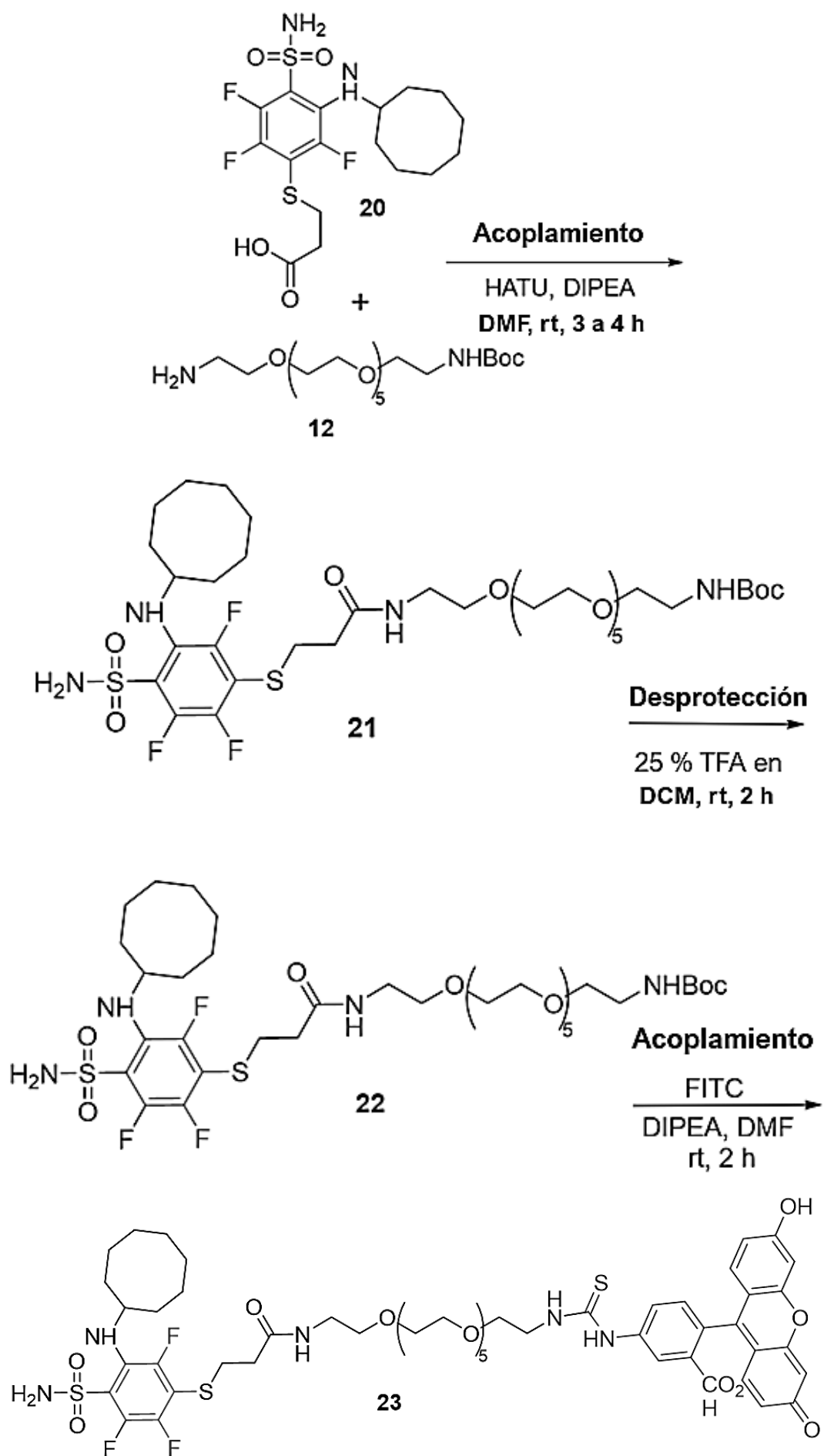
minutos). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el *orto*-CAL-PEG₆ NHBoc **21**.

[0258] *orto*-CAL-PEG₆ NH₂ (22**).** *orto*-CAL-PEG₆ NHBoc **21** (0,110 g, 1,0 equiv) se disolvió en 25% TFA en DCM húmedo (1,5 mL) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas (Esquema 8). La reacción se monitorizó por LCMS, los volátiles se eliminaron por rotavapor. El residuo se disolvió en DMF y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 60 minutos). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el *orto*-CAL-PEG₆ NH₂ **22**.

[0259] *orto*-CAL-P6-FITC (23**).** *orto*-CAL-PEG₆NH₂ **22** (0,060 g, 1,0 equiv) se disolvió en DMF (1,0 mL) bajo atmósfera de argón, tras lo cual se añadieron FITC 10 (0,028 g, 0,9 equiv, añadido por porciones 0,70 equiv + 0,20 equiv durante una hora) y DIPEA (1,25 equiv) a temperatura ambiente en condiciones oscuras (Esquema 8). La mezcla de reacción se agitó durante una hora adicional. La reacción se monitorizó por LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = agua milli-Q (TFA) pH = 3, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante tres horas y se liofilizó para obtener el conjugado *orto*-CAL-P₆-FITC **23**. La pureza del compuesto *orto*-CAL-P₆-FITC **23** se analizó mediante LCMS.

Esquema 8





[0260] Síntesis del conjugado *orto*-CAL-P₉-FITC

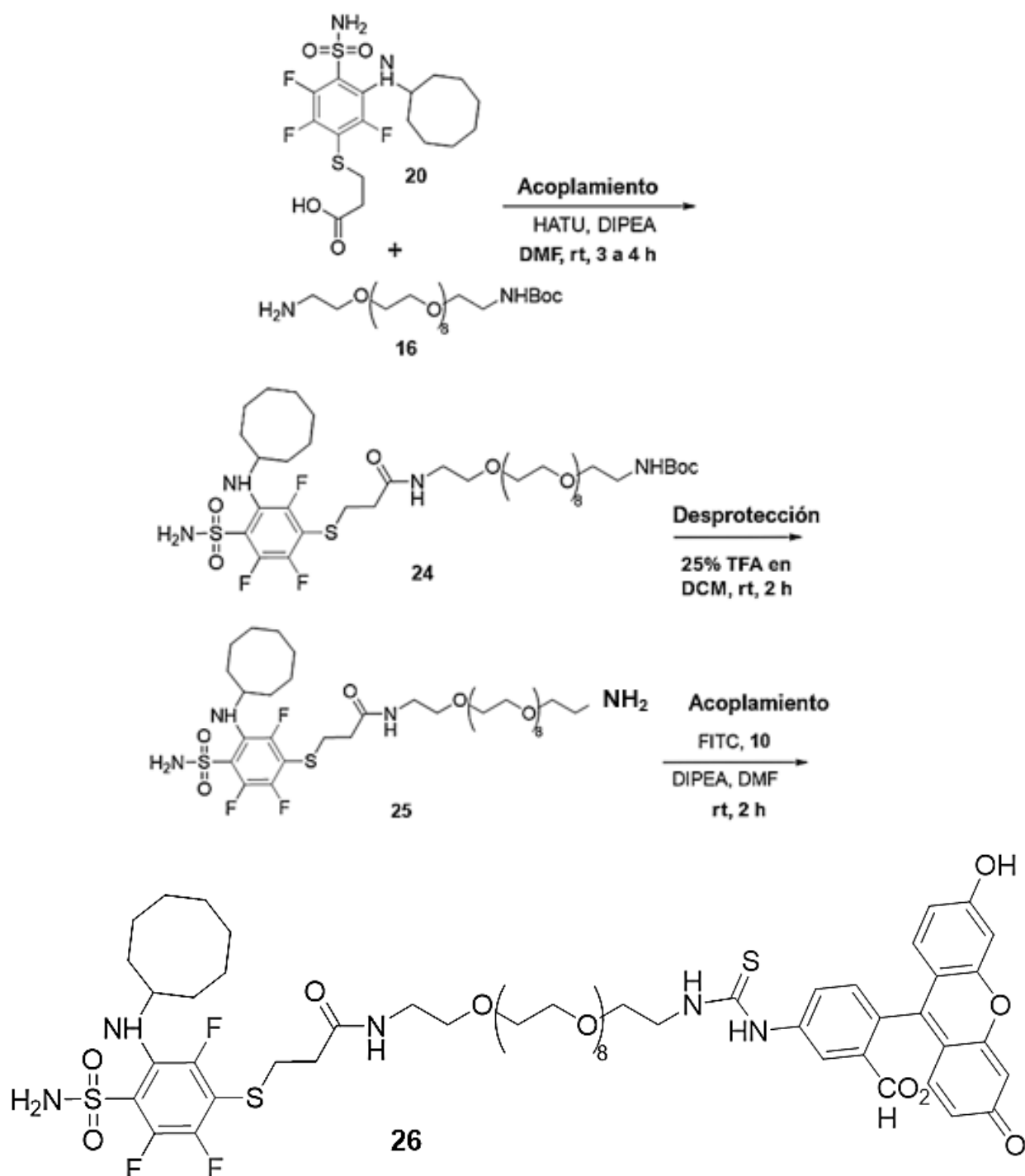
[0261] *orto*-CAL-PEG₉ NHBoc (24). El ligando *orto*-CA **20** se sintetizó mediante el procedimiento conocido descrito en la literatura. En particular, a una solución agitada de ligando *orto*-CA **20** (0,022 g, 1,0 equiv), t-Boc-N-amido-PEG₉ amina **16** (0,028 g, 1,0 equiv) y HATU (0,022 g, 1,15 equiv) en DMF (1,0 mL), se añadió DIPEA (0,0104 mL, 1,2 equiv) a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, y la solución se agitó durante 3 a 4 horas como se menciona en el Esquema 9. La reacción se monitorizó por LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el *orto*-CAL-PEG₉ NHBoc **24**.

[0262] *orto*-CAL-PEG₉ NH₂ (25). *orto*-CAL-PEG₉ NHBoc **24** (0,098 g, 1,0 equiv) se disolvió en 25% TFA en DCM húmedo (1,5 mL) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas (Esquema 9). La reacción se monitorizó por LCMS y los volátiles se eliminaron por rotavapor. El residuo se disolvió en DMF y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = acetato de amonio 20 mM pH = 7, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 60 minutos). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, proporcionando el *orto*-CAL-PEG₉ NH₂ **25**.

[0263] *orto*-CAL-P₉-FITC (26). *orto*-CAL-PEG₉NH₂ (0,071 g, 1,0 equiv) se disolvió en DMF (1,0 mL) bajo atmósfera de argón, tras lo cual se añadieron FITC **10** (0,028 g, 0,9 equiv, añadido por porciones 0,70 equiv + 0,20 equiv durante una hora) y DIPEA (1,25 equiv) a temperatura ambiente en condiciones oscuras (Esquema 9). La mezcla de reacción se agitó durante una hora adicional.

[0264] La reacción se monitorizó por LCMS y se purificó por cromatografía en fase reversa en columna C-18 (fase móvil: A = agua milli-Q (TFA) pH = 3, B = ACN; método: 5% B a 95% B en 50 minutos). La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante 3 horas y se liofilizó para obtener el conjugado *orto*-CAL-P₉-FITC **26**. La pureza del compuesto *orto*-CAL-P₉-FITC **26** se analizó mediante LCMS.

Esquema 9



REALIZACIONES ENUMERADAS DE LA INVENCION REIVINDICADA

[0265] Cláusula 1. Un adaptador biespecífico o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende una fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o N-hidroxisuccinimida (NHS)-fluoresceína conjugada a un radical de un ligando de anhidrasa carbónica IX (CAIX) a través de un enlazador, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en polietilenglicol (PEG).

[0266] Cláusula 2. El adaptador biespecífico de la cláusula 1, en donde el ligando de CAIX es o comprende ácido 3-((3-(cicloctilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (*orto*-CAL), ácido 3-((2-(cicloctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico (*meta*-CAL), acetazolamida (Aza), o un derivado o análogo de cualquiera de los anteriores.

[0267] Cláusula 3. El adaptador biespecífico de la cláusula 1, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en PEG₁ a PEG₉.

[0268] Cláusula 4. El adaptador biespecífico de la cláusula 1, en donde el ligando de CAIX es o comprende *orto*-CAL o un derivado o análogo del mismo y el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en PEG₁ a PEG₉.

[0269] Cláusula 5. El adaptador biespecífico de las cláusulas 1-3, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en PEG₃ a PEG₉.

[0270] Cláusula 6. El adaptador biespecífico de las cláusulas 1-3, en donde el ligando de CAIX es o comprende *meta*-CAL o un derivado o análogo del mismo y el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en PEG₃ a PEG₉.

[0271] Cláusula 7. El adaptador biespecífico de la cláusula 3, en donde el ligando de CAIX es o comprende Aza o un derivado o análogo del mismo.

[0272] Cláusula 8. El adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 4, 6 y 7, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en PEG₆.

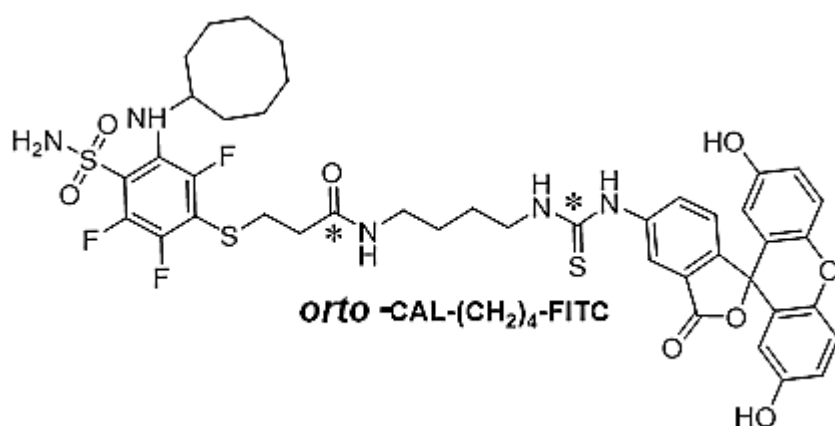
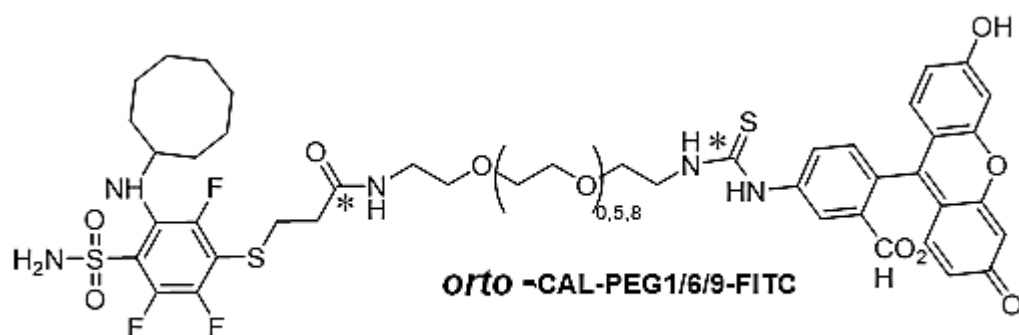
[0273] Cláusula 9. El adaptador biespecífico de la cláusula 6 o de la cláusula 7, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en PEG₉.

