

**DESCRIPCIÓN MODIFICADA DE ACUERDO CON EL ARTÍCULO 34 DEL
PCT
ADAPTADORES BIESPECÍFICOS Y SU USO CON CÉLULAS CAR-T
UNIVERSALES EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES Y LA INHIBICIÓN DE
FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER**

PRIORIDAD

[0001] La presente solicitud de patente se relaciona con y reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los EE. UU. N.º 63/451,448, presentada el 10 de marzo de 2023; la Solicitud de Patente Provisional de los EE. UU. N.º 63/595,456, presentada el 2 de noviembre de 2023; la Solicitud de Patente Provisional de los EE. UU. N.º 63/451,453, presentada el 10 de marzo de 2023; la Solicitud de Patente Provisional de los EE. UU. N.º 63/600,612, presentada el 17 de noviembre de 2023; la Solicitud de Patente Provisional de los EE. UU. N.º 63/451,457, presentada el 10 de marzo de 2023; la Solicitud de Patente Provisional de los EE. UU. N.º 63/600,616, presentada el 17 de noviembre de 2023; y la Solicitud de Patente Provisional de los EE. UU. N.º 63/451,462, presentada el 10 de marzo de 2023. El contenido de cada una de las solicitudes anteriores por la presente se incorpora por referencia en su totalidad en la presente memoria.

CAMPO TÉCNICO

[0002] La presente divulgación se refiere a células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) y adaptadores biespecíficos que pueden enlazar las células CAR-T a tumores que expresan el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y/o receptores de folato (FR), o a fibroblastos asociados al cáncer (CAF) que expresan la proteína de activación de fibroblastos (FAP), así como a combinaciones de adaptadores biespecíficos que enlazan las células CAR-T a células tumorales que expresan PSMA o FR y, de manera opcional, a CAF que expresan FAP, y a métodos de tratamiento del cáncer utilizando los mismos.

ANTECEDENTES

[0003] La terapia con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) ha demostrado ser eficaz en cánceres hematológicos, pero su eficacia en tumores sólidos es limitada, al menos en parte, debido a la escasa infiltración de células CAR-T. Esta infiltración limitada de células CAR-T se debe posiblemente a los fibroblastos asociados al cáncer (CAF), que se encuentran en la mayoría de los tumores sólidos y respecto de los cuales se ha demostrado que remodelan la matriz extracelular, secretan citocinas inmunosupresoras, promueven la proliferación de células

tumorales mediante la secreción de factores de crecimiento, favorecen la invasión tumoral, inhiben la respuesta inmunitaria y forman una barrera física que impide la infiltración de células T.

[0004] La proteína de activación de fibroblastos (FAP) se expresa en la superficie de los CAF y se ha demostrado que se correlaciona con un mal pronóstico del paciente en múltiples tumores sólidos. Además, prácticamente todo cáncer sólido humano sobreexpresa FAP.

[0005] Tradicionalmente, se ha utilizado una célula T que expresa un único CAR para dirigirse a un receptor de superficie presente en una célula tumoral. Cuando el CAR de la célula T se une al receptor de superficie de la célula tumoral, la célula T puede matar la célula tumoral a la que está unida. Si bien es eficaz, este enfoque puede resultar bastante costoso, dado que deben producirse células CAR-T para distintos cánceres que expresan diferentes receptores de superficie celular.

[0006] A pesar de la clara necesidad de prevenir y tratar el cáncer, este sigue siendo una causa importante de muerte y sufrimiento en todo el mundo porque actualmente no existen opciones terapéuticas eficaces que curen la afección. Además, cuando existen fármacos u otras terapias, dichos tratamientos suelen emplear medicamentos de alta potencia que conllevan riesgo de toxicidad sistémica en el sujeto tratado por ser poco selectivos respecto de las células cancerosas de interés.

[0007] Se necesitan adaptadores biespecíficos que puedan mejorar la respuesta inmunitaria ejercida por las células CAR-T unidas a las células tumorales e inhibir el efecto de los CAF. Esto y otros objetos y ventajas, así como características inventivas, serán evidentes a partir de la descripción detallada que se proporciona en el presente documento.

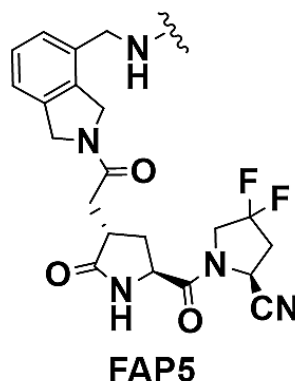
RESUMEN

[0008] Se proporciona un adaptador biespecífico para uso con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) anti-fluoresceína en el tratamiento de cánceres que expresan la proteína de activación de fibroblastos (FAP) (p. ej., que expresan FAP α) y/o el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y, de manera opcional, para su uso en combinación con fibroblastos asociados al cáncer (CAF) que expresan FAP. En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico comprende la siguiente estructura:



en donde F comprende una fluoresceína, L comprende un enlazador (linker) y TL comprende un ligando de direccionamiento (targeting ligand). La fluoresceína puede comprender fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o fluoresceína de N-hidroxisuccinimida (NHS). El ligando

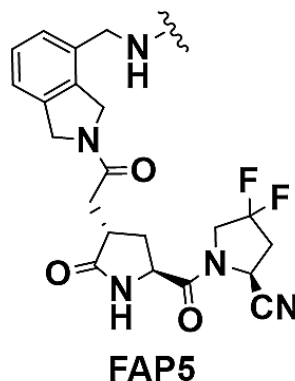
de direccionamiento puede comprender un radical de un ligando de FAP8 o un ligando FAP que comprende una estructura de:



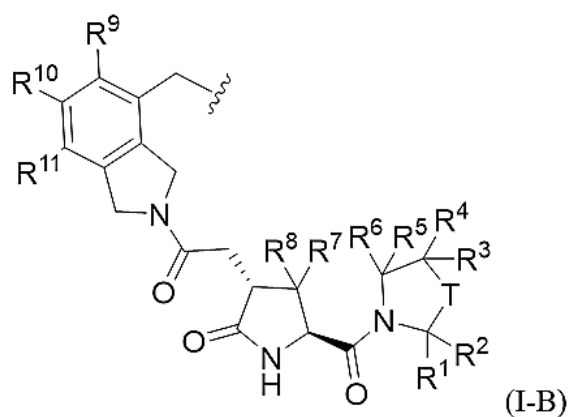
en donde  es el punto de unión al enlazador.

[0009] También se proporciona un adaptador biespecífico para uso con células CAR-T (p. ej., fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa la proteína de activación de fibroblastos (FAP) (p. ej., que expresa FAP α) y/o tumores que expresan el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA).

[0010] En ciertas realizaciones, el adaptador puede comprender fluoresceína-enlazador-ligando FAP (p. ej., fluoresceína = fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína), en donde el ligando FAP es:



y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en, o consiste en) polietilenglicol (PEG), y en donde el adaptador puede ser una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) de PEG4 a PEG16. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) PEG6. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) PEG16. El ligando FAP puede tener una estructura representada por la fórmula I-B:



T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no (-NH-), -O-, o -S-;

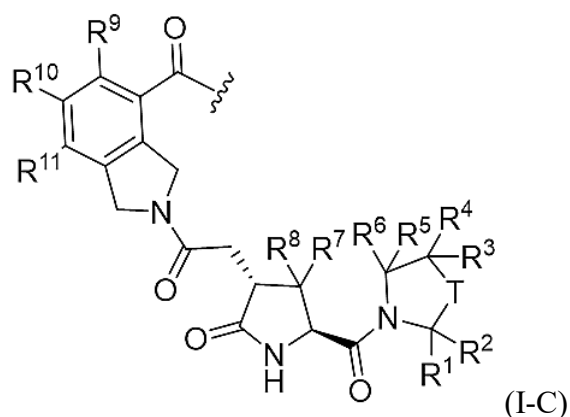
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C₁-6alquilo, -O-C₁-6alquilo, y -S-C₁-6alquilo;

R₅, R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C₁-6alquilo, -O-C₁-6alquilo, -S-C₁-6alquilo, F, Cl, Br e I.

[0011] El ligando FAP puede tener una estructura representada por la fórmula I-C:



T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no (-NH-), -O-, o -S-;

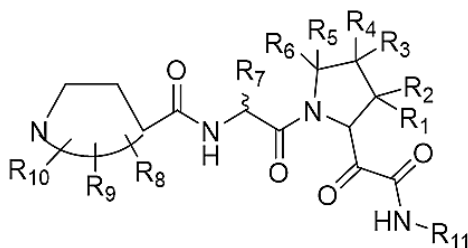
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C₁-6alquilo, -O-C₁-6alquilo, y -S-C₁-6alquilo;

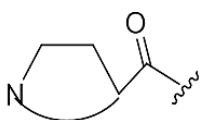
R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I. El adaptador biespecífico puede tener una de las estructuras mostradas en la **FIG. 25**.

[0012] Se proporciona otro adaptador biespecífico para uso con células CAR-T anti-fluoresceína (p. ej., fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) en el tratamiento de cáncer que expresa FAP (p. ej., que expresa FAP α), cuyo adaptador comprende fluoresceína-enlazador-ligando FAP (p. ej., fluoresceína = fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína), en donde el ligando FAP es o comprende FAP8 y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en, o consiste en) PEG, y en donde el adaptador puede ser una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) de PEG3 a PEG15. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) PEG15. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) PEG16. El ligando FAP8 puede tener la estructura:



en donde:



representa un heterociclo que contiene N aromático o no aromático, monocíclico o bicíclico, de 5 a 10 miembros, funcionalizado, que opcionalmente comprende además de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S;

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

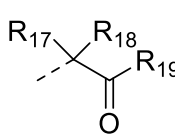
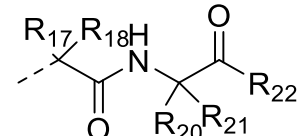
R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

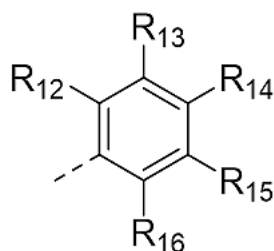
R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

R7 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH₂=, -CH₃, CH₃CH₂-, (CH₃)₂CH-, (CH₃)₃C-, -CH₂Ph, y -CH₂Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -NH₂, -N₃, -NH=NH, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, C1-C10 alquilo, C3-C10 cicloalquilo,

adamantil, , , arilo sustituido o no sustituido, arilo alquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



en donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, Cl-C3 alquilo, Cl-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, Cl-C4 alquilo y Cl-C3 alcoxi;

R13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, Cl-C3 alquilo, Cl-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, Cl-C4 alquilo y Cl-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente entre -H y -CH₃; y

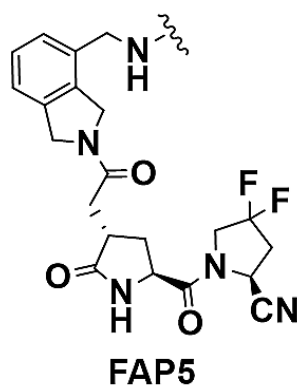
R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo.

[0013] Un adaptador biespecífico puede comprender la siguiente estructura:
F — L — TL,

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

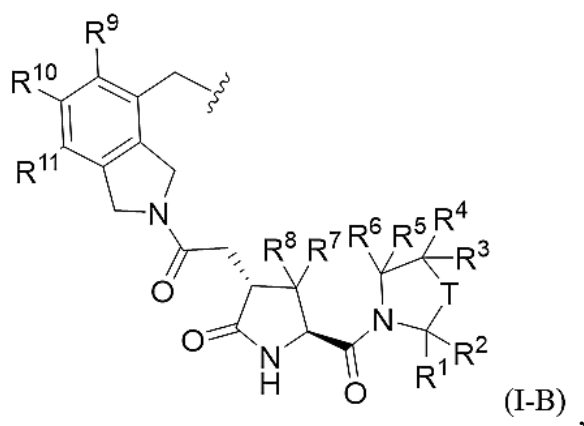
F comprende una fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína,
L comprende un enlazador, y
TL comprende un ligando de direccionamiento que comprende un radical de un ligando FAP o un radical de un ligando PSMA.

[0014] El ligando de direccionamiento puede comprender un radical de un ligando FAP8 o de un ligando FAP que comprende una estructura de:



en donde es el punto de unión al enlazador.

[0015] El ligando de direccionamiento puede comprender un radical de un ligando FAP5 que comprende una estructura representada por la fórmula I-B:



en donde:

es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no (-NH-), -O-, o -S- ;

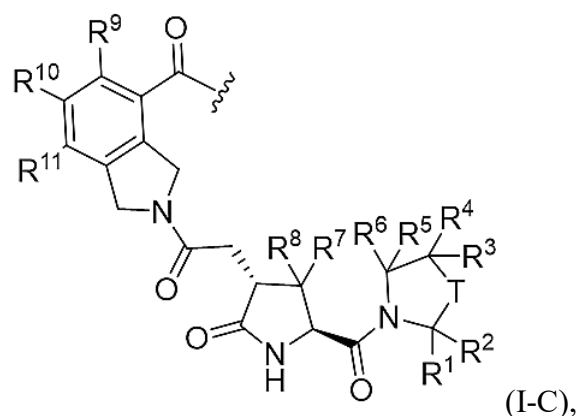
R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6 alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6 alquilo, F, Cl, Br e I.

[0016] El ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico puede comprender un radical de un ligando FAP5 que comprende una estructura representada por la fórmula I-C:



en donde:

 es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no (-NH-), -O-, o -S-;

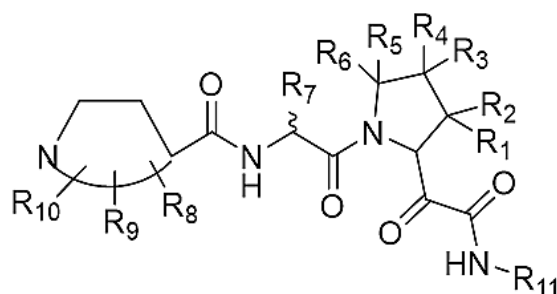
R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

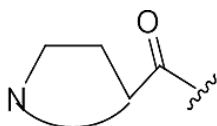
R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I.

[0017] El ligando de direccionamiento puede comprender un radical de un ligando FAP8 que comprende una estructura:



en donde:



representa un heterociclo que contiene N aromático o no aromático, monocíclico o bicíclico, de 5 a 10 miembros, funcionalizado, que opcionalmente comprende además de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S;

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

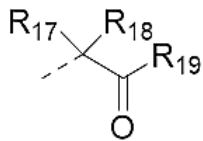
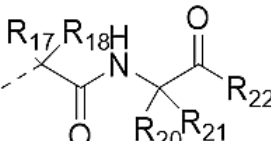
R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

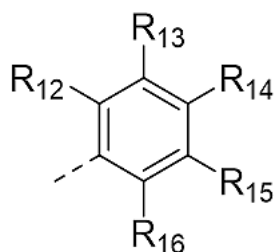
R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

R7 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH₂=, -CH₃, CH₃CH₂-, (CH₃)₂CH-, (CH₃)₃C-, -CH₂Ph y -CH₂Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -NH₂, -N₃, -NH=NH, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, Cl-C10 alquilo, C3-C10 cicloalquilo,

adamantilo, , , arilo sustituido o no sustituido, arilo alquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



en donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, Cl-C3 alquilo, Cl-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, Cl-C4 alquilo y Cl-C3 alcoxi; R-13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, Cl-C3 alquilo, Cl-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR-23, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, Cl-C4 alquilo y Cl-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente entre -H y -CH₃; y R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo.

[0018] En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando PSMA y es PSMAL1 o DUPA.

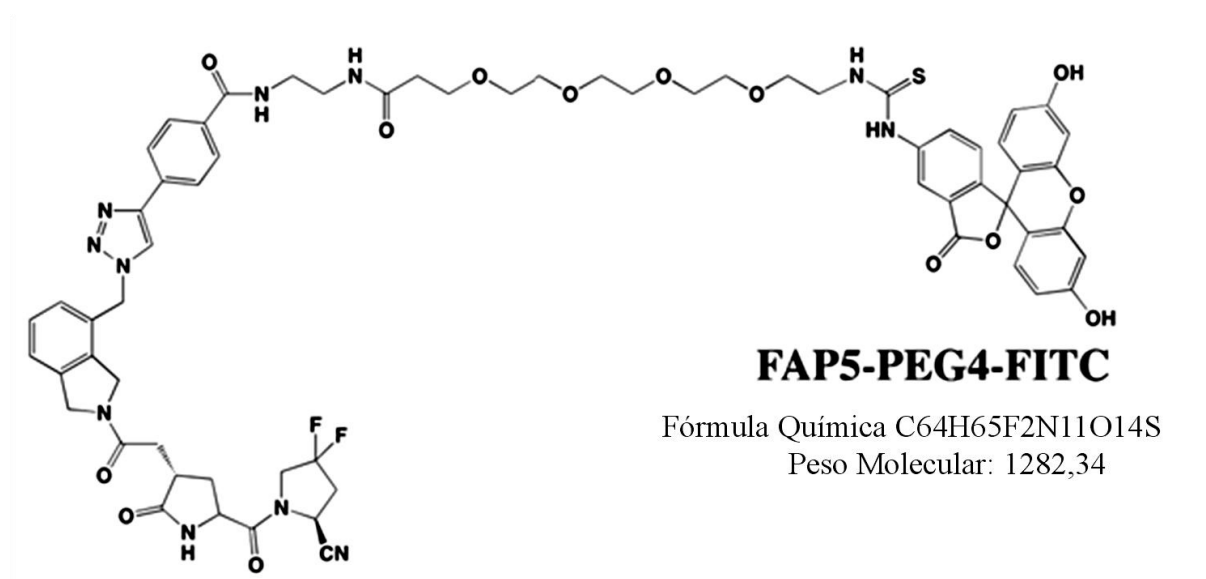
[0019] El enlazador puede comprender o consistir esencialmente en polietilenglicol (PEG) o un derivado de PEG, tales como, opcionalmente: de PEG3 a PEG16 y, opcionalmente, de PEG4 a PEG15 o de PEG3 a PEG12; PEG12, PEG15, PEG16 o PEG18; de PEG4 a PEG16; PEG16; de PEG3 a PEG15; PEG15; de PEG3 a PEG12; PEG6; de PEG3 a PEG8; o PEG6.

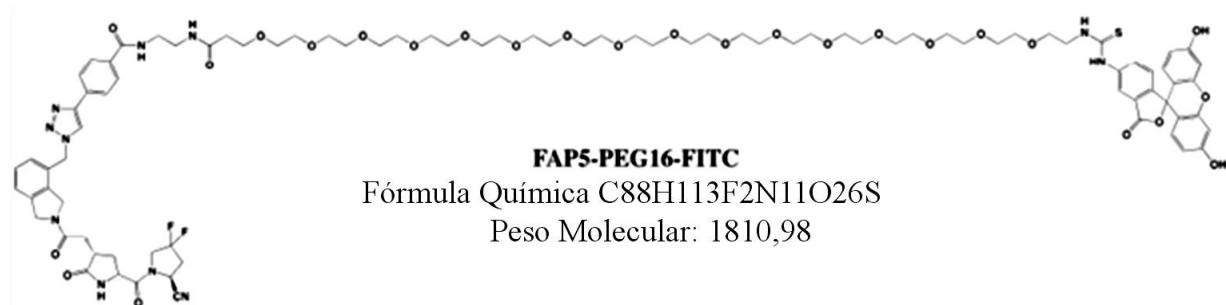
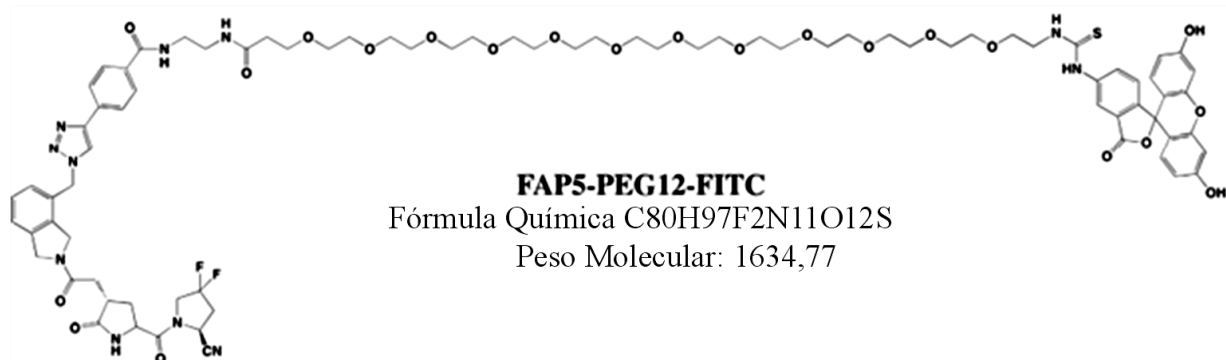
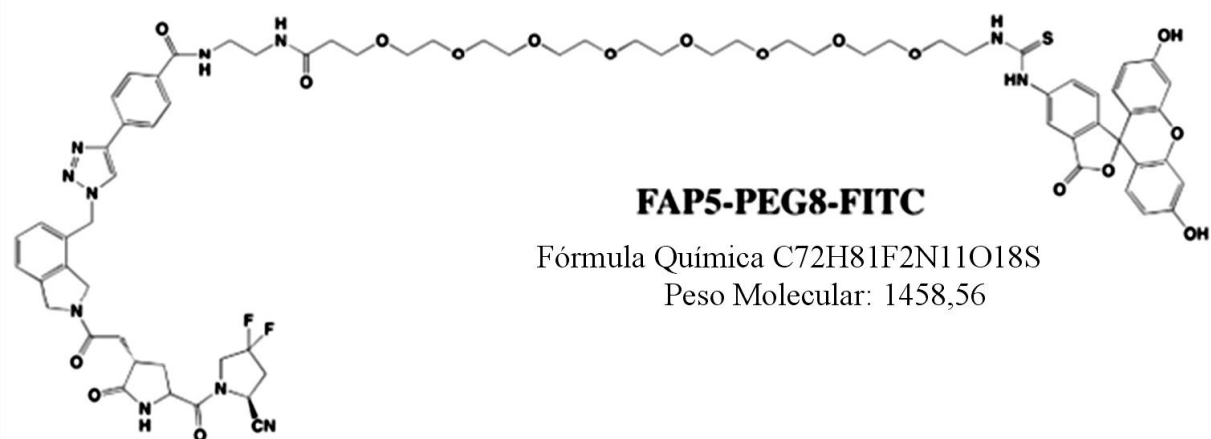
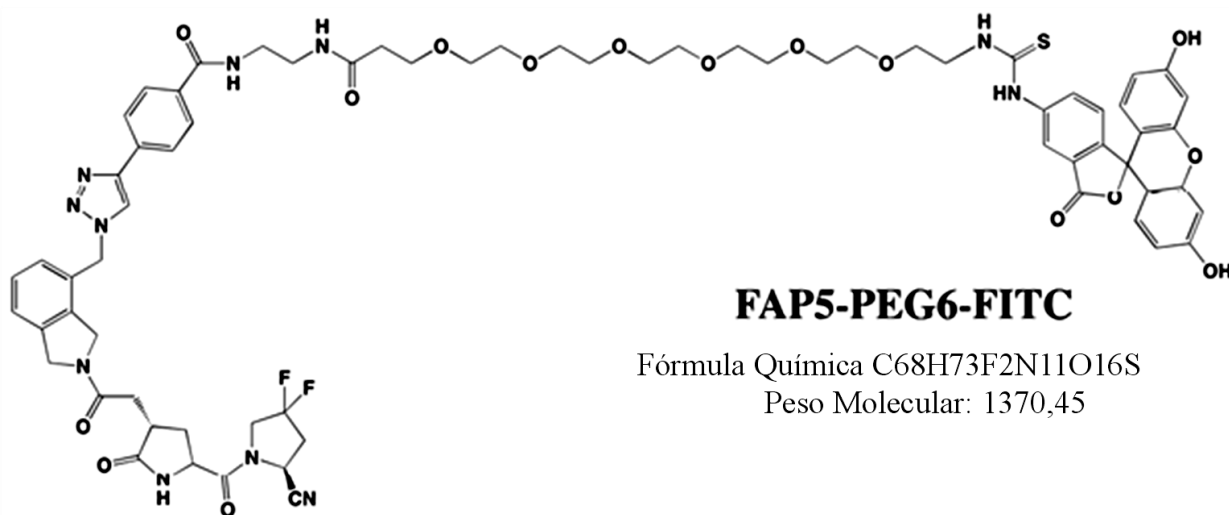
[0020] El adaptador biespecífico puede ser para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento del cáncer.

[0021] El adaptador biespecífico puede ser para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa FAP, en donde opcionalmente el enlazador comprende o consiste esencialmente en de PEG3 a PEG15 y, opcionalmente, PEG15.

[0022] El adaptador biespecífico puede ser para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa PSMA, en donde opcionalmente el enlazador comprende o consiste esencialmente en de PEG3 a PEG12 y, opcionalmente, PEG6, o de PEG3 a PEG8 y, opcionalmente, PEG6.

[0023] En ciertas realizaciones, se proporciona un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa FAP, cuyo adaptador tiene o comprende una de las siguientes estructuras:

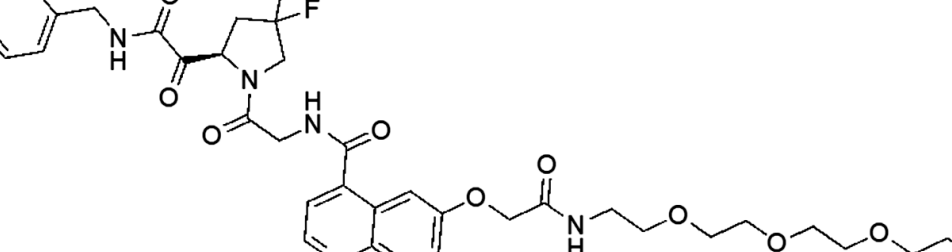




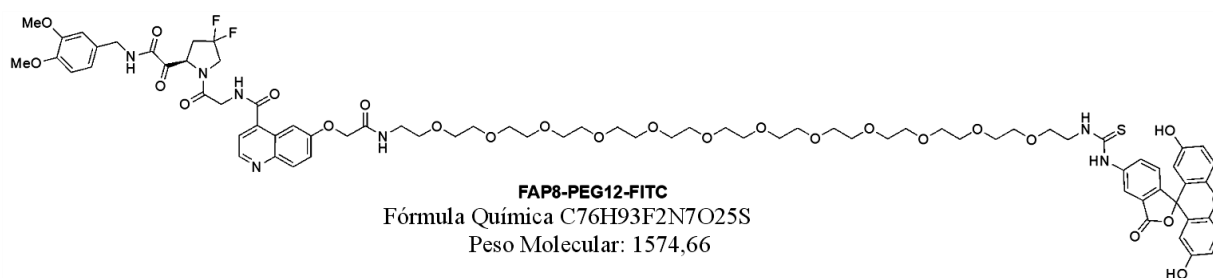
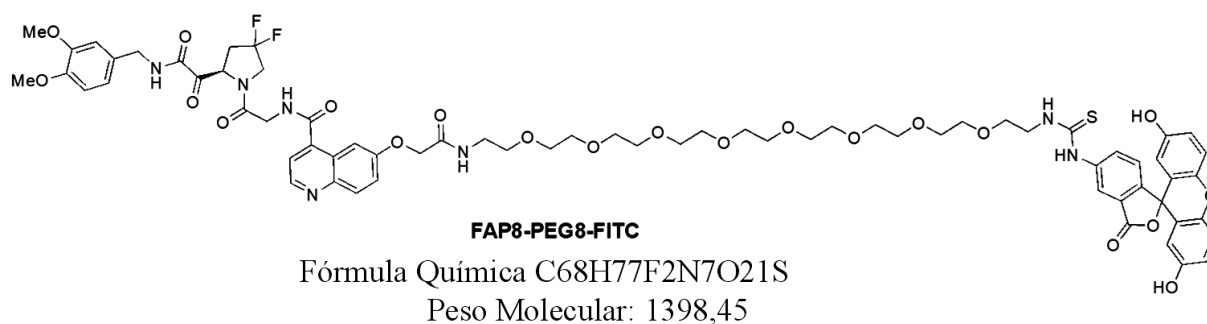
FAP8-PEG3-FITC

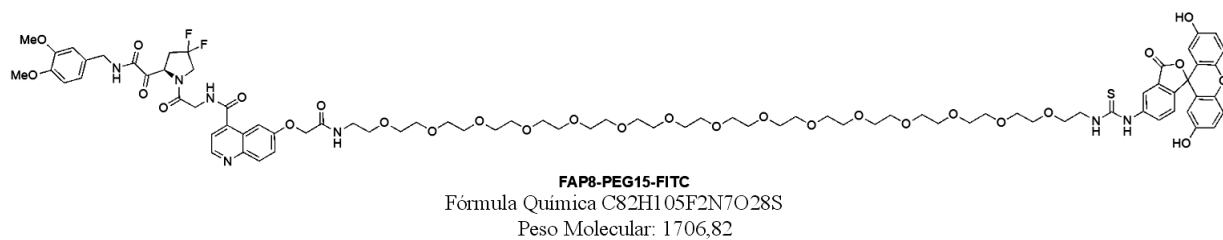
Fórmula Química C₅₈H₅₇F₂N₇O₁₆S

Peso Molecular: 1178,18



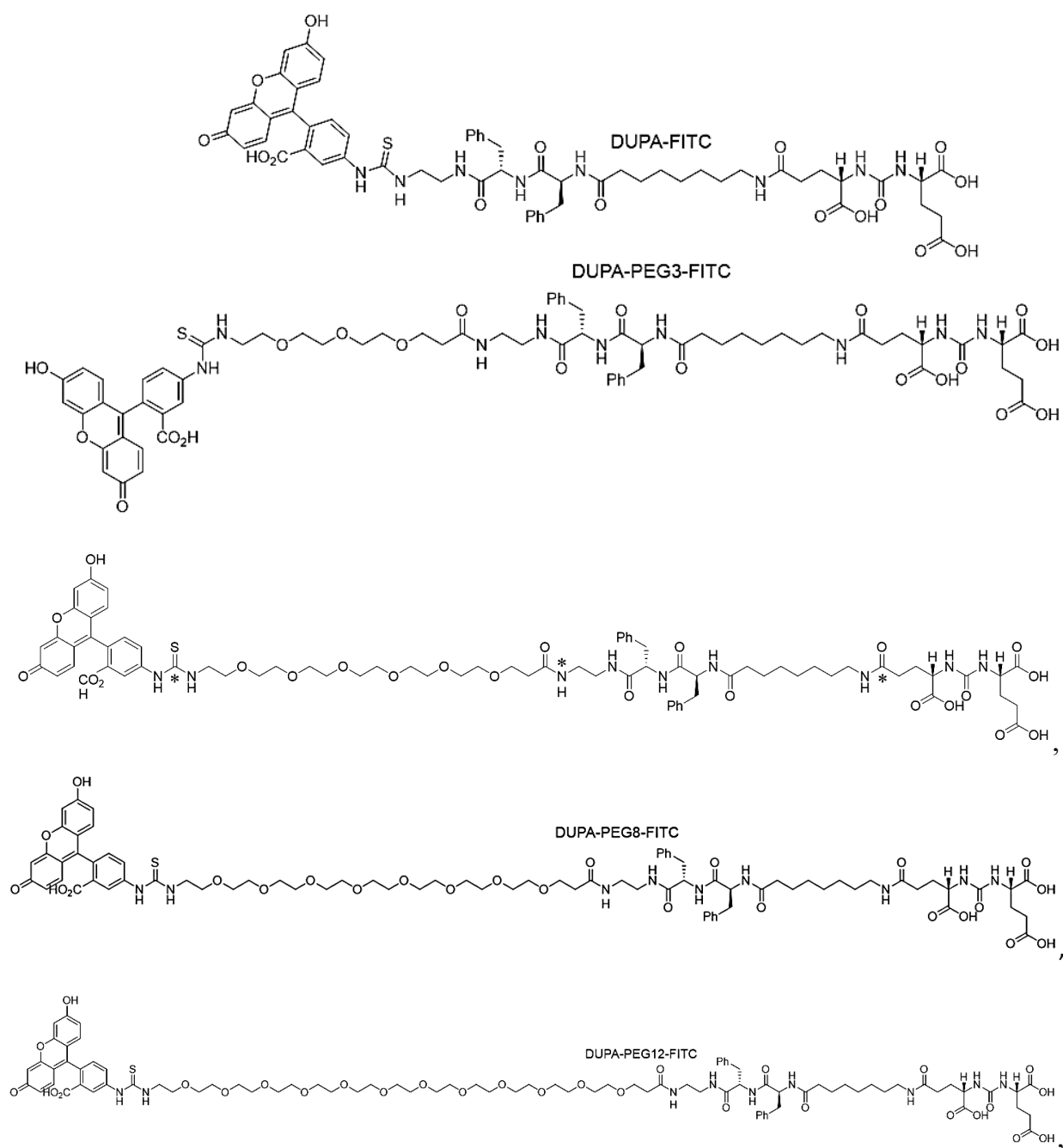
The chemical structure of FAP8-PEG3-FITC is a complex molecule. It features a 3,4,5-trimethoxybenzyl group connected via an amide bond to a 2,2-difluoro-1-methylpyrrolidine ring. This pyrrolidine ring is further linked via an amide bond to a 6-quinolinecarboxamide group. The quinoline ring is connected via an ether linkage to a PEG3 chain (three repeating -CH2CH2O- units). The PEG3 chain is terminated by a thioamide group (-NH-C(=S)-) which is part of the FITC (6-carboxyfluorescein) moiety. The FITC moiety consists of a central carbon atom bonded to two phthalate groups and a phenyl ring with a hydroxyl group.

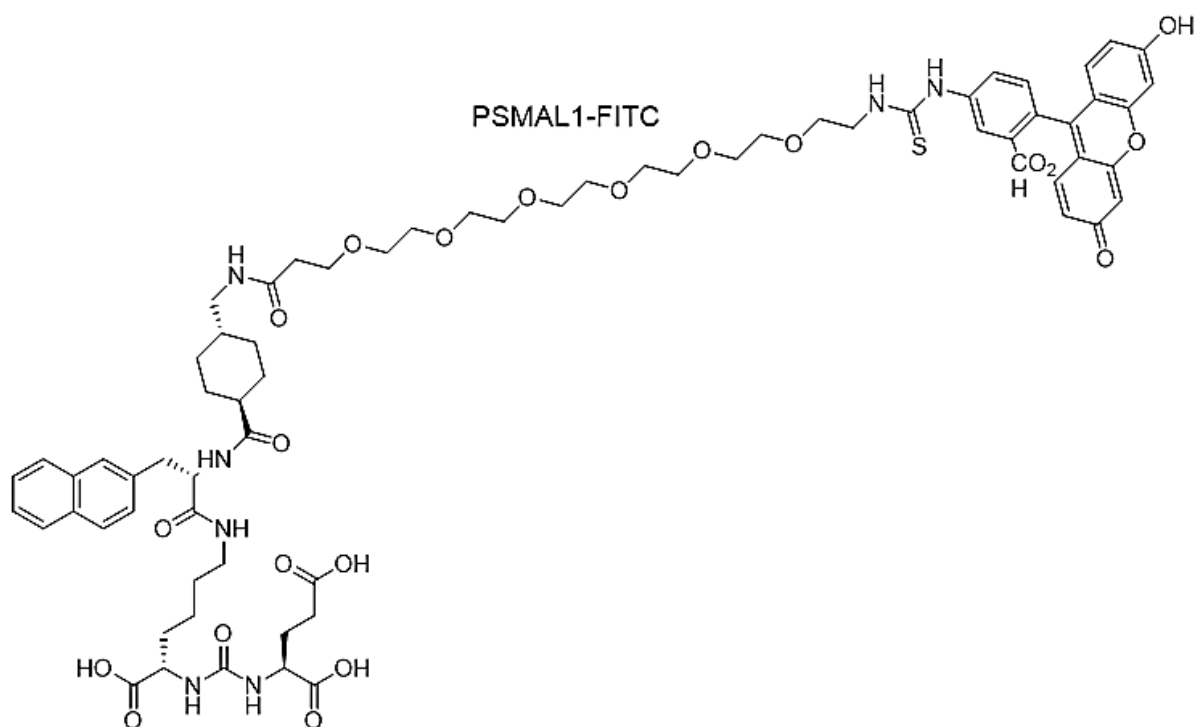




o que comprende una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las estructuras anteriores.

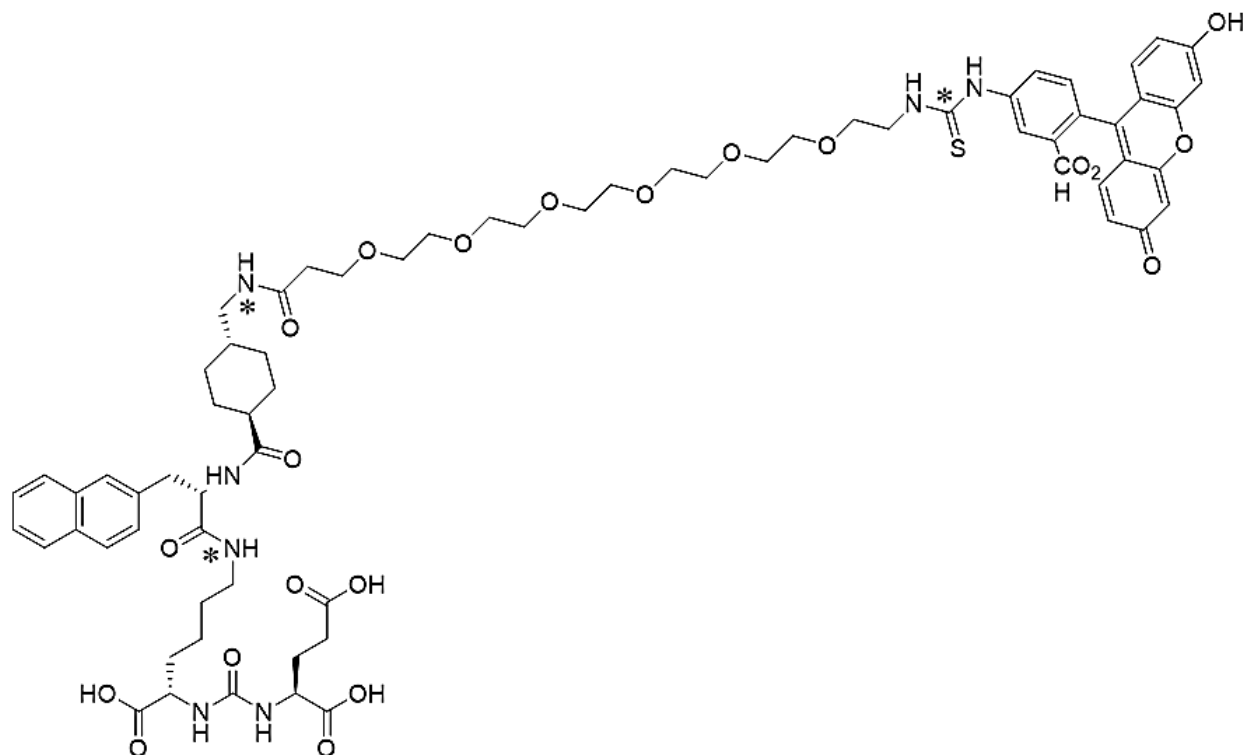
[0025] En ciertas realizaciones, se proporciona un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer PSMA, cuyo adaptador tiene o comprende una de las siguientes estructuras:





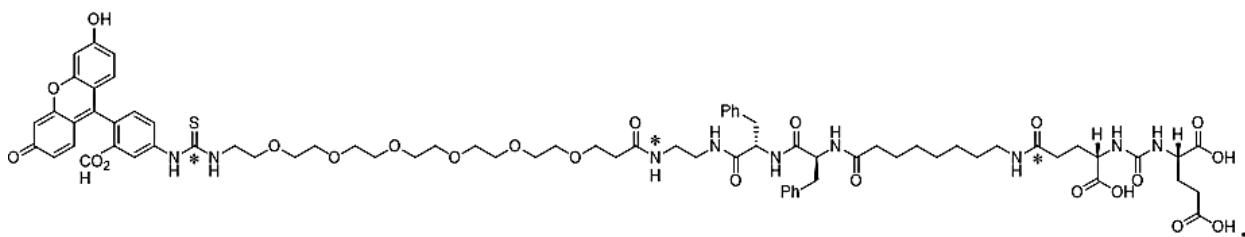
o comprende una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las anteriores.

[0026] En ciertas realizaciones, se proporciona un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa PSMA, cuyo adaptador tiene la estructura:



o es una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0027] En ciertas realizaciones, se proporciona un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa PSMA, cuyo adaptador tiene la estructura:



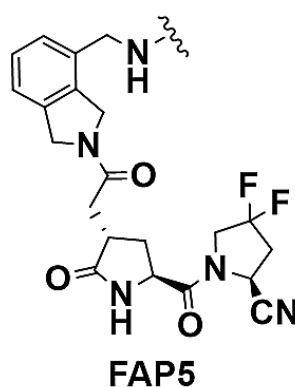
o es una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0028] También se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer que expresa FAP (p. ej., que expresa FAP α) que comprende un adaptador biespecífico descrito anteriormente y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0029] En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer comprende cualquiera de los adaptadores biespecíficos descritos en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0030] También se proporciona una combinación de adaptadores biespecíficos para uso con células CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, la combinación comprende:

(i) un primer adaptador biespecífico que comprende cualquier adaptador biespecífico descrito en el presente documento o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el ligando de direccionamiento del primer adaptador biespecífico comprende un radical de un ligando FAP8 o de un ligando que tiene una fórmula de:



en donde  es el punto de unión al enlazador; y

(ii) un segundo adaptador biespecífico que comprende la siguiente estructura:



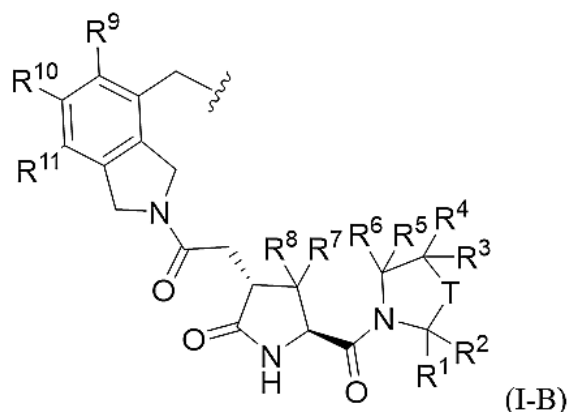
o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

F comprende una fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína,

L comprende un enlazador, y

TL comprende un ligando de direccionamiento que comprende un radical de un ligando FR o un ligando PSMA.

[0031] El radical del ligando FAP del primer adaptador biespecífico de la combinación puede tener una estructura representada por la fórmula I-B:



en donde:

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no (-NH-), -O-, o -S-;

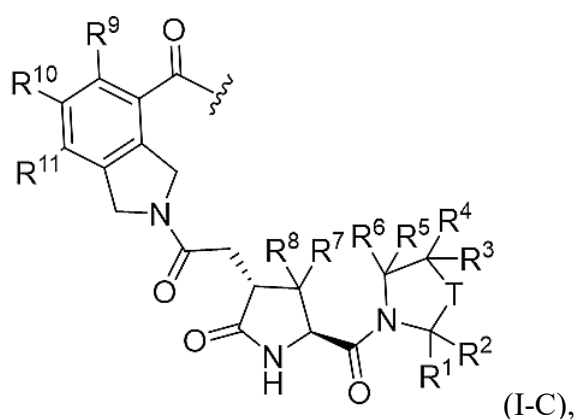
R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I; o

una estructura representada por la fórmula I-C:



en donde:

 es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no (-NH-), -O-, o -S- ;

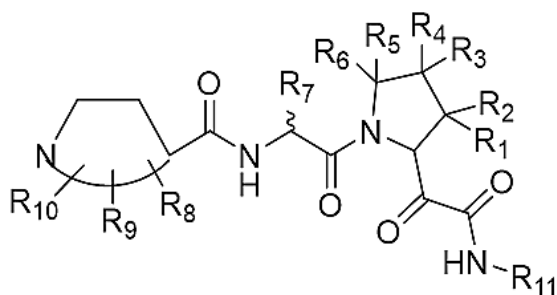
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C₁-6alquilo, -O-C₁-6alquilo y -S-C₁-6alquilo;

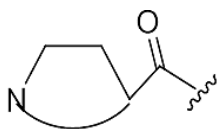
R₅, R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C₁-6 alquilo, -O-C₁-6alquilo, -S-C₁-6 alquilo, F, Cl, Br e I; o

una estructura representada que comprende la siguiente fórmula:



en donde:



representa un heterociclo que contiene N aromático o no aromático, monocíclico o bicíclico, de 5 a 10 miembros, funcionalizado, que opcionalmente comprende además de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C₁-6 alquilo, -O-C₁-6 alquilo y -S-C₁-6 alquilo;

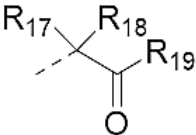
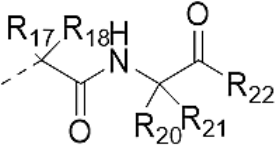
R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C₁-6 alquilo, -O-C₁-6 alquilo y -S-C₁-6 alquilo;

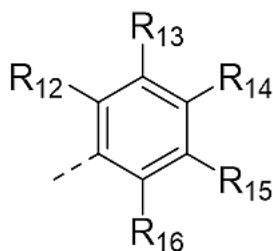
R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C₁-6 alquilo, -O-C₁-6 alquilo y -S-C₁-6 alquilo;

R₇ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH₂=, -CH₃, CH₃CH₂-, (CH₃)₂CH-, (CH₃)₃C-, -CH₂Ph y -CH₂Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -NH₂, -N₃, -NH=NH, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, C1-C10 alquilo, C3-C10 cicloalquilo,

adamantil, , , arilo sustituido o no sustituido, arilo alquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



en donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, C1-C3 alquilo, C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, C1-C4 alquilo y C1-C3 alcoxi;

R-13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, C1-C3 alquilo, C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR-23, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, C1-C4 alquilo y C1-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente entre -H y -CH₃; y

R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo.

[0032] El ligando de direccionamiento del segundo adaptador biespecífico, o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, de la combinación puede comprender un radical de un ligando PSMA. El enlazador del primer adaptador biespecífico de la combinación puede comprender o consistir esencialmente en PEG.

[0033] El ligando de direccionamiento puede ser o comprender PSMAL1 o DUPA.

[0034] El ligando de direccionamiento del segundo adaptador biespecífico de la combinación es un radical de un folato o un fragmento funcional o análogo del mismo.

[0035] El folato puede ser folato, dihidrofolato, tetrahidrofolato, 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF), 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) o raltitrexed.

[0036] El ligando PSMA puede ser DUPA y el enlazador puede comprender o consistir esencialmente en PEG o un derivado de PEG, tales como, opcionalmente: de PEG3 a PEG12 y,

opcionalmente, PEG6; de PEG3 a PEG16 y, opcionalmente, de PEG4 a PEG15 o de PEG3 a PEG12; PEG12, PEG15, PEG16 o PEG18; de PEG4 a PEG16 y, opcionalmente, PEG16; de PEG3 a PEG15 y, opcionalmente, PEG15; de PEG3 a PEG8 y, opcionalmente, PEG6.

[0037] La combinación puede utilizarse con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento del cáncer. La combinación puede utilizarse con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa FAP. La combinación puede utilizarse con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa PSMA. La combinación puede utilizarse con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa folato. El primer y el segundo adaptador biespecífico de la combinación pueden formularse en composiciones farmacéuticas separadas.

[0038] Además, se proporciona un método de tratamiento de un cáncer que expresa FAP (p. ej., que expresa FAP α) en un sujeto, cuyo método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer de (i) células CAR-T anti-fluoresceína (p. ej., 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 aquí descrito o una composición farmacéutica que comprende el mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, con lo cual el sujeto es tratado del cáncer.

[0039] El CAR puede tener una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región de fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo anti-fluoresceína (p. ej., fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína). En ciertas realizaciones, el CAR tiene un dominio coestimulador y el dominio coestimulador es CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40) o CD278 (ICOS). El CAR puede tener un dominio de señalización de activación y el dominio de señalización de activación es una cadena CD3 ζ de célula T o una γ del receptor Fc γ .

[0040] En los métodos del presente documento, (i) y (ii) pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías. Además, opcionalmente, (i) y (ii) del método pueden administrarse por vía intravenosa.

[0041] En ciertas realizaciones, se proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, cuyo método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer 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) cualquier adaptador biespecífico descrito en el presente documento, una composición farmacéutica descrita en el presente documento, o cualquier combinación descrita en el presente documento; con lo cual el sujeto es tratado del cáncer.

[0042] El CAR del método puede comprender: una región de reconocimiento que comprende una región de fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo anti-fluoresceína; un

dominio coestimulador y el dominio coestimulador 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 célula T o una γ del receptor Fc γ .

[0043] La fluoresceína del adaptador biespecífico del método puede unirse a la célula CAR-T anti-fluoresceína con afinidad al exponerse a la misma, y el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico enlaza la célula CAR-T anti-fluoresceína unida a una célula cancerosa objetivo o a un fibroblasto asociado al cáncer (CAF) cuando el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico se une con afinidad a un receptor en dicha célula cancerosa objetivo o CAF. El receptor en la célula cancerosa objetivo o en el CAF puede ser una FAP sobreexpresada, un PSMA sobreexpresado y/o un FR.

[0044] En ciertas realizaciones, (i) y (ii) del método se administran simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías. El paso (ii) del método puede comprender cualquiera de las combinaciones descritas en el presente documento y el primer y el segundo adaptador biespecífico pueden administrarse al sujeto simultáneamente por la misma o diferentes vías.

[0045] En ciertas realizaciones, el paso (ii) del método comprende cualquiera de las combinaciones descritas en el presente documento y el primer y el segundo adaptador biespecífico se administran al sujeto secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0046] Los pasos (i) y (ii) del método pueden administrarse cada uno por vía intravenosa, por ejemplo.

[0047] El cáncer puede ser un cáncer que expresa FAP y al menos un adaptador biespecífico del paso (ii) puede comprender un radical de un ligando FAP.

[0048] En ciertas realizaciones del método, el cáncer es un cáncer que expresa PSMA y al menos un adaptador biespecífico del paso (ii) del método comprende un radical de un ligando PSMA.

[0049] El cáncer puede ser un cáncer que expresa FR y el paso (ii) del método puede comprender cualquier combinación descrita en el presente documento.

[0050] También se proporciona un método de tratamiento de un cáncer que expresa FAP en un sujeto. Dicho método puede comprender administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer 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) cualquiera de los adaptadores biespecíficos o composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento, con lo cual el sujeto es tratado del cáncer.

[0051] El CAR puede tener una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína. El CAR puede comprender: un dominio coestimulador y el dominio coestimulador 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 célula T o una γ del receptor Fc γ .

[0052] También se proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, cuyo método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer 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) cualquiera de las combinaciones descritas en el presente documento; con lo cual el sujeto es tratado del cáncer. El CAR puede comprender: una región de reconocimiento que comprende una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína; un dominio coestimulador y el dominio coestimulador 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 célula T o una γ del receptor Fc γ .

[0053] En ciertas realizaciones del método, los pasos (i) y (ii) se administran simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías. El primer y el segundo adaptador biespecífico de la combinación pueden administrarse al sujeto simultáneamente por la misma o diferentes vías. El primer y el segundo adaptador biespecífico de la combinación pueden administrarse al sujeto secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías. En ciertas realizaciones del método, los pasos (i) y (ii) se administran cada uno por vía intravenosa.

[0054] 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 imagenología óptica, tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

[0055] El cáncer puede ser cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, glioma—tal como, opcionalmente, glioma en estadio 3-4, o carcinoma de células renales de células claras tal como, opcionalmente, carcinoma de células renales de células claras en estadio 3-4.

[0056] También se proporciona un método para potenciar la activación de células CAR-T. En ciertas realizaciones, dicho método comprende: proporcionar un adaptador biespecífico del presente documento, una composición farmacéutica del presente documento o una combinación del presente documento; y 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, a la composición farmacéutica o a la combinación; en donde la célula CAR-T experimenta una activación aumentada 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 de un sujeto cuando se exponen al adaptador biespecífico.

[0057] Además, se proporciona un kit. El kit puede comprender (i) un adaptador biespecífico descrito anteriormente o una composición farmacéutica que comprenda el mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y (ii) unas células CAR-T anti-fluoresceína (p. ej., fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) o una composición farmacéutica que comprenda las mismas y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0058] En ciertas realizaciones, el kit comprende: (i) al menos una unidad de dosis de cualquiera de los adaptadores biespecíficos descritos en el presente documento, una composición farmacéutica descrita en el presente documento, o cualquiera de las combinaciones descritas en el presente documento; y (ii) al menos una unidad de dosis de unas células CAR-T anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprenda células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde (i) y (ii) están opcionalmente en recipientes separados.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS O FIGURAS

[0059] Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes cuando se consideren junto con la siguiente descripción y los dibujos, en donde:

[0060] FIG. 1 muestra gráficos de proteína de activación de fibroblastos (FAP)-isotiocianato de fluoresceína (FITC), concentración (nmol/L) vs. intensidad media de fluorescencia (MFI) de FITC para FAP5 KD sobre FAP humano (izquierda) y FAP murino (derecha).

[0061] FIG. 2A es un gráfico de ligando vs. MFI (aloficocianina (APC)), que muestra la exposición de FITC. Células recubiertas con FAP-FITC se tiñeron con un anticuerpo anti-FITC que tiene una señal APC para medir la MFI de APC, que representa la exposición de FITC.

[0062] FIG. 2B es un gráfico de ligando vs. FITC (MFI), que muestra Bmax en MDA-MB231-hFAP.

