

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 559**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01) **C07K 16/30** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) **A61K 39/39** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 31/26 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2018** **PCT/US2018/020095**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2018** **WO18160622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2018** **E 18761400 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024** **EP 3589295**

54 Título: **Composiciones y métodos para la terapia con células CAR T**

30 Prioridad:

28.02.2017 US 201762464792 P
03.04.2017 US 201762480627 P
05.09.2017 US 201762554421 P
22.01.2018 US 201862620423 P
22.01.2018 US 201862620384 P
23.01.2018 US 201862620701 P
23.02.2018 US 201862634595 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2025

73 Titular/es:

ENDOCYTE, INC. (50.00%)
3000 Kent Avenue
West Lafayette, IN 47906, US y
PURDUE RESEARCH FOUNDATION (50.00%)

72 Inventor/es:

LOW, PHILIP STEWART;
CHU, HAIYAN;
LEE, YONG GU;
LU, YINGJUAN J.;
LEAMON, CHRISTOPHER PAUL y
WHEELER II, LEROY W.

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 3 010 559 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la terapia con células CAR T

5

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a una composición que comprende células CAR T y una molécula pequeña enlazada a una fracción de direccionamiento para su uso en métodos de tratamiento de un paciente con cáncer, que comprende

10 administrar al paciente la composición que comprende células CAR T y administrar al paciente una molécula pequeña enlazada a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador.

Antecedentes

15 La inmunoterapia basada en la transferencia adoptiva de linfocitos (por ejemplo, células T) a un paciente es una terapia valiosa en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades. Se han realizado importantes avances en el desarrollo de inmunoterapias basadas en la transferencia adoptiva de linfocitos. Entre los muchos tipos diferentes de agentes inmunoterapéuticos, uno de los agentes inmunoterapéuticos más prometedores que se están desarrollando son las células T que expresan receptores de antígenos quiméricos (células CAR T). El receptor de antígeno quimérico (CAR)

20 es un receptor modificado genéticamente que está diseñado para dirigirse a un antígeno específico, por ejemplo, un antígeno tumoral. Este direccionamiento puede producir citotoxicidad contra el tumor, por ejemplo, de tal manera que las células CAR T que expresan CAR pueden dirigirse a los tumores y eliminarlos a través de los antígenos tumorales específicos.

25 Los CAR de primera generación están compuestos por una región de reconocimiento, por ejemplo, una región variable de fragmento monocatenario (scFv) derivada de un anticuerpo para el reconocimiento y la unión al antígeno expresado por el tumor, y un dominio de señalización de activación, por ejemplo, la cadena CD3ζ de las células T puede servir como señal de activación de células T en CAR. Aunque las células CAR T han mostrado resultados positivos *in vitro*, han tenido un éxito limitado en la eliminación de enfermedades (por ejemplo, el cáncer) en ensayos clínicos. Uno de

30 los problemas ha sido la incapacidad de prolongar la activación y ampliar la población de células CAR T *in vivo*.

Para abordar este problema, un dominio de coestimulación (por ejemplo, CD137, CD28 o CD134) se ha incluido en los CAR de segunda generación para conseguir una activación prolongada de las células T *in vivo*. La adición de un dominio de coestimulación aumenta la proliferación y la supervivencia *in vivo* de las células T que contienen CAR, y

35 los datos clínicos iniciales han demostrado que tales construcciones son agentes terapéuticos prometedores en el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer.

Jennifer S. Y. Ma *et al.*, "Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells", PNAS, Vol. 113, N.º 4, E450-458 (12-01-2016), desvelan moléculas adaptadoras, denominadas moléculas "interruptoras", en que

40 los fragmentos de anticuerpos anti-CD19 y anti-CD22 se modifican específicamente con FITC usando aminoácidos no canónicos codificados genéticamente. Estas moléculas se usan para mediar en las interacciones entre las células CAR-T y las células cancerosas en estudios de valoración de la dosis.

David T. Rodgers *et al.*, "Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies", PNAS, Vol. 113, N.º 4, E459-E468 (26-01-2016), desvelan interruptores bifuncionales basados en anticuerpos recombinantes que consisten en una molécula Fab específica de antígeno tumoral injertada con un neopéptido peptídico, que se une exclusivamente a una célula CAR-T con interruptor específico de péptido. Estos interruptores se usan para activar y reorientar las células CAR-T contra las neoplasias malignas de células B.

50 El documento WO 2014/100615 A1 desvela linfocitos citotóxicos que expresan receptores de antígenos quiméricos (CAR) que se dirigen a y unen pequeñas moléculas conjugadas (SCM, por sus siglas en inglés) y métodos de uso de las células y las SCM en el tratamiento de cáncer.

Aunque se han realizado perfeccionamientos en las terapias con células CAR T, quedan varios problemas. En primer

55 lugar, la toxicidad "inespecífica" puede deberse a células normales que expresan el antígeno al que se dirigen las células CAR T (por ejemplo, un antígeno asociado a tumor). En segundo lugar, la activación no regulada de células CAR T puede darse cuando la eliminación rápida e incontrolada de células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) por las células CAR T induce una constelación de alteraciones metabólicas, llamado síndrome de lisis tumoral o síndrome de liberación de citocinas (CRS, por sus siglas en inglés), que puede ser mortal para los pacientes. El

60 síndrome de lisis tumoral y el CRS pueden deberse a que las células CAR T administradas no pueden regularse fácilmente y se activan de forma incontrolada. En consecuencia, aunque las células CAR T resultan muy prometedoras como herramienta para el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer, se necesitan terapias adicionales con células CAR T que reduzcan la toxicidad inespecífica y un control más preciso de la activación de las células CAR T.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

5

Las referencias a los métodos de tratamiento en esta descripción han de interpretarse como referencias a compuestos, o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y composiciones de células CAR T para su uso en esos métodos.

Los presentes inventores han descubierto métodos para reducir la toxicidad inespecífica y controlar de forma más
10 precisa la activación de células CAR T, proporcionando importantes avances en la terapia con células CAR T. En las diversas realizaciones descritas en el presente documento, un ligando de molécula pequeña enlazado a una molécula diana mediante un enlazador se usa como puente entre el cáncer que expresa el receptor de folato y las células CAR T que dirigen las células CAR T al cáncer que expresa el receptor de folato para el alivio del cáncer que expresa el receptor de folato. El "ligando de molécula pequeña" es un folato, que es un ligando de molécula pequeña que se une
15 específicamente a las células cancerosas (es decir, el receptor de estos ligandos está sobreexpresado en los cánceres en comparación con los tejidos normales).

En una realización, el "ligando de molécula pequeña" está unido a una "molécula diana" que se une al CAR expresado por las células CAR T. La "fracción de direccionamiento" es isotiocianato de fluoresceína (FITC).
20

La "fracción de direccionamiento" se une a la región de reconocimiento del CAR modificado genéticamente expresado por las células CAR T. En consecuencia, la región de reconocimiento del CAR (por ejemplo, una región variable de fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo, un Fab, Fv, Fc, fragmento (Fab')₂ y similares) se dirige a la "fracción de direccionamiento". Por lo tanto, el ligando de molécula pequeña enlazado a una molécula diana mediante un
25 enlazador actúa como puente entre el cáncer y las células CAR T, dirigiendo las células CAR T hacia el cáncer para aliviarlo.

Se proporciona en el presente documento un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto comprende un ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un
30 enlazador, en donde el ligando de molécula pequeña es un folato y la fracción de direccionamiento es FITC y una composición de células CAR T que comprende células CAR T en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es un cáncer que expresa receptor de folato, comprendiendo el método
35 administrar a un paciente al menos una primera dosis y una segunda dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la primera dosis y la segunda dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una segunda realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la
40 composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la primera realización, en donde al menos una primera dosis, una segunda dosis y una tercera dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis y la tercera dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la tercera
45 dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una tercera realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la
50 composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la primera realización, en donde al menos una primera dosis, una segunda dosis, una tercera dosis y una cuarta dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis, la tercera dosis y la cuarta dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a
55 7500 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 8000 a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una cuarta realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la
60 composición de células CAR T para su uso como se describe en la realización anterior, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 100 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 1000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la

sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 En una quinta realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, melanoma cutáneo, melanoma intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, cáncer de la uretra, cáncer de próstata, leucemia crónica, leucemia aguda, leucemia mielocítica aguda, linfoma linfocítico, leucemia mieloide, leucemia mielomonocítica, tricoleucemia, mesotelioma pleural, cáncer de la vejiga, linfoma de Burkitt, cáncer del uréter, cáncer del riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica.
- 10
- 20 En una sexta realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el CAR tiene una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región variable de fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo anti-FITC, en donde el CAR tiene un dominio de coestimulación y el dominio de coestimulación es CD137 (4-1BB), y en donde el CAR tiene un dominio de señalización de activación y el dominio de señalización de activación es una cadena CD3 ζ de células T.
- 25

En una séptima realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no es un anticuerpo y no comprende un fragmento de un anticuerpo.

30

En una octava realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra continuamente al paciente y el método comprende además finalizar la administración continua del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir o impedir el síndrome de liberación de citocinas en el paciente.

35

En una novena realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, comprende además administrar al paciente un folato, un conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o un agente que inhibe la activación de las células CAR T.

40

En una décima realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra una vez a la semana al paciente.

45

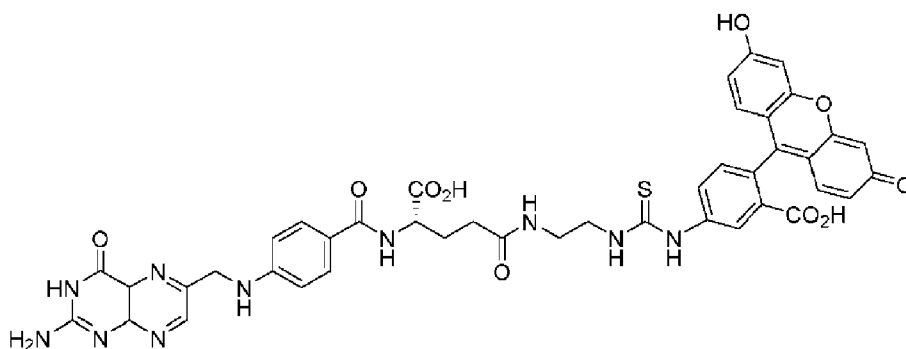
En una undécima realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde la composición de células CAR T se administra en al menos dos dosis.

50

En una duodécima realización, se proporciona el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el agente que inhibe la activación de las células CAR T es fluoresceína sódica.

55

Además, en otra realización, se proporciona el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el compuesto tiene la fórmula



Las realizaciones adicionales también se describen por las siguientes realizaciones enumeradas. Cualquiera de las siguientes realizaciones junto con cualquier realización aplicable descrita en la sección de Sumario, la sección
 5 Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas, la sección Ejemplos o las reivindicaciones de esta solicitud de patente, también se contemplan.

284. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto comprende un ligando
 10 de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador, en donde el ligando de molécula pequeña es un folato y la fracción de direccionamiento es FITC y una composición de células CAR T que comprende células CAR T en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es un cáncer que expresa receptor de folato, comprendiendo el método

administrar a un paciente al menos una primera dosis y una segunda dosis del compuesto, o de la sal
 15 farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la primera dosis y la segunda dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

285. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso
 20 de acuerdo con la realización 284 en donde al menos una primera dosis, una segunda dosis y una tercera dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis y la tercera dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la tercera dosis del compuesto, o la sal
 25 farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

286. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso
 30 de acuerdo con la realización 285 en donde al menos una primera dosis, una segunda dosis, una tercera dosis y una cuarta dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis, la tercera dosis y la cuarta dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 7500 veces mayor en cantidad que la
 35 primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 8000 a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

287. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso
 40 de acuerdo con la realización 286, en donde la segunda dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 100 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 1000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 10000 veces mayor en cantidad
 45 que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

292. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284 a 287 en donde el enlazador comprende polietilenglicol (PEG),

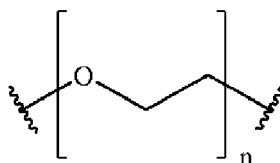
poliprolina, un aminoácido hidrófilo, un azúcar, un peptidoglucano no natural, una polivinilpirrolidona, pluronic F-127, o una combinación de los mismos.

293. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292 en donde el enlazador comprende PEG.

294. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-293 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tiene la fórmula



en donde B representa el ligando de molécula pequeña, L representa el enlazador y T representa la fracción de direccionamiento, y en donde L comprende una estructura que tiene la fórmula



en donde n es un número entero de 0 a 200.

295. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-294, en donde el enlazador comprende PEG y la fracción de direccionamiento es FITC, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

296. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-295 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 10 nmoles/kg a 100 nmoles/kg del peso corporal del paciente.

297. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-296 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 10 nmoles/kg a 50 nmoles/kg del peso corporal del paciente.

298. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-297 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 10 nmoles/kg a 20 nmoles/kg del peso corporal del paciente.

299. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-298 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 10 nmoles/kg a 600 nmoles/kg del peso corporal del paciente.

300. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-299 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 200 nmoles/kg a 600 nmoles/kg del peso corporal del paciente.

301. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-300 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 400 nmoles/kg a 600 nmoles/kg del peso corporal del paciente.

302. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-301 en donde las células CAR T están en una dosis de 1 millón de células CAR T a 15 millones de células CAR T.

303. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-302 en donde las células CAR T están en una dosis de 1 millón de células CAR T a 7 millones de células CAR T.

5 304. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-303 en donde las células CAR T están en una dosis de 1 millón de células CAR T a 5 millones de células CAR T.

305. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso
10 de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-304 en donde las células CAR T están en una dosis de 2 millón de células CAR T a 5 millones de células CAR T.

306. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso
15 que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, melanoma cutáneo, melanoma intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer
20 de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, cáncer de la uretra, cáncer de próstata, leucemia crónica, leucemia aguda, leucemia mielocítica aguda, linfoma linfocítico, leucemia mieloide, leucemia mielomonocítica, tricoleucemia, mesotelioma pleural, cáncer de la vejiga, linfoma de Burkitt, cáncer del uréter, cáncer del riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma
25 primario del SNC, tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica.

308. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-306 en donde el CAR tiene una región de
30 reconocimiento y la región de reconocimiento es una región variable de fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo anti-FITC, en donde el CAR tiene un dominio de coestimulación y el dominio de coestimulación es CD137 (4-1BB), y en donde el CAR tiene un dominio de señalización de activación y el dominio de señalización de activación es una cadena CD3ζ de células T.

35 309. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no es un anticuerpo y no comprende un fragmento de un anticuerpo.

310. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso
40 de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-309 en donde la fracción de direccionamiento no comprende un epítipo peptídico.

311. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-310 en donde no se produce la liberación
45 de citocinas que da lugar a toxicidad inespecífica en el paciente y en donde se produce toxicidad de las células CAR T para el cáncer.

312. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-310 en donde no se produce toxicidad
50 tisular inespecífica en el paciente y en donde se produce toxicidad de células CAR T para el cáncer.

313. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-310 en donde el cáncer comprende un
55 tumor, en donde se reduce el tamaño del tumor en el paciente, y en donde no se produce toxicidad inespecífica.

314. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-313 en donde las células CAR T
comprenden un ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:1.

60 315. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-313 en donde las células CAR T comprenden un polipéptido que comprende SEQ ID NO:2.

316. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-315 en donde el CAR comprende secuencias de aminoácidos humanizados.

5 317. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-315 en donde el CAR consiste en secuencias de aminoácidos humanizados.

318. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-317 en donde la composición de células CAR T comprende además células T no transformadas.

319. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra continuamente al paciente y el método comprende además finalizar la administración continua del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir o impedir el síndrome de liberación de citocinas en el paciente.

320. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 comprende además administrar al paciente un folato, un conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o un agente que inhibe la activación de las células CAR T.

321. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está en una dosis de 10 nmoles/kg del peso corporal del paciente a 2500 nmoles/kg del peso corporal del paciente y las células CAR T están en una dosis de 1 millón de las células CAR T a 15 millones de las células CAR T.

322. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra una vez a la semana al paciente.

324. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 en donde la composición de células CAR T se administra en al menos dos dosis.

Breve descripción de los dibujos

40 Las FIGURAS 1A-B muestran la toxicidad mediada por células CAR T anti-FITC. La Figura 1A muestra los cambios en el peso corporal de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento. La Figura 1B muestra la concentración detectada de IFN-gamma para los diferentes grupos de tratamiento. La Figura 1C muestra la supervivencia (%) en la primera semana de los ratones en los diferentes grupos de tratamiento.

45 Las FIGURAS 2A-B muestran el efecto de la regulación de las células CAR T anti-FITC sobre la respuesta tumoral. La Figura 2A muestra el crecimiento tumoral de los ratones que se tratan con células CAR T y PBS o con células CAR T y FITC-Folato. La Figura 2B muestra un sumario de los resultados de la respuesta tumoral de los ratones usados en el estudio.

50 Las FIGURAS 3A-D muestran el efecto de la concentración de FITC-Folato en la respuesta tumoral. La Figura 3A muestra la concentración detectada de IFN-gamma a las diferentes concentraciones de FITC-folato. La Figura 3B muestra el crecimiento tumoral tras la inyección de células CAR T en presencia de diferentes concentraciones de FITC-folato. La Figura 3C muestra la supervivencia en la primera semana (%) de los ratones. La Figura 3D muestra un sumario de los resultados de la respuesta tumoral de los ratones usados en el estudio.

55 Las FIGURAS 4A-B muestran la supresión de la activación de células T FITC CAR con agentes que inhiben un mediador de la señal de activación de células T. La Figura 4A muestra los cambios en la concentración de IFN-gamma en función de la concentración del agente. La Figura 4B muestra los cambios en la expresión de CD69 en función de la concentración del agente.

La FIGURA 5 muestra un diagrama general de las construcciones usadas para la transducción CAR T.

60 Las FIGURAS 6A-D muestran la eficacia antitumoral y la toxicidad a diferentes dosis de EC 17 y números de células CAR T. La Figura 6A muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo. La Figura 6B muestra los cambios de peso corporal a lo largo del tiempo. La Figura 6C muestra el porcentaje máximo de pérdida de peso corporal para cada dosis de EC17. La Figura 6D muestra el porcentaje de ratones que muestran sCRS (síndrome de liberación de citocinas) para cada dosis de EC17. (1) sin CAR-T + EC17 500 nmoles/kg; (2) 12,5 millones de CAR-T + EC17 10000 nmoles/kg; (3) 12,5 millones de CAR-T + EC17 1500 nmoles/kg; (4) 12,5 millones de CAR-T +

EC17 500 nmoles/kg; (5) 10 millones de CAR-T + EC17 100 nmoles/kg; (6) 10 millones de CAR-T + EC17 20 nmoles/kg.

La FIGURA 7 muestra el rescate con EC0923 de ratones que tienen sCRS y respuestas observadas de ratones tratados con o sin EC0923 y órganos cosechados de ratones tratados con o sin EC0923.

Las FIGURAS 8A-D muestran la eficacia antitumoral y la toxicidad de diferentes dosis de CAR T. La Figura 8A muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo. La Figura 8B muestra los cambios de peso corporal a lo largo del tiempo. La Figura 8C muestra el porcentaje máximo de pérdida de peso corporal para cada dosis de CAR T. La Figura 8D muestra el porcentaje de ratones que muestran sCRS para cada dosis de CAR T.

Las FIGURAS 9A-B muestran la eficacia antitumoral y el cambio de peso corporal para diferentes dosis de EC 17. La Figura 9A muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo. La Figura 9B muestra la evolución del peso corporal a lo largo del tiempo.

Las FIGURAS 10A-C muestran la eficacia antitumoral de diferentes mezclas de células CAR T y células T no transformadas. La Figura 10A muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo; (•) sin CAR-T, (◦) CAR-T el Día 0, (◐) CAR-T el Día 0, T sin modificar el Día 52, (▼) CAR-T el Día 0, el Día 46 y el Día 52. La Figura 10B muestra la evolución del peso corporal a lo largo del tiempo; (•) sin CAR-T, (◦) CAR-T el Día 0, (◐) CAR-T el Día 0, T sin modificar el Día 52, (▼) CAR-T el Día 0, el Día 46 y el Día 52. La Figura 10C muestra la cantidad de células CAR T en sangre y el volumen tumoral para diferentes mezclas de células CAR T y células T no transformadas.

Las FIGURAS 11A-B muestran la eficacia antitumoral y la toxicidad de 5 millones de células CAR T y diferentes controles estrictos de posología de EC17. La Figura 11A muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo. La Figura 11B muestra la evolución del peso corporal a lo largo del tiempo.

La FIGURA 12 muestra el control de la toxicidad mediada por células CAR T a través de la regulación de la activación de células CAR T mediante el uso de competidores para inhibir la activación de células CAR T y terminando la administración del puente.

Las FIGURAS 13A-C muestran los resultados de un estudio de escalado de dosis de FITC-Folato. La Figura 13A muestra el cambio en el peso corporal en porcentaje a lo largo del tiempo después de la administración del puente y de las células CAR T. La Figura 13B muestra el cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo después de la inyección de células CAR T y el puente. La Figura 13C muestra el porcentaje de supervivencia después de la primera semana de tratamiento con el puente y las células CAR T.

Las FIGURAS 14A-B muestran el efecto de la molécula puente FITC-ligando sobre la proliferación de células CAR T y la producción de citocinas. La Figura 14A muestra el número de células CAR T 6 días después de la introducción de las células CAR T en ratones. La Figura 14B muestra la concentración de las citocinas séricas IL-2, IFN-γ y TNF-α 6 días después de la introducción de células CAR T en ratones.

La FIGURA 15 muestra la concentración de IFN-γ como una función de la concentración de FITC-folato en un ensayo *in vitro*.

La FIGURA 16 muestra el rescate (basado en una medición de la producción de citocinas) con EC0923 o fluoresceína o ratones que tienen el síndrome de liberación de citocinas.

La FIGURA 17 muestra que la actividad de las células CAR-T (basada en una medición de la producción de citocinas) depende de la presencia del tumor y del nivel de dosis de EC17.

Las FIGURAS 18A-C muestran que las células CAR-T no proliferan en ratones sin tratamiento previo sin tumores.

La Figura 18A muestra el cambio de peso corporal en ratones (sin tumores) inyectados con células CAR-T, pero sin EC17 o con 500 nmoles/kg de EC17 tres veces por semana. Las Figuras 18B y C muestran el número de células CAR-T y el tamaño del bazo en estos ratones frente a los ratones con tumores HEK (positivos al receptor de folato). Para las Figuras 18B y C, la barra de la izquierda en cada grupo de tres barras son ratones sin tumores inyectados sin EC17 pero con células CAR-T, la barra central corresponde a ratones sin tumores inyectados con células CAR-T y EC17 y la barra de la derecha corresponde a ratones con tumores inyectados con células CAR-T y EC17. En la Figura 18B, N.D. es no determinado y el eje y es logarítmico para la Figura 18.

Las FIGURAS 19A-B muestran los efectos sobre el tamaño tumoral de las células CAR-T y EC17 inyectadas en ratones usando un modelo MDA-MB-231 (altos niveles de expresión del receptor de folato: Figura 19A) o un modelo tumoral OV90 (bajos niveles de expresión del receptor de folato: Figura 19B).

Las FIGURAS 20A-B muestran los efectos sobre el tamaño del tumor (Figura 20A) y la pérdida de peso corporal (Figura 20B) de las células CAR-T y diversas dosis de EC17 inyectadas en ratones usando un modelo MDA-MB-231.

Las FIG. 21A y 21B muestran la actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo MDA-MB-231.

Las FIG. 22A y 22B muestran la actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo OV-90.

Las FIG. 23A y 23B muestran la actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo KB. Para el grupo EC17, 2/3 tenían sCRS el día 23 y 1/3 tenían sCRS el día 37.

Las FIG. 24A y 24B muestran la actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo HEK-FRa.

Las FIG. 25A y 25B muestran la actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo SKOV-3.

La FIG. 26, Paneles C y E, muestran estudios de toxicidad en ratones con pre-pintado EC17. Los paneles A y B muestran el protocolo de tratamiento. El panel D muestra el efecto del pre-pintado EC17 sobre el tamaño del tumor.

La FIG. 27, Panel A muestra los protocolos para el tratamiento. El panel B muestra estudios de toxicidad. El panel C muestra el efecto del prepintado EC17 sobre la toxicidad tumoral. Línea 1: sin EC17. Línea 2: EC17 4 h pre-realizado. Línea 3: EC17 4 h predosis a continuación 24 h post-CAR-T. Línea 4: EC17 48 h post CAR-T.

- La FIG. 28, Paneles A-D, muestra el número de células CAR-T en sangre. El número de CAR-T en ratones sin rescate se consideró 1.
- La FIG. 29, Paneles A-E, muestra estudios comparativos de tres agentes de rescate (ácido fólico, fluoresceína sódica (NaFL) y leucovorina).
- 5 Las FIG. 30A y 30B muestran ensayos de rescate. Los ratones con rescate de fluoresceína tenían la menor pérdida de peso corporal. Todos los ratones con rescate alcanzaron una respuesta completa, excepto 2/9 en el grupo de rescate con fluoresceína. Línea 1 sin EC17. Línea 2: sin EC17 pero Fluoresceína. Línea 3: Rescate de fluoresceína. Línea 4: Rescate de leucovorina. Línea 5: Rescate de ácido fólico. Línea 6: sin rescate.
- La FIG. 31 muestra un esquema de estudio de rescate con fluoresceína sódica (60 $\mu\text{mol/kg}$).
- 10 Las FIG. 32A y 32B muestran los cambios de peso de los órganos relacionados con el rescate de NaFL. (1) CAR-T; (2) CAR-T + EC17; (3) CAR-T + EC17 + rescate de NaFL.
- La FIG. 33, Paneles A-G, muestra la producción de citocinas en la sangre de ratones 7 horas después del rescate de NaFL.
- La FIG. 34, Paneles A-G, muestran la producción de citocinas en ratones (27 horas después del rescate de NaFL).
- 15 La FIG. 35, Paneles A-E, muestra la producción reducida de citocinas en la sangre de ratones (< 7 horas después del rescate con NaFL).
- Las FIG. 36A y 36B muestran el efecto de rescate de NaFL sobre la actividad antitumoral de FITC CAR-T y el cambio de peso corporal. (1) CAR-T solo; (2) CAR-T + EC17; (3) CAR-T + EC17 + NaFL.
- Las FIG. 37A y 37B muestran el efecto del rescate en los niveles de citocinas.
- 20 La FIG. 38A muestra un control estricto de administración de CAR-T. La FIG. 38B muestra cambios en el peso del cuerpo.
- La FIG. 39, Paneles A-D, muestran que la producción de citocinas en sangre depende de la dosis de CAR-T.
- La FIG. 40A muestra el control estricto de posología y la FIG. 40B muestra que el número de CAR-T en sangre depende de la dosis de EC17 (día 3 *in vivo*).
- 25 La FIG. 41A muestra el control estricto de posología y la FIG. 41B muestra que el recuento de CAR-T en sangre depende de la dosis de EC17 aunque la diferencia es más pequeña (día 6 *in vivo*).
- La FIG. 42 muestra los cambios en el peso corporal de los ratones después de la inyección de CAR-T y EC17.
- Las FIG. 43A y 43B muestran el recuento de células CAR-T y el tamaño del bazo en ratones después de la inyección de células CAR-T y EC17. (1) Ratones con tumor: 5 millones de CAR-T + EC17 SIW; (2) ratones sin tratamiento previo: 8 millones de CAR-T sin EC17; (3) ratones sin tratamiento previo: 8 millones de CAR-T + EC17 TIW; (4) ratones sin tratamiento previo: 5 millones de CAR-T sin EC17; (5) ratones sin tratamiento previo: 5 millones de CAR-T + EC17 TIW.
- 30 La FIG. 44 muestra la producción de citocinas después de la inyección de células EC17 y CAR-T en presencia y ausencia de un tumor.
- 35 La FIG. 45 muestra la universalidad de la terapia con células CAR T anti-FITC: unión de diversos adaptadores a células CAR T. (1) Célula CAR T sin tinción; (2) Célula CAR T marcada con FITC-Alexa 647 + FITC-folato (Competición); (3) Célula CAR T marcada con FITC-Alexa 647; (4) Célula CAR T marcada con FITC-Alexa 647 + FITC-DUPA (Competición); (5) Célula CAR T marcada con FITC-Alexa 647 + FITC-CA9 (Competición).
- La FIG. 46 muestra que la célula Car T universal puede eliminar diversas células cancerosas que expresan antígenos ortogonales tras la adición de puentes coincidentes con antígenos *in vitro*.
- 40 La FIG. 47 muestra la relación entre la concentración de puentes y la actividad antitumoral de la célula CAR T universal *in vitro*.
- La FIG. 48 muestra que la célula CAR T universal puede eliminar diversas células cancerosas que expresan antígenos ortogonales tras la adición de puentes coincidentes con antígenos *in vivo*.
- 45 La FIG. 49 muestra que la célula CAR T universal puede eliminar dos tumores mediante cóctel de puentes *in vivo*.
- La FIG. 50 muestra un esquema de estudio de rescate con fluoresceína sódica (0,06, 0,6, 6 $\mu\text{mol/kg}$).
- La FIG. 51A muestra actividad antitumoral (rescate de NaFL 6 $\mu\text{mol/kg}$). La FIG. 51B muestra los cambios correspondientes en el peso corporal.
- 50 La FIG. 52, Paneles A-E, muestran los niveles de citocinas en sangre de ratón tras el rescate con fluoresceína sódica.
- La FIG. 53, Panel A muestra un esquema de rescate. Los paneles B y C muestran el recuento de células FITC CAR T en la sangre después del rescate.
- La FIG. 54 muestra la caracterización de las células CAR T circulantes en sangre de ratón después del rescate.
- La FIG. 55A muestra un esquema de rescate. Los paneles B y C muestran el recuento de células CAR T en la sangre después del rescate. (1) Control [Sin NaFL]; (2) NaFL 0,06 $\mu\text{mol/kg}$; (3) NaFL 0,6 $\mu\text{mol/kg}$; (4) NaFL 6 $\mu\text{mol/kg}$.
- 55 La FIG. 56 muestra la carga tumoral en animales tratados y no tratados con EC17.
- La FIG. 57 resume el número estimado de masas tumorales y el peso total de los tumores en todos los grupos examinados.
- 60 Las FIG. 58A y 58B muestran la caracterización de las células tumorales circulantes.
- Las FIG. 59A y 59B muestran la caracterización de las células tumorales circulantes.
- Las FIG. 60A y 60B muestran el porcentaje de sangre total que es de células CAR T tras la inyección de EC 17.

Las FIG. 61A y 61B muestran la persistencia de las células CAR T en sangre después de la infusión de EC17 con y sin rescate y el fenotipo después de la infusión de EC17.

Las FIG. 62A y 62B muestran que las células CAR T se localizaron en lesiones tumorales metastásicas, no los tejidos sanos adyacentes, cuando se inyecta EC17.

La FIG. 63 muestra el diseño y la caracterización de una célula CAR T antifuoresceína y un puente fluoresceína-folato. (A) Estructura de la fluoresceína-folato (FITC-folato). (B) Diagrama que muestra la construcción de CAR anti-fluoresceína, donde SP= péptido señal, scFv= fragmento variable monocatenario que reconoce la fluoresceína con una KD= 270 fM, TM = dominio transmembrana, 4-1BB= dominio de activación citoplasmática de CD137, y CD3ζ= dominio de activación citoplasmática de CD3 zeta. (C) Eficiencia de transducción de células CAR T evaluada mediante citometría de flujo. Histograma abierto: Células T no transducidas; histograma relleno: Células T transducidas con lentivirus que expresan GFP y la construcción CAR mostrada en (B). (D) Demostración de que el FITC-folato se une a la célula CAR T anti-fluoresceína. Histograma relleno (gris): célula CAR T antifuoresceína sin tinción; histograma abierto: célula CAR T antifuoresceína marcada con FITC-Alexa647 (10 nM); histograma relleno (negro): célula CAR T anti-fluoresceína marcada con FITC-Alexa647 (10 nM) en presencia de un exceso 100 veces mayor de FITC-folato (1 μM)).

La FIG. 64 muestra la demostración de que el puente FITC-folato media el compromiso de la célula CAR T anti-fluoresceína con las células cancerosas que expresan el receptor de folato (células KB). (A) Demostración de que el FR se expresa en las células KB. Histograma gris: Células KB sin tinción; Histograma negro: Células KB marcadas con FITC-folato 100 nM de en presencia de un exceso (10 μM) de folato libre como competidor; Histograma abierto: Células KB marcadas con FITC-folato 100 nM. (B) Citotoxicidad de las células CAR T hacia las células KB tras la adición del FITC-folato correcto (100 nM) pero no del FITC-DUPA incorrecto (100 nM) o sin puente (PBS). (C) Impacto de la relación célula efectora-célula diana en la lisis de células KB por células CAR T en presencia de FITC-folato, FITC-DUPA o sin puente. (D) La producción de IFNγ se induce por la adición de FITC-folato (100 nM) pero no de FITC-DUPA (100 nM). (E) La proliferación de células CAR T anti-fluoresceína es inducida por FITC-folato pero no por FITC-DUPA. (F) La expresión del marcador de activación (CD69) en las células CAR T antifuoresceína solo se produce tras la adición del puente correcto. Para los paneles B, D, E y F, la proporción de células CAR T antifuoresceína con respecto a las células KB fue de 10 a 1. Los gráficos de barras representan la media ± s.d. n=3. ANOVA unidireccional realizado para todas las comparaciones (****P < 0,0001, **P < 0,005, *P < 0,01, ns (no significativo)).

La FIG. 65 muestra la dependencia de CRS de la presencia de células CAR T antifuoresceína, células cancerosas positivas para el receptor de folato (células MDA-MB-231) y FITC-folato *in vivo*. (A) Cambio en el peso corporal (%) determinado 4 días después de la infusión de células CAR T antifuoresceína (5x10⁶) en ratones con o sin tumor en presencia o ausencia de FITC-folato (500 nmoles/kg administrados los días 1 y 2). **P<0,01 mediante la prueba de ANOVA unidireccional. (B) Efecto del número de células CAR T sobre el cambio de peso corporal (%) en el día 4 en ratones portadores de tumores después de la administración de PBS o 500 nmol/kg de FITC-folato en los días 1 y 2. ** P < 0,05, **** P<0,0001 mediante la prueba de ANOVA unidireccional. (C) Efecto del número de células CAR T en ratones portadores de tumores sobre la concentración plasmática de IFNγ en el día 4. *** P < 0,001, **** P < 0,0001, ns (no significativo) mediante la prueba ANOVA unidireccional. n=5 ratones por grupo. Los gráficos de barras representan la media ± s.e.m.

La FIG. 66 muestra el control de la intensidad de CRS mediante la interrupción de la administración del puente. (A) Análisis del cambio de peso corporal (%) como medida de la intensidad de CRS tras la administración de una dosis alta de células CAR T antifuoresceína (15x10⁶) en ausencia (PBS) o presencia de FITC-folato (500 nmoles/kg administrados los días 1, y 2, y días alternados en lo sucesivo). En el régimen de dosificación interrumpida, se siguió el control estricto de posología continua excepto que se omitieron las inyecciones de FITC-folato los días 4 y 6. (B) Análisis de los niveles de IFNγ en el plasma de ratones el día 6 usando los regímenes de dosificación descritos en la parte A. (C) Medición de los volúmenes tumorales en ratones tratados como se describe en la parte A. n=5 ratones por grupo. Los datos representan la media ± s.e.m. **** P < 0,0001 mediante la prueba de ANOVA unidireccional.

La FIG. 67 muestra el efecto del bloqueo del puente a través de la competición con folato libre o fluoresceína libre sobre la citotoxicidad mediada por células CAR T. (A) Medición del cambio de peso corporal (%) tras la administración de células CAR T anti-fluoresceína (15x10⁶) en ausencia (PBS) o presencia de FITC-folato (500 nmoles/kg administrados los días 1, y 2, y días alternos en lo sucesivo). Para estudios de con, se coinyectó un exceso de folato de 100 veces en los días 4 y 6. **** P < 0,0001. (B) Análisis en el día 6 de los niveles de IFNγ en plasma de los grupos de tratamiento anteriores. ** P < 0,005. (C) Medición del volumen tumoral en los mismos grupos de tratamiento. n=5 ratones por grupo. Las barras de error representan la media ± s.e.m. (D) Análisis de la dependencia temporal de los niveles de citocinas en plasma de la célula CAR T tras la administración de un exceso de 12 veces de fluoresceína libre para suprimir CRS. Se indujo CRS en todos los ratones mediante la inyección de 10x10⁶ células CAR T anti-fluoresceína más FITC-folato (500 nmol/kg el día 3). El día 4, para suprimir un potente CRS, se inyectaron 6 μmol/kg de fluoresceína libre y se midieron las citocinas indicadas en plasma a las 3 y 6 horas de la administración de fluoresceína. n=3 ratones/grupo. Los datos representan la media ± s.e.m. ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001 mediante la prueba de ANOVA bidireccional.

La FIG. 68 muestra el efecto de la concentración de puente sobre la regulación de la liberación de citocinas de células CAR T antifuoresceína y la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*. (A) Lisis de células MDA-MB-231 en

cultivo por células CAR T anti-fluoresceína (5:1=proporción células efectoras:tumorales) en presencia de varias concentraciones de FITC-folato (0,001 nM a 100000 nM). (B) Liberación de IFN γ a partir de las células descritas en la parte A. (C) Nivel de IFN γ en el plasma de ratones portadores de tumores MDA-MB-231 6 días después del inicio del tratamiento mediante la inyección de 15×10^6 células CAR T. Se trató a los ratones con 5, 50, 500 o 2500 nmol/kg de FITC-folato los días 1, 2, 8, 10 y días alternos en lo sucesivo (se omitieron los tratamientos de los días 4 y 6 para evitar un CRS). (D) Análisis del crecimiento tumoral en los grupos de tratamiento del panel C. n=5 ratones por grupo. Los gráficos de barras representan la media \pm s.e.m. **** P < 0,0001 mediante la prueba de ANOVA unidireccional.

La FIG. 69 muestra la prevención de CRS mediante el aumento gradual de la dosis puente o la disminución de la frecuencia de dosificación puente. Medición del cambio de peso corporal (A) y del volumen tumoral (B) en ratones portadores de tumores MDA-MB-231 tratados con 15×10^6 células CAR T más PBS, o un aumento gradual de la dosis de FITC-folato (0,5 nmoles/kg los días 1 y 2, 5 nmoles/kg los días 4 y 6, 50 nmoles/kg los días 8 y 10, y 500 nmoles/kg a partir del día 12), o una dosis constante de 500 nmoles/kg en días alternantes. **** P < 0,0001 mediante la prueba de ANOVA bidireccional. Medición del cambio de peso corporal (C) y del volumen tumoral (D) en ratones portadores de tumores MDA-MB-231 tratados con 5×10^6 células CAR T más PBS o FITC-folato (500 nmoles/kg) a diferentes frecuencias de dosificación de 1) una dosis/semana (los días 1, 8, 15 y etc.), 2) dos dosis/semana (los días 1, 4, 8, 11, 15 y etc.) o tres dosis/semana (los días 1, 3, 5, 8, 10, 12, 15 y etc.). n=5 ratones por grupo. Todos los datos representan la media \pm s.e.m.

La FIG. 70, El panel A muestra un esquema de escalado de dosis. Los paneles B-C, muestran el efecto del aumento de la dosis de EC17 sobre la actividad antitumoral y la toxicidad (cambios en el peso corporal) de la terapia CAR-T.

La FIG. 71, El panel A muestra un esquema para comprobar si el tamaño del tumor se correlaciona con los cambios en el peso corporal y la liberación de IL-6 durante la terapia CAR-T /EC 17. Los paneles B-C muestran los resultados del cambio de peso corporal y los niveles de IL-6, respectivamente.

La FIG. 72, Panel A muestra un esquema para comprobar si la terapia CAR-T/EC17 es eficaz en un modelo de osteosarcoma. El panel B muestra los resultados del tamaño del tumor.

La FIG. 73 muestra los cambios de peso corporal para las pruebas descritas para la FIG. 72.

La FIG. 74, Paneles A-F muestran que las células cancerosas HOS expresan el FR- α .

La FIG. 75 muestra un esquema para comprobar si se producen citocinas en respuesta a la terapia CAR-T/EC17 y si el NaFL rescata a los ratones de CRS.

Las FIG. 76, Paneles A-E muestran la reducción de la producción de citocinas en ratones por 60 μ mol/kg de NaFL 7 horas después del rescate con NaFL.

Las FIG. 77, Paneles A-c muestran la reducción de la producción de citocinas en ratones por 60 μ mol/kg de NaFL 27 horas después del rescate con NaFL.

La FIG. 78 muestra un esquema para probar la reducción de la producción de citocinas en ratones en respuesta a la terapia CAR-T/EC17 mediante diversas concentraciones de NaFL.

La FIG. 79 muestra la reducción de MCP-1 en respuesta a la terapia CAR-T/EC17 por rescate de NaFL.

La FIG. 80 muestra la reducción de IL-6 en respuesta a la terapia CAR-T/EC17 por rescate de NaFL.

La FIG. 81 muestra la reducción de IL-10 en respuesta a la terapia CAR-T /EC 17 mediante rescate de NaFL.

La FIG. 82, Panel A muestra un esquema para comprobar si la producción de MCP-1 en respuesta a la terapia CAR-T /EC 17 se correlaciona con el número de células CAR-T. El panel B muestra que la producción de MCP-1 en respuesta a la terapia CAR-T /EC 17 se correlaciona con el número de células CAR-T.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "un" o "uno/a" puede significar uno o más. Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" en referencia a un valor numérico, incluyendo, por ejemplo, números enteros, fracciones y porcentajes, se refiere generalmente a un intervalo de valores numéricos (por ejemplo, \pm 5 % al 10 % del valor recitado) que un experto habitual en la técnica consideraría equivalente al valor recitado (por ejemplo, que tiene la misma función o resultado).

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratando", "tratado", o "tratamiento" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a tratamiento profiláctico o preventivo.

Como se usa en el presente documento, los términos "mejorar", "mejora", "mejoría", o "mejorado" en referencia al cáncer puede significar la reducción de los síntomas del cáncer, reducir el tamaño de un tumor, extirpar total o parcialmente el tumor (por ejemplo, una respuesta completa o parcial), provocar enfermedad estable, impedir la progresión del cáncer (por ejemplo, supervivencia sin progresión), o cualquier otro efecto sobre el cáncer que un médico consideraría un tratamiento terapéutico, profiláctico o preventivo del cáncer.

Como se usa en el presente documento, los términos "administrar", "administración" o "administrado" se refieren a todos los medios de introducir en el paciente el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la

composición de células CAR T de la misma descritos en el presente documento al paciente, incluyendo, pero no limitado a, oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea y transdérmica.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "toxicidad inespecífica" significa daño orgánico o una reducción del peso del paciente que sea inaceptable para el médico que trata al paciente, o cualquier otro efecto en el paciente que sea inaceptable para el médico que trata al paciente, por ejemplo, aplasia de células B, una fiebre, una bajada de la tensión arterial o un edema pulmonar.

- 10 Como se usa en el presente documento, los términos "transducción" y "transfección" se usan de forma equivalente y los términos significan introducir un ácido nucleico en una célula por cualquier método artificial, incluyendo métodos víricos y no víricos.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

- 15 En las diversas realizaciones descritas en el presente documento, un ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador se usa como un puente entre un cáncer y células CAR T (es decir, células T que expresan un receptor antigénico quimérico). El puente dirige las células CAR T hacia el cáncer para el alivio del cáncer. El "ligando de molécula pequeña" es un folato, que es un ligando de molécula pequeña que se une específicamente a un tipo de célula cancerosa (es decir, el receptor para cada uno de estos ligandos está
20 sobreexpresado en los cánceres en comparación con los tejidos normales).

- La "fracción de direccionamiento" enlazada al ligando de molécula pequeña se une a la región de reconocimiento de CAR modificado genéticamente que expresan las células CAR T. En consecuencia, la región de reconocimiento del CAR (por ejemplo, una región variable de fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo, un Fab, Fv, Fc, o
25 fragmento (Fab')₂, y similares) se dirige a la "fracción de direccionamiento". Por lo tanto, el ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador actúa como puente entre el cáncer y las células CAR T, dirigiendo las células CAR T hacia el cáncer para la mejora del cáncer. En diversas realizaciones, el puente entre el cáncer y las células CAR T puede ser cualquiera de los conjugados mostrados en los Ejemplos.