[0274] Cláusula 10. El adaptador biespecífico de la cláusula 7, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en PEG₆.

[0275] Cláusula 11. El adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-10, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un alquilo.

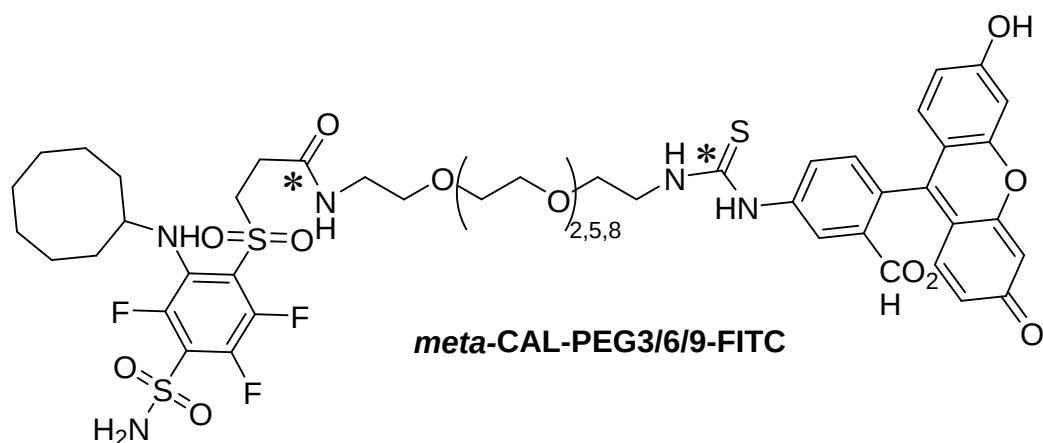
[0276] Cláusula 12. El adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-10, en donde el enlazador comprende, consiste esencialmente en, o consiste en (CH₂)₄.

[0277] Cláusula 13. El adaptador biespecífico de la cláusula 1, que comprende una estructura de una de las siguientes fórmulas:



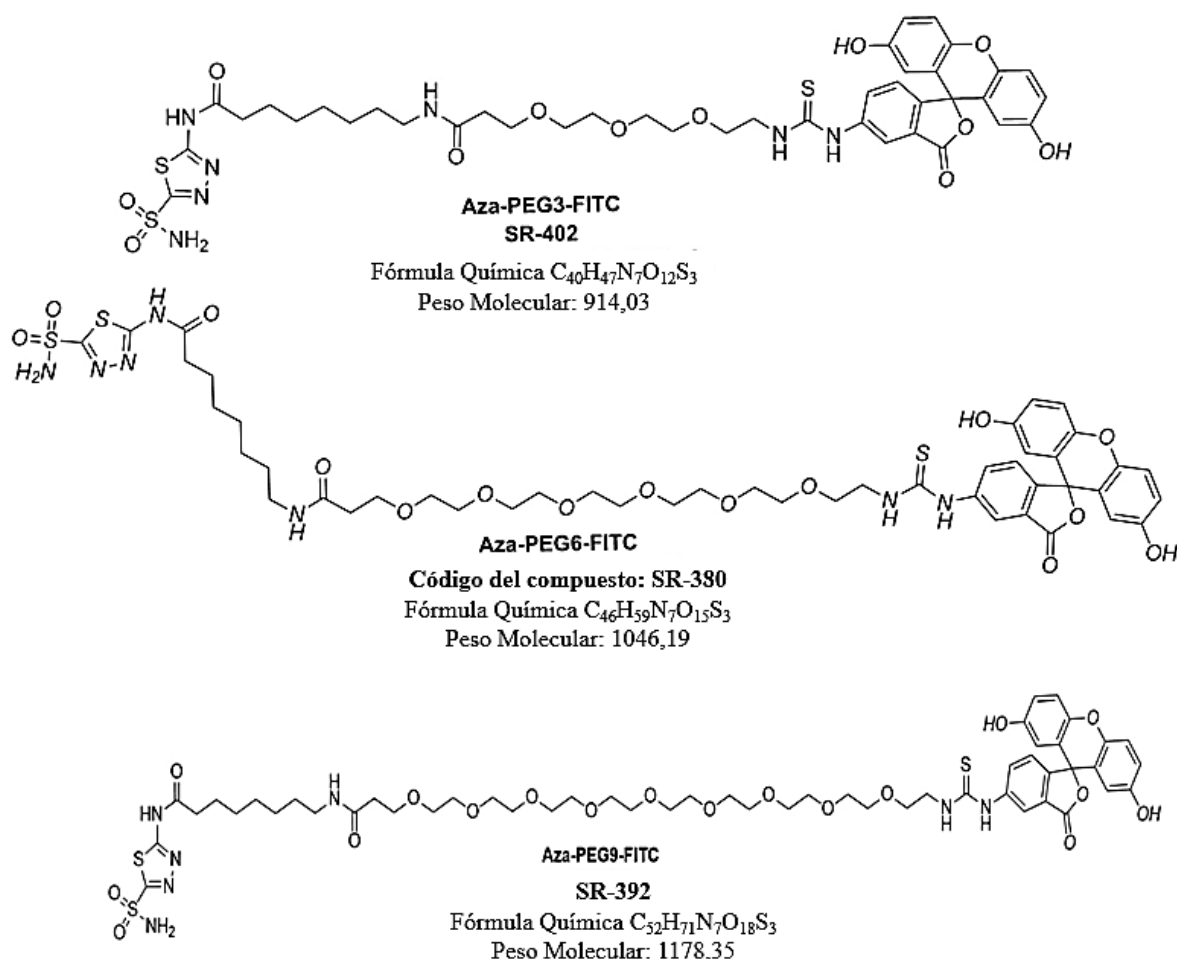
o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

[0278] Cláusula 14. El adaptador biespecífico de la cláusula 1, que comprende una estructura de las siguientes fórmulas:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0279] Cláusula 15. El adaptador biespecífico de la cláusula 1, que comprende una estructura de las siguientes fórmulas:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

[0280] Cláusula 16. El adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-15 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer.

[0281] Cláusula 17. El adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-15 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que exprese CAIX.

[0282] Cláusula 18. Una composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer que exprese CAIX que comprende el adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-16 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0283] Cláusula 19. Un kit que comprende:

- (i) al menos una unidad de dosificación de un adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-17 o una composición farmacéutica de la cláusula 18; y
 - (ii) al menos una unidad de dosificación de células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprende células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable;
- en donde (i) y (ii) están opcionalmente en recipientes separados.

[0284] Cláusula 20. El kit de la cláusula 19, en donde el ligando de CAIX del adaptador biespecífico es o comprende *orto*-CAL o un derivado o análogo del mismo.

[0285] Cláusula 21. El kit de la cláusula 19, en donde el ligando de CAIX del adaptador biespecífico es o comprende *meta*-CAL o un derivado o análogo del mismo.

[0286] Cláusula 22. El kit de la cláusula 19, en donde el ligando de CAIX del adaptador biespecífico es o comprende Aza o un derivado o análogo del mismo.

[0287] Cláusula 23. Un método de tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento de:

- (i) células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprende células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y
 - (ii) un adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-17 o una composición farmacéutica de la cláusula 18;
- tras lo cual el sujeto es tratado contra el cáncer.

[0288] Cláusula 24. El método de la cláusula 23, en donde el CAR comprende: una región de reconocimiento que comprende una región variable de fragmento de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-fluoresceína; un dominio de co-estimulación, que es CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), o CD278 (ICOS); y/o un dominio de señalización de activación, que es una cadena CD3ζ de célula T o un receptor Fc γ.

[0289] Cláusula 25. El método de la cláusula 23, en donde la fluoresceína del adaptador biespecífico se une a la célula CAR-T anti-fluoresceína con afinidad tras la exposición a la misma, y el ligando de CAIX del adaptador biespecífico enlaza la célula CAR-T anti-fluoresceína unida a una célula cancerígena que exprese CAIX tras la unión del adaptador biespecífico con afinidad a un receptor en dicha célula cancerígena que exprese CAIX.

[0290] Cláusula 26. El método de la cláusula 23, en donde (i) y (ii) se administran simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0291] Cláusula 27. El método de cualquiera de las cláusulas 23-26, en donde (i) y (ii) se administran cada uno por vía intravenosa.

[0292] Cláusula 28. El método de cualquiera de las cláusulas 23-27, que comprende además la obtención de imágenes del cáncer en el sujeto.

[0293] Cláusula 29. El método de la cláusula 28, en donde la obtención de imágenes del cáncer comprende la obtención de imágenes por imagenología óptica, tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

[0294] Cláusula 30. El método de cualquiera de las cláusulas 23-29, en donde el cáncer es un cáncer que exprese CAIX.

[0295] Cláusula 31. El método de cualquiera de las cláusulas 23-30, en donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga o carcinoma

de células renales claras, tal como, opcionalmente, carcinoma de células renales claras en estadio 3-4.

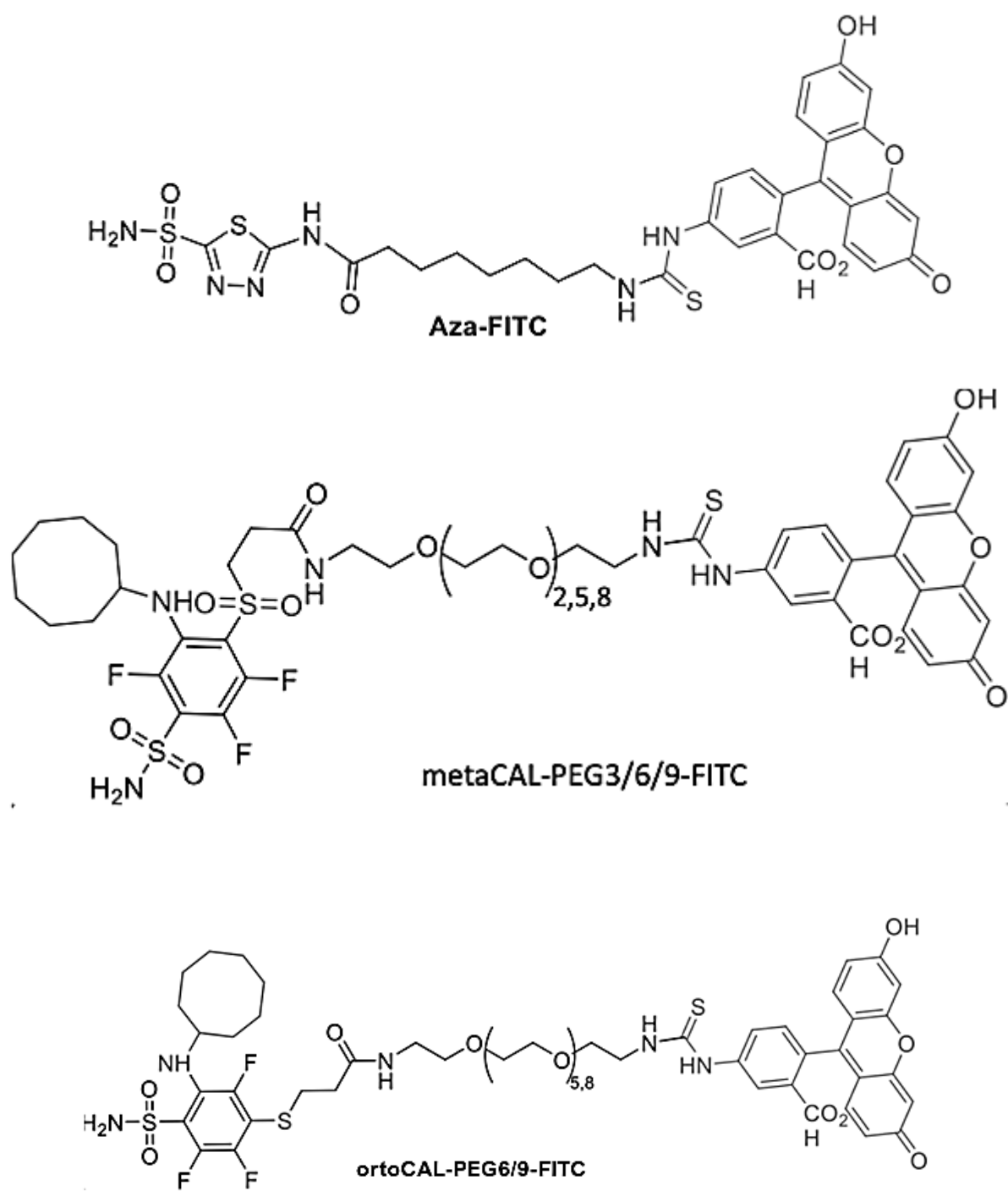
[0296] Cláusula 32. Un método para potenciar la activación de células CAR-T que comprende:

- (i) proporcionar un adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-17 o una composición farmacéutica de la cláusula 18; y
- (ii) exponer células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprende células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable al adaptador biespecífico o a la composición farmacéutica;

en donde la célula CAR-T experimenta una activación potenciada contra células cancerígenas tras la exposición en comparación con una célula CAR-T no expuesta al adaptador biespecífico.

[0297] Cláusula 33. El método de la cláusula 32, en donde las células CAR-T anti-fluoresceína están en circulación sistémica en un sujeto cuando se exponen al adaptador biespecífico.

[0298] Cláusula 34. El método de la cláusula 32, en donde las células cancerígenas son células cancerígenas que expresan CAIX.