[0063] FIG. 3 es un gráfico de concentración de FAP5-FITC (nmol/L) vs. FITC (MFI), que muestra los resultados de un ensayo de afinidad de unión.

[0064] FIG. 4A es un gráfico de concentración de FAP5-FITC (nM) vs. % de lisis.

[0065] FIG. 4B es un gráfico de concentración de FAP5-FITC (nM) vs. interferón gamma (IFN γ) (pg/ml).

[0066] FIG. 5A es un gráfico de días tras la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para tamaño tumoral agrupado.

[0067] FIG. 5B es un gráfico de días tras la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para control de enfermedad de tumor único.

[0068] FIG. 5C es un gráfico de días tras la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para tumor único solo CAR-T.

[0069] **FIG. 5D** es un gráfico de días tras la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para tumor único FAP5-PEG16-FITC.

[0070] **FIG. 5E** FIG. 5E es un gráfico de días tras la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para tumor único FAP8-PEG15-FITC.

[0071] **FIG. 5F** es un gráfico de barras de grupos control y de tratamiento vs. % de células hCD3+/total de células vivas.

[0072] **FIG. 6A** son gráficos de concentración de FAP-FITC (nM) vs. MFI (FITC), que muestran la afinidad de unión de FAP8-FITC con enlazadores de PEG de diferente longitud a hFAP.

[0073] **FIG. 6B** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nM) vs. MFI (FITC), que muestra la afinidad de unión de FAP8-FITC con enlazadores de PEG de diferente longitud a mFAP.

[0074] **FIG. 6C** es un gráfico de FITC que muestra los resultados normalizados al modo (sin tinción vs. FAP8-PEG-8-FITC, FAP8-PEG-12-FITC y FAP8-PEG-15-FITC).

[0075] **FIG. 7A** es un gráfico de anti-FITC APC que muestra los resultados normalizados al modo (sin tinción vs. aFITC-APC, FAP8-PEG8-FITC, FAP8-PEG12-FITC y -PEG15-FITC).

[0076] **FIG. 7B** es un gráfico que muestra la exposición de FITC de FAP8-FITC con enlazadores de PEG de diferente longitud mediante anticuerpo aFITC-APC (media geométrica).

[0077] **FIG. 7C** es un gráfico de días tras la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0078] **FIG. 7D** es un gráfico de barras de grupos control y de tratamiento vs. % de células hCD3+/total de células vivas.

[0079] **FIG. 8A** son gráficos de horas vs. área de superficie mCh⁺ (μm²), que muestran la eliminación de MDA-hFAP por adaptadores FAP8-FITC con enlazadores de PEG de diferentes longitudes bajo condiciones de cocultivo con adaptador.

[0080] **FIG. 8B** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nM) vs. % de lisis total a las 68 horas de cocultivo, que muestra la eliminación de MDA-hFAP por 4M5.3 para adaptadores FAP8-FITC con enlazadores de PEG de diferente longitud.

[0081] **FIG. 8C** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nM) vs. IFNγ (pg/ml), que muestra la liberación de citocinas a las 68 horas.

[0082] **FIG. 8D** son gráficos de horas vs. área de superficie mCh⁺ (μm²), que muestran la eliminación de MDA-hFAP por adaptadores FAP8-FITC con enlazadores de PEG de diferentes longitudes bajo condiciones de lavado del adaptador.

[0083] **FIG. 8E** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nM) vs. % de lisis total, que muestra la eliminación de MDA-hFAP por células CAR-T 4M5.3 y adaptadores FAP8-FITC con enlazadores de PEG de diferentes longitudes bajo condiciones de lavado a las 68 horas.

[0084] **FIG. 8F** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nM) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra la liberación de citocinas a las 68 horas.

[0085] **FIG. 9A** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nm) vs. MFI (FITC), que muestra la comparación de unión de FAP8-PEG15-FITC y FAP5-PEG16-FITC a células MDA-MB-231 que sobreexpresan hFAP.

[0086] **FIG. 9B** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmole/L) vs. MFI (FITC), que muestra la comparación de unión de FAP8-PEG15-FITC y FAP5-PEG16-FITC a células MDA-MB-231 que sobreexpresan mFAP.

[0087] **FIG. 10A** es un gráfico de anti-FITC APC que muestra los resultados normalizados al modo (sin tinción, solo aFITC-APC, FAP8-PEG15-FITC y FAP5-PEG16-FITC).

[0088] **FIG. 10B** es un gráfico que muestra la exposición de FITC de FAP8-FITC con enlazadores de PEG de diferente longitud mediante anticuerpo aFITC-APC (media geométrica).

[0089] **FIG. 11** es un gráfico de tiempo tras la incubación (h) vs. MFI (APC), que compara la disociación de FAP8-PEG16-FITC, FAP8-PEG12-FITC, FAP8-PEG15-FITC y FAP5-PEG16-FITC.

[0090] **FIG. 12A** son gráficos de horas vs. área de superficie mCh⁺ (μm^2), que muestran la eliminación de MDA-hFAP por adaptadores FAP8-PEG15-FITC y FAP5-PEG16-FITC bajo condiciones de cocultivo con adaptador y de lavado de adaptador.

[0091] **FIG. 12B** son gráficos de concentración de FAP-FITC (nM) vs. % de lisis total (izquierda) o IFN γ (pg/ml) (derecha) para FAP8-PEG15-FITC y FAP5-PEG16-FITC bajo condiciones de cocultivo con adaptador y de lavado de adaptador.

[0092] **FIG. 13A** es un gráfico de barras de grupos control y de tratamiento vs. % de células hCD3⁺/total de células vivas.

[0093] **FIG. 13B** es un gráfico de barras de grupos control y de tratamiento vs. IFN γ (pg/ml).

[0094] **FIG. 14** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. cambio de peso (%).

[0095] **FIG. 15A** es un gráfico de barras de adaptadores FAP-FITC con longitudes crecientes de enlazador PEG vs. MFI (anti-FITC APC).

[0096] **FIG. 15B** es un gráfico de barras de adaptadores FAP-FITC con longitudes crecientes de enlazador PEG vs. FITC (MFI).

[0097] **FIG. 16A** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. % de lisis total.

[0098] **FIG. 16B** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. IFN γ (pg/ml).

[0099] **FIG. 17A** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. % de lisis total.

[0100] **FIG. 17B** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. IFN γ (pg/ml).

[0101] **FIG. 18A** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. % de lisis total.

[0102] **FIG. 18B** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. IFN γ (pg/ml).

[0103] **FIG. 19A** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0104] **FIG. 19B** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0105] **FIG. 19C** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0106] **FIG. 19D** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0107] **FIG. 19E** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0108] **FIG. 19F** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0109] **FIG. 20A** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. IFN γ (pg/ml).

[0110] **FIG. 20B** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. recuento CAR+/ μ l de sangre.

[0111] **FIG. 21A** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. IFN γ (pg/ml).

[0112] **FIG. 21B** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. recuento CAR+/ μ l de sangre.

[0113] **Fig. 22A** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. IFN γ (pg/ml).

[0114] **FIG. 22B** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. recuento CAR+/ μ l de sangre.

[0115] **FIG. 23A** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. IFN γ (pg/ml).

[0116] **FIG. 23B** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. recuento CAR+/ μ l de sangre.

[0117] **FIG. 24** es un gráfico de grupos control y de tratamiento vs. células CAR+/50.000 células vivas.

[0118] **FIG. 25** muestra estructuras de adaptadores biespecíficos.

[0119] **FIG. 26A** es un gráfico de días tras la inyección de CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), que compara FAP5-PEG-16-FITC y FAP8-PEG15-FITC.

[0120] **FIG. 26B** es un gráfico de días tras la inyección de CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para control de enfermedad de tumor único.

[0121] **FIG. 26C** es un gráfico de días tras la inyección de CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para tumor único solo CAR-T.

[0122] **FIG. 26D** es un gráfico de días tras la inyección de CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para tumor único FAP5-PEG16-FITC.

[0123] **FIG. 26E** es un gráfico de días tras la inyección de CAR-T vs. volumen tumoral (mm³) para tumor único FAP8-PEG15-FITC.

[0124] **FIG. 27** es un gráfico de grupo de tratamiento vs. % de células hCD3+/total de células vivas.

[0125] **FIG. 28** muestra estructuras químicas de DUPA-FITC (ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA) enlazado a isotiocianato de fluoresceína (FITC)) con diferentes enlazadores PEG y la estructura química de (((S)-5-amino-1-carboxipentil)carbamoil)-L-glutámico (PSMAL1).

[0126] **FIG. 29** es un gráfico de [FL-DUPA] (nM) vs. intensidad media de fluorescencia (MFI) de FITC, que muestra los efectos de la longitud del enlazador sobre la afinidad de unión a PSMA.

[0127] **FIG. 30** es un gráfico de línea celular vs. MFI de APC-anti-PSMA.

[0128] **FIG. 31A** es un gráfico de DUPA-FITC con diferentes enlazadores PEG en células MDA-PSMA vs. MFI de FITC.

[0129] **FIG. 31B** es un gráfico de DUPA-FITC con diferentes enlazadores PEG en células MDA-PSMA vs. MFI de APC-anti-FITC.

[0130] **FIG. 32A** es un gráfico de [DUPA-FITC] (nm) vs. lisis (%), que muestra la citotoxicidad mediada por FITC-PEG-DUPA de células CAR-T anti-FITC sobre células HOS-143b-PSMA.

[0131] **FIG. 32B** es un gráfico de [DUPA-FITC] (nm) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra la liberación de IFN γ mediada por FITC-PEG-DUPA de células CAR-T anti-FITC cuando se cocultivan con células HOS-PSMA.

[0132] **FIG. 32C** es un gráfico de [DUPA-FITC] (nm) vs. lisis (%), que muestra la citotoxicidad mediada por FITC-PEG-DUPA de células CAR-T anti-FITC sobre células LNCap.

[0133] **FIG. 32D** es un gráfico de [DUPA-FITC] (nm) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra la liberación de IFN γ mediada por FITC-PEG-DUPA de células CAR-T anti-FITC cuando se cocultivan con células LNCap.

[0134] **FIG. 32E** es un gráfico de [DUPA-FITC] (nm) vs. lisis (%), que muestra la citotoxicidad mediada por FITC-PEG-DUPA de células CAR-T anti-FITC sobre células 22Rv1.

[0135] **FIG. 32F** es un gráfico de [DUPA-FITC] (nm) vs. IFN γ (pg/ml), que muestra la liberación de IFN γ mediada por FITC-PEG-DUPA de células CAR-T anti-FITC cuando se cocultivan con células 22Rv1.

[0136] **FIG. 33A** muestra el protocolo utilizado en el Ejemplo 33.

[0137] **FIG. 33B** es un gráfico de horas post-inyección vs. rad media (fotones/s/cm²/sr).

[0138] **FIG. 34A** muestra la línea de tiempo y el esquema de dosificación del estudio in vivo del Ejemplo 8 para probar DUPA-FITC con diferentes enlazadores PEG.

[0139] **FIG. 34B** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0140] **FIG. 34C** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. cambio de peso (%).

[0141] **FIG. 35** es un gráfico de [ligando PSMA-FITC] (nm) vs. DUPA-PEG6-FITC.

[0142] **FIG. 36A** muestra imágenes de confocal.

[0143] **FIG. 36B** muestra datos de citometría de flujo.

[0144] **FIG. 36C** muestra datos de citometría de flujo.

[0145] **FIG. 37A** muestra [ligando PSMA-FITC] (nM) vs. lisis (%).

[0146] **FIG. 37B** muestra [ligando PSMA-FITC] (nM) vs. IFN γ (pg/ml).

[0147] **FIG. 38** muestra el protocolo utilizado en el Ejemplo 38 e imágenes fluorescentes en los tiempos indicados de ratones portadores de tumor MDA-PSMA inyectados por vía intravenosa con los adaptadores indicados a 500 nmol/kg.

[0148] **FIG. 39** muestra el protocolo utilizado en el Ejemplo 39 y FITC total y FITC de superficie para tumores MDA-MB-231 PSMA para los adaptadores indicados a las 48 horas post-inyección. También se muestran los resultados a las 144 horas post-inyección con PSMAL1-PEG6-FITC.

[0149] **FIG. 40A** muestra el protocolo utilizado en el Ejemplo 14.

[0150] **FIG. 40B** muestra un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0151] **FIG. 40C** muestra un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. cambio de peso (%).

[0152] **FIG. 41A** muestra el protocolo utilizado en el Ejemplo 15.

[0153] **FIG. 41B** muestra un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0154] **FIG. 41C** muestra un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. cambio de peso (%).

[0155] **FIG. 42A** es una representación gráfica de una partícula lentiviral TagCAR, que contiene glucoproteína cocal y una proteína de fusión multidominio compuesta por un scFV anti-CD3 intercalado entre proteínas coestimuladoras.

[0156] **FIG. 42B** son gráficos de flujo representativos una hora después de la incubación de células mononucleares de sangre periférica con partículas lentivirales TagCAR, donde un anticuerpo anti-cocal se utiliza para detectar la unión de partículas lentivirales TagCAR a las células.

[0157] **FIG. 42C** muestra el porcentaje medio ($\pm$ SEM) y gMFI de cocal en subconjuntos de células inmunes circulantes tras la incubación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con partículas lentivirales TagCAR.

[0158] FIG. 42D muestra la media ($\pm$ SEM) del porcentaje CD25⁺ (activación) y TagCAR⁺ (transducción) de células T CD3⁺ en los días 3 y 7 tras la transducción de células mononucleares de sangre periférica con partículas lentivirales TagCAR, respectivamente.

[0159] FIG. 43A es una representación gráfica de un ensayo de competencia para definir una interacción ligando-FITC/TagCAR, donde células T TagCAR se incuban con niveles saturantes de FL-AF647, que luego se compete mediante concentraciones crecientes de ligando FITC.

[0160] FIG. 43B muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de FL-AF647 en células T TagCAR⁺ en presencia de concentraciones crecientes de PSMAL1-PEG6-FITC o del control de antígeno únicamente, fluoresceína sódica (NaFL).

[0161] FIG. 43D es un gráfico que muestra la constante media de inhibición calculada (K_i) de NaFL y PSMAL1-PEG6-FITC (triplicados = células T TagCAR derivadas de diferentes donantes).

[0162] FIG. 44A es una representación gráfica del uso de anticuerpo anti-fluoresceína para detectar antígeno de fluoresceína de superficie (SurfaceTag) en células tumorales MDA-MB-231.

[0163] FIG. 44B muestra los niveles de SurfaceTag (MFI de APC) tras la incubación de células tumorales MDA-MB-231 que sobreexpresan PSMA (PSMA⁺) o tipo silvestre (PSMA⁻) con PSMAL1-PEG6-FITC.

[0164] FIG. 45A es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral medio ($\pm$ SEM) normalizado en presencia de células T TagCAR con PSMAL1-PEG6-FITC a lo largo del tiempo.

[0165] FIG. 45B muestra los niveles medios ($\pm$ SEM) de citocinas (izquierda, IFN γ ; derecha, IL-2) en sobrenadantes de cultivo 24 horas después de la adición de células T TagCAR y a diferentes concentraciones de PSMAL1-PEG6-FITC a células tumorales MDA-MB-231 que sobreexpresan PSMA.

[0166] FIG. 45C muestra el porcentaje medio ($\pm$ SEM) de células TagCAR⁺ tras 88 horas de cocultivo con células tumorales MDA-MB-231 que sobreexpresan PSMA y diferentes concentraciones de PSMAL1-PEG6-FITC.

[0167] FIG. 45D muestra el porcentaje CD25⁺ de células T CD3⁺ TagCAR⁺ y TagCAR⁻ tras 88 horas de cocultivo con células tumorales MDA-MB-231 que sobreexpresan PSMA y diferentes concentraciones de PSMAL1-PEG6-FITC.

[0168] FIG. 46A muestra una serie de gráficos de día vs. volumen tumoral (mm³) para tamaño tumoral agrupado (grupo 4M5.3), control de enfermedad de tumor único, tumor único solo células CAR-T 4M5.3 y tumor único 4M5.3 y FAP5-PEG8-FITC.

[0169] FIG. 46B muestra una serie de gráficos de día vs. volumen tumoral (mm³) para tamaño tumoral de grupo (grupo E2), control de enfermedad de tumor único, tumor único solo células CAR-T E2 y tumor único E2 y FAP5-PEG8-FITC.

[0170] **FIG. 46C** es un gráfico de día vs. cambio de peso (%), que muestra el peso de los ratones a lo largo del tratamiento.

[0171] **FIG. 47A** es un gráfico de concentración de FAP5-PEG16-FITC vs. % de lisis total, que muestra los resultados de citometría de flujo durante 24 horas de cocultivo del asesinato in vitro de células MDA-MB-231-hFAP por células CAR-T 4M5.3 (E:T = 1:1).

[0172] **FIG. 47B** es un gráfico de horas vs. UA, que muestra los resultados de Incucyte de un ensayo de asesinato in vitro de células MDA-MB-231-hFAP por células CAR-T 4M5.3 durante 68 horas de cocultivo (E:T = 1:1).

[0173] **FIG. 48A** es un gráfico de día vs. volumen tumoral (mm³), que muestra el efecto del tratamiento sobre el tamaño del tumor.

[0174] **FIG. 48B** es un gráfico de día vs. cambio de peso (%), que muestra el efecto del tratamiento sobre el peso corporal de los ratones.

[0175] **FIG. 48C** muestra gráficos de tratamiento vs. recuento de hCD3⁺/μL de sangre y tratamiento vs. hIFN γ (pg/ml).

[0176] **FIG. 48D** muestra un gráfico de tratamiento vs. hCD3⁺/célula viva (%).

[0177] **FIG. 48E** muestra un diagrama de un diseño experimental, un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), un gráfico de tratamiento vs. células T hCD3⁺/total de células tumorales (%) y un gráfico de tratamiento vs. hIFN γ (pg/ml).

[0178] **FIG. 48F** muestra láminas de inmunohistoquímica (IHC), en las que los CAF se tiñeron usando anti-alfa actina de músculo liso de ratón (un marcador de CAF) y las células cancerosas se tiñeron con anti-Ki67 de ratón como marcador de proliferación de células cancerosas.

[0179] **FIG. 49A** muestra un esquema de dosificación para la terapia combinada con FAP5-PEG-8-FITC y DUPA-PEG6-FITC.

[0180] **FIG. 49B** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), que muestra el crecimiento tumoral HOS-PSMA4+.

[0181] **FIG. 49C** es un gráfico de tratamiento vs. recuentos de células T humanas/μl, que muestra los recuentos de células T humanas en sangre.

[0182] **FIG. 49D** son gráficos de tratamiento vs. células T humanas CD3⁺/células vivas (%), que muestran recuentos de células T humanas en tumores HOS-PSMA (izquierda) y h-IFN γ en sangre de ratón (derecha).

[0183] **FIG. 50** muestra un esquema de dosificación para la terapia combinada con FAP5-PEG-8-FITC y DUPA-PEG6-FITC, gráficos de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. tamaño tumoral (mm³) para DUPA-PEG6-FITC solo y DUPA-PEG6-FITC en combinación con FAP5-FITC, y un gráfico de tratamiento vs. recuento de células T humanas/μL de sangre, que muestra recuentos de células T humanas en sangre al día 29.

[0184] FIG. 51A muestra la línea de tiempo y el esquema de dosificación de un estudio in vivo para probar Aza-PEG6-FITC y orthoCAL-PEG6-FITC en combinación con EC17.

[0185] FIG. 51B es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), que muestra las curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento. Aza-PEG6-FITC en combinación con EC17 inhibió significativamente el crecimiento de tumores KB. OrthoCAL-PEG6-FITC en combinación con EC17 también mostró una inhibición ligeramente mejor del crecimiento de tumores KB.

[0186] FIG. 51C es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. cambio de peso (%), que muestra los cambios de peso corporal de ratones en diferentes grupos de tratamiento. Aza-PEG6-FITC y EC17 indujeron pérdida de peso en ratones.

[0187] FIG. 52A muestra la línea de tiempo y el esquema de dosificación de un estudio in vivo para probar diferentes adaptadores biespecíficos CAIX.

[0188] FIG. 52B es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), que muestra las curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento. Aza-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC inhibió ligeramente el crecimiento de tumores KB. La eficacia fue similar a la combinación de EC17 y FAP8-PEG18-FITC. OrthoCAL-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC mostró mejor eficacia en la inhibición del crecimiento de tumores KB.

[0189] FIG. 52C es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. cambio de peso (%), que muestra los cambios de peso corporal de ratones en diferentes grupos de tratamiento. Todas las combinaciones no indujeron pérdida de peso corporal significativa en los ratones tratados.

[0190] FIG. 53A muestra la línea de tiempo y el esquema de dosificación de un estudio in vivo.

[0191] FIG. 53B es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³), que muestra las curvas de crecimiento tumoral de diferentes grupos de tratamiento. Aza-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC y EC17 tiene una eficacia similar a orthoCAL-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC y EC17. Ambas mostraron una eficacia ligeramente mejor que la combinación de EC17 y FAP8-PEG18-FITC en la inhibición del crecimiento de tumores KB.

[0192] FIG. 53C es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. cambio de peso (%), que muestra los cambios de peso corporal de ratones en diferentes grupos de tratamiento. Los ratones inyectados con la combinación de Aza-PEG6-FITC, EC17 y FAP8-PEG18-FITC mostraron pérdida de peso durante el tratamiento. La pérdida de peso podría deberse a la liberación de citocinas por células CAR-T expandidas. La toxicidad puede minimizarse optimizando la dosificación del adaptador.

[0193] **FIG. 54A** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. MFI (FITC).

[0194] **FIG. 54B** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. MFI (FITC).

[0195] **FIG. 54C** son imágenes de IHC que muestran que el tumor KB tuvo menos infiltración de células CAR-T que el tumor MDA-MB231 (fila superior) y que el tumor KB contiene más CAF mFAP+ (fila inferior), posiblemente restringiendo la infiltración de células CAR-T.

[0196] **FIG. 55A** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. % de lisis total.

[0197] **FIG. 55B** es un gráfico de concentración de FAP-FITC (nmol/L) vs. % de lisis total.

[0198] **FIG. 56A** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0199] **FIG. 56B** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0200] **FIG. 56C** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0201] **FIG. 56D** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0202] **FIG. 56E** es un gráfico de días posteriores a la inyección de células CAR-T vs. volumen tumoral (mm³).

[0203] **FIG. 57A** es un gráfico de grupo de tratamiento vs. IFN γ (pg/ml).

[0204] **FIG. 57B** es un gráfico de grupo de tratamiento vs. recuento CAR+/ μ l de sangre.

[0205] **FIG. 58A** es un gráfico de grupo de tratamiento vs. IFN γ (pg/ml).

[0206] **FIG. 58B** es un gráfico de grupo de tratamiento vs. recuento CAR+/ μ l de sangre.

[0207] **FIG. 59** es un gráfico de grupo de tratamiento vs. células CAR+/50.000 células vivas.

[0208] **FIG. 60** muestra imágenes de IHC de tinción de hCD3 de los grupos de tratamiento, con un aumento de infiltración de células T observado después del tratamiento con FAP-FITC.

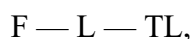
DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0209] La presente divulgación se fundamenta, al menos en parte, en el descubrimiento de que los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) pueden afectar la eficacia de las células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) en el tratamiento de tumores sólidos. Por ejemplo, se implantaron tumores KB (carcinoma epitelial humano) y tumores MDA-MB-231 (carcinoma ductal invasivo humano) en ratones NOD scid gamma (NSG). Ambos grupos de ratones se trataron con CAR-T anti-isotiocianato de fluoresceína (FITC) y EC17. A continuación, se extrajeron ambos tumores de los ratones, se fijaron con formalina al 10% durante la noche y se enjuagaron con etanol al 70% para la fijación tumoral. Luego, se enviaron las células tumorales para tinción por inmunohistoquímica (IHC) con anticuerpo anti-CD3 humano para detectar células CAR-T

humanas o con anticuerpo anti-proteína de activación de fibroblastos (FAP) de ratón para detectar CAF FAP⁺ de ratón. La tinción con anticuerpo anti-CD3 humano indicó que las células CAR-T infiltraron el tumor MDA-MB-231 pero no infiltraron el tumor KB. La tinción con anticuerpo anti-FAP de ratón indicó una infiltración significativa de CAF FAP⁺ en el tumor KB y una infiltración sustancialmente menor de CAF FAP⁺ en el tumor MDA-MB-231.

[0210] A la luz de lo anterior, se proporciona un adaptador biespecífico o una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para uso con células CAR-T anti-fluoresceína (p. ej., fluoresceína, FITC o N-hidroxisuccinimida (NHS)-fluoresceína) en el tratamiento de un cáncer que expresa FAP (p. ej., expresa FAP α o FAP β) o que expresa el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA).

[0211] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico comprende la siguiente estructura:



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

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

L comprende un enlazador, y

TL comprende un ligando de direccionamiento a cáncer o a células asociadas a cáncer que comprende un ligando FAP, un ligando PSMA o un radical de cualquiera de los anteriores.

[0212] El uso de adaptadores biespecíficos puede permitir el uso de una única célula CAR-T, es decir, una célula CAR-T “universal”, que presente, por ejemplo, en su superficie una molécula que se una a la fluoresceína. Cuando la célula CAR-T universal, como una que presente en su superficie una molécula que se una a la fluoresceína, se utiliza junto con un adaptador biespecífico, como uno que comprende FITC conectado (p. ej., mediante un enlazador y/o espaciador) a una molécula que se une a un receptor de superficie celular en CAF y células tumorales, la célula T puede eliminar los CAF y las células tumorales a las cuales está unida.

[0213] Este enfoque puede reducir el costo de producir células CAR-T capaces de unirse a distintos cánceres que expresan diferentes receptores de superficie celular. En su lugar, la célula CAR-T universal puede unirse a distintos 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 inmunitaria ejercida por las células CAR-T unidas a células tumorales e inhibir el efecto de los CAF.

[0214] Motivo de direccionamiento a célula CAR-T

[0215] El motivo de direccionamiento a célula CAR-T del adaptador biespecífico puede ser fluoresceína, FITC, NHS-fluoresceína o cualquier otro motivo que se pueda diseñar para que un CAR lo reconozca y se una a él con especificidad.

[0216] “Unirse con especificidad”, “unirse con alta afinidad” o unirse “específicamente” o “selectivamente”, al referirse a un par ligando/receptor, región de reconocimiento/motivo de direccionamiento, 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 (p. ej., uno presente en una célula cancerosa o célula CAR-T) o motivo de direccionamiento, respectivamente, y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra (p. ej., aquellas asociadas con células normales y saludables). 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 un 25% mayor, más a menudo al menos un 50% mayor, con mayor frecuencia al menos un 100% (2 veces) mayor, normalmente al menos diez veces mayor, más normalmente al menos 20 veces mayor y más normalmente 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 de al menos aproximadamente 10^6 litros/mol ($KD = 10^{-6}$ M), y preferiblemente de al menos aproximadamente 10 litros/mol, según se determina, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard.

[0217] Ligandos de direccionamiento

[0218] Como se indicó anteriormente, los adaptadores biespecíficos pueden comprender un ligando de direccionamiento a cáncer o a células asociadas a cáncer que comprenda un ligando FAP, un ligando PSMA, un receptor de folato (FR) o un radical de cualquiera de los anteriores. Cuando se administra, el ligando de direccionamiento dirige el compuesto adaptador biespecífico a un cáncer o tumor de interés o a una célula asociada a cáncer de interés. En algunas realizaciones, los motivos de direccionamiento (en su forma libre, un radical del mismo) no se unen a receptores de captación en células no objetivo.

[0219] Generalmente, los tumores pueden comprender células inmunes e inflamatorias infiltrantes tales como CAF, proteínas de matriz extracelular (ECM), células T, macrófagos asociados al tumor (TAM), células mieloides supresoras, vasculatura sanguínea y linfática, etc., que ayudan en el crecimiento y desarrollo del tumor mediante la secreción de factores de crecimiento, inmunosupresión, metástasis, resistencia, etc. Los CAF son uno de los principales tipos de células presentes en el estroma tumoral y desempeñan varias funciones críticas para promover el crecimiento tumoral. Estas funciones incluyen la producción y remodelación de la ECM y la secreción de citocinas, que pueden conducir a angiogénesis para promover el crecimiento tumoral, a la secreción de factores de señalización para aumentar la

quimiorresistencia, a un estroma tumoral más denso para proporcionar un bloqueo físico contra las células inmunes, y a una mayor motilidad celular para dirigir la metástasis. En algunas instancias, dichos procesos se asemejan al comportamiento de fibroblastos patogénicos en enfermedades fibróticas.

[0220] En algunas instancias, un marcador prevalente de los CAF es la FAP α . FAP α es una serina proteasa (principalmente) que se encuentra en la superficie celular de fibroblastos activados en células y tejidos enfermos, como en enfermedad fibrótica, enfermedad inflamatoria y/o cáncer (p. ej., fibrosis, artritis reumatoide, cicatrización de heridas y cáncer). FAP se expresa en la superficie de los CAF y se ha demostrado que se correlaciona con mal pronóstico del paciente en múltiples tumores sólidos. Además, prácticamente todos los cánceres sólidos humanos sobreexpresan FAP.

[0221] Por ejemplo, más del 90% de los carcinomas epiteliales muestran expresión de FAP α en la tinción IHC. Se ha encontrado expresión adicional de FAP α en un subconjunto de cultivos de células de glioma primario y en TAM. Recientemente, se ha detectado expresión de FAP α en al menos 28 tipos distintos de cáncer humano. Sin embargo, la expresión de FAP α es muy baja o inexistente en la mayoría de tejidos adultos sanos. Por lo tanto, debido a que la expresión está restringida a las superficies de células enfermas, como carcinomas, FAP α está singularmente calificada como receptor para la administración selectiva de farmacoterapéuticos a tumores mediante direccionamiento por ligando.

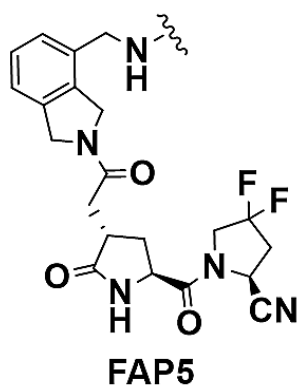
[0222] Los adaptadores biespecíficos aquí descritos pueden comprender un ligando dirigido a FAP (o un radical del mismo) unido a un enlazador, en donde el enlazador está a su vez unido a un motivo de direccionamiento a CAR. FAP es una serina proteasa de membrana de tipo II que escinde enlaces peptídicos prolina-aminoácido y puede expresarse en CAF y en miofibroblastos que producen colágeno. En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico puede dirigir células CAR-T acopladas con el motivo de direccionamiento a CAR del adaptador biespecífico a una enfermedad fibrótica o inflamatoria o a un cáncer que exprese FAP. En ciertas realizaciones, este andamiaje de ligando FAP mejorado también puede utilizarse con motivos de unión a albúmina para lograr la administración dirigida de grupos radiomarcados y otros grupos funcionales. En ciertas realizaciones, el ligando FAP es un ligando de alta afinidad que comprende un motivo triazol (o un derivado del mismo) introducido en un andamiaje del ligando. En ciertas realizaciones, el ligando FAP es un ligando de alta afinidad que comprende un motivo triazol (o un derivado del mismo) y un anillo fenilo introducidos en un andamiaje del ligando (p. ej., un andamiaje de anillo isoindolina). Salvo que se especifique lo contrario, “alta afinidad” o “mayor afinidad” respecto a la afinidad de un ligando por una diana 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 FAP de alta afinidad tiene una afinidad mejorada por FAP en comparación con un ligando sin un motivo triazol introducido en el mismo.

[0223] El motivo de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un radical de un ligando FAP α 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 760, inferior a 500; de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 g/mol, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 7.500 g/mol, de aproximadamente 750 g/mol a aproximadamente 1.500 g/mol, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 g/mol o de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.500 g/mol.

[0224] El ligando de direccionamiento puede unirse a un fibroblasto activado que exprese FAP (p. ej., FAP α o FAP β) cuando dicho fibroblasto activado participa en cáncer. En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede tener una afinidad de unión por FAP (p. ej., FAP α) en el intervalo de entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 25 nM, como 1 nM a aproximadamente 25 nM o aproximadamente 1 nM a 25 nM.

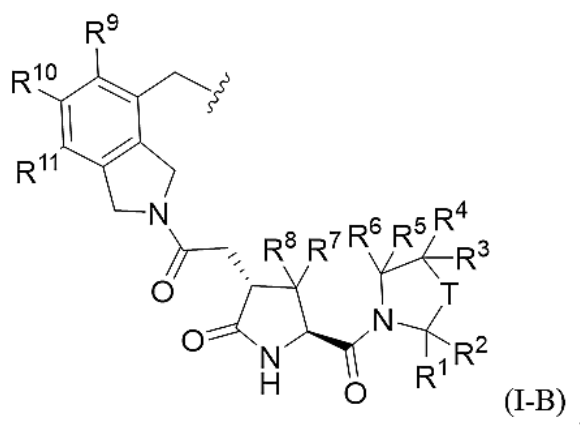
[0225] En ciertas realizaciones, el ligando FAP es FAP5 que tiene o comprende la estructura de:



en donde  es el punto de unión al enlazador del adaptador.

[0226] En ciertas realizaciones, el ligando FAP o un radical del mismo es un ligando FAP8

[0227] En ciertas realizaciones, el ligando FAP o un radical del mismo puede ser o comprender un ligando FAP5 o un radical que tiene una estructura representada por la fórmula I-B:



en donde:

— es el punto de unión al enlazador del adaptador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no (-NH-), -O- o -S-;

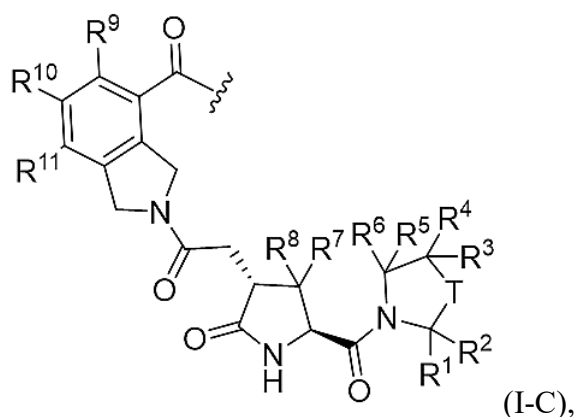
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R₅, R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I..

[0228] El ligando FAP o un radical del mismo puede ser o comprender un ligando FAP5 o un radical que tiene una estructura representada por la fórmula I-C:



en donde:

— es un punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no (-NH-), -O- o -S-;

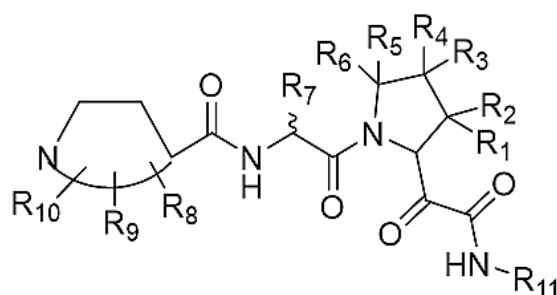
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

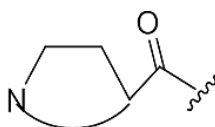
R₅, R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I.

[0229] En ciertas realizaciones, el ligando FAP o un radical del mismo puede ser o comprender un ligando FAP8 o un radical que tiene la estructura:



en donde:



representa un heterociclo que contiene N aromático o no aromático, monocíclico o bicíclico, de 5 a 10 miembros, funcionalizado, que opcionalmente comprende además de 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente de O, N y S;

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

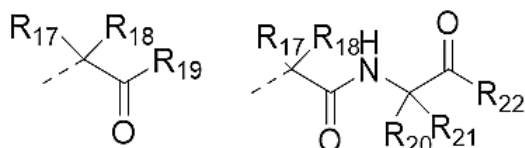
R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

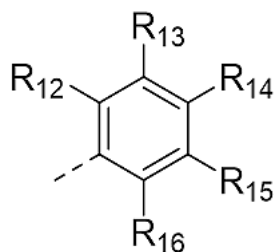
R7 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH₂=, -CH₃, CH₃CH₂-, (CH₃)₂CH-, (CH₃)₃C-, -CH₂Ph y -CH₂Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -NH₂, -N₃, -NH=NH, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, C1-C10 alquilo, C3-C10 cicloalquilo,



adamantilo, , arilo sustituido o no sustituido, arilo alquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



en donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, Cl-C3 alquilo, Cl-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, Cl-C4 alquilo y Cl-C3 alcoxi;

R13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, Cl-C3 alquilo, Cl-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, Cl-C4 alquilo y Cl-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente entre -H y -CH₃; y

R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo.

[0230] En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico comprende un ligando PSMA o un radical del mismo. PSMA se expresa en la neovasculatura tumoral de múltiples cánceres, incluidos cáncer de ovario (100%), cáncer endometrial (100%), cáncer de mama (60%), gliomas en estadio 3-4 (100%) y carcinoma de células renales de células claras en estadio 3-4 (100%). PSMA también está sobreexpresado en cáncer de próstata pero tiene poca expresión en tejido normal. Aunque PSMA se expresa en el cerebro, esa expresión es mínima y la mayoría de los ligandos de PSMA son polares y no capaces de penetrar la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, PSMA puede ser un valioso ligando de direccionamiento en el presente contexto.

[0231] PSMA es una glucoproteína de superficie celular unida a membrana de tipo H con un peso molecular de ~110 kD, que incluye un segmento intracelular (aminoácidos 1-18), un dominio transmembrana (aminoácidos 19-43) y un extenso dominio extracelular (aminoácidos 44-750). Si bien se cree actualmente que las funciones del segmento intracelular y del dominio transmembrana no son significativas, el dominio extracelular participa en varias actividades distintas. PSMA desempeña un papel en el sistema nervioso central, donde metaboliza el N-acetil-aspartil glutamato (NAAG) en ácido glutámico y ácido N-acetil aspártico. En consecuencia, a veces también se denomina N-acetil α-enlace dipeptidasa ácida (NAALADasa). PSMA también se denomina a veces folato hidrolasa 1 (FOLH I) o carboxipeptidasa de glutamato (GCP II) debido

a su papel en el intestino delgado proximal, donde elimina el glutamato enlazado en T de folatos poli- γ -glutamados y el glutamato enlazado en α de péptidos y moléculas pequeñas.

[0232] A diferencia de muchas otras proteínas unidas a membrana, PSMA sufre una rápida internalización en la célula de forma similar a receptores unidos a la superficie celular como los receptores de vitaminas. PSMA se internaliza a través de fositas cubiertas de clatrina y posteriormente puede reciclarse a la superficie celular o dirigirse a lisosomas. Se ha sugerido que las formas dímero y monómero de PSMA son interconvertibles, aunque se debate la evidencia directa de la interconversión. Aun así, solo el dímero de PSMA posee actividad enzimática, y el monómero no.

[0233] Aunque la actividad de PSMA en la superficie celular de las células prostáticas sigue bajo investigación, PSMA es una diana viable para la administración selectiva y/o específica de células CAR-T a células que expresan PSMA.

[0234] En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico comprende un ligando PSMA o un radical del mismo. El PSMA puede ser o comprender (((S)-5-amino-1-carboxipentil)carbamoil)-L-glutámico (PSMAL1). El PSMA puede ser o comprender ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA) o un derivado del mismo (véase, p. ej., Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2015/057852, que describe derivados de DUPA y que se incorpora aquí por referencia por sus enseñanzas al respecto). Cuando se administra, un compuesto adaptador biespecífico que comprende un ligando PSMA o un radical del mismo puede dirigir un cáncer que expresa PSMA en un sujeto.

[0235] El adaptador biespecífico puede diseñarse y sintetizarse específicamente para lograr una afinidad de unión particular por PSMA. Por ejemplo, cuando se comparó PSMAL1-PEG6-FITC con DUPA-PEG6-FITC *in vitro* e *in vivo*, PSMAL1-PEG6-FITC demostró mayor afinidad de unión por PSMA y mayor tiempo de retención en células PSMA-positivas. Además, PSMAL1-PEG6-FITC mostró mayor eficacia en mediar la función de células CAR-T anti-FITC a bajas concentraciones. PSMAL1-PEG6-FITC también demostró eficacia en mediar la erradicación de tumores que expresan niveles bajos de PSMA por células CAR-T anti-FITC.

[0236] En ciertas realizaciones, el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico comprende un folato o un radical del mismo. “Folato” se refiere a una molécula que se une al receptor de folato (p. ej., FR α o FR β), incluyendo, por ejemplo, ácido fólico y análogos y derivados del ácido fólico como, sin limitación, ácido folínico, ácido pteroilpoliglutámico, ácido pteroil-D-glutámico y pteridinas que se unen al FR tales como tetrahidropterinas, dihidrofolatos, tetrahidrofolatos y sus análogos deaza y dideaza. El folato del adaptador que comprende fluoresceína-enlazador-folato puede ser folato, dihidrofolato, tetrahidrofolato, 5,10-

metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF), 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) o raltitrexed (se une a $FR\alpha$ pero no a $FR\beta$).

[0237] Los términos “análogos deaza” y “análogos dideaza” se refieren a los análogos reconocidos en el arte que tienen un átomo de carbono sustituido por uno o dos átomos de nitrógeno en la estructura del ácido fólico de ocurrencia natural, o en un análogo o derivado del mismo. Por ejemplo, los análogos deaza pueden incluir los análogos 1-deaza, 3-deaza, 5-deaza, 8-deaza y 10-deaza del folato, ácido folínico, ácido pteropoliglutámico y pteridinas de unión al receptor de folato, tales como tetrahydropterinas, dihidrofolatos y tetrahydrofolatos. Los análogos dideaza incluyen, por ejemplo, 1,5-dideaza, 5,10-dideaza, 8,10-dideaza y 5,8-dideaza del folato. Otros folatos útiles como ligandos formadores de complejos son los análogos de unión al receptor de folato pemetrexed, proguanil, pirimetamina, trimetoprim, pralatrexed, raltitrexed, aminopterina, amethopterina (también conocida como metotrexato), N10-metilfolato, 2-deamino-dihidrofolato, análogos deaza tales como 1-deazamethopterina o 3-deazamethopterina y ácido 3',5'-diclor-4-amino-4-desoxi-N10-metilpteroilglutámico (diclorometotrexato).

[0238] El ácido fólico y los análogos y/o derivados anteriores también se denominan “un folato”, “el folato” o “folatos”, reflejando su capacidad para unirse a FR, tales como $FR\alpha$ o $FR\beta$. Tales moléculas, cuando se conjugan con moléculas exógenas, son eficaces para potenciar el transporte transmembrana, como a través de endocitosis mediada por folato. Lo anterior puede utilizarse en los adaptadores biespecíficos fluoresceína-enlazador-folato.

[0239] El FR alfa ($FR\alpha$) está sobreexpresado en aproximadamente el 90% del cáncer de ovario, 70% del cáncer endometrial, 80% del cáncer de mama triple negativo, 80% del cáncer de pulmón de células no pequeñas y 65% del cáncer de riñón. El FR beta ($FR\beta$) está sobreexpresado en células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) inmunosupresoras y macrófagos asociados al tumor (TAM) en el microambiente tumoral (TME).

[0240] La tinción inmunohistoquímica (IHC) de tumores sólidos demuestra que la eficacia limitada de las células CAR-T en tumores sólidos puede deberse a los CAF. Se administraron células tumorales KB y células tumorales MDA-MB-231 a ratones NSG. Ambos ratones se trataron con CAR-T anti-FITC y EC17 (un conjugado folato-FITC). A continuación, se extrajeron ambos tumores de los ratones, se fijaron con formalina al 10% durante la noche y se enjuagaron con etanol al 70% para la fijación tumoral. Luego, las células tumorales se enviaron para tinción IHC con anticuerpo anti-CD3 humano para detectar células CAR-T humanas o con anticuerpo anti-FAP de ratón para detectar FAP+ CAFs de ratón.

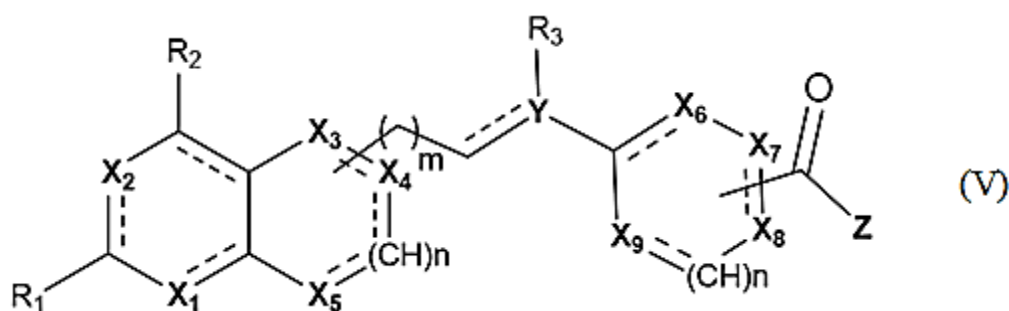
[0241] La tinción con anticuerpo anti-CD3 humano indicó que las células CAR-T infiltraron el tumor MDA-MB-231 pero no infiltraron el tumor KB. La tinción con anticuerpo anti-FAP de

ratón indicó una infiltración significativa de FAP+ CAFs en el tumor KB y una infiltración sustancialmente menor de FAP+ CAFs en el tumor MDA-MB-231.

[0242] Se administraron células tumorales KB (es decir, una línea celular que genera un tumor sólido “frío” que expresa FR) a ratones NSG y se cuantificó la toxicidad de la célula CAR-T en presencia de uno o dos adaptadores biespecíficos. Si bien la administración de células CAR-T universales seguida de inyección intravenosa de un adaptador biespecífico dirigido a FR logró una eficacia antitumoral significativa, la coinyección de un adaptador biespecífico dirigido a FAP mejoró mediblemente esta eficacia sin toxicidad aparente. Los análisis de masas tumorales a lo largo del curso de la terapia revelaron además que la coadministración del adaptador biespecífico dirigido a FAP no solo promovió la eliminación de CAF, sino que también potenció la infiltración y activación de células CAR-T.

[0243] En consecuencia, en ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico puede comprender una fluoresceína conjugada a un radical de un ligando FR (p. ej., a través de un enlazador). Dicho adaptador biespecífico fluoresceína-enlazador-folato puede utilizarse en combinación con otros adaptadores biespecíficos aquí descritos (p. ej., fluoresceína-L-PSMA y/o fluoresceína-L-FAP) para el tratamiento del cáncer en un sujeto.

[0244] El adaptador biespecífico fluoresceína-enlazador-folato puede incluir un ligando (o un radical del mismo) que tenga una estructura de fórmula V o un fragmento o análogo funcional del mismo:



en donde:

X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 y X9 son cada uno independientemente nitrógeno (N), NH, CH, CH2, oxígeno (O) o azufre (S);

Y es C, CH, CH2, N, NH, O o S;

Z es ácido glutámico, valina o un sustrato;

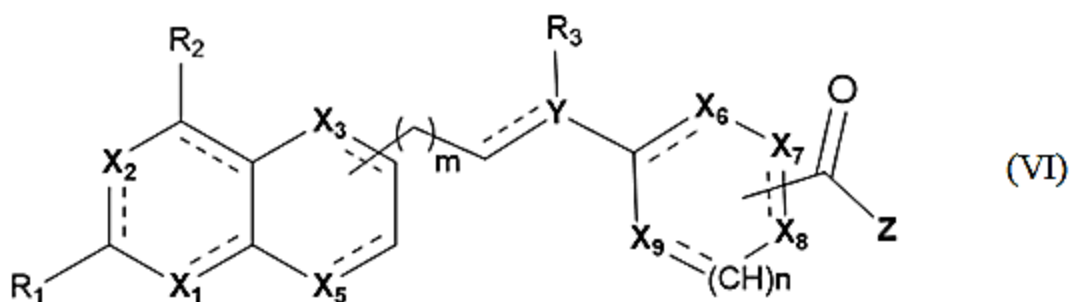
R1 y R2 son cada uno independientemente NH2, OH, SH, CH3 o H;

R3 es H o un alquilo;

m y n son cada uno independientemente 0, 1 o entre 0 y 1; y

 es representativo de un enlace C-C simple o doble.

[0245] En otro aspecto, a modo de ejemplo no limitativo, el ligando (o radical del mismo) de fórmula V tiene una estructura de VI (o un fragmento o análogo funcional del mismo):



en donde

X1, X2, X3, X5, X6, X7, X8 y X9 son cada uno independientemente N, NH, CH, CH2, O o S;

Y es C, CH, CH2, N, NH, O o S;

Z es ácido glutámico, valina o un sustrato;

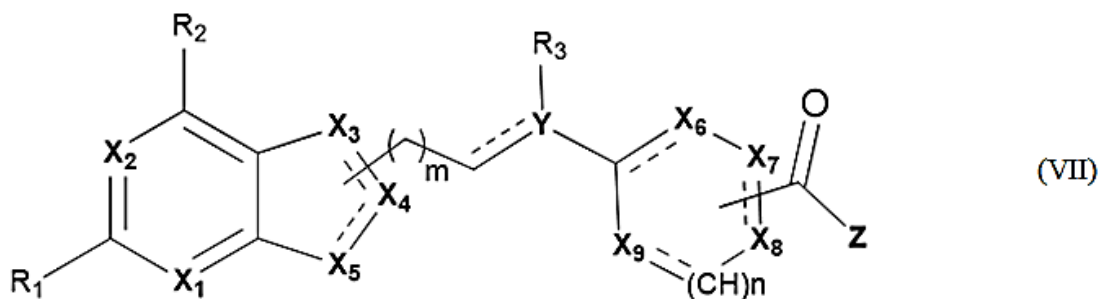
R1 y R2 son cada uno independientemente NH2, OH, SH, CH3 o H;

R3 es H o un alquilo;

m y n son cada uno independientemente 0, 1 o entre 0 y 1; y

es representativo de un enlace C-C simple o doble.

[0246] Un ligando específico (o radical del mismo) de fórmula V (o un fragmento o análogo funcional del mismo) puede tener una estructura de fórmula VII:



en donde

X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 y X9 son cada uno independientemente N, NH, CH, CH2, O o S;

Y es C, CH, CH2, N, NH, O o S;

Z es ácido glutámico, valina o un sustrato;

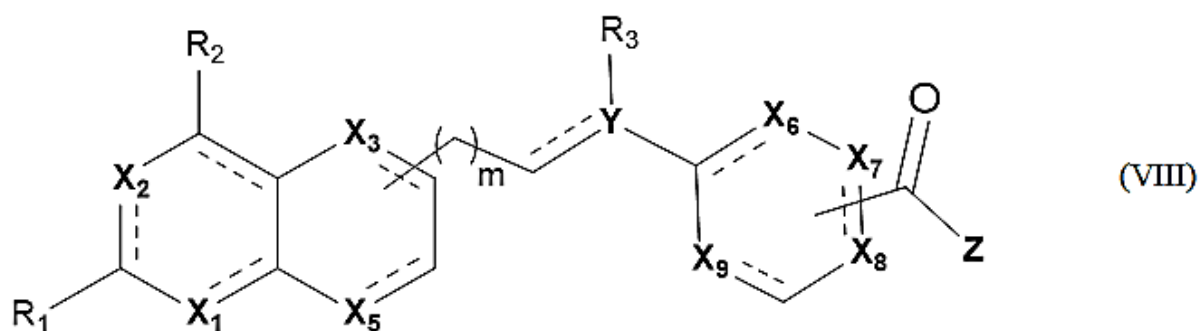
R1 y R2 son cada uno independientemente NH2, OH, SH, CH3 o H;

R3 es H o un alquilo;

m y n son cada uno independientemente 0, 1 o entre 0 y 1; y

es representativo de un enlace C-C simple o doble.

[0247] En ciertas realizaciones, un ligando (o radical del mismo) de fórmula VI puede tener la estructura de la fórmula VIII o un fragmento o análogo funcional del mismo:



en donde

X1, X2, X3, X5, X6, X7, X8 y X9 son cada uno independientemente N, NH, CH, CH2, O o S;

Y es C, CH, CH2, N, NH, O o S;

Z es ácido glutámico, valina o un sustrato;

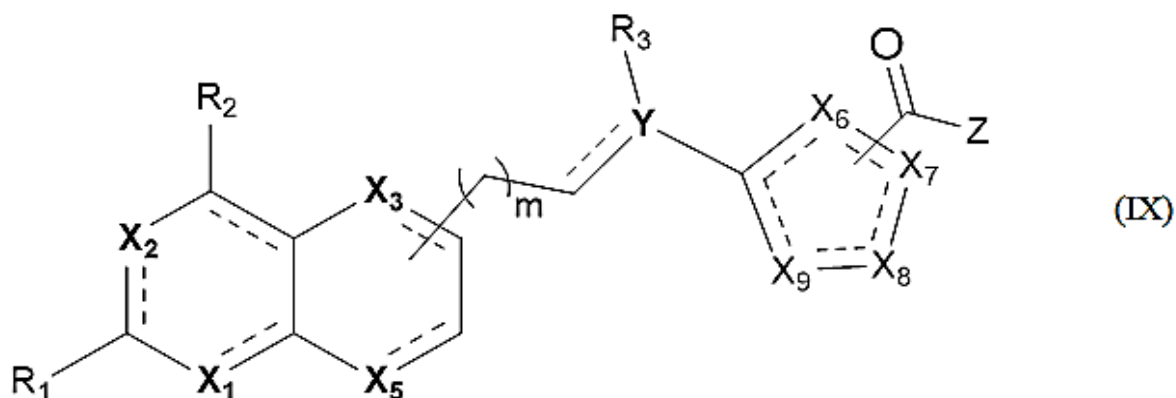
R1 y R2 son cada uno independientemente NH2, OH, SH, CH3 o H;

R3 es H o un alquilo;

m es 0, 1 o entre 0 y 1; y

 es representativo de un enlace C-C simple o doble.