- 30 El puente es una molécula orgánica pequeña por lo que puede eliminarse rápidamente del torrente sanguíneo (es decir, aproximadamente 20 minutos o menos). En un aspecto, la respuesta de la célula CAR T puede dirigirse únicamente a aquellas células cancerosas que expresan un receptor para la parte del ligando de molécula pequeña del "puente", reduciendo de esta manera la toxicidad a los tejidos normales. Adicionalmente, este sistema puede ser "universal" debido a que un tipo de construcción de célula CAR T puede usarse para dirigirse a una amplia diversidad
35 de cánceres usando diferentes "puentes". De manera ilustrativa, la fracción de direccionamiento reconocida por la célula CAR T puede permanecer constante de tal manera que pueda usarse un tipo de construcción de célula CAR T, mientras que el ligando de molécula pequeña que se une al cáncer puede alterarse para permitir la focalización en una amplia diversidad de cánceres.

- 40 En diversas realizaciones descritas en la lista a continuación y en las reivindicaciones y a lo largo de toda la solicitud, el ligando de molécula pequeña ligado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador se denomina un "compuesto".

- Varias realizaciones se describen por las siguientes realizaciones enumeradas. Cualquiera de las siguientes
45 realizaciones junto con cualquier realización aplicable descrita en la sección de Sumario de esta solicitud de patente, en la sección Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas, la sección Ejemplos o las reivindicaciones de esta solicitud de patente, también se contemplan.

284. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto comprende un ligando
50 de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador, en donde el ligando de molécula pequeña es un folato y la fracción de direccionamiento es FITC y una composición de células CAR T que comprende células CAR T en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es un cáncer que expresa receptor de folato, comprendiendo el método
55 administrar a un paciente al menos una primera dosis y una segunda dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la primera dosis y la segunda dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 60 285. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la realización 284 en donde al menos una primera dosis, una segunda dosis y una tercera dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis y la tercera dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal

farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la tercera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

286. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la realización 285 en donde al menos una primera dosis, una segunda dosis, una tercera dosis y una cuarta dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis, la tercera dosis y la cuarta dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 7500 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 8000 a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

287. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la realización 286, en donde la segunda dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 100 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 1000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

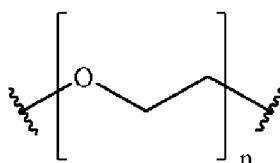
292. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 en donde el enlazador comprende polietilenglicol (PEG), poliprolina, un aminoácido hidrófilo, un azúcar, un peptidoglucano no natural, una polivinilpirrolidona, pluronic F-127, o una combinación de los mismos.

293. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292 en donde el enlazador comprende PEG.

294. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-293 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tiene la fórmula



en donde B representa el ligando de molécula pequeña, L representa el enlazador y T representa la fracción de direccionamiento, y en donde L comprende una estructura que tiene la fórmula



en donde n es un número entero de 0 a 200.

45

295. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-294, en donde el enlazador comprende PEG y la fracción de direccionamiento es FITC, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

296. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-295 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 10 nmoles/kg a 100 nmoles/kg del peso corporal del paciente.

297. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-296 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 10 nmoles/kg a 50 nmoles/kg del peso corporal del paciente.

298. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-297 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 10 nmoles/kg a 20 nmoles/kg del peso corporal del paciente.
299. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-298 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 10 nmoles/kg a 600 nmoles/kg del peso corporal del paciente.
300. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-299 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 200 nmoles/kg a 600 nmoles/kg del peso corporal del paciente.
301. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-300 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis de 400 nmoles/kg a 600 nmoles/kg del peso corporal del paciente.
302. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-301 en donde las células CAR T están en una dosis de 1 millón de células CAR T a 15 millones de células CAR T.
303. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-302 en donde las células CAR T están en una dosis de 1 millón de células CAR T a 7 millones de células CAR T.
304. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-303 en donde las células CAR T están en una dosis de 1 millón de células CAR T a 5 millones de células CAR T.
305. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-304 en donde las células CAR T están en una dosis de 2 millón de células CAR T a 5 millones de células CAR T.
306. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-305, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, melanoma cutáneo, melanoma intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, cáncer de la uretra, cáncer de próstata, leucemia crónica, leucemia aguda, leucemia mielocítica aguda, linfoma linfocítico, leucemia mieloide, leucemia mielomonocítica, tricoleucemia, mesotelioma pleural, cáncer de la vejiga, linfoma de Burkitt, cáncer del uréter, cáncer del riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica.
308. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287 o 292-306 en donde el CAR tiene una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región variable de fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo anti-FITC, en donde el CAR tiene un dominio de coestimulación y el dominio de coestimulación es CD137 (4-1BB), y en donde el CAR tiene un dominio de señalización de activación y el dominio de señalización de activación es una cadena CD3ζ de células T.
309. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no es un anticuerpo y no comprende un fragmento de un anticuerpo.

310. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-309 en donde la fracción de direccionamiento no comprende un epítopo peptídico.
- 5 311. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-310 en donde no se produce la liberación de citocinas que da lugar a toxicidad inespecífica en el paciente y en donde se produce toxicidad de las células CAR T para el cáncer.
- 10 312. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-310 en donde no se produce toxicidad tisular inespecífica en el paciente y en donde se produce toxicidad de células CAR T para el cáncer.
313. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-310 en donde el cáncer comprende un tumor, en donde se reduce el tamaño del tumor en el paciente, y en donde no se produce toxicidad inespecífica.
- 15 314. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-313 en donde las células CAR T comprenden un ácido nucleico que comprende SEQ ID NO:1.
- 20 315. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-313 en donde las células CAR T comprenden un polipéptido que comprende SEQ ID NO:2.
- 25 316. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-315 en donde el CAR comprende secuencias de aminoácidos humanizados.
- 30 317. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-315 en donde el CAR consiste en secuencias de aminoácidos humanizados.
318. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-317 en donde la composición de células CAR T comprende además células T no transformadas.
- 35 319. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra continuamente al paciente y el método comprende además finalizar la administración continua del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir o impedir el síndrome de liberación de citocinas en el paciente.
- 40 320. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 comprende además administrar al paciente un folato, un conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o un agente que inhibe la activación de las células CAR T.
- 45 321. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está en una dosis de 10 nmoles/kg del peso corporal del paciente a 2500 nmoles/kg del peso corporal del paciente y las células CAR T están en una dosis de 1 millón de las células CAR T a 15 millones de las células CAR T.
- 50 322. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra una vez a la semana al paciente.
- 55 324. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306 o 308-318 en donde la composición de células CAR T se administra en al menos dos dosis.
- 60

498. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306, 308-322 o 324 en donde el cáncer es leucemia mielocítica aguda.

5 499. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la realización 498 en donde el cáncer expresa el receptor de folato-β.

500. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con las realizaciones 498 o 499 en donde las células CAR T tienen un fenotipo de memoria central/memoria efectora.

501. El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 284-287, 292-306, 308-322, 324 o 498-500 en donde la proporción CD8:CD4 de las células CAR T es de 1:1.

15 En consecuencia, diversas realizaciones se proporcionan en los párrafos anteriores y en la lista de realizaciones anterior y todas las realizaciones aplicables se describen en esta "Descripción detallada de realizaciones ilustrativas", la sección Sumario, los Ejemplos y las reivindicaciones se aplican a estas realizaciones.

20 Como se describe en el presente documento, un "paciente" puede ser un ser humano o, en el caso de aplicaciones veterinarias, el paciente puede ser un animal de laboratorio, uno agrícola, uno doméstico o uno salvaje. En diversos aspectos, el paciente puede ser un animal de laboratorio tal como un roedor (por ejemplo, ratón, rata, hámster, etc.), un conejo, un mono, un chimpancé, un animal doméstico tal como un perro, un gato o un conejo, un animal agrícola tal como una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra o un animal salvaje en cautiverio tal como un oso, un panda, un león, un tigre, un leopardo, un elefante, una cebra, una jirafa, un gorila, un delfín o una ballena.

En diversas realizaciones, el cáncer a tratar puede seleccionarse de un carcinoma, un sarcoma, un osteosarcoma, un linfoma, un melanoma, un mesotelioma, un carcinoma nasofaríngeo, una leucemia, un adenocarcinoma o un mieloma. En otras realizaciones, el cáncer puede ser cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, 30 cáncer de cabeza, cáncer de cuello, melanoma cutáneo, melanoma intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de pulmón no 35 microcítico, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, cáncer de la uretra, cáncer de próstata, leucemia crónica, leucemia aguda, incluyendo leucemia mielocítica aguda, un linfoma linfocítico, leucemia mieloide, leucemia mielomonocítica, tricoleucemia, mesotelioma pleural, cáncer de la vejiga, linfoma de Burkitt, cáncer del uréter, cáncer del riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, una neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, un tumor del eje espinal, un glioma del tronco encefálico, un 40 adenoma hipofisario y un adenocarcinoma de la unión gastroesofágica.

El cáncer es un cáncer que expresa el receptor de folato. En otra realización, el cáncer es un cáncer que expresa el receptor de folato α. En otra realización más, el cáncer es un cáncer que expresa el receptor de folato β. En algunos aspectos de estas realizaciones, el cáncer es un cáncer de endometrio, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer 45 de ovario o un cáncer de mama triple negativo. En otra realización, el cáncer que se está tratando es un tumor. En otra realización, el cáncer es neoplásico maligno. En otra realización, el cáncer es leucemia mielocítica aguda. En otra realización más, el cáncer es leucemia mielocítica aguda y el cáncer expresa el receptor de folato β. Incluso en otra realización, el cáncer es leucemia mielocítica aguda y las células CAR-T tienen un fenotipo de memoria central/memoria efectora. En otra realización más, la proporción CD8:CD4 de las células CAR T es de 1:1. En otra 50 realización, la proporción CD8:CD4 es una proporción 1,2 a 1, una proporción 1 a 1,2, una proporción 1,3 a 1, una proporción 1 a 1,3, una proporción 1,4 a 1, una proporción 1 a 1,4, una proporción 1,5 a 1 o una proporción 1 a 1,5. En otras realizaciones donde el cáncer es leucemia mielocítica aguda y se usa un agente de rescate, las células CAR T pueden permanecer presentes en el paciente durante al menos 40 días, al menos 45 días, al menos 50 días, al menos 55 días, al menos 60 días, al menos 70 días, al menos 80 días, al menos 90 días o al menos 100 días después 55 de la administración de las células CAR T, incluso después de que se use un agente de rescate para inhibir o impedir CRS. En otra realización el cáncer es leucemia mielocítica aguda u otro cáncer, las células CAR T asociadas al tumor pueden tener una expresión aumentada de CD25 con respecto a las células CAR T no asociadas al tumor.

El "ligando de molécula pequeña" es un folato, que es un ligando de molécula pequeña que se une específicamente 60 a un tipo de célula cancerosa (es decir, el receptor para cada uno de estos ligandos puede estar sobreexpresado en los cánceres en comparación con los tejidos normales).

En una realización, el ligando de molécula pequeña puede tener una masa de menos de 10.000 Dalton, menos de 9000 Dalton, menos de 8000 Dalton, menos de 7000 Dalton, menos de 6000 Dalton, menos de 5000 Dalton, menos de 4500 Dalton, menos de 4000 Dalton, menos de 3500 Dalton, menos de 3000 Dalton, menos de 2500 Dalton, menos de 2000 Dalton, menos de 1500 Dalton, menos de 1000 Dalton o menos de 500 Dalton. En otra realización, el ligando de molécula pequeña puede tener una masa de 1 a 10.000 Dalton, 1 a 9000 Dalton, 1 a 8000 Dalton, 1 a 7000 Dalton, 1 a 6000 Dalton, 1 a 5000 Dalton, 1 a 4500 Dalton, 1 a 4000 Dalton, 1 a 3500 Dalton, 1 a 3000 Dalton, 1 a 2500 Dalton, 1 a 2000 Dalton, 1 a 1500 Dalton, 1 a 1000 Dalton o 1 a 500 Dalton.

El ligando de molécula pequeña en el contexto del "ligando de molécula pequeña enlazado a un enlazador" es un folato. En diversas realizaciones, el folato puede ser ácido fólico, un análogo del ácido fólico u otra molécula de unión al receptor de folato. En diversas realizaciones, los análogos del folato que pueden usarse incluyen ácido folínico (por ejemplo, leucovorina), ácido pteropoliglutámico y pteridinas fijadoras de receptores de folato tales como tetrahidropterinas, dihidrofolatos, tetrahidrofolatos y sus análogos desaza y didesaza. Los términos análogos "desaza" y "didesaza" se refieren a los análogos reconocidos en la técnica que tienen un átomo de carbono sustituido por uno o dos átomos de nitrógeno en la estructura natural del ácido fólico. Por ejemplo, los análogos de desaza incluyen los análogos 1-desaza, 3-desaza, 5-desaza, 8-desaza y 10-desaza. Los análogos de didesaza incluyen, por ejemplo, los análogos 1,5-didesaza, 5,10-didesaza, 8,10-didesaza y 5,8-didesaza. Los anteriores análogos del ácido fólico se denominan convencionalmente "folatos", reflejando su capacidad para unirse a los receptores de folato. Otros análogos de la unión al receptor de folato incluyen aminopterina, ametopterina (metotrexato), N10-metilfolato, 2-desamino-hidrofolato, análogos de desaza tales como 1-desazametopterina o 3-desazametopterina y ácido 3',5'-dicloro-4-amino-4-desoxi-N10-metilpterilglutámico (diclorometotrexato).

La "molécula diana" que se une al CAR expresado por las células CAR T es isotiocianato de fluoresceína (FITC).

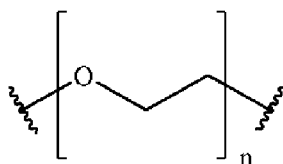
En un aspecto ilustrativo, el enlazador puede comprender polietilenglicol (PEG), poliprolina, un aminoácido hidrófilo, un azúcar, un peptidoglucano no natural, una polivinilpirrolidona, pluronic F-127, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto ilustrativo, el enlazador en el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descrito en el presente documento puede comprender un enlace directo (por ejemplo, una reacción entre el grupo isotiocianato de FITC y un grupo amina libre de un ligando de molécula pequeña) o el enlace puede ser a través de un enlazador intermediario. En una realización, si está presente, un enlazador intermediario puede ser cualquier enlazador biocompatible conocido en la técnica, tal como un enlazador divalente. En una realización ilustrativa, el enlazador divalente puede comprender de 1 a 30 átomos de carbono. En otra realización ilustrativa, el enlazador divalente puede comprender de 2 a 20 átomos de carbono. En otras realizaciones, se emplean enlazadores divalentes de menor peso molecular (es decir, aquellos que tienen un peso molecular aproximado de 30 to 300 Dalton). En otra realización, las longitudes de enlazador que son adecuadas incluyen, pero no se limitan a, enlazadores que tienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 o más átomos.

En diversas realizaciones, el ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento puede ser de fórmula

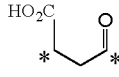
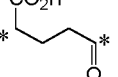
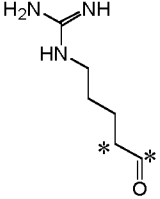
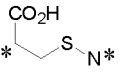
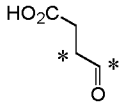
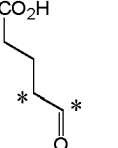
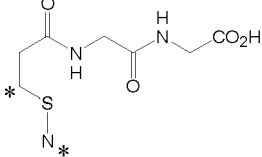
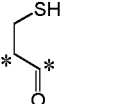
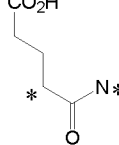
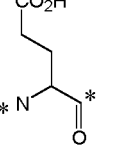
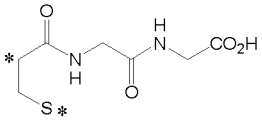
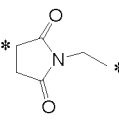
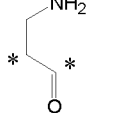
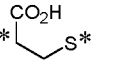
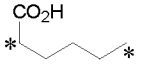
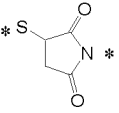
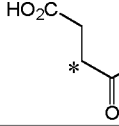
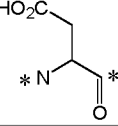
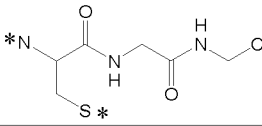
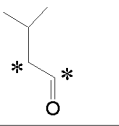
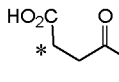
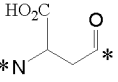
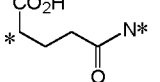
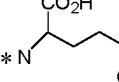
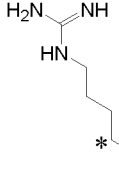
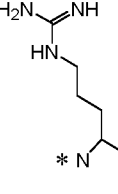
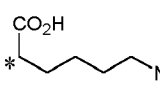
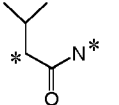
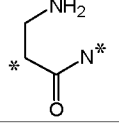
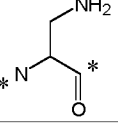
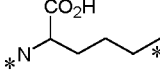
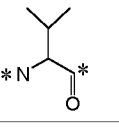
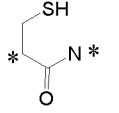
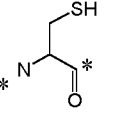
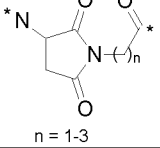
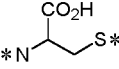
B-L-T,

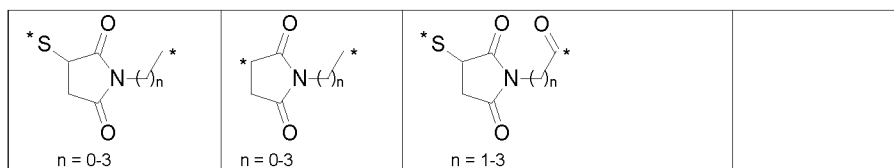
en donde B representa el ligando de molécula pequeña, L representa el enlazador y T representa la fracción de direccionamiento, y en donde L comprende una estructura que tiene la fórmula



en donde n es un número entero de 0 a 200. En otra realización, n puede ser un número entero de 0 a 150, de 0 a 110, de 0 a 100, de 0 a 90, de 0 a 80, de 0 a 70, de 0 a 60, de 0 a 50, de 0 a 40, de 0 a 30, de 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 14, de 0 a 13, de 0 a 12, de 0 a 11, de 0 a 10, de 0 a 9, de 0 a 8, de 0 a 7, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, de 0 a 1, de 15 a 16, de 15 a 17, de 15 a 18, de 15 a 19, de 15 a 20, de 15 a 21, de 15 a 22, de 15 a 23, de 15 a 24, de 15 a 25, de 15 a 26, de 15 a 27, de 15 a 28, de 15 a 29, de 15 a 30, de 15 a 31, de 15 a 32, de 15 a 33, de 15 a 34, de 15 a 35, de 15 a 36, de 15 a 37, de 15 a 38, de 15 a 39, de 15 a 40, de 15 a 50, de 15 a 60, de 15 a 70, de 15 a 80, de 15 a 90, de 15 a 100, de 15 a 110, de 15 a 120, de 15 a 130, de 15 a 140, de 15 a 150 o n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 108, 110, 120, 130, 140 o 150.

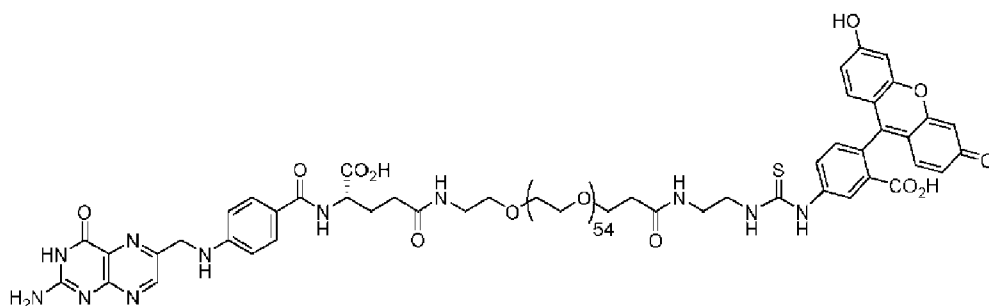
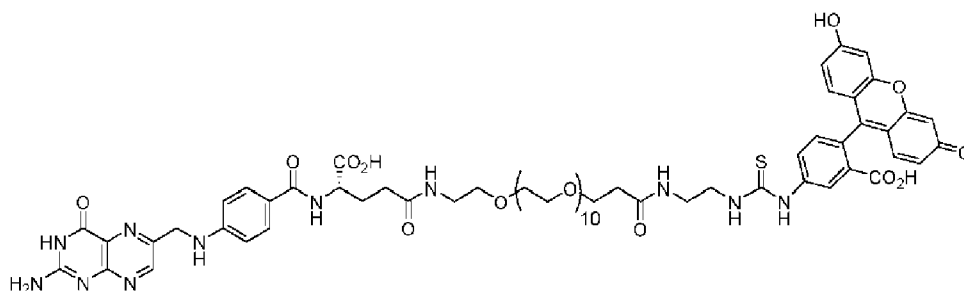
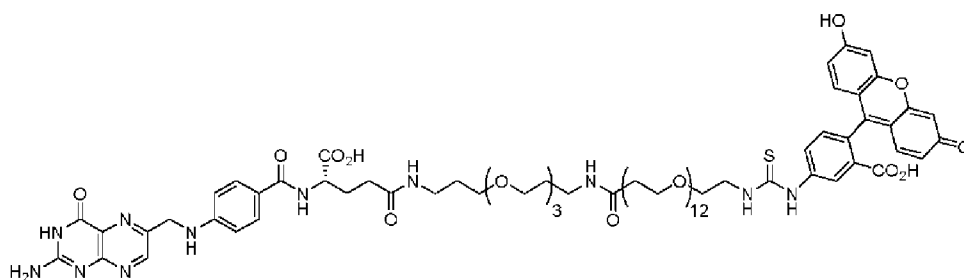
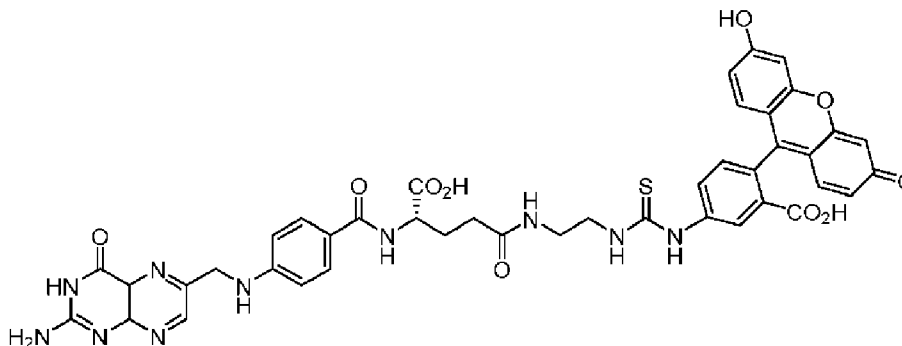
En otra realización, el enlazador puede ser un enlazador divalente que puede incluir uno o más espaciadores. Los espaciadores ilustrativos se muestran en la siguiente tabla. Se describen los siguientes espaciadores ilustrativos no limitantes donde * indica el punto de unión al ligando de molécula pequeña o a la fracción de direccionamiento, o a 5 otras porciones de enlazador divalente.



En otras realizaciones, el ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento (puente) puede tener cualquiera de las siguientes estructuras.

5



10

En otras realizaciones, el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no es un anticuerpo y no comprende un fragmento de un anticuerpo. En otra realización más, la fracción de direccionamiento no comprende un epítopo peptídico.

15

En una realización ilustrativa, el ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador (el puente) es isotiocianato de fluoresceína (FITC) enlazado al ligando de molécula pequeña. En un aspecto, el cáncer puede sobreexpresar un receptor para el ligando de molécula pequeña. En otro aspecto, por ejemplo, las células T citotóxicas u otro tipo de células T, pueden transformarse para expresar un CAR que comprende

- 5 scFv anti-FITC. En este aspecto, el CAR puede dirigirse a FITC decorando el cáncer con moléculas de FITC como resultado de la unión del ligando de molécula pequeña al cáncer. Por lo tanto, la toxicidad a células normales, no diana, puede evitarse. En esta realización, cuando las células T que expresan CAR anti-FITC se unen a FITC, las células CAR T se activan y el cáncer se mejora.
- 10 Se contempla una "sal farmacéuticamente aceptable" de un ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador. Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales cuyos contraiones pueden usarse en productos farmacéuticos. En diversas realizaciones, tales sales incluyen, pero no se limitan a 1) sales de adición de ácido, que puede obtenerse por reacción de la base libre del compuesto precursor con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido
- 15 nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y 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 o ácido malónico y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto precursor se reemplaza por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o bien se coordina con una base orgánica tal como
- 20 etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trimetamina, N-metilglucamina y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por los expertos en la materia y cualquiera de dichas sales farmacéuticamente aceptables se contempla junto con las realizaciones descritas en el presente documento.

En diversas realizaciones, se forman sales de adición de ácido adecuadas a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Los ejemplos ilustrativos incluyen las sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato,

25 bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrogenofosfato/dihidrogenofosfato, sacarato, estearato, succinato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

30 En diversas realizaciones, las sales de bases adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos ilustrativos incluyen las sales de arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y cinc. También pueden formarse semisales de ácidos y bases, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio.

35 En un aspecto ilustrativo, el compuesto, o una sal farmacéuticamente del mismo, descritos en el presente documento pueden contener uno o más centros quirales, o pueden ser de otro modo capaces de existir como estereoisómeros múltiples. En consecuencia, diversas realizaciones pueden incluir estereoisómeros puros así como mezclas de estereoisómeros, tales como enantiómeros, diastereómeros y mezclas enriquecidas enantiomérica o

40 diastereoméricamente. En un aspecto, el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descritos en el presente documento pueden existir como isómeros geométricos. En consecuencia, diversas realizaciones pueden incluir isómeros geométricos puros o mezclas de isómeros geométricos.

En algunos aspectos, el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descritos en el presente

45 documento pueden existir en formas no solvatadas así como formas solvatadas, que incluyen las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y están abarcadas dentro del alcance de la presente invención.

Los métodos descritos en el presente documento también usan linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos)

50 diseñados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que reconoce y se une a la fracción de direccionamiento (en concreto, FITC) del puente. En una realización, los CAR descritos en el presente documento comprenden tres dominios que incluyen 1) una región de reconocimiento (por ejemplo, una región variable de fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo, un fragmento Fab y similares) que reconoce y se une a la fracción de direccionamiento con especificidad, 2) un dominio de coestimulación que potencia la proliferación y supervivencia

55 de los linfocitos T y 3) un dominio de señalización de activación que genera una señal de activación de linfocitos T.

En diversos aspectos, como ejemplos no limitantes, pueden usarse regiones scFv de anticuerpos que se unen a un folato. En realizaciones no limitantes ilustrativas, las regiones scFv pueden prepararse a partir de (i) un anticuerpo conocido en la técnica que se une a una fracción de direccionamiento, (ii) un anticuerpo recién preparado usando una

60 fracción de direccionamiento seleccionada, tal como un hapteno, y (iii) variantes de secuencia derivadas de las regiones scFv de dichos anticuerpos, por ejemplo, regiones scFv que tiene al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos

el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región scFv de la que derivan.

En un aspecto, el dominio de coestimulación sirve para potenciar la proliferación y la supervivencia de los linfocitos T citotóxicos tras la unión del CAR a una fracción de direccionamiento. Los dominios de coestimulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, CD28, CD137 (4-1BB), un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), CD134 (OX40), un miembro de la superfamilia de receptores TNFR, CD27, CD30, CD150, DAP10, NKG2D y CD278 (ICOS), una molécula coestimuladora de la superfamilia CD28 expresada en células T activadas o combinaciones de los mismos. Un experto comprenderá que las variantes de secuencia de estos dominios de coestimulación pueden usarse sin afectar negativamente a la invención, donde las variantes tienen la misma o similar actividad que el dominio sobre el que se modelan. En diversas realizaciones, tales variantes pueden tener al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos del dominio del que derivan.

En una realización ilustrativa, el dominio de señalización de activación sirve para activar linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) tras la unión del CAR a una fracción de direccionamiento. En diversas realizaciones, los dominios de señalización de activación adecuados incluyen la cadena CD3 ζ de células T, proteína del receptor CD3 delta, proteína del receptor mbl, proteína del receptor B29 y receptor Fc γ . El experto comprenderá que las variantes de secuencia de estos dominios de señalización de activación pueden usarse cuando las variantes tienen la misma o similar actividad que el dominio sobre el que se modelan. En diversas realizaciones, las variantes tienen al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que derivan.

En un aspecto, las construcciones que codifican los CAR se preparan mediante técnicas de ingeniería genética. Tales técnicas se describen detalladamente en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) y Green and Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 4ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012).

Como ejemplos, un plásmido o vector de expresión vírica (por ejemplo, un vector lentivírico, un vector retrovírico, sleeping beauty y piggyback (sistemas transposón/transposasa que incluyen un sistema de administración de genes CAR no mediado por virus)) pueden prepararse que codifica 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 y enlazados en dirección 5' a 3'. En otras realizaciones, se aceptan otras disposiciones que incluyan una región de reconocimiento, un dominio de señalización de activación y uno o más dominios de coestimulación. En una realización, la colocación de la región de reconocimiento en la proteína de fusión será generalmente de tal manera que se consiga la visualización de la región en el exterior de la célula. En una realización, los CAR pueden incluir elementos adicionales, tales como un péptido señal (por ejemplo, péptido señal CD8 α) para garantizar la exportación adecuada de la proteína de fusión a la superficie celular, un dominio transmembrana para garantizar que la proteína de fusión se mantenga como una proteína integral de membrana (por ejemplo, dominio transmembrana CD8 α , dominio transmembrana CD28 o dominio transmembrana CD3 ζ), y un dominio bisagra (por ejemplo, bisagra CD8 α) que confiere flexibilidad a la región de reconocimiento y permite una fuerte unión a la fracción de direccionamiento.

Se muestra un diagrama de un CAR ilustrativo en la Figura 5 donde la secuencia de proteína de fusión se incorpora a un vector de expresión de lentivirus y donde "SP" es un péptido señal, el CAR es un CAR anti-FITC, están presentes una bisagra CD8 α y un dominio transmembrana CD8 α , el dominio de coestimulación es 4-1BB y el dominio de señalización de activación es CD3 ζ . Las secuencias de ácido nucleico ilustrativas de un inserto CAR se proporcionan como SEQ ID NO: 1 y 3 y la secuencia de aminoácidos codificada se proporciona como SEQ ID NO:2. En otra realización más, SEQ ID NO:2 puede comprender o consistir en secuencias de aminoácidos humanizadas o humanas.

En una realización, el CAR tiene una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región variable de fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo anti-FITC, un dominio de coestimulación y el dominio de coestimulación es CD137 (4-1BB), y un dominio de señalización de activación y el dominio de señalización de activación es una cadena CD3 ζ de células T. Es bien sabido por el experto que un scFv anti-FITC y un scFv anti-fluoresceína son términos equivalentes.

En una realización, los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) pueden modificarse genéticamente para que expresen construcciones de CAR transfectando una población de linfocitos T con un vector de expresión que codifique la construcción de CAR. Los métodos adecuados para preparar una población transducida de linfocitos T que expresan una construcción CAR seleccionada son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) y Green and Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 4ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012).

En una realización, se proporcionan células CAR T que comprenden un ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o 3. En otra realización, se proporcionan células CAR T que comprenden un polipéptido de SEQ ID NO:2. En otro aspecto ilustrativo, se proporciona un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico aislado) que comprende SEQ ID NO: 1 o 3 y que codifica un receptor de antígeno quimérico. En otra realización más, se proporciona un polipéptido receptor de antígeno quimérico que comprende SEQ ID NO:2. En otra realización, se proporciona un vector que comprende SEQ ID NO: 1 o 3. En otro aspecto, se proporciona un vector lentivírico que comprende SEQ ID NO: 1 o 3. En otra realización más, SEQ ID NO:2 puede comprender o consistir en secuencias de aminoácidos humanizadas o humanas.

- 10 En cada una de estas realizaciones, las secuencias variantes de ácidos nucleicos o de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5 % de identidad con SEQ ID NO: 1 a 3 se contemplan. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de ácido nucleico variante que tiene al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o 2 siempre que la secuencia variante codifique un polipéptido de SEQ ID NO:2. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos puede ser una secuencia variante de ácido nucleico o de aminoácidos que tenga al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos 99 % o al menos el 99,5 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 o 3 a lo largo de un tramo de 200 ácidos nucleicos o, para SEQ ID NO:2, a lo largo de un tramo de 200 aminoácidos. En una realización, la determinación del porcentaje de identidad o similitud entre secuencias puede realizarse, por ejemplo, usando el programa GAP (Genetics Computer Group, software; ahora disponible a través de Accelrys en <http://www.accelrys.com>), y las alineaciones pueden realizarse usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW (software VNTI, InforMax Inc.). Se puede buscar en una base de datos de secuencias usando la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de interés. Los algoritmos de búsqueda en bases de datos se basan normalmente en el programa informático BLAST (Altschul *et al.*, 1990). En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad puede determinarse a lo largo de la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico o aminoácido.

- También están dentro del ámbito de las reivindicaciones los ácidos nucleicos complementarios a los ácidos nucleicos representados por SEQ ID NO: 1 y 3, y aquellos que hibridan con los ácidos nucleicos representados por SEQ ID NO: 1 y 3, o aquellos que hibridan con sus complementos en condiciones altamente rigurosas. "Condiciones altamente rigurosas" significa hibridación a 65 °C en SSPE 5X y formamida al 50 %, y lavado a 65 °C en SSPE 0,5X. Las condiciones para hibridación de alta rigurosidad, de baja rigurosidad y moderadamente rigurosa se describen en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) y Green and Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 4ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012). En algunos aspectos ilustrativos, la hibridación se produce a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico.

- En una realización, los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos usados para preparar células CAR T o células T no transformadas), usados en los métodos descritos en el presente documento, pueden ser células autólogas, aunque también pueden usarse células heterólogas, tal como cuando el paciente tratado ha recibido altas dosis de quimioterapia o radioterapia para destruir el sistema inmunitario del paciente. En una realización, pueden usarse células alogénicas.

- En un aspecto, los linfocitos T pueden obtenerse de un paciente por medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células T (por ejemplo, células T citotóxicas o células T no transformadas) pueden obtenerse mediante la extracción de sangre periférica del paciente, sometiendo la sangre a centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y a continuación usando un kit de aislamiento de células T negativo (tal como EasySep™ T Cell Isolation Kit) para aislar una población de células T de la sangre periférica. En una realización ilustrativa, la población de linfocitos T (por ejemplo, células T citotóxicas o células T no transformadas) no tiene por qué ser pura y puede contener otras células tales como otros tipos de células T (en el caso de células T citotóxicas, por ejemplo), monocitos, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales y células B. En un aspecto, la población recogida puede comprender al menos el 90 % del tipo celular seleccionado, al menos el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % del tipo de célula seleccionada.

- En una realización, después de que se obtienen los linfocitos T (por ejemplo, células T citotóxicas usadas para preparar células CAR T), las células se cultivan en condiciones que promueven la activación de las células. En esta realización, las condiciones de cultivo pueden ser de tal manera que las células puedan administrarse a un paciente sin preocuparse por la reactividad contra los componentes del medio de cultivo. Por ejemplo, las condiciones de cultivo pueden no incluir productos derivados del suero bovino, tal como albúmina de suero bovino. En un aspecto ilustrativo, 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. En un aspecto, la población de linfocitos puede cultivarse en condiciones que promuevan la activación durante 1 a 4 días. En una realización, el nivel adecuado de activación puede determinarse en función del tamaño celular, la tasa de proliferación o los marcadores de activación determinados por citometría de flujo.

En una realización ilustrativa, después de que la población de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos usados para preparar células CAR T) se haya cultivado en condiciones que promueven la activación, las células pueden transfectarse con un vector de expresión que codifique un CAR. Se han descrito anteriormente vectores y métodos de transfección adecuados para su uso en diversas realizaciones. En un aspecto, después de la transfección, las células pueden administrarse inmediatamente al paciente o las células pueden cultivarse durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más días, o entre 5 y 12 días, entre 6 y 13 días, entre 7 y 14 días o entre 8 y 15 días, por ejemplo, para dar tiempo a que las células se recuperen de la transfección. En un aspecto, las condiciones de cultivo adecuadas pueden ser similares a las condiciones en que se cultivaron las células para la activación ya sea con o sin el agente que se usó para promover la activación.

Por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, en un aspecto ilustrativo, los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden comprender además 1) obtener una población de linfocitos T autólogos o heterólogos (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos usados para preparar células CAR T), 2) cultivar los linfocitos T en condiciones que promuevan la activación de las células y 3) transfectar los linfocitos con un vector de expresión que codifique una CAR para formar células CAR T.

En una realización ilustrativa, cuando las células se han transfectado y activado, puede prepararse una composición que comprende las células CAR T y administrarse al paciente, con o sin células T no transformadas. En una realización, los medios de cultivo que carezcan de cualquier producto de origen animal, tal como suero bovino, puede usarse para cultivar las células CAR T y/o las células T no transformadas. En otra realización, las condiciones de cultivo de tejidos normalmente usadas por el experto para evitar la contaminación con bacterias, hongos y micoplasmas pueden usarse. En una realización ilustrativa, antes de administrarse a un paciente, las células (por ejemplo, células CAR T y/o células T no transformadas) se sedimentan, se lavan y se resuspenden en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones ilustrativas que comprenden linfocitos T que expresan CAR (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) o células T no transformadas incluyen composiciones que comprenden las células en solución salina estéril de 290 mOsm, en criomedio infusible (que contiene Plasma-Lyte A, dextrosa, inyección de cloruro sódico, seralbúmina humana y DMSO), en NaCl al 0,9 % con seroalbúmina humana al 2 %, o en cualquier otro material infusible estéril de 290 mOsm. Como alternativa, en otra realización, dependiendo de la identidad del medio de cultivo, las células CAR T o las células T no transformadas pueden administrarse en el medio de cultivo como la composición, o concentrarse y resuspenderse en el medio de cultivo antes de la administración. En diversas realizaciones, la composición de las células CAR T, con o sin células T no transformadas, puede administrarse al paciente por cualquier medio adecuado, tal como administración parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o por vía intratecal.

En un aspecto, el número total de células CAR T y la concentración de las células en la composición administrada al paciente variarán dependiendo de varios factores incluyendo el tipo de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) que se usen, la especificidad de unión del CAR, la identidad de la molécula diana y el ligando de molécula pequeña, la identidad del cáncer, la localización del cáncer en el paciente, los medios usados para administrar las composiciones al paciente y la salud, la edad y el peso del paciente que se está tratando. En diversas realizaciones, las composiciones adecuadas que comprenden células CAR T transducidas incluyen aquellas que tienen un volumen de 0,1 ml a 200 ml y de 0,1 ml a 125 ml.

En diversas realizaciones, las células CAR T transducidas administradas al paciente pueden comprender de 1×10^5 a 1×10^{15} o de 1×10^6 a 1×10^{15} células CAR T transducidas. En diversas realizaciones pueden administrarse de 1×10^5 a 1×10^{10} , de 1×10^6 a 1×10^{10} , de 1×10^6 a 1×10^9 , de 1×10^6 a 1×10^8 , de 1×10^6 a 2×10^7 , de 1×10^6 a 3×10^7 , de 1×10^6 a $1,5 \times 10^7$, de 1×10^6 a 1×10^7 , de 1×10^6 a 9×10^6 , de 1×10^6 a 8×10^6 , de 1×10^6 a 7×10^6 , de 1×10^6 a 6×10^6 , de 1×10^6 a 5×10^6 , de 1×10^6 a 4×10^6 , de 1×10^6 a 3×10^6 , de 1×10^6 a 2×10^6 , de 2×10^6 a 6×10^6 , de 2×10^6 a 5×10^6 , de 3×10^6 a 6×10^6 , de 4×10^6 a 6×10^6 , de 4×10^6 a 1×10^7 , de 1×10^6 a 1×10^7 , de 1×10^6 a $1,5 \times 10^7$, de 1×10^6 a 2×10^7 , de $0,2 \times 10^6$ a 1×10^7 , de $0,2 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^7$, de $0,2 \times 10^6$ a 2×10^7 o 5×10^6 células CAR T al paciente. En un aspecto, en cualquier realización descrita en el presente documento, una dosis única o múltiples dosis de las células CAR T pueden administrarse al paciente. En cualquiera de las realizaciones descritas en este párrafo, la dosis de células CAR T puede expresarse en número de células CAR T por kg de peso corporal del paciente. En cualquier realización descrita en el presente documento, las células CAR T pueden administrarse antes del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Como se puede entender, las designaciones i), ii) y iii), etc. para las etapas de cualquier método descrito en el presente documento no indican un orden salvo que se especifique lo contrario.

En las diversas realizaciones descritas en el presente documento, las células T no transformadas también pueden administrarse con las células CAR T y pueden administrarse en las cantidades descritas en el presente documento para las células CAR T y las células T no transformadas. En un aspecto, puede administrarse una mezcla de células CAR T y células T no transformadas una sola vez o múltiples veces, o pueden administrarse combinaciones de dosis de células CAR T puras y mezclas de células CAR T y células T no transformadas (por ejemplo, una dosis de células

CAR T seguida de una o más dosis de una mezcla de células CAR T y células T no transformadas). Como está claro para el experto a partir de la divulgación en el presente documento, una mezcla de células CAR T y células T no transformadas como se describe en el presente documento, significa que las células CAR T se mezclan con células T no transformadas que no se han expuesto a una construcción usada para la expresión de un receptor de antígeno quimérico.

En otras realizaciones, la dosis de células CAR T administrada al paciente en la composición de células CAR T se selecciona del grupo que consiste en 1 millón, 2 millones, 3 millones, 4 millones, 5 millones, 6 millones, 7 millones, 8 millones, 9 millones, 10 millones, 11 millones, 12 millones, 12,5 millones, 13 millones, 14 millones y 15 millones de las células CAR T. En estas realizaciones, la dosis de células CAR T puede expresarse en número de células CAR T por kg de peso corporal del paciente.

En otras realizaciones ilustrativas más, la composición de células CAR T se administra mediante inyección en el torrente sanguíneo del paciente y las células CAR T en el torrente sanguíneo del paciente son al menos el 5 por ciento, al menos el 7 por ciento, al menos el 10 por ciento, al menos el 11 por ciento, al menos el 12 por ciento, al menos el 13 por ciento, al menos el 14 por ciento o al menos el 15 por ciento del total de células T del paciente en el torrente sanguíneo del paciente cuatro semanas después de la inyección de la composición de células CAR T, al menos el 20 por ciento, el 25 por ciento, el 30 por ciento, el 35 por ciento, el 40 por ciento o el 50 por ciento en 3 semanas después de la inyección de la composición de células CAR T, al menos el 60 por ciento, el 65 por ciento, el 70 por ciento, el 75 por ciento o el 80 por ciento en 2 semanas después de la inyección de la composición de células CAR T o al menos el 85 por ciento, el 90 por ciento o el 95 en 1 semana después de la inyección de la composición de células CAR T.

En las realizaciones descritas en el presente documento, la composición de células CAR T puede comprender células CAR T sin ningún otro tipo celular, o pueden administrarse al paciente células T no transformadas junto con células CAR T. En realizaciones donde se administran múltiples dosis de la composición de células CAR T, cualquier dosis puede comprender células CAR T o una mezcla de células CAR T y células T no transformadas. En diversas realizaciones, las células T no transformadas pueden administrarse en las cantidades descritas en el presente documento para las células CAR T.

En otra realización, cualquier dosis de la composición de células CAR T puede comprender una mezcla de células CAR T y células T no transformadas en una proporción seleccionada de 1:5 de las células CAR T a las células T no transformadas, 1:4 de las células CAR T a las células T no transformadas, 1:3 de las células CAR T a las células T no transformadas, 1:2 de las células CAR T a las células T no transformadas y 1: 1 de las células CAR T a las células T no transformadas.

En otras realizaciones más, cualquier dosis de la composición de células CAR T puede comprender una mezcla de células CAR T y células T no transformadas en una proporción de 1:1 a 1:5 de células CAR T a las células T no transformadas, o la composición de células CAR T puede comprender una mezcla de 10 millones de las células CAR T y 40 millones de células T no transformadas, 15 millones de las células CAR T y 35 millones de las células T no transformadas, 20 millones de las células CAR T y 30 millones de las células T no transformadas o 25 millones de las células CAR T y 25 millones de las células T no transformadas.

El compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición de células CAR T descritos en el presente documento pueden administrarse al paciente mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Como se describe en el presente documento, el término "administrar" o "administrado" incluye todos los medios de introducir el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición de células CAR T al paciente, incluyendo, pero no limitado a, oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica y similares. En un aspecto, el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descritos en el presente documento pueden administrarse en formas de dosificación unitarias y/o formulaciones que contengan portadores, adyuvantes y vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición de células CAR T como se describe en el presente documento pueden administrarse directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo, o en un órgano interno. En diversas realizaciones, las vías adecuadas para dicha administración parenteral incluyen suministro intravenoso, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, epidural, intracerebroventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intratumoral, intramuscular y subcutáneo. En una realización, los medios para la administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

En un aspecto ilustrativo, las formulaciones parenterales son normalmente soluciones acuosas que pueden contener vehículos o excipientes tales como sales, hidratos de carbono y agentes tamponantes (preferentemente a un pH de 3 a 9), pero pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para

usarse junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril apirógena o solución salina estéril. En otras realizaciones, cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en el presente documento puede adaptarse para su administración parenteral como se describe en el presente documento. La preparación en condiciones estériles, mediante liofilización para producir un polvo liofilizado estéril para una formulación parenteral, puede lograrse fácilmente usando técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia. En una realización, la solubilidad del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, usado en la preparación de una formulación parenteral puede aumentarse mediante el uso de técnicas de formulación adecuadas, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad.

- 10 La cantidad del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a administrar al paciente puede variar significativamente en función del cáncer que se esté tratando, la vía de administración del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la distribución tisular. La cantidad a administrarse a un paciente puede basarse en la superficie corporal, la masa y la evaluación del médico. En diversas realizaciones, las cantidades que han de administrarse pueden variar, por ejemplo, de 0,05 mg a 30 mg, de 0,05 mg a 25,0 mg, de 0,05 mg a 20,0 mg, de 0,05 mg a 15,0 mg, de 0,05 mg a 10,0 mg, de 0,05 mg a 9,0 mg, de 0,05 mg a 8,0 mg, de 0,05 mg a 7,0 mg, de 0,05 mg a 6,0 mg, de 0,05 mg a 5,0 mg, de 0,05 mg a 4,0 mg, de 0,05 mg a 3,0 mg, de 0,05 mg a 2,0 mg, de 0,05 mg a 1,0 mg, de 0,05 mg a 0,5 mg, de 0,05 mg a 0,4 mg, de 0,05 mg a 0,3 mg, de 0,05 mg a 0,2 mg, de 0,05 mg a 0,1 mg, de 0,01 mg a 2 mg, de 0,3 mg a 10 mg, de 0,1 mg a 20 mg o de 0,8 mg a 3 mg. Un experto en la materia apreciará fácilmente que la dosis puede variar dentro de los diversos intervalos indicados anteriormente en función de los factores señalados anteriormente, y puede ser a discreción del médico.

- En otras realizaciones, la dosis del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede variar, por ejemplo, de 50 nmoles/kg a 3000 nmoles/kg del peso corporal del paciente, de 50 nmoles/kg a 2000 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 1000 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 900 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 800 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 700 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 500 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 400 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 300 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 200 nmoles/kg, de 50 nmoles/kg a 100 nmoles/kg, de 100 nmoles/kg a 300 nmoles/kg, de 100 nmoles/kg a 500 nmoles/kg, de 100 nmoles/kg a 1000 nmoles/kg, de 100 nmoles/kg a 2000 nmoles/kg del peso corporal del paciente. En otras realizaciones, la dosis puede ser 1 nmol/kg, 5 nmoles/kg, 10 nmoles/kg, 20 nmoles/kg, 25 nmoles/kg, 30 nmoles/kg, 40 nmoles/kg, 50 nmoles/kg, 60 nmoles/kg, 70 nmoles/kg, 80 nmoles/kg, 90 nmoles/kg, 100 nmoles/kg, 150 nmoles/kg, 200 nmoles/kg, 250 nmoles/kg, 300 nmoles/kg, 350 nmoles/kg, 400 nmoles/kg, 450 nmoles/kg, 500 nmoles/kg, 600 nmoles/kg, 700 nmoles/kg, 800 nmoles/kg, 900 nmoles/kg, 1000 nmoles/kg, 2000 nmoles/kg, 2500 nmoles/kg o 3000 nmoles/kg de peso corporal del paciente. En otras realizaciones más, la dosis puede ser 0,1 nmoles/kg, 0,2 nmoles/kg, 0,3 nmoles/kg, 0,4 nmoles/kg, o 0,5 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 1000 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 900 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 850 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 800 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 700 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 500 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 400 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 300 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 200 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 100 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 50 nmoles/kg, de 0,1 nmoles/kg a 10 nmoles/kg o de 0,1 nmoles/kg a 1 nmol/kg de peso corporal del paciente. En otras realizaciones, la dosis puede ser de 0,3 nmoles/kg a 1000 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 900 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 850 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 800 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 700 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 500 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 400 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 300 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 200 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 100 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 50 nmoles/kg, de 0,3 nmoles/kg a 10 nmoles/kg o de 0,3 nmoles/kg a 1 nmol/kg de peso corporal del paciente. En estas realizaciones, "kg" son kilogramos de peso corporal del paciente. En un aspecto, una dosis única o múltiples dosis del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse al paciente.

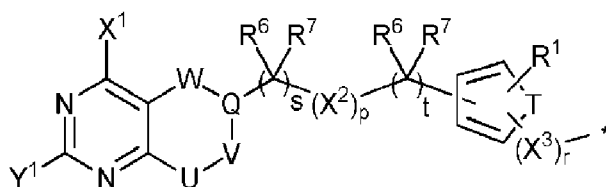
- En otras diversas realizaciones, la dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede variar, por ejemplo, de 10 nmoles/kg a 10000 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 5000 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 3000 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 2500 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 2000 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 1000 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 900 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 800 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 700 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 500 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 400 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 300 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 200 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 150 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 100 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 90 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 80 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 70 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 60 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 50 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 40 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 30 nmoles/kg, de 10 nmoles/kg a 20 nmoles/kg, de 200 nmoles/kg a 900 nmoles/kg, de 200 nmoles/kg a 800 nmoles/kg, de 200 nmoles/kg a 700 nmoles/kg, de 200 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de 200 nmoles/kg a 500 nmoles/kg, de 250 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de 300 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de 300 nmoles/kg a 500 nmoles/kg o de 400 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de peso corporal del paciente. En otras diversas realizaciones, la dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede variar, por ejemplo, de 1 nmoles/kg a 10000 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 5000 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 3000 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 2500 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 2000 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 1000 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 900 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 800 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 700 nmoles/kg,

- de 1 nmoles/kg a 600 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 500 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 400 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 300 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 200 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 150 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 100 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 90 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 80 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 70 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 60 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 50 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 40 nmoles/kg, de 1 nmoles/kg a 30 nmoles/kg o de 1 nmoles/kg a 20 nmoles/kg, En estas realizaciones, "kg" son kilogramos de peso corporal del paciente. En un aspecto, una dosis única o múltiples dosis del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse al paciente.
- En otra realización, de 20 ug/kg de peso corporal del paciente a 3 mg/kg de peso corporal del paciente del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse al paciente. En otro aspecto, las cantidades pueden ser de 0,2 mg/kg de peso corporal del paciente a 0,4 mg/kg de peso corporal del paciente, o pueden ser 50 ug/kg de peso corporal del paciente. En un aspecto, una dosis única o múltiples dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse al paciente.
- En una realización, el ligando de molécula pequeña enlazado a la molécula diana puede administrarse al paciente antes de la composición de células CAR T. En otra realización, el ligando de molécula pequeña enlazado a la molécula diana puede administrarse al paciente al mismo tiempo que la composición de células CAR T, pero en formulaciones diferentes, o en la misma formulación. En otra realización más, el ligando de molécula pequeña enlazado a la molécula diana puede administrarse al paciente después de la composición de células CAR T.
- En un aspecto ilustrativo, el tiempo transcurrido entre la administración de las células CAR T y la molécula pequeña enlazada a la fracción de direccionamiento puede variar ampliamente en función de factores que incluyen el tipo de células CAR T que se usen, la especificidad de unión del CAR, la identidad de la molécula diana y el ligando de molécula pequeña, la identidad del cáncer, la localización del cáncer en el paciente, los medios usados para administrar al paciente las células CAR T y el ligando de molécula pequeña enlazado a la fracción de direccionamiento, y la salud, la edad y el peso del paciente. En un aspecto, el ligando de molécula pequeña enlazada a la molécula diana puede administrarse antes o después de las células CAR T, tal como en 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, o 51 horas, o en 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días.
- En una realización, puede usarse cualquier control estricto de posología aplicable conocido en la técnica para la administración del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o para la composición de células CAR T. Por ejemplo, la posología una vez al día (también conocida como, qd), la posología dos veces al día (también conocida como bid), la posología tres veces al día (también conocida como tid), la posología dos veces por semana (también conocida como BIW), la posología tres veces por semana (también conocida como TIW), la posología una vez por semana y similares, pueden usarse. En un aspecto, el control estricto de posología seleccionado para el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T puede tener en cuenta la concentración del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el número de células CAR T administradas, para regular la citotoxicidad de la composición de células CAR T y controlar CRS.
- En una realización, para impedir o inhibir el síndrome de liberación de citocinas (CRS) en el paciente, un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto comprende un ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador, en donde el ligando de molécula pequeña es un folato y la fracción de direccionamiento es FITC y una composición de células CAR T en donde la composición de células CAR T comprende células CAR T y en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento se proporcionan para su uso en un método de tratamiento de un cáncer, en donde el cáncer es un cáncer que expresa receptores de folato, en donde el método comprende i) administrar a un paciente un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto comprende un ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador, ii) administrar al paciente una composición de células CAR T en donde la composición de células CAR T comprende células CAR T y en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento, y iii) administrar al paciente un folato, un conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o un fármaco que inhibe la activación de las células CAR T, en donde al menos una primera dosis y una segunda dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis y la segunda dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- En esta realización, la etapa de administrar al paciente un folato, un conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o un fármaco que inhibe la activación de las células CAR T puede usarse para impedir o inhibir CRS en el paciente. En esta realización, cualquiera de un folato, un conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o un fármaco que inhibe la activación de las células CAR T puede denominarse en el presente documento un "agente de rescate". En una realización, un folato, tal como ácido fólico, puede administrarse para impedir o inhibir CRS en el paciente. En esta realización, el folato inhibe la interacción del puente (es decir, el

ligando de molécula pequeña enlazado a la molécula diana mediante un enlazador) con los receptores del puente en el tumor inhibiendo la lisis tumoral e impidiendo o inhibiendo CRS en el paciente.

En una realización, el folato administrado como un inhibidor de la unión del puente al tumor puede ser, por ejemplo, ácido fólico, un análogo del ácido fólico u otra molécula de unión al receptor de folato. En diversas realizaciones, los análogos del folato que pueden usarse incluyen ácido folínico, ácido pteropoliglutámico y pteridinas fijadoras de receptores de folato tales como tetrahidropterinas, dihidrofolatos, tetrahidrofolatos y sus análogos desaza y didesaza. Los términos análogos "desaza" y "didesaza" se refieren a los análogos reconocidos en la técnica que tienen un átomo de carbono sustituido por uno o dos átomos de nitrógeno en la estructura natural del ácido fólico. Por ejemplo, los análogos de desaza incluyen los análogos 1-desaza, 3-desaza, 5-desaza, 8-desaza y 10-desaza. Los análogos de didesaza incluyen, por ejemplo, los análogos 1,5-didesaza, 5,10-didesaza, 8,10-didesaza y 5,8-didesaza. Los anteriores análogos del ácido fólico se denominan convencionalmente "folatos", reflejando su capacidad para unirse a los receptores de folato. Otros análogos de la unión al receptor de folato incluyen aminopterina, ametofterina (metotrexato), N10-metilfolato, 2-desamino-hidroxifolato, análogos de desaza tales como 1-desazametofterina o 3-desazametofterina y ácido 3',5'-dicloro-4-amino-4-desoxi-N10-metilpteroilglutámico (diclorometotrexato).

En otra realización, el folato administrado como un inhibidor de la unión del puente al tumor tiene la fórmula



en donde X¹ e Y¹ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en halo, R², OR², SR³ y NR⁴R⁵;

U, V y W representan moléculas divalentes cada una de las cuales se selecciona independientemente del grupo que consiste en -(R⁶ᵃ)C=, -N=, -(R⁶ᵃ)C(R⁷ᵃ)- y -N(R⁴ᵃ)-; Q se selecciona del grupo que consiste en C y CH; T se selecciona del grupo que consiste en S, O, N y -C=C-;

X² y X³ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en oxígeno, azufre, -C(Z)-, -C(Z)O-, -OC(Z)-, -N(R⁴ᵇ)-, -C(Z)N(R⁴ᵇ)-, -N(R⁴ᵇ)C(Z)-, -OC(Z)N(R⁴ᵇ)-, -N(R⁴ᵇ)C(Z)O-, -N(R⁴ᵇ)C(Z)N(R⁵ᵇ)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R⁴ᵃ)S(O)₂-, -C(R⁶ᵇ)(R⁷ᵇ)-, -N(C≡CH)-, -N(CH₂C≡CH)-, alquileo C₁-C₁₂ y alquilenoxi C₁-C₁₂, donde Z es oxígeno o azufre;

R¹ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₂ y alcoxi C₁-C₁₂;

R², R³, R⁴, R⁴ᵃ, R⁴ᵇ, R⁵, R⁵ᵇ, R⁶ᵇ y R⁷ᵇ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₂, alcoxi C₁-C₁₂, alcanóilo C₁-C₁₂, alquenoilo C₁-C₁₂, alquiniilo C₁-C₁₂, (alcoxi C₁-C₁₂)carbonilo y (alquilamino C₁-C₁₂)carbonilo;

R⁶ y R⁷ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₂ y alcoxi C₁-C₁₂; o, R⁶ y R⁷ se toman juntos para formar un grupo carbonilo;

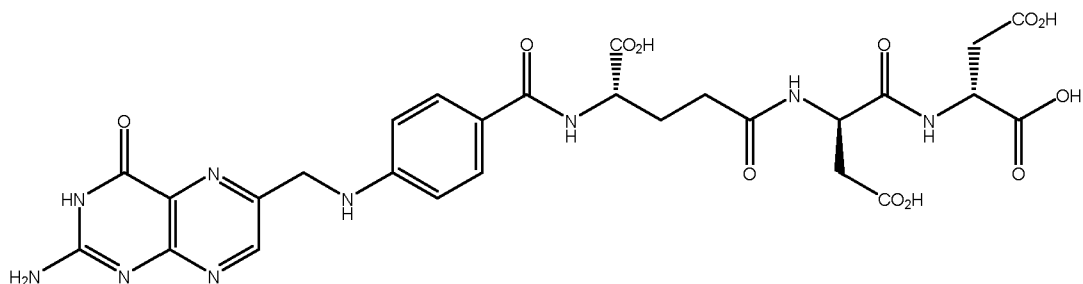
R⁶ᵃ y R⁷ᵃ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₁₂ y alcoxi C₁-C₁₂; o R⁶ᵃ y R⁷ᵃ se toman juntos para formar un grupo carbonilo;

p, r, s y t son cada uno independientemente cualquiera de 0 o 1; y

* representa un enlace covalente opcional con el resto del conjugado, si alguna molécula química adicional forma parte del folato.

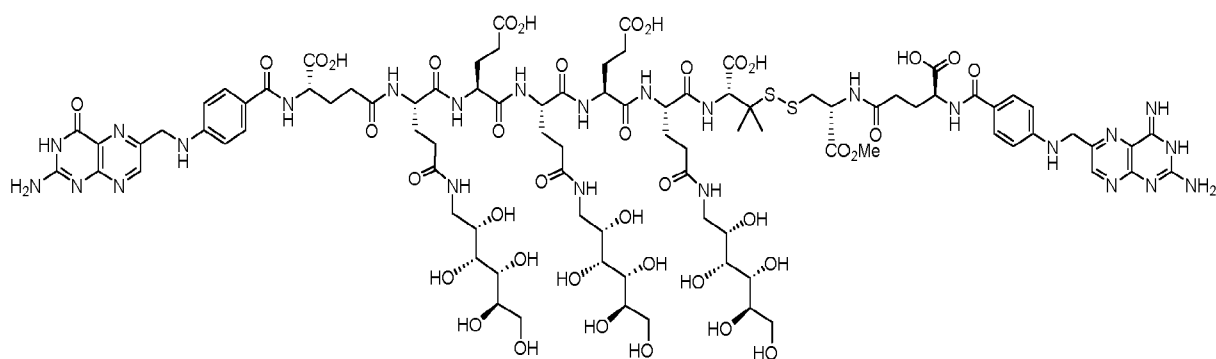
En otra realización más, puede administrarse un conjugado que comprende un folato para impedir o inhibir el síndrome de liberación de citocinas (CRS) en el paciente. CRS es un término bien conocido en la técnica y este síndrome puede provocar efectos perjudiciales para el paciente, incluyendo, pero no limitado a pérdida de peso, fiebre alta, edema pulmonar y una peligrosa caída de la presión arterial.

En esta realización, el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, y, por lo tanto, el conjugado inhibe la interacción del puente con el tumor para impedir la lisis tumoral y reducir CRS en el paciente. En esta realización, la fracción de folato en el conjugado que comprende un folato puede comprender cualquiera de los folatos descritos en los párrafos anteriores enlazado a una fracción química que no comprende una fracción de direccionamiento. En un aspecto, el conjugado que comprende un folato puede comprender un folato unido a uno o más aminoácidos que no comprenden una fracción de direccionamiento. De manera ilustrativa, el conjugado que comprende un folato puede tener la fórmula



Este compuesto también puede denominarse "EC923". En estas realizaciones, el folato o el conjugado que comprende un folato puede administrarse al paciente en exceso molar con respecto al puente (es decir, el ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador), tal como un exceso de 10 veces, un exceso de 100 veces, un exceso de 200 veces, un exceso de 300 veces, un exceso de 400 veces, un exceso de 500 veces, un exceso de 600 veces, un exceso de 700 veces, un exceso de 800 veces, un exceso de 900 veces, un exceso de 1.000 veces o un exceso de 10.000 veces del folato o del conjugado que comprende un folato con respecto al ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador. La cantidad del folato o del conjugado que comprende un folato en relación con la cantidad del ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador necesario para inhibir la interacción del puente con el tumor puede determinarse por el experto.

En otra realización, puede administrarse al paciente un agente que inhiba la activación de las células CAR T para inhibir la activación de las células CAR T e inhibir o impedir CRS en el paciente. En un aspecto el agente puede seleccionarse del grupo que consiste en un inhibidor de la proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (por ejemplo, Dasatinib), un inhibidor de PI3 quinasa (por ejemplo, GDC0980), Tocilizumab, un inhibidor de una quinasa de células T inducible por IL-2 (por ejemplo, BMS-509744), inhibidores de JAK, inhibidores de BTK, agonistas de SIP (por ejemplo Siponimod y Ozanimod) y un agente que bloquea la unión de células CAR T al puente, pero no se une al cáncer (por ejemplo, fluoresceinamina, FITC o fluoresceína sódica). Se entiende por el experto que FITC (es decir, fluoresceína) puede estar en forma de sal (por ejemplo, fluoresceína sódica) o en su forma no de sal, en condiciones fisiológicas o, por ejemplo, en un tampón a pH fisiológico. En consecuencia, en una realización, cuando se administra fluoresceína a un paciente puede estar en equilibrio entre su forma de sal (por ejemplo, fluoresceína sódica) y su forma no de sal. En otra realización, un agente de rescate que inhibe la activación de las células CAR T puede ser un compuesto de fórmula



En diversas realizaciones, el agente de rescate puede administrarse a una concentración de 0,001 nM a 100 mM, de 0,01 nM a 100 mM, de 1 nM a 100 mM, de 10 nM a 100 mM, de 50 nM a 100 mM, o de 100 nM a 100 mM en cualquier volumen apropiado, incluyendo, por ejemplo, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 100 ml o 1000 ml. En otras realizaciones, el agente de rescate puede administrarse a una dosis de 0,01 a 300 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 100 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 90 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 80 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 70 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 60 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 50 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 40 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 30 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 20 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 10 umoles/kg de peso corporal del paciente, de 0,06 a 8 umoles/kg de peso corporal del paciente o de 0,06 a 6 umoles/kg de peso corporal del paciente.

En estas realizaciones, el agente de rescate puede administrarse al paciente en exceso molar en relación con el compuesto, o su sal farmacéuticamente aceptable (es decir, el ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador), tal como un exceso de 10 veces, un exceso de 20 veces, un exceso de 30 veces, un exceso de 40 veces, un exceso de 50 veces, un exceso de 60 veces, un exceso de 70 veces, un exceso de 80 veces, un exceso de 90 veces, un exceso de 100 veces, un exceso de 200 veces, un exceso de 300 veces, un exceso de 400 veces, un exceso de 500 veces, un exceso de 600 veces, un exceso de 700 veces, un exceso de 800 veces, un exceso de 900 veces, un exceso de 1.000 veces, o un exceso de 10.000 veces del agente de rescate con respecto al ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador. La cantidad del agente de rescate en relación con la cantidad del ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador necesario para inhibir la interacción del compuesto, o su sal farmacéuticamente aceptable, con el tumor y/o las células CAR T puede determinarse por el experto.

En otra realización, puede administrarse al paciente más de una dosis de folato, el conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o el agente que inhibe la activación de las células CAR T.

En las realizaciones del "agente de rescate" descritas en el presente documento, el folato, el conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o el agente que inhibe la activación de las células CAR T puede administrarse al paciente antes y/o después del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otro aspecto, el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse antes y después de la administración del folato, el conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o el agente que inhibe la activación de las células CAR T. En esta realización, la administración posterior del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede provocar la activación de las células CAR T y un aumento de los niveles de citocinas en el paciente.

En otra realización, la administración del folato, el conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o el agente que inhibe la activación de las células CAR T puede provocar una reducción de los niveles de citocinas en el paciente. En otra realización más, la reducción de los niveles de citocinas puede producirse en aproximadamente 1 hora, en aproximadamente 2 horas, en aproximadamente 3 horas, en aproximadamente 4 horas, en aproximadamente 5 horas, en aproximadamente 6 horas, en aproximadamente 7 horas o en aproximadamente 8 horas después de la administración del folato al paciente, el conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o el agente que inhibe la activación de las células CAR T. En otra realización, la reducción de los niveles de citocinas es una reducción de aproximadamente los niveles de citocinas en un paciente no tratado. En otra realización ilustrativa, el número de células CAR T puede aumentar en la sangre del paciente después de la administración del folato, el conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o el agente que inhibe la activación de las células CAR T, aunque se reduzcan los niveles de citocinas en el paciente. En otro aspecto ilustrativo, La activación de las células CAR T puede potenciarse o mantenerse, con respecto a un paciente no tratado con un agente de rescate, después de la administración del folato, el conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o el agente que inhibe la activación de las células CAR T, aunque se reduzcan los niveles de citocinas en el paciente tratado. Incluso en otra realización, el cáncer comprende un tumor y el tamaño del tumor en el paciente no aumenta cuando el folato, el conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o el agente que inhibe la activación de las células CAR T se administra al paciente. En esta realización, puede obtenerse una respuesta completa del tumor.

En otras realizaciones, el agente que inhibe la activación de las células CAR T se administra al paciente cuando el grado de CRS alcanza 1, 2, 3 o 4 o cuando el grado de CRS alcanza 3 o 4. En otro aspecto, el edema pulmonar se reduce en el paciente cuando se administra el agente de rescate.

En una realización descrita en el presente documento se proporciona un método de tratamiento de un cáncer, y el método comprende i) administrar continuamente a un paciente un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto comprende un ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador, ii) administrar al paciente una composición de células CAR T que comprende células CAR T en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento, y iii) finalizar la administración continua del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir o impedir el síndrome de liberación de citocinas en el paciente.

De acuerdo con esta realización, el término "continuamente" puede significar administrar el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente, por ejemplo, al menos una hora, al menos cuatro horas, al menos seis horas, al menos ocho horas, al menos diez horas, al menos doce horas o al menos veinticuatro horas o puede

significar un régimen de administración diaria o semanal, tal como una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cada día, cada dos días, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana o cualquier otro régimen adecuado que un experto en la materia consideraría una administración continua. En otro aspecto, el término "continuamente" puede significar cualquier combinación de las realizaciones descritas en este párrafo.

5

En esta realización de métodos, la etapa de "finalizar la administración continua" del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir o impedir el síndrome de liberación de citocinas en el paciente, puede significar, por ejemplo, interrumpir la administración después de su administración durante un periodo de tiempo continuo, tal como horas o días, o interrumpir un régimen de tratamiento, tal como los regímenes diarios o semanales descritos anteriormente. En otra realización, la etapa de "finalizar la administración continua" puede significar, por ejemplo, administración hasta que se produzca una pérdida de peso corporal inaceptable para el paciente, o hasta que aparezca cualquier otro efecto secundario inaceptable tal como una fiebre alta, una bajada de la tensión arterial o un edema pulmonar. En esta realización, la etapa de "finalizar la administración continua" del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no significa un único tratamiento con el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, sin tratamiento posterior con el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En esta realización de métodos "impedir o prevenir" el síndrome de liberación de citocinas (CRS) significa eliminar el CRS o reducir o mejorar los síntomas del CRS.

En una realización de la realización que implica "finalizar la administración continua" del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el método puede comprender además la etapa iv) de volver a administrar el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente. En una realización, el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse, por ejemplo, una vez a la semana y puede omitirse una dosis. En otra realización, el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse en días alternos (es decir, cada dos días) y una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, etc.) dosis pueden omitirse. En otra realización, el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse dos a la semana por semana y una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, etc.) dosis pueden omitirse. En otra realización, el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse el lunes, el martes y el lunes siguiente, y a continuación puede detenerse la dosificación durante dos semanas y repetir el ciclo. En otra realización, cualquiera de las realizaciones del régimen descritas anteriormente puede usarse y una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, etc.) dosis pueden omitirse. En otra realización, pueden usarse combinaciones de estas realizaciones. En estas realizaciones, las dosis omitidas pueden impedir o reducir CRS en el paciente.

Se proporciona en el presente documento un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto comprende un ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador, en donde el ligando de molécula pequeña es un folato y la fracción de direccionamiento es FITC y una composición de células CAR T que comprende células CAR T en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que expresa el receptor de folato, en donde el método comprende i) administrar a un paciente el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde al menos una primera dosis y una segunda dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis y la segunda dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y ii) administrar al paciente una composición de células CAR T que comprende células CAR T en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento.

45

En esta realización, la dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede escalarse gradualmente para inhibir o impedir el síndrome de liberación de citocinas en el paciente. Por ejemplo, al menos una primera dosis y una segunda dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse al paciente, en donde la primera dosis y la segunda dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 20 veces a 15000 veces mayor, de 2 veces a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otras realizaciones, la segunda dosis, o una dosis posterior, puede ser de 2 veces a 5 veces, de 2 veces a 10 veces, de 2 veces a 20 veces, de 2 veces a 30 veces, de 2 veces a 40 veces, de 2 veces a 50 veces, de 2 veces a 60 veces, de 2 veces a 70 veces, de 2 veces a 80 veces, de 2 veces a 90 veces, de 2 veces a 100 veces, de 2 veces a 15000 veces, de 2 veces a 10000 veces, de 5 veces a 9000 veces, de 5 veces a 8000 veces, de 5 veces a 7000 veces, de 5 veces a 6000 veces, de 5 veces a 5000 veces, de 5 veces a 4000 veces, de 5 veces a 3000 veces, de 5 veces a 4000 veces, de 5 veces a 3000 veces, de 5 veces a 2000 veces, de 5 veces a 1000 veces, de 5 veces a 750 veces, de 2 veces a 750 veces, de 5 veces a 500 veces, de 5 veces a 100 veces, de 800 veces a 15000 veces, de 800 veces a 10000 veces, de 800 veces a 9000 veces, de 800 veces a 8000 veces, de 800 veces a 7000 veces, de 800 veces a 6000 veces, de 800 veces a 5000 veces, de 800 veces a 4000 veces, de 800 veces a 3000 veces, de 800 veces a 2000 veces, de 800 veces a 1000 veces, de 8000 veces a 15000 veces, de 8000 veces a 10000 veces, de 8000 veces a 9000 veces, 15000 veces, 10000 veces, 9000 veces, 8000 veces, 7000 veces, 6000 veces, 5000 veces, 4000 veces, 3000 veces, 2000 veces, 1000 veces, 500 veces, 400 veces, 300 veces, 200 veces, 100 veces, 90 veces,

80 veces, 70 veces, 60 veces, 50 veces, 40 veces, 30 veces, 20 veces, 10 veces, 5 veces o 2 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización ilustrativa del método de escalado de dosis, al menos una primera dosis, una segunda dosis y una tercera dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis y la tercera dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la tercera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto del método de escalado de dosis, al menos una primera dosis, una segunda dosis, una tercera dosis y una cuarta dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis, la tercera dosis y la cuarta dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 7500 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 8000 a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Incluso en otra realización, la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede ser 100 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede ser 1000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede ser 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización ilustrativa, la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 0,05 nmoles/kg, la segunda dosis es de 5 nmoles/kg, la tercera dosis es de 50 nmoles/kg y la cuarta dosis es de 500 nmoles/kg. En las realizaciones de escalado de dosis descritas en el presente documento, la primera, la segunda, la tercera, la cuarta y cualquier dosis posteriores del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden administrarse múltiples veces (por ejemplo, la primera dosis a 0,05 nmoles/kg puede administrarse varias veces antes de administrar las dosis escaladas posteriores).

En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el cáncer se visualiza antes de la administración al paciente del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o antes de la administración de la composición de células CAR T al paciente. En una realización ilustrativa, la formación de imágenes se produce mediante formación de imágenes por PET. En otras realizaciones ilustrativas la formación de imágenes se produce por medio de formación de imágenes por IRM o formación de imágenes por SPECT/CT. El método de formación de imágenes puede ser cualquier método de formación de imágenes conocido en la técnica. En una realización, el método de formación de imágenes puede implicar el uso del ligando de molécula pequeña descrito en el presente documento, pero enlazado a un agente de formación de imágenes adecuado para los tipos de formación de imágenes descritos en el presente documento.

En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la liberación de citocinas que provoca toxicidad inespecífica en el paciente puede no producirse aunque se produzca toxicidad de las células CAR T para el cáncer. En cualquier realización descrita en el presente documento, puede que no se produzca toxicidad tisular inespecífica en el paciente aunque se produzca toxicidad de las células CAR T para el cáncer. En cualquier realización descrita en el presente documento, el cáncer puede comprender un tumor y el tamaño del tumor puede reducirse en el paciente, aunque no se produzca toxicidad inespecífica. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, CRS puede reducirse o impedirse y el método puede dar lugar a una disminución del volumen tumoral en el paciente. En cualquier realización descrita en el presente documento, la pérdida de peso corporal debida al CRS puede reducirse o impedirse. En cualquier realización descrita en el presente documento, el cáncer puede comprender un tumor y puede obtenerse una respuesta completa para el tumor.

En otra realización de los métodos descritos en el presente documento, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede usarse solo, o cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede usarse junto con cualquier otro método o métodos descritos en el presente documento.

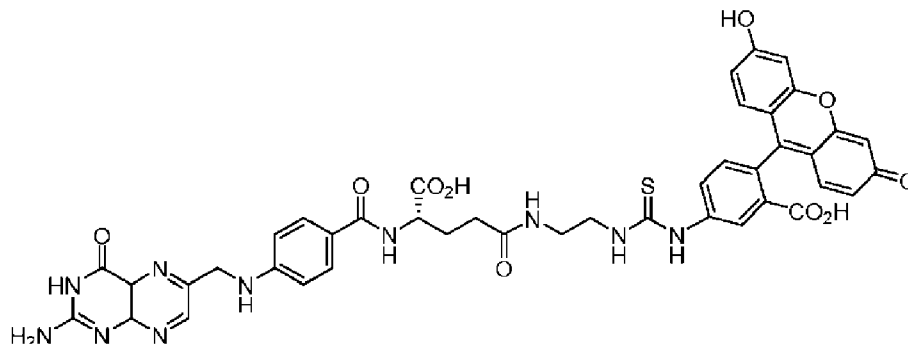
60 Ejemplos

Los Ejemplos 5-8 no están cubiertos por la materia objeto de las reivindicaciones.
Los Ejemplos 38-43 están cubiertos parcialmente por la materia objeto de las reivindicaciones.

EJEMPLO 1

Síntesis de FITC-Folato

5

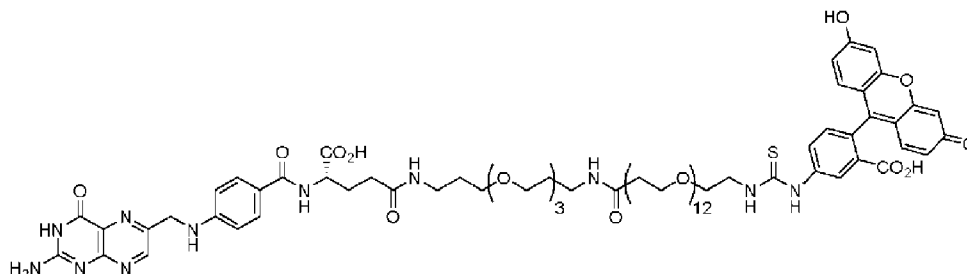


Se acopló folato- γ -etilendiamina a isómero I de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) en dimetilsulfóxido (DMF) anhidro en presencia de tetrametilguanidina y diisopropilamina. El producto bruto se cargó en una columna de HPLC preparativa Xterra RP18 (Waters) y se eluyó con condiciones de gradiente empezando con fosfato sódico 5 mM al 99 % (fase móvil A, pH 7,4) y acetonitrilo al 1 % (fase móvil B) y alcanzando el 90 % de A y el 10 % de B en 10 min a un caudal de 20 ml/min. En estas condiciones, el máximo principal de FITC-folato eluyó normalmente a los 27-50 min. La calidad de la fracción de FITC-folato se monitorizó mediante HPLC analítica en fase inversa con un detector de UV. Las fracciones con una pureza mayor del 98,0 % (CLEM) se liofilizaron para obtener el producto final FITC-folato. Como se conoce en la técnica, el compuesto con esta estructura también se denomina EC17.

EJEMPLO 2

Síntesis de FITC-PEG12-Folato

20



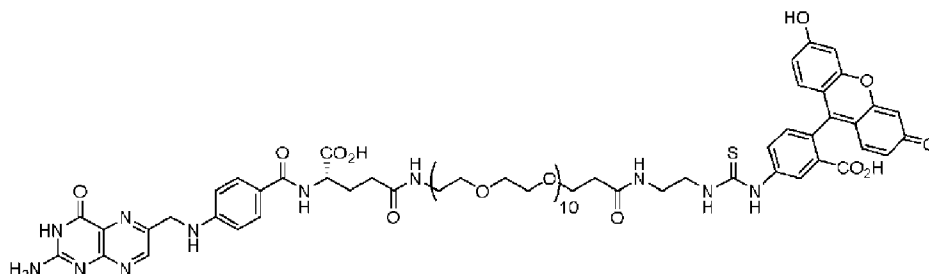
La resina universal de polietilenglicol (PEG) Nova Tag™ (0,2 g) se cargó en un recipiente de síntesis de péptidos y se lavó con alcohol isopropílico (*i*-PrOH) (3 × 10 ml) y dimetilformamida (DMF, 3 × 10 ml). La desprotección con 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) se llevó a cabo usando piperidina al 20 % en DMF (3 × 10 ml). Se realizaron pruebas de Kaiser para evaluar el progreso de la reacción. A continuación se introdujo en el recipiente una solución de éster butílico de ácido 5-*terc*-fmoc-L-glutámico (Fmoc-Glu-(O-*t*-Bu)-OH) (23,5 mg) en DMF, N,N-diisopropiletilamina (*i*-Pr₂NEt) (4 equiv), y hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) (2 equiv). La desprotección con Fmoc se llevó a cabo usando piperidina al 20 % en DMF (3 × 10 ml). A continuación se introdujo en el recipiente una solución de N¹⁰-TFA-Pte-OH (22,5 mg), DMF, *i*-Pr₂NEt (4 equiv) y PyBOP (2 equiv). Se burbujeó argón durante 2 h y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e *i*-PrOH (3 × 3 ml). Después de hinchar la resina en diclorometano (DCM), se añadió una solución de hidroxibenzotriazol (HOBT) 1 M en DCM/trifluoroetano (TFE) (1:1) (2 × 3 ml). Se burbujeó argón durante 1 h, se eliminó el disolvente y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e *i*-PrOH (3 × 3 ml). Después de hinchar la resina en DMF, se añadió una solución de Fmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH (46,3 mg) en DMF, *i*-Pr₂NEt (4 equiv) y PyBOP (2 equiv). Se burbujeó argón durante 2 h y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e *i*-PrOH (3 × 3 ml). La desprotección con Fmoc se llevó a cabo usando piperidina al 20 % en DMF (3 × 10 ml). Se realizaron pruebas de Kaiser para evaluar el progreso de la reacción. A continuación se introdujo en el recipiente una solución de FITC (Life Technologies 21,4 mg) en DMF e *i*-Pr₂NEt (4 equiv), después se burbujeó Argón durante 2 h, y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e *i*-PrOH (3 × 3 ml). A continuación se añadió al recipiente NH₂NH₂ al 2 % en DMF (2 × 2 ml). El compuesto final se separó de la resina usando una TFA:H₂O: triisopropilsilano (TIS) (95:2,5:2,5) (solución de escisión) y se concentró al vacío. El producto concentrado se precipitó en Et₂O y se secó al vacío. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa (fase móvil: A = acetato de amonio 10 mM pH = 7, B = ACN; método: del 0 % de B al

30 % de B en 30 min a 13 ml/min). Las fracciones puras se agruparon y se liofilizaron, proporcionando el FITC-PEG12-Folato.

EJEMPLO 3

5

Síntesis de FITC-PEG20-Folato



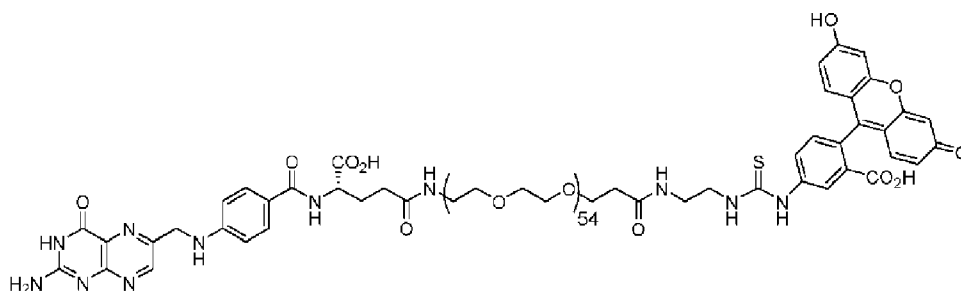
- 10 Etilendiamina, resina unida a polímero (malla 200-400) (50 mg) se cargó en un recipiente de síntesis de péptidos y se hinchó con DCM (3 ml) seguido de DMF (3 ml). A continuación se introdujo en el recipiente la solución de Fmoc-PEG₂₀-COOH (131 mg, 1,0 equiv) en DMF, *i*-Pr₂NEt (6,0 equiv) y PyBOP (4,0 equiv). Se burbujeó argón durante 6 h, se drenó la solución de acoplamiento y la resina se lavó con DMF (3 × 10 ml) e *i*-PrOH (3 × 10 ml). Se realizaron pruebas de Kaiser para evaluar el progreso de la reacción. La desprotección con Fmoc se realizó usando piperidina al 20 % en
- 15 DMF (3 × 10 ml), antes de cada acoplamiento de aminoácidos. La secuencia anterior se repitió para completar la reacción con las etapas de acoplamiento Fmoc-Glu-OtBu (72 mg, 2,0 equiv) y Tfa. ácido ptericoico (41 mg, 1,2 equiv). La resina se lavó con hidracina al 2 % en DMF 3 × 10 ml (5 min) para escindir el grupo protector trifluoroacetilo en el ácido ptericoico y se lavó con *i*-PrOH (3 × 10 ml) seguido de DMF (3 × 10 ml). La resina se secó en argón durante 30 min. El folato-péptido se separó de la resina usando la solución de escisión. Se introdujeron 10 ml de la mezcla de escisión y se burbujeó argón durante 1,5 h. La mezcla de escisión se vació en un matraz limpio. La resina se lavó 3 veces con más mezcla de escisión. La mezcla combinada se concentró a presión reducida hasta un volumen menor (~ 5 ml) y se precipitó en éter etílico.

El precipitado se recogió por centrifugación, se lavó con éter etílico (3 veces) y se secó a alto vacío. El Folato-PEG₂₀-EDA seco (1,0 equiv) se trató con FITC (50 mg, 1,5 equiv) en DMSO y DIPEA a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitorizó por CLEM. Después de 8 h el material de partida se consumió para dar el producto. La mezcla de reacción bruta se purificó por HPLC preparativa, (fase móvil A = acetato de amonio 10 mM, pH = 7; Fase orgánica B = Acetonitrilo; Método: del 0 % de B al 30 % de B en 35 minutos a 13 ml/min) y proporcionó FITC-PEG20-Folato en un rendimiento del 60 %.

30

EJEMPLO 4

Síntesis de FITC-PEG108-Folato



35

- Etilendiamina, resina unida a polímero (malla 200-400) (50 mg) se cargó en un recipiente de síntesis de péptidos y se hinchó con DCM (3 ml) seguido de DMF (3 ml). A continuación se introdujo en el recipiente la solución de Fmoc-PEG₃₆-COOH (161 mg, 1,0 equiv) en DMF, *i*-Pr₂NEt (6,0 equiv) y PyBOP (4,0 equiv). Se burbujeó argón durante 6 h, se drenó la solución de acoplamiento y la resina se lavó con DMF (3 × 10 ml) e *i*-PrOH (3 × 10 ml). Se realizaron pruebas de Kaiser para evaluar el progreso de la reacción. La desprotección con Fmoc se realizó usando piperidina al 20 % en DMF (3 × 10 ml), antes de cada acoplamiento de aminoácidos. Se repitió la secuencia anterior para completar la reacción con las etapas de acoplamiento 2X Fmoc-PEG₃₆-COOH (161 mg, 1,0 equiv), Fmoc-Glu-OtBu (72 mg, 2,0 equiv) y Tfa. ácido ptericoico (41,0 mg, 1,2 equiv). Al final la resina se lavó con hidracina al 2 % en DMF 3 × 10 ml (5
- 40 min) para escindir el grupo protector trifluoroacetilo en el ácido ptericoico y se lavó con *i*-PrOH (3 × 10 ml) seguido de
- 45

DMF (3 × 10 ml). La resina se secó en argón durante 30 min. El folato-péptido se separó de la resina usando la solución de escisión. Se introdujeron 10 ml de la mezcla de escisión y se burbujeó argón durante 1,5 h. La mezcla de escisión se vació en un matraz limpio. La resina se lavó 3 veces con más solución de escisión. La mezcla combinada se concentró a presión reducida hasta un volumen menor (~ 5 ml) y se precipitó en éter etílico.

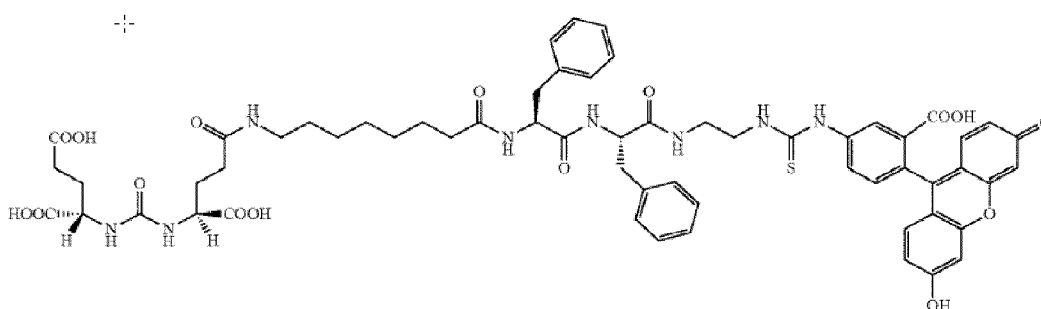
5

El precipitado se recogió por centrifugación, se lavó con éter etílico (3X) y se secó a alto vacío. El Folato-PEG₁₀₈-EDA seco (1,0 equiv) se trató con FITC (50 mg, 1,5 equiv) en DMSO y DIPEA a temperatura ambiente. El avance de la reacción se monitorizó por CLEM. Después de 10 h el material de partida se consumió para dar el producto. La mezcla de reacción bruta se purificó por HPLC preparativa, (fase móvil A = acetato de amonio 10 mM, pH = 7; Fase orgánica B = Acetonitrilo; Método: del 0 % de B al 30 % de B en 35 minutos a 13 ml/min) y proporcionó FITC-PEG108-Folato en un rendimiento del 64 %.