**Fig. 1**

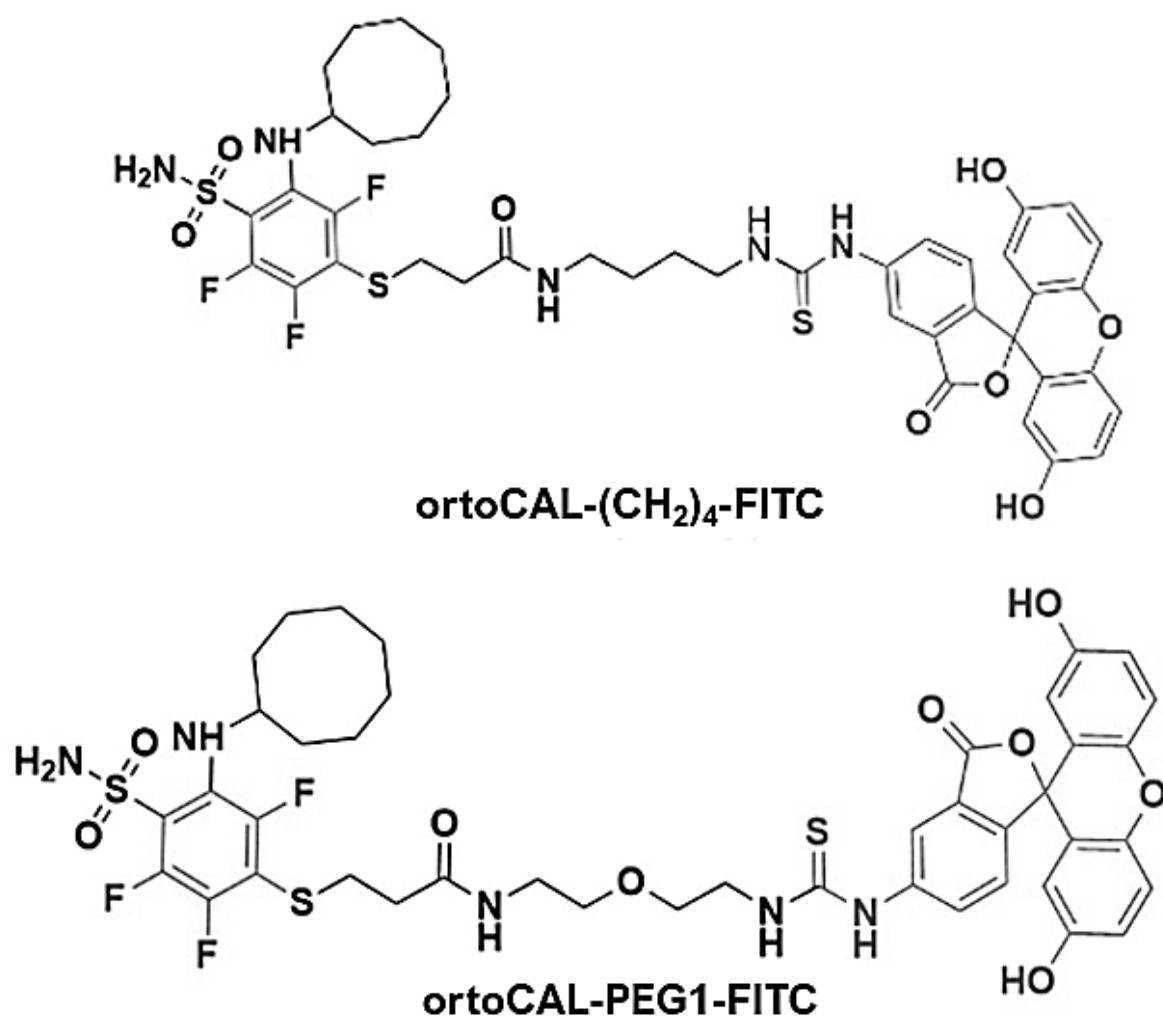
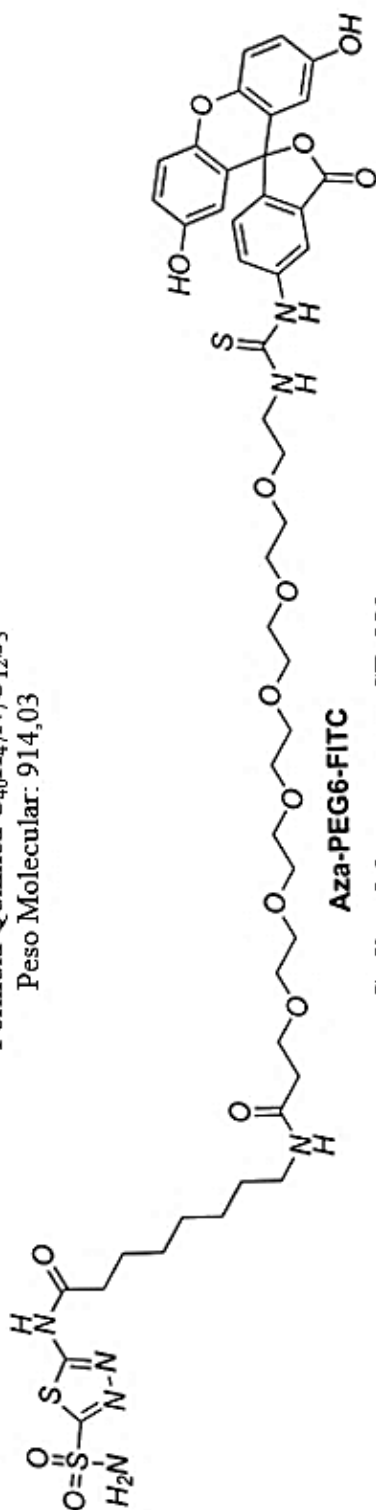


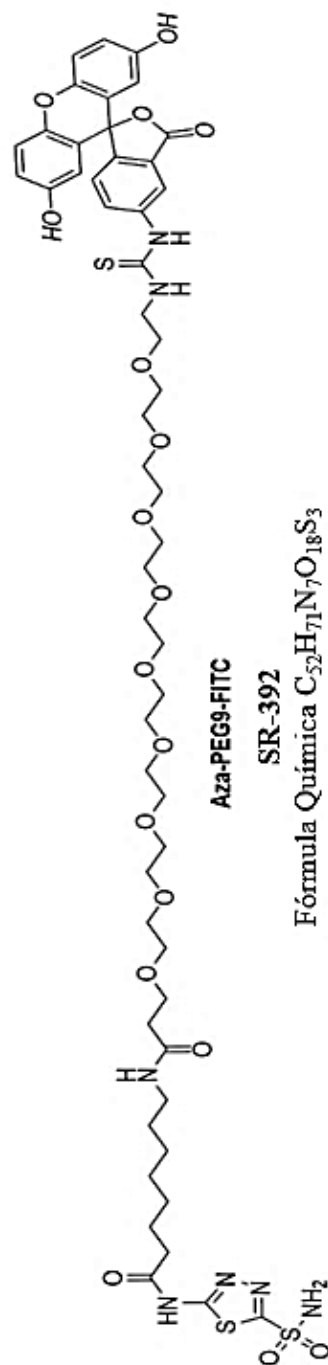
Fig. 1 cont.

Fig. 1 cont.

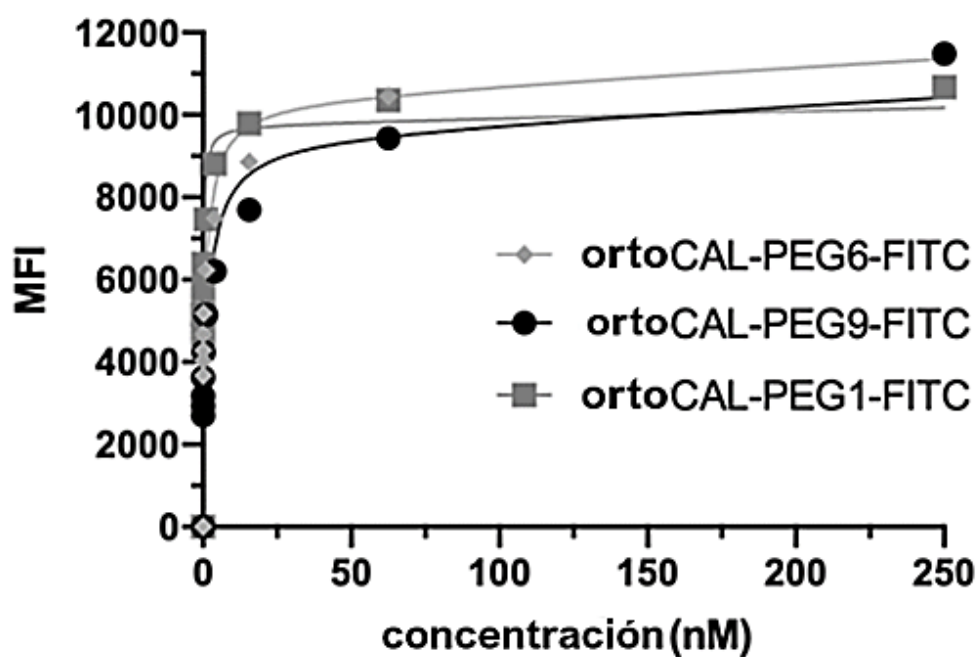
Fórmula Química $C_{40}H_{47}N_7O_{12}S_3$
Peso Molecular: 914,03



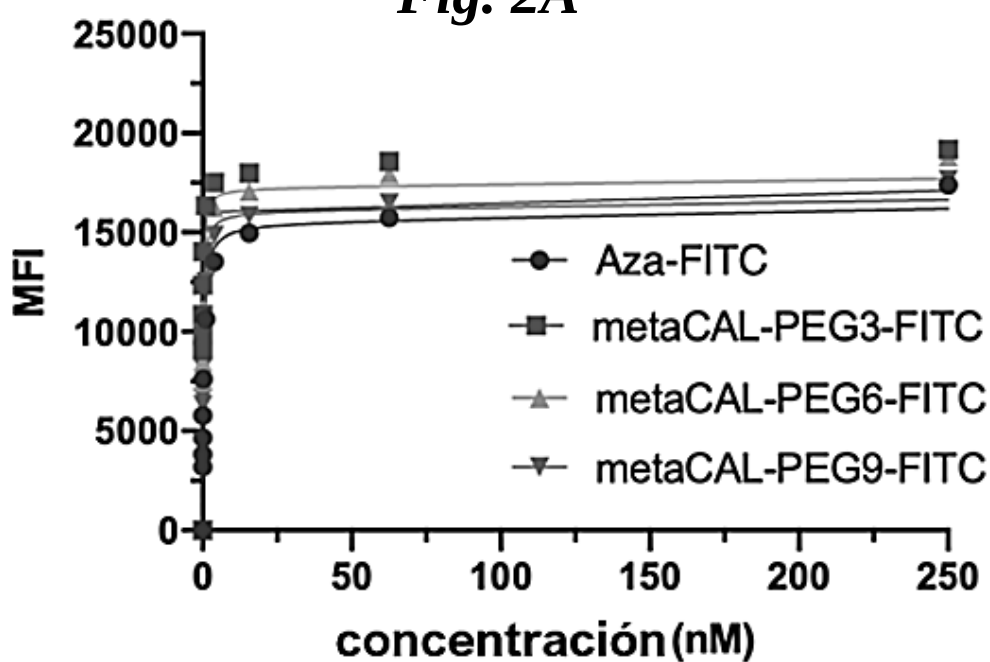
Código del compuesto: **SR-380**
Fórmula Química $C_{46}H_{59}N_7O_{15}S_3$
Peso Molecular: 1046,19



Fórmula Química $C_{52}H_{71}N_7O_{18}S_3$
Peso Molecular: 1178,35

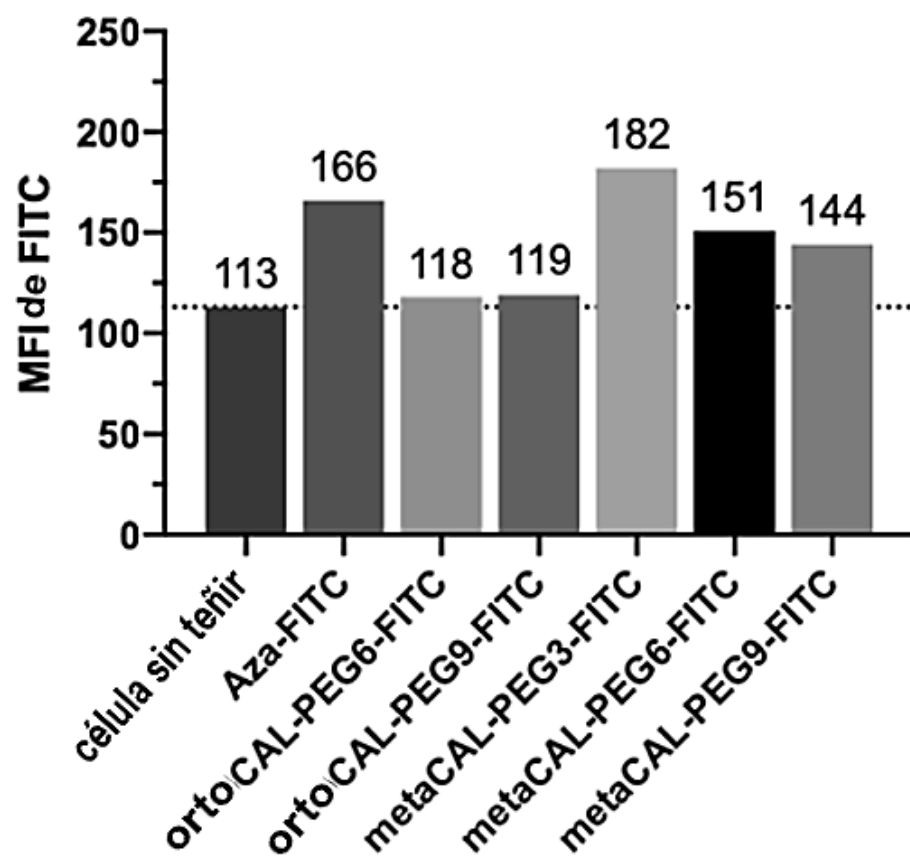
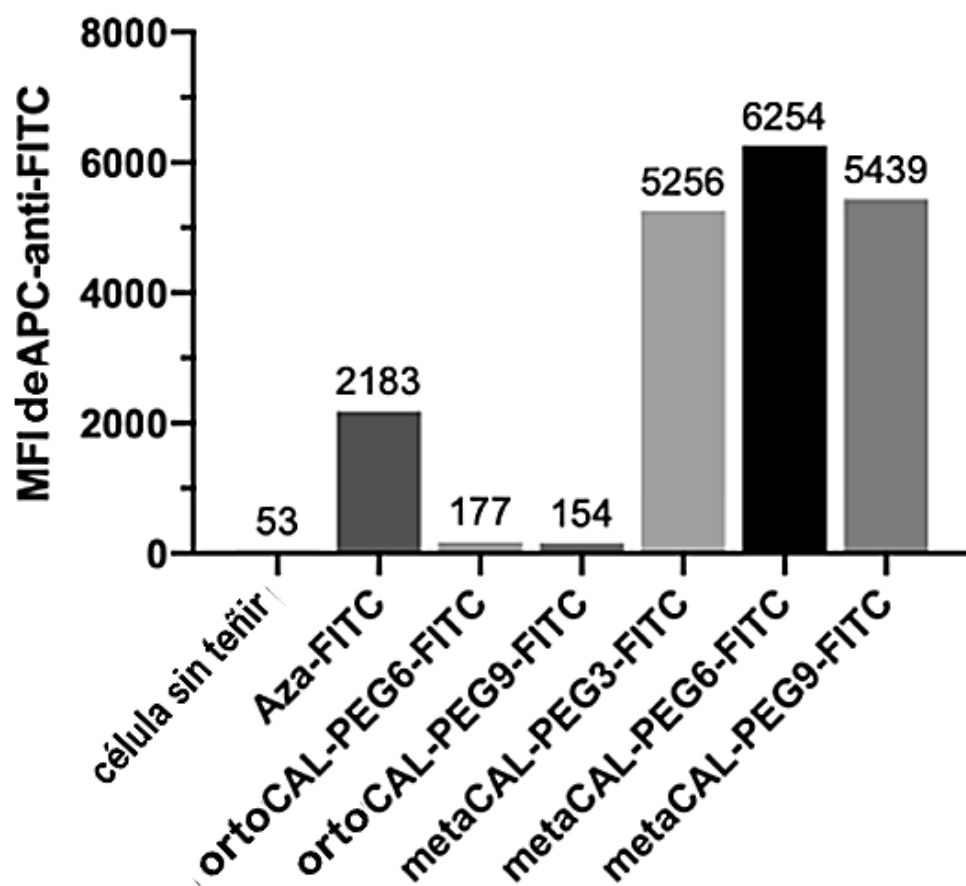