[0248] Un ligando (o radical del mismo) de fórmula VI puede tener la estructura de la fórmula IX (o un fragmento o análogo funcional del mismo):



en donde

X1, X2, X3, X5, X6, X7, X8 y X9 son cada uno independientemente N, NH, CH, CH2, O o S;

Y es C, CH, CH2, N, NH, O o S;

Z es ácido glutámico, valina o un sustrato;

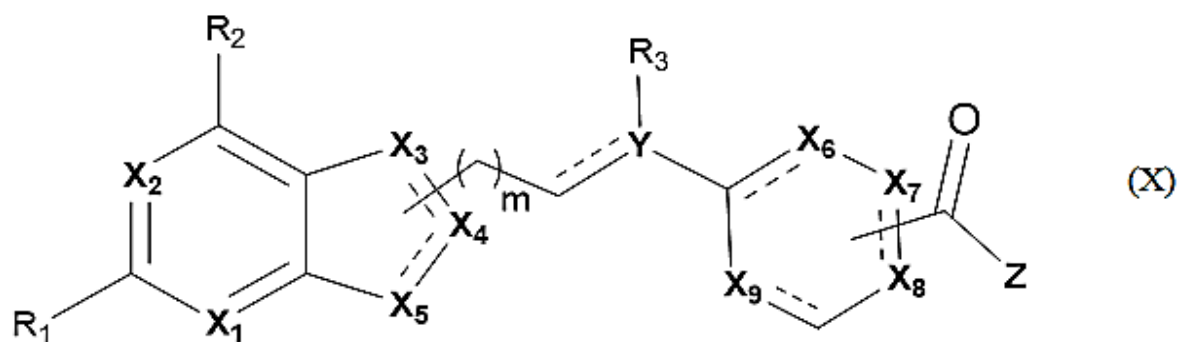
R1 y R2 son cada uno independientemente NH2, OH, SH, CH3 o H;

R3 es H o un alquilo;

m es 0, 1 o entre 0 y 1; y

 es representativo de un enlace C-C simple o doble.

[0249] Un ligando (o radical del mismo) de fórmula VII puede tener la estructura de la fórmula X o XI (o un fragmento o análogo funcional de cualquiera de ellas):



en donde

X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 y X9 son cada uno independientemente N, NH, CH, CH2, O o S;

Y es C, CH, CH2, N, NH, O o S;

Z es ácido glutámico, valina o un sustrato;

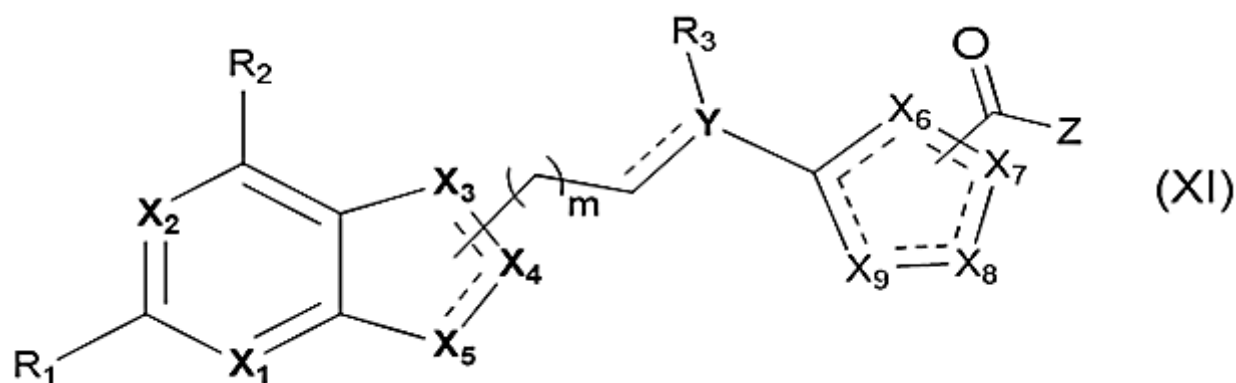
R1 y R2 son cada uno independientemente NH2, OH, SH, CH3 o H;

R3 es H o un alquilo;

m es 0, 1 o entre 0 y 1; y

 es representativo de un enlace C-C simple o doble;

o



en donde

X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 y X9 son cada uno independientemente N, NH, CH, CH2, O o S;

Y es C, CH, CH2, N, NH, O o S;

Z es ácido glutámico, valina o un sustrato;

R1 y R2 son cada uno independientemente NH2, OH, SH, CH3 o H;

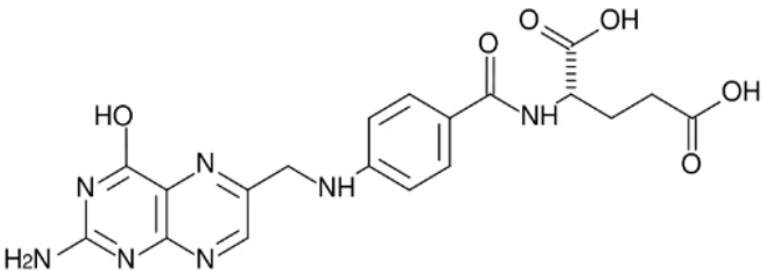
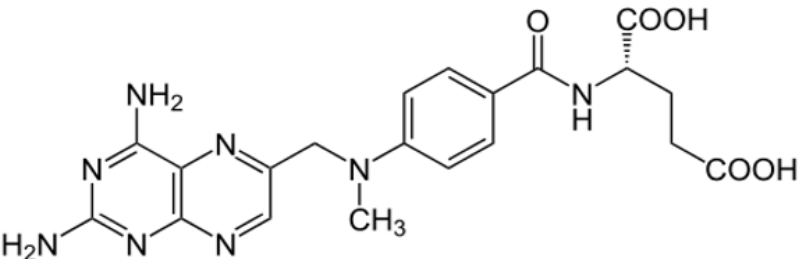
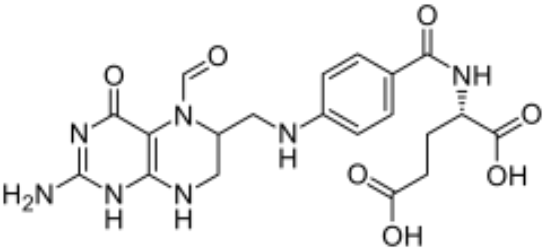
R3 es H o un alquilo;

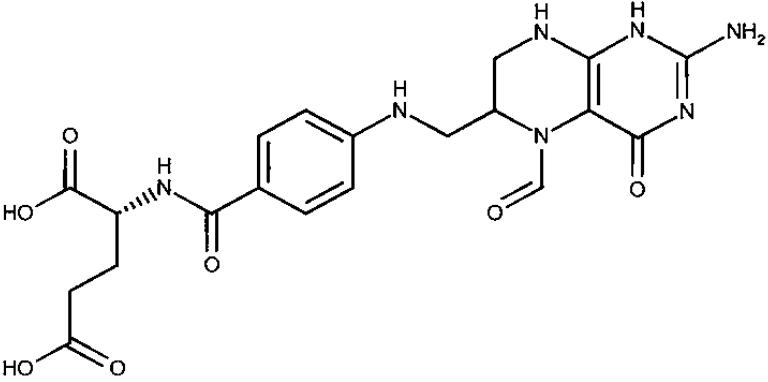
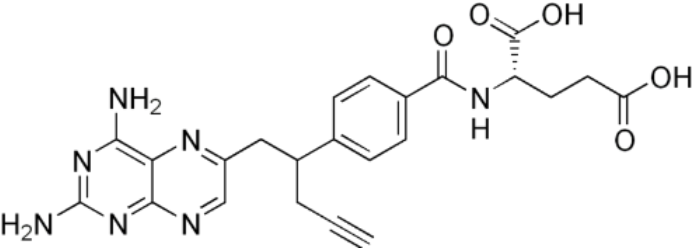
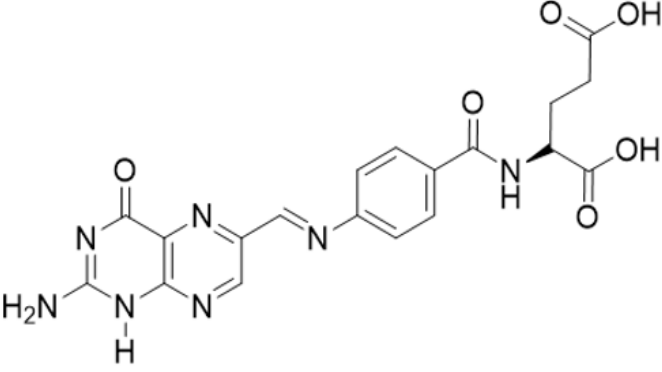
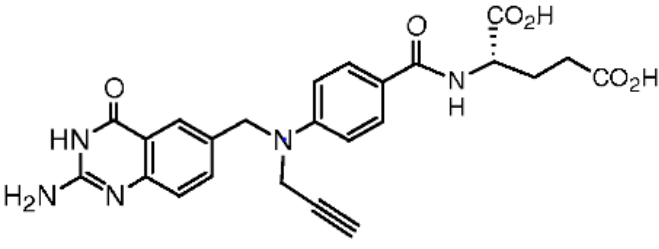
m es 0, 1 o entre 0 y 1; y

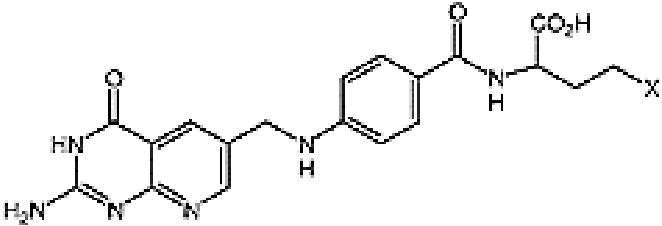
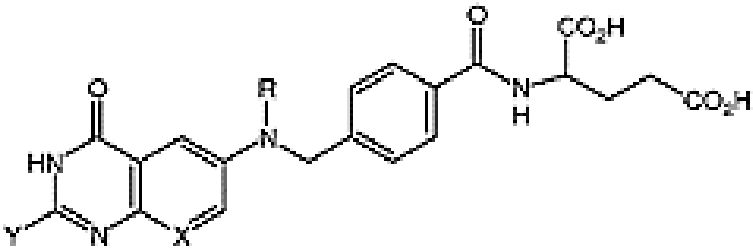
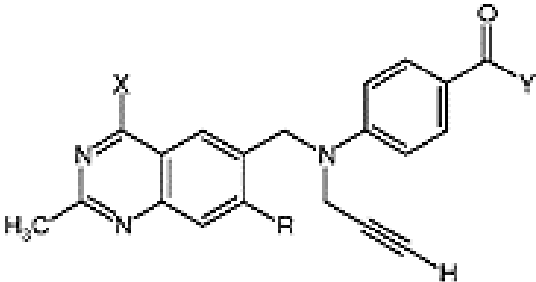
 es representativo de un enlace C-C simple o doble.

[0250] La **Tabla 1** proporciona ejemplos no limitativos de realizaciones adicionales de un ligando de direccionamiento que comprende un ligando dirigido a FR (p. ej., o radicales del mismo) que tiene la estructura de la fórmula VIII.

[0251] **Tabla 1. Fórmula VIII**

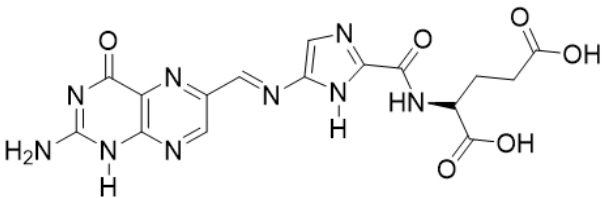
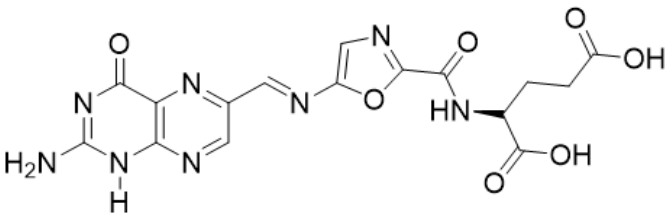
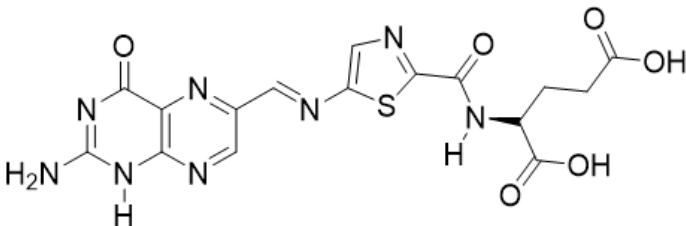
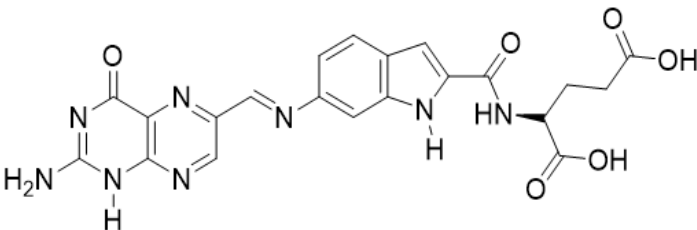
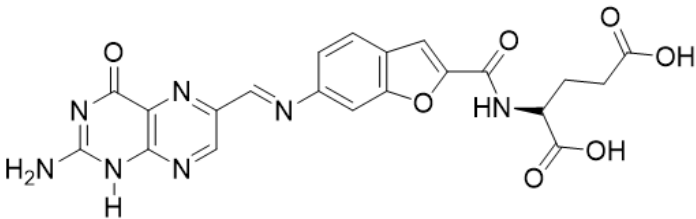
Ligando	Estructura
a	
b	
c	

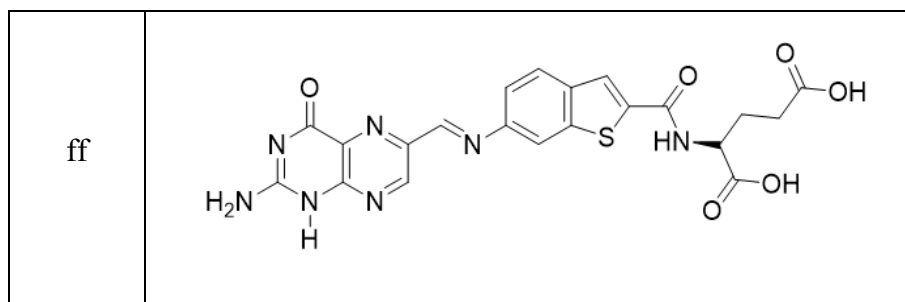
d	
e	
f	
g	

h	 en donde X es PO(OH)₂, CH₂NH₂ o SO₂OH
i	 en donde X es N o CH; Y es NH₂, H, o CH₃; y R is H, CH₃, o CHO
j	 En donde X es OH o OCH₃; R es H o CH₃; y Y es ácido glutámico, valina o un sustrato.

[0252] La Tabla 2 proporciona ejemplos no limitativos de realizaciones adicionales de un ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico que comprende un ligando dirigido a FR (p. ej., o radicales del mismo) que tiene la estructura de la fórmula IX.

[0253] Tabla 2. Fórmula IX

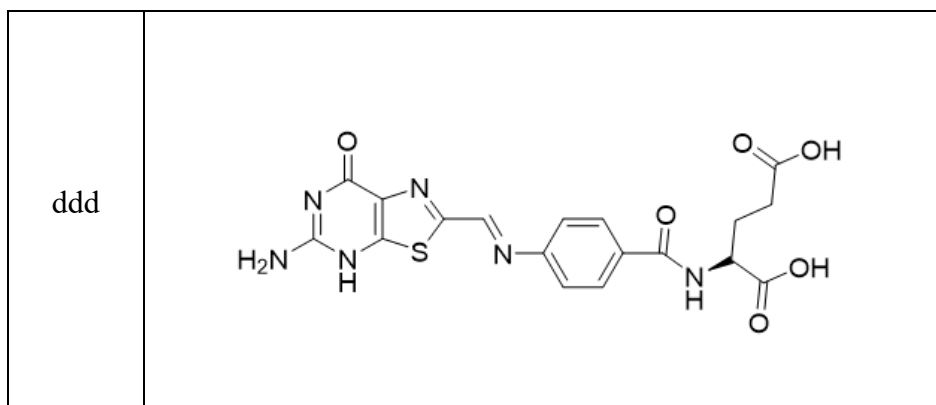
Ligando	Estructura
aa	
bb	
cc	
dd	
ee	



[0254] La Tabla 3 proporciona ejemplos no limitativos de realizaciones adicionales de un ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico aquí descrito que comprende un ligando dirigido a FR (o un radical del mismo) con la estructura de la fórmula X'.

[0255] Tabla 3. Fórmula X'

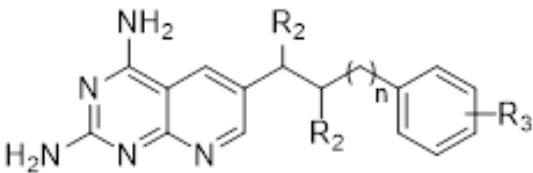
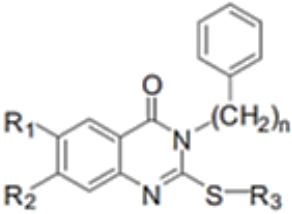
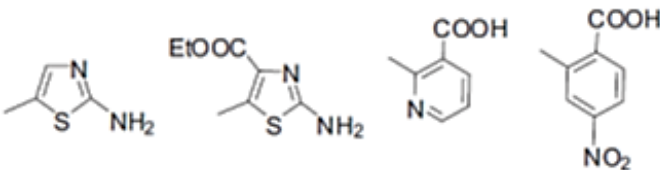
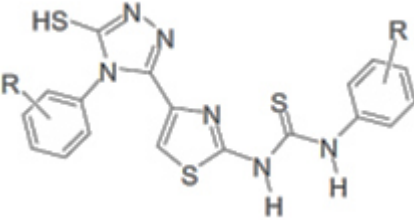
Ligando	Estructura
aaa	
bbb	
ccc	

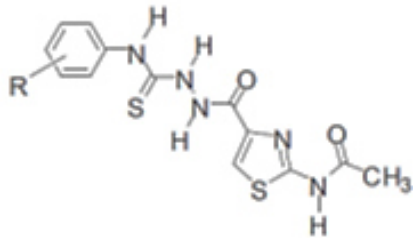
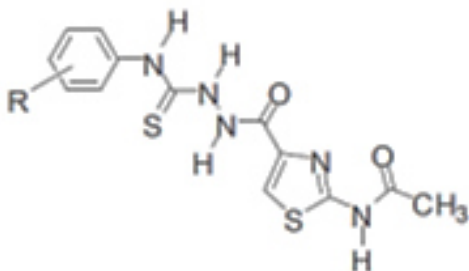
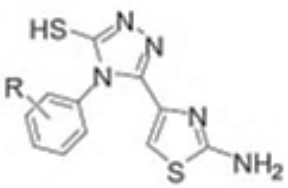
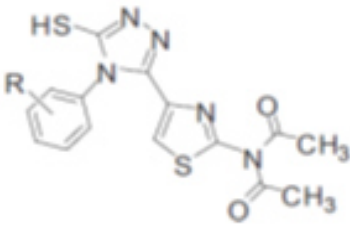


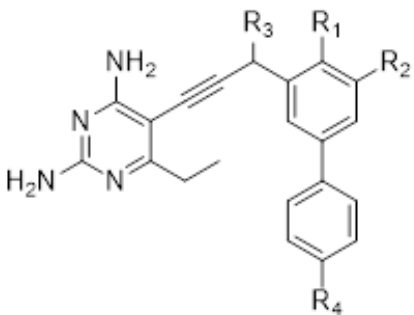
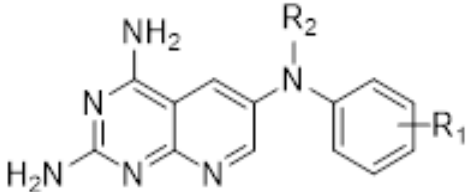
[0256] En lugar de un folato, el ligando de direccionamiento (p. ej., un radical del mismo) puede ser uno o más análogos antifolato no clásicos, tales como, por ejemplo, pirido[2,3-d]pirimidina u análogos similares (o radicales de los mismos) que tengan las fórmulas (p. ej., radicales de las fórmulas) expuestas en la Tabla 4 a continuación (o un análogo o fragmento funcional de los mismos).

[0257] Tabla 4. Análogos antifolato no clásicos

Ligando	Fórmula
aaaa	En donde R es NH₂, NHMe, NHCH(CO₂Et)(CH₂)₂CO₂Et, NHCH(CO₂Et)(CH₂)₂CO₂H, o
bbbb	En donde R₁ es 3,4,5-(OCH₃)₃, 3,4-(OCH₃)₂, or 4-OCH₃; R₂ es un H, una cadena alquilo o CHO; y es representative de un enlace C-C simple o doble.

cccc	 en donde n es 0 o 1; R1 y R2 son, cada uno independientemente, un H o un alquilo; y R3 es un H, 3',4',5'-OMe, 2',3',4'-OMe, 2',4',5'-OMe, 2',4',6'-OMe, 3',4'-OMe, 3',5'-OMe, 2',5'-OMe, 2',3'-C4H4, 4'-OMe, 2',3'-C4H4, 6'-OMe, 2',3'-C4H4, 4'-O-C6H5 o 4'-CONH-ácido L-glutámico
dddd	 En donde n es 0 or 1; R1 es CH3, chloride (Cl) o OCH3; R2 es H or OCH3; y R3 es uno de los siguientes: 
eeee	 En donde R es H, 4-Cl, 2-CH3O, 4-CH3O, 2,4-(CH3O)2, 4-CH3, o 4-C6H5O.

ffff	 En donde R es H, 4-Cl, 2-CH₃O, 4-CH₃O, 2,4-(CH₃O)₂, 4-CH₃, o 4-C₆H₅O.
gggg	 En donde R es H, 4-Cl, 2-CH₃O, 4-CH₃O, 2,4-(CH₃O)₂, 4-CH₃, o 4-C₆H₅O.
hhhh	 En donde R es H, 4-Cl, 2-CH₃O, 4-CH₃O, 2,4-(CH₃O)₂, 4-CH₃, o 4-C₆H₅O.
iiii	 En donde R es H, 4-Cl, 2-CH₃O, 4-CH₃O, 2,4-(CH₃O)₂, 4-CH₃, o 4-C₆H₅O.

jjjj	 en donde R1 y R2 son, cada uno independientemente, H u OMe; R3 es H o un alquilo; y R4 es o-COOH, m-COOH o p-COOH.
kkkk	 En donde R1 es H, 2'-Ome, 4'-OMe o 2',5'-diOMe, 3',4',5'-triOMe, 4'-Me, 4'-i-Pr, 3',4'-(C4H4), 2',3'-(C4H4), 4'-NO2, 2',5'-diF or 3',4',5'--triF; y R2 es H o un alquilo.

[0258] Enlazadores

[0259] Los enlazadores de los adaptadores biespecíficos aquí descritos se disponen entre el ligando de direccionamiento (p. ej., un radical del mismo) y el motivo de direccionamiento a células CAR-T (por ejemplo, que comprende fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína). El enlazador puede ser cualquier enlazador adecuado.

[0260] Tal como se usa en el presente documento, el término “enlazador” incluye una cadena de átomos biofuncionalmente adaptada para formar un enlace químico y conectar el motivo de direccionamiento a células CAR-T y el ligando de direccionamiento a cáncer o a CAF, para formar un conjugado. Ilustrativamente, la cadena de átomos puede incluir carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, silicio (Si) y fósforo (P), como C, N, O, S y P, o C, N, O y S.

[0261] El enlazador puede comprender una amplia variedad de enlaces, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos en el esqueleto contiguo. 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 a cada lado por un bloque hidrofílico de PEG.

[0262] El enlazador puede comprender PEG o un derivado de PEG. El enlazador puede ser (PEG)₃.

[0263] 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, por ejemplo, fotolábil, 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 (p. ej., hidrolizado química o enzimáticamente) en condiciones fisiológicas, por ejemplo, lábil a agentes reductores, pH-lábil, ácido-lábil, base-lábil, lábil por oxidación, lábil metabólicamente, lábil bioquímicamente, lábil por enzimas, o un enlace liberable multivalente basado en p-aminobencilo. Se reconoce que las condiciones fisiológicas que provocan la rotura del enlace no incluyen necesariamente un proceso biológico o metabólico y pueden incluir una reacción química estándar, como una hidrólisis, por ejemplo, a pH fisiológico o como resultado de la compartimentalización en un orgánulo celular como un endosoma con pH inferior al citosólico. Un enlace escindible puede conectar dos átomos adyacentes dentro del enlazador liberable y/o conectar otras porciones del enlazador o el motivo de direccionamiento y/o el motivo de direccionamiento a células CAR-T, tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, en cualquiera de los extremos del enlazador liberable. En algunos casos, el enlazador liberable se fragmenta en dos o más partes. En otros casos, el enlazador liberable se separa del motivo de direccionamiento a células CAR-T.

[0264] En algunas realizaciones, el enlazador se forma de modo que el motivo de direccionamiento a células CAR-T se escinda del motivo de direccionamiento a cáncer o a CAF solo después de que haya transcurrido tiempo suficiente para que el adaptador biespecífico circule por la circulación sistémica del sujeto tras su administración (p. ej., para permitir su captura e internalización por la célula o receptor diana). En algunas realizaciones, el periodo de tiempo para la liberación variará (p. ej., de un sujeto a otro en función de diversos factores). En algunas realizaciones, un enlazador liberable puede diseñarse para que no se escinda/libere hasta al menos 24 horas tras la administración o incluso a lo largo de una semana. En algunas realizaciones, el adaptador biespecífico puede pasar de forma segura por el sistema del sujeto y la fracción no capturada por las células diana (p. ej., las que expresan FR α , FR β o PSMA) puede excretarse.

[0265] Por el contrario, 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 en condiciones

fisiológicas. En algunas realizaciones, un enlazador no liberable comprende un esqueleto que es estable en condiciones fisiológicas (p. ej., el esqueleto no es susceptible a hidrólisis (p. ej., acuosa o enzimática). En algunas realizaciones, una composición que comprende un enlazador no liberable no libera ningún componente del adaptador biespecífico (p. ej., un ligando de direccionamiento a cáncer o CAF, o un ligando de direccionamiento a células CAR-T). En algunas realizaciones, el enlazador no liberable carece de un enlace disulfuro (S-S) o de un éster en el esqueleto. En algunas realizaciones, la composición comprende un ligando de direccionamiento a cáncer o CAF o un ligando de direccionamiento a células CAR-T conectados por un esqueleto sustancialmente estable durante toda la circulación del adaptador biespecífico (p. ej., durante la endocitosis al endosoma de la célula diana). El enlazador no liberable puede comprender: una amida, un éster, un éter, una amina y/o un tioéter (p. ej., tio-maleimida). Si bien se proporcionan ejemplos específicos, se entenderá que puede emplearse cualquier molécula en el enlazador no liberable siempre que forme al menos un enlace que no sea fácil o rápidamente rompible en condiciones fisiológicas.

[0266] De manera más específica, un enlazador no liberable comprende un enlazador que, a pH neutro, por ejemplo, menos del diez por ciento (10 %) (p. ej., <5 %, <4 %, <3 %, <2 %, <1 %, <0,1 %, <0,01 % o <0,001 %) se hidroliza en solución acuosa (p. ej., tamponada —p. ej., tampón fosfato—) en un periodo de tiempo (p. ej., 24 horas). En algunas realizaciones, cuando se emplea un enlazador no liberable, menos de aproximadamente el 10 %, y preferentemente menos del 5 % o nada, del adaptador biespecífico administrado libera un motivo al que está conectado (p. ej., en circulación sistémica antes de su captación por las células diana /tejidos).

[0267] En algunas realizaciones, un ligando de direccionamiento a cáncer o CAF no se escinde del ligando de direccionamiento a células CAR-T del adaptador biespecífico in vivo. En algunas realizaciones, esto es ventajoso, ya que permite que el adaptador biespecífico una y acerque una célula CAR-T a una célula diana cancerosa o a un CAF.

[0268] La longitud de un enlazador puede seleccionarse para optimizar la separación impuesta por el enlazador entre moléculas en la superficie celular diana, lo que a su vez puede facilitar la captación de una célula CAR-T unida por la célula diana (p. ej., 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 presenta aproximadamente 5 a 15 nm de longitud. En algunas, el enlazador es de al menos aproximadamente 7 nm. En ciertas realizaciones, cada enlazador es de aproximadamente 7 nm y flexible. En ciertas realizaciones, cada enlazador es de aproximadamente 7–10 nm. En algunas, el enlazador es de al menos aproximadamente 14 nm. En algunas, de aproximadamente 15 nm. En algunas, el enlazador es de aproximadamente 7 a aproximadamente 31 nm (p. ej., 7–31), de aproximadamente 7 a aproximadamente 24 nm, o de

aproximadamente 7 a aproximadamente 20 nm. En algunas, el enlazador es de aproximadamente 14 a aproximadamente 31 nm, de aproximadamente 14 a aproximadamente 24 nm, o de aproximadamente 14 a aproximadamente 20 nm. En algunas, 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 5–15 nm, 5–10 nm, 7–10 nm, 5–20 nm, 10–40 nm, o 25–100 nm. En ciertas realizaciones, la longitud de cada enlazador se selecciona para facilitar el microagrupamiento de moléculas unidas en una superficie celular para proporcionar aproximadamente 7–10 nm de separación entre ellas. Los intervalos especificados en este párrafo incluyen los extremos y todos los incrementos de 1 nm contenidos en ellos.

[0269] 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 lo anterior.

[0270] En ciertas realizaciones, un enlazador es un grupo que comprende una o más unidades estructurales covalentemente conectadas.

[0271] Además, el enlazador puede diseñarse para optimizar la biodistribución, la biodisponibilidad y la PK/PD (p. ej., del adaptador biespecífico) y/o para aumentar la captación (p. ej., del adaptador biespecífico) en el tejido diana, conforme a metodologías comúnmente conocidas o que se desarrollen en el futuro, como la PEGilación.

[0272] En algunas realizaciones, los enlazadores pueden comprender uno o más espaciadores (p. ej., para facilitar un tiempo de liberación concreto, aumentar la captación en el tejido diana y/o optimizar la biodistribución, biodisponibilidad y/o PK/PD de un adaptador biespecífico). Un espaciador puede comprender una o más cadenas alquílicas, PEG, péptidos, azúcares, peptidoglucanos, enlazadores aptos para química clic (p. ej., triazoles), enlazadores rígidos como poliprolinas y polipiperidinas, etc.

[0273] En algunas realizaciones, los enlazadores del adaptador biespecífico comprenden PEG, un derivado de PEG o cualquier otro enlazador conocido en la técnica o que se desarrolle en el futuro que logre el propósito aquí establecido. En algunas realizaciones, el enlazador se repite n veces, donde n es un entero positivo. Por ejemplo, sin limitación, n puede seleccionarse de un intervalo de 1–16, 1–32, 1–64 o 1–96. El número de repeticiones (p. ej., n) puede seleccionarse para lograr la funcionalidad, el tamaño y/o la potencia deseados del compuesto y/o en vista de la aplicación deseada. En algunas realizaciones, el enlazador comprende uno o más espaciadores (p. ej., que también pueden utilizarse para diseñar características específicas del adaptador biespecífico).

[0274] En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste o consiste esencialmente en PEG3-PEG18. En ciertas realizaciones, comprende/consiste/consiste esencialmente en PEG3-PEG12. En ciertas, PEG3-PEG8. En ciertas, PEG5-PEG15. En ciertas, PEG6-PEG14. En ciertas,

PEG7-PEG13. En ciertas, PEG8-PEG12. En ciertas, PEG9-PEG12. En ciertas, PEG4-PEG15. En ciertas, PEG4-PEG16. En ciertas, PEG3-PEG11. En ciertas, PEG3-PEG12. En ciertas, PEG3-PEG15. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente de o consistir en) PEG4 a PEG16, como PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, PEG14, PEG15 o PEG16. Todos los intervalos de este párrafo incluyen sus extremos.

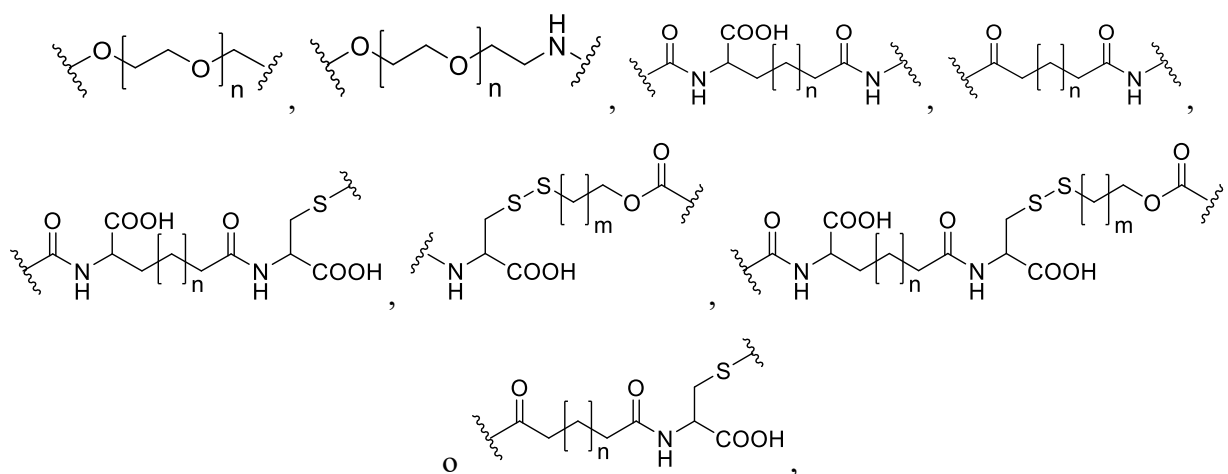
[0275] El enlazador puede ser o comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) PEG6. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG10. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG12. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG15. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende, consiste en, o consiste esencialmente en PEG16.

[0276] En algunas realizaciones, el enlazador es hidrolizable. En otras, no hidrolizable. En algunas, es un heteroalquilo opcionalmente sustituido. En algunas, 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, el enlazador comprende un espaciador (p. ej., como se describe en otras partes del presente documento).

[0277] En algunas realizaciones, el enlazador es un heteroalquilo sustituido con al menos un enlace disulfuro en su esqueleto. En algunas, el enlazador es un péptido con al menos un enlace disulfuro en su esqueleto.

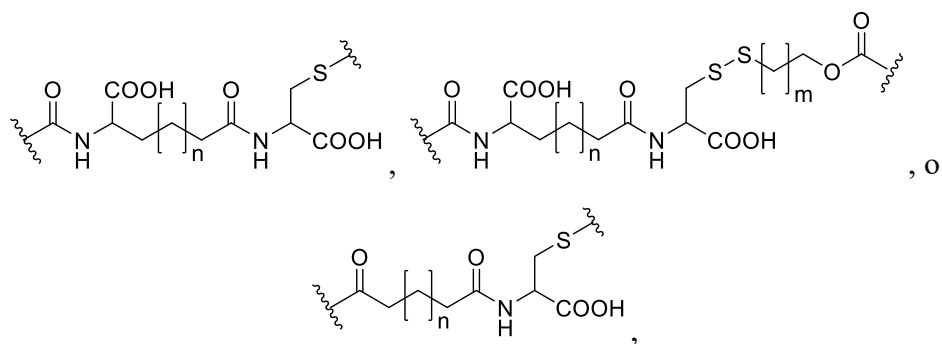
[0278] En algunas realizaciones, el enlazador comprende $\text{-CONH-CH(COOH)-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CR}_a\text{R}_b\text{-O-CO-}$, $\text{-CONH-CH(COOH)CR}_a\text{R}_b\text{-O-CO-}$, $\text{-C(O)NHCH(COOH)(CH}_2\text{)}_2\text{-CONH-CH(COOH)CR}_a\text{R}_b\text{-O-CO-}$ or $\text{-C(O)NHCH(COOH)(CH}_2\text{)}_2\text{-CONH-CH(COOH)-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CR}_a\text{R}_b\text{-O-CO-}$, en donde Ra y Rb son, independientemente, H, alquilo o heteroalquilo (por ejemplo, PEG).

[0279] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una estructura de:



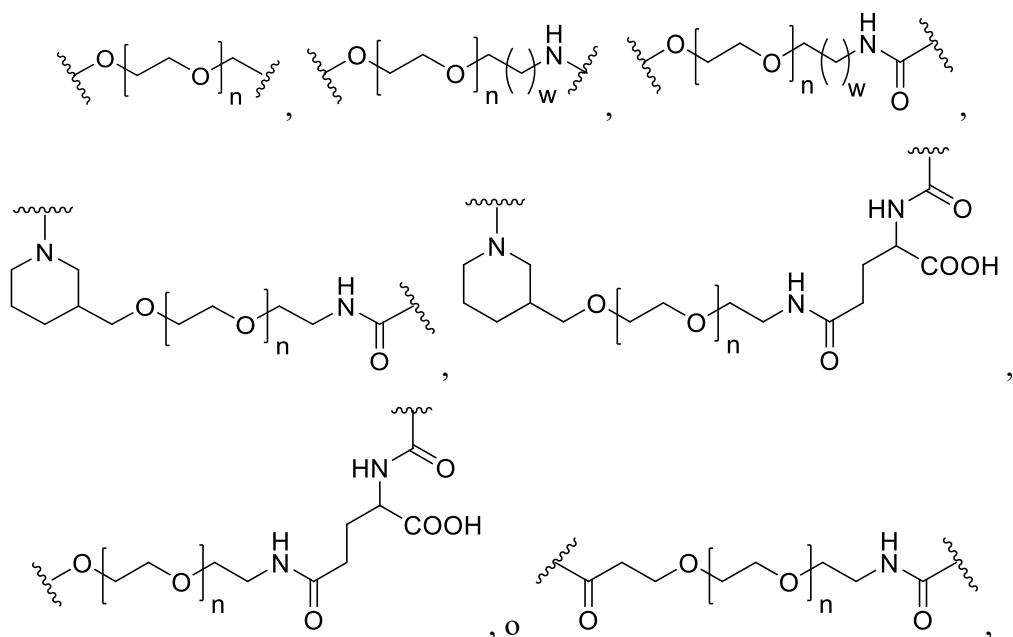
en donde n o m (según corresponda) es de 0 a 10.

[0280] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una estructura de:



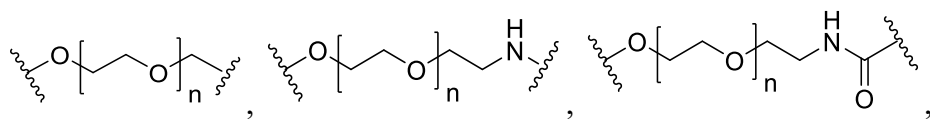
en donde n y m son, cada uno independientemente, de 0 a 10.

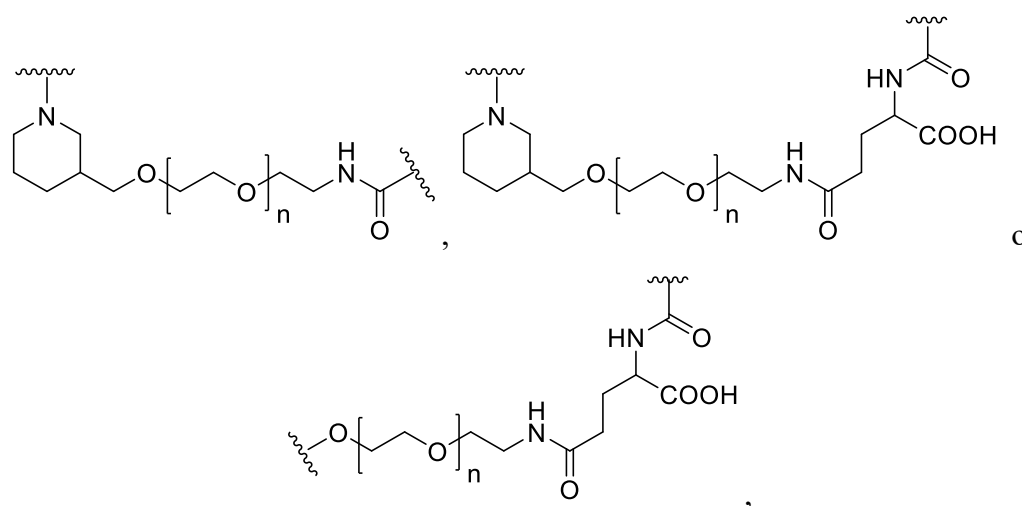
[0281] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una estructura de:



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

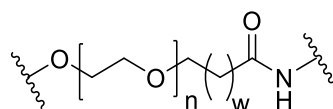
[0282] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una estructura de:





en donde n es de 1 a 16.

[0283] En ciertas realizaciones, el enlazador puede comprender la estructura de:

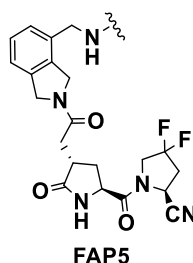


en donde n es de 1 a 30 y w es de 0 a 5.

[0284] Para una discusión adicional de enlazadores pertinentes a la presente divulgación y, en particular, relacionada con folato y adaptadores de fluoresceína–enlazador–folato, véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Internacional núm. WO 2020/033129, cuya divulgación se incorpora en el presente por referencia para sus enseñanzas al respecto.

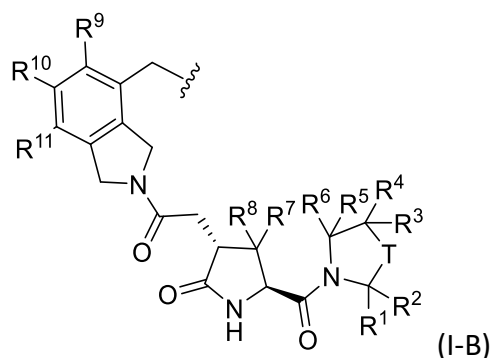
[0285] Adaptadores biespecíficos

[0286] 1 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 FAP (por ejemplo, que expresa FAP α) y puede comprender un ligando fluoresceína–enlazador–FAP. El adaptador, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, puede comprender un ligando fluoresceína–enlazador–FAP (por ejemplo, fluoresceína = fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína), en donde el ligando FAP es:



y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste en) PEG. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG4 a PEG16, tales como PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG-10, PEG11, PEG12, PEG13, PEG14, PEG15 o PEG16. El

enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG6. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG16. El ligando FAP puede tener una estructura representada por la fórmula I-B:



en donde:

 es el punto de unión al enlazador del adaptador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O- o -S-;

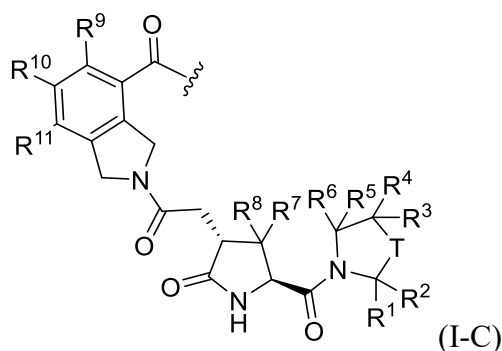
R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo-, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C₁-6alquilo, -O-C₁-6alquilo y -S-C₁-6alquilo;

R₅, R₆, R₇ y R₈ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halo; y

R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, -C₁-6alquilo, -O-C₁-6alquilo, -S-C₁-6alquilo, F, Cl, Br e I.

[0287] En ciertas realizaciones, el ligando FAP (o radical del mismo) del adaptador biespecífico puede tener una estructura representada por la fórmula I-C:



en donde:

 es el punto de unión al enlazador del adaptador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O- o -S-;

R1 y R2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo-, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

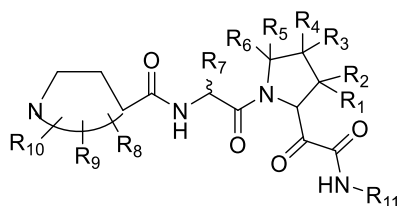
R3 y R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R5, R6, R7 y R8 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halo; y

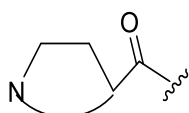
R9, R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6 alquilo, F, Cl, Br e I.

[0288] En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, es para uso con células CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) en el tratamiento de un cáncer que expresa FAP (por ejemplo, que expresa FAP α), y dicho adaptador comprende un ligando fluoresceína–enlazador–FAP (por ejemplo, fluoresceína = fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína), en donde el ligando FAP (o radical del mismo) es un ligando FAP8 y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste en) PEG. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG3 a PEG15, tales como PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, PEG14 o PEG15. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG15. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG16.

[0289] El ligando FAP (o radical del mismo) puede tener la estructura:



en donde:



representa un heterociclo funcionalizado que contiene N de 5 a 10 miembros, aromático o no aromático, mono- o bicíclico, que opcionalmente comprende además de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S;

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

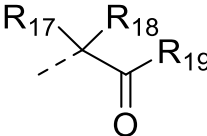
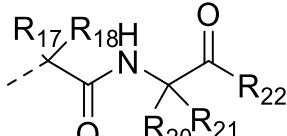
R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

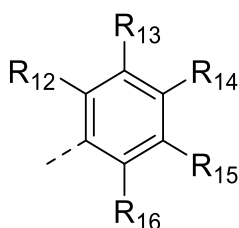
R7 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH₂=, -CH₃, CH₃CH₂-, (CH₃)₂CH-, (CH₃)₃C-, -CH₂Ph y -CH₂Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br,

-I, -NO₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -NH₂, -N₃, -NH=NH, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, C1-C10 alquilo, C3-C10 cicloalquilo,

adamantilo, , , arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



en donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, C1-C3 alquilo, C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, C1-C4 alquilo y C1-C3 alcoxi;

R13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, C1-C3 alquilo, C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, C1-C4 alquilo y C1-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente de -H y -CH₃; y

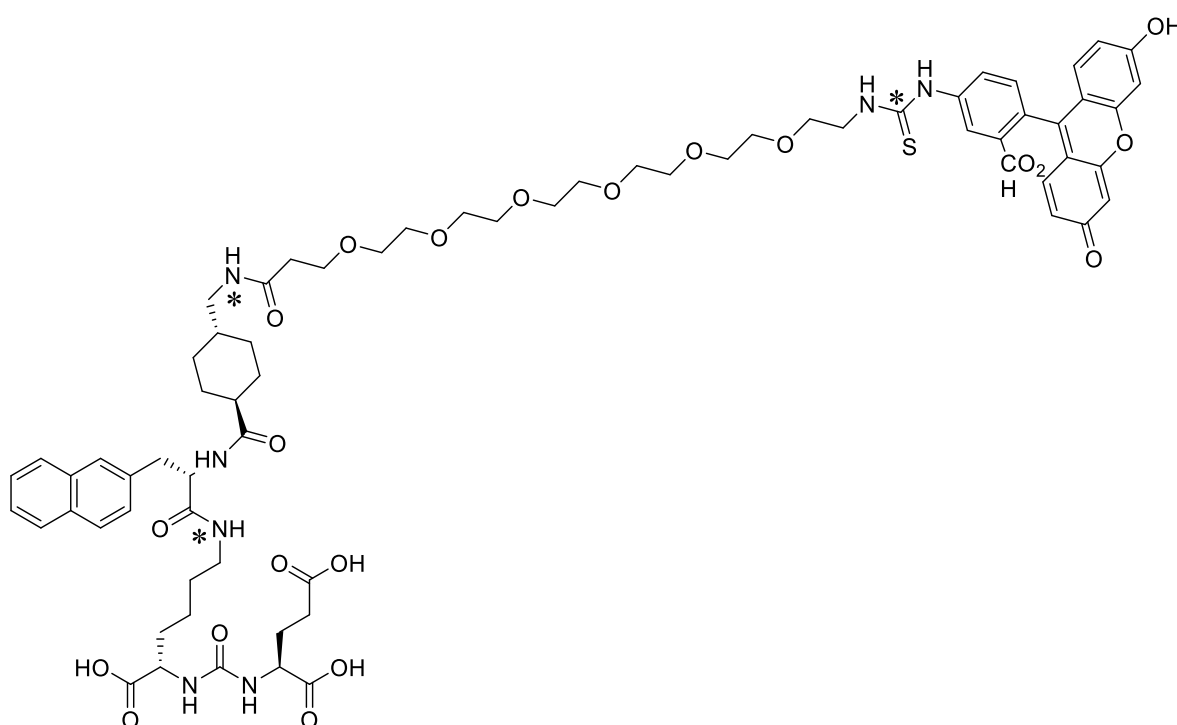
R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo.

[0290] El adaptador biespecífico puede tener una estructura de las fórmulas mostradas en la **FIG. 25**.

[0291] El adaptador biespecífico puede comprender un ligando fluoresceína-enlazador-PSMA. En ciertas realizaciones, el adaptador biespecífico es para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa PSMA. En ciertas realizaciones, el ligando

PSMA (o radical del mismo) es o comprende DUPA. En ciertas realizaciones, la fluoresceína del adaptador comprende FITC y el ligando PSMA (o radical del mismo) es o comprende DUPA tal que el adaptador biespecífico comprende FITC-DUPA conjugado con un enlazador PEG, tal como PEG3, PEG6, PEG8 o PEG12. Dichos adaptadores fueron diseñados y sintetizados para controlar la distancia entre una célula CAR-T de unión a FITC (célula T con receptor de antígeno quimérico) y una célula tumoral que expresa PSMA. En comparación con un conjugado DUPA-FITC sin ningún enlazador, la incorporación de un enlazador y el aumento de la longitud del enlazador pueden mejorar la función de las células CAR-T anti-FITC. En ciertas realizaciones, se puede obtener una longitud óptima de enlazador con PEG6.

[0292] El adaptador biespecífico, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, puede comprender un ligando fluoresceína-enlazador-PSMA (por ejemplo, fluoresceína = fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína), en donde el ligando PSMA es PSMAL1 (es decir, radical del mismo), y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste en) PEG. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG3 a PEG12, tales como PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG-10, PEG11 o PEG12. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG6. El adaptador biespecífico puede tener la estructura:



[0293] El adaptador biespecífico puede ser para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa PSMA, y puede comprender un ligando fluoresceína-enlazador-PSMA, en donde el ligando PSMA (o radical del mismo) es o comprende DUPA o un derivado de DUPA y el enlazador comprende (o consiste esencialmente en o consiste en) PEG3 a

PEG11, y en donde el adaptador puede ser una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG3 a PEG12, tales como PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG-10, PEG11 o PEG12. El enlazador puede comprender (o consistir esencialmente en o consistir en) PEG6. El adaptador biespecífico puede tener una estructura de las fórmulas mostradas en la **FIG. 28**.

[0294] El adaptador biespecífico puede contener uno o más centros quirales o, de otro modo, ser capaz de existir como múltiples estereoisómeros. En consecuencia, diversas realizaciones del adaptador biespecífico pueden incluir estereoisómeros puros, así como mezclas de estereoisómeros, tales como enantiómeros, diastereómeros y mezclas enriquecidas enantio- o diastereoméricamente. El adaptador biespecífico puede ser capaz de existir como isómeros geométricos, tales como isómeros geométricos puros o mezclas de isómeros geométricos.

[0295] Los compuestos adaptadores biespecíficos pueden sintetizarse conforme a métodos conocidos en la técnica. En el presente documento se ejemplifican diversos métodos de síntesis.

[0296] Sales e hidratos

[0297] Los adaptadores biespecíficos aquí descritos pueden presentarse como una sal farmacéuticamente aceptable. Una “sal farmacéuticamente aceptable” de un adaptador biespecífico se refiere a aquellas sales cuyos contraiones pueden utilizarse en productos farmacéuticos. Tales sales incluyen (i) sales de adición de ácido, que pueden obtenerse por reacción de la base libre del compuesto progenitor con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido hidrobromhídrico, 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 compuesto progenitor se sustituye por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de aluminio, o coordina con una base orgánica, tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trimetamina, N-metilglucamina y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por los expertos en la técnica, y cualquier sal farmacéuticamente aceptable se contempla en el presente.

[0298] En varias realizaciones, 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, hemilsulfato y hemicalcio.

[0299] Las sales farmacéuticamente aceptables pueden sintetizarse a partir del compuesto 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 compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de ambos; generalmente, 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 referencia en el presente.

[0300] El adaptador biespecífico, o su sal farmacéuticamente aceptable, puede existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluidas 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 cualesquiera y todos los hidratos y/o solvatos de las fórmulas del compuesto 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.

[0301] Ciertos grupos funcionales, tales como los hidroxilo, amino y similares, pueden formar complejos y/o conjugados de coordinación con agua y/o varios disolventes. En consecuencia, se entenderá que las fórmulas incluyen y representan esos diversos hidratos y/o solvatos. También se incluyen no hidratos y/o no solvatos de los adaptadores biespecíficos.

[0302] Composiciones farmacéuticas

[0303] En vista de lo anterior, también se proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) para el tratamiento del cáncer 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, sin limitarse a ello, 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 reguladora, como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), o listados en la Farmacopea de los Estados Unidos (U.S. Pharmacopeia) para su uso en animales (por ejemplo, mamíferos, como los seres humanos). El vehículo puede ser una solución salina tamponada con fosfato, agua, o una emulsión tal como una emulsión aceite/agua o agua/aceite.