10

EJEMPLO 5

15 Síntesis de FITC-DUPA



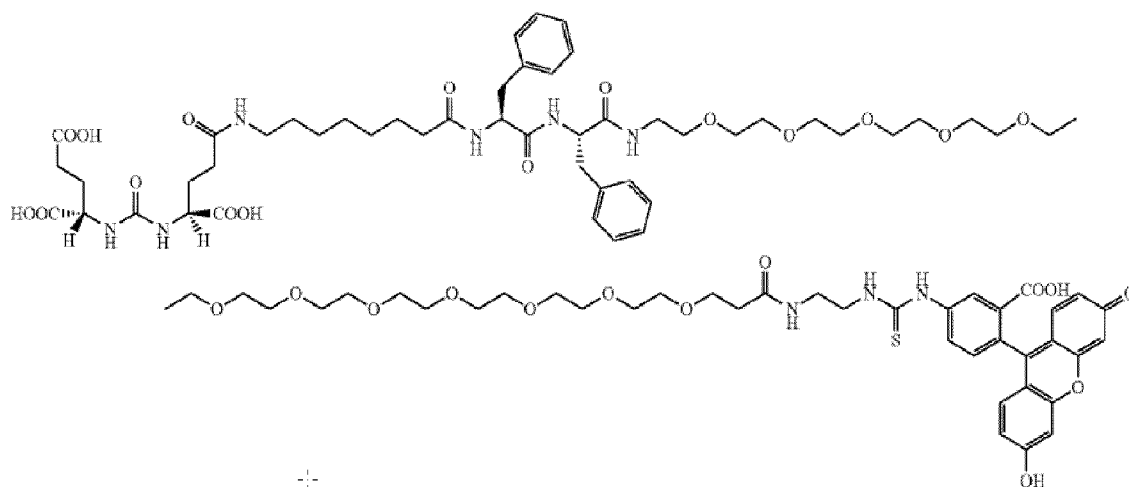
DUPA-FITC se sintetizó mediante metodología en fase sólida como sigue. La resina Universal Nova Tag™ (50 mg, 0,53 mM) se hinchó con DCM (3 ml) seguido de DMF (3 ml). Una solución de piperidina al 20 % en DMF (3 × 3 ml) se añadió a la resina y se burbujeó argón durante 5 min. La resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) y alcohol isopropílico (*i*-PrOH, 3 × 3 ml). Después de hinchar la resina en DMF, se añadió una solución de DUPA-(OtBu)-OH (1,5 equiv), HATU (2,5 equiv) e *i*-Pr₂NEt (4,0 equiv) en DMF. Se burbujeó argón durante 2 h y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e *i*-PrOH (3 × 3 ml). Después de hinchar la resina en DCM, se añadió una solución de HOBT 1 M en DCM/TFE (1:1) (2 × 3 ml). Se burbujeó argón durante 1 h, se eliminó el disolvente y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e *i*-PrOH (3 × 3 ml). Después de hinchar la resina en DMF, se añadió una solución de Fmoc-Phe-OH (2,5 equiv), HATU (2,5 equiv) y DIPEA (4,0 equiv) en DMF. Se burbujeó argón durante 2 h y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e *i*-PrOH (3 × 3 ml). La secuencia anterior se repitió para 2 etapas más de acoplamiento para la adición de ácido 8-aminooctanoico e isotiocianato de fluoresceína o isotiocianato de rodamina B. El compuesto final se separó de la resina usando la solución de escisión y se concentró al vacío. El producto concentrado se precipitó en éter dietílico y se secó al vacío. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa [λ = 488 nm; gradiente de disolvente: del 1 % de B al 80 % de B en 25 min, lavado de B al 80 % 30 min de ejecución; A = NH₄OAc 10 mM, pH = 7; B = acetonitrilo (ACN)]. El ACN se eliminó al vacío y las fracciones purificadas se liofilizaron para obtener FITC-DUPA como un sólido de color naranja parduzco. RP-HPLC: tR = 8,0 min (A = NH₄OAc 10 mM, pH = 7,0; B = ACN, gradiente de disolvente: del 1 % de B al 50 % de B en 10 min, lavado de B al 80 % 15 min de ejecución). RMN ¹H (DMSO-d₆/D₂O): δ 0,98-1,27 (ms, 9H); 1,45 (a, 3H); 1,68-1,85 (ms, 11H); 2,03 (m, 8H); 2,6-3,44 (ms, 12H); 3,82 (a, 2H); 4,35 (m, 1H); 6,53 (d, J = 8,1 Hz, 2H); 6,61 (dd, J = 5,3, 3,5 Hz, 2H); 6,64 (s, 2H); 7,05 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 7,19 (m, 5H); 7,76 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 8,38 (s, 1H). HRMS (ESI) (m/z): (M + H)⁺ calc. para C₅₁H₅₉N₇O₁₅S, 1040,3712, encontrado, 1040,3702. UV/vis: λ máx = 491 nm.

35

40

EJEMPLO 6

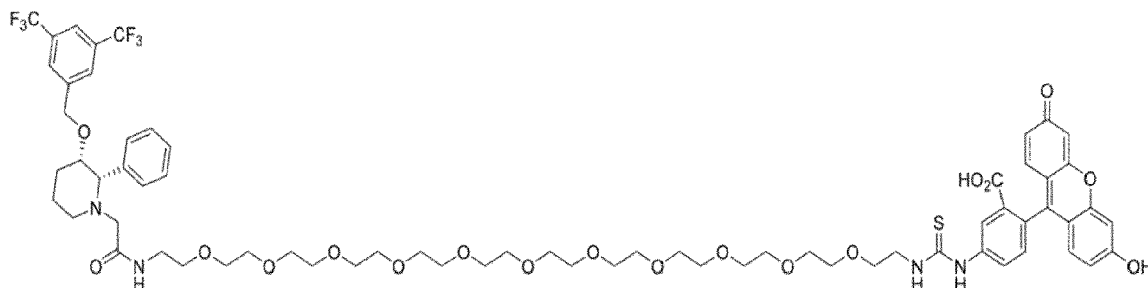
Síntesis de FITC-PEG12-DUPA



Se cargó 1,2-diaminoetano-tritil-resina (0,025 g) en un recipiente de síntesis de péptidos y se lavó con *i*-PrOH (3 × 10 ml), seguido de DMF (3 × 10 ml). A continuación se introdujo en el recipiente una solución de Fmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH (42,8 mg) en DMF, *i*-Pr₂NEt (2,5 equiv) y PyBOP (2,5 equiv). La solución resultante se burbujeó con Ar durante 1 h, se drenó la solución de acoplamiento y la resina se lavó con DMF (3 × 10 ml) e *i*-PrOH (3 × 10 ml). Se realizaron pruebas de Kaiser para evaluar el progreso de la reacción. La desprotección con Fmoc se llevó a cabo usando piperidina al 20 % en DMF (3 × 10 ml). Este procedimiento se repitió para completar todas las etapas de acoplamiento (se usaron 2 × 1,5 equiv de Fmoc-Phe-OH y 1,5 equiv de ácido 8-aminooctanoico y 1,2 equiv de DUPA en cada una de sus respectivas etapas de acoplamiento). Después del acoplamiento DUPA, la resina se lavó con DMF (3 × 10 ml) e *i*-PrOH (3 × 10 ml) y se secó a presión reducida. El péptido se separó de la resina en el recipiente de síntesis peptídica usando la solución de escisión. Se añadieron 15 ml de la solución de escisión al recipiente de síntesis peptídica y se burbujeó la reacción en Ar durante 15 minutos. La resina se trató con dos cantidades adicionales de 10 ml de la solución de separación durante 5 min cada una. La mezcla de escisión se concentró a aproximadamente 5 ml y se precipitó con éter etílico. El precipitado se recogió por centrifugación, se lavó con éter etílico (3X) y se secó a alto vacío, dando lugar a la recuperación de material bruto. A una solución agitada de DUPA-(PEG)₁₂-EDA bruto (10 mg) y FITC (5,6 mg) en dimetilsulfóxido (DMSO, 1 ml) se añadió *i*-Pr₂NEt (5 equiv) a temperatura ambiente y se agitó durante 6 h en argón. La reacción se monitorizó por CLEM y se purificó por HPLC preparativa (fase móvil: A = acetato de amonio 10 mM pH = 7, B = ACN; método: del 0 % de B al 50 % de B en 30 min a 13 ml/min). Las fracciones purificadas se agruparon y se liofilizaron, proporcionando el FITC-PEG12-DUPA.

EJEMPLO 7

Síntesis de FITC-PEG11-NK1



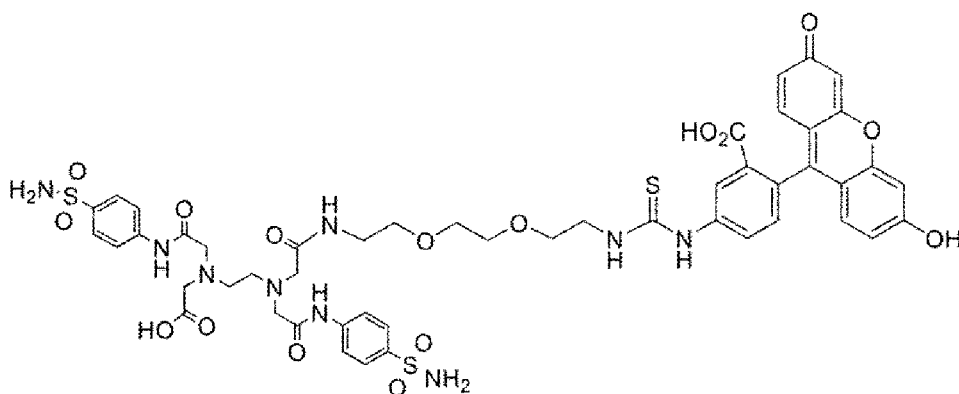
A una solución agitada de NK-1 (0,02 g, 0,0433 mmol, 1,0 eq.), O-(2-Aminoetil)-O'-[2-(Boc-amino)etil]decaetilenglicol (BocNH-PEG₁₁-NH₂) (Sigma, 0,0336 g, 0,0521 mmol, 1,2 eq.), Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) (0,027 g, 0,0521 mmol, 1,2 eq.) en CH₂Cl₂ seco se añadió N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA) (0,076 ml, 0,4338 mmol, 10 eq.) en argón a temperatura ambiente. El avance de la reacción se monitorizó mediante CLEM y se purificó mediante RP-HPLC preparativa (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 µm; columna de 19 × 100 mm, fase móvil A = tampón acetato de amonio 20 mM, pH 7, B = acetonitrilo, gradiente del 10-100 % B en 30 min, 13 ml/min, λ = 220 nm, 254 nm). Las fracciones puras se recogieron, se evaporaron todos los disolventes orgánicos y la muestra se liofilizó durante 48 h para proporcionar el NK1-PEG₁₁-NHBoc. Rendimiento: 40,13 mg (97 %). Al NK1-PEG₁₁-NHBoc (0,0165 g, 0,015 mmol) en DCM seco se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 20 eq.) y la mezcla de

reacción se agitó durante 4 h a ta. Se eliminó el exceso de TFA y la solución restante se diluyó con agua y se extrajo con CH_2Cl_2 (3×5 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. El residuo obtenido se secó al vacío y se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional. A una solución agitada de NK1-PEG₁₁-NH₂ (0,008 g, 0,0081 mmol, 1,0 eq.), Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, 0,0037 g, 0,0097 mmol, 1,2 eq.) en dimetilsulfóxido (DMSO, 0,3 ml) seco se añadió a la diisopropiletilamina (0,0028 ml, 0,0162 mmol, 2,0 eq.) a temperatura ambiente en argón. El avance de la reacción se monitorizó mediante CLEM y el producto se purificó mediante RP-HPLC preparativa (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 μm ; columna de 19×100 mm, fase móvil A = tampón acetato de amonio 20 mM, pH 7, B = acetonitrilo, gradiente del 10-100 % B en 30 min, 13 ml/min, $\lambda = 280$ nm). Las fracciones puras se recogieron, todos los disolventes orgánicos se evaporaron y la muestra se liofilizó durante 48 h para proporcionar el FITC-PEG11-NK1 en un rendimiento de 8,54 mg (77 %).

*Nota: El compuesto NK-1 se sintetizó mediante un procedimiento de dos etapas partiendo del ligando base, que se preparó siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía. (Ref: DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEUROKININ-1 RECEPTOR-BINDING AGENT DELIVERY CONJUGATES, Número de solicitud: PCT/US2015/44229.

EJEMPLO 8

Síntesis de FITC-PEG2-CA9



El ligando CA9 (53,6 mg) se disolvió en DMF (2-3 ml) en un matraz de fondo redondo de 50 ml usando una barra de agitación magnética de teflón. El aire ambiental se eliminó usando vacío y se reemplazó por gas nitrógeno, esto se realizó en tres ciclos. El matraz de fondo redondo se mantuvo en gas nitrógeno constante. Al matraz, se añadieron 28,9 mg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) seguidos de 21,6 mg de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 18,9 μl de Boc-PEG₂-NH₂ (Sigma Aldrich). Se añadieron 5,4 μl de trietilamina (TEA) y la reacción se agitó durante toda la noche. La mezcla de reacción se purificó usando HPLC y se confirmó con UHPLC-MS (m/z diana de 831). El acetonitrilo se eliminó usando evaporación rotatoria a alto vacío y el producto se liofilizó. El compuesto se mezcló con TFA:DCM 1:1 durante 30 minutos. El TFA/DCM se eliminó mediante evaporación rotatoria a alto vacío seguida de 30 minutos a alto vacío. A continuación el compuesto se disolvió en DMF y se combinó con 5 equivalentes molares de *i*-Pr₂NEt, 16 mg de isotiocianato de fluoresceína (Life Technologies) y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC y el compuesto diana se confirmó con UHPLC-MS (m/z diana de 1120). Las muestras se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C.

EJEMPLO 9

La activación de células CAR T anti-FITC puede controlarse mediante la interrupción de la administración de ligandos FITC o la introducción de una cantidad excesiva de molécula pequeña competidora

Se inyectaron células MDA-MB-231 por vía subcutánea en los hombros de ratones NSG (Jackson Laboratory) para establecer xenoinjertos tumorales sólidos. Cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 50-100 mm³, las células CAR T anti-FITC (15×10^6 células) se introdujeron por vía intravenosa en ratones portadores de tumores. Veinte ratones NSG se dividieron en cuatro grupos de estudio (5 animales en cada grupo). El primer grupo se trató con células CAR T anti-FITC con solución salina tamponada con fosfato (PBS) como un control negativo. El segundo, el tercer y el cuarto grupos se trataron con células CAR T anti-FITC con FITC-Folato (500 nmol/kg) cada dos días. Una vez se detectó una toxicidad significativa (por ejemplo, una pérdida grave de peso corporal), estos grupos se trataron con uno de: administración continuada de FITC-Folato (segundo grupo); interrupción de la administración de FITC-Folato hasta la recuperación de los ratones (tercer grupo); o una mezcla de 100 veces el exceso de EC0923 (es decir, folato libre) y FITC-Folato hasta que los ratones se recuperaron (cuarto grupo). Se midió regularmente el peso corporal para

monitorizar la toxicidad. Además, se midió la concentración sanguínea de interferón (IFN)-gamma de cada grupo de tratamiento para monitorizar el grado de activación de CAR T anti-FITC. Finalmente, se midió el volumen tumoral para identificar la eficacia antitumoral en cada grupo de tratamiento.

5 La Figura 1A muestra los cambios de peso corporal en cada grupo de tratamiento. Cada grupo de tratamiento, excepto el grupo tratado con PBS, mostró una disminución del peso corporal debido a la toxicidad mediada por células CAR T anti-FITC después de la segunda dosis de FITC-Folato (Día 1 y Día 2). Ya que se detectó toxicidad en cada grupo de ratones, los tratamientos de cada grupo se separaron como se ha descrito anteriormente en: (1) dosis continuada de FITC-Folato (grupo continuado); (2) interrumpir la inyección de FITC-Folato (grupo de interrupción) el día 4 y el día 6; 10 y (3) una mezcla de 100 veces el exceso de folato libre y FITC-Folato (grupo competidor) el día 4 y el día 6. Como se muestra en la Figura 1A, los grupos tratados con una inyección discontinua de FITC-Folato o con la administración de una mezcla de una molécula competidora y FITC-Folato se recuperaron de la toxicidad grave mediada por células CAR T anti-FITC (es decir, aumento del peso corporal). Sin embargo, el grupo que fue tratado continuamente con FITC-Folato el día 4 y el día 6, siguió perdiendo peso corporal hasta alcanzar un estado letárgico (es decir, pérdida de 15 peso corporal >20 % del original). Como se muestra en la Figura 1B, se detectó una cantidad significativa de IFN-gamma en el grupo de dosis continuadas. A diferencia del grupo de dosis continuadas, la concentración de IFN-gamma disminuyó tanto en el grupo de ruptura como en el de competidor. Estos resultados indican que la activación de las células CAR T anti-FITC puede controlarse mediante métodos que alivien la toxicidad mediada por las células CAR T. La Figura 1C resume la supervivencia de los ratones de cada grupo de tratamiento en la primera semana de 20 tratamiento (%). Se detectó toxicidad provocada por la célula CAR T anti-FITC en el grupo de dosis continuada, solo el 40 % de los ratones del grupo de dosis continuada (es decir, 2 de 5 ratones) pudieron sobrevivir al tratamiento. Sin embargo, como se muestra en la Figura 1C, todos los ratones tanto del grupo de ruptura como del competidor sobrevivieron a la toxicidad mediada por las células CAR T debido a la reducción de la activación de las células CAR T.

25 Aunque la toxicidad mediada por las células CAR T anti-FITC puede gestionarse controlando la activación de las células CAR T anti-FITC, se determinó si la regulación de la activación de las células CAR T anti-FITC provoca alguna reducción de la respuesta tumoral. Por lo tanto, el volumen tumoral se midió cada tres días. Como se muestra en las Figuras 2A y 2B, el grupo de control tratado con células CAR T anti-FITC con PBS no mostró respuesta tumoral, como se esperaba. Curiosamente, los grupos de interrupción (respuesta completa del 100 %) y competidor (respuesta completa del 75 %) mostraron una respuesta tumoral más potente en comparación con el grupo de dosis continuada (retraso del crecimiento tumoral). La falta de respuesta completa en el grupo de dosis continuada puede deberse a: 30 (1) una posología demasiado frecuente con FITC-Folato que provoque una saturación de ambos receptores diana (es decir, las células CAR T y los receptores de folato en las células cancerosas) dando como resultado una reducción de la activación de las células CAR T anti-FITC; (2) las células CAR T anti-FITC pueden haberse hiperactivado debido a la repetida afectación de las células cancerosas mediante la inyección continua de FITC-Folato. Esta hiperactivación puede haber provocado una inducción significativa de un mecanismo inhibitorio como respuesta de retroalimentación que impide la activación. En resumen, la monitorización de la toxicidad (Ejemplo 9) y la respuesta tumoral demuestran que puede lograrse el control de la activación de las células CAR T anti-FITC mediante la gestión de la toxicidad 40 mediada por las células CAR T (por ejemplo, tormenta de citocinas) sin una pérdida de la eficacia antitumoral de las células CAR T.

EJEMPLO 10

45 El efecto de la regulación de las células CAR T anti-FITC en la respuesta tumoral

Cinco grupos experimentales: (1) célula anti-FITC CAR T con PBS; (2) célula anti-FITC CAR T con FITC-Folato (5 nmoles/kg); (3) célula anti-FITC CAR T con FITC-Folato (50 nmoles/kg); (4) célula anti-FITC CAR T con FITC-Folato (500 nmoles/kg); (5) célula anti-FITC CAR T con FITC-Folato (2500 nmoles/kg) se diseñaron para identificar la relación 50 entre la respuesta de las células anti-FITC CAR T y la dosis de ligandos FITC. Se inyectaron células MDA-MB-231 por vía subcutánea en los hombros de ratones NSG (Jackson Laboratory) para establecer xenoinjertos tumorales sólidos. Cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 50-100 mm³, se introdujeron por vía intravenosa en los ratones células CAR T anti-FITC (15×10^6 células) y diferentes dosis de FITC-Folato.

55 Para monitorizar la activación de células anti-FITC CAR T con las diferentes dosis de FITC-Folato, la concentración de IFN-gamma se midió en sangre de ratón mediante un inmunoensayo basado en perlas (kit Legendplex de Biolegend). También se midió el volumen tumoral. La toxicidad general de cada grupo de tratamiento se monitorizó midiendo la pérdida de peso.

60 Las Figuras 3A-D muestran que la activación de las células CAR T anti-FITC depende de la concentración de FITC-Folato. Las concentraciones de INF-gamma en cada grupo de tratamiento mostraron una curva de respuesta a dosis en forma de campana (Figura 3A). La activación de las células CAR T anti-FITC se correlacionó positivamente con un aumento de la dosis de FITC-Folato. Sin embargo, si la dosis de FITC-Folato (2500 nmol/kg) era superior a

500 nmol/kg, la activación de las células CAR T empezó a disminuir. Esto puede deberse al hecho de que los receptores diana tanto en la célula CAR T (por ejemplo anti-FITC) como en la célula cancerosa (por ejemplo receptor de folato) pueden saturarse por separado a las dosis más altas de los ligandos FITC. Esto puede disminuir la funcionalidad de los ligandos FITC como puente entre las células CAR T y las células cancerosas. Como se muestra en la Figura 3B, la respuesta a la dosis en forma de campana se confirmó también con la respuesta tumoral. La eficacia antitumoral de las células CAR T se indujo mediante concentraciones crecientes de FITC-Folato (de 5 nmoles/kg a 500 nmoles/kg). Similar a los niveles de la citocina proinflamatoria, la eficacia antitumoral de las células CAR T también empezó a disminuir a mayor concentración de FITC-Folato (2500 nmoles/kg). Como se muestra en la figura 3C, la toxicidad máxima (es decir, la tasa de supervivencia más baja de los ratones) se observó en el grupo tratado con 500 nmoles/kg, que también mostró la mayor eficacia antitumoral. Por otra parte, a través de una disminución o un aumento de la dosis de FITC-Folato, la toxicidad mediada por las células CAR T se alivió gradualmente. Por lo tanto, ya que la activación de las células CAR T anti-FITC depende de la dosis de ligando FITC, la gestión de la toxicidad mediada por células CAR T puede lograrse a través de la alteración de la dosis de ligando FITC.

15 EJEMPLO 11

Administración de un fármaco capaz de desactivar la señal de activación de las células CAR T anti-FITC

Para probar si la activación de células CAR T anti-FITC puede suprimirse mediante agentes que inhiban un mediador de la señal de activación de células T, se seleccionaron los siguientes agentes: (1) dasatinib, que está aprobado por la FDA para su uso en el tratamiento de CML en adultos (se sabe que el Dasatinib suprime la activación natural de las células T mediante la inhibición de la activación de LCK), (2) Inhibidor de PI3K (GDC0980), que se encuentra en fase 2 de ensayo clínico (se sabe que PI3K desempeña un papel fundamental en la activación de las células T), (3) Quinasa de células T inducible (ITK, BMS-509744), que también interviene en la señal de activación de las células T y se encuentra en fase preclínica. Para estudiar la eficacia de cada agente en la supresión de la activación de las células CAR T, se realizó un estudio funcional *in vitro* de células CAR T (por ejemplo, ensayo de producción de citocinas proinflamatorias y evaluación del grado de activación de células CAR T mediante marcadores de activación de superficie) en presencia de varias concentraciones de cada agente.

30 Estudio funcional de células CAR T 1: Ensayo de producción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IFN-gamma)

Se realizó un ensayo ELISA para cuantificar el nivel de producción de IFN-gamma por las células CAR T anti-FITC en presencia de cada agente usando un kit ELISA de detección de IFN-gamma humano de Biolegend. Para realizar el ensayo ELISA, cada muestra se obtuvo desde la coincubación de células CAR T anti-FITC, células MDA-MB-231, FITC-ligandos y cada agente. Las células MDA-MB-231 se sembraron previamente a una densidad de 10^4 células/100 μ l de medio en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, las células CAR T se introdujeron en cada pocillo donde se sembraron las células MDA-MB-231. Se introdujo FITC-Folato 100 nM para activar la célula CAR T anti-FITC. Se añadieron de 0,01 nM a 100 μ M de cada agente a cada pocillo y las células se cultivaron 24 horas. Después de la coincubación, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron para eliminar los restos celulares a 1000 g y 4 °C durante 10 min. Los sobrenadantes aclarados de cada muestra se usaron para detectar directamente IFN-gamma mediante ELISA o se almacenaron a -80 °C. El ensayo ELISA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estudio funcional de células CAR T 2: Evaluación del grado de activación de las células CAR T

Para identificar el grado de activación de las células CAR T en presencia de cada agente, la superficie de las células CAR T se tiñó con un anticuerpo anti-CD69 (CD69 es un marcador de superficie de activación de células T). Específicamente, las células CAR T se coincubaron con células MDA-MB-231 presembradas en presencia de FITC-Folato (100 nM) y cada agente (0,01 nM a 100 μ M) durante 24 horas. Después de la coincubación, se recogieron las células CAR T y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD69 durante 15 min en hielo. Las células CAR T se lavaron 2 veces con tampón de tinción (2 % FBS en PBS). Después del lavado, las células CAR T se analizaron mediante citometría de flujo.

Las Figuras 4A-B muestran que la activación de las células CAR T anti-FITC puede regularse dirigiéndose a un mediador clave de la señal de activación de las células T. Como se muestra en las Figuras 4A y 4B, dasatinib y GDC0980 mostraron eficacia en la supresión de la activación de células CAR T anti-FITC. En presencia de cada agente (>10 nM), la producción de IFN-gamma se inhibió significativamente y las células CAR T anti-FITC siguieron dirigiéndose a las células cancerosas a través de FITC-Folato (Figura 4A). La inhibición de la activación de células CAR T con cada agente se confirmó también mediante la comprobación de un marcador convencional de activación de células T, CD69. Como se muestra en la Figura 4B, las células CAR T activadas (células CD69 positivas) disminuyeron en presencia de cada agente a una concentración >10 nM. Aunque el inhibidor de PI3K y dasatinib mostraron una eficacia similar en la supresión de la activación de células CAR T *in vitro*, puede preferirse el dasatinib.

EJEMPLO 12

Preparación de células T

- 5 Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de sangre total de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (GE Healthcare Lifesciences). A continuación se aislaron células T a partir de PBMC usando un kit de aislamiento de células T humanas EasySep™ (STEM CELL technologies). Las células T se cultivaron en medio TexMACS (Miltenyi Biotech Inc) con 40-100 UI/ml de IL-2 humana (Miltenyi Biotech), 2 % de suero humano de tipo AB y 1 % de sulfato de penicilina/estreptomicina. Se añadieron Dynabeads
- 10 Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific) a las células T en proporción 1:1 para activarlas. 12-24 horas después de la activación, las células T se transdujeron con partículas lentivíricas FITC-CAR en presencia de 8 µg/ml de polibrina (Santa Cruz Biotech) mediante espinfeción a 1.200 g durante 90 minutos a 22-32 °C. La mezcla de células T que contenía aquellas con modificación CAR (CAR-T) y aquellas sin modificación CAR (T no transformadas) se cultivó en presencia de perlas de activación durante 6 días antes de retirar las perlas de activación. Se usó la
- 15 clasificación celular activada por fluorescencia para separar las células CAR-T (GFP positivas) de las células T no transformadas (GFP negativas) en función de su expresión de GFP. Las células T seleccionadas se cultivaron durante 7-15 días antes de inyectarlas en ratones. Cuando se usó una mezcla de células T, las células CAR-T y las células T no transformadas se mezclaron en la proporción deseada antes de la inyección en el ratón. Los datos que se muestran en las Figuras 6-11 se obtuvieron con células T preparadas con estos procedimientos.

20

EJEMPLO 13

Generación del vector lentivírico que codifica el gen CAR

- 25 Se usó un método de PCR solapada para generar construcciones CAR que comprenden scFv contra fluoresceína. scFv contra fluoresceína, se sintetizó 4M5.3 (Kd = 270 fM, 762 pb) derivado del anticuerpo anti-fluoresceína (4-4-20). La secuencia que codifica el péptido señal de CD8α humano (SP, 63 pb), la bisagra y la región transmembrana (249 pb), el dominio citoplasmático de 4-1BB (CD137, 141 pb) y la cadena CD3ζ (336 pb), como se muestra en la Figura 5, se fusionaron con el scFv anti-fluoresceína mediante PCR solapada. La construcción CAR resultante
- 30 (1551 pb) se insertó en el vector de expresión lentivírico escindido por EcoRI/NotI pCDH-EF1-MCS-(PGK-GFP) (Figura 5, System Biosciences). La secuencia de la construcción CAR en el vector lentivírico se confirmó mediante secuenciación del ADN. Salvo que se indique lo contrario en el presente documento, la construcción CAR usada para generar los datos de los Ejemplos, tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
- 35 Una secuencia codificante de ácido nucleico de CAR ilustrativa puede comprender:

```

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG
CCAGGCCGGATGTCGTGATGACCCAGACCCCCCTCAGCCTCCCAGTGTCCCTCGG
TGACCAGGCTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCCTCTAACGGT
AATACCTACCTGAGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAGGTGCTG
ATCTACAAAGTCTCCAACCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAGGGAGCG
GTTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAGACCTCG
GCGTCTATTTCTGCTCTCAGAGTACACATGTGCCCTGGACCTTCGGCGGAGGGAC
CAAGCTGGAGATCAAAAGCTCCGCAGACGATGCCAAGAAAGATGCCGCTAAGAA
AGACGATGCTAAGAAAGACGATGCAAAGAAAGACGGTGGCGTGAAGCTGGATG
AAACCGGAGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGCCATGAAGCTGAGTTGCGTGA
CCAGCGGATTACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGGTGCGACAGTCCCCAGA
GAAGGGGCTCGAATGGGTGCTCAGTTTCAGGAACAAACCCTACAATTATGAGAC
ATACTATTCAGACAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTA
    
```

--

GAGACGATTCCAAATCTAGCGTGACCTGCAGATGAACAATCTCAGGGTCGAAG
 ATACAGGCATCTACTATTGCACAGGGGGCATCCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCA
 GGGGACAAGCGTCACAGTCAGTTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCACC
 ACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCC
 CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACG
 AGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTT
 GTGGGGTTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAACCACAGGAACCG
 TTTCTCTGTTGTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA
 TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC
 CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
 GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
 GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
 ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT
 GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
 GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA
 AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID
 NO:1).

En la secuencia de ácido nucleico ilustrativa mostrada anteriormente (SEQ ID NO:1) el primer ATG es el codón de inicio. Una secuencia de aminoácidos de CAR ilustrativa puede comprender:

5

MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNT
 YLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGYYFC
 SQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDGGVKLDDETGGGL
 VQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYETYYSDS
 VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGTSVTVSFVPVF
 LPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG
 TCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
 EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPR (SEQ ID NO:2)

Un inserto ilustrativo puede comprender:

ES 3 010 559 T3

GCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCC
ACGCCGCCAGGCCGGATGTCTGTATGACCCAGACCCCCCTCAGCCTCCCAGTGTC
CCTCGGTGACCAGGCTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCACTCT
AACGGTAATACCTACCTGAGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAG
GTGCTGATCTACAAAGTCTCCAACCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAG
GGAGCGGTTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAG
ACCTCGGCGTCTATTTCTGCTCTCAGAGTACACATGTGCCCTGGACCTTCGGCGG
AGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGCTCCGCAGACGATGCCAAGAAAGATGCCG
CTAAGAAAGACGATGCTAAGAAAGACGATGCAAAGAAAGACGGTGGCGTGAAG
CTGGATGAAACCGGAGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGCCATGAAGCTGAGT
TGCGTGACCAGCGGATTACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGGTGCGACAGT
CCCCAGAGAAGGGGCTCGAATGGGTGCTCAGTTCAGGAACAAACCCTACAATT
ATGAGACATACTATTACAGACAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTA
GAGACGATTCCAAATCTAGCGGTACCTGCAGATGAACAATCTCAGGGTCTGAAG
ATACAGGCATCTACTATTGCACAGGGGCATCCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCA
GGGGACAAGCGTCACAGTCAGTTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACC
ACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCAACCATCGCGTGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACG
AGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTT
GTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAACCACAGGAACCG
TTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA
TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC
CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT
GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA
AGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID
NO:3)

En el inserto ilustrativo descrito anteriormente (SEQ ID NO:3), la primera secuencia GCCACC puede comprender un sitio de escisión por enzimas de restricción, seguido del codón de inicio ATG. La secuencia de aminoácidos codificada 5 puede comprender:

MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNT
YLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYFC
SQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKDAKDDAKKDDAKKDDGGVKLDETGGGL
VQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYETYYS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDTGIIYCTGASYGMEYLGQGTSTVTSFVPVF
LPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG
TCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR (SEQ ID NO:2)

EJEMPLO 14

5 Producción de lentivirus que contienen el gen CAR para la transducción de células T humanas

Para preparar virus lentivíricos que contengan un CAR de fragmento variable monocatenario (scFv) antiluoresceína (es decir, anti-FITC), una línea celular de envasado HEK-293TN se co-transfectó con el vector lentivírico que codifica CAR scFv anti-luoresceína y una 2ª generación de una mezcla de plásmidos de envasado lentivíricos (Cellecta) o ViraPower Lentiviral Packaging Mix (ThermoFisher). Después de 24 y 48 horas de transfección, los sobrenadantes que contenían el lentivirus con el gen CAR se recogieron y las partículas de virus se concentraron mediante el método convencional de concentración de virus con polietilenglicol (Clontech) para la futura transducción con células T humanas.

15 EJEMPLO 15

Aislamiento de células T humanas a partir de PBMC humanas

Las células T se aislaron a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (GE Healthcare Lifesciences). Después de lavar la solución de Ficoll restante, las células T se aislaron usando un Kit de aislamiento de células T humanas EasySep™ (STEM CELL technologies). Las células T purificadas se cultivaron en medio TexMACSTM (Miltenyi Biotech Inc) con penicilina al 1 % y sulfato de estreptomicina en presencia de IL-2 humana (100 UI/ml, Miltenyi Biotech Inc). Las células T se cultivaron a una densidad de 1×10^6 células/ml en placas de múltiples pocillos. Las células T se dividieron y realimentaron cada 2-3 días.

EJEMPLO 16

Transducción de células T humanas

Las células T aisladas se activaron con Dynabeads acopladas con anticuerpos anti-CD3/CD28 (Life Technologies) durante 12-24 horas en presencia de IL-2 humana (100 UI/ml), a continuación se transdujeron con lentivirus que codifican un gen CAR antiluoresceína. Las células se recogieron después de 72 horas y la expresión de CAR sobre células T transducidas se identificó mediante la medición de células fluorescentes GFP usando citometría de flujo.

35 EJEMPLO 17

Probar la eficacia antitumoral de las células CAR T *in vivo*

Se usaron ratones NSG inmunodeficientes (Jackson Laboratory) para identificar la eficacia de la actividad antitumoral de las células CAR T *in vivo*. Se inyectó por vía subcutánea en el dorso de ratones NSG una línea celular de cáncer MDA-MB-231 que expresaba receptores de folato para establecer xenoinjertos tumorales sólidos. Cuando se alcanzó un volumen tumoral de alrededor de 100-300 mm³, se introdujo una concentración deseada de EC 17 (como se muestra en las leyendas de las figuras) 4 horas antes de la administración de un número deseado de células CAR T (como se muestra en las leyendas de las figuras) en los ratones portadores de tumores. Después de la administración inicial de EC17 y células CAR T, también se introdujeron (i.v.) concentraciones deseadas de EC17 (como se muestra

en las leyendas de las figuras) tres veces por semana. A los ratones control se les administraron células T sin modificación CAR. A otros ratones de control se les administraron CAR-T, pero se dosificó PBS en lugar de EC17. La eficacia antitumoral se evaluó en función del volumen tumoral. La toxicidad general del tratamiento se monitorizó por pérdida de peso, morfología y comportamiento animal en bruto.

5

El ajuste de la dosis de puente puede reducir la liberación de citocinas y la toxicidad, manteniendo al mismo tiempo el efecto antitumoral. Como se muestra en las leyendas de las Figuras 6A-D, se administraron células T o células CAR T a ratones junto con 0, 20 nmoles/kg, 100 nmoles/kg, 500 nmoles/kg, 1500 nmoles/kg o 10000 nmoles/kg de EC 17. El volumen tumoral (Figura 6A) y los cambios en el peso corporal (Figura 6B) se midieron a lo largo de 74 días. El porcentaje máximo de pérdida de peso corporal para cada dosis de EC 17 se muestra en la Figura 6C. Entre paréntesis se indica el número de ratones que presenta el síndrome de liberación grave de citocinas y el número total de ratones de cada grupo. El porcentaje de ratones que mostraron sCRS para cada dosis de EC17 se muestra en la Figura 6D. En comparación con los ratones de una cohorte con una dosis de EC17 superior (500 nmoles/kg), los ratones de una cohorte con dosis de 20 y 100 nmoles/kg de EC17 tenían un menor porcentaje de sCRS y una menor pérdida de peso corporal, mientras que todos ellos alcanzaron curas completas. Con dosis de puente sobresaturado EC17 (1500 y 10000 nmoles/kg), menos ratones mostraron sCRS pero menos ratones alcanzaron la curación.

10

15

La reducción de la dosis de CAR-T o la división de la dosis de CAR-T en 2 dosis puede evitar el síndrome grave de liberación de citocinas, manteniendo al mismo tiempo la eficacia antitumoral. La dosis de EC 17 se fijó en 500 nmoles/kg. Como se muestra en las leyendas de las Figuras 8A-D se introdujeron diferentes dosis de CAR T en los ratones. El volumen tumoral (Figura 8A) y el peso corporal (Figura 8B) se midieron a lo largo de 56 días. Entre paréntesis se indica el número de ratones que presenta el síndrome de liberación grave de citocinas y el número total de ratones de cada grupo. El porcentaje máximo de pérdida de peso corporal para cada dosis de CAR T se muestra en la Figura 8C. El porcentaje de ratones que mostraron sCRS para cada dosis de CAR T se muestra en la Figura 8D.

25

El ajuste de la dosis de células CAR T y de la dosis de EC17 puede afectar al tamaño del tumor. Se administraron células T o células CAR T a ratones junto con 100 nmoles/kg o 500 nmoles/kg de EC17. Como se muestra en las leyendas de las Figuras 9A-B, se administraron control o células CAR T con diferentes concentraciones de EC17. El volumen tumoral (Figura 9A) y el peso corporal (Figura 9B) se midieron durante 75 días. Entre paréntesis se indica el número de ratones que presenta el síndrome de liberación grave de citocinas y el número total de ratones de cada grupo. Con la cantidad de EC17 y el número de CAR T optimizados, los ratones solo tenían un 2 % de pérdida de peso corporal mientras alcanzaban la curación completa.

30

La presencia de células CAR T en una segunda dosis de células T puede afectar al tamaño del tumor. Como se muestra en las leyendas de las Figuras 10A-C, no se administró segunda dosis de células T, una segunda dosis con 20 millones de células T no transformadas, o una segunda dosis con una mezcla de células T no transformadas y células CAR T. El volumen tumoral (Figura 10A) y el peso corporal (Figura 10B) se midieron a lo largo del tiempo. Las cantidades medidas de células CAR T/células T normales en 50 µl de sangre del paciente 2 semanas después de la inyección de la mezcla de células CAR T se muestran en la Figura 10C para un ratón para el tratamiento sin segunda dosis de células T, y para dos ratones cada uno para los grupos de tratamiento de una segunda dosis con 20 millones de células T no transformadas, o una segunda dosis con una mezcla de células T no transformadas y células CAR T. La Figura 10C también muestra los correspondientes gráficos de citometría de flujo de las cantidades medidas de células T normales y células CAR T, y los correspondientes volúmenes tumorales 4 semanas después de la inyección de la mezcla de células CAR T.

45

El ajuste del control estricto de dosis de EC 17 puede reducir la toxicidad y afectar al tamaño del tumor. Como se muestra en las leyendas de las Fig. 11A-B, se administraron células CAR T y EC17 a ratones usando diferentes controles estrictos de posología. El volumen tumoral (Figura 11A) y el peso corporal (Figura 11B) se midieron a lo largo del tiempo. Entre paréntesis se indica el número de ratones que presenta el síndrome de liberación grave de citocinas y el número total de ratones de cada grupo. Ajustar la frecuencia de dosificación del puente (de tres veces por semana (TIW) a una vez por semana (SIW)) puede reducir la toxicidad y lograr una mejor potencia antitumoral.

50

EJEMPLO 18

55 Probar la capacidad de rescate de EC0923 durante el tratamiento con células CAR T *in vivo*

Se introdujeron células CAR T en ratones portadores de tumores y también se introdujo EC17 (i.v.) tres veces por semana. Cuando se observó un síndrome grave de liberación de citocinas, se introdujo una dosis de EC0923 a 10 µmoles/kg para rescatar a los ratones. Los ratones se monitorizaron durante 4 días más y a algunos se les practicó la eutanasia para evaluar los órganos. Los órganos de ratones tratados con o sin EC0923 6 horas, 1 día y 4 días después del tratamiento se muestran en la Figura 7. Los ratones con una dosis de EC0923 empezaron a moverse y a buscar comida después de 4 horas, y sus bazo e hígados estaban enrojecidos. Los ratones control sin EC0923 no se movían después de 6 horas, y sus bazo e hígados estaban pálidos. Los ratones tratados con EC0923 volvieron a

60

estar activos en 24 horas y se esperaba que sobrevivieran, por lo que se les volvió a administrar la dosis normal de EC17. Los ratones de control sin EC0923 empezaron a moverse un poco en 24 horas, pero tuvieron que sacrificarse para impedir el sufrimiento de los animales. Los ratones con EC0923 parecían normales en 4 días. Uno de los ratones fue sacrificado y se comprobó que tenía el bazo y el hígado de color normal. El bazo del ratón rescatado estaba agrandado, lo que indica que los CAR-T seguían proliferando a pesar de la dosis única de EC0923 de rescate. Otros ratones restantes con EC0923 recibieron la dosis habitual de EC17 tres veces por semana, y sus tumores desaparecieron en 4 semanas.

EJEMPLO 19

Control de la activación de células CAR T *in vivo*

La activación de las células CAR T anti-FITC puede controlarse interrumpiendo la administración de los ligandos FITC, la introducción de cantidades excesivas de pequeñas moléculas competidoras (por ejemplo ácido fólico (AF)), o una combinación de estos dos enfoques.

Para mostrar el control de la activación de las células CAR T, una línea celular de cáncer de mama humano (por ejemplo MDA-MB-231) se inyectó por vía subcutánea en el hombro de ratones NSG (Jackson Laboratory) para establecer xenoinjertos tumorales sólidos. Cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 50-100 mm³, se introdujeron aproximadamente 15×10⁶ células CAR T anti-FITC en ratones con tumores por vía intravenosa. Se diseñaron cinco grupos de estudio para comprobar si la activación de células CAR T anti-FITC puede controlarse mediante la terminación temporal de los ligandos FITC, mediante la administración de una pequeña molécula competidora o un enfoque combinado de la interrupción de los ligandos FITC y/o la administración de un competidor FA. El primer grupo se trató administrando células CAR T anti-FITC con solución salina tamponada con fosfato (PBS) como un control negativo. Cada dos días a lo largo del estudio, el segundo, el tercero, el cuarto y el quinto grupos se trataron con células CAR T anti-FITC mezcladas con FITC-Folato (500 nmol/kg). Una vez detectado un acontecimiento de toxicidad significativo (es decir, pérdida grave de peso corporal), el régimen de tratamiento se alteró para los cuatro grupos como sigue: (1) el grupo 2 continuó con inyecciones de FITC-Folato (Continuado); (2) el grupo 3 recibió un tratamiento combinado que incluía la supresión de FITC-Folato y la recepción de una cantidad excesiva de folato libre (Interrupción + Competidor FA); (3) el grupo 4 recibió una interrupción de FITC-Folato hasta que los ratones se recuperaron (Interrupción); y (4) el grupo 5 recibió una mezcla que contenía un exceso 100 veces superior de ácido fólico libre (es decir, EC0923) en relación con FITC-Folato hasta que los ratones se recuperaron (FITC-Folato + Competidor FA). Se midió regularmente el peso corporal de los ratones para comprobar su toxicidad.