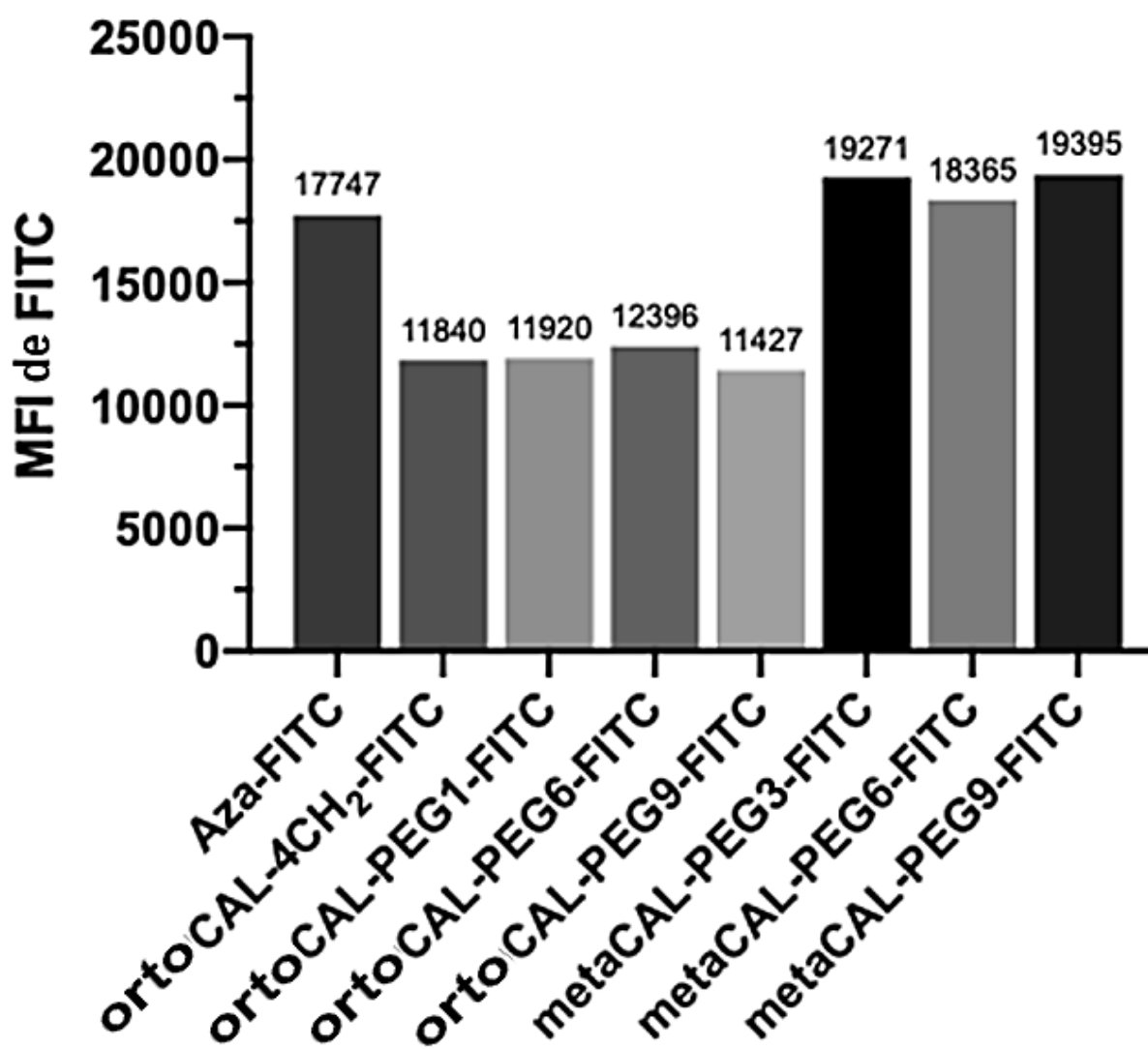
	ortoCAL-PEG1-FITC	ortoCAL-PEG6-FITC	ortoCAL-PEG9-FITC
Kd (nM)	0,002	0,2	0,3

Fig. 2A

	metaCAL-PEG3-FITC	metaCAL-PEG6-FITC	metaCAL-PEG9-FITC	Aza-FITC
Kd (nM)	0,002	0,2	0,3	0,5

Fig. 2B

*Fig. 3A**Fig. 3B*

*Fig. 3C*

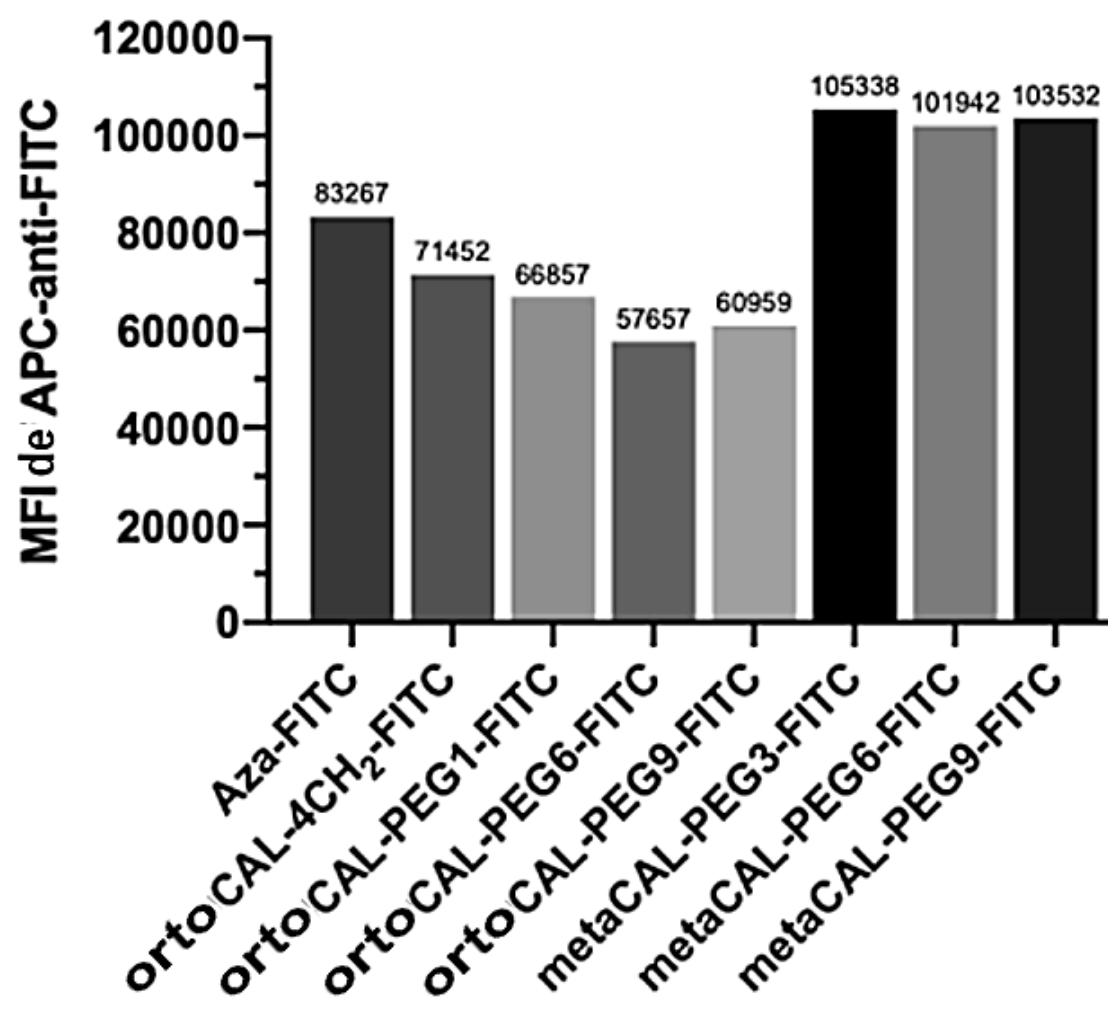
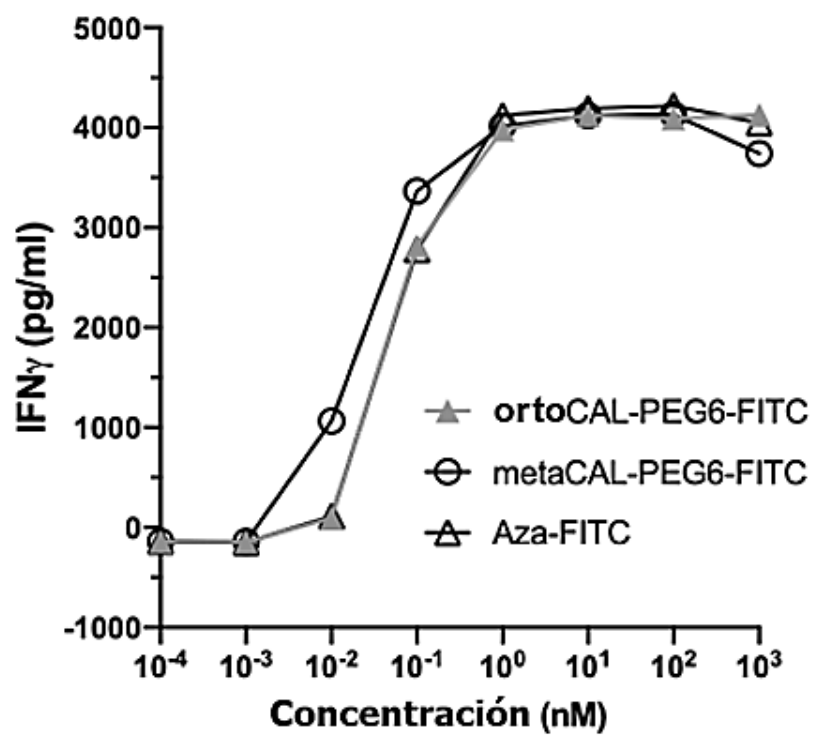
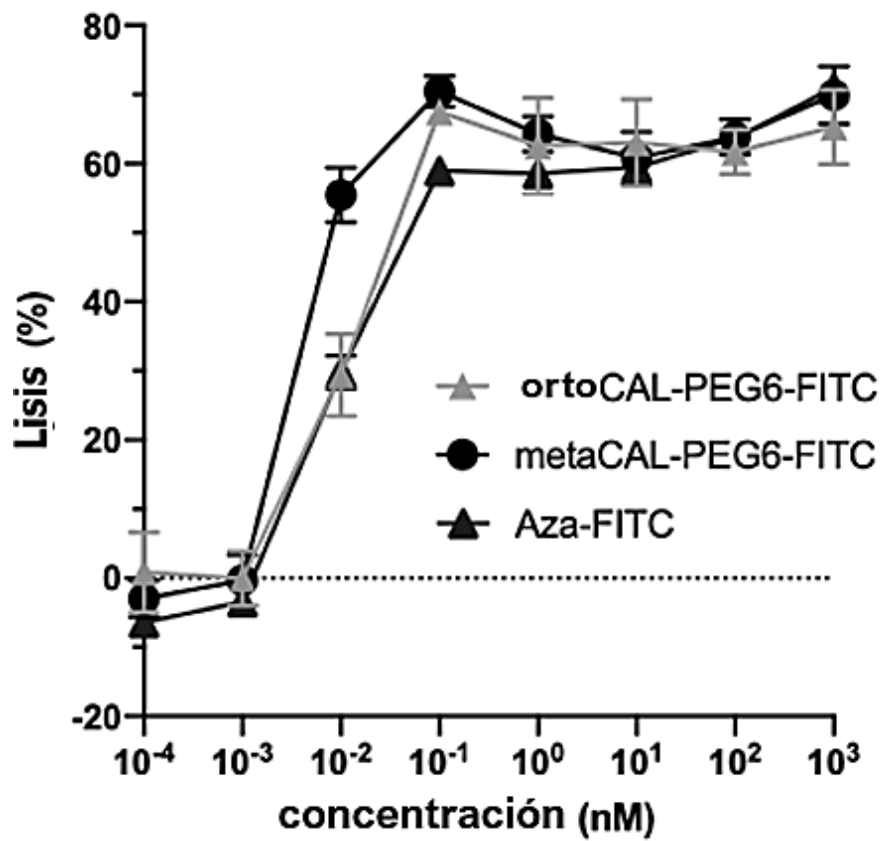
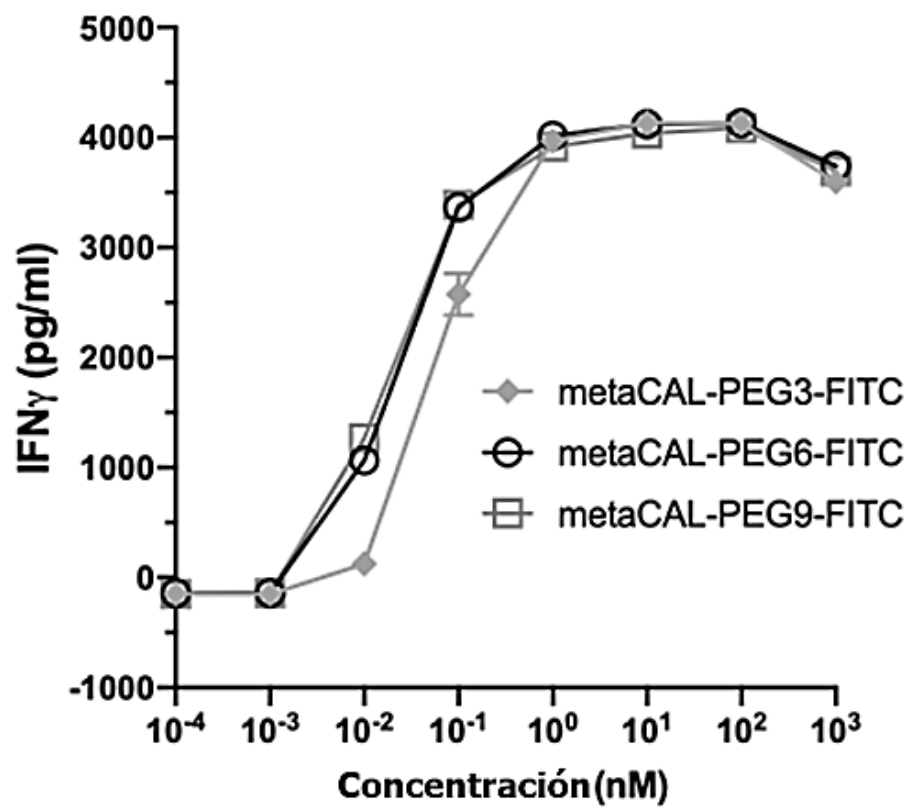
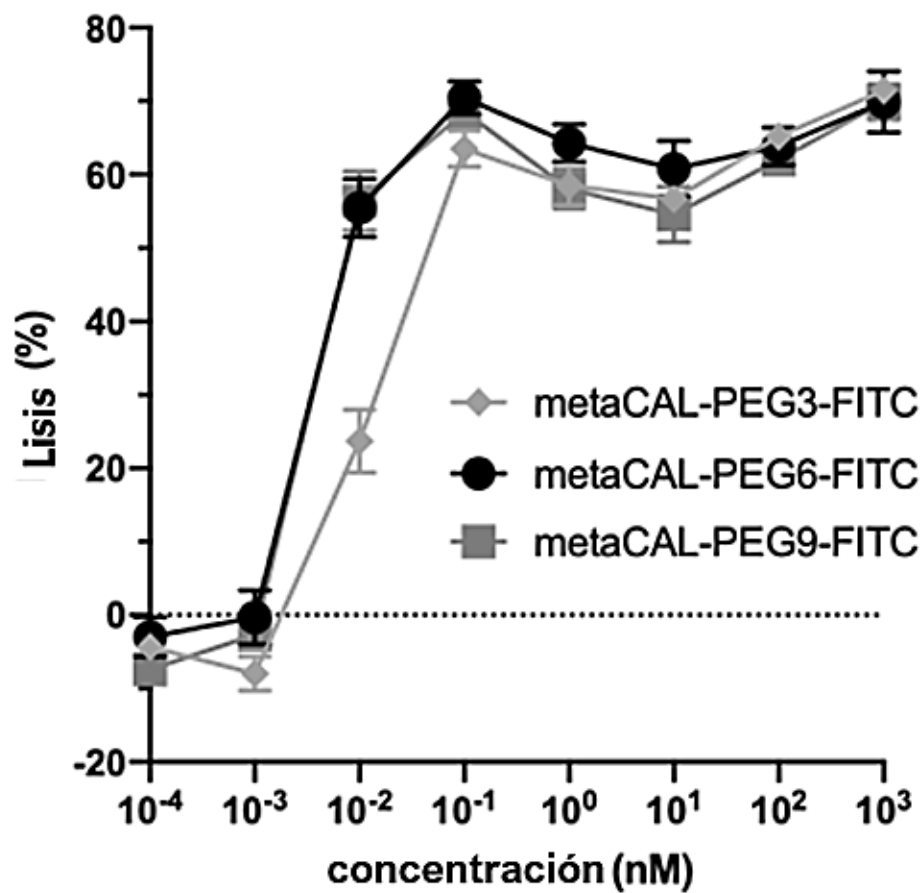
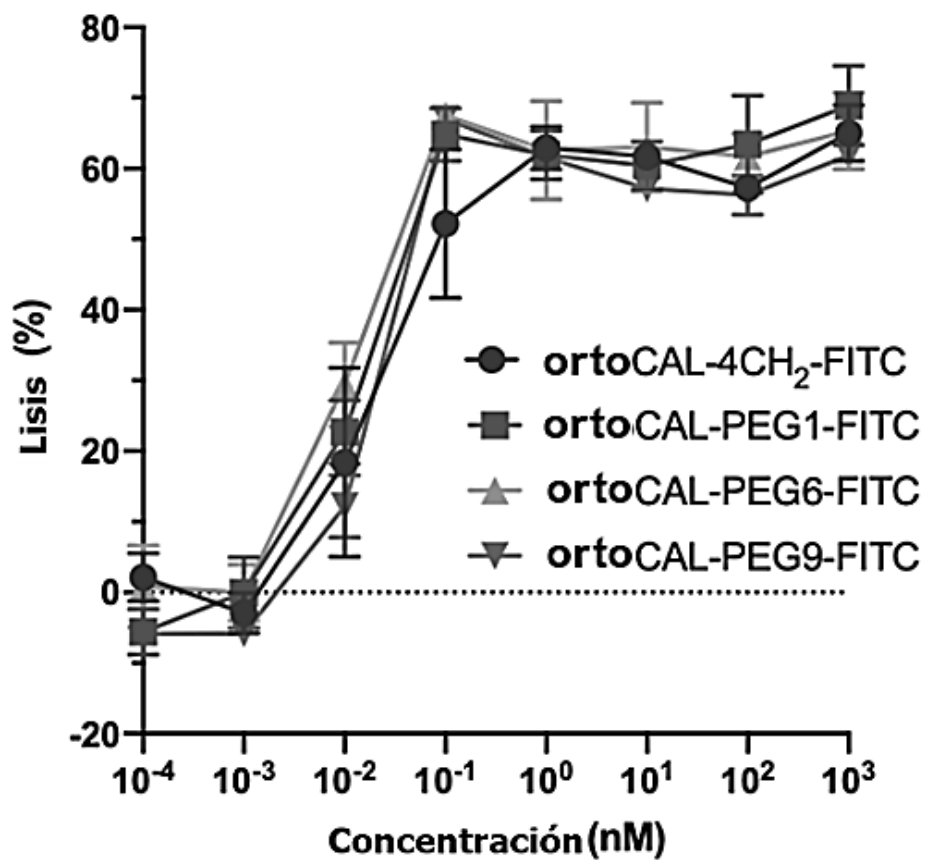
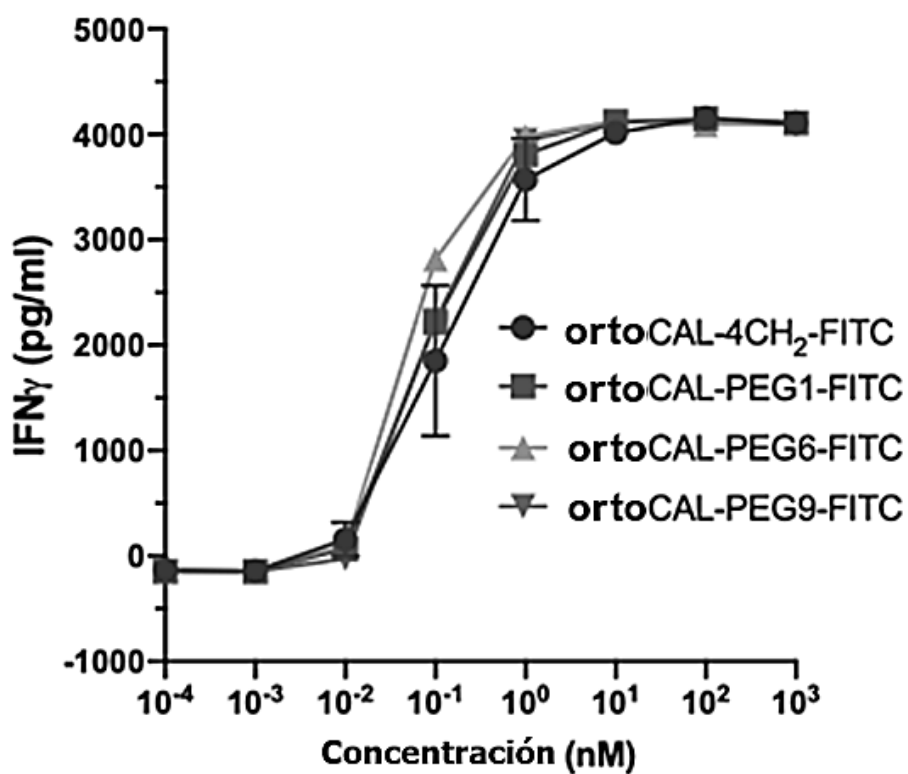