[0304] En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una combinación de dos o más tipos de adaptadores biespecíficos del presente documento. Por ejemplo, sin limitación, la composición farmacéutica puede comprender (i) una combinación de un primer conjunto de adaptadores biespecíficos que comprenden o consisten en fluoresceína–enlazador–FAP y un segundo conjunto de adaptadores biespecíficos que comprenden o consisten en fluoresceína–enlazador–FR; y (ii) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender (i) una combinación de un primer conjunto de adaptadores biespecíficos que comprenden o consisten en fluoresceína–enlazador–FAP y un segundo conjunto de adaptadores biespecíficos que comprenden o consisten en fluoresceína–enlazador–PSMA; y (ii) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0305] Además, se proporciona una combinación de composiciones farmacéuticas separadas para el tratamiento del cáncer. La combinación puede comprender (i) una composición farmacéutica que comprende un adaptador biespecífico que comprende fluoresceína–enlazador–folato y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (ii) una composición farmacéutica que comprende un adaptador biespecífico que comprende ligando FAP–enlazador–fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0306] Aún más, se proporciona una combinación de composiciones farmacéuticas separadas para el tratamiento del cáncer que comprende (i) una composición farmacéutica que comprende un adaptador biespecífico que comprende ligando PSMA–enlazador–fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (ii) una composición farmacéutica que comprende un adaptador biespecífico que comprende ligando FAP–enlazador–fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0307] También se proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer que expresa FAP que comprende un adaptador biespecífico que comprende fluoresceína–enlazador–FAP y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa PSMA. En ese caso, la composición farmacéutica puede comprender un adaptador biespecífico que comprende fluoresceína–enlazador–PSMA y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa FR (por ejemplo, FR α o FR β), cuya composición comprende un adaptador biespecífico que comprende fluoresceína–enlazador–FR y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0308] Los adaptadores biespecíficos pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un hospedador mamífero, 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 vía oral o parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, epidural, intracerebroventricular, intrauretral, inesternal, intracraneal, intratumoral, intramuscular, tópica, por inhalación y/o subcutánea. De hecho, en al menos una realización, un adaptador biespecífico y/o una composición según se describe en el presente puede administrarse directamente al torrente sanguíneo, al músculo o a un órgano interno.

[0309] Por ejemplo, en al menos una realización, los adaptadores biespecíficos de la presente pueden administrarse sistémicamente (por vía oral, por ejemplo) 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(los) ingrediente(s) activo(s) y un aglutinante, excipientes, un agente desintegrante, un lubricante y/o un edulcorante (como se conoce en la técnica). La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosis eficaz.

[0310] 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 ser utilizada junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril y apirógena o solución salina estéril. La preparación en condiciones estériles, por liofilización para producir un polvo estéril liofilizado para una formulación parenteral, puede lograrse utilizando métodos bien conocidos en la técnica. La solubilidad del adaptador biespecífico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para formulación parenteral puede incrementarse mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes que aumentan la solubilidad.

[0311] Los adaptadores/composiciones biespecíficos también pueden administrarse por infusión o inyección (por ejemplo, utilizando inyectores con aguja (incluidas 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 ser utilizada junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril y apirógena o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Por ejemplo, pueden prepararse dispersiones en glicerol, PEG líquidos, triacetina y sus mezclas y en aceites. En condiciones ordinarias de

almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden además contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

[0312] Las formas farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden los ingredientes activos que están adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles, 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 medio de dispersión líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo y sin limitación, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, PEG(s) líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres glicéricos no tóxicos y/o mezclas adecuadas de los mismos. En al menos una realización, la fluidez apropiada 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 los microorganismos puede prevenirse mediante la adición de varios 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 retardar la absorción, por ejemplo, monostearato de aluminio y gelatina.

[0313] 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 se requiera, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y las técnicas de liofilización, que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente esterilizadas por filtración.

[0314] Para la 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 sólido o 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 modo similar, los vehículos líquidos útiles pueden comprender agua, alcoholes o glicoles o mezclas agua–alcohol/glicol, en las cuales los compuestos presentes pueden disolverse o dispersarse a niveles efectivos, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Adicional y/o alternativamente, pueden añadirse coadyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos para optimizar las

propiedades para un uso determinado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse desde almohadillas absorbentes, utilizarse para impregnar vendajes y/u otros apósitos, pulverizarse sobre el área objetivo utilizando pulverizadores tipo bomba o aerosol, o simplemente aplicarse directamente a un área deseada del sujeto.

[0315] Agentes 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 para su aplicación directa sobre la piel del sujeto.

[0316] La cantidad del adaptador biespecífico (o sal farmacéuticamente aceptable del mismo) que se va a administrar a un sujeto puede variar significativamente, dependiendo del cáncer que se esté tratando, la vía de administración y la distribución tisular. Tal como se utiliza 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 una vez o durante el curso 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. De hecho, la dosis del adaptador biespecífico puede variar significativamente dependiendo de la condición del sujeto hospedador, el cáncer que se está tratando, cuán avanzada está 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 u otros fármacos en terapias combinadas como, por ejemplo, la terapia con células CAR-T). La cantidad de la composición requerida para su uso en el tratamiento (por ejemplo, la cantidad o dosis terapéutica o profilácticamente eficaz) variará no solo con la aplicación particular, sino también con la sal seleccionada (si procede) y las características del sujeto (tales como, por ejemplo, edad, condición, sexo, superficie corporal y/o masa del sujeto, tolerancia a los fármacos) y, en última instancia, estará a discreción del médico, clínico u otro responsable.

[0317] La cantidad que se administrará 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 experto habitual en la materia apreciará fácilmente que la dosis puede variar dentro de los diversos rangos proporcionados anteriormente en función de los factores señalados y puede quedar a discreción del médico tratante.

[0318] 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, entre otros, 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 ellos en 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.

[0319] En otra realización, el adaptador biespecífico puede administrarse en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de desde aproximadamente 0.5 g/m² hasta aproximadamente 500 mg/m², desde aproximadamente 0.5 g/m² hasta aproximadamente 300 mg/m², o desde aproximadamente 100 g/m² hasta aproximadamente 200 mg/m². En otras realizaciones, las cantidades pueden ser desde aproximadamente 0.5 mg/m² hasta aproximadamente 500 mg/m², desde aproximadamente 0.5 mg/m² hasta aproximadamente 300 mg/m², desde aproximadamente 0.5 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m², desde aproximadamente 0.5 mg/m² hasta aproximadamente 100 mg/m², desde aproximadamente 0.5 mg/m² hasta aproximadamente 50 mg/m², desde aproximadamente 0.5 mg/m² hasta aproximadamente 600 mg/m², desde aproximadamente 0.5 mg/m² hasta aproximadamente 6.0 mg/m², desde aproximadamente 0.5 mg/m² hasta aproximadamente 4.0 mg/m², o desde

aproximadamente 0.5 mg/m² hasta 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. Estas cantidades se basan en metros de superficie corporal. Todos los rangos especificados en este párrafo son inclusivos de los límites indicados e incluyen todos los incrementos de 0.5 g/m² comprendidos en cada rango especificado.

[0320] 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 de 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 rangos especificados en este párrafo son inclusivos de los límites indicados e incluyen todos los incrementos de 1 nmol/kg o 10 µg/kg, según corresponda, comprendidos en cada rango especificado.

[0321] Usos y métodos

[0322] Aún se proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, cuyo método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer de (i) células CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) o una composición farmacéutica que las comprende y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (ii) un adaptador biespecífico o una composición farmacéutica que lo comprende y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, con lo cual el sujeto es tratado del cáncer.

[0323] Los términos “tratar”, “tratando”, “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 ven atenuados, tales como una reducción en el tamaño de un tumor, la eliminación completa o parcial de un tumor, la estabilización del cáncer como, por ejemplo, mediante la inhibición de la progresión del cáncer (por ejemplo, un aumento en el tamaño de un tumor o un 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).

[0324] El término “sujeto”, tal como se utiliza en el presente documento, significa un animal, tal como un mamífero, y en particular un ser humano. En aplicaciones veterinarias, el sujeto puede ser un animal de laboratorio, agrícola, doméstico o salvaje. Ejemplos de tales animales incluyen, entre otros, 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 cebra, una jirafa, un gorila, un delfín o una ballena.

[0325] 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 la fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína) en el adaptador biespecífico.

[0326] 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 sencilla (scFv) de un anticuerpo), que reconoce y se une a la 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.

[0327] Se pueden utilizar y preparar regiones scFv de anticuerpos que se unen a la fluoresceína (por ejemplo, en FITC) a partir de (i) un anticuerpo conocido en la técnica que se une a la fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína), (ii) un anticuerpo anti-fluoresceína de nueva preparación, o (iii) variantes de secuencia derivadas de las regiones scFv de tales 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 cual se derivan. La porción de unión del CAR puede ser, por ejemplo, un scFv de un anticuerpo, un fragmento Fab, Fv, Fc o (Fab')₂.

[0328] “La identidad de secuencia porcentual (%)” con respecto a una referencia a una secuencia de polipéptido se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o de ácidos nucleicos, respectivamente, en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es 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 fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia puede lograrse de diversas maneras que están al alcance de la habilidad de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente. Por ejemplo, la determinación de identidad o similitud porcentual entre secuencias puede realizarse, por ejemplo, utilizando el programa GAP (Genetics Computer Group, software; ahora disponible a través de Accelrys en línea), y las alineaciones pueden realizarse utilizando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW (software VNTI, InforMax Inc.). Además, puede buscarse una base de datos de secuencias utilizando la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de interés. Los algoritmos para la búsqueda en bases de datos se basan típicamente en el software BLAST (Altschul et al., 1990), pero los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario 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 toda la longitud de la secuencia de ácido nucleico o aminoácido.

[0329] 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 (véanse, por ejemplo, el anticuerpo anti-fluoresceína E2 descrito en Vaughan et al., *Nature Biotechnol* 14(3): 309-314 (1996), y el constructo 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 núm. WO 2019/144091, ambos incorporados por referencia en el presente para sus enseñanzas al respecto). El CAR tiene un dominio de coestimulación y el dominio de coestimulación puede ser CD28 (antígeno de diferenciación 28), CD2 (antígeno de diferenciación 2), CD137 (antígeno de diferenciación 137; 4-1BB), un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), CD134 (antígeno de diferenciación 134; OX40), un miembro de la superfamilia de receptores TNF (TNFR), CD27 (antígeno de diferenciación 27), CD30 (antígeno de diferenciación 30), CD150 (antígeno de diferenciación 150), DAP10, NKG2D,

CD278 (antígeno 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 de linfocitos señalizadores (SLAM) (como 2B4), o cualquier combinación de los mismos. Variantes de secuencia de los dominios de coestimulación antes mencionados, que tengan la misma o similar actividad que el dominio en el cual se basan, también pueden utilizarse sin afectar negativamente 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 célula T, proteína receptora delta CD3, proteína receptora mbl, proteína receptora B29 o un receptor Fc γ . Variantes de secuencia de los dominios de señalización de activación antes mencionados, que tengan la misma o similar actividad que el dominio en el cual se basan, también pueden utilizarse sin afectar negativamente el método. Tales dominios de coestimulación y variantes de tales 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 cual se derivan.

[0330] 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 CD3 ζ .

[0331] 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 CD3 ζ como dominio de señalización de activación.

[0332] 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 referencia en el presente. 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 de transposón/transposasa que incluyen un sistema de suministro del gen CAR no mediado por virus)) para codificar una proteína de fusión que comprende 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'. Otras disposiciones pueden ser aceptables e incluir una región de reconocimiento, un dominio de señalización de activación y uno o más dominios de coestimulación. La ubicación 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 exportación adecuada 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 al grupo de direccionamiento del CAR.

[0333] Los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) pueden diseñarse genéticamente para expresar constructos CAR transfectando una población de linfocitos T con un vector de expresión que codifique el constructo CAR. Los métodos adecuados para preparar una población transducida de linfocitos T que expresan un constructo CAR seleccionado son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en Sambrook et al. (2001), *supra*.

[0334] Los linfocitos T pueden ser autólogos, aunque pueden utilizarse células heterólogas, como cuando el paciente que se trata ha recibido quimioterapia o radioterapia a dosis altas para destruir el sistema inmunitario del paciente. En varias realizaciones, pueden utilizarse células alogénicas.

[0335] Los linfocitos T pueden obtenerse de un paciente por medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células T pueden obtenerse recogiendo sangre periférica del paciente, sometiendo la sangre a centrifugación en gradiente de densidad Ficoll y utilizando luego un kit de aislamiento de células T negativas (tal 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 está recogiendo puede comprender al menos aproximadamente 90% del tipo de célula seleccionado, tal como al menos aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% del tipo de célula seleccionado.

[0336] 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 la 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 el tamaño celular, la tasa de proliferación o marcadores de activación determinados por citometría de flujo.

[0337] Después de que la población de linfocitos T citotóxicos se haya cultivado en condiciones que promueven la activación, las células pueden transfectarse con un vector de expresión que codifique un CAR. Después de 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.

[0338] Cuando las células han sido transfectadas y activadas, puede prepararse una composición que comprende las células CAR-T y administrarse al sujeto. Pueden utilizarse medios de cultivo que carezcan de cualquier producto animal, tal como BSA. Pueden emplearse las condiciones de cultivo tisular típicamente utilizadas en la técnica para evitar la contaminación con bacterias, hongos y micoplasma. Las células pueden sedimentarse, lavarse y resuspenderse en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0339] Las 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.

[0340] 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.

[0341] El número total de células CAR-T y la concentración de las células en la composición administrada al sujeto variarán en función de diversos factores, incluidos el tipo de células CAR-T que se utilicen, la especificidad de unión del CAR, la identidad del grupo de direccionamiento del CAR (en los ejemplos del presente documento, FITC), y la identidad del ligando de molécula pequeña/ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico (p. ej., PSMAL1, DUPA, un ligando de FR y/o un ligando de FAP), 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 que está siendo tratado. Composiciones adecuadas que comprenden células CAR-T transducidas incluyen aquellas que tienen un volumen de entre aproximadamente 5 ml y

aproximadamente 200 ml, y que contienen de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{15} células CAR-T transducidas. 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), 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 8M, 9M, 10M, 11M, 12M, 12.5M, 13M, 14M o 15M células CAR-T, por ejemplo por kg de peso corporal del paciente. Cuando la composición de células CAR-T se administra mediante inyección en el torrente sanguíneo del sujeto, las células CAR-T en el torrente sanguíneo del sujeto constituyen al menos el 5 %, 7 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 % del total de linfocitos T del sujeto en el torrente sanguíneo aproximadamente cuatro semanas después de la inyección; al menos el 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 50 % del total de linfocitos T del sujeto en el torrente sanguíneo aproximadamente dos semanas después de la inyección; o al menos el 85 %, 90 % o 95 % del total de linfocitos T del sujeto aproximadamente una semana después de la inyección.

[0342] El adaptador biespecífico (o sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo) o la composición farmacéutica que lo comprende, o una combinación de los mismos, y las células CAR-T anti-fluoresceína o la composición farmacéutica que comprende 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 comprende 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 comprende las células CAR-T anti-fluoresceína. Ejemplos de vías de administración adecuadas incluyen, sin limitarse a ello, oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea y transdérmica. Los componentes pueden administrarse directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. Las vías adecuadas para la administración parenteral incluyen, sin limitarse a ello, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, epidural, intracerebroventricular, intrauretral, inesternal, intracraneal, intratumoral, intramuscular y subcutánea. Pueden utilizarse inyectores con aguja, incluidas microagujas, inyectores sin aguja e infusiones. Los componentes antes mencionados pueden administrarse en formas de dosificación unitarias y/o formulaciones que contienen vehículos o excipientes no tóxicos y farmacéuticamente aceptables (o vehículos o adyuvantes).

[0343] En el método, las células CAR-T anti-fluoresceína (o una composición farmacéutica que comprende células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente

aceptable) y el adaptador biespecífico, una composición farmacéutica o una combinación pueden administrarse simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o por 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 tiempo entre la administración de las células CAR-T y la administración del adaptador biespecífico puede variar ampliamente en función de factores que incluyen el tipo de células CAR-T que se utilicen, la especificidad de unión del CAR, la identidad del grupo de direccionamiento del CAR (en los ejemplos del presente documento, una fluoresceína) y la del ligando de direccionamiento de molécula pequeña del adaptador biespecífico (en los ejemplos del presente documento, un ligando de PSMA, un ligando de FAP, un ligando de FR, o una combinación de ligandos de PSMA y FAP, o una combinación de ligandos de FAP y FR), 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.

[0344] 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 calendario de dosificación, tal como continua, una vez/día, dos veces/día, tres veces/día, una vez/semana, dos veces/semana o tres veces/semana). Por “continua” 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, (i) y (ii) pueden administrarse por vía intravenosa. El cáncer puede ser cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de mama, glioma (por ejemplo, glioma en estadio 3-4) o carcinoma de células renales de células claras (por ejemplo, carcinoma de células renales de células claras en estadio 3-4).

[0345] Tales métodos de terapia combinada pueden realizarse utilizando cualquier célula diseñada que sea adecuada para el tratamiento del cáncer y pueden incluir el uso de más de uno de estos tipos de agentes. En ciertas realizaciones, las células diseñadas utilizadas en esta terapia combinada son células CAR T y también pueden (o alternativamente) comprender células madre diseñadas y otras células.

[0346] Las células diseñadas utilizadas en combinación con los adaptadores biespecíficos o composiciones de la invención pueden ser cualesquiera células CAR T, células madre u otra célula

diseñada o combinación de las mismas. Varias terapias celulares adoptivas (también denominadas inmunoterapia celular) son conocidas en la técnica para su uso en el tratamiento del cáncer, y la inmunoterapia con células T, en particular, ha recibido mucha atención. Algunos ejemplos no limitantes de tales terapias incluyen la terapia con receptor de célula T diseñado (TCR), la terapia con células CAR T y la terapia con células asesinas naturales (NK).

[0347] En ciertos enfoques, la administración tanto de los compuestos adaptadores biespecíficos como de la terapia celular diseñada da como resultado una inhibición del crecimiento del cáncer mayor que aditiva.

[0348] Cuando se coadministran múltiples 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 cuales un adaptador biespecífico dirigido se administra al menos una vez durante un curso de tratamiento que implica administrar una terapia celular a un sujeto.

[0349] 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 número WO 2017/177149.

[0350] Los métodos de tratamiento del cáncer del presente documento pueden comprender administrar cualquiera de los adaptadores biespecíficos al paciente y administrar cualquiera de las composiciones de células diseñadas o terapias celulares diseñadas descritas anteriormente al paciente.

[0351] En ciertas realizaciones, se proporciona un método de tratar el cáncer en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer 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) cualquier adaptador biespecífico, cualquier composición farmacéutica que lo comprenda o cualquier combinación de adaptadores biespecíficos. Los pasos (i) y (ii) pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0352] Las células CAR-T anti-fluoresceína pueden comprender cualesquiera células CAR T descritas en el presente o adecuadas para utilizarse como 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, y 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 célula T o un receptor Fc γ .

[0353] Cuando el método administra una combinación, la combinación puede comprender un primer y un segundo adaptador biespecífico, que pueden administrarse al sujeto simultáneamente

por la misma o diferentes vías. Alternativamente, el primer y el segundo adaptador biespecífico pueden administrarse al sujeto secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0354] En ciertas realizaciones, ambos pasos (i) y (ii) del método se administran por vía intravenosa.

[0355] La fluoresceína del adaptador biespecífico puede unir con afinidad a la célula CAR-T anti-fluoresceína al exponerse a la misma, y el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico puede enlazar la célula CAR-T anti-fluoresceína unida a una célula cancerosa dirigida o a un CAF cuando el ligando dirigido del adaptador biespecífico se une con afinidad a un receptor en dicha célula cancerosa dirigida o CAF. De este modo, los compuestos, composiciones y combinaciones del presente documento facilitan una eficacia mejorada de la terapia con células CAR T.

[0356] En ciertas realizaciones, el receptor en la célula cancerosa dirigida o CAF es un FAP sobreexpresado, un PSMA sobreexpresado y/o un FR (por ejemplo, un FR sobreexpresado). El cáncer puede ser un cáncer que expresa FAP, y al menos un adaptador biespecífico de (ii) puede comprender un radical de un ligando FAP. El cáncer puede ser un cáncer que expresa PSMA, y al menos un adaptador biespecífico de (ii) puede comprender un radical de un ligando PSMA. En ciertas realizaciones, por ejemplo, cuando el método administra una combinación del presente documento, el cáncer es un cáncer que expresa FR y (ii) puede comprender una combinación del presente documento que comprende un folato.

[0357] También se proporcionan métodos para tratar cáncer que expresa FAP en un sujeto. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer 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) cualquier adaptador biespecífico o una composición farmacéutica que comprende 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 puede ser una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína. En ciertas realizaciones, el CAR comprende: un dominio de coestimulación, y el dominio de coestimulación puede ser CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40) o CD278 (ICOS); y/o un dominio de señalización de activación, y el dominio de señalización de activación puede ser una cadena CD3ζ de célula T o un receptor Fc γ.

[0358] En ciertas realizaciones, un método de tratar el cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer de: (i) células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-fluoresceína o una composición farmacéutica que comprende células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y (ii)

cualquier combinación de adaptadores biespecíficos. Aquí, el CAR puede comprender: una región de reconocimiento que comprende una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína; un dominio de coestimulación y el dominio de coestimulación puede ser CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40) o CD278 (ICOS); y/o un dominio de señalización de activación que es una cadena CD3 ζ de célula T o un receptor Fc γ . Los pasos (i) y (ii) pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías. En ciertas realizaciones, el primer y el segundo adaptador biespecífico de la combinación se administran al sujeto simultáneamente por la misma o diferentes vías. En ciertas realizaciones, el primer y el segundo adaptador biespecífico de la combinación se administran al sujeto secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías. (i) y (ii) pueden administrarse cada uno por vía intravenosa.

[0359] 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 ópticas, tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), por ejemplo.

[0360] En los métodos, el cáncer puede, adicionalmente, visualizarse antes de la administración al sujeto del adaptador biespecífico, o de las sales o hidratos farmacéuticamente aceptables del mismo, o de la composición de células diseñadas (por ejemplo, una composición de linfocitos citotóxicos que expresan CAR o una composición de células CAR-NK). El cáncer, adicional o alternativamente, puede visualizarse 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 mediante PET, imagen por resonancia magnética (MRI) o SPECT/tomografía computarizada (CT). El método de obtención de imágenes puede ser cualquier método de obtención de imágenes adecuado conocido en la técnica.

[0361] El cáncer puede ser cualquier cáncer. “Cáncer” tiene su significado llano y ordinario cuando se lee a la luz de la especificación y puede incluir, sin limitarse a ello, un grupo de enfermedades que implican crecimiento celular anormal con potencial para invadir o propagarse (es decir, metastatizar) a otras partes del cuerpo. Ejemplos incluyen, sin limitarse a ello, un cáncer del cerebro, tiroides, pulmón, páncreas, riñón, estómago, estroma gastrointestinal, endometrio, mama, cuello uterino, ovario, colon, próstata, leucemias, linfomas, otros cánceres relacionados con la sangre o 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 de endometrio, 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.

[0362] En algunos aspectos de estas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa el receptor de folato, por ejemplo y sin limitación, un cáncer que expresa FR α . En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa FR β . En ciertas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa FAP. En ciertas realizaciones, el cáncer es un cáncer que expresa PSMA.

[0363] En algunas realizaciones, el cáncer se visualiza antes de la administración de (i) y (ii) al sujeto. La obtención de imágenes puede realizarse mediante PET, MRI o SPECT/CT.

[0364] En ciertas realizaciones, se proporciona un uso de un adaptador biespecífico, una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del adaptador biespecífico, o una composición del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto. El adaptador biespecífico puede ser cualquier compuesto o conjugado del presente documento. El medicamento puede ser para su uso en combinación con la administración de una terapia celular diseñada al sujeto como, por ejemplo, la terapia con células CAR T, en la que las células CAR T expresan anti-fluoresceína.

[0365] 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 del presente documento o una combinación del presente documento (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anteriores); y 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(los) adaptador(es) biespecífico(s), composición farmacéutica o 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 circulación sistémica en un sujeto cuando se exponen al adaptador biespecífico, composición farmacéutica o combinación, por ejemplo. Alternativamente, las células CAR-T anti-fluoresceína pueden exponerse in vitro al adaptador biespecífico, composición farmacéutica o combinación.

[0366] Kits

[0367] Aún más, se proporciona un kit. El kit puede comprender (i) un adaptador biespecífico, o una composición farmacéutica que comprende el mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, o una combinación de los mismos, y (ii) células CAR-T anti-fluoresceína (por ejemplo, células CAR-T anti-FITC) o una composición farmacéutica que comprende las mismas y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0368] En ciertas realizaciones, el(los) adaptador(es) biespecífico(s), la composición farmacéutica o la combinación y las células CAR-T se almacenan en recipientes separados. En ciertas realizaciones en las que el kit comprende una combinación del presente documento, el primer y el segundo adaptador biespecífico se almacenan en recipientes separados.

[0369] General

[0370] Los expertos en la técnica reconocerán que pueden realizarse numerosas modificaciones a las implementaciones específicas descritas anteriormente. Las implementaciones no deben limitarse a las limitaciones particulares descritas. Pueden ser posibles otras implementaciones.

[0371] Si bien los adaptadores biespecíficos y las composiciones farmacéuticas se ilustran y describen en detalle en la descripción anterior, lo mismo debe considerarse como ilustrativo y no limitante en carácter, entendiéndose que solo se han mostrado y descrito ciertas realizaciones y que se desea proteger todos los cambios y modificaciones que estén dentro del espíritu de la invención.

[0372] Se pretende que el alcance de los presentes adaptadores biespecíficos, composiciones y métodos esté definido por las siguientes reivindicaciones. Sin embargo, esta divulgación puede practicarse de otra manera distinta a la específicamente explicada e ilustrada sin apartarse de su espíritu o alcance. Los expertos en la técnica entenderán que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones descritas en el presente al practicar las reivindicaciones sin apartarse del espíritu y alcance tal como se define en las siguientes reivindicaciones.

[0373] Cualquier uso de encabezados de sección está destinado a facilitar la lectura del documento y no debe interpretarse como limitante. Además, información que sea relevante para un encabezado de sección puede aparecer dentro o fuera de esa sección particular.

[0374] Todas las publicaciones, patentes, publicaciones de solicitudes de patente, 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 cual pertenece la divulgación. Todas esas publicaciones se incorporan en el presente por referencia en la misma medida que si cada publicación individual fuera específicamente e individualmente indicada como incorporada por referencia. En caso de usos inconsistentes entre este documento y aquellos documentos así incorporados por referencia, el uso en la referencia incorporada debe considerarse complementario al de este documento; para inconsistencias irreconciliables, el uso en este documento controla.

[0375] Varias técnicas y mecanismos a veces describirán una conexión o enlace entre dos componentes. Palabras tales como unido, enlazado, acoplado, conectado y términos similares con sus morfemas flexivos se usan indistintamente, a menos que la diferencia se señale o se haga de otro modo clara a partir del contexto. Estas palabras y expresiones no significan necesariamente conexiones directas, sino que incluyen conexiones a través de componentes intermedios. Debe observarse que una conexión entre dos componentes no significa necesariamente una conexión directa, sin impedimentos, ya que una variedad de otros componentes pueden residir entre los dos componentes de interés. En consecuencia, una conexión no significa necesariamente una conexión directa, sin impedimentos, a menos que se indique lo contrario.

[0376] Definiciones determinadas

[0377] Tal como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos y frases tendrán los significados establecidos a continuación. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica.

[0378] El término “aproximadamente” o “alrededor de” significa dentro de un rango aceptable para el valor particular según lo determine una persona con conocimientos ordinarios en la materia, lo cual dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, por ejemplo, de 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 “alrededor de” puede significar dentro de 90 %, dentro de 95 %, 99 %, 99.5 %, 99.9 %, 99.99 %, o al menos “aproximadamente” 99.999 % o más de un valor establecido o del límite establecido de un rango. Alternativamente, particularmente 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 $\pm 1\text{--}20\%$, preferiblemente $\pm 1\text{--}10\%$ y más preferiblemente $\pm 1\text{--}5\%$.

[0379] 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 comprendido. Los límites superior e inferior de esos rangos más pequeños pueden incluirse de manera independiente en los rangos más pequeños, y también están comprendidos, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, también se incluyen rangos que excluyen uno o ambos de esos límites.

[0380] 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” tiene la intención de abarcar: *a*, *b*, *c*, *a-b*, *a-c*, *b-c* y *a-b-c*.

[0381] Los términos “un”, “una” o “el” se utilizan para incluir uno o más de uno, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término “o” se utiliza para referirse a una “o” no exclusiva, salvo que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que la fraseología o terminología empleada en el presente documento, y no definida de otro modo, tiene únicamente fines descriptivos y no de limitación.

[0382] El término “o” se utiliza para referirse a una “o” no exclusiva, salvo que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que la fraseología o terminología empleada en el presente documento, y no definida de otro modo, tiene únicamente fines descriptivos y no de limitación.

[0383] Los términos y expresiones empleados se usan como términos de descripción y no de limitación. Cuando ciertos términos están definidos y, de otro modo, se describen o analizan en otra parte de la “Descripción Detallada”, todas esas definiciones, descripciones y análisis se atribuyen a dichos términos. Además, no existe la intención, en el uso de tales términos y expresiones, de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas. Asimismo, aunque pueden utilizarse subtítulos en la “Descripción Detallada”, dicho uso es únicamente para facilitar la lectura y no pretende limitar ninguna divulgación realizada en una sección a esa sección en particular; por el contrario, cualquier divulgación realizada bajo un subtítulo se pretende que constituya una divulgación bajo todos y cada uno de los demás subtítulos.

[0384] Se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Así, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente en el contexto de realizaciones preferidas y características opcionales, quienes tengan conocimientos en la materia pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos aquí divulgados. Tales modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la invención tal como se reivindica en el presente.

EJEMPLOS

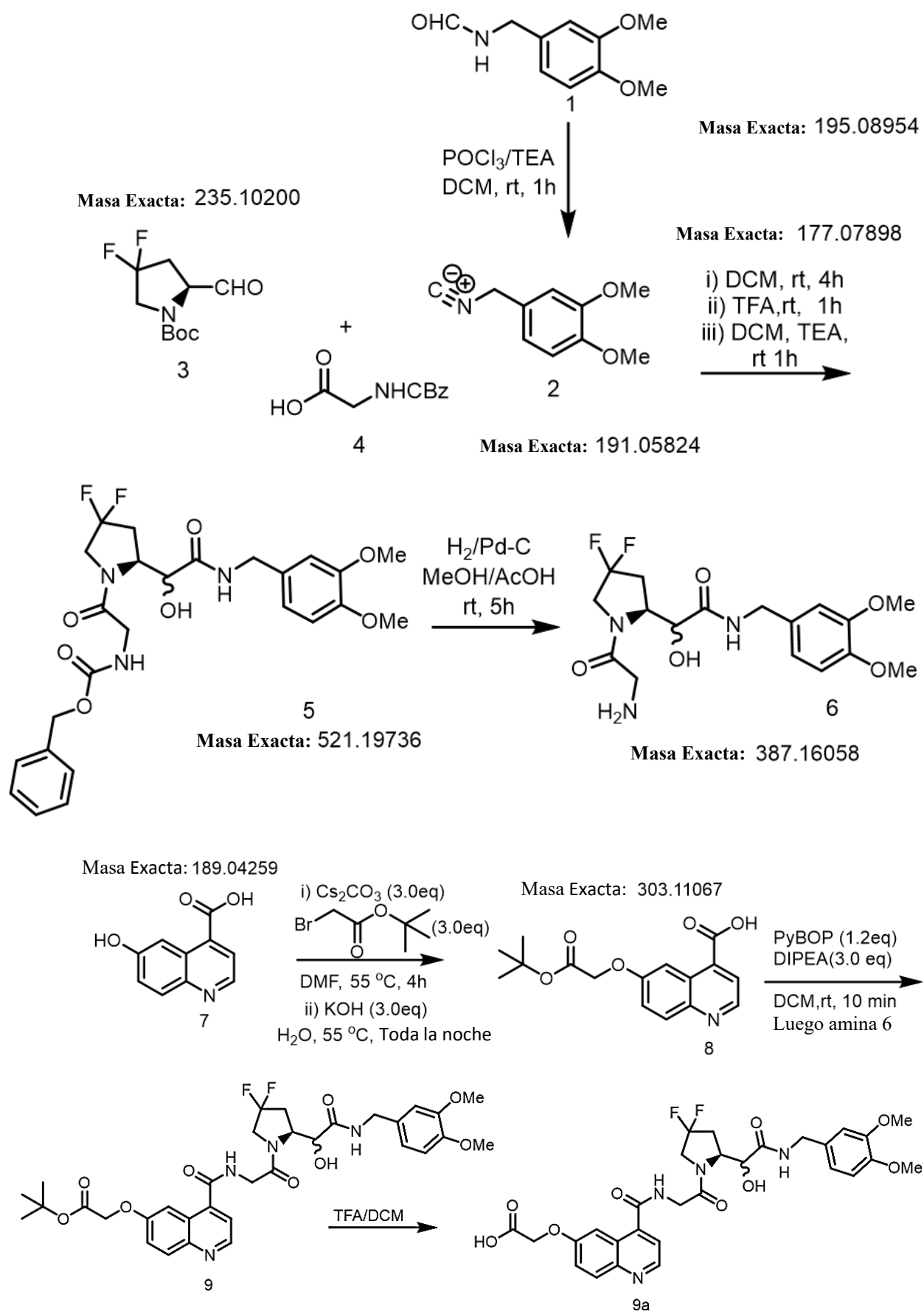
[0385] Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente divulgación. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada de ninguna manera.

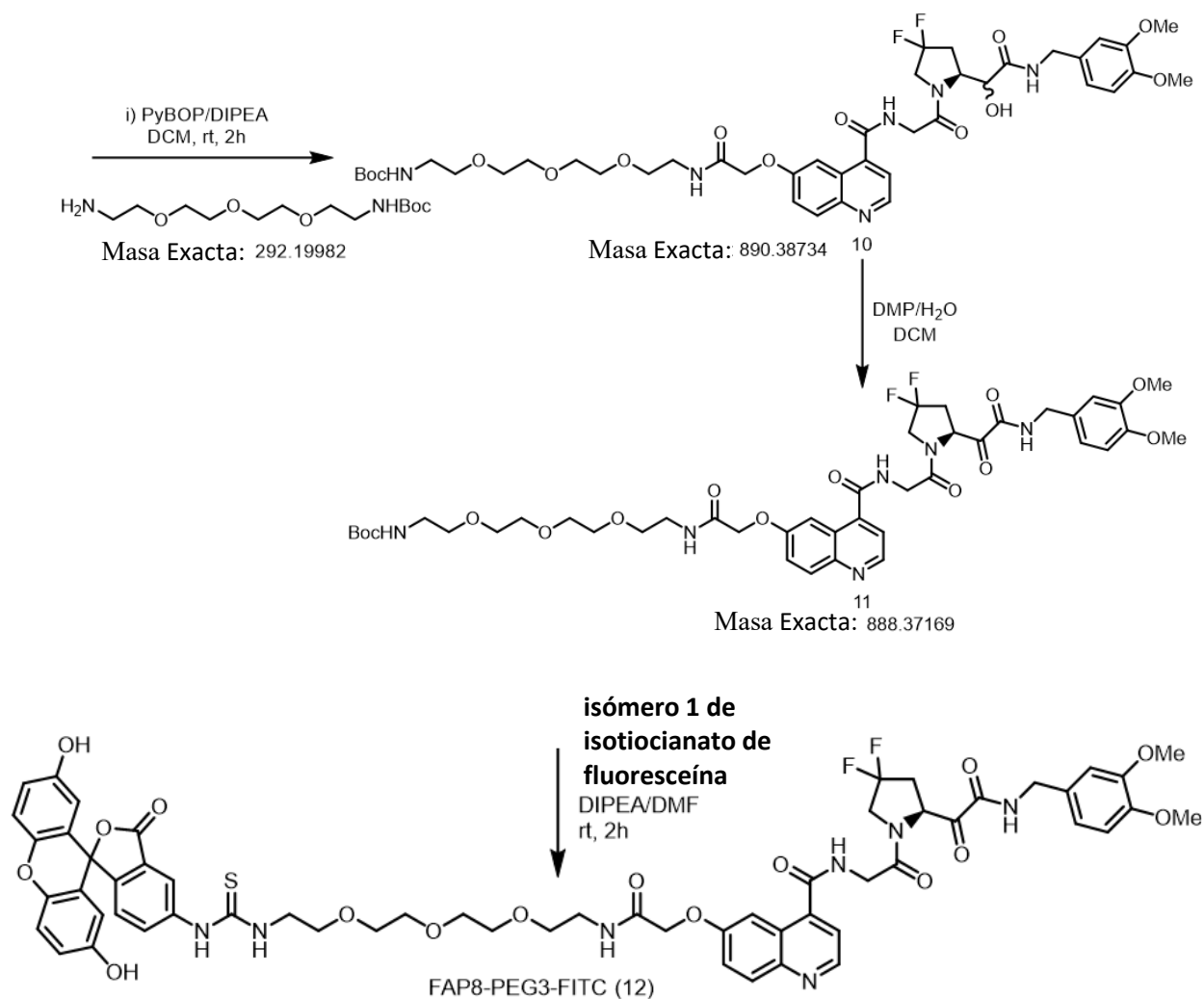
Ejemplo 1

Síntesis del conjugado FAP8-PEG3-FITC

[0386] El conjugado FAP8-PEG3-FITC puede sintetizarse de acuerdo con el Esquema 1.

Esquema 1





[0387] A una solución agitada del compuesto **1** (1.0 g, 5.1 mmol) en diclorometano (DCM) seco (3.0 mL) a 0 °C se añadió Et₃N (5.0 eq), seguido de POCl₃ (1.5 eq), y se permitió que la mezcla de reacción continuara a la misma temperatura durante 1 hora. El progreso de la reacción se monitorizó mediante cromatografía en capa fina (TLC). Tras la finalización de los materiales de partida según lo indicado en placas de TLC, la mezcla de reacción se diluyó adicionalmente con DCM, luego se absorbió en un cartucho de gel de sílice y se purificó utilizando acetato de etilo + hexanos como fase móvil para proporcionar el compuesto deseado **2** (750 mg, 81%) como un líquido amarillo claro.

[0388] Síntesis de los compuestos (5 y 6): A una mezcla de N-Boc-L-prolinal (1 eq, 200 mg, 0.851 mmol), glicina N-protégida (1 eq, 161 mg, 0.851 mmol) e isocianuro (1 eq, 162 mg, 0.851 mmol) se disolvieron en DCM anhidro (10 mL) y se agitaron durante 4 horas. Tras la conversión completa de los materiales de partida (según lo monitorizado por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS)), se añadió ácido trifluoroacético (3.0 mL) a la mezcla de reacción y se continuó la agitación a temperatura ambiente (de aquí en adelante en las figuras rt por sus siglas en inglés) durante 1 hora. Los volátiles se evaporaron a presión reducida. El residuo

aceitoso se redisolvió en DCM anhidro (10 mL) y se enfrió a 0 °C con un baño de hielo. Se añadió trietilamina (5.0 mL) gota a gota, y la agitación continuó hasta conversión completa (monitorizada por LC-MS, diferente tiempo de retención con la misma masa), lo que usualmente llevó menos de 2 horas. Los líquidos se evaporaron a presión reducida, la mezcla se redisolvió en DCM y se lavó 3 veces con agua. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo crudo obtenido se purificó utilizando combiflash con hexanos + acetato de etilo como fase móvil, proporcionando el α -hidroxi-amida 5 deseado como un sólido de color marrón. El producto se utilizó luego en el siguiente paso disolviéndolo en MeOH + AcOH (10 mL, 1:1) y se añadió Pd-C al 10% (100 mg por 1 g de material de partida), luego se agitó bajo atmósfera de hidrógeno durante 6 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celita y el filtrado se evaporó a presión reducida para obtener un residuo crudo. El residuo crudo se azeotropeó con EtOH, el cual se purificó mediante combiflash utilizando metanol (MeOH) + DCM para dar la amina **6** como un sólido de color blanco.

[0389] Síntesis del compuesto (8): Se añadió Cs₂CO₃ (2.65 g, 7.93 mmol) seguido de bromacetato de terc-butilo (7.93 mmol) a una solución del compuesto **7** (500 mg, 2.64 mmol) en DMF (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a 55 °C durante 4 horas, luego se añadieron (KOH 3 eq con respecto al producto dialquilado) + H₂O (5.0 mL) a la misma mezcla de reacción y la agitación continuó allí durante 12 horas adicionales. El progreso de la reacción se monitorizó por LC-MS y la mezcla de reacción se neutralizó cuidadosamente con HCl 1 N y se extrajo múltiples veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se evaporaron a presión reducida, y se obtuvo el residuo crudo y se purificó mediante combiflash utilizando un sistema de EtOAc + hexanos para proporcionar el compuesto deseado **8** como sólido blanco (650 mg, 81%).

[0390] Síntesis del compuesto (9): Se añadieron PyBOP (411 mg, 0.792 mmol) y DIPEA (0.22 mL, 1.32 mmol) a una solución agitada del compuesto **8** (200 mg, 0.66 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (10.0 mL) y se agitó allí durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió la amina **6** (0.66 mmol) a la mezcla de reacción y la agitación continuó allí durante 2 horas adicionales. La mezcla de reacción se diluyó con agua y luego se extrajo en DCM (2 x 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y el filtrado se evaporó a presión reducida para obtener un residuo crudo. El residuo crudo se purificó mediante combiflash utilizando EtOAc + hexanos durante 15 minutos, seguido de MeOH + DCM como fase móvil durante 25 minutos para proporcionar el compuesto **9** como un sólido blanco.

[0391] Síntesis del compuesto (10): Se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (2.0 mL) a una solución del compuesto **10** (200.0 mg, 0.297 mmol) en DCM (5 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se evaporó luego a presión reducida y se secó al

vacío, para dar un residuo crudo que se purificó mediante combiflash utilizando EtOAc + hexanos durante 15 minutos, seguido de MeOH + DCM durante 25 minutos para proporcionar el compuesto ácido **9a** como sólido blanco. El compuesto ácido **9a** (1.0 eq) se disolvió luego en DCM, seguido de la adición de PyBOP (1.2 eq) + N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) (2.0 eq). Tras 10 minutos de agitación, se añadió BocNH(PEG)3NH₂ (1.2 eq) a la mezcla de reacción y la agitación continuó allí durante 2 horas adicionales. El trabajo y la purificación siguieron el mismo procedimiento descrito anteriormente para proporcionar el compuesto **10** como un sólido blanco. Finalmente, se añadió agua (10 eq) al compuesto **10** (1.0 eq) después de que se redisolvió en DCM seguido de periodinano de Dess-Martin (DMP) (3.0 eq), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó adicionalmente con agua y se extrajo en DCM (2 x 30 mL).

[0392] Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se filtraron. El filtrado se evaporó a presión reducida para obtener un residuo crudo, que se purificó mediante combiflash utilizando MeOH + DCM como fase móvil para proporcionar el compuesto ceto deseado **11** como un sólido blanco.

[0393] **Síntesis del compuesto 12 (FAP8-PEG3-FITC):** Se añadió TFA (0.5 mL) a una solución agitada del compuesto **11** (100 mg, 0.1126 mmol) en DCM (1.0 mL). La agitación continuó allí durante 30 minutos. La mezcla de reacción se evaporó luego a presión reducida para proporcionar la amina **12** como un sólido gomoso de color marrón, y esta amina se utilizó para los pasos posteriores sin purificación.

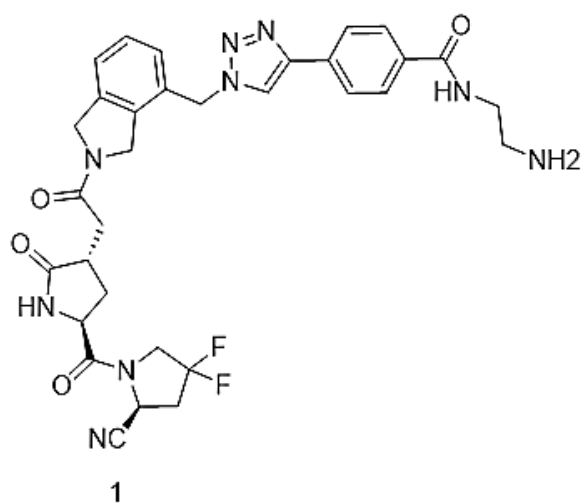
[0394] A una solución agitada de la amina **12** (20 mg, 0.0253 mmol) en DMF (500 µL), se añadieron DIPEA (0.11 mmol) seguida de isómero 1 de isotiocianato de fluoresceína (1.2 eq) y la mezcla de reacción se agitó continuamente a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (U-HPLC) utilizando (A = acetato de amonio (10 mM, pH = 7.5), B = acetonitrilo) durante 60 minutos utilizando el método 5-35 para obtener las fracciones deseadas. Estas fracciones se congelaron rápidamente utilizando nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 48 horas para proporcionar el compuesto deseado FAP8-PEG3-FITC (**13**) como un sólido amarillo.

Ejemplo 2

Síntesis del conjugado FAP5-PEG8-FITC

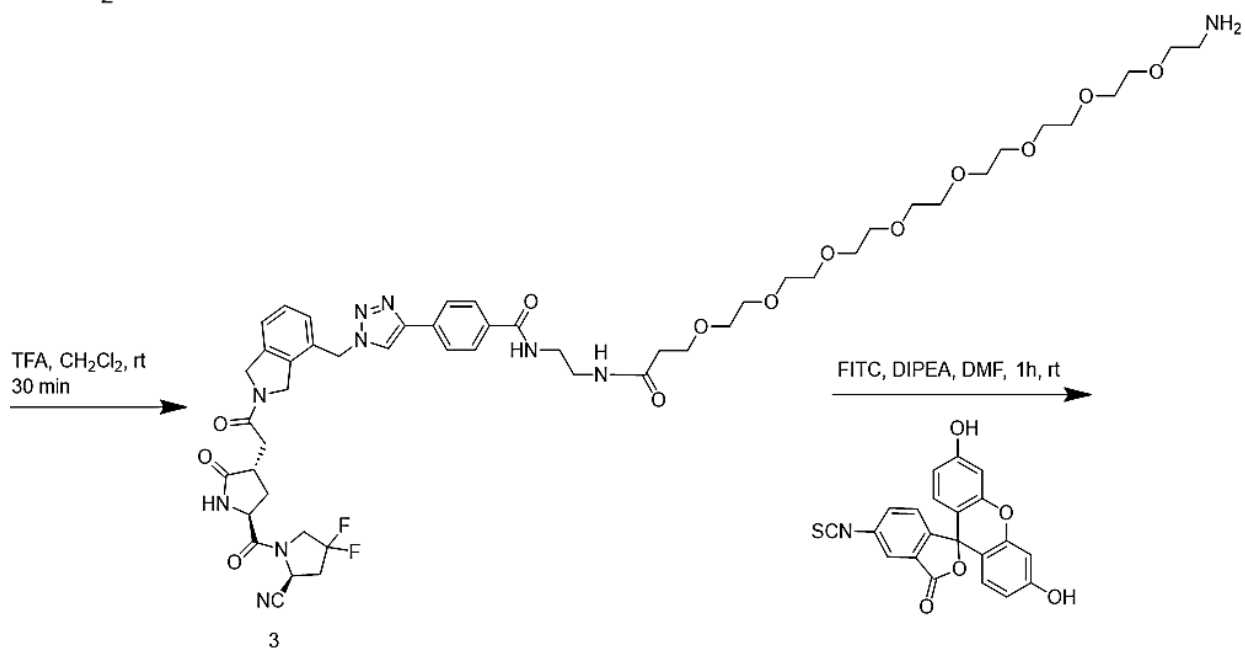
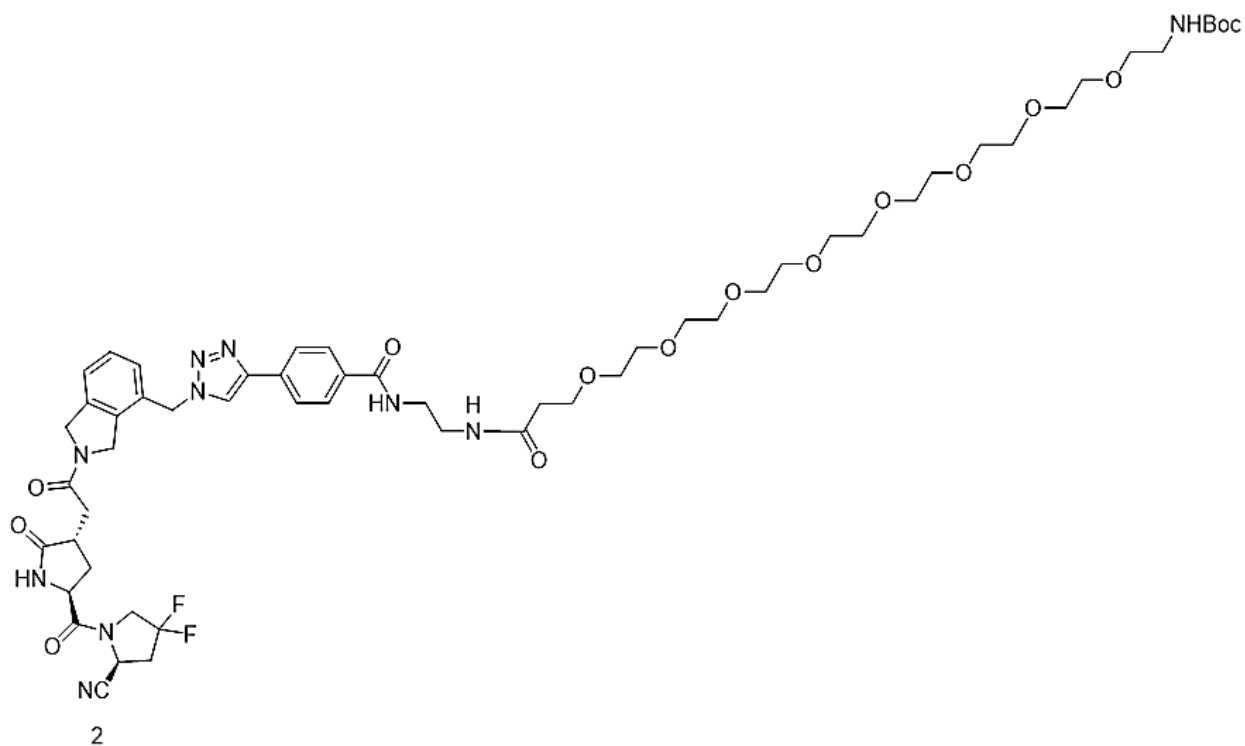
[0395] El conjugado FAP5-PEG8-FITC puede sintetizarse de acuerdo con el Esquema 2.

Esquema 2



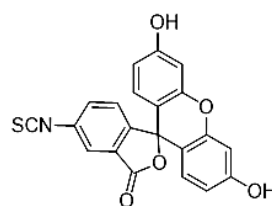
NHBoc-PEG8-NHS ester

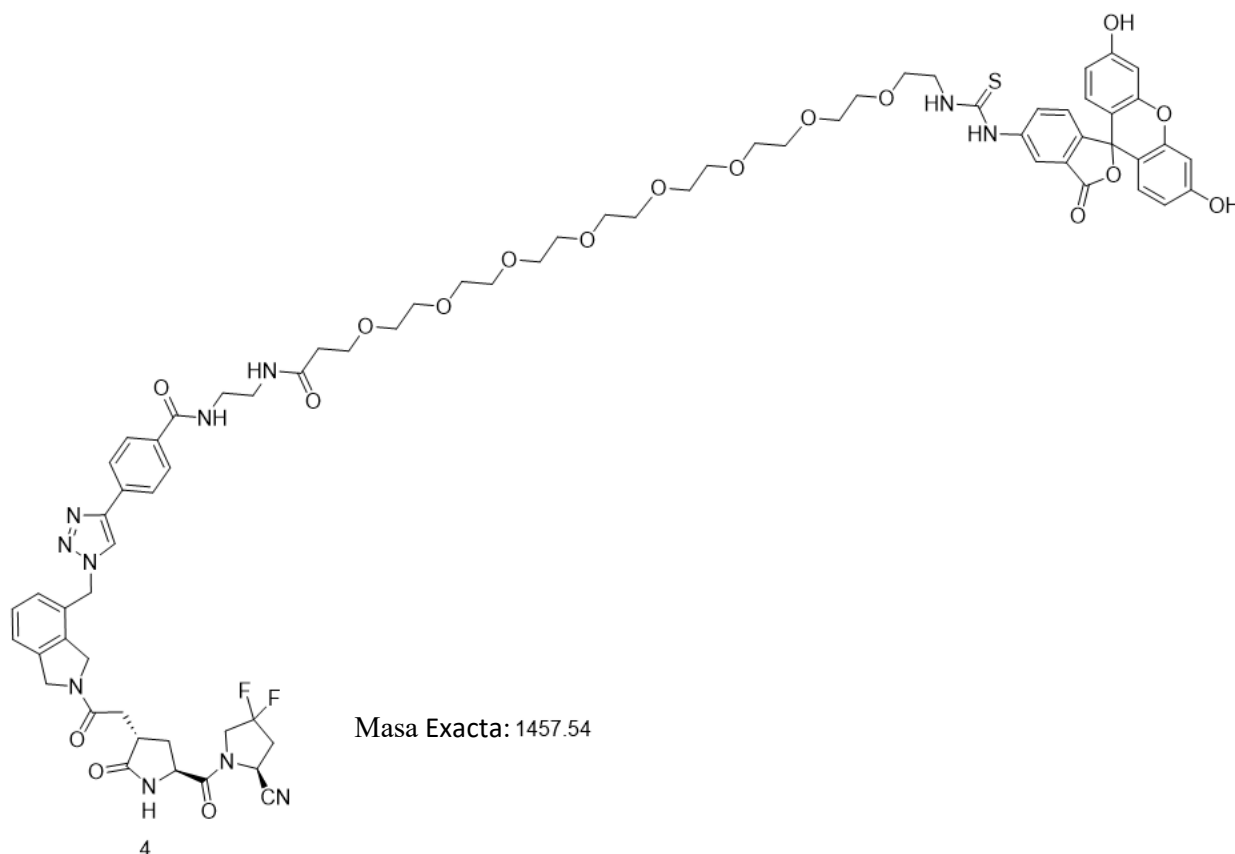
CH₂Cl₂, DIPEA, 12h, rt



TFA, CH₂Cl₂, rt
30 min

FITC, DIPEA, DMF, 1h, rt





[0396] Se añadieron isotiocianato de fluoresceína (FITC) (13.65 mg, 0.035 mmol, 0.95 eq) y DIPEA (13.0 μ L, 0.074 mmol, 2 eq) a una solución agitada del compuesto 3 (40 mg, 0.037 mmol, 1 eq) en DMF seco (1.0 mL) y la mezcla se agitó continuamente durante 1 hora a temperatura ambiente bajo N₂. Tras la finalización de la reacción (confirmada por LC-MS), se eliminó el disolvente y el crudo se cargó sobre celita, que se purificó mediante combi flash (columna: 15.5 g HP C18 Aq, caudal: 40 mL/min, longitud de onda 254 nm, eluente: A = tampón de acetato de amonio 20 mM (pH = 7), B = acetonitrilo), gradientes de disolvente 0% B a 100% en 60 minutos para proporcionar FAP5-PEG8-FITC como un sólido amarillo. LC-MS (m/z): [M+H] encontrado: 1458.4.