Resultados. La Figura 12 (barras alrededor de la línea 0 = control PBS; primera barra de cada grupo por debajo de la línea 0 = continuo; segunda barra de cada grupo por debajo de la línea 0 = interrupción + competidor FA; tercera barra de cada grupo por debajo de la línea 0 = interrupción; cuarta barra en cada grupo por debajo de la línea 0 = competidor FA) muestra que la toxicidad mediada por células CAR T anti-FITC puede gestionarse controlando la activación de células CAR T anti-FITC mediante la interrupción de la inyección de FITC-Folato, administración de una cantidad excesiva de una molécula competidora, o una combinación de ambas. El gráfico y la tabla de la Figura 12 muestran que la toxicidad mediada por células CAR T (por ejemplo tormenta de citocinas) puede gestionarse controlando la activación de células CAR T mediante la interrupción de los ligandos FITC (Interrupción); administración de una cantidad en exceso de ácido fólico libre como competidor con FITC-Folato (500 nmol/kg) (FITC-Folato + Competidor FA); o una combinación de estos dos enfoques (Interrupción + Competidor FA). La Figura 12 muestra además que los grupos tratados con células CAR T + FITC-Folato demostraron pérdida de peso corporal debido a la hiperactivación de las células CAR T. Cuando se detectó una toxicidad grave mediada por células CAR T (es decir, >10 % de pérdida de peso), se probaron tres métodos diferentes (mencionados anteriormente) para averiguar si se puede disminuir el grado de activación de las células CAR T y gestionar la toxicidad mediada por células CAR T. Basándose en los datos, los tres métodos son capaces de controlar el grado de activación de las células CAR T para aliviar la toxicidad mediada por las células CAR T. Adicionalmente, la combinación de la interrupción de FITC-Folato y la administración de una cantidad excesiva de ácido fólico libre mostró una mayor eficacia en la disminución de la toxicidad mediada por células CAR T en comparación con cada enfoque por separado. Como era de esperar, el grado de activación de las células CAR T disminuyó cuando se limitó la cantidad de FITC-Folato. Simultáneamente, la administración de una cantidad excesiva de ácido fólico libre puede competir con el FITC-Folato al interferir con la interacción entre el FITC-Folato y el receptor de folato. Por lo tanto, un tratamiento de combinación que incluye la terminación de FITC-Folato y la administración de un competidor de folato puede promover la rápida disminución de la toxicidad mediada por células CAR T.

EJEMPLO 20

Estudio de escalado de dosis de FITC-Folato *in vivo*

Para probar si el aumento gradual de la dosis de FITC-Folato puede minimizar la toxicidad mediada por las células CAR T sin comprometer la eficacia antitumoral de las células CAR T, se diseñó un experimento. Primero se introdujo una dosis de FITC-Folato (0,05 nmoles/kg) en ratones NSG portadores de MDA-MB-231 (volumen tumoral de aproximadamente 50-100 mm³) junto con inyecciones de células CAR T anti-FITC (usando aproximadamente 5 15×10⁶ células). Se administraron a los ratones dos dosis adicionales de aproximadamente 0,05 nmol/kg de FITC-Folato. A continuación se aumentaron gradualmente las dosis de FITC-Folato de 5 nmol/kg (dosis única) a 50 nmol/kg (dos dosis). Después de un aumento gradual de la dosis de FITC-Folato, los ratones se trataron con una dosis de 500 nmol/kg de FITC-Folato. Esta concentración mostró una buena eficacia tumoral, pero también provocó toxicidad si los ratones fueron tratados inicialmente con la dosis de 500 nmoles/kg. La toxicidad general de cada grupo de 10 tratamiento se monitorizó midiendo la pérdida de peso corporal. Se midió el volumen tumoral para controlar la eficacia antitumoral de las células CAR T anti-FITC.

La Figura 13 muestra que un aumento gradual de la dosis de FITC-Folato puede minimizar la toxicidad mediada por células CAR T anti-FITC sin comprometer la eficacia antitumoral de las células CAR T. Específicamente, las Figuras 15 13A y 13C demuestran que no se detectó toxicidad grave (es decir, >10 % de pérdida de peso) usando los protocolos de tratamiento gradual en comparación con el grupo que se trató continuamente con 500 nmoles/kg de FITC-Folato. La Figura 13B muestra que la activación gradual de las células CAR T mediante un aumento gradual de la dosis de FITC-Folato, no afectó negativamente a la eficacia antitumoral de las células CAR T. Por lo tanto, podría usarse un aumento gradual de la dosis de FITC-Folato para tratar tumores usando un puente de FITC-Folato, evitando al mismo 20 tiempo efectos secundarios de toxicidad graves y sustanciales.

EJEMPLO 21

Efecto del folato-FITC en el número de células CAR-T y en las citocinas séricas

25 La línea celular de cáncer de mama humano triple negativo (es decir, MDA-MB-231) se implantó por vía subcutánea en los hombros de ratones inmunodeficientes (por ejemplo NSG). Cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 50-100 mm³, se introdujeron por vía intravenosa células CAR T anti-FITC (10⁷ células) con FITC-folato (500 nmoles/kg) o PBS. Para monitorizar la proliferación de células CAR T y la producción de citocinas proinflamatorias, la sangre de los ratones se recogió el Día 6. La proliferación de células CAR T se evaluó tiñendo una 30 muestra de sangre total con un anticuerpo anti CD3 humano (Biolegend) y detectando la expresión de GFP en la población de células T CD3 positivas. La producción de citocinas proinflamatorias se midió mediante un inmunoensayo basado en perlas (kit Legendplex de biolegend).

35 La Figura 14A muestra que las células CAR T anti-FITC solo proliferaron significativamente cuando la molécula puente se introdujo en ratones portadores de tumores. Sin embargo, en ausencia de la molécula puente compatible con el antígeno, las células CAR T anti-FITC no proliferaron significativamente. Adicionalmente, las citocinas proinflamatorias (por ejemplo IL-2, TNF-α e IFN-γ) se produjeron de forma significativa cuando los ratones portadores de tumores se trataron tanto con células CAR T anti-FITC como con la molécula puente de antígeno coincidente. Tomadas en 40 conjunto las figuras 14A y 14B, muestran que las células CAR T anti-FITC pueden proliferar y activarse específicamente para producir citocinas proinflamatorias dirigiéndose a las células cancerosas a través de la molécula puente Folato-FITC emparejada con el antígeno.

EJEMPLO 22

Ensayo de interferón-γ *in Vitro*

Para estudiar la relación entre la dosis de puente y la activación de células CAR T anti-FITC, se sembró una línea celular de cáncer positiva a receptor de folato (MDA-MB-231) a una densidad de 10⁴ células/100 ul de medio en cada 50 pocillo de una placa de 96 pocillos y las células se cultivaron durante toda la noche. A continuación se añadieron células CAR T anti-FITC (5×10⁴ células) en cada pocillo que contenía células cancerosas con varias concentraciones de Folato-FITC (de 0,001 nM a 100 μM) durante 6-24 horas. Después de la coincubación, las placas que contenían células CAR T anti-FITC y células cancerosas se centrifugaron durante 10 minutos a 350 x g para eliminar las células y los restos celulares y se ensayaron 50 ul de sobrenadante mediante ELISA (kit ELISA de IFN-γ humano de 55 Biolegend) para detectar la producción de IFN-γ por las células CAR T anti-FITC.

Para evaluar la relación entre la dosis de puente y la activación de células CAR T anti-FITC, se midió el nivel de IFN-γ producido por las células CAR T anti-FITC después de la coincubación de las células CAR T con células cancerosas a diversas concentraciones de FITC-folato *in vitro* como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 60 15, el nivel de producción de IFN-γ aumentaba a medida que se aumentaba la dosis de puente. Sin embargo, si la dosis del puente era superior a la dosis óptima (es decir, el nivel más alto de IFN-γ [10 nM]), la producción de IFN-γ disminuyó y finalmente no se detectó cuando se introdujeron dosis muy elevadas (por ejemplo, 10 μM y 100 μM) del puente (es decir, una respuesta a la dosis del puente en forma de campana). Este resultado *in vitro* puede deberse a

que la dosis elevada del puente puede saturar todos los receptores diana tanto en las células cancerosas como en las células CAR T *in vitro*. Estos resultados demuestran que la toxicidad mediada por células CAR T puede controlarse manipulando la dosis del puente. En la Figura 15, "Dosis de adaptador" en el eje X es la dosis de Folato-FITC.

5 EJEMPLO 23

Capacidad de rescate de los competidores durante el tratamiento con células CAR T *in vivo*

Se introdujo un exceso de células CAR T (de 8 a 10 millones en cada estudio) en ratones portadores de tumores MDA-MB-231 y también se introdujeron 500 nmol/kg de EC17 (i.v.) tres veces por semana. Cuando se observó un síndrome grave de liberación de citocinas, se introdujo por vía intravenosa una dosis de EC0923 (folato) o de fluoresceína no ligada (ambas a 10 μ moles/kg) para rescatar a los ratones (Figura 16). Los ratones con una dosis de EC0923 o fluoresceína empezaron a moverse y a buscar comida después de 4 horas, volvían a estar activos en 24 horas y tenían un aspecto normal en 4 días. A continuación se continuó con la administración de EC17. Los ratones de control sin EC0923 ni fluoresceína no se movieron al cabo de 4 horas y tuvieron que ser sacrificados a causa de la enfermedad. Se recogieron muestras de sangre 6 horas después de la administración de los competidores y se midieron los niveles de citocinas (véase la Figura 16). Cuatro semanas después, los tumores se eliminaron de los ratones con el tratamiento de rescate. A todos los ratones sometidos a pruebas de producción de citocinas se les inyectaron 8 millones de células CAR-T.

20 EJEMPLO 24

La actividad de los CAR-T depende tanto del nivel de dosis puente como de la presencia del tumor

Se inyectaron células CAR-T en ratones sin tratamiento previo (8 millones por ratón) y ratones portadores de tumores MDA-MB-231 (5 millones por ratón). Se administraron varios niveles de EC17 tres veces por semana. Se midió el IFN- γ en sangre 10 días después de la inyección de células CAR-T. Como se muestra en la Figura 17, la producción de citocinas (actividad CAR-T) depende tanto del nivel de dosis de puente (EC 17) como de la presencia del tumor.

30 EJEMPLO 25

Las células CAR-T no proliferan en ratones sin tratamiento previo sin tumores

Se inyectaron (i.v.) cinco millones de células CAR-T en ratones sin tratamiento previo sin tumores. Se administraron 500 nmoles/kg de EC 17 tres veces por semana. Los ratones se monitorizaron durante 5 semanas y a algunos se les practicó la eutanasia cada semana para evaluar los órganos. No se observó pérdida aparente de peso corporal (toxicidad) en ninguno de los ratones, tanto si se administraba EC17 como si no (Figura 18A). Las células CAR-T no proliferaron en ratones sin tratamiento previo con o sin administración de EC 17, como indica el número de células CAR-T en sangre (Figura 18B) y el tamaño del bazo (Figura 18C).

40 EJEMPLO 26

Actividad antitumoral de FITC-CAR-T dependiente de EC17 en diferentes modelos de xenoinjertos tumorales positivos para receptores de folato

Se usaron ratones NSG inmunodeficientes (Jackson Laboratory) para demostrar la eficacia de la actividad antitumoral de las células CAR T con una dosis única de EC17 por semana. Se usaron dos líneas celulares de cáncer que expresan receptores de folato para establecer xenoinjertos de tumores sólidos subcutáneos: MDA-MB-231 tiene una alta expresión del receptor de folato, mientras que OV90 tiene una baja expresión del receptor de folato. Cuando se alcanzó un volumen tumoral de alrededor de 100-250 mm³, los ratones se dividieron en dos grupos. A los ratones del grupo "EC17 500 nmol/kg" (nmol/kg equivale a nmoles/kg tal cual se usa en esta solicitud de patente para el puente) se les inyectaron 500 nmoles/kg de peso corporal de EC 17, mientras que a los ratones del grupo "sin EC17" no se les inyectó EC17. Cuatro horas más tarde, a los ratones de ambos grupos se les administraron 5 millones de células CAR-T anti-FITC. Después de la administración inicial de EC17 y células CAR-T, solo a los ratones del grupo "EC17 500 nmol/kg" se les inyectaron (i.v.) 500 nmoles/kg de EC17 una vez por semana. La eficacia antitumoral se evaluó en función del volumen tumoral.

La Figura 19A muestra que las células CAR-T anti-FITC por sí solas no tienen actividad antitumoral en modelos tumorales MDA-MB-231 con alta expresión del receptor de folato. Solo con la administración de EC17 (dosis única por semana), las células CAR-T anti-FITC eliminan los tumores MDA-MB-231. Por lo tanto, una única dosis semanal de EC17 es suficiente para activar y unir las células CAR-T anti-FITC a las células tumorales para eliminar los tumores. La Figura 19B muestra que las células CAR-T anti-FITC también muestran actividad antitumoral dependiente de EC17

en un modelo de xenoinjerto OV90 que tiene un bajo nivel de expresión de receptores de folato en las células tumorales.

EJEMPLO 27

5

Mantenimiento de la actividad antitumoral de CAR-T ajustando el nivel de la dosis puente

Se usaron ratones inmunodeficientes NSG (Jackson Laboratory) para estudiar la actividad antitumoral de las células CAR T y su toxicidad en presencia de diferentes niveles de dosis de EC17. Se usaron células tumorales MDA-MB-231 para establecer xenoinjertos de tumores sólidos subcutáneos. Cuando se alcanzó un volumen tumoral de alrededor de 100-150 mm³, se preinyectaron varias concentraciones de EC17 4 horas antes de la inyección i.v. de 10 millones de células CAR-T. A continuación se administraron diversas concentraciones de EC17 tres veces por semana después de las inyecciones iniciales de EC17 y células CAR-T. Al grupo de control negativo se le inyectaron 500 nmol/kg de EC17 (4 horas antes) y 50 millones de células T no modificadas. A continuación se administraron 500 nmol/kg de EC17 tres veces por semana después de la inyección inicial. Se midieron el tamaño del tumor y el peso corporal para controlar la actividad antitumoral y la toxicidad. Como se muestra en la Figura 20A, los tumores en ratones tratados con 10 millones de células CAR-T y EC17 500 nmol/kg, 100 nmol/kg o 20 nmol/kg fueron todos eliminados, pero no se eliminaron los tumores del grupo de control negativo. Al comparar la pérdida de peso corporal debida al tratamiento en ratones a los que se administraron 10 millones de células CAR-T pero diferentes niveles de dosis de EC17, se observó que el grupo al que se administró 500 nmol/kg de TIW EC17 mostraba la toxicidad más fuerte (pérdida de peso corporal (Figura 20B)). 20 nmol/kg EC17 TIW mostró la menor toxicidad (indicada por la pérdida de peso corporal) entre los tres grupos de dosis de EC17, pero seguía manteniendo una actividad antitumoral suficiente. Ajustando el nivel de dosis de EC17, la actividad antitumoral de CAR-T puede mantenerse al tiempo que se reduce la consiguiente pérdida de peso corporal (toxicidad). En las Figuras 20A y 20B, EC17 también se denomina "adaptador" o "adaptador biespecífico".

EJEMPLO 28

LA TERAPIA FITC-CAR-T / EC17 MUESTRA ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN DIVERSOS MODELOS DE TUMORES FR+

30

Para comprobar si la terapia FITC-CAR-T/EC17 tiene actividad antitumoral en diversos modelos de tumores FR+, a los ratones NSG se les implantó por vía subcutánea MDA-MB-231 (línea celular de cáncer de mama triple negativo), OV90 (línea de células de cáncer de ovario humano), KB (línea celular de adenocarcinoma cervical humano), SKOV-3 (línea celular de carcinoma de ovario humano) o HEK293-FRa (HEK293 transfectada de forma estable con FRa humano). Cuando el tamaño del tumor alcanzó 100-300 mm³, se inyectó una dosis de EC17 a 500 nmol/kg de peso corporal por la vena de la cola seguida de la administración de 5 millones de células FITC-CAR-T 4 horas después. Se dosificaron 500 nmol/kg de EC17 una vez a la semana tras la administración inicial de EC17/CAR-T (aproximadamente el día 7); el tamaño del tumor y el peso corporal de los ratones se monitorizaron tres veces por semana. Los días de dosificación de EC17 se marcaron como líneas verticales discontinuas verdes en el gráfico. Como se muestra en las FIG. 21 a 25, el tratamiento con FITC-CAR-T no mostró ninguna actividad antitumoral en ausencia de EC17, mientras que la terapia FITC-CAR-T / EC17 mostró una actividad antitumoral dependiente de EC17 en diversos modelos de xenoinjertos tumorales FR+. La terapia logró un 100 % de curaciones en ratones con xenoinjerto MDA-MB-231, 50 % de curaciones y 50 % de enfermedad estable en ratones OV90, enfermedad estable en todos los ratones con xenoinjerto KB y con xenoinjerto SKOV3 y enfermedad progresiva en el modelo HEK293-FRa. También se observó una pérdida temporal de peso corporal dependiente de la dosis de EC17 en todos los ratones portadores de tumores, lo que indica que la activación de las CAR-T depende del EC17 en estos ratones.

La actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo MDA-MB-231 se muestra en las FIG. 21A y 21B. La actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo OV-90 se muestra en las FIG. 22A y 22B. La actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo KB se muestra en las FIG. 23A y 23B. La actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo HEK-FRa se muestra en las FIG. 24A y 24B. La actividad antitumoral de FITC-CAR-T en un modelo SKOV-3 se muestra en las FIG. 25A y 25B.

55 EJEMPLO 29

LA TOXICIDAD RELACIONADA CON FITC-CAR-T (POR EJEMPLO, sCRS) PUEDE REDUCIRSE PRE-PINTANDO LOS TUMORES CON EC17

60 Para evaluar si el prepintado de tumores con EC17 puede reducir la toxicidad relacionada con la terapia (por ejemplo, sCRS), se implantaron ratones NSG con MDA-MB-231. Dado que una mayor carga tumoral se correlaciona con un CRS más grave, el tratamiento se inició cuando el tamaño del tumor alcanzó 400-500 mm³. Los ratones se dividieron en dos grupos y se predosificaron con 500 nmol/kg de EC17 en diferentes momentos antes de la administración de

CAR-T (FIG. 26A y 26B). El grupo n.º 1 recibió una dosis previa 4 horas antes de la administración de 8 millones de células CAR-T, mientras que al grupo n.º 2 se le administró una dosis previa 24 horas antes de la administración de 8 millones de células CAR-T. A continuación se administró una dosis i.v. de 500 nmol/kg de EC17 una vez a la semana (en los días 1, 8, 15, etc.) después de la administración de CAR-T (FIG. 26D y 26E). Aunque los ratones de los dos grupos mostraron una pérdida de peso corporal dependiente de EC17 similar, los ratones en el grupo con 4 horas de pre-pintado de EC17 mostraron peor sCRS que los ratones del grupo pintado con EC17 24 horas antes de la administración de CAR-T. Como se muestra en la FIG. 26C, en el grupo de prepintado de 4 horas, el 33 % de los ratones murieron (o se sacrificaron debido al sCRS) en la semana 2, el 33 % murieron en la semana 3, el 17 % murieron en la semana 4, y solo el 17 % sobrevivió más de 5 semanas; en el grupo de prepintado de 24 horas, solo el 17% de los ratones murieron (o se sacrificaron debido al sCRS) en la semana 2, y el 83% sobrevivieron durante 5 semanas. No se observaron diferencias en la actividad antitumoral en estos dos grupos, y todos los ratones supervivientes quedaron finalmente libres de tumores. Por lo tanto, la toxicidad fue menor en los ratones con 24 horas de prepintado que en los ratones con 4 horas de prepintado con EC17.

15 EJEMPLO 30

EL PREPINTADO DE TUMORES CON EC17 REDUCE LA TOXICIDAD (sCRS)

La toxicidad relacionada con FITC-CAR-T (por ejemplo sCRS) puede reducirse mediante la combinación del prepintado de EC17 y el retraso de la dosificación de EC17 después de la administración de CAR-T. Para explorar estrategias para controlar la toxicidad relacionada con la terapia, se evaluó la combinación del prepintado EC17 y la optimización del control estricto de posología de EC17. Los ratones portadores de tumores MDA-MB-231 (100-200 mm³) se dividieron en tres grupos. A los ratones del grupo n.º 1 (sin prepintado de EC17) se les administraron 8 millones de células FITC-CAR-T a través de la vena de la cola, y a continuación se dosificaron 500 nmol/kg de EC17 como dosis única a la semana (en los días 2, 9, 16, etc.) después de la administración de CAR-T. Los ratones del grupo n.º 2 (EC17 4 horas de prepintado) se prepintaron con 500 nmol/kg de EC17 4 horas antes de la administración de 8 millones de células CAR-T, y a continuación se dosificaron 500 nmol/kg de EC17 como dosis única a la semana tras la administración de CAR-T. Los ratones del grupo n.º 3 (EC17 4 horas de prepintado + segunda dosis de EC17 retardada) también se prepintaron con 500 nmol/kg de EC17 4 horas antes de la administración de 8 millones de células CAR-T, pero la segunda dosis de 500 nmol/kg de EC17 se pospuso hasta 7 días después de la administración de CAR-T, y a continuación se siguió el control estricto de dosis única semanal de EC17. Tres días después de la administración de CAR-T, los ratones de los tres grupos se evaluaron mediante observación visual. Como se muestra en la FIG. 27A, los ratones en el grupo n.º 1 (sin prepintado) mostraron el peor sCRS, los ratones en el grupo n.º 2 (EC17 4 horas de prepintado) mostraron sCRS pero menos graves que los del grupo n.º 1. Más importante aún, los ratones en el grupo n.º 3 (EC17 4 horas de prepintado + segunda dosis de EC17 retardada) no mostraron sCRS. Como se muestra en la FIG. 27B, los ratones del grupo n.º 3 con el tratamiento combinado con EC17 4 horas de prepintado y la segunda dosis retardada de EC17 mostraron la menor pérdida de peso corporal. Las variaciones del control estricto de posología de EC17 no afectaron a la actividad antitumoral de CAR-T, y los ratones de los tres grupos alcanzaron respuestas completas (FIG. 27C).

40 EJEMPLO 31

EL NÚMERO DE CAR-T EN SANGRE AUMENTA DESPUÉS DEL RESCATE

La estrategia terapéutica EC17/CAR-T es controlable mediante el desplazamiento del puente por folato libre o fluoresceína libre. Para evaluar si la estrategia terapéutica FITC-CAR-T es controlable mediante dosis/desplazamiento puente (por ejemplo, EC17), a ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231 (100-250 mm³) se les administró un exceso de células FITC-CAR-T (8 millones) y se les dosificó con 500 nmol/kg de EC17 tres veces por semana (en los días 1, 3, 5, etc. posteriores a la administración de CAR-T). Estos ratones mostraron sCRS al cabo de una semana y se dividieron en tres grupos. A un grupo de ratones se le inyectó i.v. con 10 umol/kg de folato no conjugado (EC0923), al segundo grupo se le inyectó i.v. con 10 umol/kg de fluoresceína para "rescate", mientras que el tercer grupo no fue tratado como grupo de control. A continuación, los ratones de los tres grupos se sacrificaron a las 8, 12, 24 y 48 horas tras la inyección de EC0923 o fluoresceína, y se analizaron sus muestras de sangre para determinar el número de células CAR-T y los niveles de citocinas. Las células CAR-T de la sangre se tiñeron con un anticuerpo anti CD45 humano marcado con APCeF780 (Biolegend) y se contaron mediante FACS. CountBright™ Absolute Counting Beads (ThermoFisher Scientific) se mezclaron en las muestras y se usaron como referencia para el recuento celular. Como se muestra en la FIG. 28A-D, los tratamientos tanto con 10 umol/kg de EC0923 (folato no conjugado) como con 10 umol/kg de fluoresceína (fluoresceína no conjugada) provocaron un aumento del número de CAR-T en la circulación sanguínea, lo que indica que algunas células CAR-T se disociaron de sus células tumorales diana y volvieron a la circulación sanguínea cuando el puente (EC17) fue desplazado por un exceso de folato no conjugado o fluoresceína. El aumento del recuento de células CAR-T en la circulación sanguínea de los ratones rescatados se observó tan pronto como en 6 horas después de la inyección de EC0923/fluoresceína, lo que indica que los ratones respondieron rápidamente al "rescate" del desplazamiento. Adicionalmente, la fluoresceína parecía provocar más

desplazamiento de CAR-T que el folato (EC0923), lo que se correlaciona con los descubrimientos descritos anteriormente de que el rescate con fluoresceína reducía la producción de citocinas en sangre con más fuerza que el folato.

5 EJEMPLO 32

COMPARACIÓN DE TRES REACTIVOS DE RESCATE (ÁCIDO FÓLICO, FLUORESCEÍNA SÓDICA (NAFL) Y LEUCOVORINA)

- 10 Una dosis de folato, fluoresceína sódica o leucovorina pueden "rescatar" a los ratones sometidos a sCRS desplazando el puente EC17 entre el CART y las células tumorales. Para evaluar si los ratones con sCRS relacionados con la terapia FITC-CAR-T pueden rescatarse mediante el uso de competidores que puedan desplazar a EC17 de las células tumorales FITC-CAR-T o FR+, a 49 ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231 (150-250 mm³) se les administró un exceso de células FITC-CAR-T (8 millones), a continuación 36 de ellos recibieron una dosis de
- 15 500 nmol/kg de EC17 48 horas después de la administración de CAR-T, a 6 de ellos no se les dosificó EC17 y se usaron como control "Sin EC17", y a 7 de ellos se les dosificó 260 umol/kg de fluoresceína sódica (sin EC17 pero con fluoresceína) para comprobar su toxicidad. Un día después, mientras que los ratones del grupo de control "sin EC17" y "sin EC17 pero con fluoresceína" estaban sanos, los ratones dosificados con EC17 empezaron a mostrar sCRS y se dividieron en cuatro grupos. A cada grupo se le inyectó i.v. 10 umol/kg de leucovorina, o 10 umol/kg de ácido fólico, o
- 20 260 umol/kg de fluoresceína sódica, o nada como control no rescatado. Esos ratones se evaluaron 10 horas después de la inyección de rescate, y se comprobó que tenían diferentes niveles de gravedad del sCRS. Aunque los tres grupos rescatados mostraron una mejor recuperación del sCRS en comparación con el grupo de control no rescatado, los niveles de recuperación en estos grupos de rescate fueron diferentes. Los órdenes de gravedad del sCRS fueron (de peor a menor): grupo sin rescate > grupo con rescate de leucovorina > grupo con rescate de ácido fólico > grupo con
- 25 rescate de fluoresceína sódica > grupo sin EC17. También se controlaron los cambios en el peso corporal de los ratones como indicio de toxicidad. Como se muestra en la FIG. 29A-E, los ratones rescatados con fluoresceína tenían la menor pérdida de peso corporal en comparación con los otros dos grupos de rescate. Para evaluar si las inyecciones de rescate afectan a la actividad antitumoral de las células FITC-CAR-T, estos ratones se dosificaron con 500 nmol/kg de EC17 dos veces por semana (días 9, 11, 15, 18, 22, 25, etc.) y se monitorizó el tamaño del tumor. Como se muestra en la FIG. 30A y la FIG. 30B, casi todos los ratones se curaron excepto 2 de los 9 ratones del grupo de rescate con
- 30 fluoresceína que aún tenían un pequeño tumor en el día 36 después de la inyección de CART, indicando que una dosis única de reactivos de rescate tuvo poco efecto sobre la actividad antitumoral de los FITC-CAR-T.

EJEMPLO 33

35 RESCATE DE FLUORESCEÍNA SÓDICA

Se muestra la fluoresceína sódica como un agente de rescate para mitigar el síndrome de liberación de citocinas en la terapia antitumoral EC17/CAR-T.

40 Materiales:

EC17 (folato-FITC, p.m. 873) se sintetizó en una instalación propia. La fluoresceína sódica (AK-FLUOR®, fluoresceína inyectable, USP) se adquirió en Purdue Pharmacy.

45 Métodos in vivo:

Línea celular

- 50 MDA-MB-231 es una línea celular humana de cáncer de mama triple negativo (TNBC) que expresa un alto nivel del FR α humano. THP1-PP β es una línea celular de leucemia mieloide aguda humana CD33+ CD123+ que expresa de forma estable FR β humano. Las células se cultivaron respectivamente en un medio RPMI1640 sin folatos (Gibco BRL) (FFRPMI) que contenía el 5-10 % de suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS) y se mantuvieron en una atmósfera con CO₂ al 5 % usando técnicas convencionales de cultivo celular.

55 Ratones

- NSG™ hembra (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, n.º de artículo 005557) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se usaron cuando alcanzaron ~4 semanas de edad. Los ratones se alimentaron con una dieta deficiente en folato
- 60 (TestDiet, Louis, MO) el día de llegada.

Implantación de tumores

Los tumores MDA-MB-231 se generaron mediante la implantación subcutánea de células cultivadas a 2×10^6 en ratones NSG.

Preparación de células CAR-T

5

Las células FITC-CAR-T se prepararon como se describió anteriormente. Después de cultivar *in vitro* durante 12-20 días, se congelaron y almacenaron a -80°C en un reactivo de congelación que contenía el 50 % de suero humano AB+ inactivado por calor, 40 % de medio de cultivo de células T y 10 % de DMSO. Las células CAR-T congeladas se descongelaron rápidamente a 37°C , se lavaron dos veces con PBS y se usaron para inyección en animales.

10

Terapia EC17/CAR-T de ratones portadores de tumores

En general, la terapia EC17/CAR-T se inició cuando los tumores de ratón alcanzaron $\sim 200\text{-}250\text{ mm}^3$ y las dosis semanales de EC17 a 500 nmol/kg comenzaron 2 días después de la administración de CAR-T. Todas las dosis de EC17 se dieron hacia el final del día ($\sim 3\text{-}4\text{ PM}$) para permitir que el síndrome de liberación de citocinas (CRS) se desarrollara durante la noche. Se administró fluoresceína sódica de rescate a varias dosis ($0,06\text{-}60\text{ }\mu\text{mol/kg}$) después de la primera dosis de EC17, cuando los animales experimentaron un CRS grave de grado 3-4 en una escala de graduación de 0-5 (FIG. 31). Se recogieron muestras de plasma en varios puntos temporales (3-27 horas) después del rescate con fluoresceína sódica para el análisis múltiple de citocinas.

20

Análisis de células de sangre completa mediante citometría de flujo

El plasma se extrajo de volúmenes predeterminados de sangre total tratada con EDTA mediante un centrifugado a 4°C durante 10 minutos a 3000 g y los gránulos celulares resultantes se incubaron con un volumen 10 veces mayor de solución de lisis 1X de RBC a temperatura ambiente [preparada a partir de una solución madre 10X; Biolegend, n.º de catálogo 420301] durante 5 minutos, se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y el sedimento celular se lavó en un volumen 10 veces mayor de solución salina tamponada con fosfato pH=7,4 helada, se filtró con un filtro de nailon de $40\text{ }\mu\text{m}$ y, a continuación, se volvió a granular. A continuación los gránulos de leucocitos se resuspendieron en una solución de tinción para citometría de flujo [seroalbúmina bovina al 1 %, IgG humana 50 mg/ml (Equitech Bio, n.º de cat SLH56-0001), azida sódica al 0,9 % en una solución salina tamponada con fosfato, pH=7,4] suplementado con un bloque anti-receptor Fc γ III/II de ratón (CD16/CD32) [clon 2.4G2; BD Bioscience, n.º de catálogo 553142 a dilución 1:100 (v/v)] y bloque anti-Fc humano [BD Biosciences, n.º de catálogo 564220 en dilución 1:50 (v/v)]. La tinción de los marcadores de superficie leucocitaria se realizó añadiendo a cada muestra los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo durante 20 minutos en hielo y en la oscuridad: anti-CD45 humano-APCeF780 [clon HI30, eBioscience n.º 47-0459-42 en dilución 1:20 (v/v)], anti-CD137 humano-BV650 [clon 4B4-1, BD Bioscience n.º 564092 en dilución 1:20 (v/v)], anti-CD8 α humano-PECy7 [clon RPA-T8, BD Bioscience, n.º de catálogo 557746 en dilución 1:20 (v/v)], anti-CD4 humano-Perce710 [clon SK3, eBioscience n.º de catálogo 46-0047-42 en dilución 1:20 (v/v)]. Después de la tinción de leucocitos, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS frío que contenía 53.000 perlas CountBright™ [Invitrogen n.º de catálogo C36950] y se transfirieron a tubos de recogida de citometría de flujo. Los datos de citometría de flujo se recogieron en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA), donde se recogió un mínimo de 15.000 acontecimientos de perlas CountBright™ en un intento de recoger suficientes acontecimientos de leucocitos para un recuento preciso de las células CAR T infundidas en cada muestra de sangre de ratón. La determinación de la concentración de células CAR T en cada muestra de sangre se calculó siguiendo las instrucciones de Invitrogen. Brevemente, las células CAR T se identificaron como acontecimientos CD45+ humano GFP+ y se distinguieron y se contaron fácilmente usando el software de citometría de flujo Kaluza™. Las microesferas CountBright™ se marcaron uniformemente con un fluorocromo no usado en el panel de anticuerpos empleado para identificar las células CAR T y se distinguieron fácilmente de los leucocitos y se contaron los acontecimientos de las perlas. Debido a que se añadieron 53.000 perlas CountBright™ a cada tubo de muestra, se calculó la relación entre el total de 53.000 perlas y los acontecimientos de perlas recogidos por muestra y se estableció la relación de perlas equivalente al número desconocido de células CAR T en cada muestra dividido por el número conocido de acontecimientos de células CAR T recogidos. La resolución de la incógnita dio el número de células CAR T aisladas de cada muestra de sangre de volúmenes conocidos. A continuación el número de células CAR T en la circulación de cada ratón infundido se representó en los gráficos como el número total de células CAR T por $50\text{ }\mu\text{l}$ de sangre total analizada. La significancia estadística se determinó usando una prueba de la t de student no apareada, de dos colas, con significancia fijada en $p < 0,05$ para las comparaciones entre cada uno de los tres grupos de ratones.

Preparación de suspensiones unicelulares de tejidos tumorales y normales

Se recogieron los tumores sólidos ($100\text{-}1000\text{ mm}^3$), se pesaron y se trituraron en trozos pequeños y, a continuación, se transfirieron a tubos de 50 ml que contenían 20 ml de un cóctel de digestión tumoral. El cóctel enzimático de digestión tumoral consistió en $0,5\text{ mg/ml}$ de collagenasa IV (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo C5138), Hialuronidasa $0,5\text{ mg/ml}$ (Sigma-Aldrich, N.º de Catálogo H3506) y $0,1\text{ mg/ml}$ de DNasa I (Sigma-Aldrich, N.º de Catálogo DN25) en medio RPMI1640 libre de suero y deficiente en folato suplementado con antibióticos. Los fragmentos tumorales se

digirieron durante una hora a 37 °C a 300 rpm en un agitador horizontal. En lo sucesivo, el digerido tumoral se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y el sedimento de células tumorales se sometió a una etapa de lisis de glóbulos rojos, se lavó a continuación con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) fría y finalmente se filtró a través de un colador celular de nailon de 40 µm.

5

Datos y resultados:

Como se muestra en la FIG. 31, se evaluaron los efectos de un rescate único de fluoresceína sódica a 60 µmol/kg tanto en la producción de citocinas como en la actividad antitumoral de CAR-T *in-vivo*. El día 0, se administraron -
 10 10,4 millones de células FITC-CAR-T por vía intravenosa a ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231. Aproximadamente 48 horas después de la infusión de células CAR-T, los ratones se separaron en 3 grupos. El primer grupo (n.º 1) no se dosificó con EC17 y sirvió como el control de células CAR-T, al segundo (n.º 2) y al tercer grupos (n.º 3) se les inyectó por vía intravenosa una dosis única de EC17 (500 nmol/kg). A las 17 horas después de la dosis EC17, los ratones de los grupos n.º 2 y n.º 3 que recibieron EC17 (500 nmol/kg) mostraron sCRS mientras que los
 15 ratones del grupo de control de células CAR-T n.º 1 no mostraron ninguna toxicidad relacionada. El grupo n.º 2 recibió a continuación una única dosis intravenosa de fluoresceína sódica (60 µmol/kg) mientras que el grupo n.º 3 quedó sin rescate. Siete horas después del rescate con fluoresceína sódica, los ratones del grupo n.º 2 rescatados con 60 µmol/kg de fluoresceína sódica se recuperaban y se puntuaban con un sCRS de grado 3 bajo, mientras que los ratones sin rescate del grupo n.º 3 seguían teniendo un sCRS de grado 3. Se practicó la eutanasia a tres animales
 20 satélite de cada grupo para recoger sangre y órganos para el análisis de citocinas y la evaluación de la toxicidad orgánica. La sangre total se obtuvo mediante punción cardíaca y se recogió en tubos con EDTA. Veintisiete horas después del rescate con fluoresceína sódica, los ratones rescatados con 60 µmol/kg de fluoresceína sódica en el grupo n.º 2 se estaban recuperando y la escala sCRS disminuyó a grado 2, mientras que los ratones sin rescate del grupo n.º 3 tenían peor sCRS (grado 3-4). En este momento, se practicó la eutanasia a 6 ratones satélite de cada
 25 grupo para la extracción de sangre y la evaluación de órganos. Los ratones restantes se dosificaron con una dosis única de 500 nmol/kg de EC17 cada semana si se deseaba, y las fechas de dosificación de EC17 se etiquetaron en la FIG. 36 como líneas verticales discontinuas que aparecen después de la anotación "EC17". El volumen del tumor y los cambios en el peso corporal se controlaron 2-3 veces por semana.

30 Como se muestra en la FIG. 36, aunque los tumores en el grupo CAR-T solo crecieron rápidamente, los tumores en ratones dosificados con 500 nmol/kg de EC17 SIW siguieron creciendo lentamente durante aproximadamente una semana, y a continuación empezaron a reducirse y finalmente desaparecieron. Aunque los tumores de los grupos rescatados tardaron unos días más en empezar a encogerse, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre el grupo rescatado y el no rescatado. Este descubrimiento sugirió que una dosis de
 35 60 µmol/kg de fluoresceína sódica no interfería con la actividad antitumoral de CAR-T *in vivo*. Como se muestra en la FIG. 36B, los ratones del grupo rescatado parecían tener menos pérdida de peso corporal en comparación con los del grupo no rescatado, indicando que 60 µmol/kg de rescate de fluoresceína sódica puede reducir la toxicidad relacionada con la terapia CAR-T (mostrada como menor pérdida de peso corporal).

40 Los órganos de los tres grupos también se evaluaron a las 7 horas y a las 27 horas después del rescate con fluoresceína sódica y sus pesos se compararon como se muestra en la FIG 32. Como se muestra en la FIG. 32A, 7 horas después del rescate, los pulmones de los ratones tratados con CAR-T y EC17 estaban hinchados y pesaban más que los pulmones recogidos de los ratones del grupo de células CAR-T únicamente. Como se muestra en la FIG. 32B, 27 horas después del rescate, el peso de los pulmones del grupo rescatado disminuyó más que el del grupo no
 45 rescatado. Aunque no se encontraron diferencias de peso evidentes en hígado o riñones entre el grupo rescatado y el no rescatado, los órganos del grupo rescatado parecían más sanos en el examen visual (menos decoloración del hígado y el riñón, y menos edema pulmonar). Para la FIG. 32, el edema pulmonar mejoró 27 horas después del rescate con NaFL.

50 También se midieron los niveles de citocinas asociados al CRS para determinar si el rescate inactiva las células CAR-T y reduce la producción de citocinas. Los niveles de citocinas humanas en muestras de plasma de ratón se midieron usando kits de ensayo de flujo multianálisis basados en FACS (BioLegend) y kits de detección de citocinas basados en ELISA (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las FIG. 33A-G muestran los niveles de citocinas 7 horas después del rescate. Para la FIG. 33, la producción de citocinas en la sangre de los ratones se redujo
 55 en <7 horas después del rescate de NaFL. Las FIG. 34A-G muestran los niveles de citocinas 27 horas después del rescate. Para la FIG. 34, la producción de citocinas en la sangre de los ratones se redujo en <7 horas después del rescate de NaFL. Las FIG. 35A-E muestran cambios dependientes del tiempo en los niveles de citocinas. Para la FIG. 35, había un retraso entre los niveles de citocinas en sangre y el estado general del ratón (puntuaciones CRS). En resumen, los ratones administrados con células CAR-T pero sin EC 17 tenían un nivel muy bajo de citocinas en su sangre, mientras que los ratones dosificados con EC17 tenían mayores niveles de citocinas en su sangre, incluyendo
 60 IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10, GM-CSF e IL-3. Más importante aún, los niveles de citocinas en los ratones rescatados con 60 µmol/kg de fluoresceína sódica eran mucho más bajos que los de los ratones no rescatados (tanto 7 horas como 27 horas después del rescate). Los niveles de algunas citocinas (por ejemplo IL-2, TNF-α, IL-3, GM-CSF e IL-6)

disminuyeron hasta valores normales 7 horas después del rescate, mientras que otras citocinas (por ejemplo IFN- γ) disminuyeron hasta valores cercanos a los normales a las 27 horas después del rescate.

Para evaluar si un nivel más bajo de fluoresceína sódica también puede rescatar a los ratones sometidos a sCRS, se realizó el mismo estudio de rescate salvo que la fluoresceína sódica se dosificó a 0,06, 0,6 y 6 $\mu\text{mol/kg}$. Como se muestra en la FIG. 50, se administraron ~8,3 millones de células CAR-T congeladas y se indujo sCRS con una dosis de 500 nmol/kg de EC17. Mientras que los ratones sin rescate mostraron una mayor gravedad de sCRS, los ratones rescatados con fluoresceína sódica mostraron una reducción dependiente de la dosis de la gravedad del sCRS (FIG. 50). En resumen, los ratones rescatados con 6 $\mu\text{mol/kg}$ de fluoresceína sódica fueron los que se recuperaron más rápidamente, mientras que los ratones rescatados con 0,06 $\mu\text{mol/kg}$ de fluoresceína sódica mostraron la recuperación más lenta.

Como se muestra en la FIG. 51, el rescate con una dosis de 6 $\mu\text{mol/kg}$ de fluoresceína sódica no afectó a la actividad antitumoral de la terapia celular EC17/CAR-T (FIG. 51A, curva de crecimiento tumoral), pero el rescate redujo la toxicidad CAR-T dependiente de EC17 (menor pérdida inicial de peso corporal) (FIG. 51B). Como se muestra en la FIG. 52, los niveles de citocinas en sangre de ratón también dependían de las concentraciones de fluoresceína sódica usadas para el rescate, y la dosis media eficaz es de aproximadamente 0,6 $\mu\text{mol/kg}$ con citocinas clave (por ejemplo IL-2, TNF- α , IFN- γ , etc.) comenzando a responder a partir de las 3 horas posteriores al rescate.

20 Enumeración de células T FITC CAR en la sangre

El cronograma experimental se representa en la FIG. 53A. El día 0, las células T GFP+ FITC-CAR [clon 4M5.3] se extrajeron de la crioconservación, se descongelaron y a continuación se infundieron por vía intravenosa en ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231 a 10 millones por ratón [tumores ~250 mm³]. Aproximadamente 48 horas después de la infusión, se dividieron en tres grupos para comprobar los efectos de la fluoresceína sódica en el comportamiento de las células CAR T, *in vivo*, específicamente en la circulación. El primer grupo sirvió como control sin EC17/sin fluoresceína (FIG. 53B-C). Al segundo grupo se le inyectó por vía intravenosa una dosis única de EC17 [500 nmol/kg] para generar el síndrome de liberación grave de citocinas (sCRS) (FIG. 53B-C, rojo). El tercer grupo (FIG. 53B-C) recibió EC17 [500 nmol/kg] para generar sCRS pero también recibió una única fluoresceína sódica intravenosa [60 $\mu\text{mol/kg}$] aproximadamente 18 horas después para inhibir la interacción de las células CAR T con las células tumorales positivas al receptor de folato. Veintisiete horas después del rescate con fluoresceína sódica, los ratones se sacrificaron y se obtuvo sangre total mediante punción cardíaca y se recogió en tubos que contenían EDTA; a continuación se prepararon los leucocitos sanguíneos para su análisis, de acuerdo con el protocolo detallado en la sección de métodos. Los anticuerpos monoclonales específicos para marcadores de superficie humanos, que no reaccionan de forma cruzada con los marcadores de ratón, se usaron para el análisis por citometría de flujo. La tinción para CD45 antihumano permite identificar claramente las células T humanas que circulan en la sangre de ratones infundidos con células CAR T (FIG. 53B, eje y, gráficos de puntos). Adicionalmente, las células T humanas infundidas que fueron transducidas con éxito con la construcción lentivirus CAR se visualizaron mediante fluorescencia verde posibilitada por la coexpresión del ADNc también presente en la construcción lentivírica CAR que codifica la proteína verde fluorescente (FIG. 53B, eje x, diagrama de puntos). Por lo tanto, por selección en acontecimientos humanos CD45+ GFP+ doble positivos, se puede distinguir y contar de forma fiable el número de células T humanas que expresan FITC-CAR de células T humanas no transducidas o de leucocitos de ratón (FIG. 53B).