Fig. 3D





*Fig. 6A**Fig. 6B*

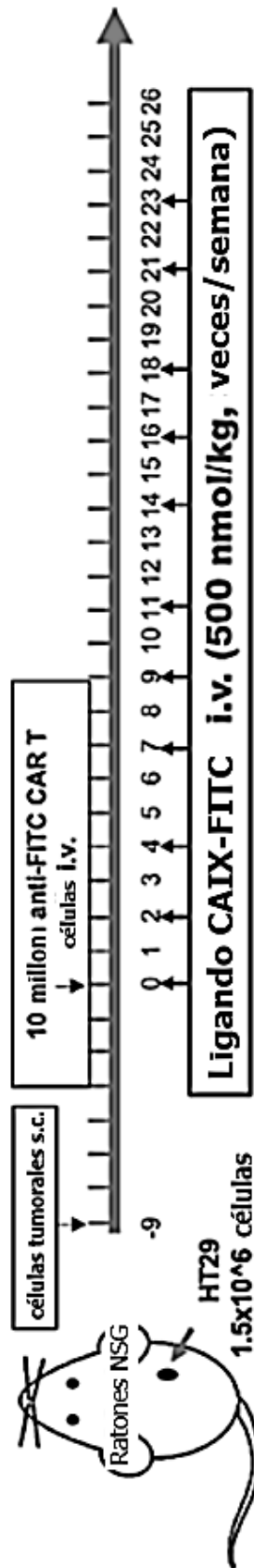


Fig. 7A

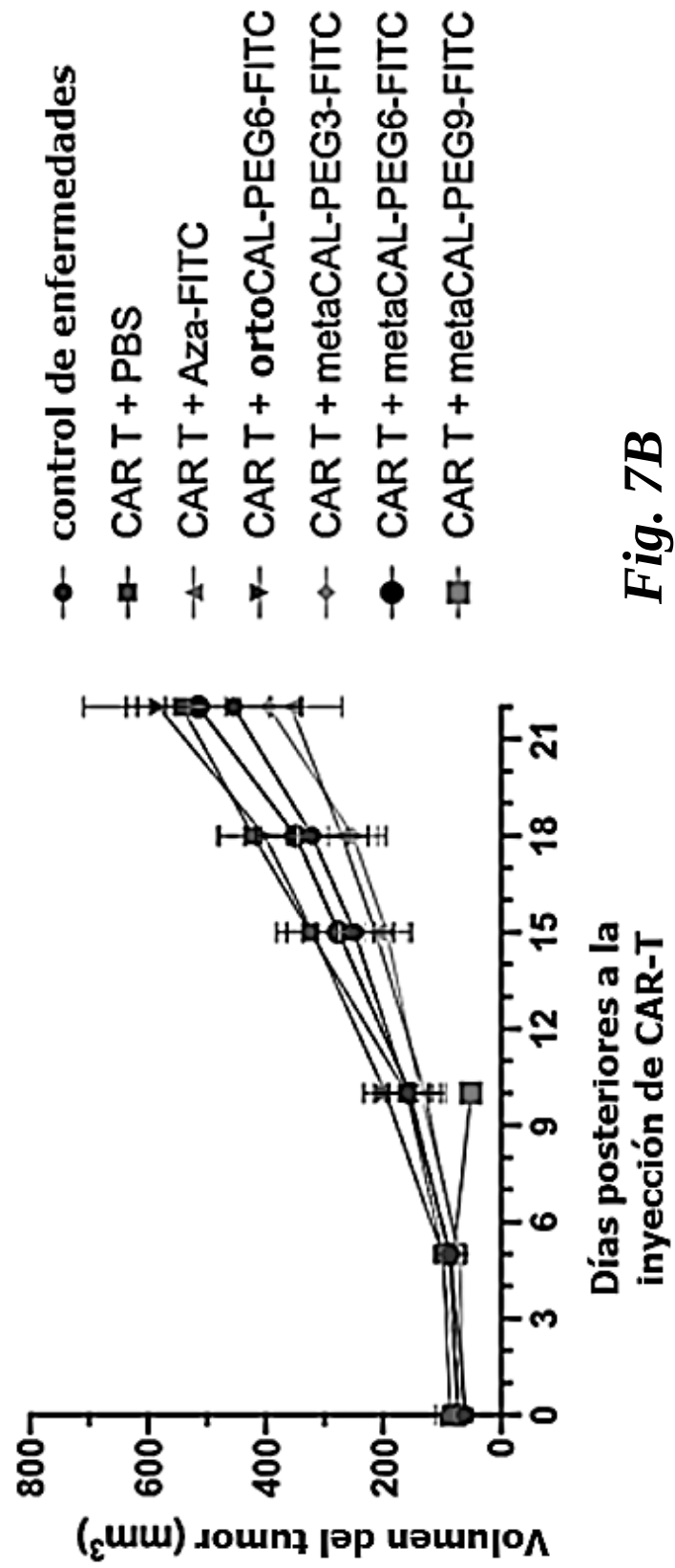


Fig. 7B

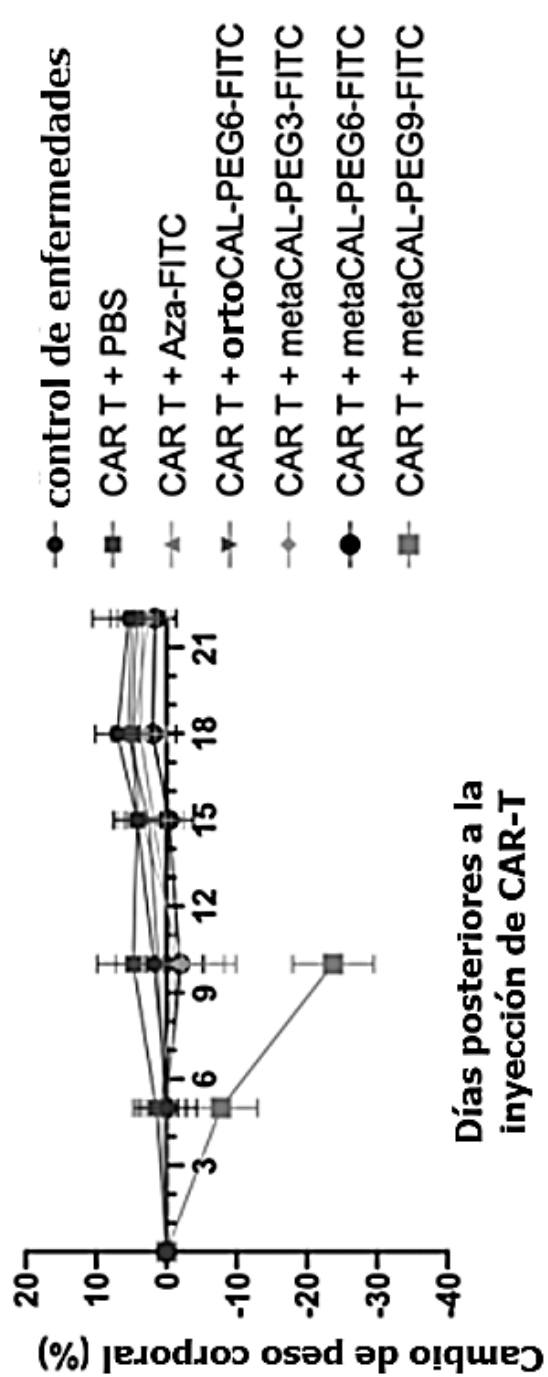


Fig. 7C

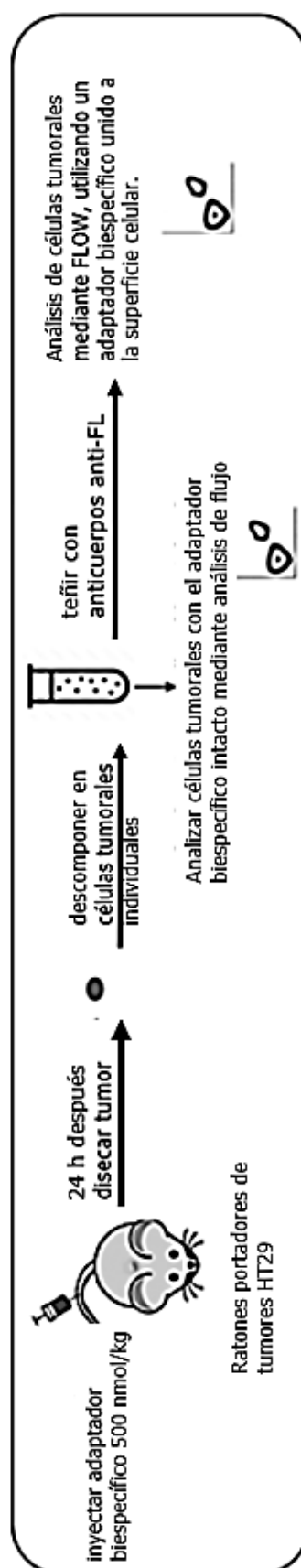
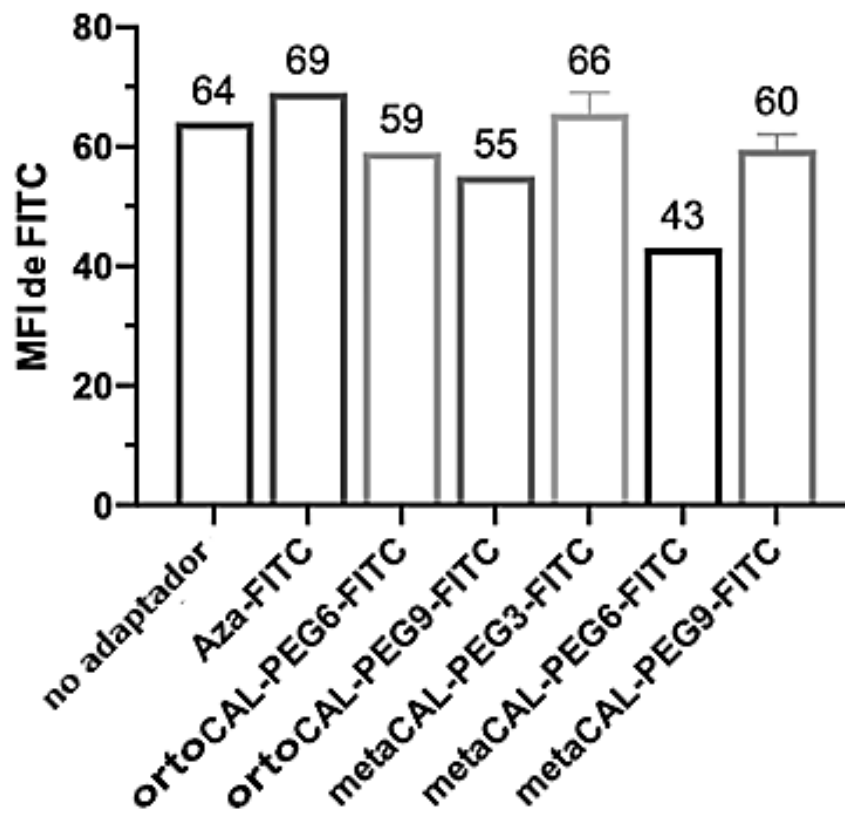
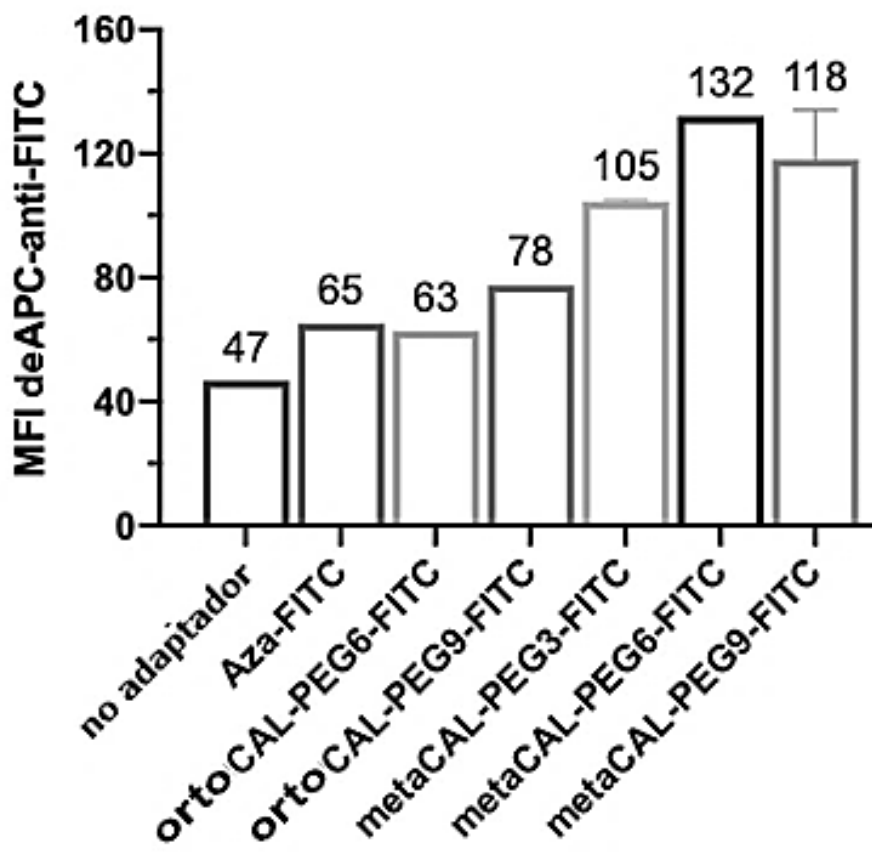
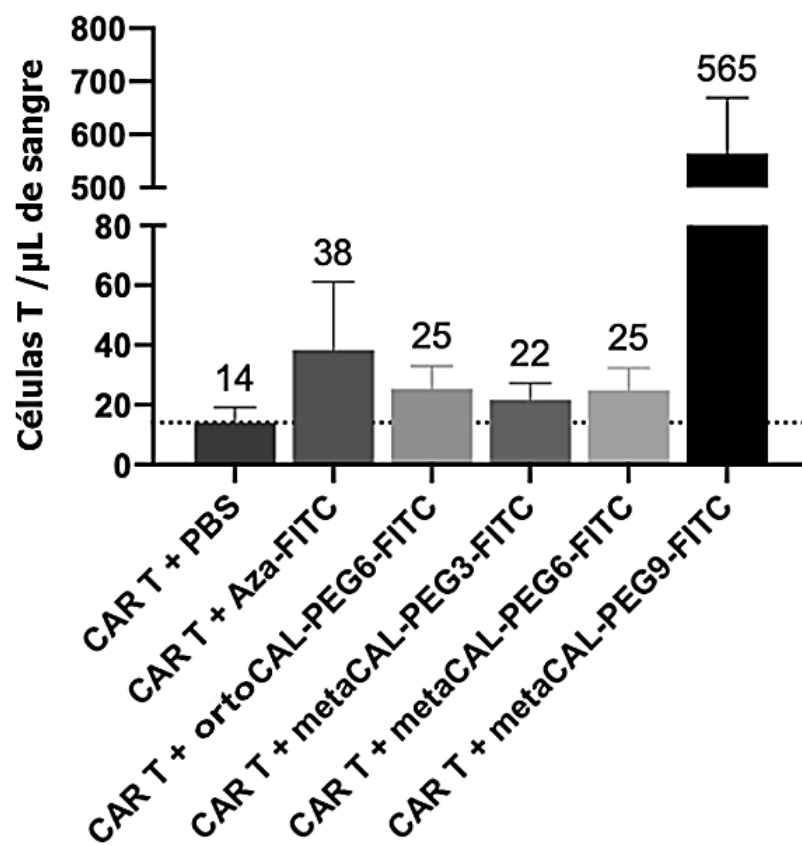
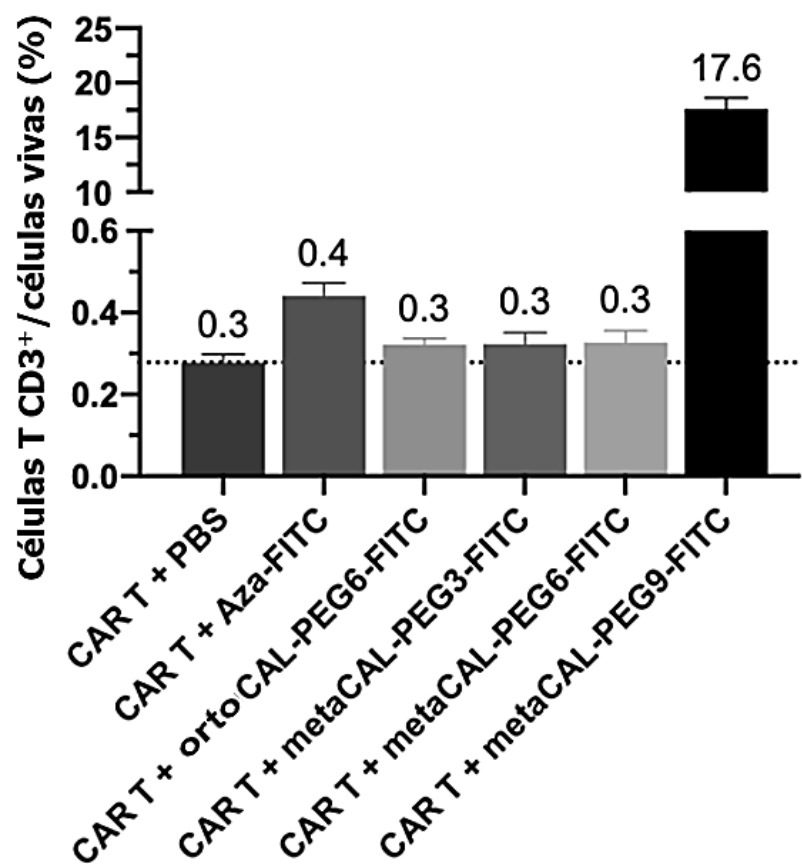