[0397] ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.18 (s, 1H), 8.69 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.54 – 8.51 (m, 1H), 8.24 (s, 2H), 8.05 – 8.01 (m, 2H), 7.97 – 7.74 (m, 5H), 7.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.31 (m, 2H), 7.23 – 7.11 (m, 2H), 6.60 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 6.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.66 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 5.12 – 5.05 (m, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.85 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.32 – 4.28 (m, 1H), 4.19 – 4.06 (m, 2H), 3.66 (s, 2H), 3.59 – 3.53 (m, 7H), 3.51 – 3.39 (m, 26H), 3.24 – 3.16 (m, 3H), 3.00 – 2.60 (m, 5H), 2.46 – 2.42 (m, 1H), 2.38 – 2.27 (m, 3H), 2.14 – 2.04 (m, 1H).

[0398] ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 181.96, 179.73, 178.88, 171.87, 170.87, 169.85, 169.80, 169.60, 168.99, 166.34, 152.75, 146.48, 146.43, 141.76, 138.30, 137.55, 136.78, 136.48, 135.85, 134.08, 133.56, 131.19, 130.94, 129.63, 12.10, 128.80, 128.69, 128.44, 128.34, 127.95, 127.75,

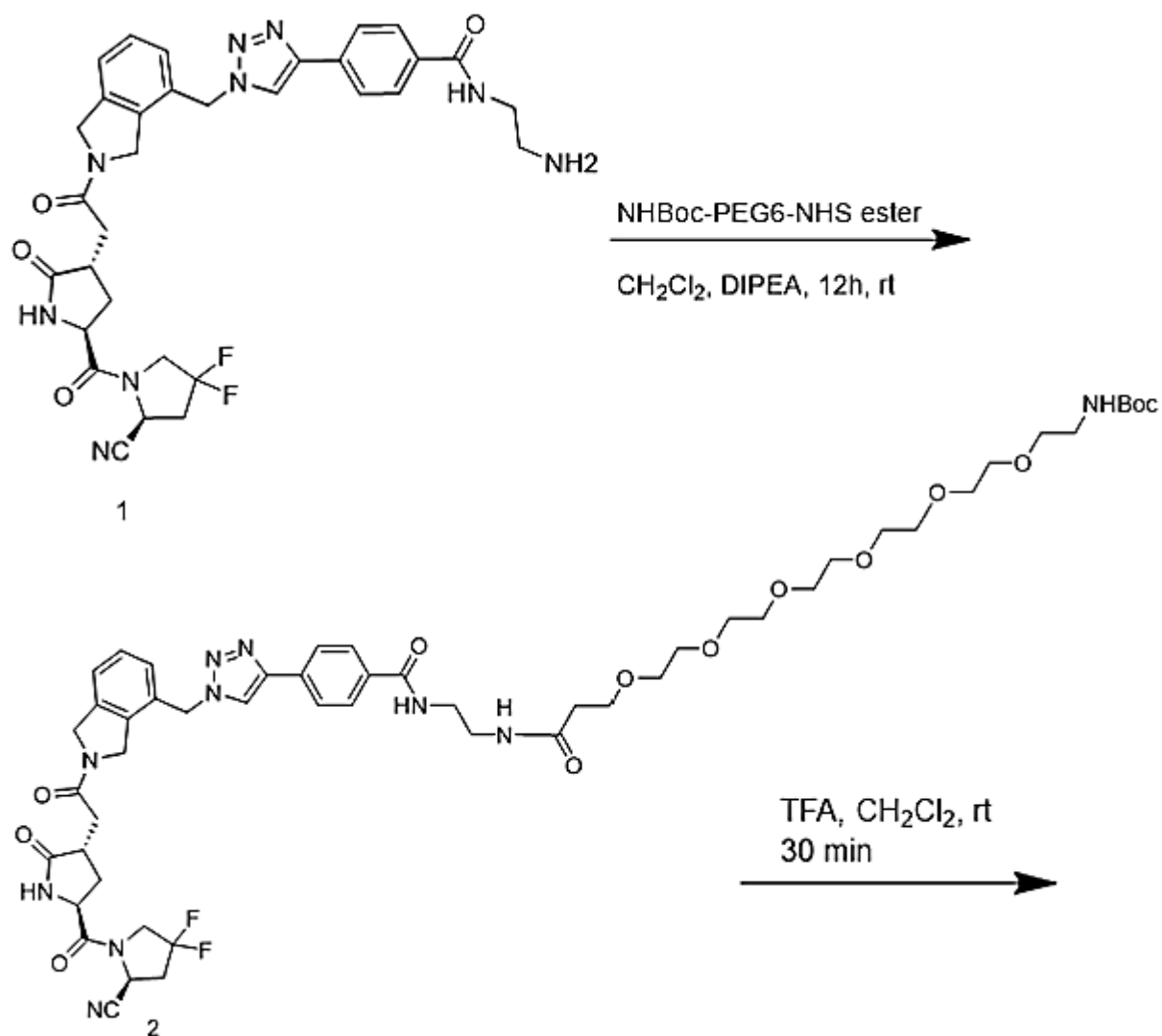
127.11, 125.31, 123.64, 123.44, 122.83, 122.86, 118.10, 110.51, 102.73, 70.22, 70.10, 69.97, 68.89, 67.23, 52.32, 51.15, 44.79, 44.14, 38.70, 36.65, 36.45, 35.47, 35.40, 31.78, 31.73.

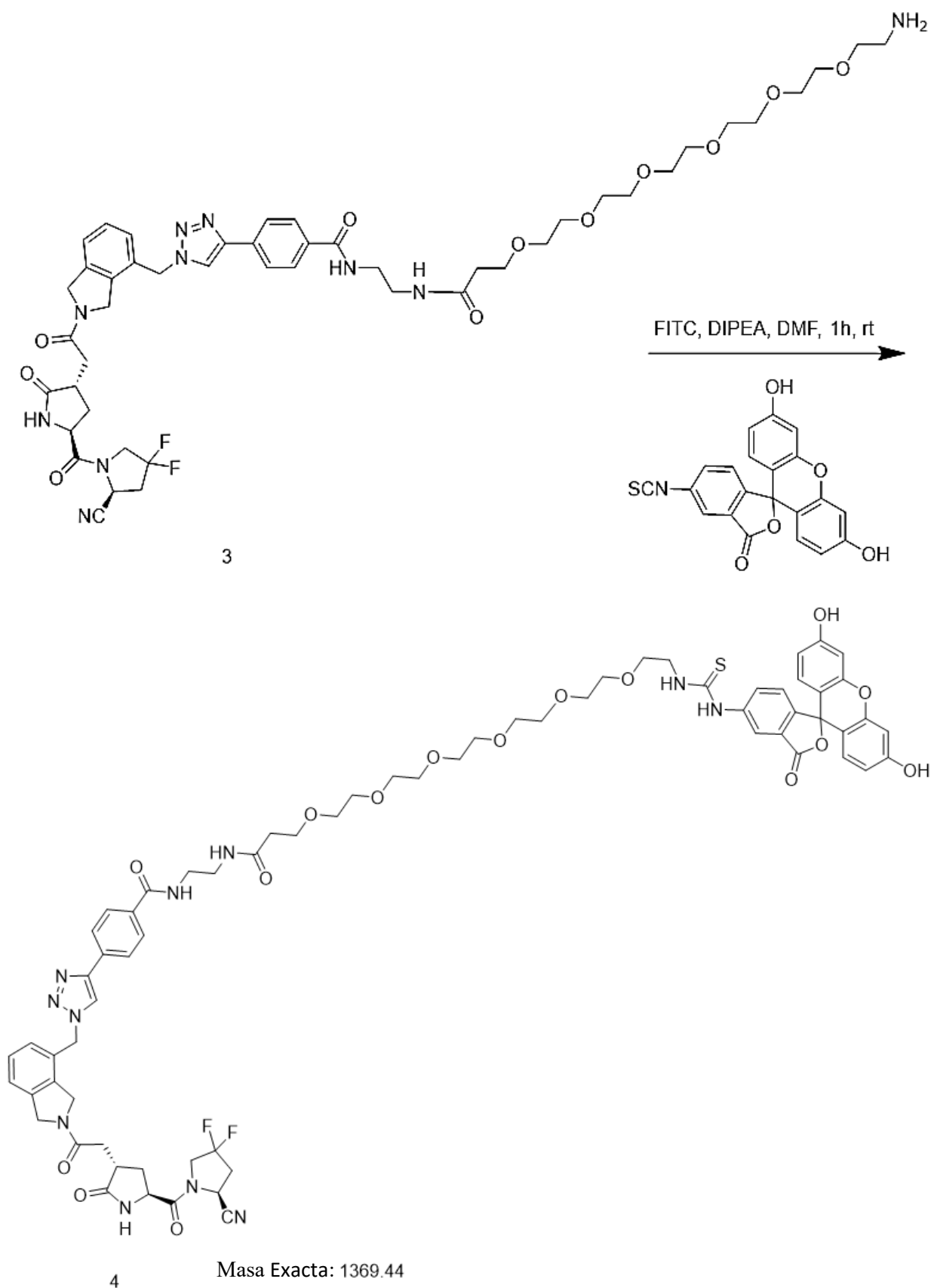
Ejemplo 3

Síntesis del conjugado FAP5-PEG6-FITC

[0399] El conjugado FAP5-PEG6-FITC puede sintetizarse de acuerdo con el Esquema 3.

Esquema 3





[0400] Se añadieron FITC (5.96 mg, 0.014 mmol, 0.95 eq) y DIPEA (5.32 μ L, 0.03 mmol, 2 eq) a una solución agitada del compuesto 3 (15 mg, 0.015 mmol, 1 eq) en DMF seco (1.0 mL) y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 1 hora bajo gas N₂. Tras la finalización de la

reacción (confirmada por LC-MS), se eliminó el disolvente y el crudo se cargó sobre celita, y se purificó mediante combi flash (columna: 15.5 g HP C18 Aq, caudal: 40 mL/min, longitud de onda: 254 nm, eluente: A = tampón de acetato de amonio 20 mM (pH = 7), B = acetonitrilo), gradientes de disolvente 0% B a 100% en 60 minutos para proporcionar FAP5-PEG6-FITC como un sólido amarillo (Compuesto 4). LC-MS (m/z): [M+H] encontrado: 1370.4.

[0401] ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.14 (s, 1H), 8.72 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.55 – 8.51 (m, 1H), 8.26 (s, 2H), 8.06 – 8.02 (m, 2H), 7.94 – 7.90 (m, 5H), 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.36 – 7.33 (m, 2H), 7.25 – 7.15 (m, 2H), 6.63 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 6.55 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.68 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 5.15 – 5.07 (m, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.88 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.34 – 4.30 (m, 1H), 4.21 – 4.08 (m, 2H), 3.68 (br-s, 2H), 3.60 – 3.54 (m, 7H), 3.50 – 3.46 (m, 18H), 3.245 – 3.19 (m, 3H), 2.89 – 2.71 (m, 5H), 2.47 – 2.41 (m, 1H), 2.37 – 2.27 (m, 3H), 2.15 – 2.07 (m, 1H).

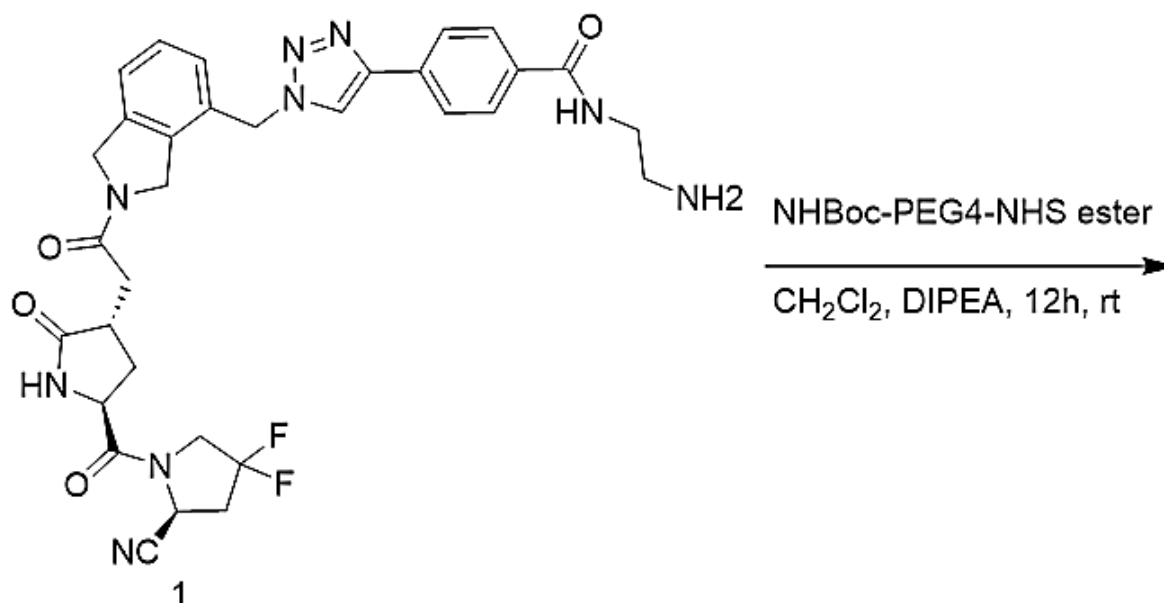
[0402] ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 180.99, 178.91, 178.85, 171.87, 170.86, 170.83, 169.85, 169.78, 168.98, 166.33, 152.72, 146.48, 146.41, 141.71, 138.30, 137.55, 136.49, 135.86, 134.08, 133.57, 133.15, 131.18, 130.93, 129.64, 128.79, 128.69, 128.58, 128.34, 128.25, 127.94, 127.75, 127.12, 125.34, 123.63, 123.43, 122.86, 122.62, 118.10, 110.48, 102.73, 70.22, 70.10, 69.96, 67.23, 52.31, 51.98, 51.42, 44.76, 44.14, 38.70, 36.84, 36.65, 36.45, 35.48, 35.31, 31.79, 31.67.

Ejemplo 4

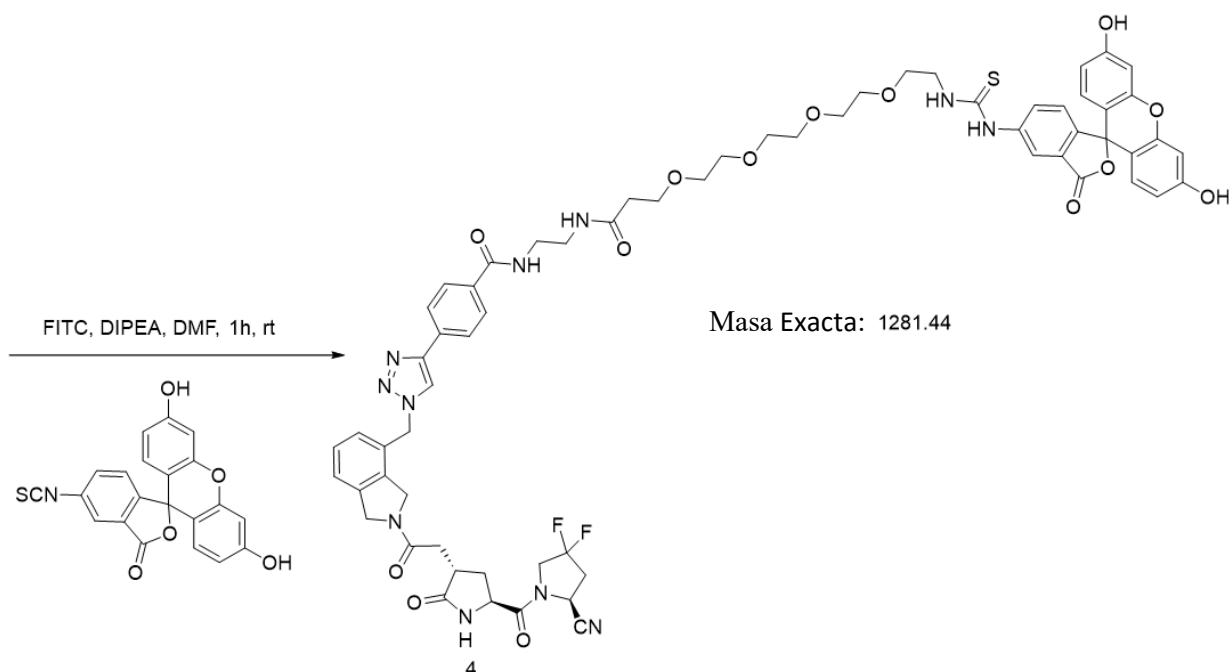
Síntesis del conjugado FAP5-PEG4-FITC

[0403] El conjugado FAP5-PEG4-FITC puede sintetizarse según el Esquema 4.

Esquema 4







[0404] Se añadieron FITC (5,96 mg, 0,018 mmol, 0,95 eq) y DIPEA (6,6 μ L, 0,038 mmol, 2 eq) a una disolución agitada del compuesto 3 (17 mg, 0,019 mmol, 1 eq) en DMF seca (1,0 mL) y se continuó la agitación durante 1 hora a temperatura ambiente bajo gas N₂. Tras la finalización de la reacción (confirmada por LC-MS), se eliminó el disolvente, el crudo se cargó sobre celita y se purificó por CombiFlash (columna: 15,5 g HP C18 Aq, caudal: 40 mL/min, longitud de onda 254 nm, eluente: A = tampón de acetato de amonio 20 mM (pH = 7), B = acetonitrilo), con gradientes de disolvente del 0 % de B al 100 % en 60 minutos para proporcionar FAP5-PEG4-FITC como sólido amarillo (Compuesto 4 arriba). LC-MS (m/z): [M+H] encontrado: 1282,4.

[0405] ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.18 (s, 1H), 8.69 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 8.54 – 8.49 (m, 1H), 8.25 (s, 2H), 8.04 – 7.98 (m, 2H), 7.93 – 7.87 (m, 5H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 7.22 – 7.13 (m, 2H), 6.62 – 6.59 (m, 4H), 6.53 (d, *J* = 8.5, 2H), 5.66 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 5.10 – 5.07 (m, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.32 – 4.29 (m, 1H), 4.20 – 4.04 (m, 2H), 3.66 (br-s, 2H), 3.59 – 3.51 (m, 8H), 3.49 – 3.42 (m, 9H), 3.23 – 3.17 (m, 3H), 2.88 – 2.70 (m, 5H), 2.46 – 2.38 (m, 1H), 2.31 – 2.24 (m, 1H), 2.11 – 2.07 (m, 1H).

[0406] ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 181.01, 178.91, 178.87, 171.88, 170.86, 169.85, 169.80, 169.01, 166.34, 152.69, 146.48, 146.43, 141.80, 138.30, 137.56, 136.49, 135.86, 134.09, 133.56, 133.11, 131.20, 130.94, 129.62, 128.80, 128.69, 128.57, 128.34, 128.21, 127.95, 127.76, 127.15, 125.32, 123.64, 123.45, 122.84, 122.61, 118.11, 110.45, 102.73, 70.22, 70.12, 69.97, 67.23, 52.32, 51.98, 51.43, 50.95, 44.76, 44.12, 38.71, 36.86, 36.65, 36.45, 35.48, 35.31, 31.67.

Ejemplo 5

El conjugado 5 FAP-FITC tiene afinidad de unión (KD) < 10 nM hacia FAP humano y FAP murino

[0407] Para evaluar la afinidad de unión, células MDA-MB-231 (aproximadamente 0,1 millones de células/pocillo) que sobreexpresan la proteína activadora de fibroblastos humana (hFAP) o la proteína activadora de fibroblastos murina (mFAP) se suspendieron en medio RPMI completo en placas de 96 pocillos. El RPMI completo se preparó suplementando RPMI 1640 (Gibco #21870076) con 10 % de suero fetal bovino (FBS; bio-technie #S11150H), 1 % de estreptomicina/penicilina (Corning #30002CI) y 1 % de L-glutamina (ATCC #302214).

[0408] Los conjugados FAP-FITC se diluyeron con tampón fosfato salino (PBS; Sigma #D8537). Sus concentraciones se confirmaron midiendo la absorbancia a 495 nm con un espectrofotómetro NanoDrop. A continuación, se añadió FAP-FITC a las células MDA-MB-231 a diferentes concentraciones finales (por triplicado).

[0409] Las células se incubaron con FAP5-FITC a temperatura ambiente durante 40 minutos, se lavaron tres veces con PBS que contenía 2 % de FBS y se sometieron a citometría de flujo para medir la intensidad media de fluorescencia en el canal FITC. El KD de diferentes conjugados FAP-FITC se calculó mediante Prism 8.

[0410] Los resultados se muestran en la **FIG. 1**. Como se muestra en la **FIG. 1**, FAP5-FITC se une a hFAP y mFAP con un KD < 10 nM.

Ejemplo 6

6 FAP-FITC se retuvo en la superficie celular durante aproximadamente 24 horas

[0411] Se sembraron células MDA-MB231-hFAP (aproximadamente 0,1 millones de células/pocillo) en RPMI completo en cámaras confocales (Thermo Scientific #155382) durante la noche. Se añadió FAP5-PEG4-FITC (25 nM) a las células y la mezcla se incubó durante una hora en el incubador celular a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía 2 % de FBS para eliminar el FAP5-PEG4-FITC libre y se continuó la incubación en RPMI completo durante 0 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 24 horas o 48 horas. A continuación, se examinaron las células en los distintos puntos temporales mediante microscopía confocal.

[0412] FAP5-FITC se retuvo en las superficies celulares durante aproximadamente 24 horas.

Ejemplo 7

Optimización de la longitud del polietilenglicol para conjugados FAP5-FITC

[0413] Se examinó la estructura proteica de hFAP (PDB 1z68) utilizando Pymol. Se modeló molecularmente FAP5-PEG4-FITC con proteínas hFAP para examinar la profundidad del bolsillo

de unión de FAP en relación con FAP5-PEG4-FITC. El modelado molecular indicó un bolsillo de unión profundo en hFAP, que normalmente requiere una longitud de PEG larga para una mejor exposición del FITC.

[0414] Células MDA-MB-231 (aproximadamente 100 000 células/pocillo) que sobreexpresan hFAP se suspendieron en medio RPMI completo en placas de 96 pocillos. Las células se incubaron con 100 nM de FAP5-PEG4-FITC, FAP5-PEG6-FITC, FAP5-PEG8-FITC, FAP5-PEG12-FITC o FAP5-PEG16-FITC a temperatura ambiente durante 40 minutos. Las células se lavaron dos veces y se incubaron con anticuerpo anti-FITC (APC) a 4 °C durante 30 minutos (para exposición de FITC) antes de la citometría de flujo o se sometieron inmediatamente a citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 2A y 2B**. La **FIG. 2A** muestra que aumentar la longitud del enlazador de PEG para FAP5-FITC permitió una mejor exposición de FITC, mientras que la **FIG. 2B** muestra que aumentar la longitud del enlazador de PEG para FAP5-FITC no cambió el Bmax de los adaptadores biespecíficos.

[0415] También se examinó el efecto de la longitud del enlazador de PEG sobre la afinidad de unión. Células MDA-MB-231 (aproximadamente 100 000 células/pocillo) que sobreexpresan hFAP o mFAP se suspendieron en medio RPMI completo en placas de 96 pocillos. Las concentraciones de FAP5-PEG6-FITC, FAP5-PEG8-FITC, FAP5-PEG12-FITC o FAP5-PEG16-FITC se confirmaron midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro NanoDrop. Los adaptadores biespecíficos se añadieron por separado a las células MDA-MB-231 a diferentes concentraciones finales (por triplicado). Las células se incubaron con los adaptadores a temperatura ambiente durante 40 minutos, se lavaron tres veces con PBS + 2 % de FBS, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se sometieron a citometría de flujo para la medición de la intensidad media de fluorescencia. Los resultados se muestran en la **FIG. 3**. La **FIG. 3** muestra que FAP5-FITC con diferentes longitudes de enlazador de PEG no cambió el KD del compuesto frente a hFAP.

[0416] También se examinó la eficacia de muerte mediada por FAP5-FITC con diferentes longitudes de enlazador de PEG. Se sembraron células MDA-MB-231 (aproximadamente 7,000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos durante la noche. En el día 18, se añadieron células CAR-T 4M5.3 a las células diana a una relación efector:objetivo de 1:4. FAP5-PEG8-FITC, FAP5-PEG12-FITC o FAP5-PEG16-FITC se co-incubaron con las células durante 24 horas o se aspiraron y lavaron con PBS tras una hora de incubación (0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM o 1 000 nM, todos por triplicado) a temperatura ambiente. Las células vivas se determinaron por células positivas a mCherry. El porcentaje de muerte se determinó mediante $(1 - (\text{células vivas})/(\text{células vivas en el pocillo solo con células tumorales})) * 100 \%$. Los resultados se muestran en las **FIGS. 4A y 4B**.

[0417] Como se muestra en la **FIG. 4A**, un FAP5-FITC con un enlazador más largo (por ejemplo, PEG16) fue más eficaz en la eliminación de células tumorales. Como se muestra en la **FIG. 4B**, un FAP5-FITC con un enlazador más largo (por ejemplo, PEG16) fue más eficaz en la activación de células CAR-T.

Ejemplo 8

FAP8-FITC es mejor que FAP5-FITC con una longitud de PEG similar debido a una mejor estabilidad en suero

[0418] Se inyectaron subcutáneamente células MDA-MB-231-hFAP en ratones NSG y se les permitió crecer hasta 150 mm³. En ese momento, se inyectaron por vía intravenosa células CAR-T E2 (8 millones) y se inyectaron FAP8-PEG8-FITC, FAP8-PEG12-FITC, FAP8-PEG15-FITC o FAP5-PEG16-FITC tres veces por semana a 500 nmol/kg. Se utilizaron los seis grupos de ratones siguientes:

- Grupo 1 (n=6): grupo control de enfermedad (solo células tumorales),
- Grupo 2 (n=6): grupo solo células CAR-T E2 (PBS tres veces/semana),
- Grupo 3 (n=6): grupo FAP8-PEG8-FITC,
- Grupo 4 (n=7): grupo FAP8-PEG12-FITC,
- Grupo 5 (n=7): grupo FAP8-PEG15-FITC, y
- Grupo 6 (n=6): grupo FAP5-PEG16-FITC.

[0419] Como se muestra en las **FIGS. 5A-5E**, FAP5-PEG16-FITC y FAP8-PEG15-FITC funcionan de manera similar in vitro; FAP8-PEG15-FITC tiene una mejor estabilidad en suero y media una mejor interacción con células CAR-T in vivo. Como se muestra en la **FIG. 5F**, más células CAR-T infiltraron tumores cuando se trataron con FAP8-PEG15-FITC que con FAP5-PEG16-FITC. Los tumores se extrajeron de los ratones en el punto final y se digirieron con un kit de disociación de tumores humanos (Miltenyi) con 50 % de enzima R para mejorar la recuperación de linfocitos. A continuación, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos, seguidas de dos lavados, tinción con anticuerpo anti-hCD3 en hielo durante 30 minutos, tres lavados y citometría de flujo.

Ejemplo 9

FAP8-FITC con longitud óptima de enlazador de PEG

[0420] Células MDA-MB-231 (aproximadamente 100 000 células/pocillo) que sobreexpresan hFAP o mFAP se suspendieron en medio RPMI completo en placas de 96 pocillos. Los

adaptadores FAP8-FITC con longitudes crecientes de enlazador de PEG se diluyeron con PBS. Sus concentraciones se confirmaron midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro NanoDrop. A continuación, los adaptadores biespecíficos FAP-FITC con diferentes longitudes de enlazador de PEG se añadieron por separado a las células MDA-MB-231 a diferentes concentraciones finales (por triplicado). Las células se incubaron con los adaptadores a temperatura ambiente durante 40 minutos, se lavaron tres veces con PBS y 2 % de FBS, se centrifugaron a 300 g durante cinco minutos y se sometieron a citometría de flujo para MFI. Los resultados se muestran en las **FIGS. 6A-6C**. Como se muestra en las **FIGS. 6A-6C**, FAP8-FITC se une a células FAP+ con alta especificidad. Se observó una disminución en Kd con el incremento de la longitud del enlazador.

[0421] Se suspendieron células MDA-MB231-FAP en tubos Eppendorf de 1,5 mL (aproximadamente 0,1 millones de células/tubo). Las células se incubaron con 100 nM de FAP8-PEG8-FITC, FAP8-PEG12-FITC o FAP8-PEG15-FITC a temperatura ambiente durante 40 minutos. Luego, las células se lavaron dos veces, se incubaron con anticuerpo anti-FITC (APC) a 4 °C durante 30 minutos (para exposición de FITC) y seguidamente se sometieron a citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 7A-7B**. Como se muestra en las **FIGS. 7A-7B**, aumentar la longitud del enlazador de PEG permitió una mejor exposición, mostrando FAP8-PEG15-FITC la mejor exposición de FITC. Como se muestra en las **FIGS. 7C-7D**, aumentar la longitud del enlazador de PEG permite una mejor interacción con células CAR-T, mejorando así la eliminación tumoral.

[0422] Se sembraron células MDA-MB-231-FAP-mCh en 96 pocillos durante la noche (aproximadamente 5,000 células/pocillo). FAP8-PEG3-FITC, FAP8-PEG8-FITC, FAP8-PEG12-FITC y FAP8-PEG15-FITC se añadieron por separado a las células diana a diferentes concentraciones (0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM o 1 000 nM, todos por triplicado). FAP5-PEG8-FITC se co-incubó con las células o se aspiró y se lavó con RPMI completo tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente. En el día 19, se añadieron células CAR-T 4M5.3 a las células diana a una relación efector:objetivo de 1:3 y luego se co-incubaron durante 68 horas. Se tomaron imágenes con Incucyte cada dos horas para medir el área total positiva a mCherry+. Los resultados se muestran en las **FIGS. 8A-8F**. Como se muestra en las **FIGS. 8A-8F**, aumentar la longitud del enlazador de PEG en FAP8-FITC incrementó la eficacia de muerte, mostrando FAP8-PEG15-FITC la mejor eficacia de muerte y activación de células CAR-T in vitro.

Ejemplo 10

FAP8-PEG15-FITC es comparable a FAP5-PEG16-FITC en eficacia de muerte pero proporciona una exposición de FITC significativamente mejor in vitro

[0423] Células MDA-MB-231 que sobreexpresan hFAP o mFAP se suspendieron en placas de 96 pocillos con RPMI completo (aproximadamente 100 000 células/pocillo). Las concentraciones de FAP8-PEG15-FITC y FAP5-PEG16-FITC se confirmaron midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro NanoDrop. Los adaptadores se añadieron a las células MDA-MB-231 a diferentes concentraciones finales (por triplicado). Las células se incubaron con los compuestos a temperatura ambiente durante 40 minutos, se lavaron tres veces con PBS y 2 % de FBS, se centrifugaron a 300 g durante cinco minutos y se sometieron a citometría de flujo para la medición de MFI. Los resultados se muestran en las **FIGS. 9A y 9B**. Como se muestra en las **FIGS. 9A y 9B**, la afinidad de unión de FAP8-PEG15-FITC es comparable, pero no tan buena, como la afinidad de unión de FAP5-PEG16-FITC en células MDA-MB-231 que sobreexpresan hFAP y mFAP.

[0424] Células MDA-MB-231 que sobreexpresan FAP se suspendieron en tubos Eppendorf de 1,5 mL (aproximadamente 0,1 millones de células/tubo). Las células se incubaron con 100 nM de FAP5-PEG16-FITC o FAP8-PEG15-FITC a temperatura ambiente durante 40 minutos. Las células se lavaron dos veces, se incubaron con anticuerpo anti-FITC (APC) a 4 °C durante 30 minutos y se sometieron a citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 10A y 10B**. Como se muestra en las **FIGS. 10A y 10B**, FAP8-PEG15-FITC media más exposición de FITC que FAP5-PEG16-FITC.

[0425] Células MDA-MB-231 que sobreexpresan FAP se suspendieron en tubos Eppendorf de 1,5 mL (aproximadamente 0,2 millones de células/tubo). Las células se incubaron con 100 nM de FAP8-PEG8-FITC, FAP8-PEG12-FITC, FAP8-PEG15-FITC o FAP5-PEG16-FITC a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, las células se lavaron dos veces, se incubaron a 37 °C durante cero minutos o una hora, luego se incubaron con anticuerpo anti-FITC (APC) a 4 °C durante 30 minutos y se sometieron a citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **FIG. 11**. Como se muestra en la **FIG. 11**, el adaptador FAP8-PEG15-FITC presentó menos disociación (es decir, internalización) de la proteína FAP en comparación con FAP5-PEG16-FITC, lo que resultó en una mejor exposición de FITC.

[0426] Se sembraron células MDA-MB-23a-FAP-mCh en placas de 96 pocillos (aproximadamente 5,000 células/pocillo) durante la noche. Se añadieron adaptadores FAP8-PEG15-FITC y FAP5-PEG16-FITC a las células diana a diferentes concentraciones (0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM o 1 000 nM, todos por triplicado). FAP5-PEG16-FITC y FAP8-PEG15-FITC se co-incubaron con las células o se aspiraron y se lavaron con RPMI completo tras una hora de incubación a temperatura ambiente. Se añadieron células CAR-T 4M5.3 en D19 a las

células diana a una relación E:T de 1:3 y luego se co-incubaron durante 68 horas. Se tomaron imágenes con Incucyte cada dos horas para medir el área total positiva a mCherry+. Los resultados se muestran en las **FIGS. 12A-12B**. Como se muestra en las **FIGS. 12A-12B**, FAP8-PEG15-FITC fue similar a FAP5-PEG16-FITC en eficacia in vitro en condiciones de co-cultivo con adaptador y en condiciones con adaptador lavado.

Ejemplo 11

Proliferación y activación de células CAR-T en sangre

[0427] Se extrajeron muestras de sangre de los corazones de ratones en el punto final del tratamiento. Parte de la sangre se incubó con tampón de lisis de eritrocitos durante 30 minutos en hielo y se lavó tres veces. El resto de la sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos para recoger el suero para análisis ELISA de IFN γ humano. Posteriormente, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces, se tiñeron para anti-hCD3 en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 13A-13B**. Como se muestra en las **FIGS. 13A-13B**, los adaptadores FAP8-FITC con enlazadores de PEG más largos dan lugar a una mejor proliferación y activación de células CAR-T.

Ejemplo 12

El tratamiento con FAP8-PEG15-FITC no causó toxicidad en ratones

[0428] Ratones control de enfermedad se inyectaron con 500 nmol/kg de FAP8-PEG15-FITC o tampón fosfato salino 24 horas antes de la obtención de imágenes utilizando el Sistema de Imagen Óptica Spectral Ami. Se diseccionaron tumores y todos los órganos principales para la obtención de imágenes de la señal FITC.

[0429] Se midieron los pesos corporales de los ratones dos veces por semana y se compararon con el peso corporal inicial antes de cualquier tratamiento o implantación tumoral. Los datos indican que FAP8-PEG15-FITC se localiza específicamente en los sitios tumorales y no se une a células en órganos principales. Como se muestra en la **FIG. 14**, el análisis del peso corporal indica que el tratamiento con FAP8-PEG15-FITC no produjo toxicidad en ratones.

Ejemplo 13

Bmax y exposición de FITC del adaptador FAP8-FITC con longitudes de enlazador PEG8-PEG23

[0430] Se suspendieron células MDA-MB231-FAP en tubos Eppendorf de 1,5 mL (aproximadamente 0,1 millones de células/tubo). Las células se incubaron con 100 nM de adaptadores FAP8-FITC con longitudes de enlazador PEG8-PEG23 (n = 3) a temperatura

ambiente durante 1 hora. A continuación, las células se lavaron dos veces y se incubaron con anticuerpo anti-FITC (APC) a 4 °C durante 30 minutos (para exposición de FITC) o se sometieron a citometría de flujo (para Bmax).

[0431] Los resultados se muestran en las **FIGS. 15A-15B**. Como se muestra en la **FIG. 15A**, la exposición de FITC desde el bolsillo de unión de FAP aumentó con el incremento de la longitud del enlazador de PEG. Como se muestra en la **FIG. 15B**, Bmax disminuyó gradualmente con el aumento de la longitud del enlazador de PEG.

Ejemplo 14

Comparación de FAP8-FITC con longitudes de enlazador PEG8-PEG23 en un ensayo de muerte por co-cultivo in vitro con 4M5.3 CAR-T

[0432] Se sembraron células MDA-MB231-FAP-mCh (aproximadamente 7,000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos durante la noche. Se añadió FAP8-FITC con longitudes de enlazador PEG8-PEG23 a las células diana a diferentes concentraciones (0 nM a 1 000 nM; n = 3). Los adaptadores se co-incubaron con las células o se aspiraron y se reemplazaron por RPMI completo tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente. Se añadieron células CAR-T 4M5.3 a las células diana a una relación E:T de 1:3 alrededor del día 20 y luego se permitió co-incubar durante 48 horas. Las células vivas se midieron mediante células positivas a mCherry por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 16A-16B**.

[0433] Como se muestra en las **FIGS. 16A-16B**, se observó una mejor eliminación y activación de células T con 4M5.3 CAR-T y FAP8-PEG23-FITC. Se observaron los mismos resultados con la condición de adaptador lavado en el ensayo de muerte in vitro como se muestra en las **FIGS. 17A-17B**.

Ejemplo 15

Comparación de FAP8-FITC con longitudes de enlazador PEG8-PEG23 en un ensayo de muerte por co-cultivo in vitro con E2 CAR-T

[0434] Se sembraron células MDA-hFAP o Hs894 CAFs en placas de 96 pocillos durante la noche. Se añadió FAP8-FITC con longitudes de enlazador PEG8-PEG23 a las células diana a diferentes concentraciones (0 nM a 1 000 nM; n=3). Se añadió E2 CAR-T a las células diana a una relación E:T de 1:3 para MDA-hFAP y de 2:1 para CAFs y luego se permitió co-incubar durante 48 horas. Las células vivas se midieron mediante células positivas a CellTrace por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 18A-18B**.

[0435] Como se muestra en las **FIGS. 18A-18B**, la eficacia de muerte in vitro aumentó con el aumento de la longitud del enlazador de PEG, aunque con diferencias menores.

Example 16

El efecto de FAP8-FITC con longitudes de enlazador PEG8-PEG23 en combinación con EC17 sobre el tumor KB in vivo

[0436] El tumor KB es FAP- y FR+, y los CAFs son FAP+. Se implantaron tumores KB en ratones NSG y se permitió que los tumores crecieran hasta aproximadamente 50 mm³. Los grupos de ratones fueron los siguientes:

Grupo 1 (n=5) (solo adaptador FAP-FITC): solo FAP8-FITC (sin CAR-T)

Grupo 2 (n=6) (solo CAR-T): E2 CAR-T y PBS

Grupo 3 (n=6) (solo FAP-FITC): E2 CAR-T y FAP-FITC

Grupo 4 (n=6) (solo EC17): E2 CAR-T y EC17

Grupos 5, 6, 7 y 8 (n=6) (FAP-FITC y EC17): E2 CAR-T, FAP8-PEG8-23-FITC y EC17.

[0437] Se inyectaron por vía intravenosa 10×10⁶ células CAR-T E2 (VPN404) con FAP8-FITC y/o EC17. Los tumores se extrajeron cuando el tumor control de enfermedad alcanzó 1 500 mm³ o cuando los tumores se eliminaron en los grupos de tratamiento. Los resultados se muestran en las **FIGS. 19A-19F**.

[0438] Como se muestra en las **FIGS. 19A-19F**, FAP8-FITC con un enlazador PEG18 medió una mejor regresión en tumores KB.

Ejemplo 17

FAP8-PEG15-FITC y FAP8-PEG18-FITC mostraron una liberación de citocinas y un recuento de CAR-T similares en el punto medio del estudio

[0439] Se extrajo sangre de las venas de la cola de los ratones en el punto medio del estudio. Parte de la sangre se incubó con tampón de lisis de eritrocitos (RBC) durante 30 minutos en hielo y se lavó tres veces. El resto de la sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos para recoger el suero para análisis ELISA de IFN γ humano. Posteriormente, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces, se tiñeron para anti-hCD3 en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 20A-20B**.

[0440] Como se muestra en las **FIGS. 20A-20B**, se obtuvieron una liberación de citocinas y un recuento de células CAR-T similares en el punto medio del estudio con FAP8-PEG15-FITC y FAP8-PEG18-FITC.

Ejemplo 18

AP8-PEG18-FITC mostró una liberación de citocinas y un recuento de CAR-T ligeramente mejores que FAP8-PEG15-FITC en el punto final del estudio

[0441] Se extrajo sangre de las venas de la cola de los ratones en el punto final del estudio. Parte de la sangre se incubó con tampón de lisis de RBC durante 30 minutos en hielo y se lavó tres veces. El resto de la sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos para recoger el suero para análisis ELISA de IFN γ humano. Posteriormente, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces, se tiñeron para anti-hCD3 en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 21A-21B**.

[0442] Como se muestra en las **FIGS. 21A-21B**, FAP8-PEG18-FITC mostró una liberación de citocinas y un recuento de CAR-T ligeramente mejores que FAP8-PEG15-FITC en el punto final del estudio..

Ejemplo 19

La terapia combinada produce una mejor proliferación y activación de CAR-T en el punto medio del estudio

[0443] Se extrajo sangre de las venas de la cola de los ratones en el punto medio del estudio. Parte de la sangre se incubó con tampón de lisis de RBC durante 30 minutos en hielo y se lavó tres veces. El resto de la sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos para recoger el suero para análisis ELISA de IFN γ humano. Posteriormente, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces, se tiñeron para anti-hCD3 en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 22A-22B**.

[0444] Como se muestra en las **FIGS. 22A-22B**, FAP8-PEG15-FITC y FAP8-PEG18-FITC mostraron una liberación de citocinas y un recuento de CAR-T similares en el punto medio del estudio.

Ejemplo 20

La terapia combinada produce una mejor proliferación y activación de CAR-T en el punto final del estudio

[0445] Se extrajo sangre de las venas de la cola de los ratones en el punto final del estudio. Parte de la sangre se incubó con tampón de lisis de RBC durante 30 minutos en hielo y se lavó tres veces. El resto de la sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos para recoger el suero para análisis ELISA de IFN γ humano. Posteriormente, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces, se tiñeron para anti-hCD3 en

hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 23A-23B**.

[0446] Como se muestra en las **FIGS. 23A-23B**, FAP8-PEG18-FITC con EC17 mostró una mejor liberación de citocinas y un mayor recuento de CAR-T que EC17 sin FAP8-PEG18-FITC en el punto final del estudio.

Ejemplo 21

La terapia combinada produce una mejor infiltración de CAR-T en el tumor KB en el punto final del estudio

[0447] Los tumores se extrajeron de los ratones en el punto final y se digirieron con un kit de disociación de tumores humanos (Miltenyi) con 50 % de enzima R para mejorar la recuperación de linfocitos. Posteriormente, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces, se tiñeron con anticuerpo anti-E2 CAR en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **FIG. 24**.

[0448] Como se muestra en la **FIG. 24**, se observó una mayor infiltración de células CAR-T con la terapia combinada de FAP8-FITC y EC17.

[0449] Cuando se inyectó FAP8-FITC (500 nmol/kg) 24 horas antes de la obtención de imágenes en ratones control de enfermedad (tumor KB), FAP8-PEG23-FITC mostró una retención más débil que FAP8-PEG15-FITC y FAP8-PEG18-FITC.

Ejemplo 22

inmunohistoquímica del tumor KB y del tumor MDA-MB231

[0450] Para caracterizar y comparar los CAFs FAP+ infiltrantes en tumores KB “fríos” e inmunológicamente en tumores MDA-MB-231 “calientes”, se implantaron tumores KB o tumores MDA-MB-231 en ratones NOD scid gamma (NSG) y se trataron los ratones con el CAR-T anti-FITC universal y EC17 (folato-fluoresceína). Ambos tumores se extrajeron de los ratones, se fijaron con formalina al 10 % durante la noche y se enjuagaron con etanol al 70 % para la fijación tumoral. Luego, las células tumorales se enviaron para tinción IHQ con anticuerpo anti-CD3 humano para detectar células CAR-T humanas o con anticuerpo anti-FAP de ratón para detectar CAFs FAP+ de ratón.

[0451] Los resultados de la tinción inmunohistoquímica (IHQ) demostraron una falta de infiltración de células CAR-T en el tumor KB inmunológicamente “frío”, pero no en el tumor MDA-MB-231 “caliente”. Se encontró una infiltración elevada de CAFs FAP+ en el tumor KB “frío”, formando una barrera física alrededor del tumor, pero los CAFs infiltrantes fueron

significativamente menores en el tumor MDA-MB-231 “caliente”. Se planteó la hipótesis de que estos fibroblastos infiltrantes son una de las razones de un tumor sólido inmunológicamente “frío”.

Ejemplo 23

Microscopía confocal de la unión específica de FAP8-FITC

[0452] Para confirmar la especificidad del adaptador FAP8-FITC en células que expresan FAP, se sembraron MDA-MB231-hFAP (FAP humano), MDA-MB231-mFAP (FAP murino) y células parentales MDA-MB231 (sin expresión de FAP) en cámaras confocales durante la noche (aproximadamente 0,1 millones de células/pocillo). Se añadió FAP8-PEG18-FITC (50 nM) a las células y la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS + 2 % de FBS y se examinaron inmediatamente mediante microscopía confocal. FAP8-FITC se unió específicamente a hFAP y mFAP.

Ejemplo 24

Estudio in vivo para determinar el enlazador óptimo de FAP8-FITC en ratones

[0453] Se probaron FAP8-FITC con diferentes enlazadores de PEG en ratones para determinar el enlazador óptimo. También se comparó la eficacia de FAP8-PEG8, 12, 15-FITC y FAP5-PEG16-FITC. Se inyectaron MDA-MB231-hFAP (5 millones de células) por ratón NSG por vía subcutánea. Se inyectaron células CAR-T E2 (8 millones) en cada ratón cuando el tamaño tumoral alcanzó aproximadamente 100 mm³. FAP8-FITC se inyectó por vena de la cola tres veces por semana a 500 nmol/kg. Los grupos de ratones fueron los siguientes:

- Grupo 1 (n=6) (control de enfermedad); solo se inyectaron células tumorales
- Grupo 2 (n=6) (solo CAR-T); se inyectaron células CAR-T (8×10^6 células); FAP-FITC se inyectó tres veces por semana
- Grupo 3 (n=6) (tratamiento FAP8-PEG8-FITC); se inyectaron células CAR-T (8×10^6 células); FAP-FITC se inyectó tres veces por semana
- Grupo 4 (n=7) (tratamiento FAP8-PEG12-FITC); se inyectaron células CAR-T (8×10^6 células); FAP-FITC se inyectó tres veces por semana
- Grupo 5 (n=7) (tratamiento FAP8-PEG15-FITC); se inyectaron células CAR-T (8×10^6 células); FAP-FITC se inyectó tres veces por semana
- Grupo 6 (n=6) (tratamiento FAP5-PEG16-FITC); se inyectaron células CAR-T (8×10^6 células); FAP-FITC se inyectó tres veces por semana.

[0454] Aunque FAP5-FITC funciona de manera similar a FAP8-FITC in vitro, FAP8-FITC, que tenía una mejor estabilidad en suero, pareció mediar una mejor interacción con células CAR-T in vivo. Véanse las **FIGS. 26A-26E**.

Ejemplo 25*Infiltración tumoral de células CAR-T*

[0455] Los tumores se extrajeron de los ratones en el punto final, se digirieron con un kit de disociación de tumores humanos (Miltenyi) con 50 % de enzima R para mejorar la recuperación de linfocitos. Posteriormente, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos y luego se lavaron dos veces. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-hCD3 en hielo durante 30 minutos y luego se lavaron tres veces. Posteriormente, las células se sometieron a citometría de flujo. Se observó una mayor infiltración de células CAR-T con el tratamiento con FAP8-FITC que con el tratamiento con FAP5-FITC. Véase la **FIG. 27**.

Ejemplo 26*Análisis de retención tumoral de FAP8-FITC mediante obtención de imágenes*

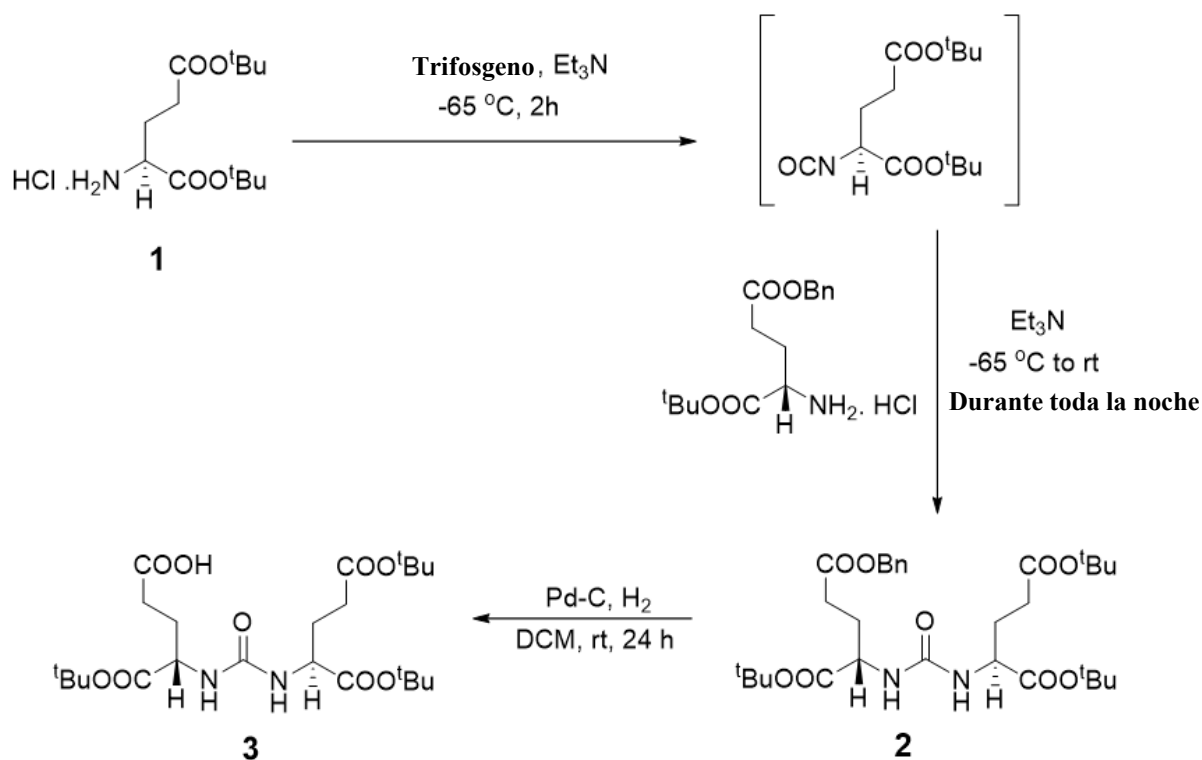
[0456] Se inyectó FAP8-FITC (500 nmol/kg) 24 horas antes de la obtención de imágenes en ratones control de enfermedad (tumor KB). FAP8-FITC con enlazador PEG23 mostró una retención más débil en el tumor, mientras que FAP8-FITC con enlazador PEG15 o PEG18 mostró buena retención.

Ejemplo 27*Síntesis de DUPA-PEG6-FITC*

[0457] **2-[3-(3-Beniloxicarbonilo-1-tert-butoxicarbonil-propil)-ureido]pentanodioato de ácido di tert-butil éster (2)**. Se añadió TEA (1,0 mL, 8,19 mmol) a una disolución de L-glutamato di-tert-butil éster hidrocloreuro (1,0 g, 3,39 mmol) y trifosgeno (329,8 mg, 1,12 mmol) en diclorometano (DCM) (25,0 mL) a -65 °C (**Esquema 5**). Tras agitar la mezcla durante 2 horas a -65 °C bajo argón, se añadió una disolución de L-Glu(OBn)-OtBu (1,2 g, 3,72 mmol) y TEA (600 µL, 4,91 mmol) en DCM (5,0 mL). La mezcla de reacción se dejó subir a temperatura ambiente durante un período de 1 hora y se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

[0458] La reacción se apagó con HCl 1 M y la capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (hexano:EtOAc; 1:1) para dar **2** (1,76 g, 90,2 %) como un aceite incoloro. LCMS (m/z): (M + H)⁺ calc. para C₃₀H₄₇N₂O₉ = 579,33; encontrado = 579,30.