Las células CAR T humanas están presentes en altos niveles en la circulación de los ratones cuatro días después de la infusión en el grupo de control de ratones que no han recibido la molécula puente CAR, EC17 (FIG. 53B, diagrama de puntos de la izquierda). Curiosamente, en el grupo de ratones que recibió una dosis de EC17, se detectan muy pocas células CAR T en la circulación, presumiblemente porque el EC17 ha dirigido a las células CAR T para que se localicen en los sitios del antígeno en la superficie de las células tumorales (FIG. 53B, diagrama de puntos central). La reducción de los tumores por las células CAR T que se observaron de forma rutinaria bajo esta condición de tratamiento, da lugar a la producción de niveles elevados de citocinas inflamatorias humanas, incluyendo TNF α e IFN γ , provocando CRS grave en estos animales. Es importante destacar que cuando se dosificó a estos animales enfermos con 60 $\mu\text{mol/kg}$ de fluoresceína sódica, no solo se redujeron los síntomas de sCRS, sino también se observó que las células CAR T reaparecen en la circulación (FIG. 53B, diagrama de puntos derecho). Por lo tanto, el exceso de fluoresceína puede mediar la liberación de las células CAR T desde la molécula puente CAR EC17 que marca las células tumorales positivas para el receptor de folato. Tras la liberación de las células CAR T de las células tumorales, cesará la producción de citocinas inflamatorias que impulsan el sCRS, lo que permite salvar de la muerte a los ratones portadores de tumores.

La activación de las células T a través de un receptor de células T o de un receptor quimérico para antígenos, se visualiza por el aumento de la expresión de receptores de superficie coestimuladores, incluyendo 4-1BB (CD137). Esta expresión aumentada de 4-1BB durará varios días tras la activación antigénica inicial del receptor de células T o del receptor antigénico quimérico. De manera no sorprendente, tras la caracterización de las células CAR T circulantes procedentes de la sangre de ratones infundidos únicamente con células CAR T, se observó muy poca expresión del

marcador de activación de superficie, 4-1BB, en la superficie de menos del 2 % de las células CAR T infundidas aisladas de animales que no recibieron EC17 (FIG. 54). Curiosamente, cuando se midió el estado de activación de las células CAR T circulantes de los animales que recibieron la infusión de células CAR T más los tratamientos con EC17 y fluoresceína sódica, las células CAR T circulantes expresan cantidades significativas de 4-1BB, lo que consiste en su reciente activación por EC17 dentro del tumor, dos días antes de la recogida (FIG. 54). Las células CAR T circulantes del segundo grupo de ratones portadores de tumores que recibieron la infusión de CAR T más el tratamiento con EC17 no pudieron analizarse de forma fiable para determinar la expresión de 4-1BB debido a su escaso número en circulación (FIG. 53A-C).

- 10 Aunque la fluoresceína sódica a 60 $\mu\text{mol/kg}$ está muy por debajo de la dosis tolerada establecida en pacientes humanos, el conocimiento de la dosis mínima eficaz de fluoresceína sódica que rescata a los pacientes de sCRS infundidos con células CAR T FITC y EC17, sería útil. Como se muestra en la FIG. 50 y la FIG. 55A, los animales infundidos con CAR-T recibieron una dosis de EC17 para inducir sCRS y, un día después, se separaron en cuatro grupos diferentes. Tres grupos recibieron dosis bajas de rescate de fluoresceína sódica a 0,06, 0,6 y 6 $\mu\text{mol/kg}$. En concreto, la dosis más alta de fluoresceína sódica usada en este estudio fue 10 veces menor que la dosis administrada a los ratones de la FIG. 31. A los animales de los grupos de dosis anteriores se les practicó la eutanasia a las 3 y 24 horas después del rescate con fluoresceína sódica para poder enumerar las células CAR-T circulantes en la sangre (FIG. 55B-C). Curiosamente, el número de células CAR T circulantes en animales que recibieron tratamiento con fluoresceína sódica 0,06-6 $\mu\text{mol/kg}$ aumentó ya a las 3 horas tras el rescate (FIG. 55B). Esto sugiere que la inyección de fluoresceína sódica probablemente desplazó a las células CAR T de sus dianas en las células tumorales FR+. De manera importante, a las 24 horas después del rescate, la extravasación de células CAR T a la sangre aumentó de forma dependiente de la dosis de fluoresceína sódica (FIG. 55C). Estas observaciones mostradas en las FIG. 53-55 sugieren que el comportamiento y la localización de las células FITC CAR-T pueden modificarse en diferentes grados en animales que experimentan CRS grave mediante la administración de dosis bajas de fluoresceína sódica.

25 EJEMPLO 34

EL RESCATE ANTERIOR NO AFECTÓ A LA REACTIVACIÓN DE FITC-CAR-T INDUCIDA POR EC17

- 30 Para evaluar si el rescate afecta a la función FITC-CAR-T, a 12 ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231 (150-250 mm^3) se les administró un exceso de células FITC-CAR-T (8 millones). A continuación, se administró a nueve ratones una dosis de 500 nmol/kg de EC17 48 horas después de la administración de CAR-T, y a 3 ratones no se les administró EC17 y se usaron como controles "solo CAR-T". Mientras que los ratones del grupo de control "solo CAR-T" estaban sanos, los ratones dosificados con EC17 mostraron sCRS un día después y se dividieron en tres grupos.
- 35 A un grupo de ratones (CAR-T + EC17 + FA) se le inyectó i.v. 10 umol/kg de ácido fólico, al segundo grupo de ratones (CAR-T + EC17 + NaFL) se le inyectó i.v. 260 umol/kg de fluoresceína sódica, mientras que el tercer grupo (CAR-T + EC17) no fue rescatado. Todos los ratones se volvieron a estimular con 500 nmol/kg de EC17 seis días más tarde para la reactivación de FITC-CAR-T y se recogieron muestras de sangre 18 horas después de la reactivación de EC17 para el análisis de citocinas en sangre. La producción de citocinas humanas es un indicio de la activación de CAR-T.
- 40 Como se muestra en la FIG. 37A-B, los niveles de citocinas humanas (por ejemplo IFN gamma, IL-2) en los ratones rescatados (grupo "CAR-T + EC17 + FA" y grupo "CAR-T + EC17 + NaFL") son similares a los de los ratones sin rescate (grupo "CAR-T + EC17"). Los datos indican que los rescates no afectaron a la reactivación de CAR-T inducida por EC17.

45 EJEMPLO 35

LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN SANGRE Y LA PÉRDIDA DE PESO CORPORAL SON DEPENDIENTES DE LA DOSIS DE CAR-T

- 50 Para evaluar si la producción de citocinas en la sangre de ratones está correlacionada con el número de CAR-T en ratones, se dosificaron 15 ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231 (250-500 mm^3) con 500 nmol/kg de peso corporal de EC17 y a continuación se dividieron en tres grupos. Cuatro horas más tarde, a cada grupo se le administraron 2, 5 o 12,5 millones de células FITC-CAR-T respectivamente. A continuación se administró a los ratones de los tres grupos una segunda dosis de 500 nmol/kg de EC17 24 horas después de la administración de CAR-T, y se recogieron muestras de sangre 48 horas más tarde (el esquema de administración se muestra en la FIG. 38A). Como se muestra en la FIG. 38B, los ratones a los que se administraron 12,5 millones de células CAR-T mostraron la mayor pérdida de peso corporal, mientras que los ratones a los que se administraron 2,5 millones de CAR-T mostraron la menor pérdida de peso corporal. La producción de citocinas (por ejemplo IL-2 humana, IFN gamma humana, TNF alfa humano e IL-10 humana) se correlaciona con el número de células CAR-T administradas (FIG. 39A-D). Con el aumento de células CAR-T en ratones, aumenta la producción de citocinas y aumenta también la pérdida de peso corporal.

EJEMPLO 36

LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS FITC-CAR-T *IN VIVO* ES DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE EC17

Para evaluar si la dosis puente puede controlar la proliferación de CAR-T *in vivo*, los ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231 (250-500 mm³) se dividieron en 4 grupos y se dosificaron con 0, 5, 50, o 500 nmol/kg de peso corporal de EC17 respectivamente (como se muestra en la FIG. 40A). Cuatro horas más tarde, a los cuatro grupos se les administraron 5 millones de células FITC-CAR-T que se cultivaron *in vitro* durante 11 días, mientras que un grupo de ratones predosificados con 500 nmol/kg de EC17 no se dosificó con células CAR-T y se usó como un "control sin CAR-T". Dos días después, los ratones de los cinco grupos se dosificaron con diversos niveles de EC17 como se indica en la FIG. 40B. Mientras que los ratones del grupo "Sin dosis de CAR-T" mostraron poco síndrome relacionado con CRS, los ratones dosificados con 5 millones de células CAR-T mostraron CRS dependiente de la dosis de EC17 3 días después de la administración de CAR-T. A continuación se recogieron muestras de sangre 16 horas después de la segunda dosis de EC17 y se analizó el número de CAR-T en la circulación sanguínea (FIG. 40B). Como se muestra en la FIG. 40B, en comparación con los ratones dosificados con 0 nmol/kg de EC17, los ratones dosificados con 5 nmol/kg de EC17 tenían menos células CAR-T en la circulación sanguínea, probablemente debido al tráfico de células CAR-T dependiente de EC17 hacia los tejidos tumorales, que eliminó las células CAR-T de la circulación sanguínea. De manera importante, los ratones administrados con la misma cantidad de células CAR-T pero dosificados con 50 o 500 nmol/kg de EC17 tenían más células CAR-T en la circulación sanguínea. La interpretación de este descubrimiento es que las células CAR-T proliferaron más en ratones dosificados con 50 o 500 nmol/kg de EC17 que en ratones dosificados con 5 nmol/kg de EC 17, de tal manera que los recuentos de CAR-T en la circulación sanguínea fueran mayores.

Para confirmar aún más que la proliferación de FITC-CAR-T depende de la dosis de EC 17, también se evaluó la proliferación *in vivo* de los CAR-T cuando se les dio más tiempo para asentarse y proliferar. Con este fin, se examinó el número de células CAR-T en ratones a los que se habían administrado células CAR-T seis días antes y se habían administrado cuatro dosis de EC17 para potenciar la proliferación de CAR-T *in vivo*. Los ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231 (250-500 mm³) se dividieron en 4 grupos y se dosificaron con 0, 5, 50, o 500 nmol/kg de peso corporal de EC17 respectivamente (como se muestra en la FIG. 41A). Cuatro horas más tarde, a todos los ratones se les administraron 5 millones de células FITC-CAR-T que se cultivaron *in vitro* durante 18 días. A continuación se dosificaron diversos niveles de EC17 en los días 1, 3 y 5 posteriores a la administración de CAR-T para potenciar la proliferación de CAR-T. Se recogieron muestras de sangre de ratón 24 horas después de la última dosis de EC17. Las células CAR-T de la sangre se tiñeron con un anticuerpo anti CD45 humano y se contaron mediante FACS. Como se muestra en la FIG. 41B, el recuento de CAR-T fue el más bajo en los ratones sin dosis de EC17, aumentó en ratones con la dosis de 5 nmol/kg de EC17, alcanzó el máximo en ratones dosificados con 50 nmol/kg de EC17, y empezó a disminuir cuando la dosis de EC17 fue de 500 nmol/kg probablemente debido a la sobresaturación de EC17 y la consiguiente disociación de las células CAR-T de la célula tumoral. En resumen, se ha observado una proliferación FITC-CAR-T dependiente de la dosis de EC17 en ratones portadores de tumores MDA-MB-231 en dos momentos diferentes, lo que indica que el control del nivel de dosis de EC17 puede controlar la proliferación de FITC-CAR-T *in vivo*.

40 EJEMPLO 37

FITC-CAR-T NO PROLIFERA NI PROVOCA TOXICIDAD EN RATONES SIN TRATAMIENTO PREVIO

Se probó la evaluación de la proliferación de FITC-CAR-T y la toxicidad relacionada tanto en ratones sin tratamiento previo como en ratones portadores de xenoinjertos tumorales FR+. Para evaluar si la proliferación *in vivo* de FITC-CAR-T depende de la coexistencia del puente (por ejemplo, EC17) y el antígeno tumoral (por ejemplo, receptor de folato), se comparó la proliferación *in vivo* de FITC-CAR-T en ratones sin tratamiento previo y ratones portadores de xenoinjertos tumorales FR+, con o sin EC17. Se administraron (i.v.) 5-8 millones de células CAR-T (como se indica en las FIG. 42 y 43) a ratones sin tratamiento previo sin tumores y a ratones portadores de xenoinjertos tumorales FR+ (80-200 mm³). Se dosificaron 500 nmol/kg de EC17 4 horas antes y tres veces por semana después de la administración de CAR-T, si se desea. Se monitorizaron los cambios de peso corporal de los ratones y el recuento de células CAR-T en la circulación sanguínea; algunos ratones también se sacrificaron semanalmente para evaluar los órganos. Como se muestra en la FIG. 42, los ratones sin tratamiento previo sin carga tumoral no mostraron ninguna pérdida aparente de peso corporal (toxicidad), no importa si el EC17 se dosificó o no. Por otro lado, los ratones portadores de tumores FR+ MDA-MB-231 mostraron una pérdida de peso corporal dependiente de EC17: los ratones dosificados con EC17 tres veces por semana tenían pérdida de peso corporal en los primeros 10 días, mientras que los ratones sin dosis de EC17 no tenían pérdida de peso corporal (FIG. 42). También se comparó el recuento de células CAR-T en muestras de sangre para evaluar la proliferación de CAR-T. Como se muestra en la FIG. 43A, FITC-CAR-T no proliferó en ratones sin tratamiento previo a los que se administraron dosis de 5 u 8 millones de células FITC-CAR-T, no importa si el EC17 se dosificó o no. Por el contrario, las células FITC-CAR-T de los ratones implantados con xenoinjertos FR+ HEK-FRa tuvieron una rápida proliferación cuando se administraron 500 nmol/kg de EC17 tres veces por semana. Dado que el aumento del tamaño del bazo es otro indicador de la proliferación de CAR-T *in vivo*, también se midió el tamaño del bazo como se muestra en la Fig. 43B. Los ratones sin tratamiento

previo sin carga tumoral no mostraron un gran agrandamiento del bazo (indicio de ausencia de proliferación de CAR-T), no importa si EC 17 se dosificó o no. Por otro lado, los ratones portadores de tumores FR+ MDA-MB-231 presentaban agrandamiento del bazo cuando se les administraba una dosis de 500 nmol/kg de EC17 tres veces por semana. En conclusión, las células FITC-CAR-T no proliferan ni provocan toxicidad en ratones sin tratamiento previo
 5 incluso en presencia de EC17, pero proliferan rápidamente en ratones portadores de tumores FR+ cuando también se administra EC17.

Para la FIG. 42, se usó el modelo MDA-MB-231 s.c. Para la FIG. 43A, se usó el modelo de xenoinjerto HEK-FRa s.c. Para la FIG. 43B, se usó el modelo MDA-MB-231 s.c.

10

Los resultados muestran que FITC-CAR-T no es activo en ratones sin tratamiento previo sin carga tumoral. Se inyectaron células CAR-T i.v. en ratones sin tratamiento previo (8 millones por ratón) y ratones portadores de tumores MDA-MB-231 (5 millones por ratón). Se administraron 500 nmol/kg de EC17 tres veces por semana cuando se deseó (se muestra en el marcador de la figura). Después de una semana, las muestras de sangre de ratón se recogieron en
 15 tubos recubiertos de EDTA y se centrifugaron a 3000 g durante 15 min a 4 °C y el plasma se aisló y almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Los niveles de citocinas incluyendo IFN se midieron con los kits de panel de citocinas humanas LEGENDplex (BioLegend, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma se diluyeron
 20 con tampón de ensayo y a continuación se mezclaron con perlas de captura inmovilizado con el anticuerpo dirigido a la citocina analizada. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente con agitación, se añadió el anticuerpo de detección biotinilado de la citocina analizada y se incubó durante una hora más a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se añadió estreptavidina marcada con ficoeritrina (PE) para que se uniera con biotina en el anticuerpo de detección, y se usó FACS para leer la señal de PE en el complejo de unión (anticuerpo de captura-
 25 citocina-anticuerpo de detección). La intensidad de PE es proporcional al nivel de la citocina analizada. Una serie de soluciones de citocinas con concentraciones conocidas se midieron al mismo tiempo y se usaron como patrones para cuantificar los niveles de citocinas en las muestras analizadas.

Como se muestra en la FIG. 44, la producción de citocinas (actividad CAR-T) es dependiente de la presencia del
 30 tumor. Las células CAR-T no son activas en ratones sin tratamiento previo incluso cuando los ratones fueron dosificados con 500 nmol/kg de EC17 tres veces por semana.

EJEMPLO 38

35 CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS PUENTE

Para examinar la capacidad de las moléculas puente para unirse a scFv antilfluoresceína en células CAR T, se desarrolló un ensayo de unión competitiva. No pudo usarse la medición de la señal de fluoresceína de los puentes unidos a células CAR T debido al solapamiento de su fluorescencia con la de las células CAR T que expresan GFP.
 40 Con este fin, se permitió que FITC-Alexa647 (10 nM) se uniera a células CAR T anti-fluoresceína en ausencia o presencia de un exceso (1 µM) de ligando competidor (es decir, FITC-folato, FITC-DUPA, FITC-CA9) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células CAR T anti-fluoresceína se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el FITC-Alexa647 no unido, y las células lavadas se analizaron para determinar la fluorescencia de Alexa647 mediante citometría de flujo.

45

Todas las moléculas puente probadas (es decir, FITC-folato, FITC-DUPA, FITC-CA9) fueron capaces de unirse a las células T que expresaban CAR, como se estableció por la capacidad de los puentes para bloquear competitivamente la unión de FITC-Alexa 647 a las células T modificadas por ingeniería genética (FIG. 45).

50 EJEMPLO 39

LA CÉLULA CAR T UNIVERSAL PUEDE ELIMINAR DIVERSAS CÉLULAS DE CÁNCER QUE EXPRESAN ANTÍGENOS ORTOGONALES DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE PUENTES COINCIDENTES CON ANTÍGENOS *IN VITRO*

55

Cada línea celular de cáncer humano se sembró a una densidad de 10⁴ células/100 µl de medio en placas de 96 pocillos y se cultivó durante la noche. Se añadieron células CAR T antilfluoresceína a cada pocillo en ausencia o presencia de moléculas puente. Después de la coincubación durante 6-24 horas, las placas se centrifugaron a 350xg durante 10 minutos para eliminar los restos y se analizaron los sobrenadantes para determinar la liberación de lactato
 60 deshidrogenasa (análisis de muerte celular) mediante el kit Pierce™ LDH cytotoxicity assay (Thermo Fisher Scientific, MA) y los niveles de interferón γ (IFNγ) mediante un kit ELISA de IFNγ humano (Biolegend, CA).

Para evaluar la especificidad y la universalidad de las células CAR T antilfluoresceína, las células CAR T antilfluoresceína se coincubaron con células HEK que expresaban FR, PSMA, CA9 o NK1R en presencia o ausencia de moléculas puente respectivamente. Como se muestra en la FIG. 46, panel A, las células CAR T antilfluoresceína pueden eliminar las células HEK diana cuando están presentes moléculas puente coincidentes con el antígeno. La universalidad de las células CAR T antilfluoresceína con múltiples moléculas puente se evaluó además con diversas líneas celulares de cáncer humano que expresan el receptor de folato (KB, MDA-MB-231 y OVCAR3), PSMA (LNCaP y 22RV1) o CA9 (HT29, SK-RC-52, A549 y SKOV3) (FIG. 46B). La lisis fue específica para el puente probado y el tumor correspondiente que expresaba el receptor para el ligando del tumor puente.

10 EJEMPLO 40

RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE MOLÉCULAS PUENTE Y LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA CÉLULA CAR T UNIVERSAL

15 Cada línea celular de cáncer humano se sembró a una densidad de 10^4 células/100 μ l de medio en placas de 96 pocillos y se cultivó durante la noche. Se añadieron células CAR T antilfluoresceína a cada pocillo en ausencia o presencia de moléculas puente. Después de la coincubación durante 6-24 horas, las placas se centrifugaron a 350xg durante 10 minutos para eliminar los restos y se analizaron los sobrenadantes para determinar la liberación de lactato deshidrogenasa (análisis de muerte celular) mediante el kit Pierce™ LDH cytotoxicity assay (Thermo Fisher Scientific, 20 MA) y los niveles de interferón γ (IFN γ) usando un kit ELISA de IFN γ humano (Biolegend, CA).

Como se muestra en la FIG. 47, todas las moléculas puente se comportan de manera similar. Conforme aumentó la concentración de puentes, también aumentó la actividad antitumoral de las células CAR T. Sin embargo, si se añadían mayores concentraciones de moléculas puente, a continuación se redujo la actividad antitumoral de las células CAR T (es decir, una respuesta a la dosis en forma de campana). Este resultado se debe al hecho de que las moléculas puente no pueden formar un puente entre las células CAR T y las células cancerosas cuando se añaden concentraciones más elevadas de moléculas puente, ya que concentraciones más elevadas de moléculas puente pueden saturar tanto los receptores de las células CAR T como los de las células cancerosas, respectivamente.

30 EJEMPLO 41

LA CÉLULA CAR T UNIVERSAL PUEDE ELIMINAR DIVERSAS CÉLULAS DE CÁNCER QUE EXPRESAN ANTÍGENOS ORTOGONALES DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE MOLÉCULAS PUENTE COINCIDENTES CON ANTÍGENOS *IN VIVO*

35 Se generaron múltiples clones de MDA-MB-231 que expresaban antígenos ortogonales usando un sistema lentivírico de liberación de genes. Se implantaron por vía subcutánea ratones NSG inmunodeficientes (Jackson Laboratory, ME) con cada una de las células MDA-MB-231 que expresaban el receptor de folato, PSMA, o CA9 y se les inyectaron por vía intravenosa células CAR T y a continuación moléculas puente (es decir, cualquiera de FITC-folato, FITC-DUPA o 40 FITC-CA9) cuando los tumores alcanzaban un tamaño de ~ 100 mm³. Los tumores se midieron cada dos días con calibradores y el volumen tumoral se calculó según la ecuación: Volumen tumoral = $\frac{1}{2}(L \times W^2)$ donde L es el eje más largo del tumor y W es el eje perpendicular a L.

Para evaluar si cada puente puede inducir la actividad antitumoral de las células CAR T antilfluoresceína, se generaron 45 múltiples clones de MDA-MB-231 que expresan el receptor de folato, PSMA o CA9. Como se muestra en la FIG. 48, las células CAR T antilfluoresceína podían eliminar las células tumorales que expresaban antígenos ortogonales cuando se inyectaban puentes coincidentes con antígenos. Tomados en conjunto, estos datos demostraron que una sola célula CAR T antilfluoresceína podía eliminar múltiples tumores mediante la inyección de puentes coincidentes con antígenos diana.

50 EJEMPLO 42

LA CÉLULA CAR T UNIVERSAL PUEDE ELIMINAR DOS TUMORES A TRAVÉS DE UN CÓCTEL DE MOLÉCULAS PUENTE *IN VIVO* (MODELO DE DOS TUMORES SEPARADOS)

55 Para evaluar si un cóctel de moléculas puente puede eliminar dos tumores que expresan antígenos ortogonales, se establecieron dos modelos tumorales diferentes. Como un primer modelo tumoral, cada una de PSMA+ MDA-MB-231 y CA9+ MDA-MB-231 se implantaron en ratones NSG en dos localizaciones diferentes (es decir, flanco derecho: CA9+ MDA-MB-231, flanco izquierdo: PSMA+ MDA-MB-231). Para el segundo modelo tumoral, se premezclaron PSMA+ 60 MDA-MB-231 y CA9+ MDA-MB-231 en una proporción de 1:1 y se implantaron en una ubicación. Como se muestra en los paneles A y B de la Fig. 49, la eliminación completa de las células tumorales que expresan PSMA o CA9 puede conseguirse cuando se inyectan ambos puentes (es decir, el cóctel de FITC-PSMA y FITC-CA9). Sin embargo, un tumor que expresaba un antígeno no emparejado (es decir, PSMA o CA9) crecía continuamente si se infundía solo

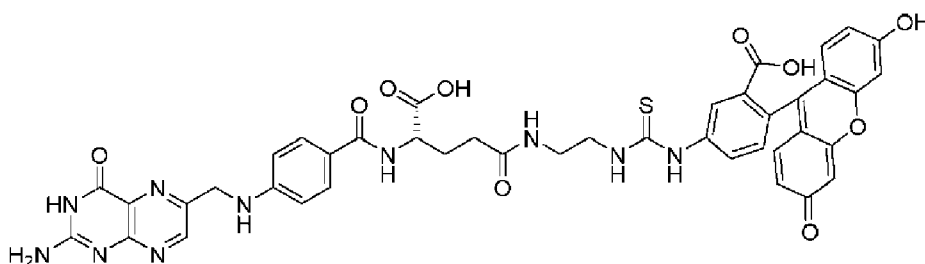
uno de los puentes (es decir, FITC-DUPA solo o FITC-CA9 solo). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que las células CAR T antiluminescencia pueden superar la heterogeneidad tumoral usando un cóctel de moléculas puente.

Se implantaron MDA-MB-231 PSMA+ y MDA-MB-231 CA9+ en ratones NSG (Jackson Laboratory, ME) en dos localizaciones diferentes (es decir, en el flanco derecho: PSMA+ MDA-MB-231, flanco izquierdo: CA9+ MDA-MB-231) o una localización tras la mezcla previa de dos células tumorales (es decir, 50 % de PSMA+ MDA-MB-231 y 50 % de CA9+ MDA-MB-231). Cuando los tumores alcanzaron ~100 mm³ de tamaño, se inyectaron células CAR T antiluminescencia (8×10⁶) más FITC-DUPA, FITC-CA9 o ambas. Los tumores se midieron cada dos días con calibradores y el volumen tumoral se calculó según la ecuación: Volumen tumoral=½(L × W²) donde L es el eje más largo del tumor y W es el eje perpendicular a L. Los resultados se muestran en las FIG. 49A y 49B.

Síntesis de moléculas puente

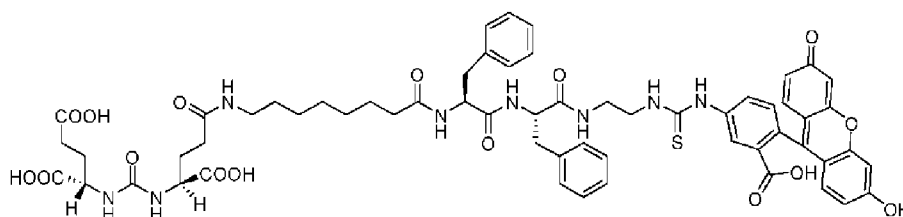
FITC-folato

Se acopló folato-γ-etilendiamina a isómero I de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) en dimetilsulfóxido (DMF) anhidro en presencia de tetrametilguanidina y diisopropilamina. El producto bruto se cargó en una columna de HPLC preparativa Xterra RP18 (Waters) y se eluyó con condiciones de gradiente empezando con fosfato sódico 5 mM al 99 % (fase móvil A, pH 7,4) y acetonitrilo al 1 % (fase móvil B) y alcanzando el 90 % de A y el 10 % de B en 10 min a un caudal de 20 ml/min. En estas condiciones, el máximo principal de FITC-folato eluyó normalmente a los 27-50 min. La calidad de la fracción de FITC-folato se monitorizó mediante HPLC analítica en fase inversa con un detector de UV. Las fracciones con una pureza mayor del 98,0 % (CLEM) se liofilizaron para obtener el producto final FITC-folato.



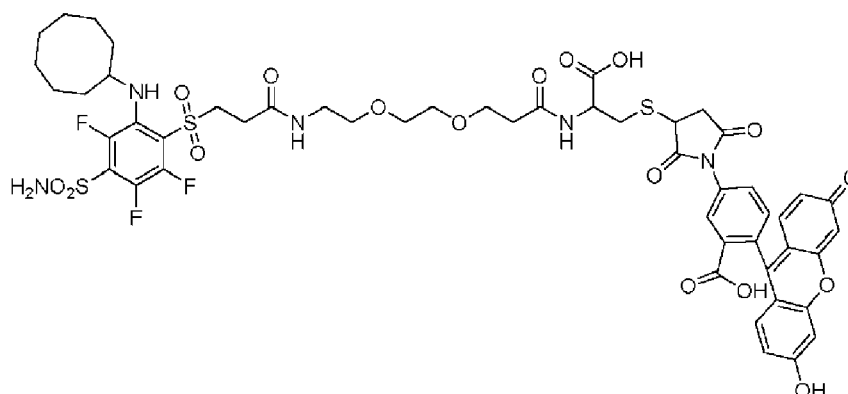
FITC-DUPA

DUPA-FITC se sintetizó mediante metodología en fase sólida como sigue. La resina NovaTag universal (50 mg, 0,53 mM) se hinchó con diclorometano (DCM) (3 ml) seguido de dimetilformamida (DMF, 3 ml). Una solución de piperidina al 20 % en DMF (3 × 3 ml) se añadió a la resina y se burbujeó argón durante 5 min. La resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) y alcohol isopropílico (i-PrOH, 3 × 3 ml). Después de hinchar la resina en DMF, una solución de DUPA-(OtBu)-OH (1,5 equiv), Se añadió HATU (2,5 equiv) y DIPEA (4,0 equiv) en DMF. Se burbujeó argón durante 2 h y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e i-PrOH (3 × 3 ml). Después de hinchar la resina en DCM, se añadió una solución de HOBt 1 M en DCM/trifluoroetano (TFE) (1:1) (2 × 3 ml). Se burbujeó argón durante 1 h, se eliminó el disolvente y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e i-PrOH (3 × 3 ml). Después de hinchar la resina en DMF, se añadió una solución de Fmoc-Phe-OH (2,5 equiv), HATU (2,5 equiv) y DIPEA (4,0 equiv) en DMF. Se burbujeó argón durante 2 h y la resina se lavó con DMF (3 × 3 ml) e i-PrOH (3 × 3 ml). La secuencia anterior se repitió para 2 etapas más de acoplamiento para la adición de ácido 8-aminooctanoico e isotiocianato de fluoresceína o isotiocianato de rodamina B. El compuesto final se escindió de la resina usando ácido trifluoroacético (TFA):H₂O: triisopropilsilano:cóctel (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 bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa [λ = 488 nm; gradiente de disolvente: del 1 % de B al 80 % de B en 25 min, lavado de B al 80 % 30 min de ejecución; A = NH₄OAc 10 mM, pH = 7; B = acetonitrilo (ACN)]. El ACN se eliminó al vacío y las fracciones puras se liofilizaron para obtener DUPA-FITC como un sólido de color naranja parduzco. RP-HPLC: t_R = 8,0 min (A = NH₄OAc 10 mM, pH = 7,0; B = ACN, gradiente de disolvente: del 1 % de B al 50 % de B en 10 min, lavado de B al 80 % 15 min de ejecución). RMN ¹H (DMSO-d₆/D₂O): δ 0,98-1,27 (ms, 9H); 1,45 (a, 3H); 1,68-1,85 (ms, 11H); 2,03 (m, 8H); 2,6-3,44 (ms, 12H); 3,82 (a, 2H); 4,35 (m, 1H); 6,53 (d, J = 8,1 Hz, 2H); 6,61 (dd, J = 5,3, 3,5 Hz, 2H); 6,64 (s, 2H); 7,05 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 7,19 (m, 5H); 7,76 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 8,38 (s, 1H). HRMS (ESI) (m/z): (M + H)⁺ calc. para C₅₁H₅₉N₇O₁₅S, 1040,3712, encontrado, 1040,3702. UV/vis: λ máx = 491 nm.



FITC-CA9

- 5 En un matraz de fondo redondo de 50 ml se disolvió el ligando CA9 (53,6 mg, sintetizado en laboratorio) en una cantidad deseada de N,N-dimetilformamida (DMF) (2-3 ml) usando una barra de agitación magnética de teflón. El aire ambiental se eliminó usando vacío y se reemplazó por gas nitrógeno, esto se realizó en tres ciclos. A continuación el fondo redondo se mantuvo bajo gas nitrógeno constante. Al matraz, se añadieron 28,9 mg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) seguidos de 21,6 mg de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) y 18,9 µl de Boc-PEG2-NH2 (obtenido de Sigma Aldrich). Se añadieron 5,4 µl de trietilamina (TEA) al final y la reacción se dejó agitar durante toda la noche. La mezcla de reacción se purificó usando HPLC y se confirma con UHPLC-MS (m/z diana de 831). El acetonitrilo se eliminó mediante evaporación rotatoria a alto vacío y se colocó en un liofilizador durante 48 horas. La desprotección de Boc se realizó con TFA:DCM 1:1 durante 30 minutos. TFA/DCM se eliminó mediante evaporación rotatoria a alto vacío seguida de 30 minutos a alto vacío. A continuación el compuesto se disolvió en DMF y se combinó con 5 equivalentes molares de N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA). Se añadieron 16 mg de isotiocianato de fluoresceína (adquirido a Life Technologies) a la solución y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC y el compuesto diana se confirmó con UHPLC-MS (m/z diana de 1120). Las muestras se colocaron en un liofilizador durante 48 horas y el compuesto se almacenó a -20 °C.



20

FITC-NK 1R

- A una solución agitada de NK-1 (0,02 g, 0,0433 mmol, 1,0 eq.), O-(2-Aminoetil)-O'-[2-(Boc-amino)etil]decaetilenglicol (BocNH-PEG11-NH2) (Sigma, 0,0336 g, 0,0521 mmol, 1,2 eq.), Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) (0,027 g, 0,0521 mmol, 1,2 eq.) en CH₂Cl₂ seco se añadió N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA) (0,076 ml, 0,4338 mmol, 10 eq.) en argón a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CLEM y se purificó mediante RP-HPLC preparativa (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 µm; columna de 19 × 100 mm, fase móvil A = tampón acetato de amonio 20 mM, pH 7, B = acetonitrilo, gradiente del 10-100 % B en 30 min, 13 ml/min, λ = 220 nm, 254 nm). Se recogieron las fracciones puras, se evaporaron todos los disolventes orgánicos y se liofilizó la muestra durante 48 h para obtener el NK1-PEG 11-NHBoc. Rendimiento: 40,13 mg (97 %). Al NK1-PEG11-NHBoc (0,0165 g, 0,015 mmol) en CH₂Cl₂ seco se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 20 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 4 h a ta. Se eliminó el exceso de TFA, se diluyó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x5 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El semisólido de color rojo obtenido se secó al vacío y se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional. A una solución agitada de NK1-PEG11-NH2 (0,008 g, 0,0081 mmol, 1,0 eq.), Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, 0,0037 g, 0,0097 mmol, 1,2 eq.) en dimetilsulfóxido (DMSO, 0,3 ml) seco se añadió diisopropiletilamina (0,0028 ml, 0,0162 mmol, 2,0 eq.) a temperatura ambiente en argón. El progreso de la reacción se monitorizó mediante CLEM y se purificó mediante RP-HPLC preparativa (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 µm; columna de 19 × 100 mm, fase móvil A = tampón acetato de amonio 20 mM, pH 7, B = acetonitrilo, gradiente del 10-100 % B en 30 min, 13 ml/min, λ = 280 nm). Se recogieron las fracciones puras, se evaporaron todos los disolventes orgánicos y se liofilizó la muestra durante 48 h para obtener el NK1-PEG11-FITC (5). Rendimiento: 8,54 mg (77 %).

El compuesto NK-1 se sintetizó mediante un procedimiento de dos etapas partiendo del ligando base, que se preparó siguiendo un procedimiento bibliográfico. (Ref: DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEUROKININ-1 RECEPTOR-BINDING AGENT DELIVERY CONJUGATES, Número de solicitud: PCT/US2015/44229).

5 EJEMPLO 43

CONTROL DE LA TORMENTA DE CITOCINAS CON MOLÉCULAS PUENTE

Se muestra la regulación de la intensidad de un síndrome de liberación de citocinas mediado por células CAR T con el uso de moléculas puente de bajo peso molecular. Se describen cuatro estrategias novedosas para eliminar un síndrome de liberación de citocinas tóxico y a veces letal, al tiempo que se describe el perfeccionamiento de la eficacia terapéutica de las células CAR T.

Líneas celulares y células T

Las líneas celulares positivas al receptor de folato (por ejemplo KB y MDA-MB-231) se mantuvieron en RPMI 1640 sin ácido fólico (Gibco, Irlanda) que contiene suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor y penicilina-estreptomicina al 1 % en CO₂ al 5 % a 37 °C. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (GE Healthcare Lifesciences, EE.UU.) de sangre humana fresca procedente de voluntarios sanos (IRB N.º: 1702018875). Se aislaron células T CD3⁺ puras a partir de PBMC usando el kit de aislamiento de células T humanas EasySep™ (STEM CELL technologies, Canadá) y a continuación se cultivaron en medio TexMACS™ (Miltenyi Biotech Inc, CA) que contenía penicilina al 1 % y sulfato de estreptomicina en presencia de IL-2 humana (100 UI/ml, Miltenyi Biotech Inc, CA). Las células T se dividieron y los medios anteriores se cambiaron cada 2-3 días.

Generación del vector lentivírico que codifica el gen CAR antilfluoresceína

Se usó un método de PCR solapada para generar la construcción CAR que contiene un fragmento variable monocatenario (scFv) contra la fluoresceína. La secuencia codificadora del scFv se sintetizó (GeneScript, NJ) a partir de una secuencia optimizada por afinidad de un anticuerpo humano antilfluoresceína, 4M5.3 (Kd = 270 fM, 762 pb) [21]. Las secuencias que codifican el péptido señal de CD8α humano (SP, 63 pb), las regiones bisagra y transmembrana de CD8α (249 pb), el dominio citoplasmático de 4-1BB (CD137, 141 pb) y el dominio citoplasmático de la cadena CD3ζ (336 pb) (adquiridas de GeneScript) se fusionaron con el scFv antilfluoresceína mediante PCR solapada. La construcción CAR resultante (1551 pb) se insertó en el vector de expresión lentivírico escindido por EcoRI/NotI pCDH-EF 1-MCS-(PGK-GFP) (System Biosciences, CA) y se expandió/purificó usando el kit PureLink HiPure plasmid midiprep (Invitrogen, CA). La secuencia de la construcción CAR en el vector lentivírico se confirmó mediante secuenciación del ADN (Purdue Genomic Core Facility, IN).

Producción de lentivirus y transducción de células T humanas

Para preparar lentivirus que contengan el CAR anti-fluoresceína (scFv), la línea celular de envasado 293TN se co-transfectó con el vector lentivírico que codifica el scFv CAR anti-fluoresceína y una mezcla de plásmidos de envasado de 2ª generación (Cellecta, CA). Después de 24 y 48 horas de transfección, se recogieron los sobrenadantes que contenían lentivirus que codificaban el gen CAR y se concentraron las partículas de virus usando un método convencional de concentración de virus con polietilenglicol (Clontech, CA).

Transducción de células T humanas con lentivirus que expresan CAR

Las células T aisladas (véase anteriormente) se activaron usando Dynabeads acopladas a anticuerpos anti-CD3/CD28 (Life Technologies, CA) durante 12-24 horas en presencia de IL-2 humana (100 UI/ml) y a continuación se transdujeron con el lentivirus mencionado anteriormente que codifica tanto la GFP como el CAR antilfluoresceína [50]. Después de 72 horas de transducción, se analizó la fluorescencia de la GFP en las células T mediante citometría de flujo para determinar la eficiencia de la transducción.

Unión de puente a CAR T y receptores de células cancerosas

La fluoresceína-folato (FITC-folato) y la fluoresceína-PSMA (FITC-DUPA) se sintetizaron como se describió anteriormente. Para examinar la capacidad de estas moléculas puente para unirse a scFv antilfluoresceína en células CAR T, fue necesario desarrollar un ensayo de unión competitiva, porque no pudo usarse la medición de la señal de fluoresceína de los puentes unidos a células CAR T debido al solapamiento de su fluorescencia con la de las células CAR T que expresan GFP. Con este fin, se permitió que FITC-Alexa647 (10 nM) se uniera a células CAR T antilfluoresceína en ausencia o presencia de un exceso (1 μM) de ligando competidor (es decir, FITC-folato) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células CAR T anti-fluoresceína se lavaron 3 veces con PBS

para eliminar el FITC-Alexa647 no unido, y las células lavadas se analizaron para determinar la fluorescencia de Alexa647 mediante citometría de flujo. Para el análisis de la unión del folato FITC al receptor de folato, las células KB positivas para FR se incubaron con FITC-folato (100 nM) en ausencia o presencia de un exceso (10 μ M) de folato libre (es decir, como un ligando competitivo). Después de lavar las muestras con PBS (3 veces), se analizaron mediante

Análisis de la actividad antitumoral de células CAR T antifluoresceína *in vitro*

Se sembraron líneas celulares de cáncer positivas para FR (por ejemplo, células KB o MDA-MB-231) a una densidad de 10^4 células/100 μ l de medio en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante toda la noche. Se añadieron células CAR T antifluoresceína a cada pocillo en ausencia o presencia de moléculas puente. Después de la coincubación durante 6-24 horas, las placas se centrifugaron a 350xg durante 10 minutos para eliminar los restos y se analizaron los sobrenadantes para determinar la liberación de lactato deshidrogenasa (análisis de muerte celular) mediante el kit Pierce™ LDH cytotoxicity assay (Thermo Fisher Scientific, MA) y los niveles de interferón γ (IPN γ) usando un kit ELISA de IPN γ humano (Biolegend, CA), mientras que los gránulos se evaluaron para la activación de células CAR T mediante tinción con APC anti-CD69 humana (Clon: FN50, Biolegend, CA) o se examinó la proliferación de células CAR T cultivándolas durante 5 días en medio TexMACS™ (Miltenyi Biotech Inc, CA) con penicilina al 1 % de y sulfato de estreptomycin y cuantificando por citometría de flujo usando la fluorescencia intrínseca de GFP y la tinción con anticuerpo APC anti CD3 humano (Clon: HIT3a, Biolegend, CA).

Análisis de la actividad antitumoral de células CAR T antifluoresceína *in vivo*

A ratones NSG inmunodeficientes (Jackson Laboratory) se les implantaron células MDA-MB-231 por vía subcutánea y se les inyectaron por vía intravenosa células CAR T y, a continuación, fluoresceína-folato (como se indica) cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~ 100 mm³. Los ratones se mantuvieron con una dieta deficiente en ácido fólico (TD.95247, Envigo) para reducir el nivel de ácido fólico en ratones a los niveles fisiológicos encontrados en seres humanos. Los tumores se midieron cada dos días con calibradores y el volumen tumoral se calculó según la ecuación: Volumen del tumor = $\frac{1}{2}(L \times W^2)$ donde L es el eje más largo del tumor y W es el eje perpendicular a L. También se recogió sangre de ratón para medir los niveles de citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-6, IFN γ y TNF α) usando el inmunoensayo basado en perlas LEGENDplex (Biolegend, CA) y se monitorizó la toxicidad sistémica midiendo la pérdida de peso corporal. Todo el cuidado y uso de animales siguió las directrices del National Institutes of Health (NIH) y todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Purdue.

Análisis estadísticos

Se usó el programa GraphPad Prism versión 7 (Graphpad, CA) para generar todos los gráficos y análisis estadísticos. Todas las cifras indican valores de media \pm s.e.m. salvo que se indique lo contrario. Se usó ANOVA para comparaciones múltiples.