Fig. 8A

*Fig. 8B**Fig. 8C*

*Fig. 9A**Fig. 9B*

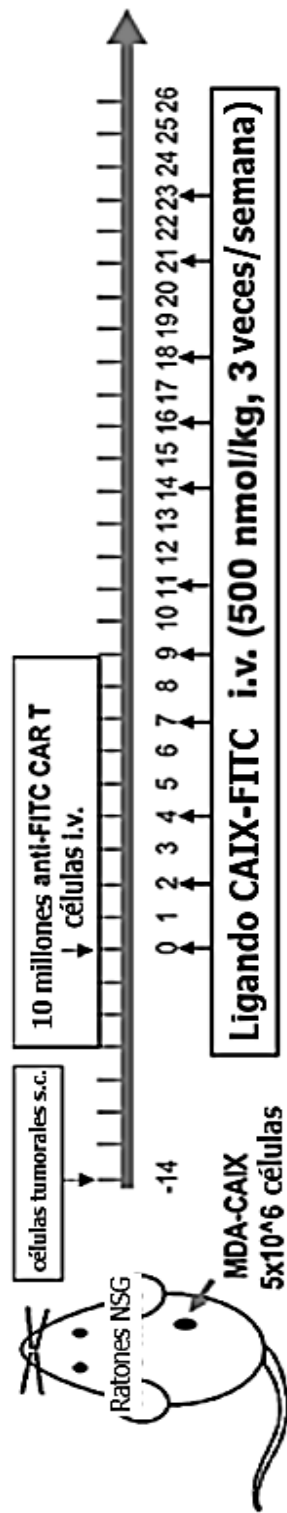


Fig. 10A

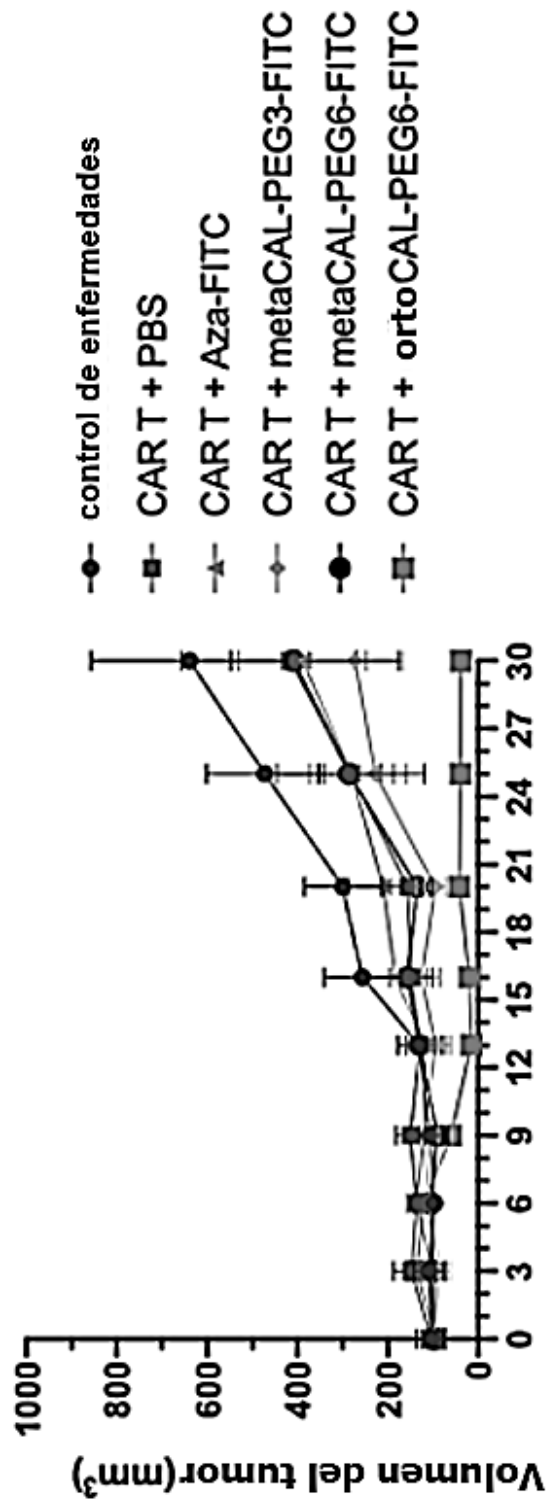
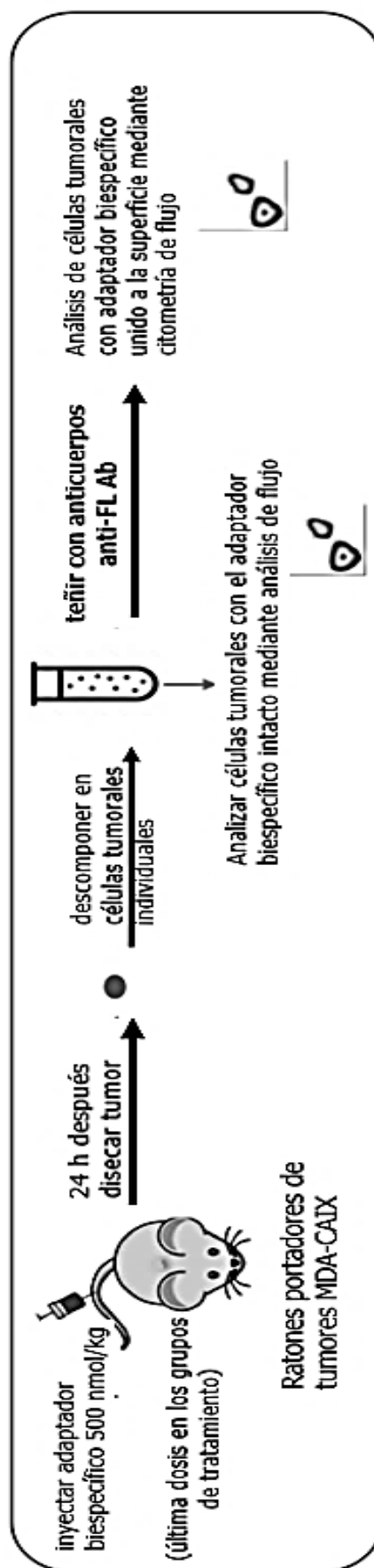
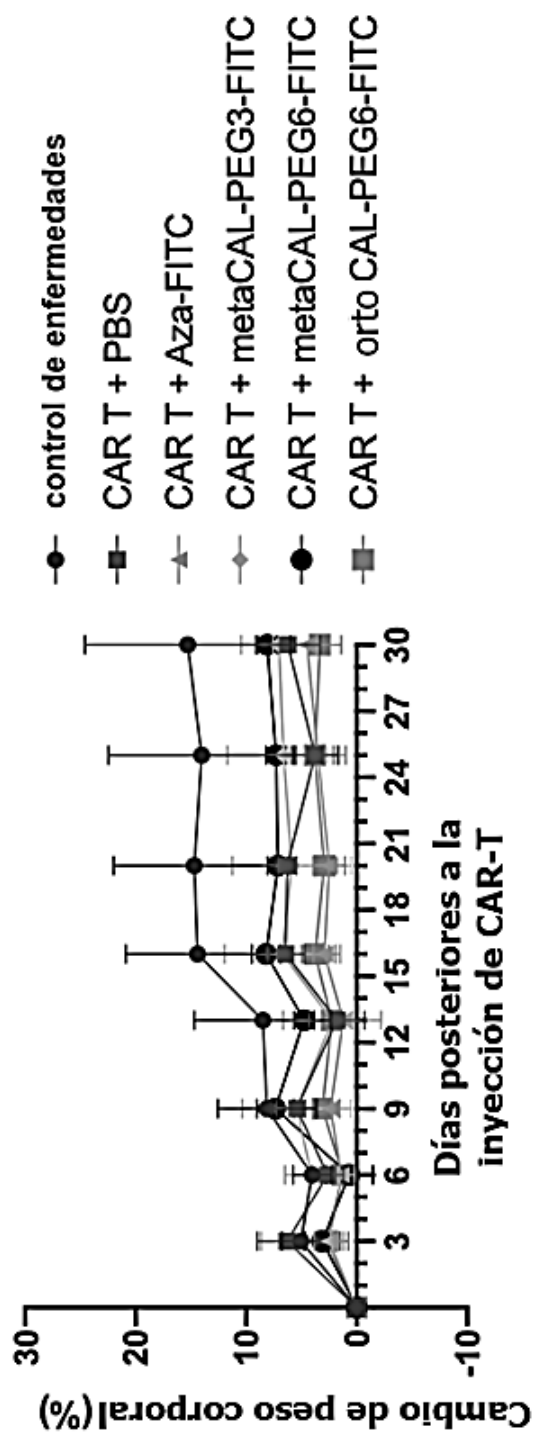


Fig. 10B

Días posteriores a la inyección de CAR-T

Fig. 10C**Fig. 11A**