Esquema 5

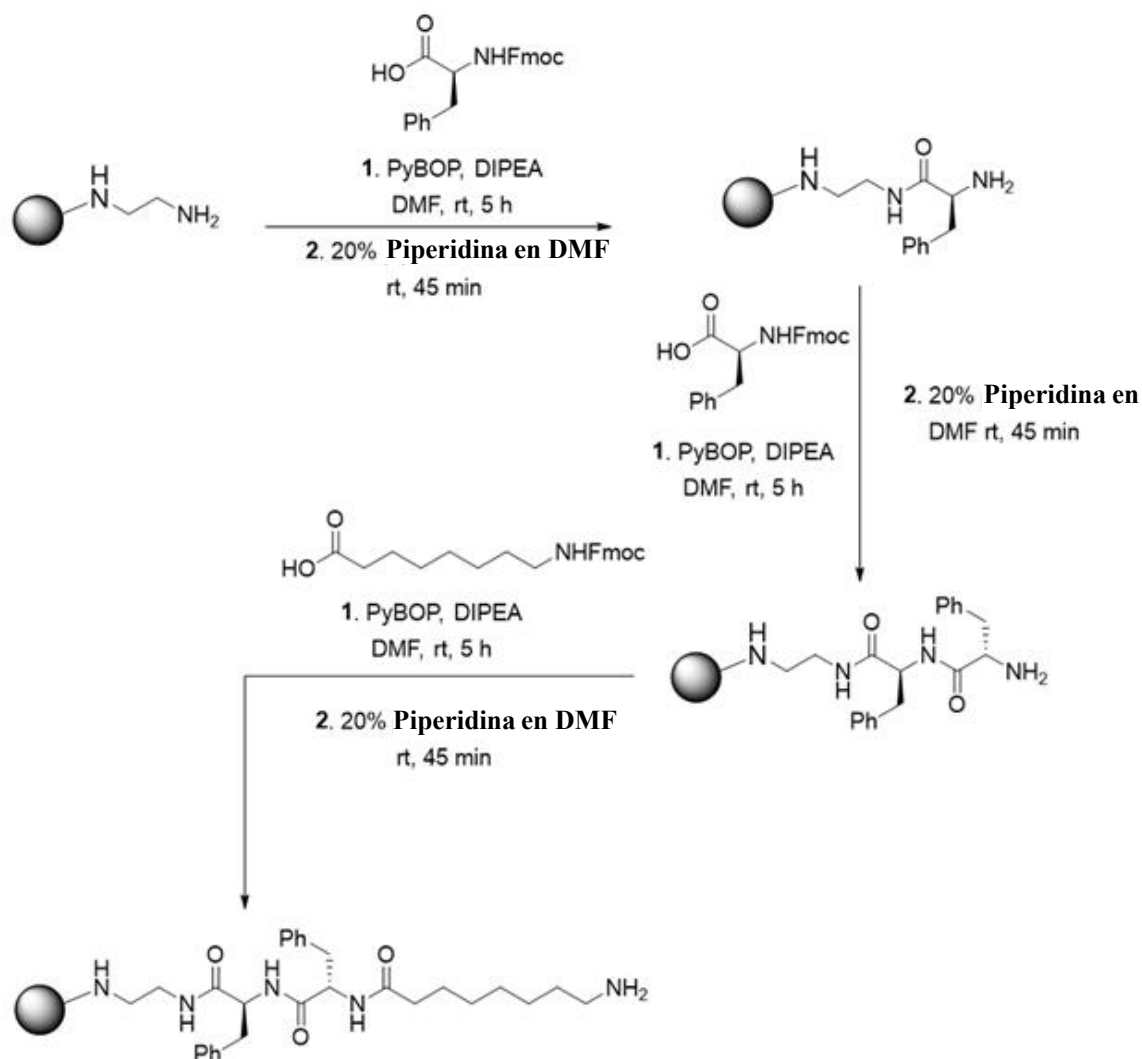


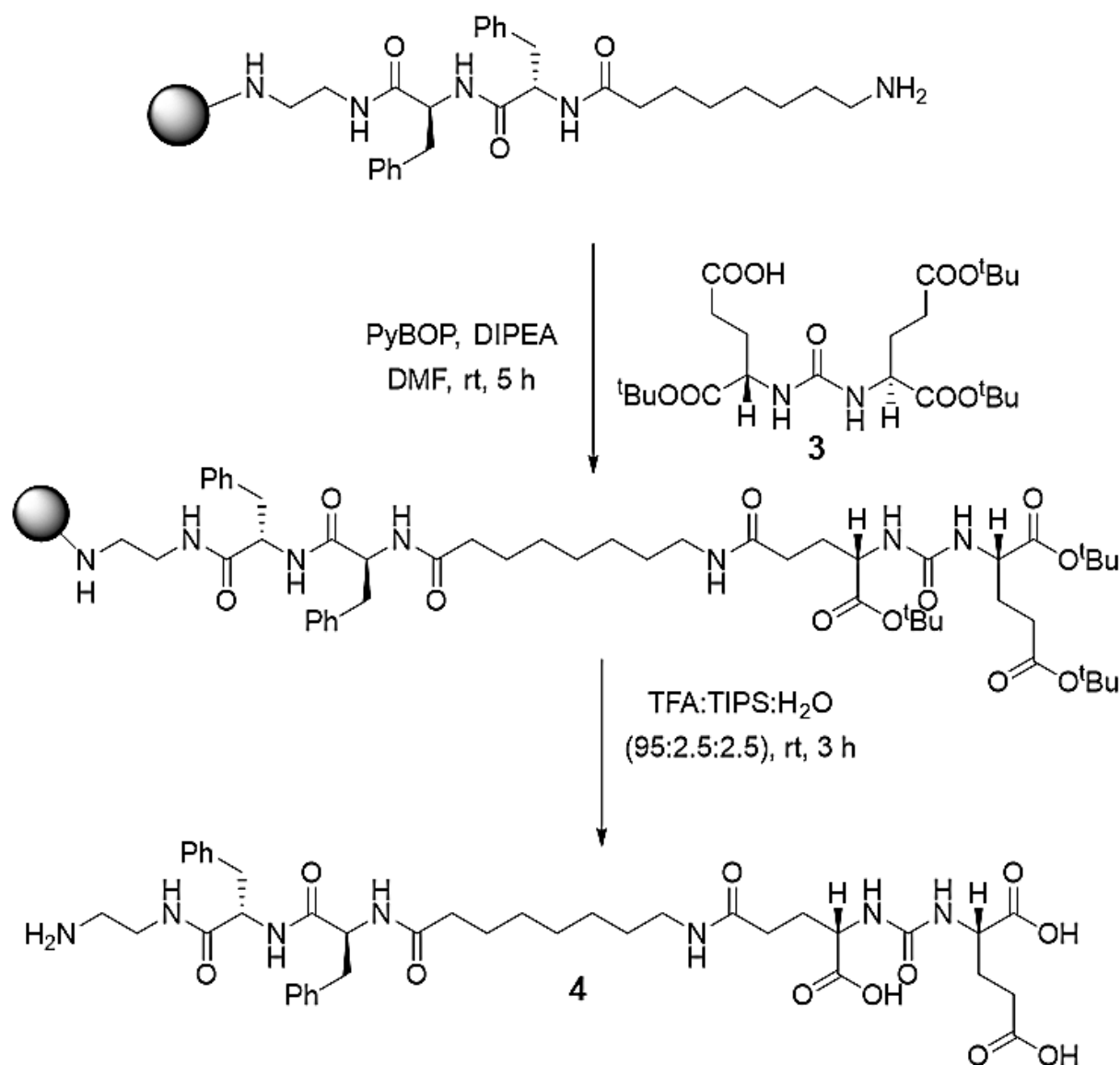
[0459] 2-[3-(1,3-Bis-tert-butoxicarbonil-propil)-ureido]pentanodioato de ácido 1-tert-Butil éster (3). Se añadió Pd/C al 10 % a una disolución de 2 (1,00 g, 432) en DCM. La mezcla de reacción se hidrogenó a 1 atm durante 24 horas a temperatura ambiente. El Pd/C se filtró a través de una capa de celita y se lavó con DCM. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (hexano: EtOAc; 40:60) para dar 3 (80,2 %) como un aceite incoloro. LCMS (m/z): ($M + H$)⁺ calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_9 = 489,28$; encontrado = 489,28.

[0460] Síntesis en fase sólida del conjugado 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA). El conjugado DUPA se sintetizó por metodología de fase sólida como sigue (véase Esquema 5). La resina tritilo de etilendiamina 1,2, unida al polímero de 200–400 malla (500 mg, 0,400 mM), se hinchó con DCM (8 mL) haciendo burbujear argón durante 10 minutos, se drenó el DCM, se hizo burbujear dimetilformamida (DMF, 8 mL) durante 10 minutos y se drenó. La resina se lavó con DMF (3×8 mL). Tras hinchar la resina en DMF, se añadió una disolución de Fmoc-Phen-OH (2,0 equiv), PyBOP (2,0 equiv) y DIPEA (5,0 equiv) en DMF (8,0 mL) (Esquema 6). Se hizo burbujear argón durante 5 horas y la resina se lavó con DMF (3×8 mL). Se añadió a la resina una disolución de piperidina al 20 % en DMF (3×8 mL), se hizo burbujear argón durante 15 minutos para cada adición y la resina se lavó con DMF (3×8 mL). La secuencia anterior se repitió para tres pasos de acoplamiento más con Fmoc-Phen-OH (2,0), ácido 8-aminooctanoico (1,5 eq) y DUPA(OtBu)-OH 3 (1,5 eq), como se muestra en el Esquema 7. El

compuesto final se escindió de la resina utilizando un cóctel de ácido trifluoroacético (TFA):H₂O:triethylsilano (95:2,5:2,5) y se concentró al vacío. El producto concentrado se precipitó en éter dietílico y se secó al vacío. El producto crudo se disolvió en una cantidad mínima de DMF y se purificó utilizando una columna C-18 (fase inversa) [gradiente de disolvente: 0 % B a 80 % B en una corrida de 55 min; A = agua milli Q (TFA) pH = 3; B = acetonitrilo (ACN)]. La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante tres horas y se liofilizó para dar el conjugado **4**. HRMS (ESI) (m/z): (M + H)⁺ calc. para C₃₉H₅₆N₇O₁₁ = 798,40; encontrado, 798,40.

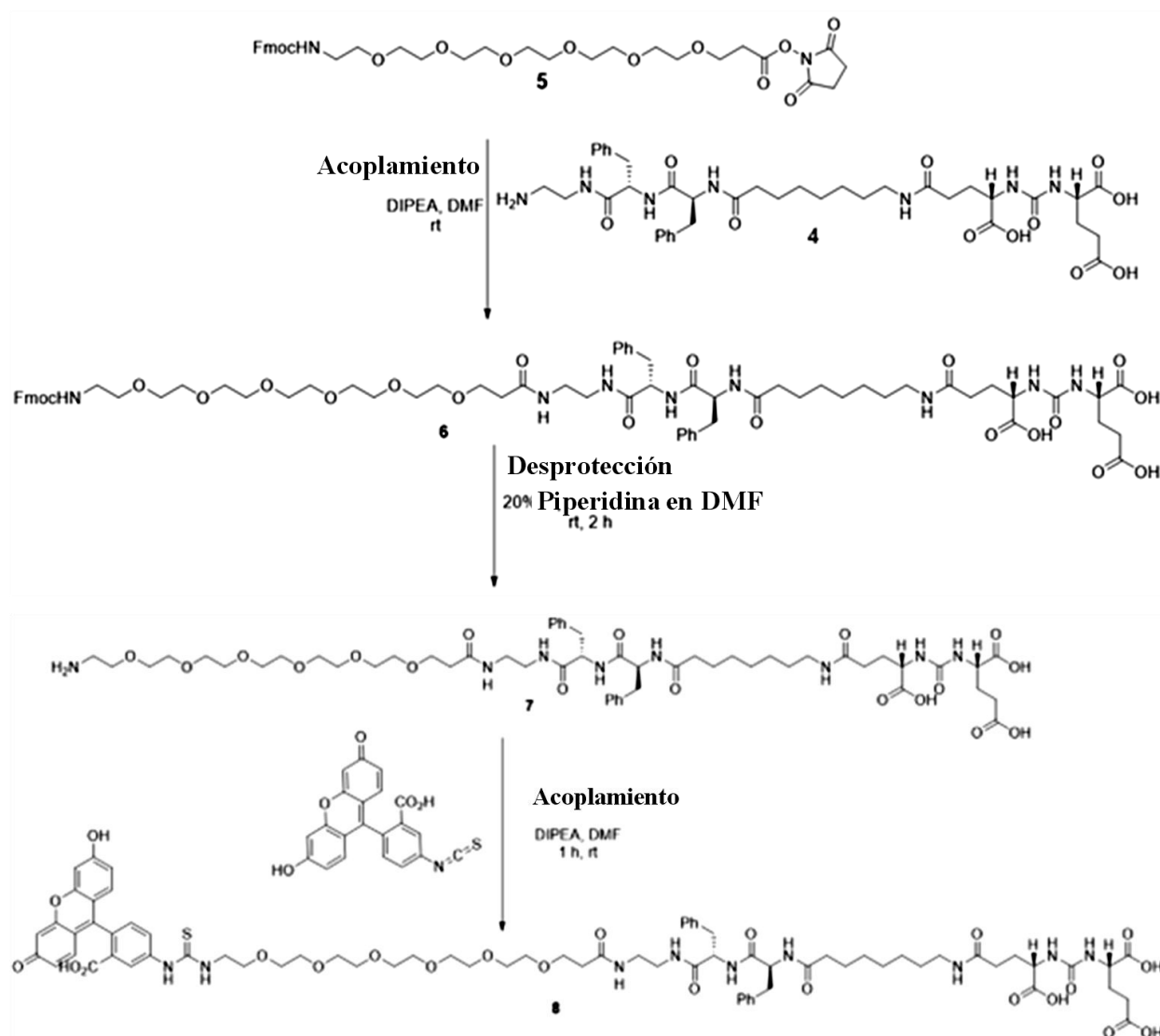
Esquema 6





[0461] DUA-PEG6 NHFmoc (6). A una disolución agitada del conjugado DUA 4 (0,100 g, 1 equivalente) y el éster PEG6 NH 5 (0,092 g, 1,1 equivalentes) en DMF (1,5 mL) se añadió DIPEA (0,044 mL, 2,0 equivalentes) a temperatura ambiente bajo argón, y la disolución se agitó durante 3 horas como se menciona en el Esquema 7. La reacción se monitoreó por LCMS y se purificó por columna C-18 de fase inversa (fase móvil: A = agua milli Q (TFA) pH = 3, B = ACN; método: 0 % B a 90 % B en 50 min). Las fracciones puras se agruparon y se liofilizaron, proporcionando DUA-PEG6 NHFmoc 6.

Esquema 7



[0462] Dupa-PEG6 NH₂ (7). Dupa-PEG6 NHFmoc (6) se disolvió en piperidina al 20 % en DMF (1,0 mL) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas bajo argón (Esquema 7). La reacción se monitoreó por LCMS y se purificó por columna C-18 de fase inversa (fase móvil: A = agua milli Q (TFA) pH = 3, B = ACN; método: 0 % B a 90 % B en 50 min). Las fracciones puras se agruparon y se liofilizaron, proporcionando Dupa-PEG6 NH₂ 7.

[0463] Dupa-PEG6-FITC (8). Dupa-PEG6 NH₂ 7 (20 mg, 1,0 equiv) se disolvió en DMF (1,0 mL) bajo atmósfera de argón, tras lo cual se añadió FITC (1,2 equivalentes) en condiciones de oscuridad (Esquema 7). Tras agitar durante 5 minutos, se añadió DIPEA (4,0 equivalentes) a la disolución y la reacción se monitoreó con LCMS (la reacción se completó en 2,0 horas). El producto crudo se purificó por columna C-18 de fase inversa (fase móvil: A = agua milli Q (TFA) pH = 3, B = ACN; método: 0 % B a 90 % B en 60 min). La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante tres horas y se liofilizó para dar el conjugado Dupa-PEG6-FITC 8. LCMS

(ESI) (m/z): (M + H)⁺ calc. para C₇₅H₉₅N₉O₂₅S + H = 1522,6; encontrado (m/2): (M + H)⁺ 762,4 y (m/3): (M + H)⁺ 508,4.

Ejemplo 28

Síntesis de PSMAL1-PEG6-FITC

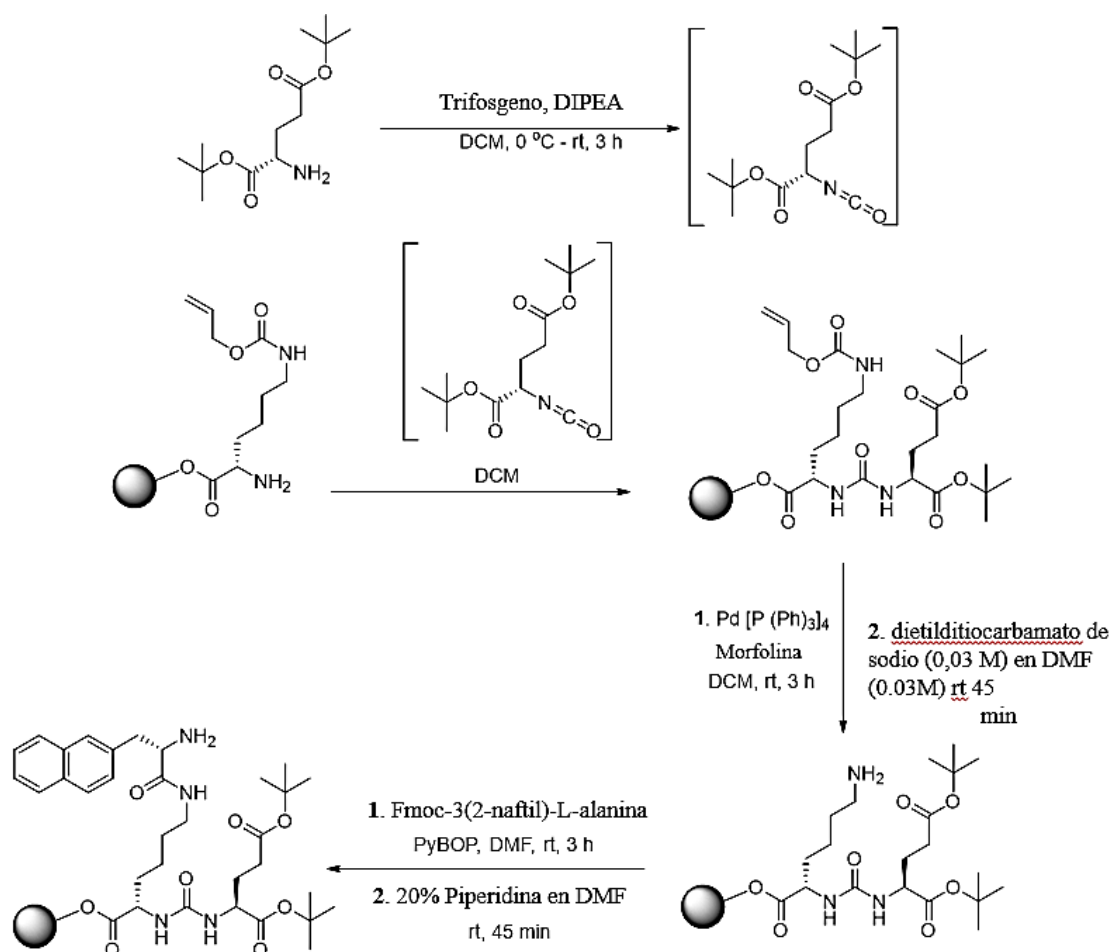
[0464] El conjugado PSMAL1-PEG6-FITC se sintetizó por metodología de fase sólida como sigue (véanse los Esquemas a continuación):

[0465] Se añadió DIPEA (1,3 mL, 10 equivalentes, 7,5 mmol) a una disolución de L-glutamato di-tert-butil éster hidrocloreuro (1,33 g, 6,00 equivalentes, 4,50 mmol) y trifosgeno (0,445 g, 2,00 equivalentes, 1,5 mmol) en DCM (15,0 mL) a -65 °C (**Esquema 8**). Tras agitar durante 1 hora a -65 °C bajo argón, la disolución se templó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente para producir in situ el intermedio isocianato correspondiente.

[0466] La resina H-L-LYS(ALLOC)-2-Cl-tritilo (1,0 g, 1,0 equivalente, 0,75 mM) se hinchó con DCM seco (8 mL) haciendo burbujear argón durante 10 minutos en un recipiente para péptidos. A continuación se drenó el DCM, y la resina se lavó dos veces con DCM seco y luego se drenó. Inmediatamente después de hinchar la resina en DCM, el isocianato generado in situ se transfirió a un recipiente para péptidos bajo atmósfera de argón. Se hizo burbujear argón durante la noche (16 horas) a temperatura ambiente y se lavó el isocianato con DCM. La finalización de la reacción se confirmó mediante el Test de Kaiser.

[0467] Posteriormente, tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (100 mg) y 0,800 mL de morfolina se disolvieron en 8 mL de DCM seco en un matraz de fondo redondo bajo atmósfera de argón, se transfirieron a un recipiente para péptidos y se hizo burbujear argón durante 3 horas a temperatura ambiente para eliminar el grupo protector alilooxi. Tras la desprotección, la resina se lavó tres veces con DCM seco. De nuevo, la finalización de la reacción se confirmó mediante Test de Kaiser. Además, la resina se lavó dos veces con DMF y tres veces con morfolin para eliminar el catalizador de Pd residual. Finalmente, la resina se lavó tres veces con DMF y DCM.

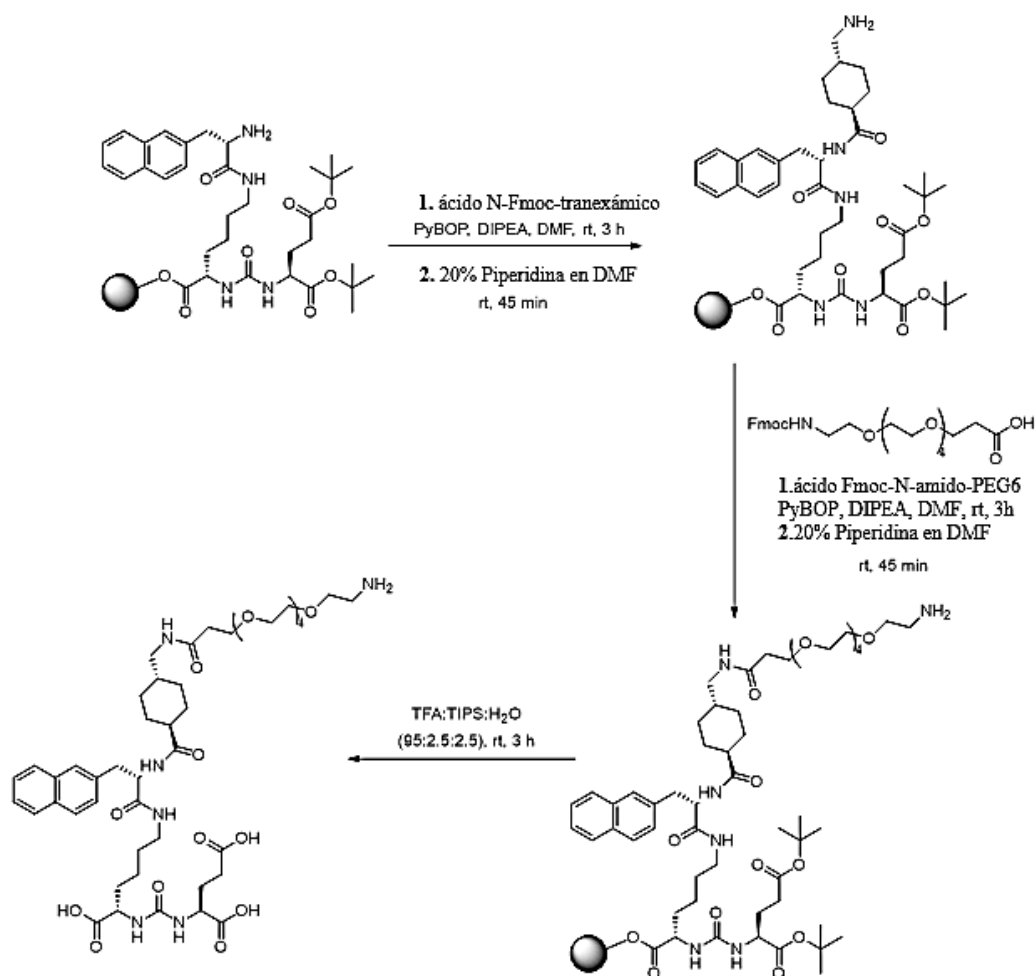
Esquema 8



[0468] Inmediatamente, se hinchó la resina en DMF para un acoplamiento posterior y se añadió una disolución de Fmoc-3(2-naftil)-L-alanina (2,0 equivalentes), PyBOP (2,0 equivalentes) y DIPEA (5,0 equivalentes) en DMF (8,0 mL) (**Esquema 8**). Se hizo burbujear argón durante 5 horas y la resina se lavó con DMF (3 × 8 mL). Se añadió a la resina una disolución de piperidina al 20 % en DMF (3 × 8 mL), se hizo burbujear argón durante 15 minutos para cada adición y la resina se lavó con DMF (3 × 8 mL). La secuencia anterior se repitió para dos pasos de acoplamiento más con ácido N-Fmoc-tranexámico (2,0), ácido Fmoc-N-amido-PEG6 (2,0 eq), como se muestra en el **Esquema 9**. El compuesto final se escindió de la resina utilizando un cóctel de TFA:H₂O:triethylsilano (95:2,5:2,5) y se concentró al vacío. El producto concentrado se precipitó en éter dietílico y se secó al vacío. El producto crudo se disolvió en una cantidad mínima de DMF y se purificó utilizando una columna C-18 (fase inversa) [gradiente de disolvente: 0 % B a 80 % B en corrida de 55 min; A = agua milli Q (TFA pH = 3); B = acetonitrilo (ACN)]. La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante tres horas y se liofilizó para dar el intermedio

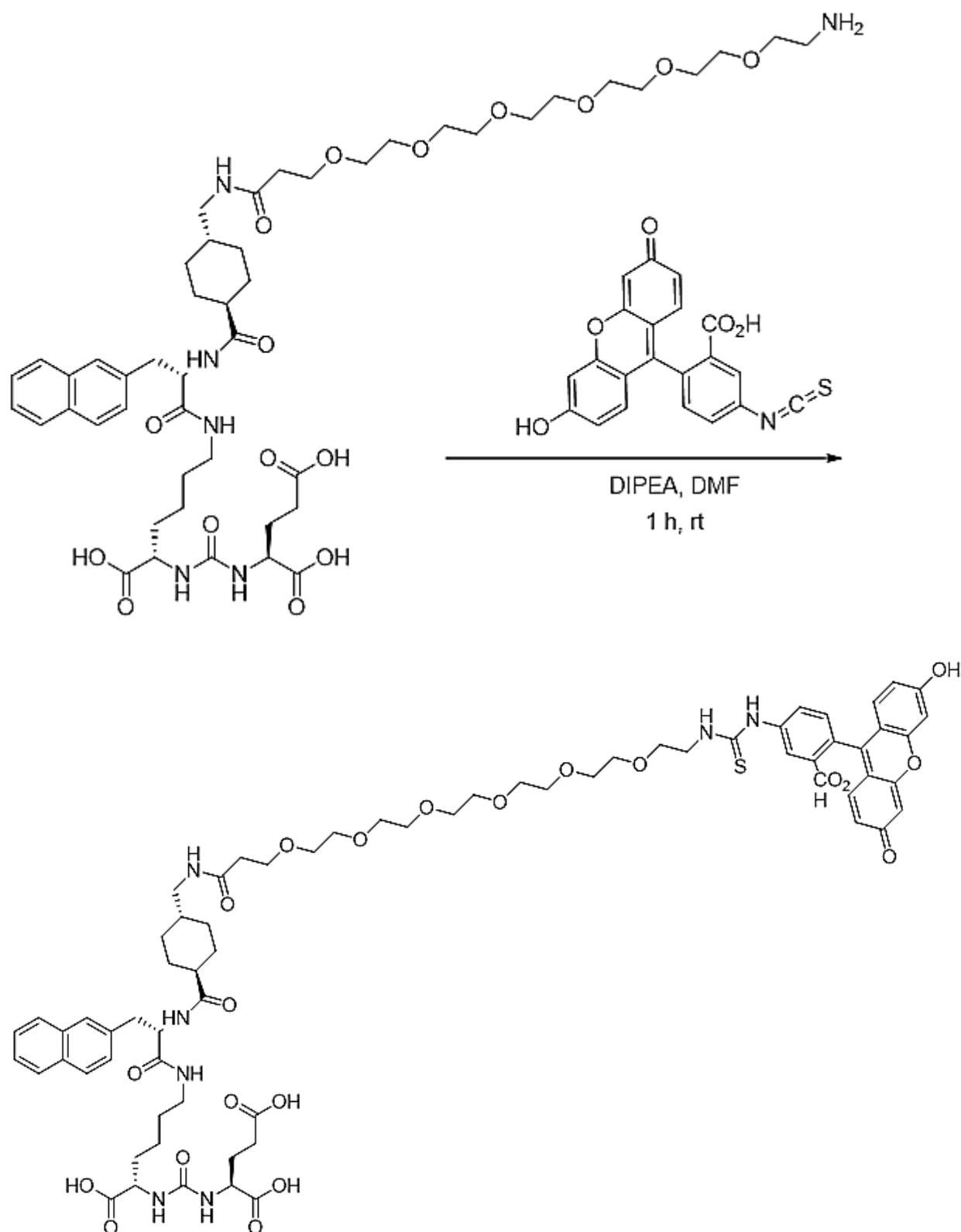
conjugado PSMAL1-PEG6-NH₂. HRMS (ESI) (m/z): (M + H)⁺ calc. para C₄₈H₇₅N₆O₁₆ = 991,52; encontrado, 991,5.

Esquema 9



[0469] **Síntesis del conjugado PSMAL1-PEG6-FITC.** PSMAL1-PEG6-NH₂ (10 mg, 1,0 equiv) se disolvió en DMF (1,0 mL) bajo atmósfera de argón, tras lo cual se añadió FITC (1,2 equivalentes) en condiciones de oscuridad (**Esquema 10**). Tras agitar durante 5 minutos, se añadió DIPEA (4,0 equivalentes) a la disolución y la reacción se monitoreó con LCMS (reacción completada dentro de 1,0 a 2 horas). El producto crudo se purificó por columna C-18 de fase inversa (fase móvil: A = agua milli Q (TFA, pH = 3), B = ACN; método: 0 % B a 90 % B en 60 minutos). La fracción pura se recogió, se congeló a -80 °C durante tres horas y se liofilizó para dar el conjugado **8** PSMAL1-PEG6-FITC. LCMS (ESI) (m/z): (M + H)⁺ calc. para C₆₉H₈₆N₇O₂₁S + H = 1380,56; encontrado (m/2): (M + H)⁺ 690,9 y (m/3): (M + H)⁺ 461,0

Esquema 10



Ejemplo 29

Efecto de la longitud del enlazador en la afinidad de unión a PSMA

[0470] Células MDA-PSMA (0,2 millones) se incubaron con adaptadores en dilución seriada 2-piegues comenzando en 500 nM en medio RPMI completo (RPMI + 10 % FBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con 2 % FBS en PBS y se resuspendieron

en el mismo tampón. La intensidad de fluorescencia de la isotiocianato de fluoresceína (FITC) se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **FIG. 29**.

[0471] Como se muestra en la **FIG. 29**, a medida que aumentó la longitud del enlazador entre DUPA y FITC, la afinidad de unión y la unión total de los adaptadores DUPA-FITC disminuyeron..

Ejemplo 30

Niveles de expresión de PSMA en varias líneas celulares utilizadas

[0472] Las células (0,2 millones) se tiñeron con anticuerpo APC-anti-PSMA en hielo durante 30 minutos y se lavaron dos veces con 2 % FBS en PBS. La intensidad de fluorescencia de APC-anti-PSMA se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **FIG. 30**, que muestra el nivel de expresión de PSMA en las líneas celulares indicadas.

Ejemplo 31

La longitud del enlazador de PEG afecta la unión y la exposición superficial de la porción de FITC en las células diana

[0473] Células MDA-PSMA (0,2 millones) se incubaron con 1 μ M de conjugados DUPA-FITC con diferentes enlazadores de PEG en medio RPMI completo (RPMI + 10 % FBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminaron los compuestos libres y la intensidad de fluorescencia de FITC se analizó por citometría de flujo. Para analizar la exposición superficial de la porción de FITC, las células teñidas se incubaron con APC-anti-FITC en hielo durante 30 minutos. Luego se lavaron las células y la intensidad de fluorescencia de APC se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 31A-31B**.

[0474] Como se muestra en la **FIG. 31A**, la unión total de DUPA-FITC disminuye a medida que aumenta la longitud del enlazador. Como se muestra en la **FIG. 31B**, la exposición superficial de FITC aumenta a medida que aumenta la longitud del enlazador.

Ejemplo 32

Aumentar la longitud del enlazador hasta PEG6 incrementa la activación de células CAR-T anti-FITC

[0475] Células CAR-T anti-FITC se incubaron con un número igual de células diana en presencia de FITC-PEG-DUPA a diferentes concentraciones. El número de células diana se determinó al final del co-cultivo y la citotoxicidad se calculó mediante la fórmula: [(número de células no tratadas – número de células tratadas)/número de células no tratadas] * 100 %. La secreción de IFN γ por células CAR-T en el medio de co-cultivo se analizó por ELISA utilizando un kit ELISA

de IFN γ humano (Biolegend). Los resultados se muestran en las **FIGS. 32A-32F**. Como se muestra en las figuras, aumentar la longitud del enlazador en el adaptador biespecífico incrementó la activación de células CAR-T anti-FITC. Cuando la longitud del enlazador alcanzó PEG6, la célula CAR-T alcanzó el nivel más alto de activación. Longitudes de enlazador mayores no mejoraron de manera drástica la activación de las células CAR-T.

Ejemplo 33

Curso temporal de la acumulación de DUPA-FITC en tumores KB-PSMA

[0476] Ratones portadores de tumores KB-PSMA se inyectaron con las dosis indicadas de DUPA-PEG6-FITC o DUPA-PEG12-FITC. Los ratones se sacrificaron en los puntos temporales deseados y se disecaron los tumores. Se tomaron imágenes fluorescentes de los tumores en el sistema de imagen Spectral Ami y los rads medios de las imágenes se analizaron con el software Aura. Los resultados se muestran en la **FIG. 33B**. Como se muestra en la **FIG. 33B**, la acumulación máxima de DUPA-PEG6-FITC y DUPA-PEG12-FITC en tumores KB-PSMA ocurrió aproximadamente dos horas después de la inyección y se produjo una depuración casi completa aproximadamente a las 96 horas.

Ejemplo 34

DUPA-FITC con diferentes enlazadores de PEG media la erradicación de tumores MDA-PSMA en ratones sin provocar pérdida de peso corporal

[0477] Se implantaron células MDA-PSMA (alto nivel de PSMA; 5 millones de células) en cada ratón NSG por inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm³, los grupos de tratamiento se inyectaron con 10 millones de células CAR-T anti-FITC y adaptadores biespecíficos (sin enlazador, PEG3, PEG6 o PEG12), como se muestra en la **FIG. 34A**. Se monitorizaron regularmente el volumen tumoral y el peso corporal. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: (longitud * anchura²)/2. Los resultados se muestran en las **FIGS. 34B y 34C**. Como se muestra en la **FIG. 34B**, todos los adaptadores DUPA-FITC con diferentes enlazadores de PEG lograron mediar la erradicación de los tumores. Como se muestra en la **FIG. 34C**, ninguno de los adaptadores DUPA-FITC probados causó pérdida de peso corporal durante el tratamiento.

Ejemplo 35

PSMAL1-PEG6-FITC tiene mayor afinidad de unión y mayor unión total que DUPA-PEG6-FITC

[0478] Células MDA-PSMA (0,2 millones) se incubaron con adaptadores en dilución seriada 2-pliegues comenzando en 500 nM en medio RPMI completo (RPMI + 10 % FBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con 2 % FBS en PBS y se resuspendieron en el mismo tampón. La intensidad de fluorescencia de FITC se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **FIG. 35**.

[0479] Como se muestra en la **FIG. 35**, la afinidad de unión de PSMAL1-PEG6-FITC es cinco veces mayor que la afinidad de unión de DUPA-PEG6-FITC a células MDA-PSMA.

Ejemplo 36

PSMAL1-PEG6-FITC tiene mejor retención en células PSMA+ que DUPA-PEG6-FITC

[0480] Células MDA-PSMA o 22Rv1 se incubaron con 1 μ M de DUPA-PEG6-FITC o PSMAL1-PEG6-FITC durante una hora a temperatura ambiente. Se eliminaron los compuestos no unidos y las células se cultivaron en RPMI que contenía 10 % de FBS a 37 °C con 5 % de CO₂. En los puntos temporales indicados, las células se observaron bajo un microscopio confocal para analizar la intensidad y la localización de FITC. Para cuantificar la intensidad de FITC y la FITC unida a la superficie, las células teñidas con DUPA-PEG6-FITC y PSMAL1-PEG6-FITC se analizaron por citometría de flujo en los puntos temporales indicados para analizar la intensidad de fluorescencia de FITC. Para analizar la FITC unida a la superficie, las células se tiñeron con anticuerpo APC-anti-FITC durante 30 minutos en hielo en diferentes puntos temporales. La intensidad de fluorescencia de APC se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en las **FIGS. 36A-36C**. Como se muestra en la **FIG. 36A**, PSMAL1-PEG6-FITC permaneció más tiempo en células MDA-MB-231-PSMA que DUPA-PEG6-FITC. La **FIG. 36B** muestra que PSMAL1-PEG6-FITC permaneció más tiempo en células MDA-PSMA que expresan diferentes niveles de PSMA que DUPA-PEG6-FITC. Como se muestra en la **FIG. 36C**, PSMAL1-PEG6-FITC permaneció más tiempo en células 22Rv1, que expresan naturalmente niveles bajos de PSMA, que DUPA-PEG6-FITC.

Ejemplo 37

La eficacia de células CAR-T anti-FITC mediada por PSMAL1-PEG6-FITC es mayor que la de DUPA-PEG6-FITC a bajas concentraciones

[0481] Se co-cultivaron números iguales de 22Rv1 y células CAR-T anti-FITC en placas de 96 pocillos con DUPA-PEG6-FITC o PSMAL1-PEG6-FITC a diferentes concentraciones durante 48 horas. El número de células 22Rv1 se contó al final del co-cultivo. La citotoxicidad de las células CAR-T anti-FITC se calculó mediante la fórmula: (número de células 22Rv1 no tratadas – número de células 22Rv1 tratadas)/número de células 22Rv1 no tratadas * 100 %. Las concentraciones de

IFN γ en el medio de co-cultivo se analizaron por ELISA utilizando el kit ELISA de IFN γ humano (Biolegend). Los resultados se muestran en las **FIGS. 37A-37B**. Como se muestra en la **FIG. 37A**, la lisis de células 22Rv1 por células CAR-T anti-FITC mediada por PSMAL1-PEG6-FITC fue mucho mayor que con DUPA-PEG6-FITC a baja concentración. Como se muestra en la **FIG. 37B**, el IFN γ secretado por células CAR-T anti-FITC cuando se co-cultivaron con células 22Rv1 en presencia de PSMAL1-PEG6-FITC fue mayor que con DUPA-PEG6-FITC a bajas concentraciones.

Ejemplo 38

PSMAL1-PEG6-FITC tiene mejor retención en tumores MDA-MB-231-PSMA que DUPA-PEG6-FITC y DUPA-FITC

[0482] Ratones portadores de tumores MDA-PSMA se inyectaron por vía intravenosa con los adaptadores indicados a 500 nmol/kg. Se tomaron imágenes fluorescentes de los ratones en el sistema de imagen Spectral Ami en los puntos temporales indicados tras la inyección. Los resultados se muestran en la **FIG. 38**.

Ejemplo 39

PSMAL1-PEG6-FITC tiene una retención más prolongada en las superficies de células tumorales MDA-MB-231-PSMA in vivo

[0483] Ratones portadores de tumores MDA-PSMA se inyectaron con DUPA-PEG6-FITC, PSMAL1-PEG6-FITC o folato-FITC como control. Los ratones se sacrificaron en los puntos temporales indicados tras la inyección. Se disecaron los tumores y se disociaron en células individuales. La intensidad de fluorescencia de FITC que indica la retención total de los adaptadores en las células tumorales se analizó por citometría de flujo. Para analizar la retención en la superficie de los adaptadores en la superficie de las células tumorales, las células tumorales disociadas se tiñeron con anticuerpo APC-anti-FITC y la intensidad de fluorescencia de APC se analizó por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **FIG. 39**. Tras la inyección (48 horas post-inyección), el 77 % de las células tumorales aún tenían PSMAL1-PEG6-FITC en las células y el 65 % de las células retuvieron PSMAL1-PEG6-FITC en la superficie. En contraste, solo el 13 % de las células tumorales tenían DUPA-PEG6-FITC y el 9 % de las células retuvieron DUPA-PEG6-FITC en la superficie. A las 144 horas post-inyección, el 45 % de las células tumorales retuvieron PSMAL1-PEG6-FITC y el 34 % de las células retuvieron PSMAL1-PEG6-FITC en la superficie.

Ejemplo 40

PSMAL1-PEG6-FITC y DUPA-PEG6-FITC pueden mediar la erradicación de tumores MDA-PSMA que expresan niveles altos de PSMA

[0484] Se implantaron células MDA-PSMA (5 millones) en cada ratón NSG mediante inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm³, los ratones se inyectaron con 10 millones de células CAR-T anti-FITC y los adaptadores correspondientes. Los volúmenes de los tumores y los pesos corporales de los ratones se monitorizaron regularmente. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: (longitud * anchura²)/2. Los resultados se muestran en las **FIGS. 40A-40C**. Tanto DUPA-PEG6-FITC como PSMAL1-PEG6-FITC presentan buena eficacia en la eliminación de tumores MDA-PSMA que expresan niveles altos de PSMA y no se observó pérdida de peso corporal en los ratones durante el tratamiento.

Ejemplo 41

PSMAL1-PEG6-FITC inhibió significativamente el crecimiento del tumor 22Rv1

[0485] Se implantaron células 22Rv1 (3 millones) en ratones NSG mediante inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 50 mm³, los ratones se inyectaron con 10 millones de células CAR-T anti-FITC y los adaptadores indicados. Los volúmenes de los tumores y los pesos corporales de los ratones se monitorizaron regularmente. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: (longitud * anchura²)/2. Los resultados se muestran en las **FIGS. 41A-41C**. PSMAL1-PEG6-FITC y las células CAR-T anti-FITC inhibieron significativamente el crecimiento del tumor 22Rv1, mientras que DUPA-PEG6-FITC no mostró mucha eficacia. No se observó pérdida obvia de peso corporal en ninguno de los grupos de tratamiento durante el tratamiento.

Ejemplo 42

Eficacia de la unión de PSMAL1-PEG6-FITC a células TagCAR T generadas utilizando un vector lentiviral

[0486] Este estudio se realizó para evaluar la eficacia de una combinación de PSMAL1-PEG6-FITC administrado con células T diseñadas in vivo con vectores lentivirales que codifican un CAR anti-fluoresceína universal (TagCAR). Tales métodos pueden ser ventajosos frente a otros métodos autólogos costosos o tóxicos.

[0487] **Generación selectiva de células T TagCAR universales anti-fluoresceína (TagCAR) utilizando un vector lentiviral.** Se utilizó un vector lentiviral TagCAR ejemplar (**FIG. 42A**) para facilitar la transducción y la expresión de carga útil de TagCAR en células T. Las partículas lentivirales TagCAR se pseudotiparon con la glucoproteína cocal y se diseñaron en superficie para expresar una proteína de fusión multidominio (MDF) compuesta por un scFv anti-

CD3 intercalado entre dos ligandos coestimuladores de células T. El vector también contenía la carga útil TagCAR como un polinucleótido que codifica el TagCAR con los siguientes componentes en orden N-terminal a C-terminal: un scFv (por ejemplo, anti-FITC E2), una bisagra (espaciador), un dominio transmembrana y un endodominio con un dominio de señalización coestimulador y un dominio de señalización CD3zeta (Z).

[0488] Para evaluar la unión, activación y transducción selectivas de células T por las partículas lentivirales TagCAR, se transdujeron PBMCs con partículas lentivirales TagCAR que contenían la carga útil TagCAR o, como controles negativos, sin vector lentiviral TagCAR o con un vector lentiviral TagCAR que no contenía la MDF. Los gráficos de flujo representativos una hora después de la incubación de PBMCs con un anticuerpo anti-cocal utilizado para detectar la unión del vector lentiviral se muestran en la **FIG. 42B**. Además, el porcentaje de subconjuntos de células inmunes circulantes en función de la cantidad de partículas lentivirales TagCAR administradas se muestra en la **FIG. 42C**. Asimismo, se midieron la activación de células T y la transducción, respectivamente, como porcentaje de CD25+ a los 3 días post-transducción y TagCAR+ a los 7 días post-transfección (**FIG. 42D**). En conjunto, estos datos sugieren que las partículas lentivirales TagCAR generan selectivamente células T TagCAR tras el tratamiento de PBMCs.

[0489] **PSMAL1-PEG6-FITC se une firmemente a células TagCAR T generadas utilizando partículas lentivirales TagCAR.** Para demostrar que las células TagCAR T generadas utilizando partículas lentivirales TagCAR pueden unirse firmemente a PSMAL1-PEG6-FITC, se utilizó un ensayo competitivo representado gráficamente en la **FIG. 43A** para definir la interacción entre el TagCAR y PSMAL1-PEG6-FITC. Debido a que la fluorescencia de la fluoresceína se apaga cuando está unida por TagCAR, las células TagCAR T se incubaron en su lugar con niveles saturantes de FL-AF647, que luego fue desplazado por concentraciones crecientes de PSMAL1-PEG6-FITC. Los resultados del ensayo competitivo se muestran en las **FIGS. 43B-43C**. En comparación con el control de solo antígeno, fluoresceína sódica (NaFL), se necesitaron concentraciones más bajas de PSMAL1-PEG6-FITC para competir con FL-AF647, según lo detectado por la intensidad media de fluorescencia (MFI) de FL-AF647. Además, la constante media calculada del inhibidor (K_i), o concentración a la mitad de la inhibición máxima, a partir de triplicados compuestos por células TagCAR T derivadas de diferentes donantes, se calculó para PSMAL1-PEG6-FITC y NaFL utilizando la ecuación: $K_i = IC_{50}/(1+[S]/K_m)$, donde $[S] = [FL-AF647] = 100 \text{ nM}$ y el K_m de FL-AF647 es $9,9 \text{ nM}$. PSMAL1-PEG6-FITC tuvo un K_i más bajo de $9,9 \text{ nM}$ en comparación con NaFL, lo que sugiere que PSMAL1-PEG6-FITC se une fuertemente a células TagCAR T generadas utilizando partículas lentivirales TagCAR.

Ejemplo 43*Eficacia de células TagCAR T generadas utilizando partículas lentivirales TagCAR mediada por PSMAL1-PEG6-FITC en tumores MDA-PSMA in vitro*

[0490] Este estudio se realizó para evaluar si la combinación de PSMAL1-PEG6-FITC administrado con células TagCAR T generadas como se describe en el Ejemplo 42 fue eficaz en el tratamiento de células tumorales PSMA-positivas in vitro.

[0491] **PSMAL1-PEG6-FITC se localiza fuertemente en la superficie de células tumorales PSMA-positivas.** Para caracterizar la afinidad de unión en célula de PSMAL1-PEG6-FITC a células tumorales que expresan PSMA, se incubaron diferentes concentraciones de PSMAL1-PEG6-FITC con células tumorales MDA-MB-321 que sobreexpresaban PSMA (PSMA+) o que eran de tipo salvaje (PSMA-). Los niveles de antígeno de fluoresceína en la superficie de células tumorales MDA-MB-321 se detectaron utilizando un anticuerpo anti-fluoresceína (**FIG. 44A**). Como se muestra en la **FIG. 44B**, en comparación con el control PSMA-, PSMAL1-PEG6-FITC se detectó en la superficie de células tumorales PSMA+ a concentraciones crecientes de ligando. Su afinidad, o Kd, se calculó en 1,292 nM, y su cantidad total de antígeno, o Bmax, en células tumorales PSMA+ fue de $2,6 \times 10^6$ MFI. Estos datos sugieren que PSMAL1-PEG6-FITC se localiza específicamente en la superficie de tumores que expresan PSMA.

[0492] **PSMAL1-PEG6-FITC provoca función dependiente de dosis de células TagCAR T in vitro.** Se investigó la eficacia de células TagCAR T generadas como se describe en el Ejemplo 42 mediada por PSMAL1-PEG6-FITC en células tumorales PSMA-positivas in vitro. El crecimiento tumoral normalizado (en pliegues) de células tumorales MDA-MB-231 PSMA+ se midió cada cuatro horas durante un co-cultivo de 88 horas de células tumorales MDA-MB-231 PSMA+ y diferentes concentraciones de PSMAL1-PEG6-FITC en presencia de células TagCAR T generadas como se describe en el Ejemplo 42. Como se muestra en la **FIG. 45A**, el tamaño del tumor disminuyó en presencia de PSMAL1-PEG6-FITC, en comparación con un control negativo sin la presencia de PSMAL1-PEG6-FITC.

[0493] Además, se midieron los niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivo 24 horas después de la adición de células TagCAR T generadas como se describe en el Ejemplo 42 y diferentes concentraciones de PSMAL1-PEG6-FITC a células tumorales MDA-MB-231 PSMA+. Como se muestra en la **Fig. 45B**, los niveles tanto de interferón gamma (IFN γ) como de interleucina 2 (IL-2) aumentaron con dosis crecientes de PSMAL1-PEG6-FITC.

[0494] La presencia de células TagCAR+ (**FIG. 45C**) y la presencia de CD25+ (**FIG. 45D**) en células T CD3+ también se midieron tras 88 horas de co-cultivo con células tumorales MDA-MB-231 PSMA+ con diferentes concentraciones de PSMAL1-PEG6-FITC. Las células T CD3+

con TagCAR presentaron porcentajes más altos de CD25+ en comparación con las células T CD3+ sin TagCAR.

[0495] En conjunto, estos datos sugieren que las células TagCAR T pueden mediar actividad citolítica dependiente de dosis y liberación de citocinas frente a células tumorales PSMA-positivas, así como inhibir el crecimiento de tumores PSMA-positivos.

Ejemplo 44

AP-FITC media la eliminación de células tumorales hFAP+ por células CAR-T anti-FITC

[0496] Se sembraron células MDA-MB-231-hFAP-mCh en placas de 96 pocillos (aproximadamente 7,000 células/pocillo) durante la noche. Se añadieron células CAR-T 4M5.3 a las células diana en el día 18 a una relación efector:objetivo de 1:1. Se añadió FAP5-PEG16-FITC a las células diana y a las células CAR-T a diferentes concentraciones (0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM o 1 000 nM, todas por triplicado) y se incubó durante 24 horas. Las células vivas se determinaron mediante células positivas a mCherry por citometría de flujo o mediante el área superficial positiva a mCherry medida por Incucyte, tomando imágenes cada dos horas. El porcentaje de muerte se determinó mediante $(1 - (\text{células vivas})/(\text{células vivas en el pocillo solo con células tumorales})) * 100 \%$. Los resultados se muestran en las **FIGS. 47A y 47B**.

[0497] Como se muestra en las **FIGS. 47A-47B**, FAP5-FITC medió una buena eliminación de células hFAP+. La eliminación fue máxima a 1 nM–10 nM de FAP5-FITC.

[0498] El experimento anterior se repitió con células de fibrosarcoma humano que sobreexpresan hFAP. Se obtuvieron resultados similares.

Ejemplo 45

FAP5-FITC media la eliminación de tumores FAP+ mediante células CAR-T 4M5.3 o E2 sin toxicidad

[0499] Se inyectaron subcutáneamente células MDA-MB-231-hFAP en ratones NSG y se permitió que crecieran hasta 150 mm³. Luego, se inyectaron por vía intravenosa células CAR-T 4M5.3 o E2 (8 millones) y se inyectó FAP5-PEG8-FITC tres veces por semana a 400 nmol/kg. Se utilizaron los cinco grupos de ratones (n = 6) siguientes:

- Grupo control de enfermedad (solo células tumorales),
- Grupo solo células CAR-T 4M5.3 (células CAR-T 4M5.3 y PBS),
- Grupo células CAR-T 4M5.3 y FAP5-PEG8-FITC (dosificación tres veces/semana),
- Grupo solo células CAR-T E2 (células CAR-T E2 y PBS), y
- Grupo células CAR-T E2 y FAP5-PEG8-FITC (dosificación tres veces/semana).

[0500] Las células CAR-T E2 se dirigen y atacan células cancerosas que expresan el receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), también conocido como E2, y están diseñadas para reconocer y unirse a células cancerosas que sobreexpresan $ER\alpha$, lo que a menudo se encuentra en cáncer de mama positivo para receptor hormonal y otros cánceres dependientes de hormonas.

[0501] Los resultados se muestran en las **FIGS. 46A-46C**. Como se muestra en la **FIG. 46A**, FAP5-PEG8-FITC fue capaz de mediar la eliminación de tumores FAP⁺ mediante células CAR-T 4M5.3. Como se muestra en la **FIG. 46B**, FAP5-PEG8-FITC fue capaz de mediar la eliminación de tumores FAP⁺ mediante células CAR-T E2. Como se muestra en la **FIG. 46C**, el tratamiento con FAP5-PEG8-FITC no medió ninguna toxicidad en ratones con células CAR-T 4M5.3 o células CAR-T E2.