40 Construcción y caracterización de un CAR antifluoresceína y su interacción con moléculas puente de fluoresceína y folato

La FIG. 63A muestra la estructura de un puente fluoresceína-folato (FITC-folato). En el lado izquierdo de la estructura se encuentra la vitamina, ácido fólico, que se seleccionó como ligando representativo de la diana tumoral porque su receptor (receptor de folato alfa, FR α) se sobreexpresa en el ~ 40 % de los tumores epiteliales humanos, pero en gran medida está ausente o inaccesible en los tejidos normales. En el lado derecho se encuentra la fluoresceína, que se eligió como ligando para el acoplamiento de CAR porque ya se había descrito en la bibliografía un anticuerpo humano antifluoresceína con afinidad femtomolar por la fluoresceína. La FIG. 63B esboza la construcción del CAR (SEQ ID NO: 1 y 2) que se usó para dirigir la célula CAR T citotóxica para eliminar las células cancerosas. El scFv antifluoresceína del anticuerpo mencionado anteriormente se fusionó con la cadena CD3 zeta de un receptor de células T que se había diseñado previamente para contener el dominio intracelular de CD137 (4-1BB). La inserción de esta construcción CAR en un vector lentivírico [pCDH-EF1-MCS-(PGK-GFP)] permitió la transducción de células T humanas preactivadas con una eficiencia del 50-60 %, como muestra la fracción de células T con tinción positiva para GFP (un marcador fluorescente co-transducido con el CAR) (FIG. 63C). La FIG. 63D demuestra además que las células T que expresan CAR se unen al folato de fluoresceína, como demuestra la capacidad de la fluoresceína-folato para bloquear competitivamente la unión de FITC-Alexa 647 a las células T modificadas por ingeniería genética.

Una vez establecida la capacidad de generar células CAR T antifluoresceína, se examinó la potencia de destrucción de las células T modificadas mediante la evaluación de la capacidad de la molécula puente fluoresceína-folato para mediar en la eliminación de células tumorales por parte de las células CAR T en cultivo. Como se muestra en la FIG. 64A, se observó que el folato de fluoresceína se unía a las células KB FR positivas (una línea celular de cáncer de cuello de útero), como lo demostraba i) el desplazamiento de la fluorescencia de las células KB al añadir folato de fluoresceína, y ii) el bloqueo de este desplazamiento al competir con un exceso de ácido fólico libre. La destrucción

de células KB mediada por células CAR T se demostró a continuación mediante la lisis de células KB en presencia pero no en ausencia del puente. Por lo tanto, como se muestra en la FIG. 64B, se observó lisis de las células cancerosas cuando estaban presentes tanto las células CAR T como fluoresceína-folato, pero no cuando fluoresceína-folato estaba ausente (PBS) o cuando estaba presente la fluoresceína-DUPA (una molécula puente que se une a las células de cáncer de próstata pero no a las células KB). Por otra parte, las células CAR T antifuoresceína fueron capaces de erradicar las células KB en múltiples proporciones de células efectoras a células diana, pero solo cuando estaba presente fluoresceína-folato (FIG. 64C). El análisis de la producción concomitante de IFN γ proporcionó pruebas adicionales de que la actividad tumoricida de la célula CAR T antifuoresceína solo se desencadenaba mediante la adición del puente fluoresceína-folato correcto (FIG. 64D) y los experimentos relacionados establecieron que tanto la proliferación de la célula CAR T antifuoresceína como la activación de la célula CAR T dependían adicionalmente de la adición del puente correcto (FIG. 64, paneles E y F). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la funcionalidad de la célula CAR T antifuoresceína depende inextricablemente de la disponibilidad del puente específico del tumor correcto para mediar en el acoplamiento de la célula CAR T con la célula cancerosa deseada.

15 Identificación de las condiciones que favorecen un síndrome de liberación de citocinas (CRS)

Para explorar si la manipulación de la duración, la concentración o la frecuencia de dosificación del puente podrían aprovecharse para controlar un CRS, primero fue necesario identificar las condiciones en las que se produciría de forma reproducible un CRS fácilmente medible. Después de la exploración de varios modelos de xenoinjertos tumorales humanos, se descubrió que los ratones NSG implantados con células MDA-MB-231 FR positivas (una línea celular humana de cáncer de mama triple negativo) mostraban de forma fiable un potente CRS después de la administración de células CAR T anti-fluoresceína más fluoresceína-folato. Por lo tanto, como se muestra en la FIG. 65A, se observó una pérdida de peso corporal del ~8 % en ratones portadores de tumores en los 4 días siguientes a la inyección de 5×10^6 células CAR T más 500 nmoles/kg de fluoresceína-folato; es decir, indicando la presencia de un CRS. En cambio, no se observó pérdida de peso en ratones similares portadores de tumores tras la inyección de células CAR T en ausencia de fluoresceína-folato; es decir, consistente con los datos mencionados anteriormente que demuestran que el puente es necesario para la activación de las células CAR T. De manera significativa, no se detectó pérdida de peso en los ratones libres de tumor tratados con las mismas células CAR T antifuoresceína, independientemente de que el puente estuviera presente o ausente. Estos últimos datos confirman que incluso en presencia de células CAR T y puente fluoresceína-folato, la activación de la célula CAR T y la consiguiente pérdida de peso corporal no pueden producirse a menos que una célula con fluoresceína expuesta (es decir, una célula MDA-MB-231 decorada con fluoresceína) pueda ser captada por la célula CAR T. Dado que la expresión de FR en los tejidos sanos se limita principalmente a la superficie apical de las células tubulares proximales de los riñones (donde los FR son inaccesibles para las células inmunitarias), en ratones libres de tumores se esperaría una activación escasa o nula de las células CAR T.

Para establecer además que la intensidad de una CRS depende del número de células CAR T que logran formar una sinapsis citotóxica con una célula cancerosa, se determinó la dependencia de la pérdida de peso corporal y la liberación de IFN γ en función del número de células CAR T. Como se muestra en la FIG. 65B, la administración del puente solo no promovió ninguna pérdida de peso corporal. De manera similar, la inyección de 10×10^6 células CAR T en ausencia del puente no estimuló ninguna disminución del peso corporal; es decir, confirmando que se requiere el compromiso de una célula cancerosa para la citotoxicidad sistémica. Mientras que la inyección de 2×10^6 células CAR T más 500 nmoles/kg de puente tampoco indujo una pérdida de peso aparente, la infusión de 5×10^6 o 10×10^6 células CAR T más la misma dosis puente promovió pérdidas cada vez mayores de peso corporal. Los análisis concomitantes de la liberación de IFN γ sugieren que estos descensos de la masa corporal probablemente se debieron a CRS, que también muestran una dependencia sensible del número de células CAR T y de la presencia del puente. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que tanto las células CAR T como un puente deben estar presentes para la inducción de la activación de las células CAR T y el CRS asociado.

50 Estrategias para poner fin rápidamente a un síndrome de liberación de citocinas preexistente

Experimentando el 92 % de todos los pacientes con ALL tratados con células CAR T un CRS, se planteó la cuestión de si la capacidad de controlar el compromiso de una célula CAR T con su diana celular cancerosa podría aprovecharse para poner fin a un CRS tras su activación completa. Para explorar esta posibilidad, se examinó en primer lugar si la interrupción de la administración de fluoresceína-folato podría facilitar el cese de un CRS. Como se muestra en la FIG. 66A, un tratamiento único de ratones portadores de tumores MDA-MB-231 con 15×10^6 células CAR T antifuoresceína seguido de la administración cada dos días de 500 nmol/kg de fluoresceína-folato promovió una pérdida de peso rápida y continua, dando lugar a la eutanasia requerida de tres de los ratones el día 8 de tratamiento. En cambio, los ratones tratados de forma idéntica en los que se omitió la dosificación de fluoresceína-folato los días 4 y 6 (pero que recibieron a partir de entonces una dosificación continua cada dos días) solo mostraron una pérdida de peso moderada de la que se recuperaron rápidamente. Que esta pérdida de peso estaba probablemente relacionada con el nivel de producción de citocinas en los mismos ratones queda demostrado por los cambios relacionados en los niveles de IFN γ medidos en el plasma de cada ratón (FIG. 66B). Más importante aún, la interrupción temporal de la

dosificación en días alternos no solo no comprometió la actividad antitumoral, sino que, por el contrario, aumentó la potencia de las células CAR T. Por lo tanto, como se muestra en la FIG. 66C, mientras que los ratones no tratados o tratados continuamente mostraron un rápido aumento del crecimiento tumoral, los ratones expuestos a dosis puente interrumpidas presentaron una remisión completa de sus tumores. Estos datos sugieren que un CRS preestablecido

5 puede controlarse mediante la interrupción temporal de la dosificación puente sin subvertir la citotoxicidad de las células CAR T.

Dándose cuenta de que la interrupción transitoria de la dosificación puente puede conducir a una disminución de CRS, a continuación los presentes inventores se preguntaron si podría promoverse una disminución más potente de CRS

10 añadiendo ligandos que compitieran con el fluoresceína-folato para establecer puentes entre las células CAR T y las células cancerosas. Con este fin, se inició un CRS como se ha descrito anteriormente y, mientras se continuaba con la posología habitual del puente cada dos días, simplemente se administró un exceso de 100 veces de folato libre en los días 4 y 6 para intentar terminar el CRS. Como se muestra en la FIG. 67A, la inyección de ácido fólico en exceso impidió rápidamente la pérdida de peso continua observada con la dosificación puente ininterrumpida. Por otra parte,

15 como se ve en la FIG. 66, esta competición con la dosificación del adaptador no solo redujo el nivel de IFN γ en los ratones tratados (FIG. 67B), sino que también aumentó la potencia terapéutica de la terapia de células CAR T (FIG. 67C). Estos datos sugieren que la administración transitoria de un ligando competidor benigno (es decir, la vitamina ácido fólico) puede poner fin a un CRS sin comprometer significativamente la terapia tumoral.

20 Mientras que el ácido fólico puede usarse para controlar CRS, las terapias con células CAR T aprovechan la fluoresceína-folato para mediar el puente entre la célula CAR T y la célula cancerosa, parecía prudente examinar también la capacidad de la fluoresceína para bloquear un CRS, ya que debería resultar útil para controlar el CRS asociado a cualquier puente específico del tumor ligado a la fluoresceína. Por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, se indujo un CRS en ratones portadores de tumores MDA-MB-231 y se intentó interrumpirlo mediante

25 la administración de fluoresceína libre el día 3 del CRS. Mientras que la inyección de fluoresceína competidora indujo una disminución del CRS con un aumento de la eficacia terapéutica, lo hizo más rápidamente que lo observado con el folato libre. Por lo tanto, como se muestra en la FIG. 67D, todas las citocinas relevantes para CRS disminuyeron en las 3 horas siguientes a la administración de fluoresceína, disminuyendo IL-2, TNF- α e IL-6 >50 % en este corto periodo de tiempo. Aunque el IFN γ no mostró una disminución de la concentración plasmática a las 3 horas, demostró

30 una disminución a las 6 horas después de la inyección de fluoresceína, lo que sugiere que su producción también se suprime por la adición de fluoresceína. De manera importante, las concentraciones en plasma de IL-2, TNF- α e IL-6 habían disminuido casi a niveles de fondo al punto temporal de 6 horas.

Estrategias para impedir la aparición de CRS sin comprometer la actividad antitumoral

35 Aunque un CRS muy elevado y prolongado puede conducir a menudo a la muerte del paciente, algún nivel de CRS se ha considerado deseable, ya que los pacientes que no muestran indicios de CRS no suelen responder a las terapias con células CAR T. Por lo tanto, se plantea la cuestión de si la optimización de las condiciones de dosificación de las células T puente o CAR puede dar lugar a la minimización de un CRS sin pérdida de actividad antitumoral. Para

40 explorar esta posibilidad, se examinó en primer lugar el efecto de la dosis puente sobre la lisis de células tumorales y la liberación de IFN γ *in vitro*. Con este fin, se añadieron CAR T antifluoresceína a cultivos celulares de MDA-MB-231 seguidos de un tratamiento con concentraciones de fluoresceína-folato que variaban de 0,001 a 100.000 nM. Como se muestra en la FIG. 68A y B, las dosis puente inferiores a 0,01 nM ejercieron escaso efecto sobre la lisis de las células tumorales y solo un efecto mínimo sobre la producción de IFN γ . En cambio, las concentraciones algo más

45 elevadas de fluoresceína-folato ejercieron un potente impacto sobre ambos parámetros, mientras que dosis aún mayores de puente promovieron una reducción tanto de la liberación de citocinas como de la destrucción de células MDA-MB-231. Basado en el mecanismo del puente, podría predecirse que las concentraciones excesivas de puente saturarían monovalentemente todos los sitios tanto en las células CAR T como en las células cancerosas, y de este modo bloquearían bivalentemente la función de puente intercelular del puente.

50 Para evaluar la dependencia de la concentración del mismo puente *in vivo*, se implantaron células MDA-MB-231 por vía subcutánea en ratones NSG y se examinó de nuevo el efecto de la dosis de fluoresceína-folato controlando el crecimiento tumoral y la liberación de citocinas. Desafortunadamente, como se ha visto anteriormente en la FIG. 66, la dosificación continua en días alternos dio lugar al CRS tóxico prevista, independientemente de la dosis de puente,

55 obligando a omitir la administración del puente los días 4 y 6. Sin embargo, incluso con esta modificación, fue posible analizar el efecto de la concentración de puentes, revelando una dependencia en forma de campana similar a la observada *in vitro*; es decir, un aumento inicial del IFN γ plasmático fue seguido de una disminución de su concentración plasmática a medida que se elevaba la dosis puente (FIG. 66C). De manera importante, la reducción de las células tumorales también mostró una respuesta a la dosis en forma de campana similar, presentando 500 nmoles/kg una

60 erradicación completa del tumor y presentando tanto las concentraciones más bajas como las más altas potencias más bajas (FIG. 66D). Estas observaciones confirman que el puente máximo entre las células CAR T y las células cancerosas solo se producirá a concentraciones de puente intermedias, donde esté presente un puente suficiente para

maximizar la formación de puentes, pero no se ha administrado un exceso de puente para promover la competencia autóloga por la función de puente.

- Una vez establecida la capacidad de aprovechar la dosis puente para controlar la activación de las células CAR T, se
- 5 decidió investigar si podría identificarse un régimen de dosificación puente terapéuticamente activo que pudiera impedir la aparición de un CRS tóxico sin comprometer la potencia antitumoral. Basándose en la hipótesis de que CRS se vuelve más grave cuando las células CAR T se activan demasiado precipitadamente, se decidió probar dos regímenes de dosificación puente menos agresivos que podrían inducir más gradualmente la activación de las células CAR T. Para el primer régimen, la concentración de fluoresceína-folato se incrementó de forma constante de 0,5 a
- 10 500 nmoles/kg durante cada administración sucesiva del adaptador. Como se muestra en la FIG. 69A, esta lenta escalada de la concentración de puentes solo provocó una pérdida de peso transitoria que se resolvió en 4 días sin ninguna intervención. En cambio, la dosificación continua de 500 nmoles/kg en los mismos ratones pretratados con 15×10^6 células CAR T provocó una pérdida de peso drástica y continua que obligó a la eutanasia final de los ratones. Más importante aún, el régimen de aumento escalonado de la dosis produjo la curación completa de los ratones
- 15 portadores de tumores, mientras que el control estricto de posología tóxica continua proporcionó escasos beneficios terapéuticos (FIG. 69B). Estos datos sostienen firmemente que la actividad antitumoral puede desacoplarse de CRS y que una activación más lenta de las células CAR T puede, de hecho, potenciar la actividad tumoricida al tiempo que reduce CRS.
- 20 Se examinó el impacto de la reducción de la frecuencia de la dosificación puente con la esperanza de que la introducción de intervalos más largos entre la activación de las células CAR T pudiera permitir cierta relajación de las células CAR T y, de este modo, reducir cualquier agotamiento que hubiera surgido normalmente de la exposición crónica al antígeno. Como se muestra en la FIG. 69C, tres dosis de puente a la semana provocaron una importante pérdida de peso de los animales, mientras que dos dosis de puente por semana provocaron menos toxicidad y una
- 25 sola inyección de fluoresceína-folato por semana no provocó pérdida de peso. Como se ha visto en muchos de los estudios anteriores, la actividad antitumoral aumentaba a medida que disminuía CRS; es decir, que se producían curaciones completas cuando solo se administraba una dosis de puente a la semana.

EJEMPLO 44

30 ESTUDIO QUE USA EL MODELO AML

Se muestra la terapia EC17/CAR-T en un modelo de leucemia mieloide aguda positiva al receptor de folato- β .

35 Materiales:

EC17 (folato-FITC, p.m. 873) se sintetizó en una instalación propia. La fluoresceína sódica (AK-FLUOR®, fluoresceína inyectable, USP) se adquirió en Purdue Pharmacy.

40 Métodos *in vivo*:

Línea celular

- THP-1 es una línea celular monocítica humana derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda, un tipo de
- 45 leucemia mieloide aguda (AML). THP-1-FR β es un subclon positivo a GFP de THP-1 transfectado de forma estable con un FR β humano. Las células se cultivaron en un medio RPMI1640 sin folatos (Gibco BRL) (FFRPMI) que contenía el 10 % de suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS) y antibióticos y se mantuvieron en una atmósfera con CO₂ al 5 % usando técnicas convencionales de cultivo celular.

50 Ratones

NSG™ hembra (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, n.º de artículo 005557) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se usaron cuando alcanzaron ~4 semanas de edad. Los ratones se alimentaron con una dieta deficiente en folato (TestDiet, Louis, MO) el día de llegada.

55 Implantación de tumores

Los tumores THP-1-FR β se generaron mediante la implantación intravenosa de células cultivadas a 5×10^6 por animal en 9 ratones NSG.

60 Terapia EC17/CAR-T de ratones portadores de tumores

Empezando 11 días después de la implantación del tumor, se infundieron por perfusión intravenosa ~8,3 millones de células CAR-T GFP+ 4M5.3 en cada ratón. Los ratones se dividieron en 3 grupos (n = 3): (1) célula CAR-T sola, (2) células CAR-T con dosis semanales de EC17 a 500 nmol/kg, y (3) células CAR-T con dosis semanales de EC17 a 500 nmol/kg más rescate de fluoresceína sódica cuando fuera necesario. La primera dosis de EC17 se dio dos días después de la administración de células CAR-T. Todas las dosis de EC17 se dieron hacia el final del día (~3-4 PM) para permitir que el síndrome de liberación de citocinas (CRS) se desarrollara durante la noche. A la mañana siguiente de la primera dosis de EC17, los 6 ratones de los Grupos 2 y 3 mostraron un inicio de CRS con un grado de CRS de ~3, a continuación se administró fluoresceína sódica a 6 µmol/kg solo para el Grupo 3. Todos los ratones dosificados con EC17 con y sin rescate de fluoresceína sódica se recuperaron completamente en los días siguientes. No se administró adicionalmente fluoresceína sódica de rescate para la dosificación de EC17 en el Grupo 3. Se pesó a los ratones y se les vigiló para detectar signos de salud y desarrollo de enfermedades. Los animales fueron eutanasiados cuando mostraban un comportamiento de angustia/moribundo grave o a efectos de comparación. Después de la eutanasia, todos los ratones se sometieron a un examen macroscópico para detectar la presencia de masas tumorales. Se extirparon todas las masas tumorales visibles, se contaron y se pesaron. La sangre, las metástasis tumorales (metástasis) y los tejidos adyacentes normales se recogieron para su análisis por citometría de flujo el mismo día.

Análisis de células de sangre completa mediante citometría de flujo

El plasma se extrajo de volúmenes predeterminados de sangre total tratada con EDTA mediante un centrifugado a 4 °C durante 10 minutos a 3000 x g y los gránulos celulares resultantes se incubaron con un volumen 10 veces mayor de solución de lisis 1X de RBC a temperatura ambiente [preparada a partir de una solución madre 10X; Biolegend, n.º de catálogo 420301] durante 5 minutos, se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos. Los gránulos celulares se lavaron en un volumen 10 veces mayor de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,4) helada, se filtraron con un filtro de nailon de 40 µm y se volvieron a granular. A continuación los gránulos de células leucocitarias se resuspendieron en una solución de tinción para citometría de flujo seroalbúmina bovina al 1 %, IgG humana 50 mg/ml (Equitech Bio, n.º de cat SLH56-0001), azida sódica al 0,9 % en PBS, pH=7,4) suplementado con un bloque anti-receptor FcγIII/II de ratón (CD16/CD32) [clon 2.4G2; BD Bioscience, n.º de catálogo 553142 a dilución 1:100 (v/v) y bloque anti-Fc humano (BD Biosciences, n.º de catálogo 564220 en dilución 1:50 (v/v)). La tinción de los marcadores de superficie se realizó añadiendo a cada muestra los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo durante 20 minutos en hielo y en la oscuridad: anti-CD45 humano-APCeF780 (clon HI30, eBioscience n.º 47-0459-42 en dilución 1:20 (v/v)), anti-CD3 humano-BV650 (clon SK7, BD Bioscience, n.º de catálogo 563999 en dilución 1:20 (v/v)), anti-CD137 humano-BV650 (clon 4B4-1, BD Bioscience n.º 564092 en dilución 1:20 (v/v)), anti-CD8α humano-PECy7 (clon RPA-T8, BD Bioscience, n.º de catálogo 557746 en dilución 1:20 (v/v)), anti-CD4 humano-PercpCy7 (clon SK3, eBioscience n.º de catálogo 46-0047-42 en dilución 1:20 (v/v)), anti-CD25 humano-PE (clon M-A251, BD Bioscience, n.º de catálogo 555432 en dilución 1:10 (v/v)), anti-CD33 humano-PE (clon WM53, BD Bioscience, n.º de catálogo 555450 en dilución 1:5 (v/v)), anti-CD123 humano-AF647 (clon 9F5, BD Bioscience n.º de catálogo 563599 en dilución 1:20 (v/v)). El receptor de folato-β antihumano biotinilado (clon m909) fue proporcionado amablemente por el Low lab de la Universidad de Purdue (*Arthritis Res Ther.*) 201 1;13(2):R59) y se detectó usando estreptavidina-eFluor660 (eBioscience, catálogo n.º 50-4317 en dilución 1:1000 (v/v)). La unión del ácido fólico se interpretó como una medición del receptor de folato funcional y se determinó mediante incubación con un ácido fólico conjugado con Alexa Fluor que se sintetizó internamente. Después de la tinción de leucocitos, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS frío que contenía yoduro de propidio 3 µM. Los datos de citometría de flujo se recogieron en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA), donde se recogió un mínimo de 15.000 acontecimientos de perlas CountBright™ en un intento de recoger suficientes acontecimientos de leucocitos para un recuento preciso de las células CAR T infundidas en cada muestra de sangre de ratón. La determinación de la concentración de células CAR T en cada muestra de sangre se calculó siguiendo las instrucciones de Invitrogen. Brevemente, las células CAR T se identificaron como acontecimientos CD45+ humano GFP+ y se distinguieron y se contaron fácilmente usando el software de citometría de flujo Kaluza™ versión 1.5. Las microesferas CountBright™ se marcaron uniformemente con un fluorocromo no usado en el panel de anticuerpos empleado para identificar las células CAR T y se distinguieron fácilmente de los leucocitos y se contaron los acontecimientos de las perlas. Debido a que se añadieron 53.000 perlas CountBright™ a cada tubo de muestra, se calculó la relación entre el total de 53.000 perlas y los acontecimientos de perlas recogidos por muestra y se estableció la relación de perlas equivalente al número desconocido de células CAR T en cada muestra dividido por el número conocido de acontecimientos de células CAR T recogidos. La resolución de la incógnita dio el número de células CAR T aisladas de cada muestra de sangre de volúmenes conocidos. A continuación el número de células CAR T en la circulación de cada ratón infundido se representó en los gráficos como el número total de células CAR T por 50 µl de sangre total analizada. Se adquirieron células mononucleares de sangre periférica humana y se usaron para controles de tinción de marcadores de superficie leucocitaria (PBMC humanas, Stem Cell Technologies, n.º de catálogo 70025.22). La significancia estadística se determinó usando una prueba de la t de student no apareada, de dos colas, con significancia fijada en p < 0,05 para las comparaciones entre cada uno de los tres grupos de ratones.

Preparación de suspensiones unicelulares de tumor y tejido sano adyacente

Se recogieron los tumores sólidos y los tejidos adyacentes libres de tumor, se pesaron y se trituraron en trozos pequeños, a continuación, se transfirieron a tubos de 50 ml que contenían 20 ml de un cóctel de digestión tumoral. El cóctel enzimático de digestión tumoral consistió en 0,5 mg/ml de colagenasa IV (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo C5138), Hialuronidasa 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, N.º de Catálogo H3506) y 0,1 mg/ml de DNasa I (Sigma-Aldrich, N.º de Catálogo DN25) en medio RPMI1640 libre de suero y deficiente en folato suplementado con antibióticos. Los fragmentos tumorales se digirieron durante una hora a 37 °C a 300 rpm en un agitador horizontal. En lo sucesivo, el digerido tumoral se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los gránulos de células tumorales se incubaron con un volumen 10 veces mayor de solución de lisis 1X RBC a temperatura ambiente [preparada desde solución madre 10X; Biolegend, n.º de catálogo 420301] durante 5 minutos, se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y el sedimento celular se lavó en un volumen 10 veces mayor de solución salina tamponada con fosfato pH=7,4 helada, se filtró con un filtro de nailon de 40 µm, a continuación, se volvió a granular. Las células tumorales se analizaron mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

Examen macroscópico de la carga tumoral total

Los 3 animales de control con células CAR-T del Grupo 1 (n.º 1, n.º 2, n.º 3) se encontraron hinchados el día 45 después de la implantación del tumor (PTI 45) (es decir, 34 días después de la administración de células CAR-T). Dos animales de control se sacrificaron y el tercero murió justo antes de la eutanasia. Un animal del Grupo 2 (n.º 5) se sacrificó y sirvió como comparador del mismo día para el Grupo 1. El día 58 después de la implantación del tumor (PTI 58) (es decir, 46 días después de la administración de CAR-T), los dos animales restantes del Grupo 2 (n.º 4 y n.º 6) se sacrificaron (al n.º 4 se le administró previamente EC17 el día anterior). Los 3 animales del Grupo 3 (n.º 7, n.º 9 y n.º 10) (n.º 7 y n.º 10 fueron predosificados con EC17 el día anterior). Como se muestra en la FIG. 56, se encontraron masas tumorales metastásicas de diversos tamaños (grandes en los ovarios) y localizaciones (excepto en los pulmones) en el grupo de control de solo células CAR-T. El mismo día de la recogida, solo se identificaron nódulos tumorales diminutos en el animal tratado con EC17 del Grupo 2 (n.º 5). La FIG. 57 resume el número estimado de masas tumorales y el peso total de los tumores en todos los grupos examinados. En general, los ratones del grupo 1 de control de células CAR-T tenían las masas tumorales más visibles y una carga tumoral total mayor que los animales de ambos grupos tratados con EC17 independientemente del rescate con fluoresceína sódica. Aparte de un animal del Grupo 3 (n.º 10), cinco de los 6 ratones tratados con EC17 (+/- rescate único con fluoresceína sódica) tenían una carga tumoral mínima en el momento de la recogida. Estos resultados preliminares mostraron que la terapia CAR-T controlada por EC17 era altamente eficaz contra este modelo tumoral de AML.

Caracterización de las células tumorales circulantes

Se analizaron los AML circulantes que muestran una expresión característica de marcadores de superficie, CD33 y CD123, en aproximadamente el 90-95 % de todos los pacientes. Para probar la actividad antileucémica de las presentes células CAR T 4M5.3 específicas de FITC en este agresivo modelo de AML, se usaron células THP-1 transfectadas de forma estable con FRβ y denominadas THP-1-FRβ. Por lo tanto se probó la presente línea celular THP-1-FRβ *in vitro* y se demostró que estas células también expresaban CD33 y CD123 en superficie (FIG. 58A, diagrama de puntos izquierdo), lo que sugiere un fenotipo de AML. Las células THP-1-FRβ no teñidas y las PBMC humanas frescas sirvieron como controles de clasificación y positivos, lo que da confianza en el presente ensayo para estos marcadores (FIG. 58A, gráficos de puntos central y derecho). Cuando las células THP-1-FRβ se inyectaron por vía intravenosa en los ratones NSG, las células leucémicas humanas se distinguieron fácilmente de los leucocitos de ratón en la sangre mediante fluorescencia GFP y se observó que conservaban la expresión de superficie de los marcadores de AML, CD33 y CD123 (FIG. 58B). Además, se confirmó la expresión estable de FRβ en células tumorales circulantes *in vivo* mediante tinción superficial positiva con ácido fólico marcado con Alexa Fluor 647 (FIG. 59A). Las células tumorales THP-1-FRβ también siguieron expresando FRβ en metástasis tumorales sólidas aisladas del hígado y el ovario, como se observa en la tinción por citometría de flujo con un anticuerpo FRβ antihumano (FIG. 59B).

Actividad antileucémica de células CAR T dirigidas por EC17

Para determinar si las células CAR T pueden dirigirse para reducir la carga leucémica de ratones NSG portadores de células THP-1-FRβ, el día 34 después de la infusión de CAR-T, se compararon las células tumorales GFP+ aisladas de la sangre de un animal que recibía células CAR T solas en el Grupo 1 y que había cumplido los criterios de eutanasia con las de un animal que recibía células CAR T más EC17 (500 nmol/kg; SIW) durante 4 semanas en el Grupo 2 (FIG. 60). Claramente había una alta carga de leucemia en el animal control sin tratamiento con EC17, ya que aproximadamente el 23 % del total de leucocitos son células leucémicas GFP+ (FIG. 60A y FIG. 60B, gráfico de barras). Sin embargo, en el animal infundido con células CAR T y dosificado con EC17, se observó una actividad significativa de las células CAR T ya que las células leucémicas GFP+ se volvieron casi indetectables en la sangre (FIG. 60B). Por otra parte, la actividad antileucémica observada de las células CAR T persistió en animales hasta 47 días después de la infusión de células CAR T, ya que las células THP1-FRβ seguían siendo indetectables en la sangre (FIG. 60B).

Persistencia de las células CAR T en la sangre después de la infusión

El número de células T FITC-CAR en la circulación se midió mediante análisis de citometría de flujo para enumerar los acontecimientos GFP+ CD3+ CAR T en muestras de sangre total recogidas de ratones en los días 34 y 47 (extremo del estudio) después de la infusión de células CAR T (FIG. 61A). Las presentes células CAR T humanas transducidas con la construcción 4M5.3 persistieron hasta 34 días después de la infusión en un ratón de control que no recibió ningún EC17, lo que sugiere que los ratones NSG portadores de tumores THP-1-FRβ fueron capaces de mantener la viabilidad de las células T humanas. En ratones portadores de células CAR-T THP1-FRβ infundidos que recibieron EC17 semanalmente, las células CAR T fueron notablemente persistentes en la sangre hasta 47 días después de la infusión, con un número que está en el intervalo de 3800 a 300.000 células CAR T por 100 µl de sangre (FIG. 61A), sin diferencia aparente con los animales de control. Curiosamente, el fenotipo de las células CAR T aisladas de los ratones que recibieron inyecciones semanales de EC17 fue principalmente el de un fenotipo de memoria central/memoria efector (FIG. 61B), mientras que las células CAR T del ratón que no recibió EC17, seguía teniendo el fenotipo de células T efectoras (FIG. 61B). Las células CAR T con fenotipo de memoria son un rasgo deseable para la terapia celular T, ya que las células T de memoria son capaces de seguir dividiéndose para dar lugar a futuras células T efectoras disponibles para destruir las células cancerosas.

Las células CAR T se localizan en las lesiones tumorales metastásicas y no en los tejidos sanos adyacentes

Aunque las células tumorales de AML se encuentran normalmente en la sangre y la médula ósea de los pacientes, en ocasiones, las células de AML pueden formar tumores sólidos en cualquier parte del cuerpo. El modelo tumoral THP-1-FRβ en ratones NSG se asemeja al de AML con células tumorales en la sangre y lesiones tumorales sólidas metastásicas en tejidos normales tales como ovarios, hígado, intestino delgado, cerebro y estómago. Dado que el tratamiento con EC17/CAR-T redujo significativamente la carga tumoral total (FIG. 56 y FIG. 57), se quiso evaluar la presencia de células CAR T dentro de los tumores residuales encontrados en los animales tratados con EC17 y estudiar la preferencia de las células CAR T por los tumores en relación con sus tejidos normales adyacentes en el mismo animal (FIG. 62). Dos animales que recibieron infusión de células CAR-T más 5 dosis semanales de EC17 (500 nmol/kg) se sacrificaron el día 47 después de la infusión de células T. Se encontraron tumores residuales en algunos órganos normales (por ejemplo, revestimiento del estómago, corazón, hígado y duodeno). Usando citometría de flujo en muestras digeridas, se analizó la presencia de células CAR T en metástasis visibles de tumores sólidos y se comparó la infiltración de células CAR T con la del tejido sano adyacente de los mismos animales donde se encontraron tumores. En un animal (ratón n.º 4), las células CAR T estaban presentes en mayor número en los tumores encontrados en el estómago y el corazón (FIG. 62A), pero no en los tejidos sanos adyacentes (FIG. 62A). También se observaron datos similares en otro animal (ratón n.º 10) en el que se encontraron tumores dentro del duodeno, sin embargo, la diferencia en el número de células CAR T entre el tumor hepático encontrado y el tejido hepático sano no era grande.

En un esfuerzo por medir cualquier actividad de las células CAR T dentro de los tumores, también se tiñó la superficie de las células CAR T para el marcador de actividad, CD25. Curiosamente se observaron niveles más altos de CD25 en las células CAR T de los tumores pero no en las células CAR T aisladas de tejidos sanos adyacentes (FIG. 62B). Tomados en conjunto (FIG. 62A y 62B) estos datos sugieren que las células CAR T pueden seguir a las células leucémicas hasta los tejidos sanos y atacarlas en los lugares metastásicos de formación del tumor, y siguen siendo activas 47 días después de la infusión. De manera importante, el ratón n.º 10 pertenecía al Grupo 3, que recibió fluoresceína sódica para rescatar de sCRS después de la primera dosis de EC17. Aunque se administró fluoresceína sódica a este animal, las células CAR T seguían presentes tanto en la sangre como en los tumores, sugiriendo que la funcionalidad de las células CAR T se preservó y que estas células CAR-T pueden ser reactivadas por EC17 contra dianas tumorales FR-positivas.

EJEMPLO 45

LOS CICLOS DE DESESCALADA DE DOSIS EC17 PUEDEN REDUCIR LA TOXICIDAD

Se investigó el efecto de la desescalada de dosis de EC17 sobre la actividad antitumoral y la toxicidad (cambios en el peso corporal) de la terapia CAR-T. Se descongelaron 8,5 millones de células CAR-T anti-FITC congeladas y se inyectaron i.v. en ratones portadores de tumores s.c. MDA-MB-231 (100-200 mm³). Se administró EC17 500 nmol/kg 2 días después de la inyección de CAR-T y provocó sCRS en ratones. Esos ratones se rescataron con éxito con 6 umol/kg de NaFL y, a continuación, se dividieron en dos grupos. El primer grupo recibió una dosis semanal de EC17 500 nmol/kg (SIW), mientras que al segundo grupo se le administraron dos ciclos de escalada EC17. Cada ciclo duró 2 semanas (14 días). El control estricto de posología en cada ciclo incluía EC17 5 nmol/kg el día 1, EC17 50 nmol/kg el día 3 y EC17 500 nmol/kg el día 5. Después de 9 días de descanso, comenzó el segundo ciclo de escalada. En la FIG. 70A se muestran los programas de dosificación del grupo de intensificación y del grupo de SIW. El tamaño de los tumores y el peso corporal se controlaron 2-3 veces por semana. Ambos grupos mostraron una respuesta similar a la

terapia CAR-T (FIG. 70B), mientras que la pérdida de peso corporal del grupo de escalada fue mucho menor que la del grupo EC17 SIW (FIG. 70C). Los datos sugieren que la desescalada de dosis de EC17 puede reducir la toxicidad manteniendo la actividad antitumoral de la terapia celular CAR-T.

5 EJEMPLO 46

LA TOXICIDAD RELACIONADA CON LA TERAPIA CAR-T Y EC17 SE CORRELACIONA CON EL TAMAÑO DEL TUMOR

- 10 Para explorar si la toxicidad relacionada con la terapia CAR-T depende de la carga tumoral, se implantaron s.c. ratones NSG con MDA-MB-231. Para este estudio se seleccionaron diez ratones con diferentes tamaños de tumor entre 150-900 mm³. Para las células CAR-T, se inyectaron i.v. 10,5 millones de células GFP+ FITC-CAR-T seguidas de la administración de 500 nmol/kg de EC17 48 horas después (FIG. 71A). Se comparó el peso corporal de los ratones entre antes de la inyección de CAR-T y 18 horas después de la administración de EC17. Como se muestra en la FIG. 15 71B, se demostró que los cambios en el peso corporal dependían del tamaño del tumor. Con mayor carga tumoral, los ratones perdieron más peso corporal después del tratamiento con CAR-T y EC17. Dieciocho horas después de la administración de EC17, los ratones mostraron un síndrome de liberación de citocinas de grado 2 y sus muestras de sangre se recogieron mediante cardiopunción. Las muestras de plasma se separaron inmediatamente y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis de los niveles de citocinas mediante un kit de detección de citocinas humanas (Biolegend). Como se muestra en la FIG. 71C, se demostró que la producción de IL-6 dependía del tamaño del tumor. Con mayor carga tumoral, se produjo más IL-6 después del tratamiento con CAR-T y EC17. Se ha informado ampliamente que la IL-6 es el biomarcador predictivo del síndrome de liberación grave de citocinas en pacientes humanos con tumores líquidos cuando son tratados con terapia CAR-T convencional. Estos datos sugieren que en la terapia CAR-T y EC17, la gravedad de CRS en ratones portadores de tumores sólidos también está correlacionada 25 con la carga tumoral.

EJEMPLO 47

EVALUACIÓN DE LA TERAPIA CON CÉLULAS T ANTI-FITC CONTROLADA POR EC17 EN UN MODELO DE OSTEOSARCOMA AGRESIVO

Materiales

- EC17 (folato-FITC, p.m. 873) se sintetizó en una instalación propia. La fluoresceína sódica (AK-FLUOR®, fluoresceína 35 inyectable, USP) se adquirió en Purdue Pharmacy.

Métodos *in vivo*

Línea celular

- 40 HOS-143b es una línea celular adquirida de ATCC (CRL-8303) que procede de una niña caucásica de 13 años con osteosarcoma. HOS-FRα es un subclon de HOS-143b transfectado de forma estable con un FRα humano. Las células se cultivaron en un medio RPMI1640 sin folatos (Gibco BRL) (FFRPMI) que contenía el 5-10 % de suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS) y se mantuvieron en una atmósfera con CO₂ al 5 % usando técnicas 45 convencionales de cultivo celular.

Ratones

- NSGTM hembra (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, n.º de artículo 005557) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) 50 y se usaron cuando alcanzaron ~4 semanas de edad. Los ratones se alimentaron con una dieta deficiente en folato (TestDiet, Louis, MO) el día de llegada.

Implantación de tumores

- 55 Se implantaron células HOS-FRα por vía subcutánea con 5 × 10⁵ por animal en 6 animales.

Preparación de células CAR-T

- Las células T GFP+ anti-FITC 4M5.3 scFv-CAR se prepararon como se describió anteriormente. Después de cultivarse 60 *in vitro* durante 12-20 días, se congelaron y almacenaron a -80 °C en un reactivo de congelación que contenía el 50 % de suero humano AB+ inactivado por calor, 40 % de medio de cultivo de células T y 10 % de DMSO. Las células CAR-T congeladas se descongelaron rápidamente a 37 °C, se lavaron dos veces con PBS y se usaron para inyección en animales.

Terapia EC17/CAR-T en ratones portadores de tumores

Como se muestra en la Figura 72A, a los 6 días de la implantación del tumor, todos los animales recibieron 10,5 millones de células CAR T por vía intravenosa (Día 0). Dos días después, los animales se dividieron en dos grupos ($n = 3$ para este estudio) y no recibieron tratamiento con EC17 o se les dosificó EC17 por vía intravenosa a 500 nmol/kg, una vez a la semana (SIW) durante 4-5 dosis. Un animal del grupo tratado con EC17 recibió otras dos dosis de EC17 a 50 y 100 nmol/kg los Días 40 y 42. Todas las dosis de EC17 se dieron hacia el final del día (~3-4 PM) para permitir que el síndrome de liberación de citocinas (CRS) se desarrollara durante la noche. El rescate con fluoresceína sódica se realizó según fuera necesario a 0,6 μ mol/kg. Solo el último animal dosificado con EC17 recibió fluoresceína sódica el día 47.

Análisis de células de sangre completa mediante citometría de flujo

El plasma se extrajo de volúmenes predeterminados de sangre total tratada con EDTA mediante un centrifugado a 4 °C durante 10 minutos a 3000 g y los gránulos celulares resultantes se incubaron con un volumen 10 veces mayor de solución de lisis 1X de RBC a temperatura ambiente [preparada a partir de una solución madre 10X; Biolegend, n.º de catálogo 420301] durante 5 minutos, se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y el sedimento celular se lavó en un volumen 10 veces mayor de solución salina tamponada con fosfato pH=7,4 helada, se filtró con un filtro de nailon de 40 μ m y, a continuación, se volvió a granular. A continuación los gránulos de leucocitos se resuspendieron en una solución de tinción para citometría de flujo [soroalbúmina bovina al 1 %, IgG humana 50 mg/ml (Equitech Bio, n.º de cat SLH56-0001), azida sódica al 0,9 % en una solución salina tamponada con fosfato, pH=7,4] suplementado con un bloque anti-receptor Fc γ III/II de ratón (CD16/CD32) [clon 2.4G2; BD Bioscience, n.º de catálogo 553142 a dilución 1:100 (v/v)] y bloque anti-Fc humano [BD Biosciences, n.º de catálogo 564220 en dilución 1:50 (v/v)]. La tinción de los marcadores de superficie leucocitaria se realizó añadiendo a cada muestra los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo durante 20 minutos en hielo y en la oscuridad: anti-CD45 humano-APCeF780 [clon HI30, eBioscience n.º 47-0459-42 en dilución 1:20 (v/v)], anti-CD137 humano-BV650 [clon 4B4-1, BD Bioscience n.º 564092 en dilución 1:20 (v/v)], anti-CD8 α humano-PECy7 [clon RPA-T8, BD Bioscience, n.º de catálogo 557746 en dilución 1:20 (v/v)], anti-CD4 humano-Perce710 [clon SK3, eBioscience n.º de catálogo 46-0047-42 en dilución 1:20 (v/v)]. Después de la tinción de leucocitos, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS frío que contenía 53.000 perlas CountBright™ [Invitrogen n.º de catálogo C36950] y se transfirieron a tubos de recogida de citometría de flujo. Los datos de citometría de flujo se recogieron en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA), donde se recogió un mínimo de 15.000 acontecimientos de perlas CountBright™ en un intento de recoger suficientes acontecimientos de leucocitos para un recuento preciso de las células CAR T infundidas en cada muestra de sangre de ratón. La determinación de la concentración de células CAR T en cada muestra de sangre se calculó siguiendo las instrucciones de Invitrogen. Brevemente, las células CAR T se identificaron como acontecimientos CD45+ humano GFP+ y se distinguieron y se contaron fácilmente usando el software de citometría de flujo Kaluza™. Las microesferas CountBright™ se marcaron uniformemente con un fluorocromo no usado en el panel de anticuerpos empleado para identificar las células CAR T y se distinguieron fácilmente de los leucocitos y se contaron los acontecimientos de las perlas. Debido a que se añadieron 53.000 perlas CountBright™ a cada tubo de muestra, se contó la relación entre el total de 53.000 perlas y los acontecimientos de perlas recogidos por muestra y se estableció la relación de perlas equivalente al número desconocido de células CAR T en cada muestra dividido por el número conocido de acontecimientos de células CAR T recogidos. La resolución de la incógnita proporcionó el número de células CAR T aisladas de cada muestra de sangre de volúmenes conocidos. A continuación el número de células CAR T en la circulación de cada ratón infundido se representó en los gráficos como el número total de células CAR T por 50 μ l de sangre total analizada.