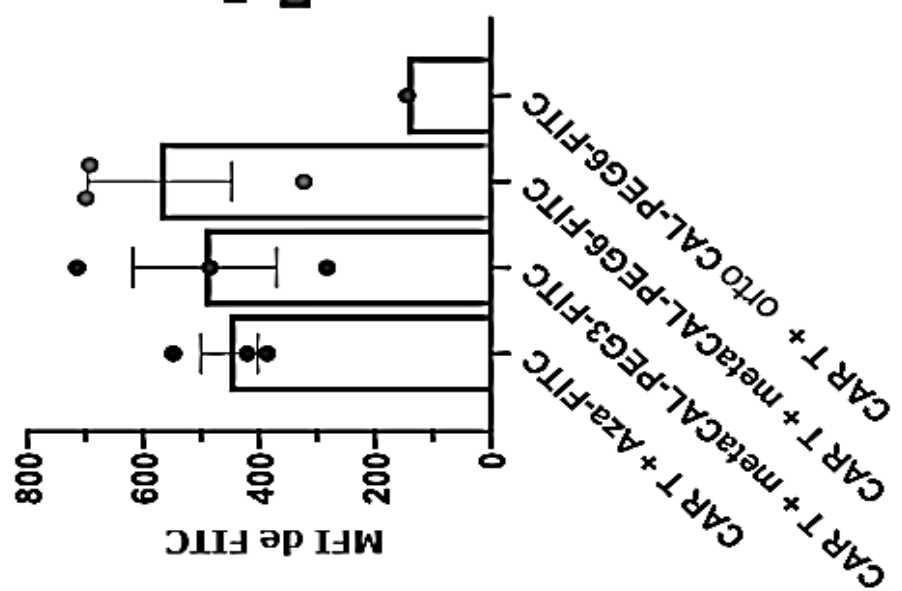


Fig. 11B

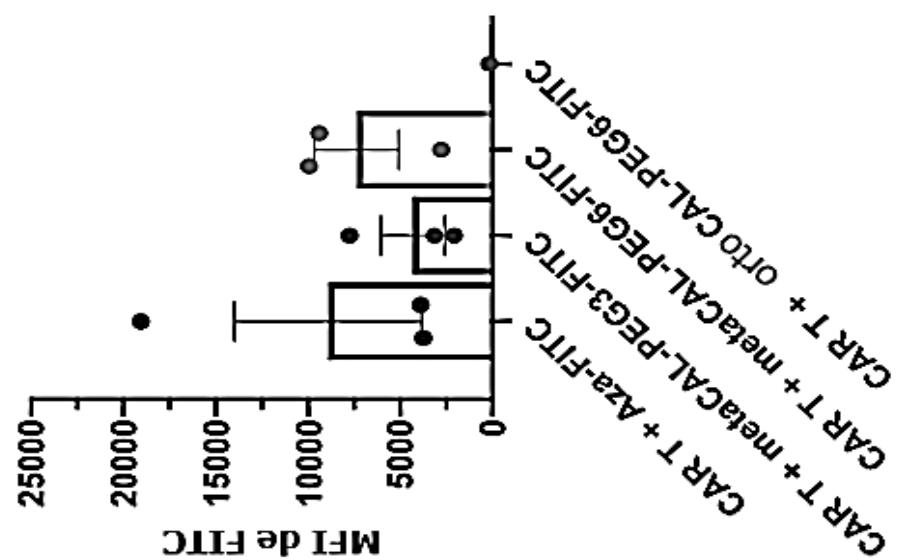
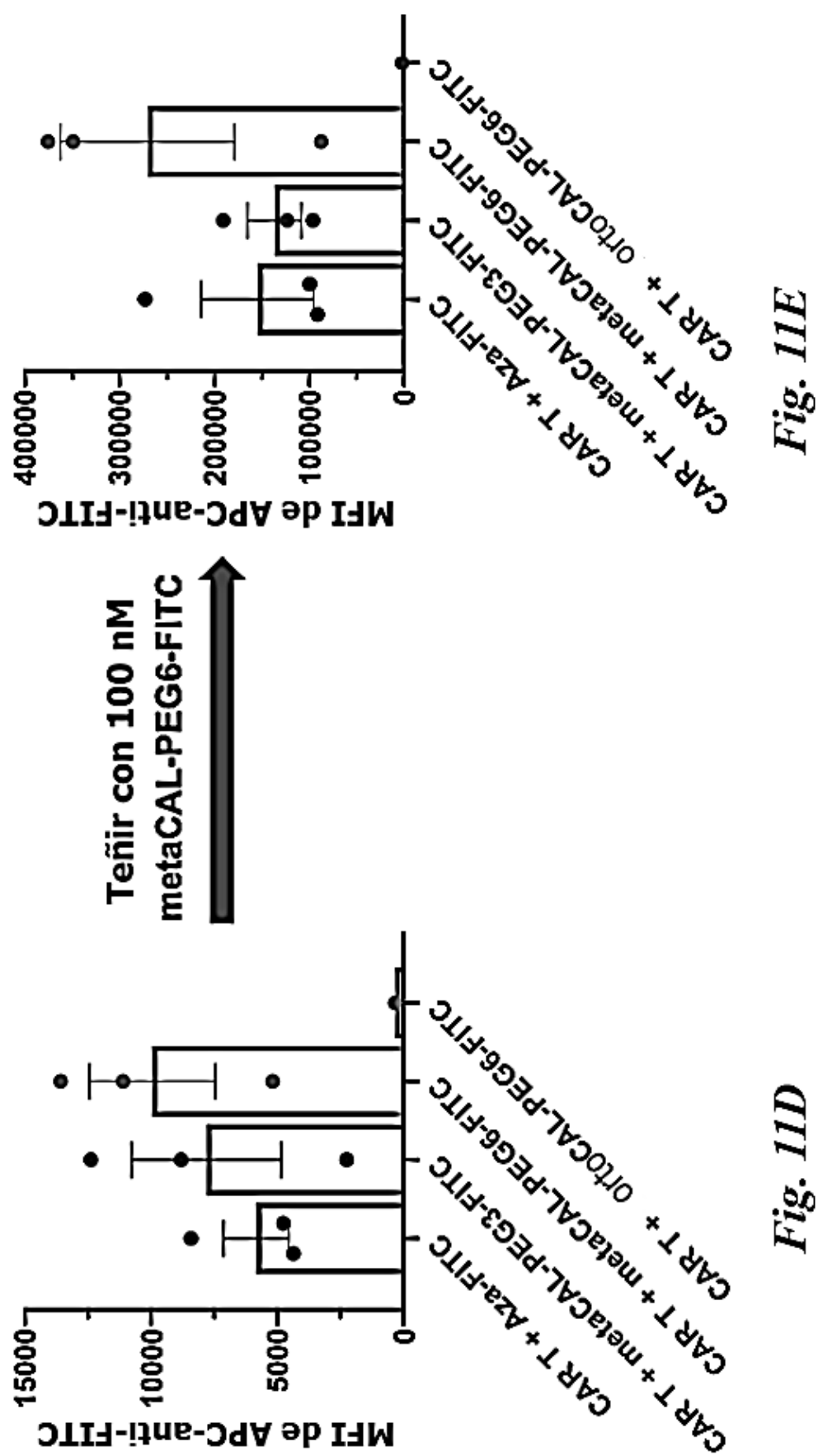
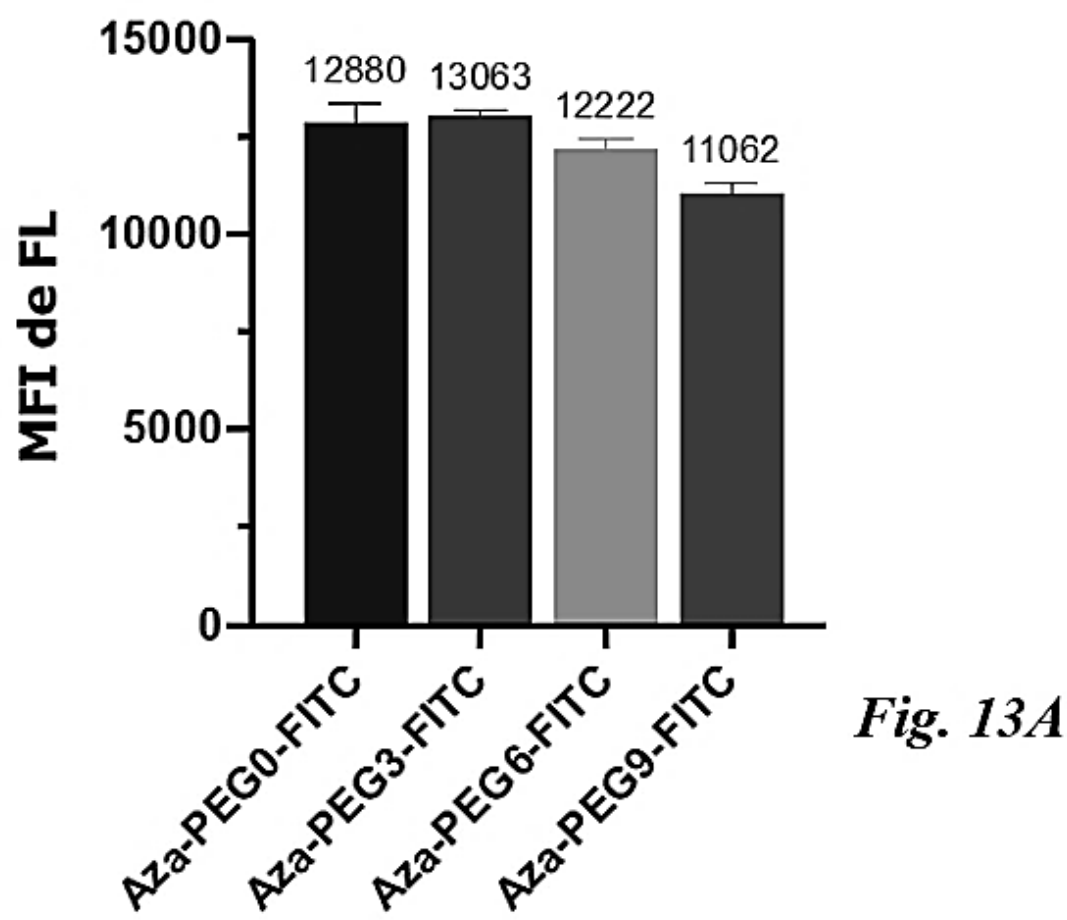
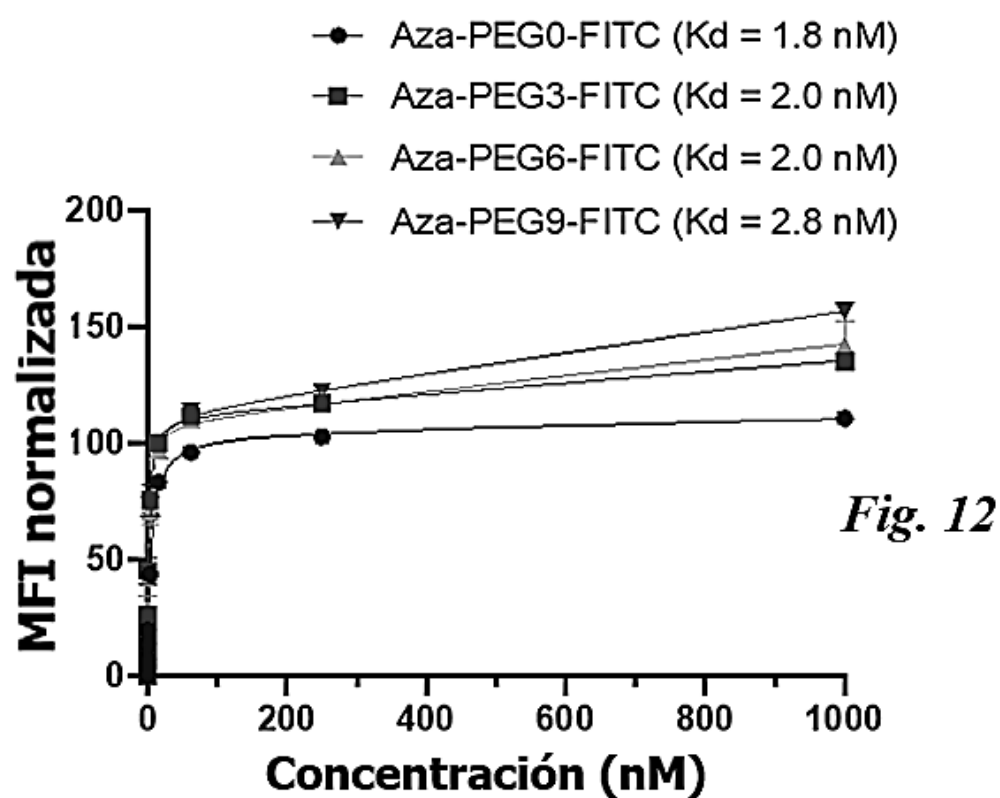
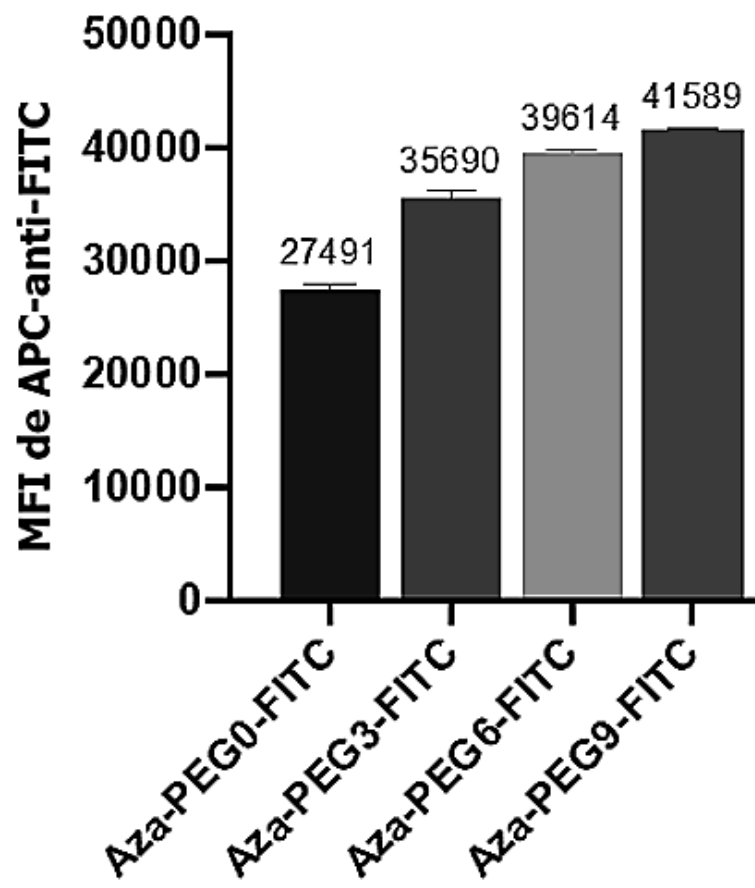
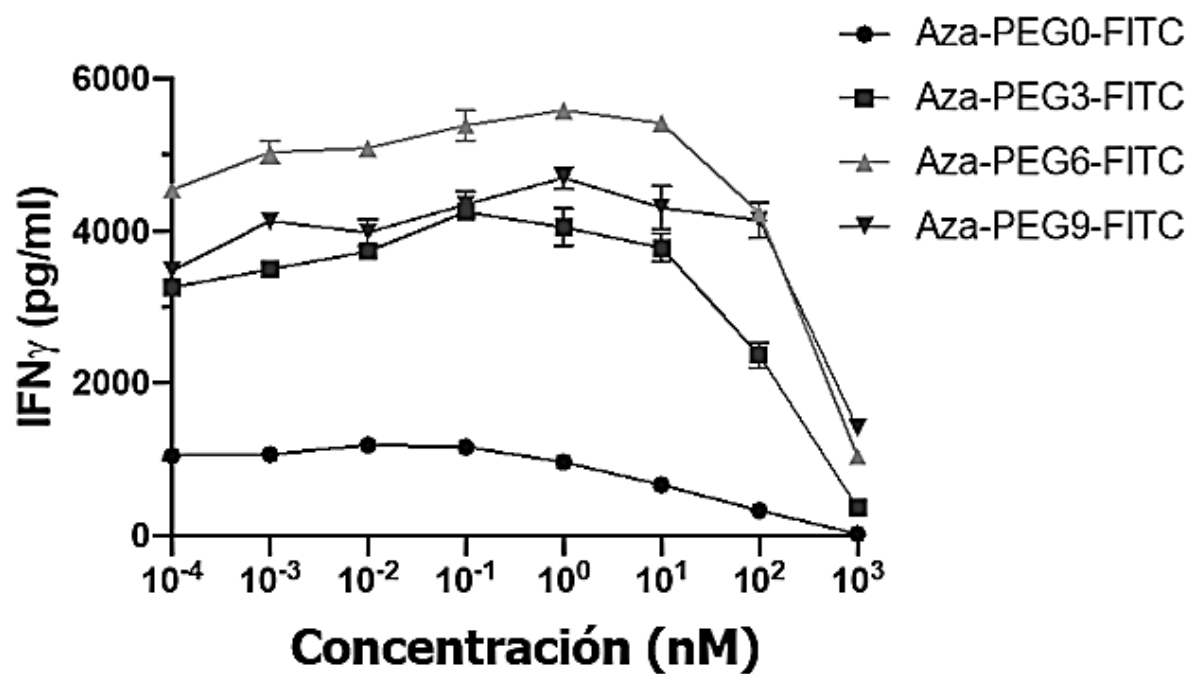