Ejemplo 46

El tratamiento con FAP-FITC aumentó la activación y proliferación de células CAR-T y redujo la proliferación de células tumorales al eliminar CAFs FAP⁺ en el TME

[0502] Se obtuvieron muestras de sangre de los ratones en el punto final del estudio in vivo mediante punción cardíaca. A continuación, las muestras de sangre de ratón se centrifugaron a aproximadamente 1 000 g durante 10 minutos, tras lo cual se obtuvo suero para la detección de hIFN γ mediante ensayo ELISA (**FIG. 48C**). Después, las muestras de sangre se incubaron en tampón de lisis de eritrocitos (RBC) según el protocolo del fabricante, se lavaron, se tiñeron con zombie violeta (es decir, una tinción de vivo/muerto) y con anticuerpo anti-CD3 humano (es decir, para detectar células CAR-T humanas) (**FIG. 48C**). La terapia combinada de FAP-FITC + EC17 suprimió el crecimiento del tumor KB sin toxicidad perceptible (**FIGS. 48A-48B**).

[0503] Los tumores de los ratones se extrajeron en el punto final del estudio tras la eutanasia de los animales. Se cortó un pequeño fragmento de cada muestra tumoral y se fijó en formalina al 10 % para la preparación de portaobjetos de IHQ, y el resto del tumor se digirió utilizando el kit de disociación de tumores humanos de Miltenyi Biotec según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para los portaobjetos de IHQ, los CAFs se tiñeron con anti- α -actina de músculo liso de ratón (un marcador de CAFs), y las células cancerosas se tiñeron con anti-Ki67 de ratón como marcador de proliferación de células cancerosas. Las células tumorales procedentes de la disociación tumoral se tiñeron luego con anticuerpo anti-CD3 humano para la detección de células CAR-T humanas. Los resultados se muestran en las **FIGS. 48A-49D**.

[0504] Como se muestra en las **FIGS. 48C-48D**, los ratones tratados con terapia combinada presentaron mayor proliferación de células CAR-T y niveles más altos de hIFN γ en sangre. La infiltración de CAR-T en tumores KB fue similar entre el grupo tratado con EC17 y el grupo tratado con EC17 + FAP5-FITC; estos resultados podrían deberse a la recolección del tumor en

fase tardía y a que la mayoría de las células CAR-T ya no funcionaban o no eran viables. La tinción de IHQ con α -actina de músculo liso mostró una disminución de CAFs en los bordes y en el centro de los tumores tras el tratamiento con FAP-FITC y una disminución de la tasa de proliferación tumoral (**FIG. 48F**). La disminución de la tasa de proliferación tumoral se debió a la eliminación de CAFs, lo que elimina la liberación de múltiples factores de crecimiento desde los CAFs que estimulan el crecimiento de células tumorales. Como se muestra en la **FIG. 48E**, la terapia combinada con células CAR-T anti-FITC 4M5.3 mostró resultados similares.

[0505] Como se muestra en las **FIGS. 49A-49D**, la terapia combinada con FAP5-PEG8-FITC y DUPA-PEG6-FITC también mejoró la eliminación tumoral. Los ratones tratados con terapia combinada mostraron mayor proliferación de células CAR-T en sangre y en el tumor. Se obtuvieron resultados similares en un modelo diferente de tumor “frío” PSMA+ (KB-PSMA) (véase la **FIG. 50**).

Ejemplo 47

Eficacia in vivo de Aza-PEG6-FITC y orthoCAL-PEG6-FITC en combinación con EC17 (folato-FITC)

[0506] Se implantaron células KB (1 millón) en cada ratón NSG por inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 50 mm³, los grupos de tratamiento se inyectaron con 10 millones de células CAR-T anti-FITC y los adaptadores biespecíficos indicados como se muestra en la **FIG. 51A**. Se monitorizaron regularmente el volumen tumoral y el peso corporal. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: (longitud * anchura²)/2. Los resultados se muestran en las **FIGS. 51A-51C**.

[0507] La **FIG. 51B** es una gráfica de días post-inyección de células CAR-T frente a volumen tumoral (mm³), que muestra las curvas de crecimiento tumoral de los distintos grupos de tratamiento. Aza-PEG6-FITC en combinación con EC17 inhibió significativamente el crecimiento de tumores KB. OrthoCAL-PEG6-FITC en combinación con EC17 también mostró una inhibición ligeramente mejor del crecimiento de tumores KB. La **FIG. 51C** es una gráfica de días post-inyección de células CAR-T frente a cambio de peso corporal (%), que muestra los cambios de peso de los ratones en los distintos grupos de tratamiento. Aza-PEG6-FITC y EC17 indujeron pérdida de peso corporal en los ratones. La pérdida de peso corporal podría deberse a liberación de citocinas por expansión de células CAR-T. La toxicidad puede minimizarse optimizando la dosificación del adaptador.

Ejemplo 48

Eficacia in vivo de Aza-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC

[0508] Se implantaron células KB (1 millón) en cada ratón NSG por inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 50 mm³, los grupos de tratamiento se inyectaron con 10 millones de células CAR-T anti-FITC y los adaptadores biespecíficos indicados como se muestra en la **FIG. 52A**. Se monitorizaron regularmente el volumen tumoral y el peso corporal. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: $(\text{longitud} * \text{anchura}^2)/2$. Los resultados se muestran en las **FIGS. 52B-52C**.

[0509] La **FIG. 52B** es una gráfica de días post-inyección de células CAR-T frente a volumen tumoral (mm³), que muestra las curvas de crecimiento tumoral de los distintos grupos de tratamiento. Aza-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC inhibió ligeramente el crecimiento de tumores KB. La eficacia fue similar a la de la combinación de EC17 y FAP8-PEG18-FITC. OrthoCAL-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC mostró mejor eficacia para inhibir el crecimiento de tumores KB. La **FIG. 52C** es una gráfica de días post-inyección de células CAR-T frente a cambio de peso corporal (%), que muestra los cambios de peso de los ratones en los distintos grupos de tratamiento. Ninguna de las combinaciones indujo una pérdida de peso corporal significativa en los ratones tratados.

Ejemplo 49

Eficacia in vivo de Aza-PEG6-FITC en combinación con EC17 (folato-FITC) y FAP8-PEG18-FITC

[0510] Se implantaron células KB (1 millón) en cada ratón NSG por inyección subcutánea. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 50 mm³, los grupos de tratamiento se inyectaron con 10 millones de células CAR-T anti-FITC y los adaptadores biespecíficos indicados como se muestra en la **FIG. 53A**. Se monitorizaron regularmente el volumen tumoral y el peso corporal. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: $(\text{longitud} * \text{anchura}^2)/2$. Los resultados se muestran en las **FIGS. 53B-53C**.

[0511] La **FIG. 53B** es una gráfica de días post-inyección de células CAR-T frente a volumen tumoral (mm³), que muestra las curvas de crecimiento de los distintos grupos de tratamiento. Aza-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC y EC17 tiene una eficacia similar a orthoCAL-PEG6-FITC en combinación con FAP8-PEG18-FITC y EC17. Ambas mostraron una eficacia ligeramente mejor que la combinación de EC17 y FAP8-PEG18-FITC para inhibir el crecimiento de tumores KB. La **FIG. 53C** es una gráfica de días post-inyección de células CAR-T frente a cambio de peso corporal (%), que muestra los cambios de peso de los ratones en los distintos grupos de tratamiento. Los ratones inyectados con la combinación de Aza-PEG6-FITC, EC17 y FAP8-PEG18-FITC mostraron pérdida de peso corporal durante el tratamiento. La

pérdida de peso corporal podría deberse a liberación de citocinas por expansión de células CAR-T. La toxicidad puede minimizarse optimizando la dosificación del adaptador.

Ejemplo 50

IHQ del tumor KB y del tumor MDA-MB231

[0512] Para caracterizar y comparar los CAFs FAP+ infiltrantes en tumores KB “fríos” e inmunológicamente y en tumores MDA-MB-231 “calientes”, se implantaron tumores KB o MDA-MB-231 en ratones NOD scid gamma (NSG), y se trataron los ratones con el CAR-T anti-FITC universal y EC17 (folato-fluoresceína). Ambos tumores se extrajeron de los ratones, se fijaron con formalina al 10 % durante la noche y se enjuagaron con etanol al 70 % para la fijación tumoral. A continuación, las células tumorales se enviaron para tinción de IHQ con anticuerpo anti-CD3 humano para detectar células CAR-T humanas o con anticuerpo anti-FAP de ratón para detectar CAFs FAP+ de ratón.

[0513] Como se muestra en la **FIG. 54C**, los resultados de la tinción de IHQ demostraron una falta de infiltración de células CAR-T en el tumor KB inmunológicamente “frío”, pero no en el tumor MDA-MB-231 “caliente”. Se encontró una infiltración elevada de CAFs FAP+ en el tumor KB “frío”, formando una barrera física alrededor del tumor, pero los CAFs infiltrantes fueron significativamente menores en el tumor MDA-MB-231 “caliente”. Se planteó la hipótesis de que estos fibroblastos infiltrantes son una de las razones de un tumor sólido inmunológicamente “frío”.

Ejemplo 51

Afinidad de unión de FAP8-FITC

[0514] Para determinar la afinidad de unión de FAP8-FITC sobre FAP humano (hFAP) y FAP murino (mFAP), las células MDA-MB231-FAP (aproximadamente 0,1 millones de células) se suspendieron e incubaron con concentraciones crecientes de FAP8-FITC a temperatura ambiente durante una hora. Las células se lavaron dos veces y se sometieron a citometría de flujo para Bmax.

[0515] Como se muestra en las **FIGS. 54A-54B**, FAP8-FITC se une a hFAP y mFAP con alta afinidad y especificidad. Se observó una disminución de Kd con el aumento de la longitud del enlazador.

Ejemplo 52

Eficacia de FAP8-FITC en la eliminación de células FAP+ in vitro

[0516] Para determinar la eficacia de FAP8-FITC en la eliminación de células FAP+ in vitro, se sembraron por separado células MDA-hFAP (aproximadamente 7 000 células/pocillo) y Hs894

CAFs (aproximadamente 4 000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos durante la noche. Se añadió FAP8-FITC a las células diana a diversas concentraciones (0 nM, 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 000 nM; n=3). Se añadió E2 CAR-T a las células diana a una relación E:T de 1:3 para MDA-hFAP y de 2:1 para CAFs y se co-incubó durante 48 horas. Las células vivas se midieron mediante células CellTrace+ por citometría de flujo. FAP-FITC medió la eliminación de células que expresan FAP. Véanse las **FIGS. 55A-55B**.

Ejemplo 53

Efecto de FAP8-FITC y EC17 sobre el tumor KB

[0517] Para comparar FAP8-FITC con diferentes longitudes de PEG in vivo, se implantaron tumores KB (tumor FAP–, FR+; CAF FAP+) en ratones NSG y se permitió que crecieran hasta aproximadamente 50 mm³. Se inyectaron por vía intravenosa 10×10^6 E2 CAR-T (VPN 404) con FAP8-FITC y/o EC17. Los tumores se extrajeron cuando el control de enfermedad alcanzó 1 500 mm³ o cuando los tumores se eliminaron en el grupo de tratamiento. Los grupos de ratones fueron los siguientes:

- Grupo 1 (n=5) (solo adaptador FAP-FITC): solo FAP8-FITC (sin CAR-T)
- Grupo 2 (n=6) (solo CAR-T): E2 CAR-T + PBS
- Grupo 3 (n=6) (solo FAP-FITC): E2 CAR-T + FAP-FITC
- Grupo 4 (n=6) (solo EC17): E2 CAR-T + EC17
- Grupo 5 (n=6) (FAP-FITC + EC17): E2 CAR-T + FAP8-FITC + EC17

[0518] Los resultados muestran que FAP8-FITC media un efecto terapéutico combinado en tumores KB. Véanse las **FIGS. 56A-56E**.

Ejemplo 54

La terapia combinada produce mejor proliferación y activación de CAR-T en el punto medio del estudio

[0519] Se extrajo sangre de las venas de la cola de los ratones en el punto medio del estudio. Parte de la sangre se incubó con tampón de lisis de RBC durante 30 minutos en hielo y se lavó tres veces. El resto de la sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos para recoger suero para análisis ELISA de IFN γ humano. A continuación, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos y se lavaron dos veces. Después, las células se tiñeron con anti-hCD3 durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a citometría de flujo.

[0520] FAP8-FITC con PEG15/PEG18 mostró una liberación de citocinas y un recuento de CAR-T similares en el punto medio del estudio. Véanse las **FIGS. 57A-57B**.

Ejemplo 55

La terapia combinada produce mejor proliferación y activación de CAR-T en el punto final del estudio

[0521] Se extrajo sangre de las venas de la cola de los ratones en el punto medio del estudio. Parte de la sangre se incubó con tampón de lisis de RBC durante 30 minutos en hielo y se lavó tres veces. El resto de la sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos para recoger suero para análisis ELISA de IFN γ humano. A continuación, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos y se lavaron dos veces. Después, las células se tiñeron con anti-hCD3 durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a citometría de flujo.

[0522] FAP8-PEG18-FITC mostró mejor liberación de citocinas y mayor recuento de CAR-T en el punto final del estudio. Véanse las **FIGS. 58A-58B**.

Ejemplo 56

La terapia combinada produce mejor infiltración de CAR-T en el tumor KB en el punto final del estudio

[0523] Los tumores se extrajeron de los ratones en el punto final y se digirieron con un kit de disociación de tumores humanos (Miltenyi) con 50 % de enzima R para mejorar la recuperación de linfocitos. A continuación, las células se tiñeron con Zombie violeta y bloqueador Fc en hielo durante 30 minutos y se lavaron dos veces. Después, las células se tiñeron con anticuerpo anti-E2 CAR en hielo durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a citometría de flujo.

[0524] Se observó una mayor infiltración de células CAR-T con la terapia combinada de FAP8-FITC y EC17. Véase la **FIG. 59**.

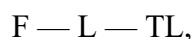
Ejemplo 57*Tinción de IHQ*

[0525] Las muestras tumorales del estudio en ratones (CAR-T + EC17; CAR-T + FAP-FITC; y CAR-T + EC17 + FAP-FITC) se fijaron con formalina al 10 %, se parafinaron y se cortaron para la tinción de IHQ del marcador de proliferación tumoral Ki67. Se observó una disminución de la proliferación tumoral tras el tratamiento con FAP-FITC, posiblemente debido a la eliminación de CAFs conocidos por secretar diversos factores de crecimiento (**FIG. 60**).

[0526] La tinción del marcador de células T humanas CD3 indicó un aumento de la infiltración de células T tras el tratamiento con FAP-FITC, posiblemente debido a la eliminación de CAFs conocidos por formar una barrera física que bloquea la función de las células inmunes (**FIG. 60**).

REALIZACIONES ENUMERADAS DE LA INVENCION REIVINDICADA

[0527] Cláusula 1. Un adaptador biespecífico que comprende la estructura siguiente:



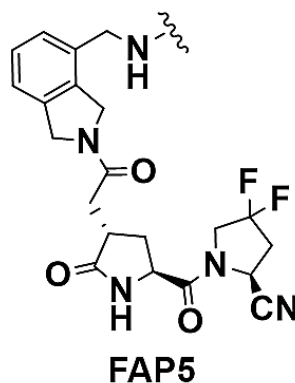
o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

F comprende una fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o N-hidroxisuccinimida (NHS)-fluoresceína,

L comprende un enlazador, y

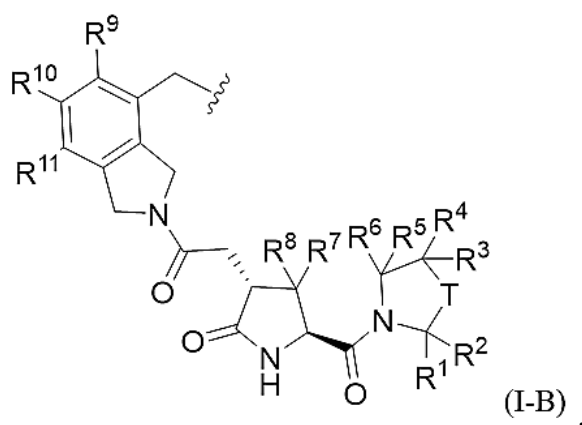
TL comprende un ligando de direccionamiento que comprende un radical de un ligando de proteína activadora de fibroblastos (FAP) o un radical de un ligando del antígeno prostático específico de membrana (PSMA).

[0528] Cláusula 2. El adaptador biespecífico de la cláusula 1, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando de FAP que comprende un ligando FAP8 o un ligando que comprende una estructura de:



en donde es el punto de unión al enlazador.

[0529] Cláusula 3. El adaptador biespecífico de la cláusula 2, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando FAP5 que comprende una estructura representada por la fórmula I-B:



en donde:

— es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O-, o -S-;

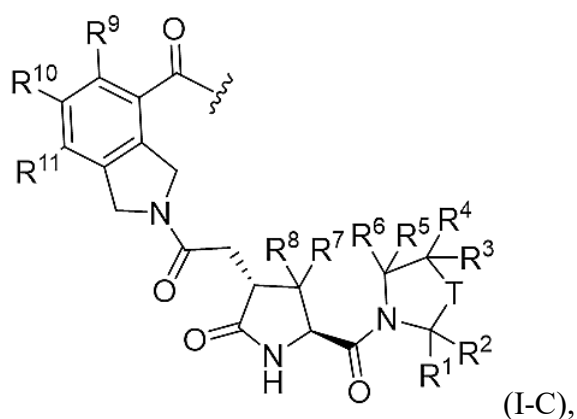
R1 y R2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R5, R6, R7 y R8 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I.

[0530] Cláusula 4. El adaptador biespecífico de la cláusula 2, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando FAP5 que comprende una estructura representada por la fórmula I-C:



en donde:

— es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O-, o -S-;

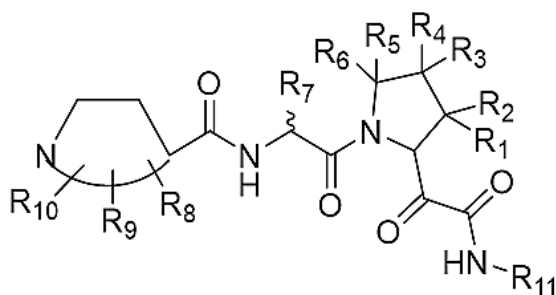
R1 y R2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

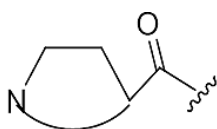
R5, R6, R7 y R8 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I.

[0531] Cláusula 5. El adaptador biespecífico de la cláusula 2, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando FAP8 que comprende una estructura::



En donde:



representa un heterociclo funcionalizado aromático o no aromático, monocíclico o bicíclico, que contiene N, de 5 a 10 miembros, que opcionalmente comprende además de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S;

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

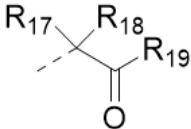
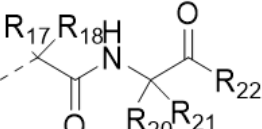
R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

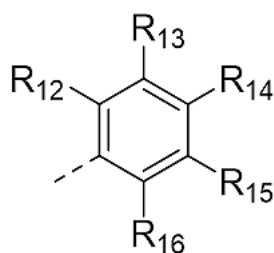
R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R7 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH₂=, -CH₃, CH₃CH₂-, (CH₃)₂CH-, (CH₃)₃C-, -CH₂Ph y -CH₂Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -NH₂, -N₃, -NH=NH, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, C1-C10 alquilo, C3-C10 cicloalquilo,

adamantilo, , , arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



En donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, C1-C3 alquilo, C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, C1-C4 alquilo y C1-C3 alcoxi;

R13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, C1-C3 alquilo, C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, C1-C4 alquilo y C1-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente entre -H y -CH₃; y

R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo.

[0532] Cláusula 6. El adaptador biespecífico de la cláusula 1, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando de PSMA y es ((S)-5-amino-1-carboxipentil)carbamoil)-L-glutámico (PSMAL1) o 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA).

[0533] Cláusula 7. El adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-6, en donde el enlazador comprende o consiste esencialmente en polietilenglicol (PEG) o un derivado de PEG, tal como, opcionalmente: PEG3 a PEG16 y, opcionalmente, PEG4 a PEG15 o PEG3 a PEG12; PEG12, PEG15, PEG16 o PEG18; PEG4 a PEG16; PEG16; PEG3 a PEG15; PEG15; PEG3 a PEG12; PEG6; PEG3 a PEG8; o PEG6.

[0534] Cláusula 8. El adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-6 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento del cáncer.

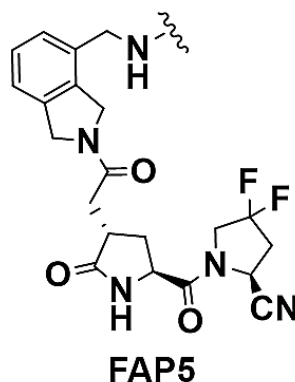
[0535] Cláusula 9. El adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-5, para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa FAP, en donde opcionalmente el enlazador comprende o consiste esencialmente en PEG3 a PEG15 y, opcionalmente, PEG15.

[0536] Cláusula 10. El adaptador biespecífico de la cláusula 1 o la cláusula 6 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa PSMA, en donde opcionalmente el enlazador comprende o consiste esencialmente en PEG3 a PEG12 y, opcionalmente, PEG6, o PEG3 a PEG8 y, opcionalmente, PEG6.

[0537] Cláusula 11. Una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende el adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-10 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0538] Cláusula 12. Una combinación de adaptadores biespecíficos para uso con células CAR-T (receptor de antígeno quimérico) anti-fluoresceína en el tratamiento del cáncer, cuya combinación comprende:

(i) un primer adaptador biespecífico que comprende el adaptador biespecífico de la reivindicación 1 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el ligando de direccionamiento del primer adaptador biespecífico comprende un radical de un ligando FAP8 o un ligando FAP que tiene una fórmula de:



En donde  en donde es el punto de unión al enlazador; y

(ii) un segundo adaptador biespecífico que comprende la estructura siguiente:

F — L — TL,

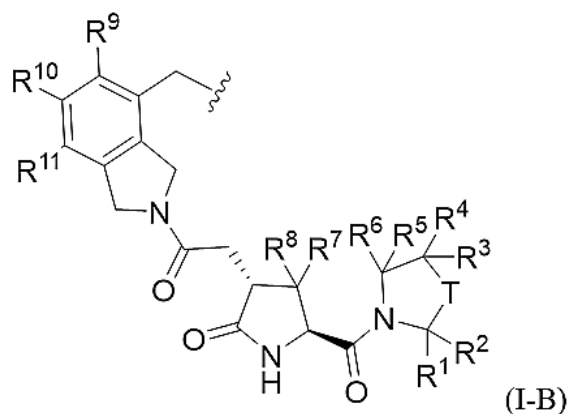
o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

F comprende una fluoresceína, FITC, o NHS-fluoresceína,

L comprende un enlazador, y

TL comprende un ligando de direccionamiento que comprende un radical de un ligando del receptor de folato (FR) o un ligando de PSMA.

[0539] Cláusula 13. La combinación de la cláusula 12, en donde el radical del ligando de FAP del primer adaptador biespecífico tiene una estructura representada por la fórmula I-B:



T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O-, o -S-;

R1 y R2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

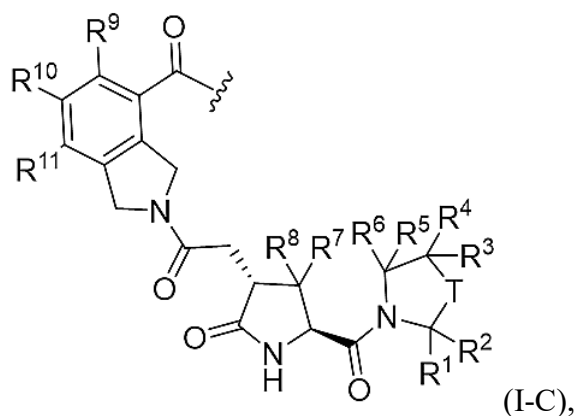
R3 y R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I,

-C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R5, R6, R7 y R8 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I; o

una estructura representada por la fórmula I-C:



En donde:

es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O-, o -S-;

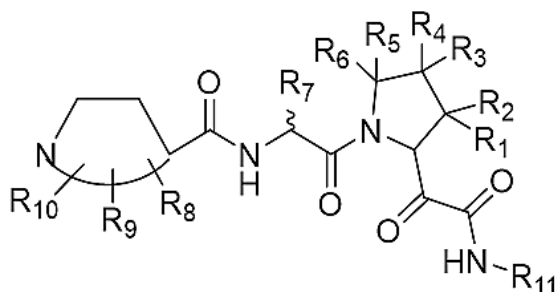
R1 y R2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

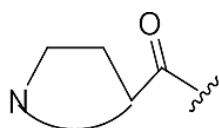
R5, R6, R7 y R8 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I; o

una estructura representada que comprende la fórmula siguiente:



En donde:



en donde:

representa un heterociclo funcionalizado aromático o no aromático, monocíclico o bicíclico, que contiene N, de 5 a 10 miembros, que opcionalmente comprende además de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N y S;

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl,

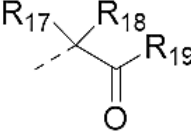
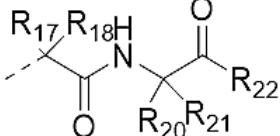
-Br, -I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

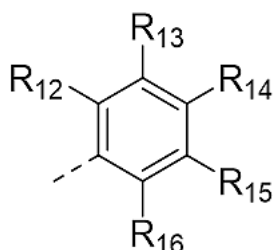
R7 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH₂=, -CH₃, CH₃CH₂-, (CH₃)₂CH-, (CH₃)₃C-, -CH₂Ph y -CH₂Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br,

-I, -NO₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -NH₂, -N₃, -NH=NH, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, C1-C10 alquilo, C3-C10

cicloalquilo, adamantilo, , , arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



en donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, C1-C3 alquilo, C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, C1-C4 alquilo y C1-C3 alcoxi;

R13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, C1-C3 alquilo, C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, C1-C4 alquilo y C1-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente entre -H y -CH₃; y

R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo.

[0540] Cláusula 14. La combinación de la cláusula 12, en donde el ligando de direccionamiento del segundo adaptador biespecífico, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, comprende un radical de un ligando de PSMA.

[0541] Cláusula 15. La combinación de la cláusula 12, en donde el enlazador del primer adaptador biespecífico comprende o consiste esencialmente en PEG.

[0542] Cláusula 16. La combinación de la cláusula 14, en donde el ligando de direccionamiento es o comprende PSMAL1 o DUPA.

[0543] Cláusula 17. La combinación de la cláusula 12, en donde el ligando de direccionamiento del segundo adaptador biespecífico es un radical de un folato o un fragmento funcional o análogo del mismo.

[0544] Cláusula 18. La combinación de la cláusula 17, en donde el folato es folato, dihidrofolato, tetrahydrofolato, 5,10-metileno tetrahydrofolato (5,10-MTHF), 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) o raltitrexed.

[0545] Cláusula 19. La combinación de la cláusula 16, en donde el ligando de PSMA es DUPA y el enlazador comprende o consiste esencialmente en PEG o un derivado de PEG, tal como, opcionalmente: PEG3 a PEG12 y, opcionalmente, PEG6; PEG3 a PEG16 y, opcionalmente, PEG4 a PEG15 o PEG3 a PEG12; PEG12, PEG15, PEG16 o PEG18; PEG4 a PEG16 y, opcionalmente, PEG16; PEG3 a PEG15 y, opcionalmente, PEG15; PEG3 a PEG8 y, opcionalmente, PEG6.

[0546] Cláusula 20. La combinación de cualquiera de las cláusulas 12-19 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento del cáncer.

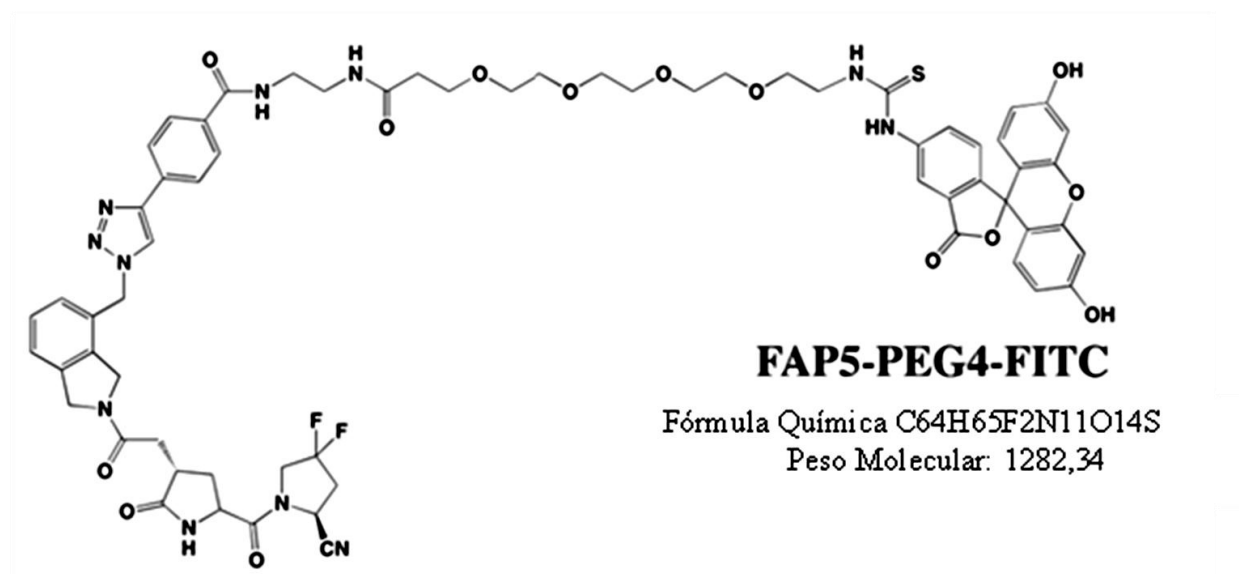
[0547] Cláusula 21. La combinación de cualquiera de las cláusulas 12-19 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa FAP.

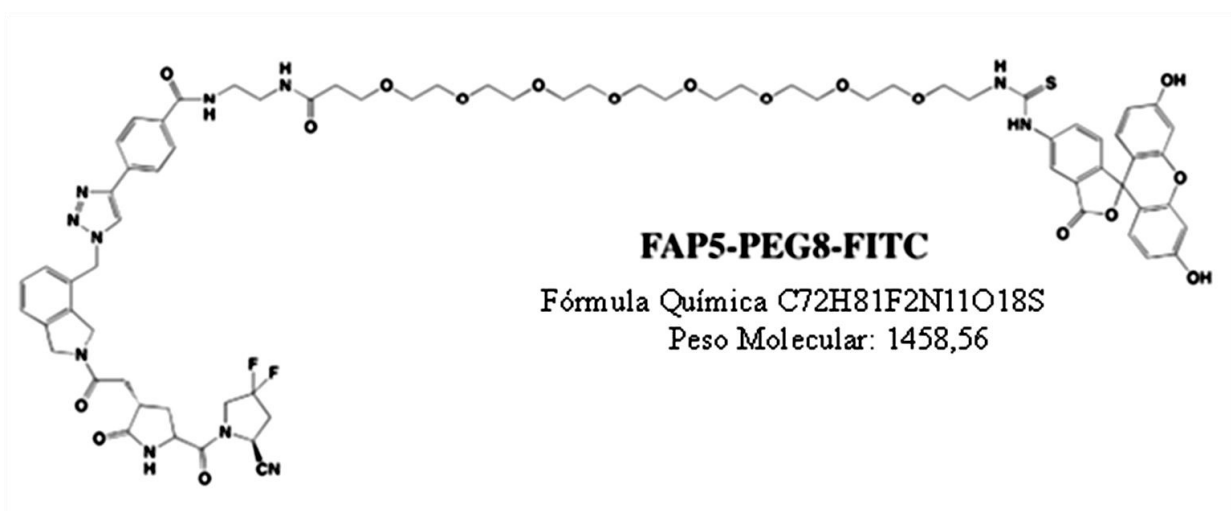
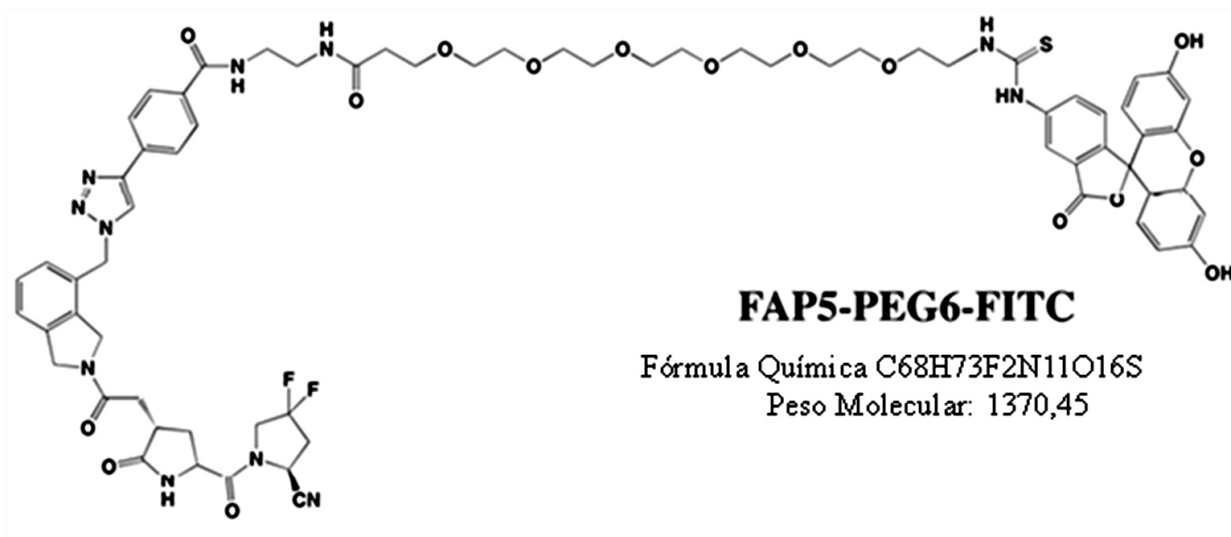
[0548] Cláusula 22. La combinación de cualquiera de las cláusulas 12-16 y 19 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa PSMA.

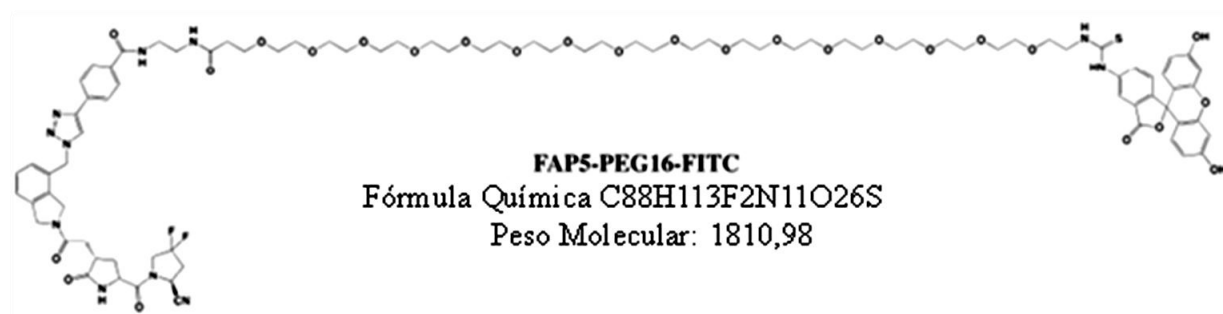
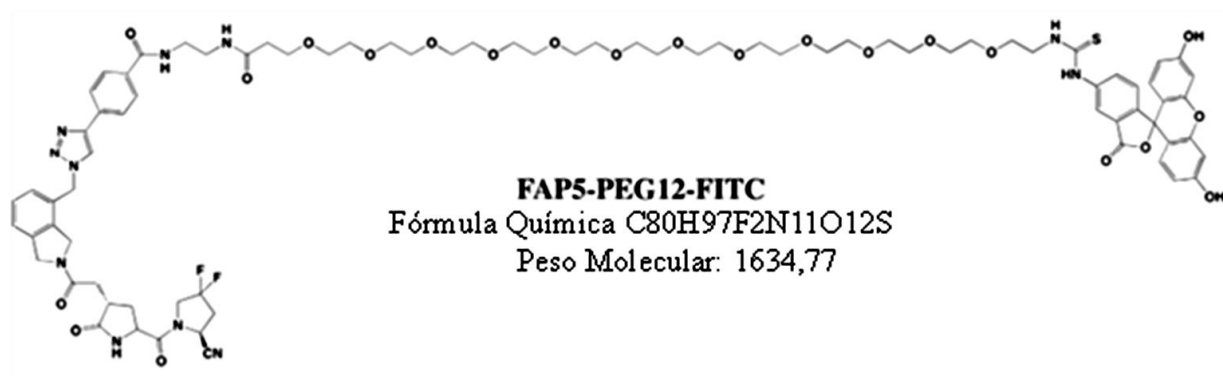
[0549] Cláusula 23. La combinación de cualquiera de las cláusulas 12-15, 17 y 18 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa folato.

[0550] Cláusula 24. La combinación de cualquiera de las cláusulas 12-19, en donde el primer y el segundo adaptador biespecífico se formulan en composiciones farmacéuticas separadas.

[0551] Cláusula 25. Un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa FAP, cuyo adaptador tiene o comprende una de las estructuras siguientes:

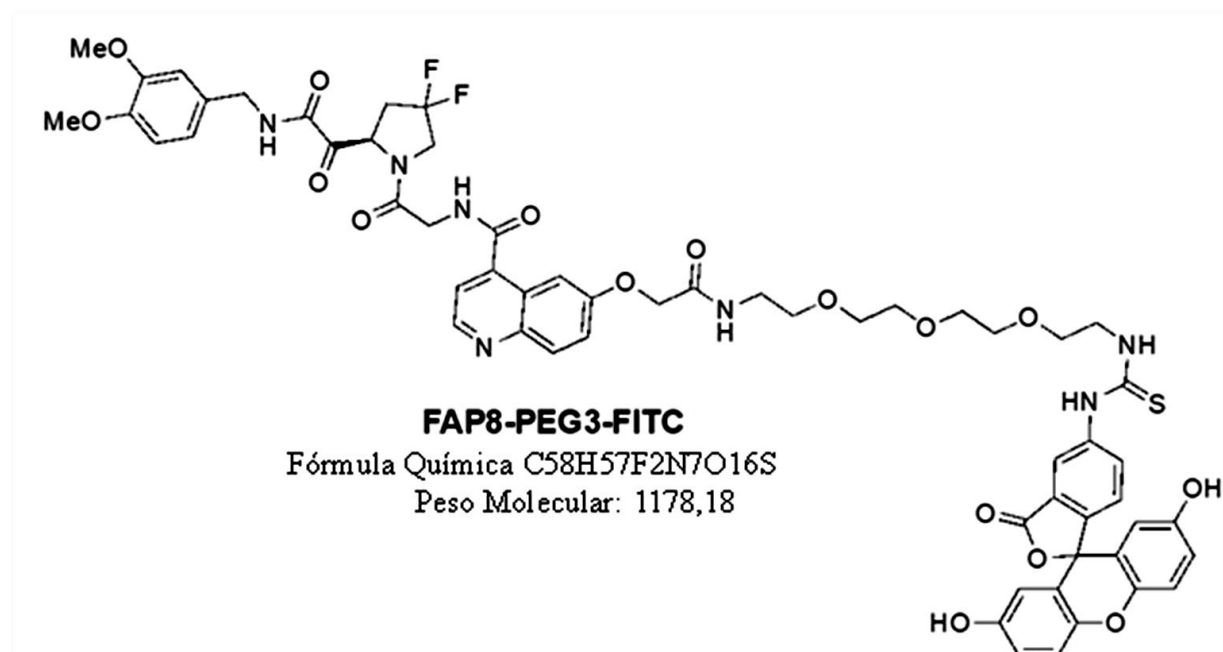


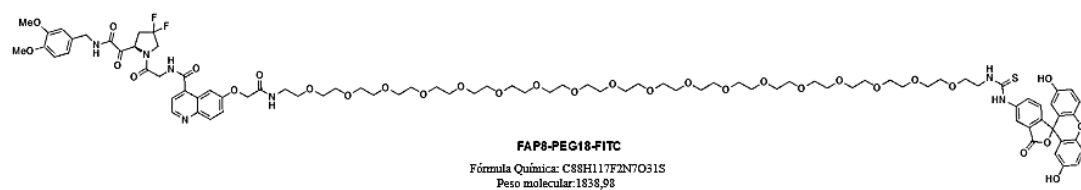
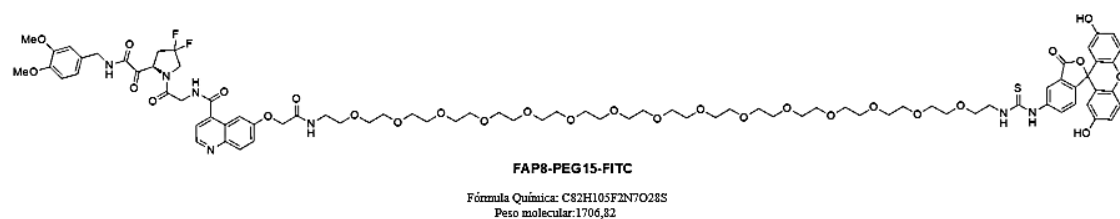
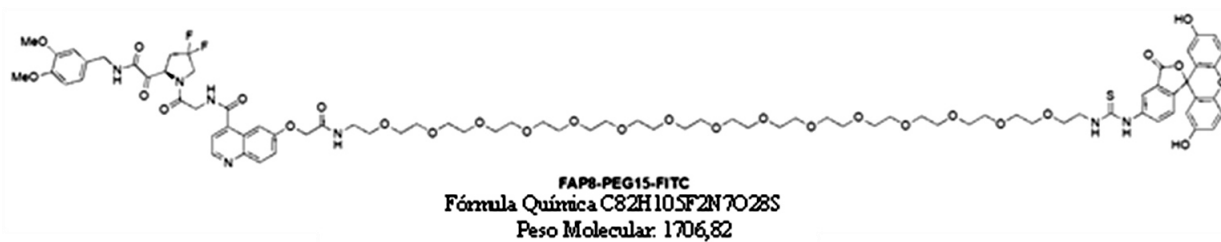
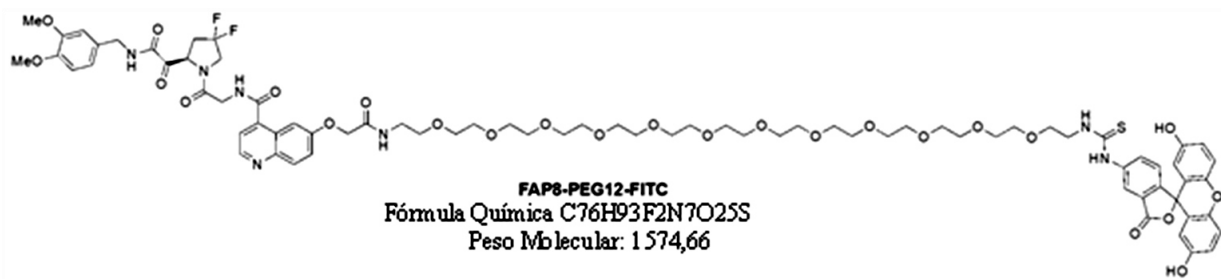
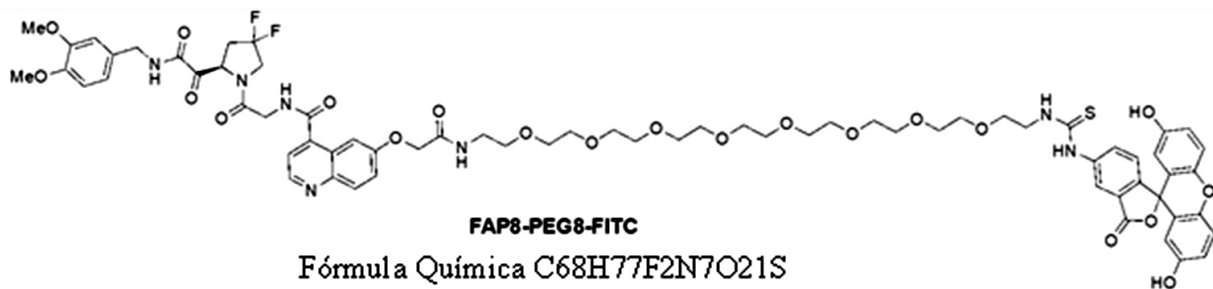




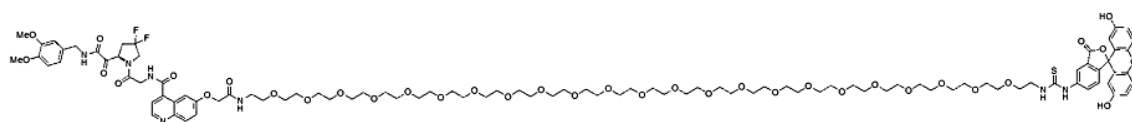
o que comprende una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las estructuras anteriores.

[0552] **Cláusula 26.** Un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer que expresa FAP, cuyo adaptador tiene o comprende una de las estructuras siguientes:





,

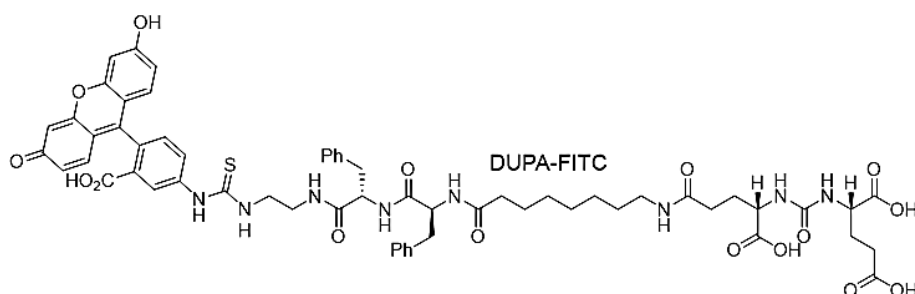


FAP8-PEG23-FITC

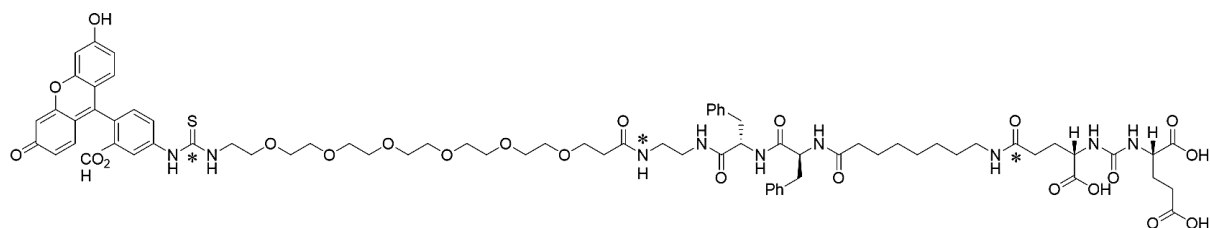
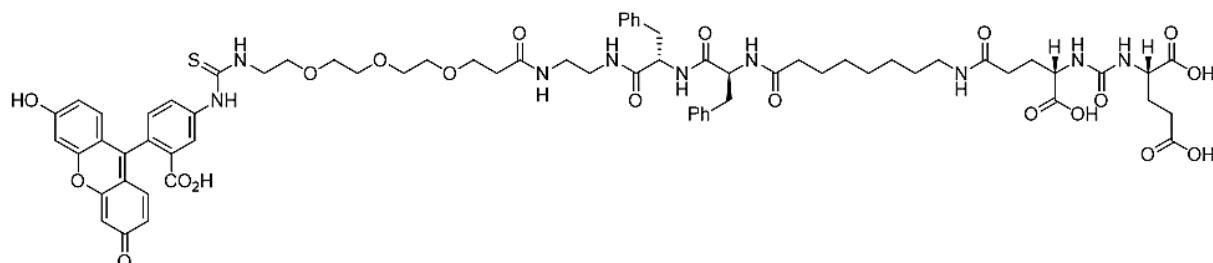
Fórmula Química: C98H137F2N7O36S
Peso molecular: 2059,24

, o que comprende una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las estructuras anteriores.

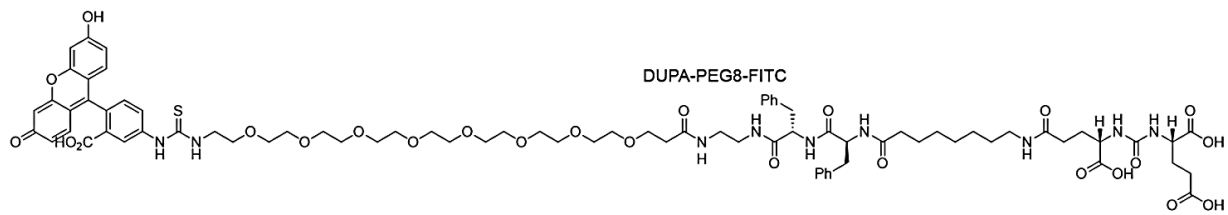
[0553] Cláusula 27. Un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de un cáncer PSMA, cuyo adaptador tiene o comprende una de las estructuras siguientes:

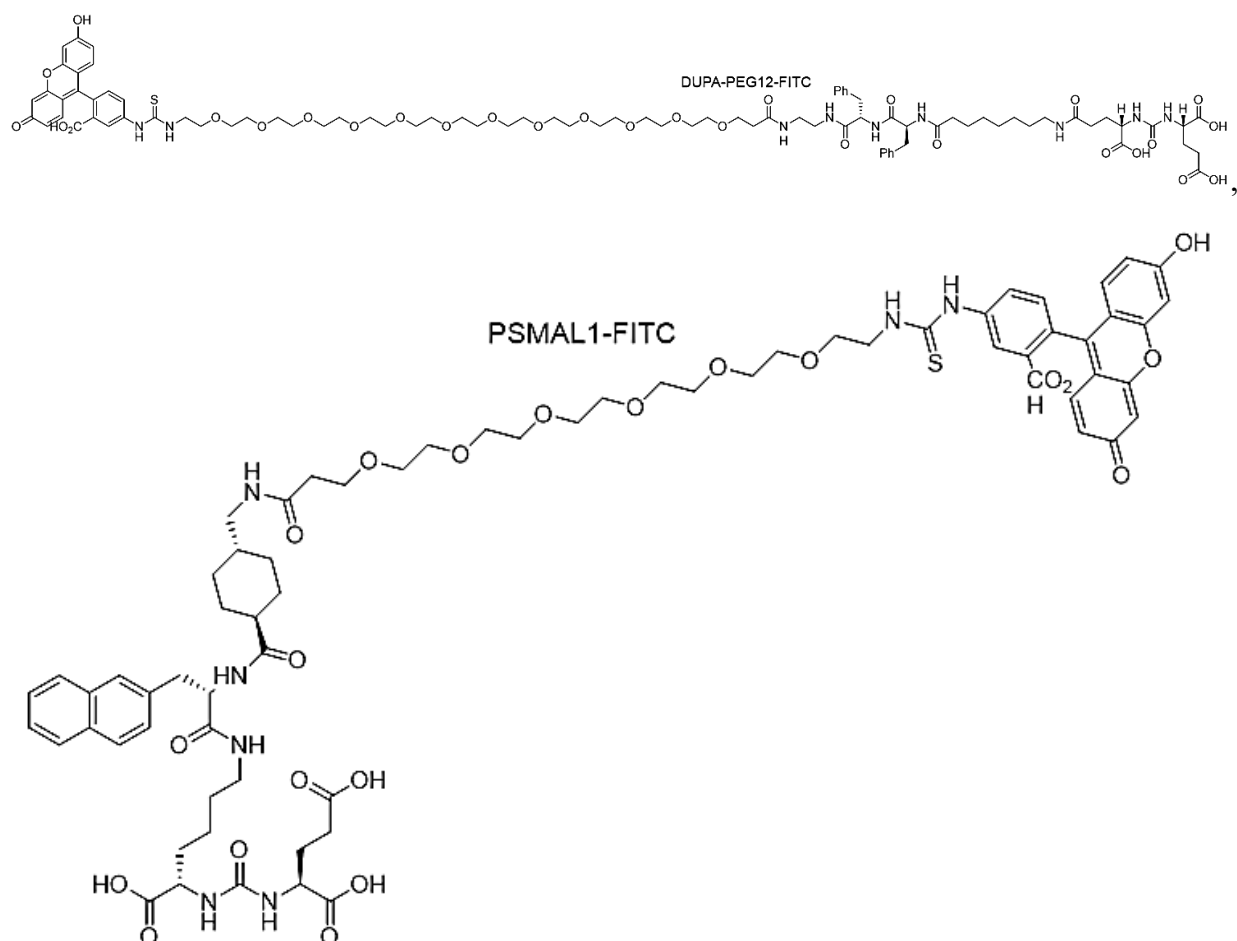


DUPA-PEG3-FITC



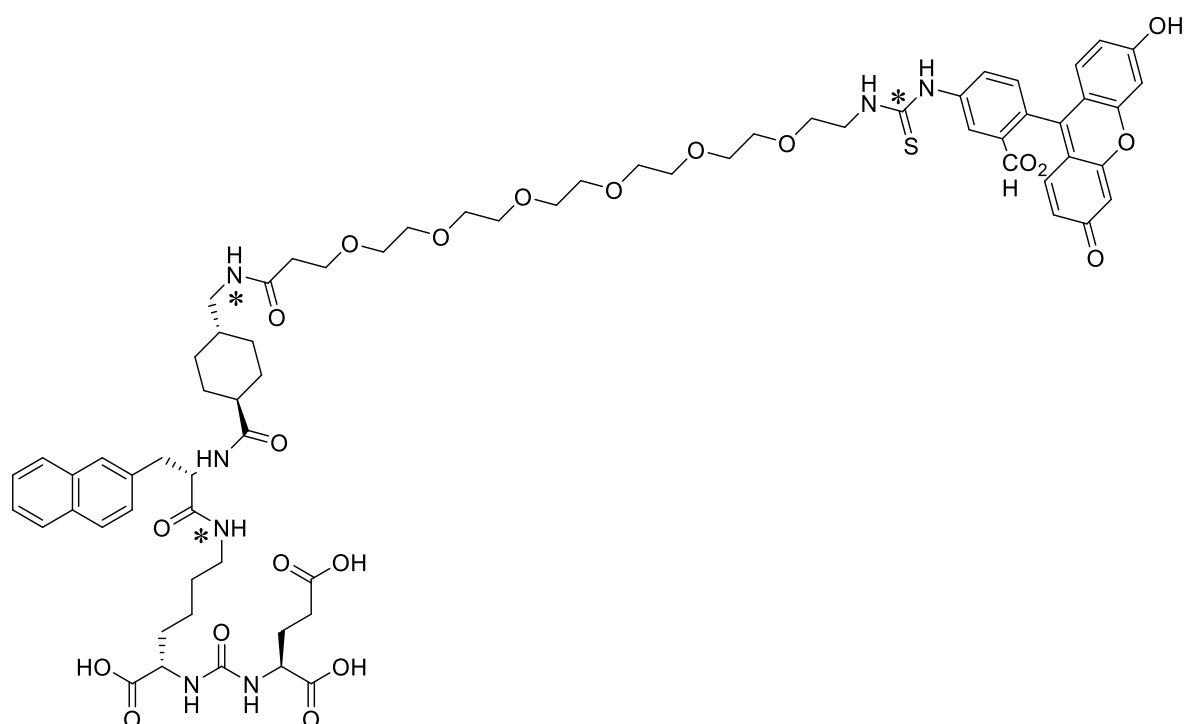
DUPA-PEG8-FITC





o que comprende una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las anteriores.