Fig. 11C





*Fig. 13B**Fig. 14*

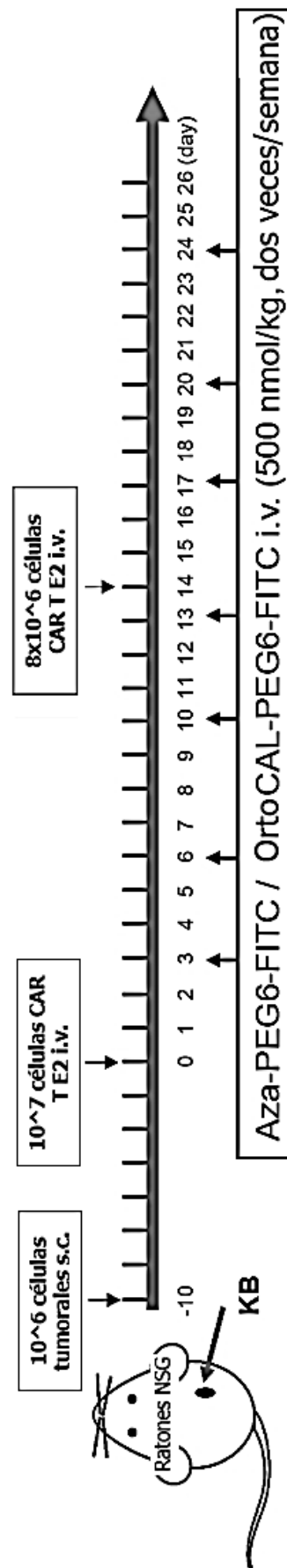
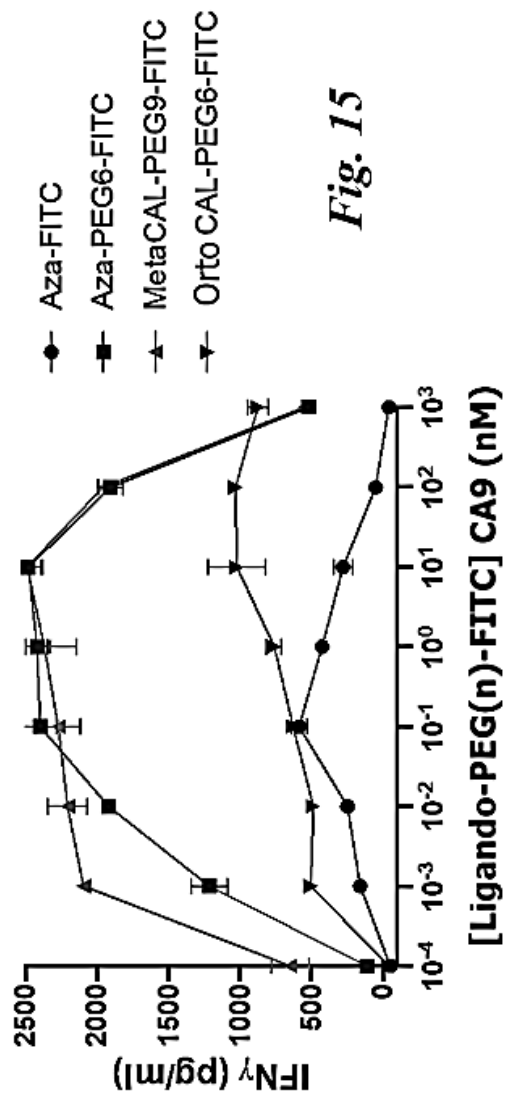


Fig. 16A

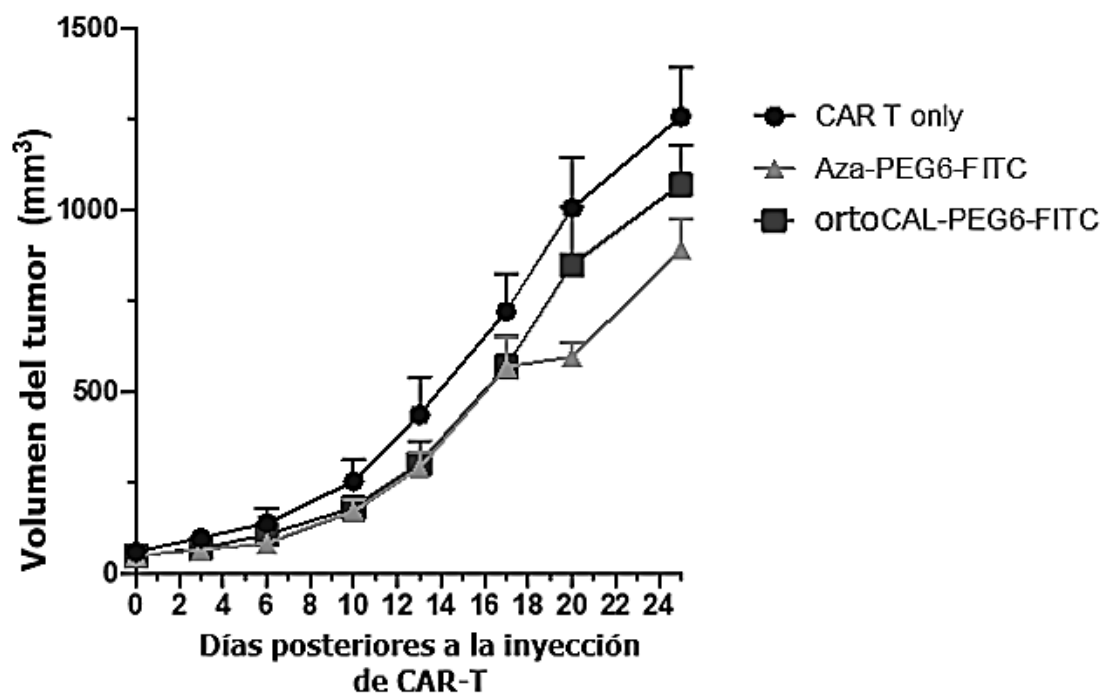


Fig. 16B

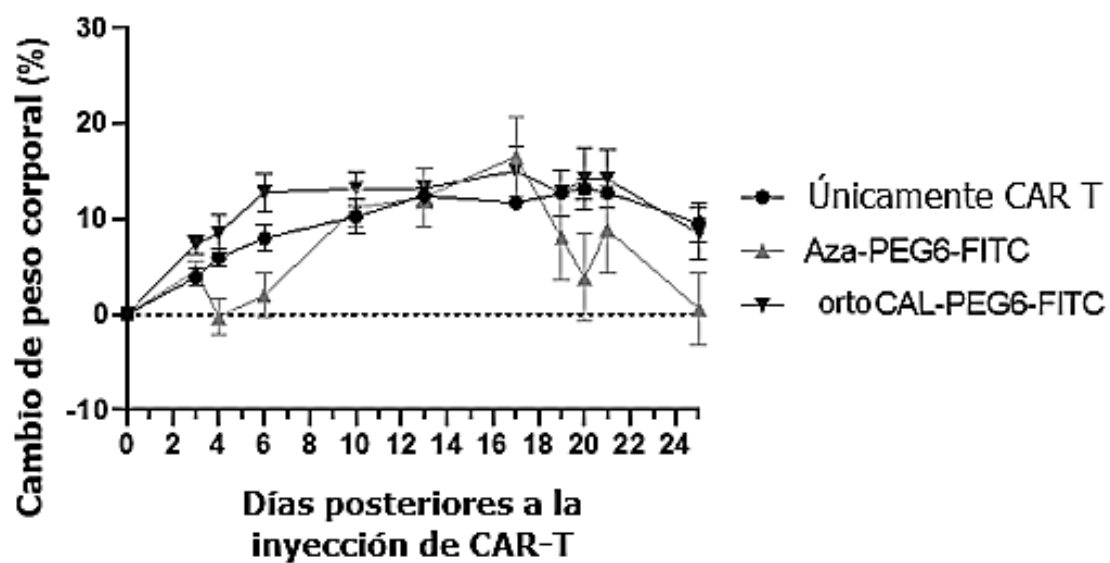


Fig. 16C