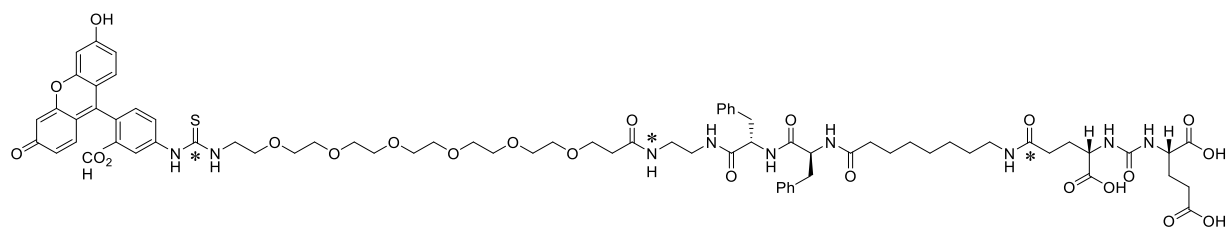
[0554] Cláusula 28. Un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa PSMA, cuyo adaptador tiene la estructura:



o es

una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0555] Cláusula 29. Un adaptador biespecífico para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa PSMA, cuyo adaptador tiene la estructura::



o es una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0556] Cláusula 30. Un kit que comprende: (i) al menos una dosis unitaria de un adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-10 o 25-29, una composición farmacéutica que comprende un adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-10 o 25-29 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, o una combinación de cualquiera de las cláusulas 12-24; y (ii) al menos una dosis unitaria 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.

[0557] Cláusula 31. Un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer 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 1-10 y 25-29, una composición farmacéutica de la cláusula 11, o una combinación de cualquiera de las cláusulas 12-24; tras lo cual el sujeto es tratado contra el cáncer.

[0558] Cláusula 32. El método de la cláusula 31, en donde el CAR comprende: una región de reconocimiento que comprende una región de fragmento de cadena única variable (scFv) de un anticuerpo anti-fluoresceína; un dominio coestimulador y el dominio coestimulador 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 célula T o un receptor Fc γ .

[0559] Cláusula 33. El método de la cláusula 31, en donde la fluoresceína del adaptador biespecífico se une a la célula CAR-T anti-fluoresceína con afinidad al exponerse a ella, y el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico enlaza la célula CAR-T anti-fluoresceína unida a una célula cancerosa o CAF diana cuando el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico se une con afinidad a un receptor en dicha célula cancerosa o CAF diana.

[0560] Cláusula 34. El método de la cláusula 33, en donde el receptor en la célula cancerosa o CAF diana es un FAP sobreexpresado, un PSMA sobreexpresado y/o un FR.

[0561] Cláusula 35. El método de la cláusula 31, en donde (i) y (ii) se administran simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0562] Cláusula 36. El método de la cláusula 31, en donde (ii) comprende la combinación de cualquiera de las cláusulas 25-29 y el primer y segundo adaptadores biespecíficos se administran al sujeto simultáneamente por la misma o diferentes vías.

[0563] Cláusula 37. El método de la cláusula 31, en donde (ii) comprende la combinación de cualquiera de las cláusulas 25-29 y el primer y segundo adaptadores biespecíficos se administran al sujeto secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0564] Cláusula 38. El método de cualquiera de las cláusulas 31-37, en donde (i) y (ii) se administran por vía intravenosa.

[0565] Cláusula 39. El método de la cláusula 31, en donde el cáncer es un cáncer que expresa FAP y al menos un adaptador biespecífico de (ii) comprende un radical de un ligando de FAP.

[0566] Cláusula 40. El método de la cláusula 31, en donde el cáncer es un cáncer que expresa PSMA y al menos un adaptador biespecífico de (ii) comprende un radical de un ligando de PSMA.

[0567] [Cláusula 41. El método de la cláusula 31, en donde el cáncer es un cáncer que expresa receptor de folato y (ii) comprende una combinación de cualquiera de las cláusulas 12-15, 17 y 18.

[0568] Cláusula 42. Un método para tratar cáncer que expresa FAP en un sujeto, que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer 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) el adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-5 o una composición farmacéutica que comprende el mismo y un

vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tras lo cual el sujeto es tratado contra el cáncer.

[0569] Cláusula 43. El método de la cláusula 42, en donde el CAR tiene una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína.

[0570] Cláusula 44. El método de la cláusula 42 o 43, en donde el CAR comprende: un dominio coestimulador y el dominio coestimulador 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 célula T o un receptor Fc γ .

[0571] Cláusula 45. Un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer 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) una combinación de cualquiera de las cláusulas 12-24; tras lo cual el sujeto es tratado contra el cáncer.

[0572] Cláusula 46. El método de la cláusula 45, en donde el CAR comprende: una región de reconocimiento que comprende una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína; un dominio coestimulador y el dominio coestimulador 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 célula T o un receptor Fc γ .

[0573] Cláusula 47. El método de la cláusula 45, en donde (i) y (ii) se administran simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0574] Cláusula 48. El método de la cláusula 45, en donde el primer y el segundo adaptadores biespecíficos de la combinación se administran al sujeto simultáneamente por la misma o diferentes vías.

[0575] Cláusula 49. El método de la cláusula 45, en donde el primer y el segundo adaptadores biespecíficos de la combinación se administran al sujeto secuencialmente, en cualquier orden, por la misma o diferentes vías.

[0576] Cláusula 50. El método de cualquiera de las cláusulas 45-49, en donde (i) y (ii) se administran por vía intravenosa.

[0577] Cláusula 51. El método de cualquiera de las cláusulas 31-49 que además comprende obtener imágenes del cáncer en el sujeto.

[0578] Cláusula 52. El método de la cláusula 51, en donde la obtención de imágenes del cáncer comprende imagen óptica, tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

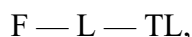
[0579] Cláusula 53. El método de cualquiera de las cláusulas 31-49, en donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer endometrial, cáncer de mama, glioma (opcionalmente, glioma estadio 3-4), o carcinoma de células renales de células claras (opcionalmente, estadio 3-4).

[0580] Cláusula 54. Un método para mejorar la activación de células CAR-T que comprende: proporcionar un adaptador biespecífico de cualquiera de las cláusulas 1-10 y 25-29, una composición farmacéutica de la cláusula 11, o una combinación de cualquiera de las cláusulas 12-24; y 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, la composición farmacéutica o 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.

[0581] Cláusula 55. El método de la cláusula 54, en donde las células CAR-T anti-fluoresceína están en la circulación sistémica en un sujeto cuando se exponen al adaptador biespecífico.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS DE ACUERDO CON EL ARTÍCULO 34 DEL PCT

1. Un adaptador biespecífico que comprende la siguiente estructura:



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

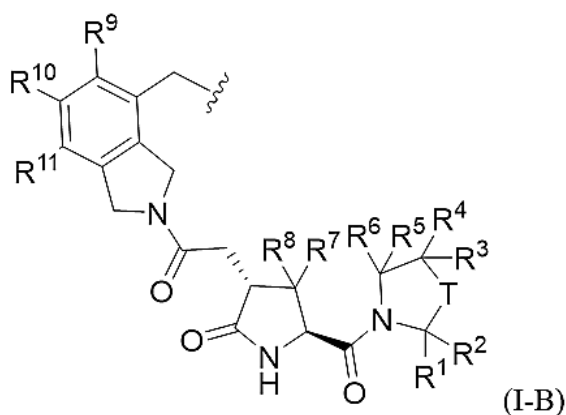
F comprende una fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o N-hidroxisuccinimida (NHS)-fluoresceína;

L comprende un enlazador (linker); y

TL comprende un ligando de direccionamiento que comprende un radical de un ligando de la proteína de activación de fibroblastos (FAP) o un radical de un ligando del antígeno prostático específico de membrana (PSMA).

2. El adaptador biespecífico de la reivindicación 1, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando FAP5 o un radical de un ligando FAP8.

3. El adaptador biespecífico de la reivindicación 2, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando FAP5 que comprende una estructura representada por la fórmula I-B:



en donde:

es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O-, o -S-;

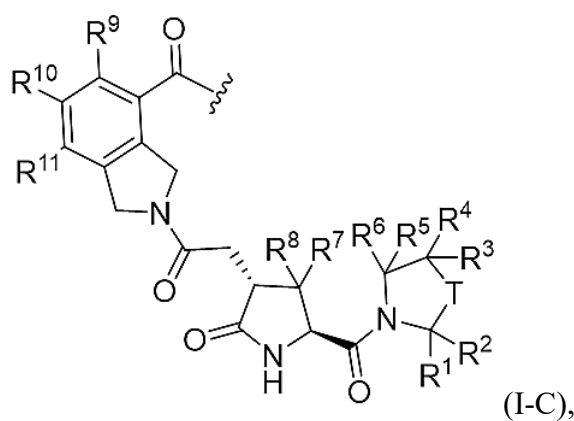
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo-, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I.

4. El adaptador biespecífico de la reivindicación 2, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando FAP5 que comprende una estructura representada por la fórmula I-C:



en donde:

— es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O-, o -S-;

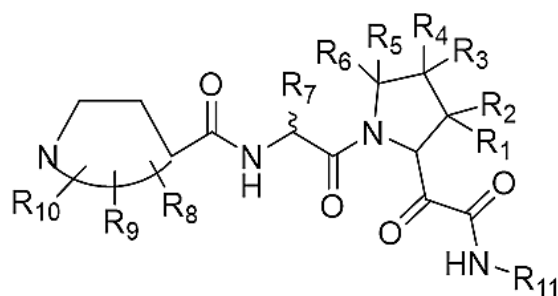
R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo-, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

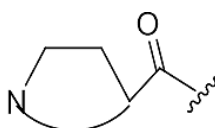
R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I.

5. El adaptador biespecífico de la reivindicación 2, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando FAP8 que comprende una estructura:



en donde:



representa un heterociclo funcionalizado N-containing de 5 a 10 miembros, aromático o no aromático, mono- o bicíclico, que opcionalmente comprende adicionalmente 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, N y S;

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

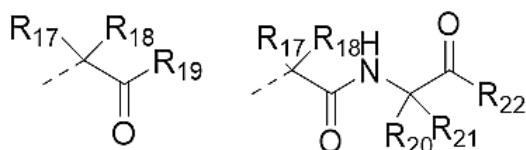
R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

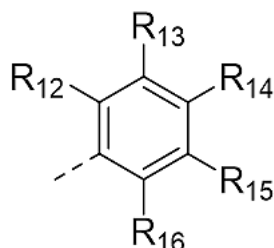
R7 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH₂=, -CH₃, CH₃CH₂-, (CH₃)₂CH-, (CH₃)₃C-, -CH₂Ph y -CH₂Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -SO₃H, -SO₂NH₂, -NH₂, -N₃, -NH=NH, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, alquilo C1-C10, cicloalquilo C3-



C10, adamantilo, , arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



en donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -C1-C3 alquilo, -C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, -C1-C4 alquilo y -C1-C3 alcoxi;

R13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, -C1-C3 alquilo, -C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -C1-C4 alquilo y -C1-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente entre -H y -CH₃; y

R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo.

6. El adaptador biespecífico de la reivindicación 1, en donde el ligando de direccionamiento comprende un radical de un ligando de PSMA y es ácido (((S)-5-amino-1-carboxipentilo)carbamoil)-L-glutámico (PSMAL1) o ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA).

7. El adaptador biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el enlazador comprende o consiste esencialmente en polietilenglicol (PEG) o un derivado de PEG, tal como, opcionalmente:

PEG3 a PEG16 y, opcionalmente, PEG4 a PEG15 o PEG3 a PEG12;

PEG12, PEG15, PEG16 o PEG18;

PEG4 a PEG16;

PEG16;

PEG3 a PEG15;

PEG15;

PEG3 a PEG12;

PEG6;

PEG3 a PEG8; o

PEG6..

8. El adaptador biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso con una célula T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) en el tratamiento del cáncer.

9. El adaptador biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa FAP, en donde

opcionalmente el enlazador comprende o consiste esencialmente en PEG3 a PEG15 y, opcionalmente, PEG15.

10. El adaptador biespecífico de la reivindicación 1 o de la reivindicación 6 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa PSMA, en donde opcionalmente el enlazador comprende o consiste esencialmente en PEG3 a PEG12 y, opcionalmente, PEG6, o PEG3 a PEG8 y, opcionalmente, PEG6.

11. Una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende el adaptador biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Una combinación de adaptadores biespecíficos para uso con células T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) en el tratamiento del cáncer, que comprende:

(i) un primer adaptador biespecífico que comprende el adaptador biespecífico de la reivindicación 1 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el ligando de direccionamiento del primer adaptador biespecífico comprende un radical de un ligando FAP5 o un radical de un ligando FAP8; y

(ii) un segundo adaptador biespecífico que comprende la siguiente estructura::



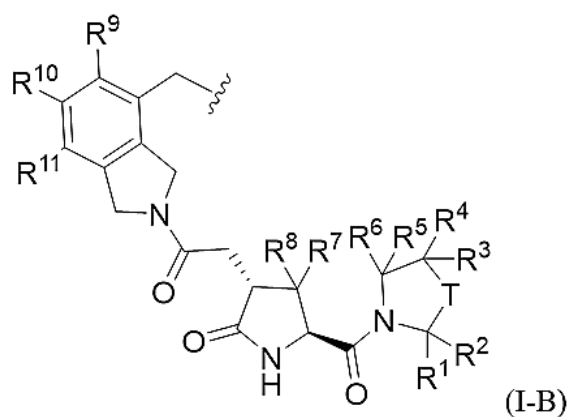
o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

F comprende una fluoresceína, FITC o NHS-fluoresceína,

L comprende un enlazador, y

TL comprende un ligando de direccionamiento que comprende un radical de un ligando del receptor de folato (FR) o un radical de un ligando de PSMA.

13. La combinación de la reivindicación 12, en donde el radical del ligando de FAP del primer adaptador biespecífico tiene una estructura representada por la fórmula I-B:



T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O-, o -S-;

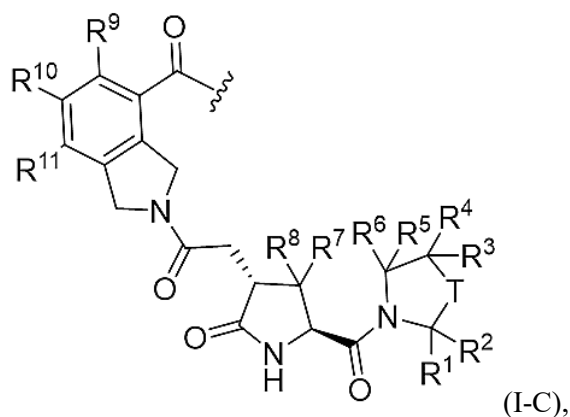
R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo-, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I; o

una estructura representada por la fórmula I-C:



En donde:

es el punto de unión al enlazador;

T es metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), amino sustituido o no sustituido (-NH-), -O-, o -S-;

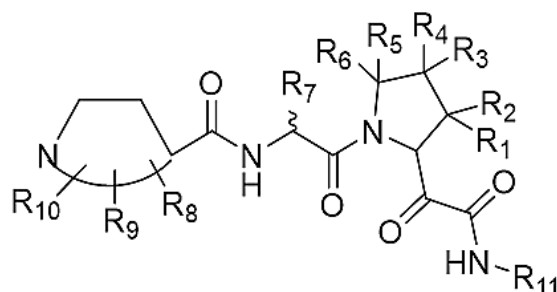
R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -CN, -CHO, -B(OH)₂, -C(O)alquilo, -C(O)arilo-, -C=C-C(O)arilo, -C=C-S(O)₂arilo, -CO₂H, -SO₃H, -SO₂NH₂, -PO₃H₂, -SO₂F y 5-tetrazolilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, F, Cl, Br, I, -C1-6alquilo, -O-C1-6alquilo y -S-C1-6alquilo;

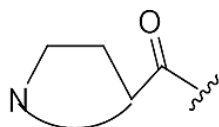
R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo y halógeno; y

R9, R10 y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, -C1-6 alquilo, -O-C1-6alquilo, -S-C1-6alquilo, F, Cl, Br e I; o

una estructura que comprende la siguiente fórmula:



En donde:



representa un heterociclo funcionalizado N-containing de 5 a 10 miembros, aromático o no aromático, mono- o bicíclico, que opcionalmente comprende adicionalmente 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, N y S;

R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

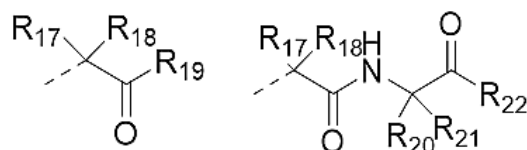
R3 y R4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

R5 y R6 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo;

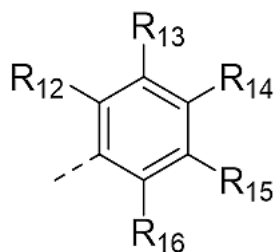
R7 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, OH, CH2=, -CH3, CH3CH2-, (CH3)2CH-, (CH3)3C-, -CH2Ph y -CH2Ph sustituido;

R8-R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NO2, -SO3H, -SO2NH2, -NH2, -N3, -NH=NH, -C1-6 alquilo, -O-C1-6 alquilo y -S-C1-6 alquilo; y

R11 se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, alquilo C1-C10, cicloalquilo



C3-C10, adamantilo, , arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo C7-C20 sustituido o no sustituido, en donde el arilo es:



En donde:

R12 y R16 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -C1-C3 alquilo, -C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en H, D, halógeno, -C1-C4 alquilo y -C1-C3 alcoxi;

R13, R14 y R15 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -OMe, -C1-C3 alquilo, -C1-C3 alcoxi, -CF₃ y -C(=O)-OR₂₃, en donde R₂₃ se selecciona del grupo que consiste en -H, -D, halógeno, -C1-C4 alquilo y -C1-C3 alcoxi;

R17, R18, R20 y R21 se seleccionan independientemente entre -H y -CH₃; y

R19 y R22 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en fenilo, dimetoxifenilo y arilo..

14. La combinación de la reivindicación 12, en donde el ligando de direccionamiento del segundo adaptador biespecífico, o su sal o hidrato farmacéuticamente aceptable, comprende un radical de un ligando de PSMA.

15. La combinación de la reivindicación 12, en donde el enlazador del primer adaptador biespecífico comprende o consiste esencialmente en polietilenglicol (PEG).

16. La combinación de la reivindicación 14, en donde el ligando de direccionamiento es o comprende (((S)-5-amino-1-carboxipentilo)carbamoil)-L-glutámico (PSMAL1) o ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA).

17. La combinación de la reivindicación 12, en donde el ligando de direccionamiento del segundo adaptador biespecífico es un radical de un folato o un fragmento o análogo funcional del mismo.

18. La combinación de la reivindicación 17, en donde el folato es folato, dihidrofolato, tetrahydrofolato, 5,10-metilentetrahydrofolato (5,10-MTHF), 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) o raltitrexed.

19. a combinación de la reivindicación 16, en donde el ligando de PSMA es DUPA y el enlazador comprende o consiste esencialmente en PEG o un derivado de PEG, tal como, opcionalmente:

PEG3 a PEG12 y, opcionalmente, PEG6;

PEG3 a PEG16 y, opcionalmente, PEG4 a PEG15 o PEG3 a PEG12;

PEG12, PEG15, PEG16 o PEG18;

PEG4 a PEG16 y, opcionalmente, PEG16;

PEG3 a PEG15 y, opcionalmente, PEG15;

PEG3 a PEG8 y, opcionalmente, PEG6.

20. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-19 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento del cáncer.

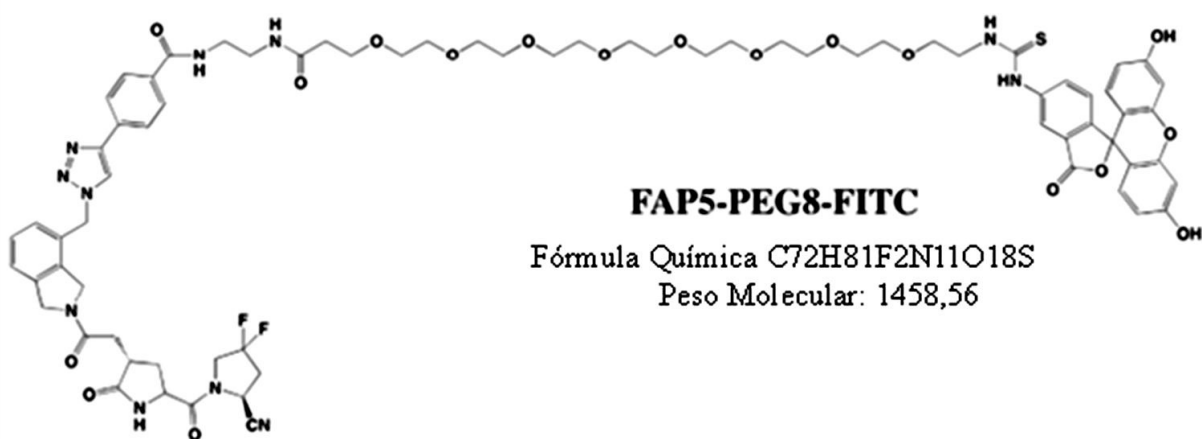
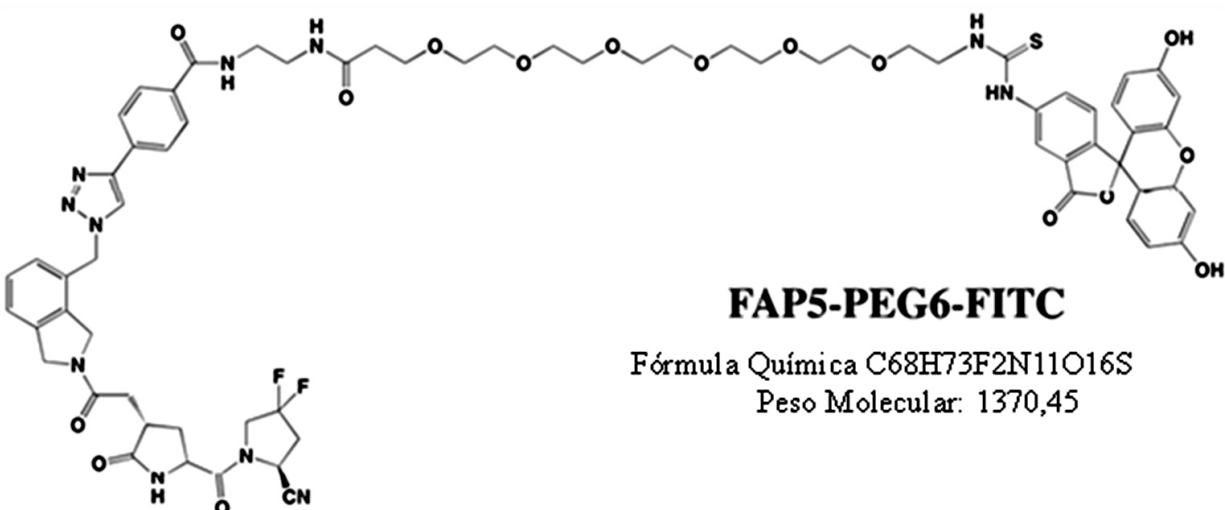
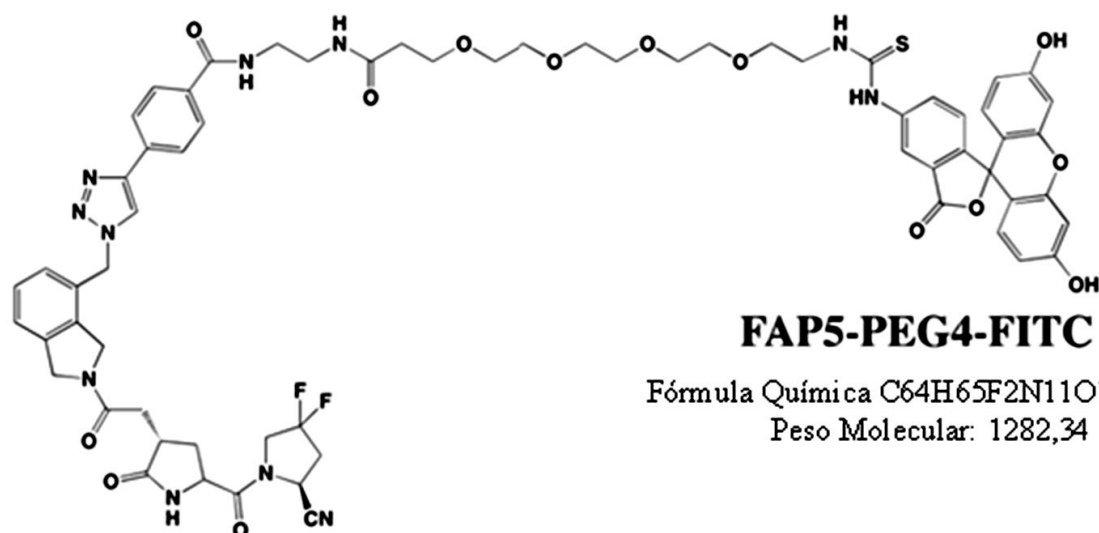
21. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-19 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa FAP.

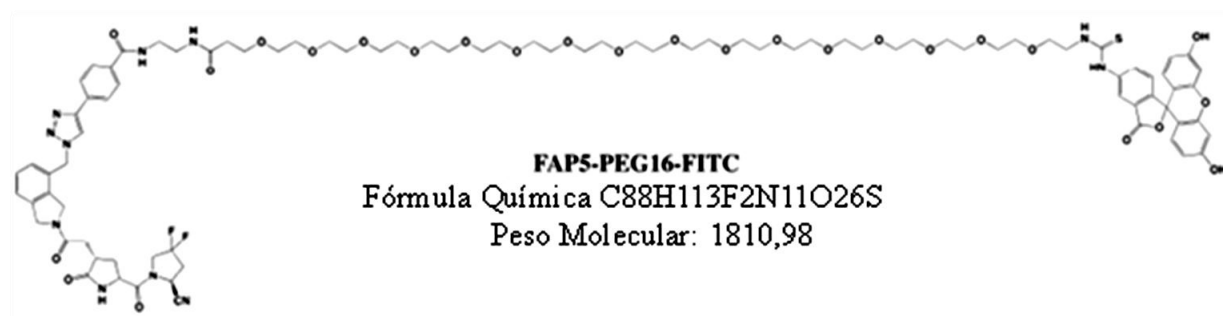
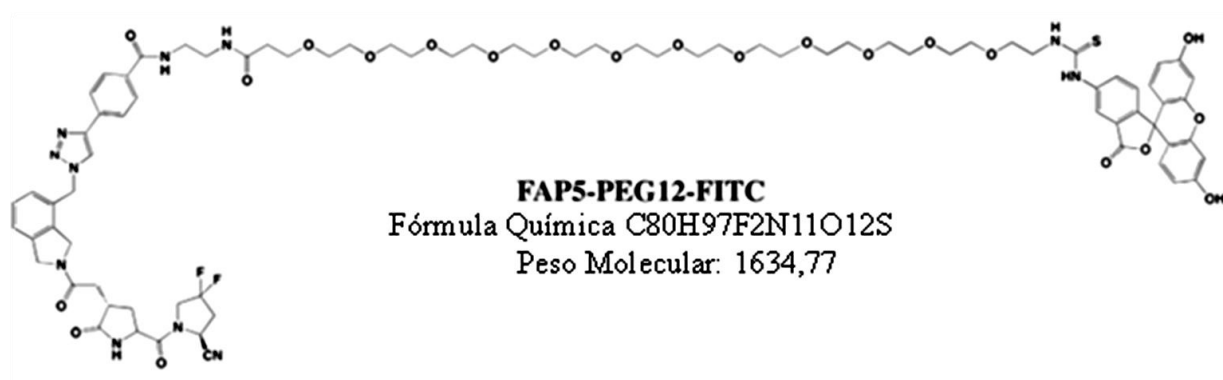
22. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-16 y 19 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa PSMA.

23. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-15, 17 y 18 para uso con una célula CAR-T anti-fluoresceína en el tratamiento de cáncer que expresa el receptor de folato.

24. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-19, en donde el primer y el segundo adaptador biespecífico están formulados en composiciones farmacéuticas separadas.

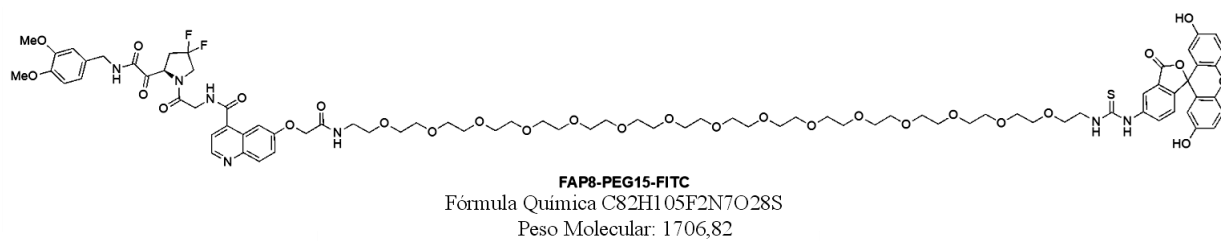
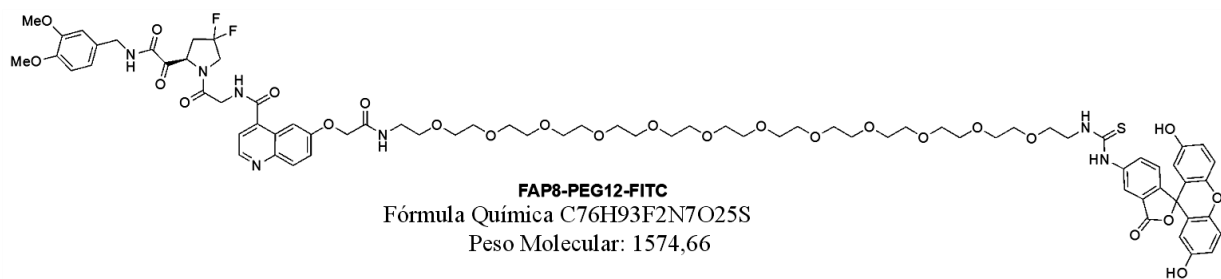
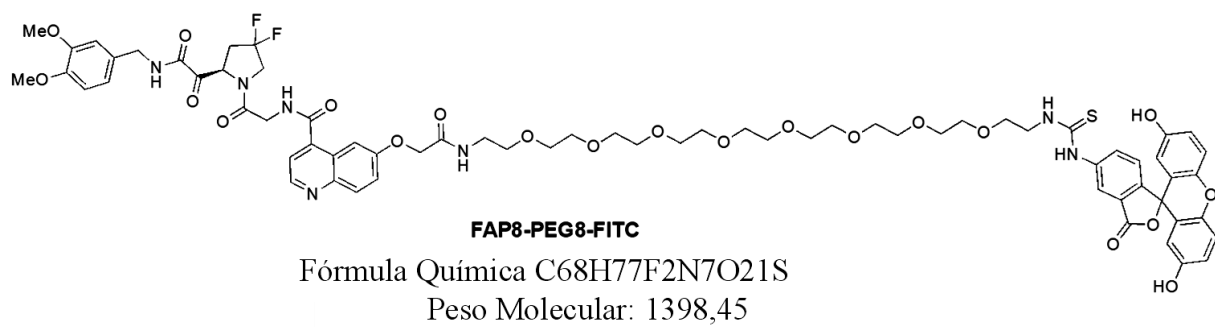
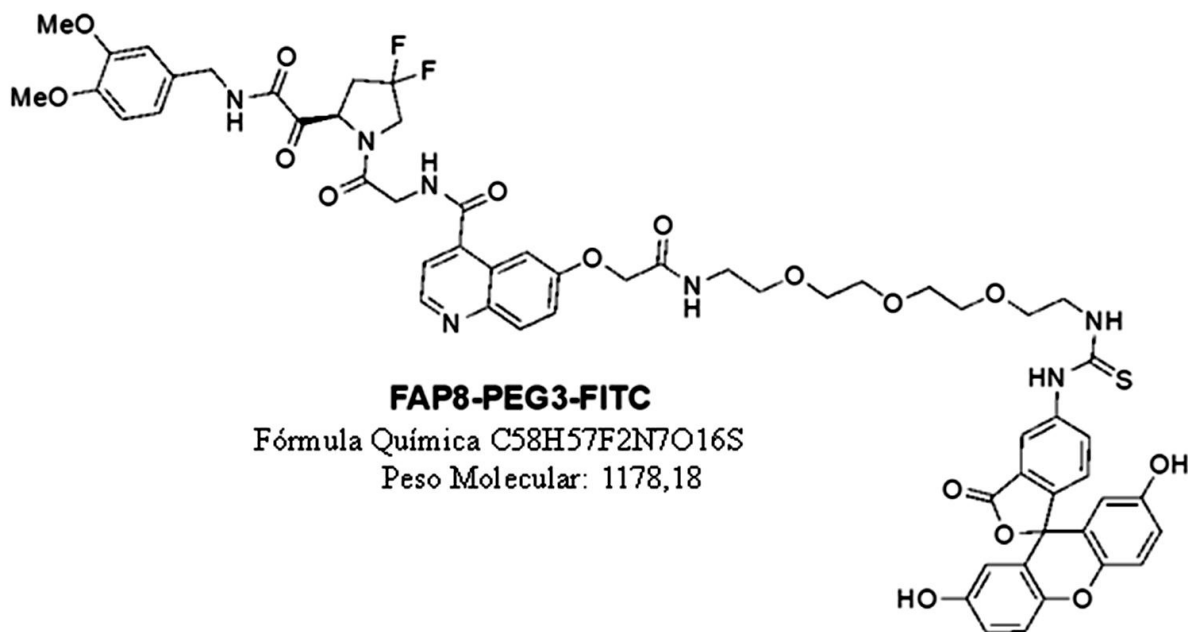
25. Un adaptador biespecífico para uso con una célula T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) en el tratamiento de un cáncer que expresa la proteína de activación de fibroblastos (FAP), cuyo adaptador tiene o comprende una de las siguientes estructuras:



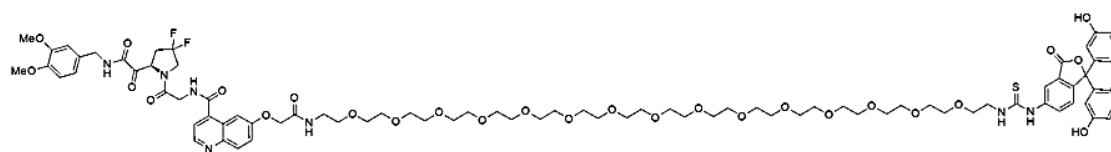


o que comprende una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las estructuras anteriores.

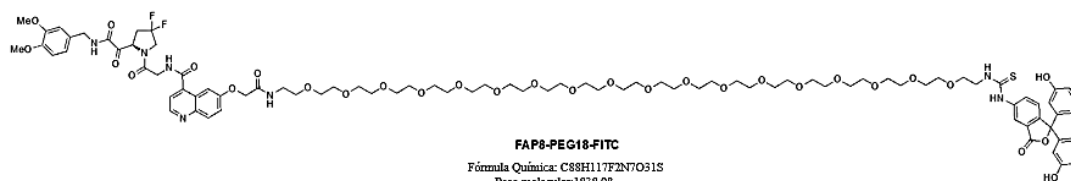
26. Un adaptador biespecífico para uso con una célula T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) en el tratamiento de un cáncer que expresa FAP, cuyo adaptador tiene o comprende una de las siguientes estructuras:



,

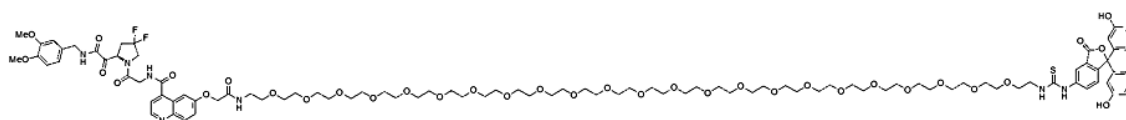
**FAP8-PEG15-FITC**

Fórmula Química: C₈₂H₁₀₅F₂N₇O₂₈S
Peso molecular: 1706,82

**FAP8-PEG18-FITC**

Fórmula Química: C₈₈H₁₁₇F₂N₇O₃₁S
Peso molecular: 1838,98

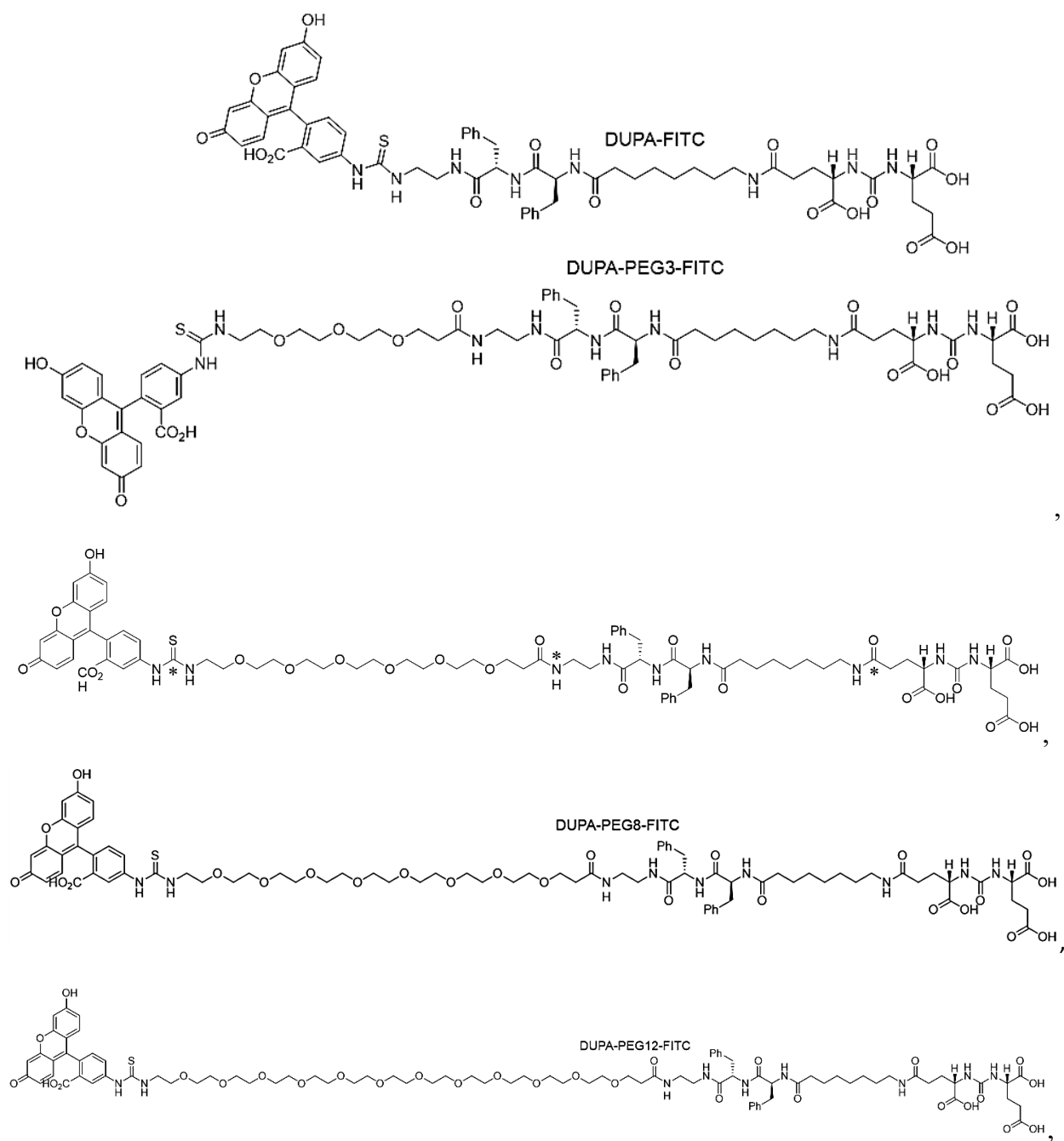
,

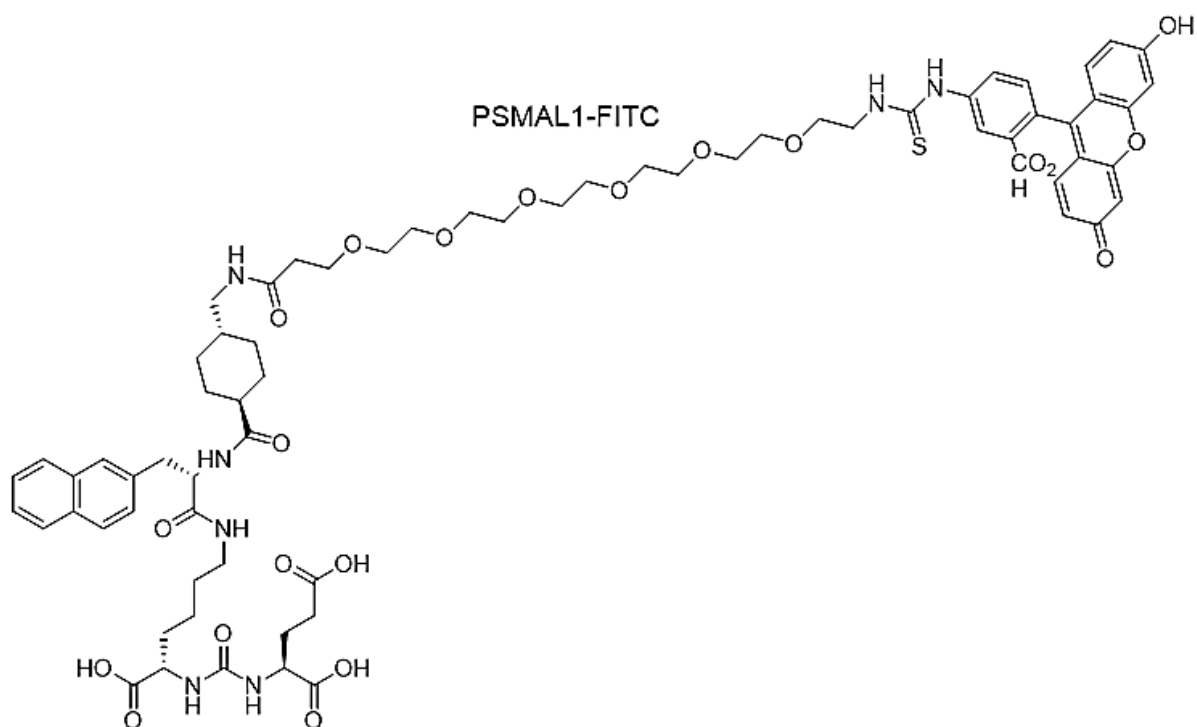
**FAP8-PEG23-FITC**

Fórmula Química: C₉₈H₁₃₇F₂N₇O₃₆S
Peso molecular: 2059,24

, o que comprende una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las estructuras anteriores.

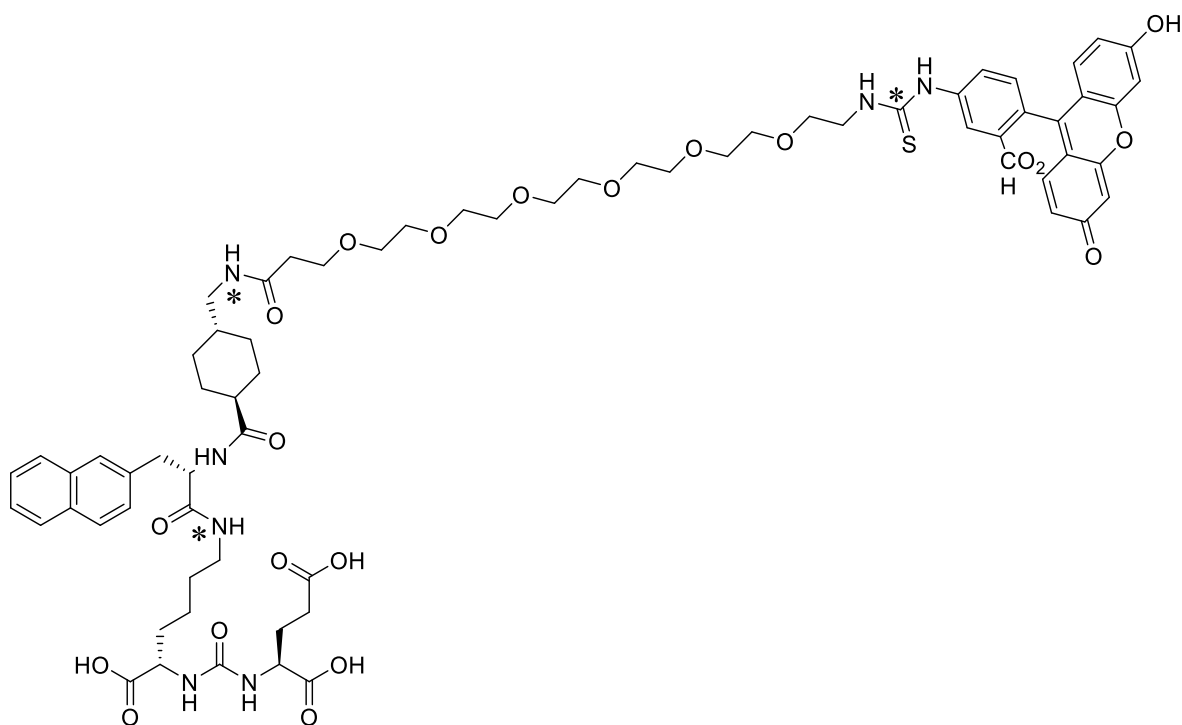
27. Un adaptador biespecífico para uso con una célula T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) en el tratamiento de un cáncer de antígeno prostático específico de membrana (PSMA), cuyo adaptador tiene o comprende una de las siguientes estructuras:





o que comprende una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las anteriores.

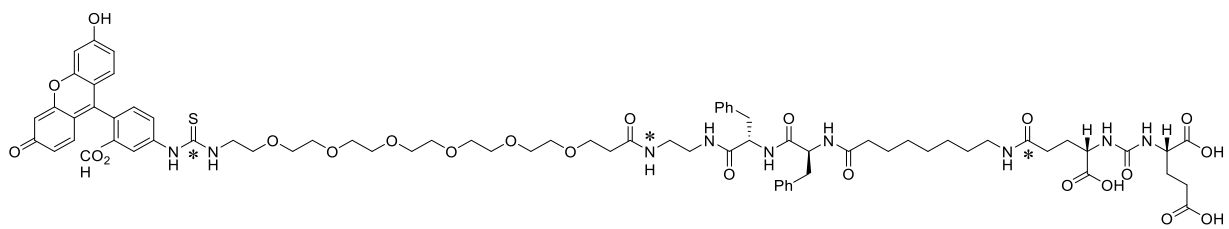
28. Un adaptador biespecífico para uso con una célula T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) en el tratamiento de cáncer que expresa PSMA, cuyo adaptador tiene la estructura:



o

es una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

29. Un adaptador biespecífico para uso con una célula T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) en el tratamiento de cáncer que expresa PSMA, cuyo adaptador tiene la estructura:



o es una sal o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

30. Un kit que comprende:

(i) al menos una unidad de dosis de un adaptador biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o 25-29, una composición farmacéutica que comprende un adaptador biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o 25-29 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, o una combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-24; y

(ii) al menos una unidad de dosis de células T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) 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.

31. Un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer de:

(i) células T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) 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 reivindicaciones 1-10 y 25-29, una composición farmacéutica de la reivindicación 11, o una combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-24;

tras lo cual el sujeto es tratado contra el cáncer.

32. El método de la reivindicación 31, en donde la CAR comprende:

una región de reconocimiento que comprende una región de fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) de un anticuerpo anti-fluoresceína;

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 que es una cadena CD3 ζ de células T o un receptor Fc γ .

33. El método de la reivindicación 31, en donde la fluoresceína del adaptador biespecífico se une con afinidad a la célula CAR-T anti-fluoresceína al exponerse a esta, y el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico enlaza la célula CAR-T anti-fluoresceína unida a una célula cancerosa objetivo o a un fibroblasto asociado a cáncer (CAF) cuando el ligando de direccionamiento del adaptador biespecífico se une con afinidad a un receptor presente en dicha célula cancerosa objetivo o CAF.

34. El método de la reivindicación 33, en donde el receptor en la célula cancerosa objetivo o en el CAF es una FAP sobreexpresada, un PSMA sobreexpresado y/o un receptor de folato (FR).

35. El método de la reivindicación 31, en donde (i) y (ii) se administran simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por las mismas o diferentes vías.

36. El método de la reivindicación 31, en donde (ii) comprende la combinación de cualquiera de las reivindicaciones 25-29 y el primer y segundo adaptador biespecífico se administran al sujeto simultáneamente por las mismas o diferentes vías.

37. El método de la reivindicación 31, en donde (ii) comprende la combinación de cualquiera de las reivindicaciones 25-29 y el primer y segundo adaptador biespecífico se administran al sujeto secuencialmente, en cualquier orden, por las mismas o diferentes vías.

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31-37, en donde (i) y (ii) se administran cada uno por vía intravenosa.

39. El método de la reivindicación 31, en donde el cáncer es un cáncer que expresa FAP y al menos un adaptador biespecífico de (ii) comprende un radical de un ligando de FAP.

40. El método de la reivindicación 31, en donde el cáncer es un cáncer que expresa PSMA y al menos un adaptador biespecífico de (ii) comprende un radical de un ligando de PSMA.

41. El método de la reivindicación 31, en donde el cáncer es un cáncer que expresa el receptor de folato y (ii) comprende una combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-15, 17 y 18.

42. Un método de tratamiento de cáncer que expresa FAP en un sujeto, que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer de

(i) células T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) o una composición farmacéutica que comprende células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y

(ii) el adaptador biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o una composición farmacéutica que comprende el mismo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tras lo cual el sujeto es tratado contra el cáncer.

43. El método de la reivindicación 42, en donde la CAR tiene una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína.

44. El método de la reivindicación 42 o 43, en donde la 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 .

45. Un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto cantidades eficaces para el tratamiento del cáncer de:

(i) células T con receptor de antígeno quimérico anti-fluoresceína (CAR-T) o una composición farmacéutica que comprende células CAR-T anti-fluoresceína y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; y

(ii) una combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-24;
tras lo cual el sujeto es tratado contra el cáncer.

46. El método de la reivindicación 45, en donde la CAR comprende:
una región de reconocimiento que comprende una región scFv de un anticuerpo anti-fluoresceína;

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 que es una cadena CD3 ζ de células T o un receptor Fc γ .

47. El método de la reivindicación 45, en donde (i) y (ii) se administran simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, por las mismas o diferentes vías.

48. El método de la reivindicación 45, en donde el primer y el segundo adaptador biespecífico de la combinación se administran al sujeto simultáneamente por las mismas o diferentes vías.

49. El método de la reivindicación 45, en donde el primer y el segundo adaptador biespecífico de la combinación se administran al sujeto secuencialmente, en cualquier orden, por las mismas o diferentes vías.

50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 45-49, en donde (i) y (ii) se administran cada uno por vía intravenosa.

51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31-49 que además comprende la obtención de imágenes del cáncer en el sujeto.

52. El método de la reivindicación 51, en donde la obtención de imágenes del cáncer comprende imagen óptica, tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

53. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31-49, en donde el cáncer es cáncer de ovario, endometrio, mama, glioma (tal como, opcionalmente, glioma en estadio 3-4) o carcinoma de células renales claras (tal como, opcionalmente, estadio 3-4).

54. Un método para mejorar la activación de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T) que comprende:

proporcionar un adaptador biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 25-29, una composición farmacéutica de la reivindicación 11, o una combinación de cualquiera de las reivindicaciones 12-24; y

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, a la composición farmacéutica o a la combinación;

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

55. El método de la reivindicación 54, en donde las células CAR-T anti-fluoresceína están en la circulación sistémica en un sujeto cuando se exponen al adaptador biespecífico.