Preparación de suspensiones unicelulares de tumor y tejido sano

Para el animal sacrificado el Día 47, se recolectaron sangre, tejidos normales (hígado, bazo y médula ósea) y un tumor subcutáneo y se picaron en trozos pequeños, a continuación se transfirieron a tubos de 50 ml que contenían 20 ml de un cóctel de digestión tumoral. El cóctel enzimático de digestión tumoral consistió en 0,5 mg/ml de colagenasa IV (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo C5138), Hialuronidasa 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, N.º de Catálogo H3506) y 0,1 mg/ml de DNasa I (Sigma-Aldrich, N.º de Catálogo DN25) en medio RPMI1640 libre de suero y deficiente en folato suplementado con antibióticos. Los fragmentos tumorales se digirieron durante una hora a 37 °C a 300 rpm en un agitador horizontal. En lo sucesivo, el digerido tumoral se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y los gránulos de células tumorales se incubaron con un volumen 10 veces mayor de solución de lisis 1X RBC a temperatura ambiente [preparada desde solución madre 10X; Biolegend, n.º de catálogo 420301] durante 5 minutos, se centrifugó a 400 g durante 5 min, el sedimento celular se lavó en un volumen 10 veces mayor de solución salina tamponada con fosfato pH=7,4 helada, se filtró con un filtro de nailon de 40 μ m y, a continuación, se volvió a granular. La expresión de FR α por las células tumorales se midió mediante tinción con anti FR α humano [clon LK26, Biolegend n.º de catálogo 908304 en dilución 1:20 (v/v)]. Las células tumorales se analizaron mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

Datos y resultados

El esquema del estudio se muestra en la Fig. 72A. El primer animal con tumor HOS-FR α del grupo tratado con EC17
 5 recibió 4 dosis semanales de EC17 a 500 nmol/kg, pero se le practicó la eutanasia el Día 28 por problemas
 neurológicos. El segundo animal del mismo grupo recibió 5 dosis semanales de EC17 a 500 nmol/kg, pero fue
 encontrado muerto el día 34. El último animal del mismo grupo recibió 5 dosis semanales de EC17 a 500 nmol/kg más
 dos dosis adicionales de EC17 a 50 y 100 nmol/kg los Días 40 y 42 respectivamente. Este animal recibió fluoresceína
 sódica el Día 47 y se sacrificó el Día 53. Todos los animales desarrollaron GVHD aproximadamente 5 semanas
 10 después de la administración de células CAR-T.

El volumen tumoral (FIG. 72B) y los cambios en el peso corporal (FIG. 73) se representaron gráficamente para cada
 animal individual. Las líneas continuas representan a ratones portadores de tumores HOS-FR α que recibieron
 únicamente células CAR-T. Las líneas discontinuas representan ratones HOS-FR α portadores de tumores que
 15 recibieron células CAR-T y tratamiento con EC17 como se ha descrito anteriormente. Las fechas de dosificación del
 EC17 se marcaron con líneas verticales discontinuas. Los volúmenes tumorales y los cambios en el peso corporal se
 monitorizaron 2-3 veces por semana. Mientras que un animal del grupo CAR-T solo fue encontrado muerto el Día 45
 sin razón aparente, los 3 animales de control con células CAR-T tenían sus tumores creciendo rápidamente una vez
 establecidos (FIG. 72B, líneas continuas). En cambio, los tumores de los 3 ratones dosificados con EC17 SIW a
 20 500 nmol/kg empezaron a reducirse en los Días 28 y 33 (FIG. 72B, líneas discontinuas). Aunque se perdieron
 2 animales en los Días 28 y 34 en el grupo tratado con EC17, el último animal del mismo grupo tratado tuvo un
 crecimiento tumoral más retardado y respondió adicionalmente al tratamiento con dosis bajas de EC17. Los cambios
 en el peso corporal de estos animales (FIG. 73) sugerían que CRS era grave una vez que los tumores alcanzaban
 >200 mm³ en los animales tratados con EC17. El CRS acoplado a GVHD grave fueron probablemente las razones de
 25 la toxicidad y mortalidad observadas en estos animales.

El análisis de citometría de flujo se realizó en el último animal que se recogió el Día 47. Como se muestra en la FIG.
 74A-F, las células cancerosas HOS se identificaron como positivas para la tinción anti FR α humano [clon LK26]. Las
 células cancerosas HOS-FR α no eran detectables en los tejidos normales analizados y solo lo eran en el tumor sólido
 30 subcutáneo. Además, estos datos confirmaron la continua expresión superficial de FR α en las células tumorales HOS-
 FR α *in-vivo* después del tratamiento con EC17/CAR-T.

EJEMPLO 48

35 EL RESCATE CON FLUORESCÉINA SÓDICA (NAFL) PUEDE REDUCIR LA PRODUCCIÓN DE MCP-1, IL-6 E IL-10 DEL HOSPEDADOR QUE ESTÁN RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DEL SÍNDROME GRAVE DE LIBERACIÓN DE CITOCINAS

Se ha informado que niveles altos de MCP-1, IL-6 e IL-10 son predictores del síndrome de liberación de citocinas
 40 (CRS) después de la terapia con células CAR-T para diversos tumores líquidos. La producción de estas citocinas no
 solo se produce en las células CAR-T humanas, sino también en las células inmunitarias del hospedador incluyendo
 monocitos, macrófagos y células dendríticas. También se ha informado de que estas citocinas participan en la
 activación anómala de los macrófagos e impulsan el desarrollo de CRS en pacientes tratados con células CAR-T. La
 reducción de estas citocinas (por ejemplo IL-6 y MCP-1) ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de CRS en la
 45 terapia CAR-T. Aunque los ratones NSG son inmunodeficientes, las células dendríticas y los macrófagos del ratón
 siguen siendo parcialmente funcionales. Para evaluar si la terapia CAR-T/EC17 puede inducir la producción de estas
 citocinas del hospedador en ratones NSG y para estudiar también si el rescate con NaFL puede reducir la producción
 de estas citocinas del ratón hospedador, se usaron ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231.

50 En la primera parte del estudio (FIG. 75), los ratones se trataron con células EC17 y FITC-CAR-T. Cuando los ratones
 empezaron a mostrar sCRS, se inyectó una dosis de 60 μ mol/kg de NaFL para rescate. A continuación se recogieron
 muestras de sangre de ratones a las 7 horas y a las 27 horas después del rescate con NaFL. Los niveles de citocinas
 de ratón en sangre se analizaron usando un kit de panel de inflamación de ratón (n.º de Cat. 740446) de BioLegend
 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las FIG. 76 A-E muestran los niveles de citocinas 7 horas después del
 55 rescate. Las FIG. 77A-C muestran los niveles de citocinas 27 horas después del rescate. En resumen, los ratones
 administrados con CAR-T pero sin EC17 tenían un nivel muy bajo de citocinas de ratón en su sangre, mientras que
 los ratones dosificados con EC17 tenían mayores niveles de citocinas de ratón en su sangre, incluyendo MCP-1, IL-
 6, IL-10, IFN- β y TNF- α . Más importante aún, los niveles de citocinas de ratón en los ratones rescatados con
 60 60 μ mol/kg de fluoresceína sódica eran mucho más bajos que los de los ratones no rescatados (tanto a 7 horas como
 27 horas después del rescate).

En la segunda parte del estudio, se probó la eficacia de rescate de una serie de concentraciones de NaFL (FIG. 78).
 Como se muestra en las FIG. 79-81, los niveles de citocinas de ratón en sangre también dependían de las

concentraciones de fluoresceína sódica usadas para el rescate, y la dosis media eficaz es de aproximadamente 0,6 $\mu\text{mol/kg}$ con citocinas probadas (por ejemplo MCP-1, IL-6 e IL-10) y los ratones empezaron a responder a partir de las 3 horas posteriores al rescate.

- 5 En conclusión, la terapia CAR-T/EC17 puede inducir una elevada producción de citocinas en los ratones, y una dosis de rescate de NaFL puede reducir la producción de estas citocinas en los ratones relacionadas con CRS y mejorar la condición general de los ratones.

EJEMPLO 49

10

LA PRODUCCIÓN DE MCP-1 EN RATONES ESTÁ CORRELACIONADA CON EL NÚMERO DE CÉLULAS CAR-T

- La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) es una molécula de quimiocina que es quimiotáctica para los monocitos/macrófagos. Se ha informado de que un nivel elevado de MCP-1 es un biomarcador predictivo del síndrome de liberación de citocinas después de la terapia con células CAR-T para diversos tumores líquidos incluyendo leucemia linfoblástica aguda. Aunque los ratones NSG son inmunodeficientes, las funciones de las células dentarias y los macrófagos son defectuosas, pero no se eliminan totalmente. Para evaluar si la terapia CAR-T/EC17 puede inducir la producción de MCP-1 de ratón en el ratón NSG, y estudiar si la producción de MCP-1 de ratón está correlacionada con el número de CAR-T en ratones, los ratones NSG portadores de tumores MDA-MB-231 (250-500 mm^3) se dividieron en tres grupos y se les administraron 500 nmol/kg de peso corporal de EC17 y diferentes cantidades de células CAR-T (2, 5 o 12,5 millones respectivamente), como se muestra en la FIG. 82A. Dos días después de la segunda dosis de EC17, se recogieron muestras de sangre de ratón y se analizó la producción de MCP-1 de ratón en sangre usando un kit de panel de inflamación de ratón (n.º de Cat. 740446) de BioLegend. Como se muestra en la FIG. 82B, MCP-1 de ratón se correlaciona con el número de células CAR-T administradas. En conclusión, con el aumento de células CAR-T, también aumenta la producción de MCP-1 de ratón, principalmente debido al alto nivel de citocinas humanas liberadas por las células CAR-T humanas activas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto comprende un ligando de molécula pequeña enlazado a una fracción de direccionamiento mediante un enlazador, en donde el ligando de molécula pequeña es un folato y la fracción de direccionamiento es FITC y una composición de células CAR T que comprende células CAR T en donde las células CAR T comprenden un CAR dirigido a la fracción de direccionamiento para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es un cáncer que expresa receptor de folato, comprendiendo el método administrar a un paciente al menos una primera dosis y una segunda dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la primera dosis y la segunda dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos una primera dosis, una segunda dosis y una tercera dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis y la tercera dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la tercera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos una primera dosis, una segunda dosis, una tercera dosis y una cuarta dosis del compuesto, o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administran al paciente, en donde la primera dosis, la segunda dosis, la tercera dosis y la cuarta dosis son diferentes, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 2 veces a 750 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 800 veces a 7500 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es de 8000 a 15000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la segunda dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 100 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la tercera dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 1000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde la cuarta dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es 10000 veces mayor en cantidad que la primera dosis del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
5. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, melanoma cutáneo, melanoma intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, cáncer de la uretra, cáncer de próstata, leucemia crónica, leucemia aguda, leucemia mielocítica aguda, linfoma linfocítico, leucemia mieloide, leucemia mielomonocítica, tricoleucemia, mesotelioma pleural, cáncer de la vejiga, linfoma de Burkitt, cáncer del uréter, cáncer del riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica.
6. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el CAR tiene una región de reconocimiento y la región de reconocimiento es una región variable de fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo anti-FITC, en donde el CAR tiene un dominio de coestimulación y el dominio de coestimulación es CD137 (4-1 BB), y en donde el CAR tiene un dominio de señalización de activación y el dominio de señalización de activación es una cadena CD3ζ de células T.

7. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no es un anticuerpo y no comprende un fragmento de un anticuerpo.

5 8. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra continuamente al paciente y el método comprende además finalizar la administración continua del compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir o impedir el síndrome de liberación de citocinas en el paciente.

10

9. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprende además administrar al paciente un folato, un conjugado que comprende un folato en donde el conjugado que comprende un folato no comprende una fracción de direccionamiento, o un agente que inhibe la activación de las células CAR T.

15

10. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra una vez a la semana al paciente.

20

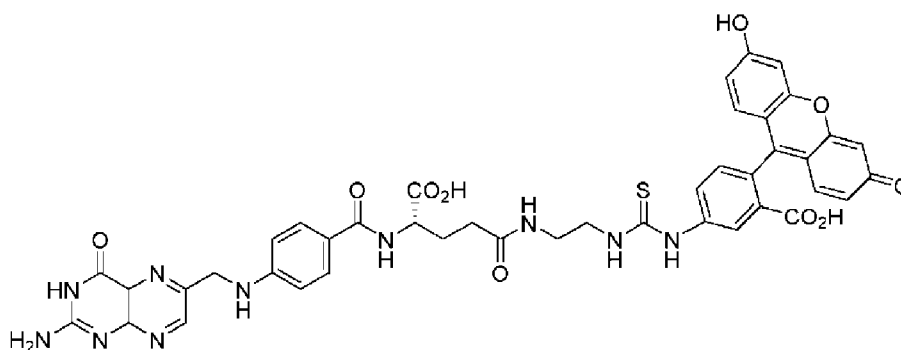
11. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la composición de células CAR T se administra en al menos dos dosis.

25

12. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el agente que inhibe la activación de las células CAR T es fluoresceína sódica.

30

13. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la composición de células CAR T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el compuesto tiene la fórmula



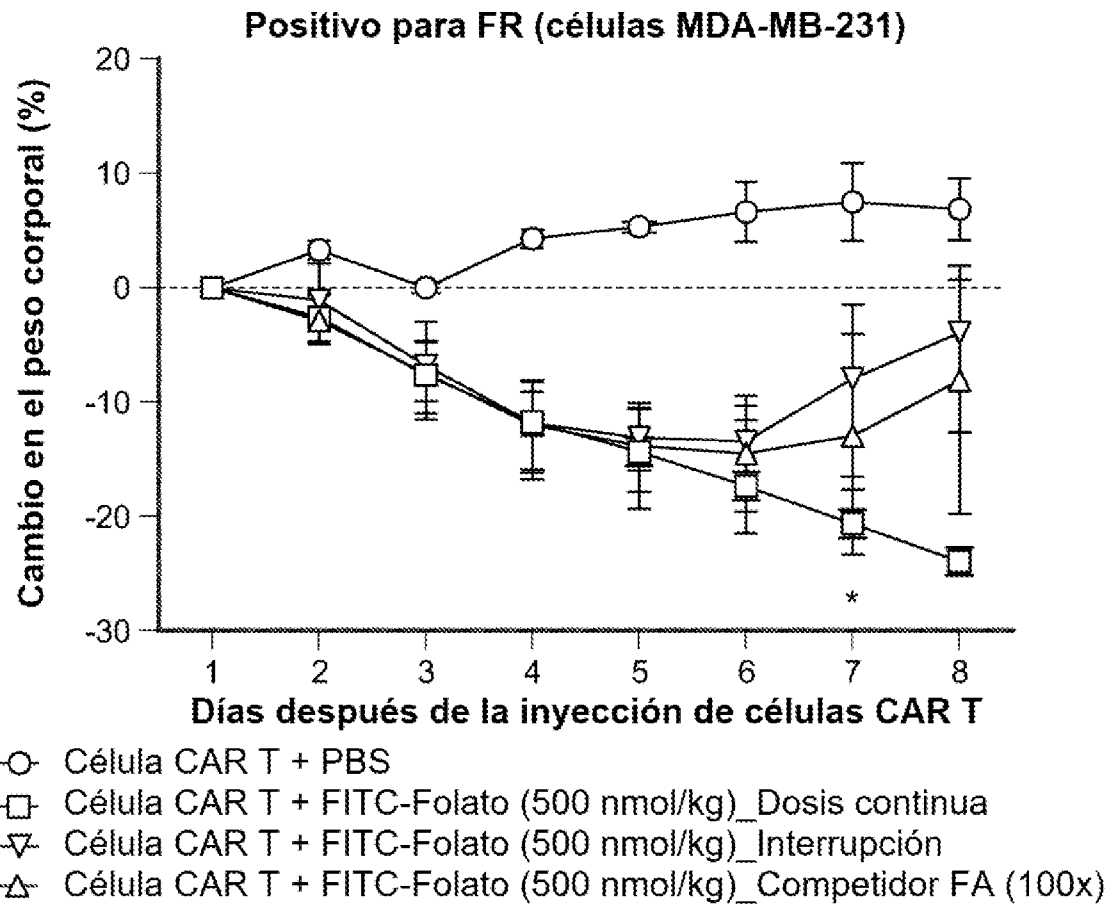


FIG. 1A

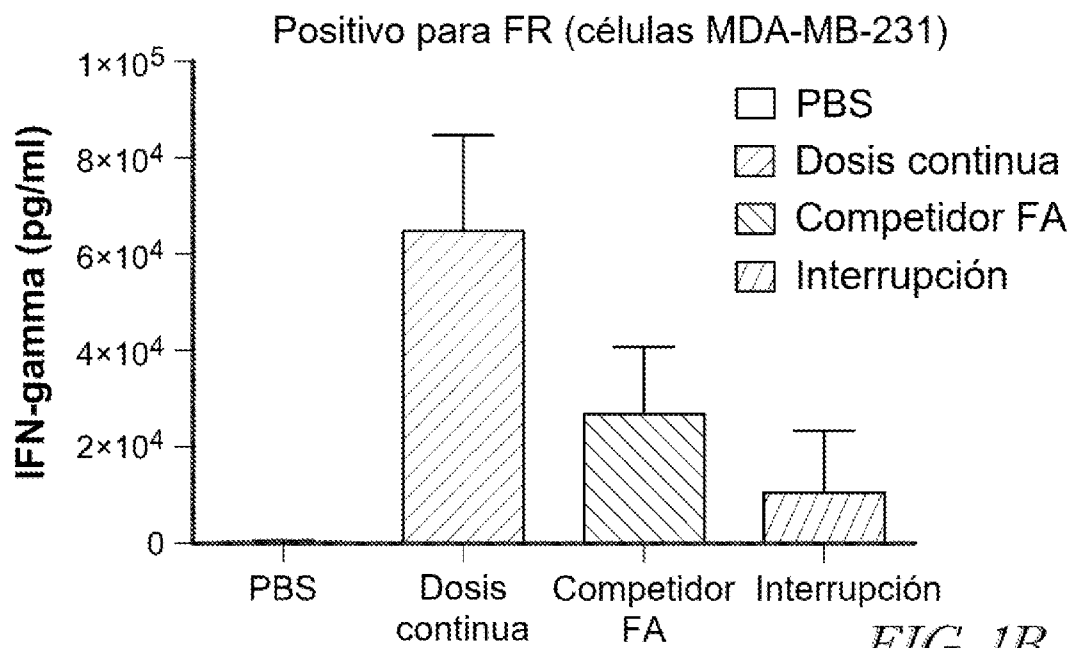
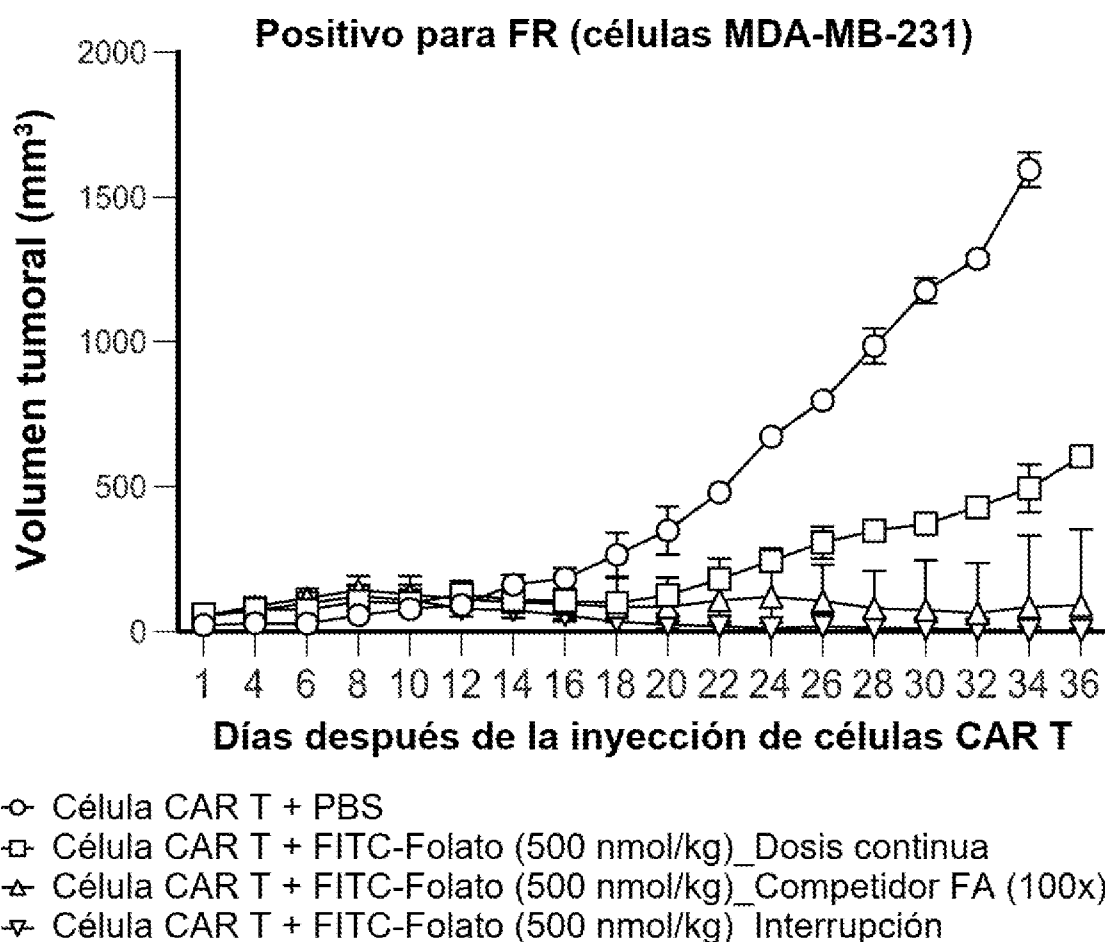


FIG. 1B

Porcentaje de supervivencia en la primera semana de tratamiento				
	PBS	FITC-FA (500 nmol/kg)		
		Continua	Competidor FA (100x)	Interrupción
%	100(5/5)	40 (2/5)	100 (5/5)	100 (5/5)

FIG. 1C

*FIG. 2A*

Resultado final de respuesta tumoral				
%	PBS	Interrupción	Competidor FA	Dosis continua
Respuesta completa	–	100 (5/5)	75 (3/4)	
Enfermedad estable	–	–	25 (1/4)	
Respuesta parcial	–	–	–	100 (2/2)
Sin respuesta	100 (5/5)	–	–	–

FIG. 2B

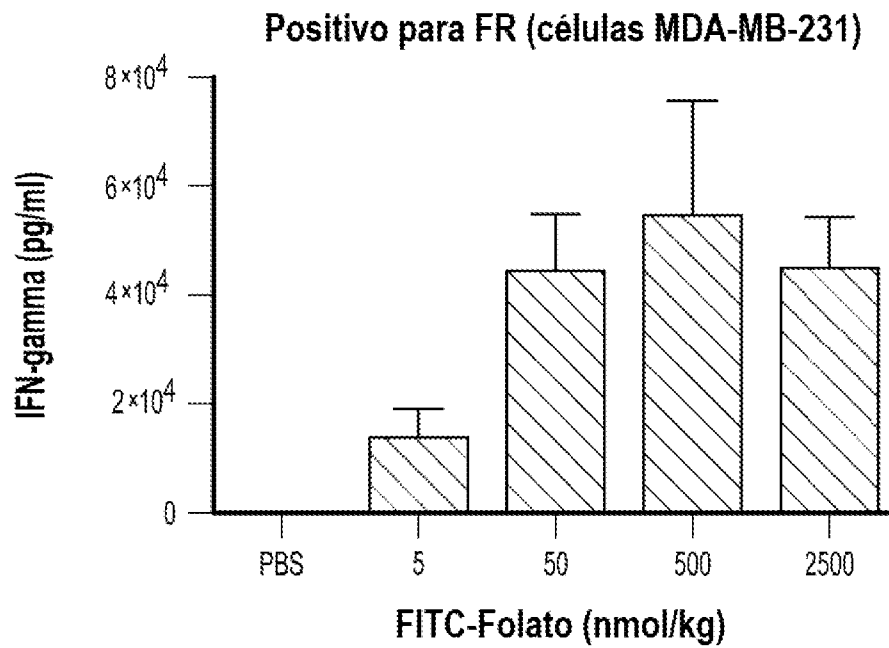
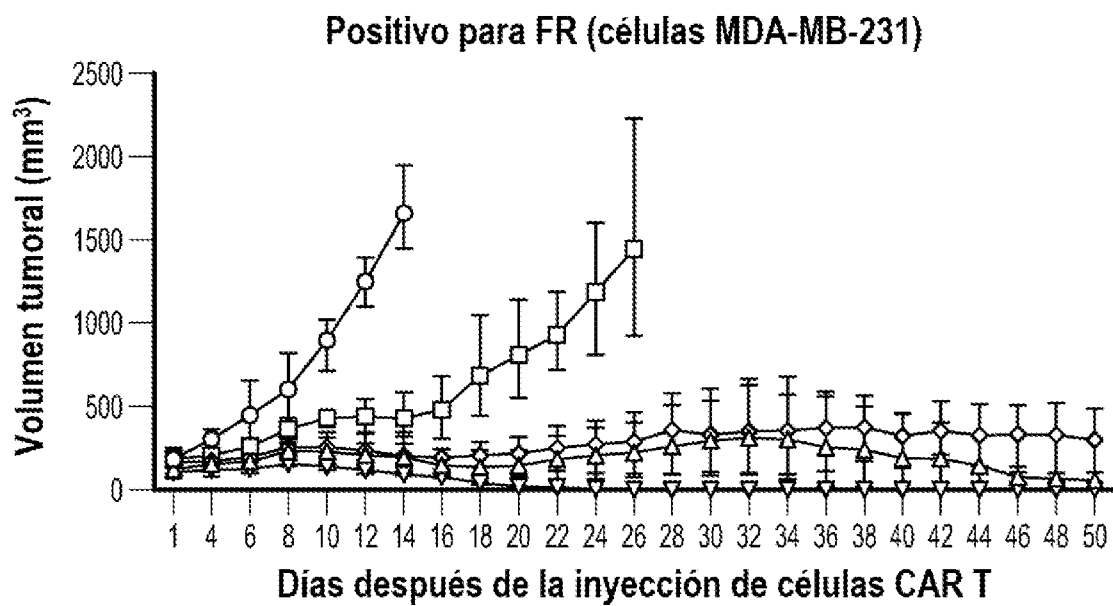


FIG. 3A



- ◇ Célula CAR T + FITC-Folato (2500 nmol/kg)
- ▼ Célula CAR T + FITC-Folato (500 nmol/kg)
- ▲ Célula CAR T + FITC-Folato (50 nmol/kg)
- Célula CAR T + FITC-Folato (5 nmol/kg)
- Célula CAR T + PBS

FIG. 3B

Porcentaje de supervivencia en la primera semana de tratamiento					
	PBS	FITC-FA (nmol/kg)			
		5	50	500	2500
%	100 (5/5)	100 (5/5)	60 (3/5)	40 (2/5)	80 (4/5)

FIG. 3C

Resultado final de respuesta tumoral					
%	PBS	FITC-FA (nmol/kg)			
		5	50	500	2500
Respuesta completa	0	0	33,3 (1/3)	100 (2/2)	0
Enfermedad estable	0	0	67,7 (2/3)	0	100 (4/5)
Respuesta parcial	0	100 (5/5)	0	0	0
Sin respuesta	100 (5/5)	0	0	0	0

FIG. 3D

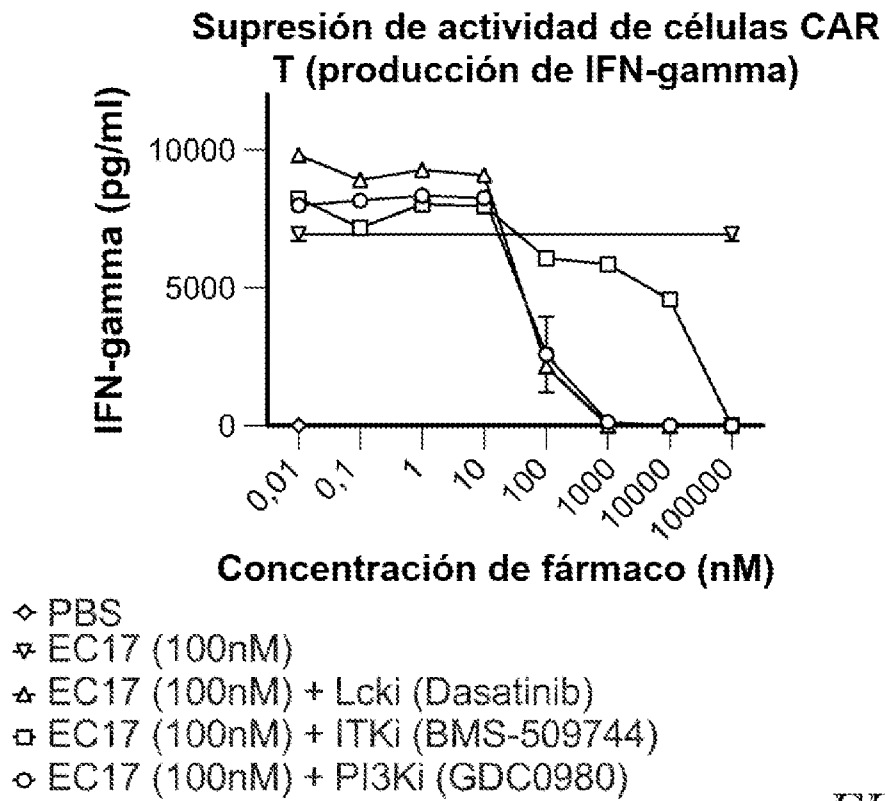


FIG. 4A

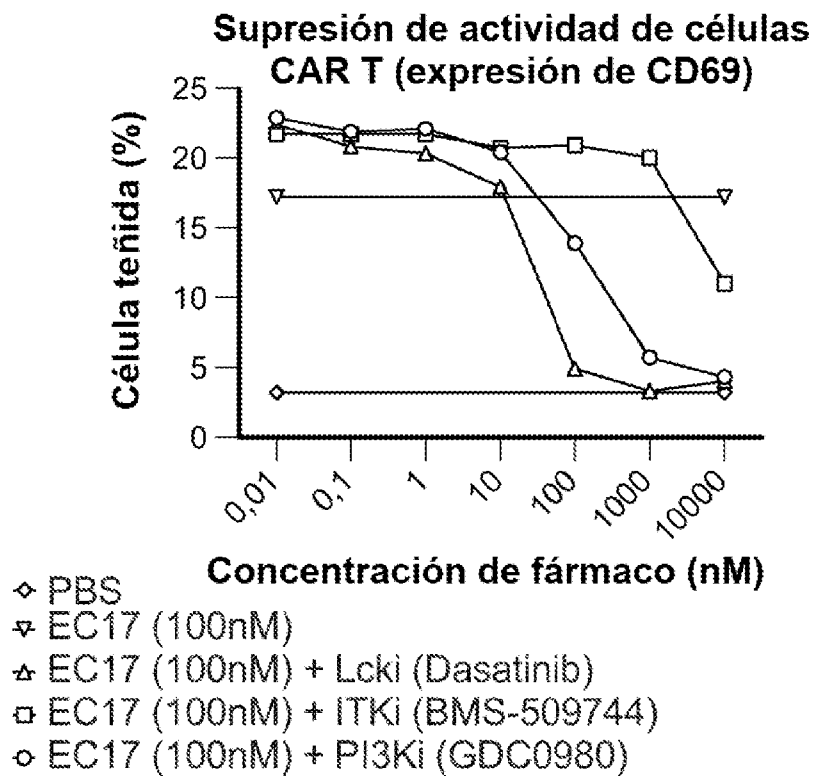
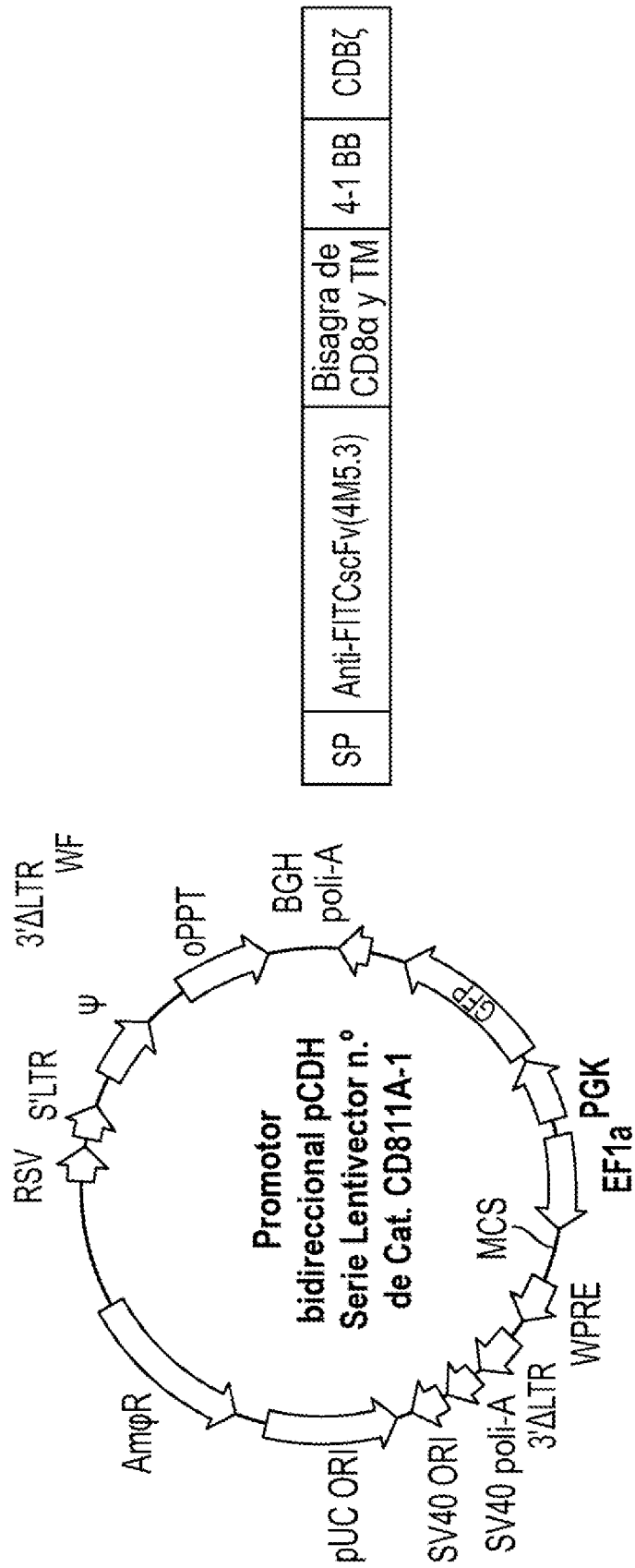
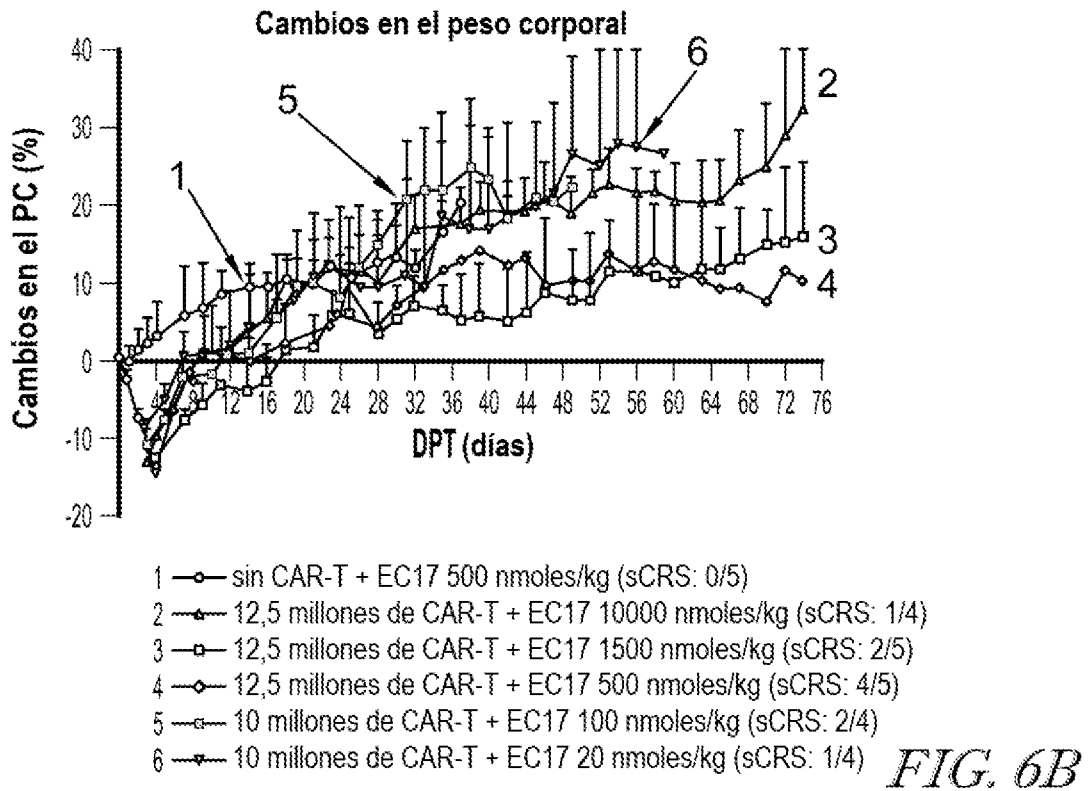
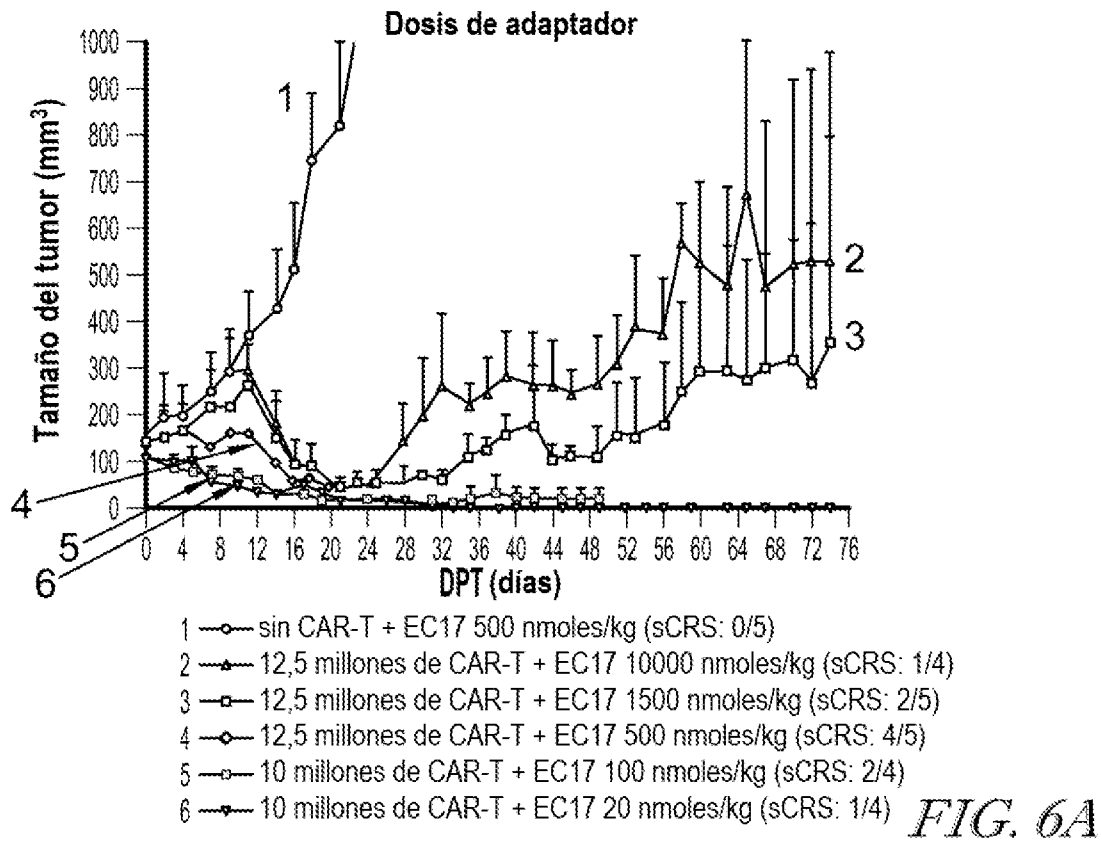


FIG. 4B



SP	Anti-FITCscFv(4M5.3)	Bisagra de CD8α y TM	4-1 BB	CDBζ
----	----------------------	----------------------	--------	------

FIG. 5



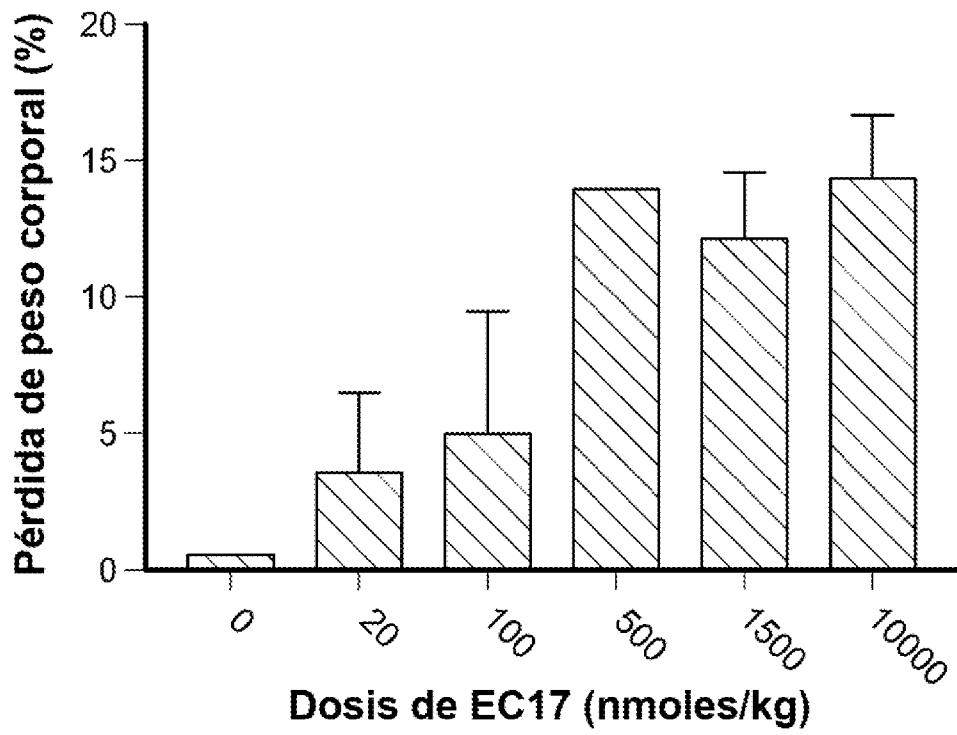


FIG. 6C

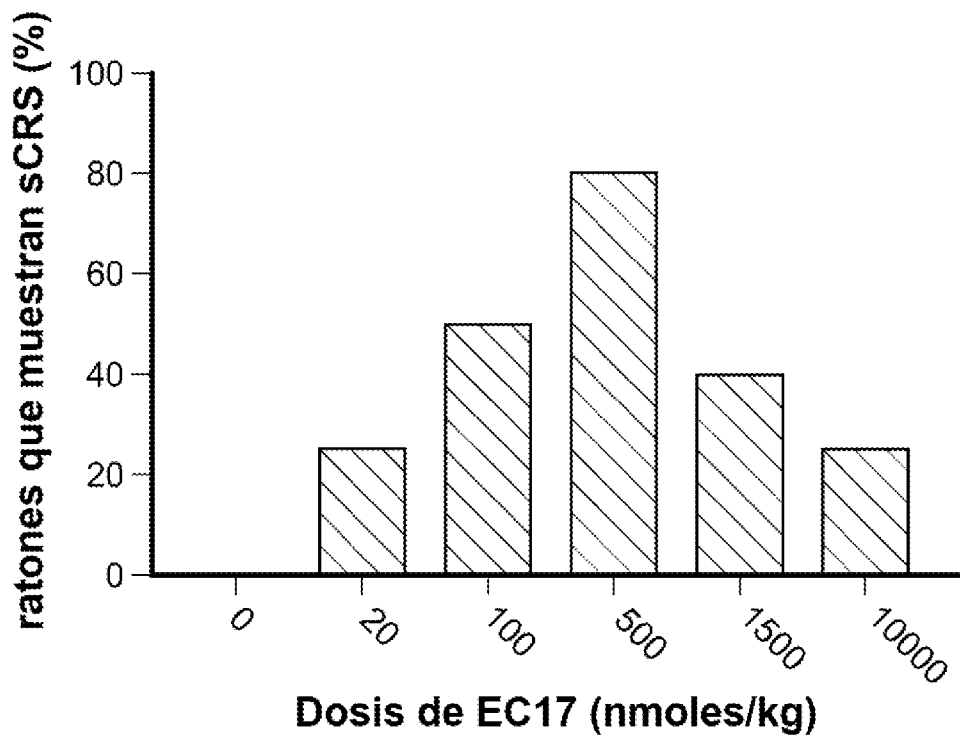


FIG. 6D

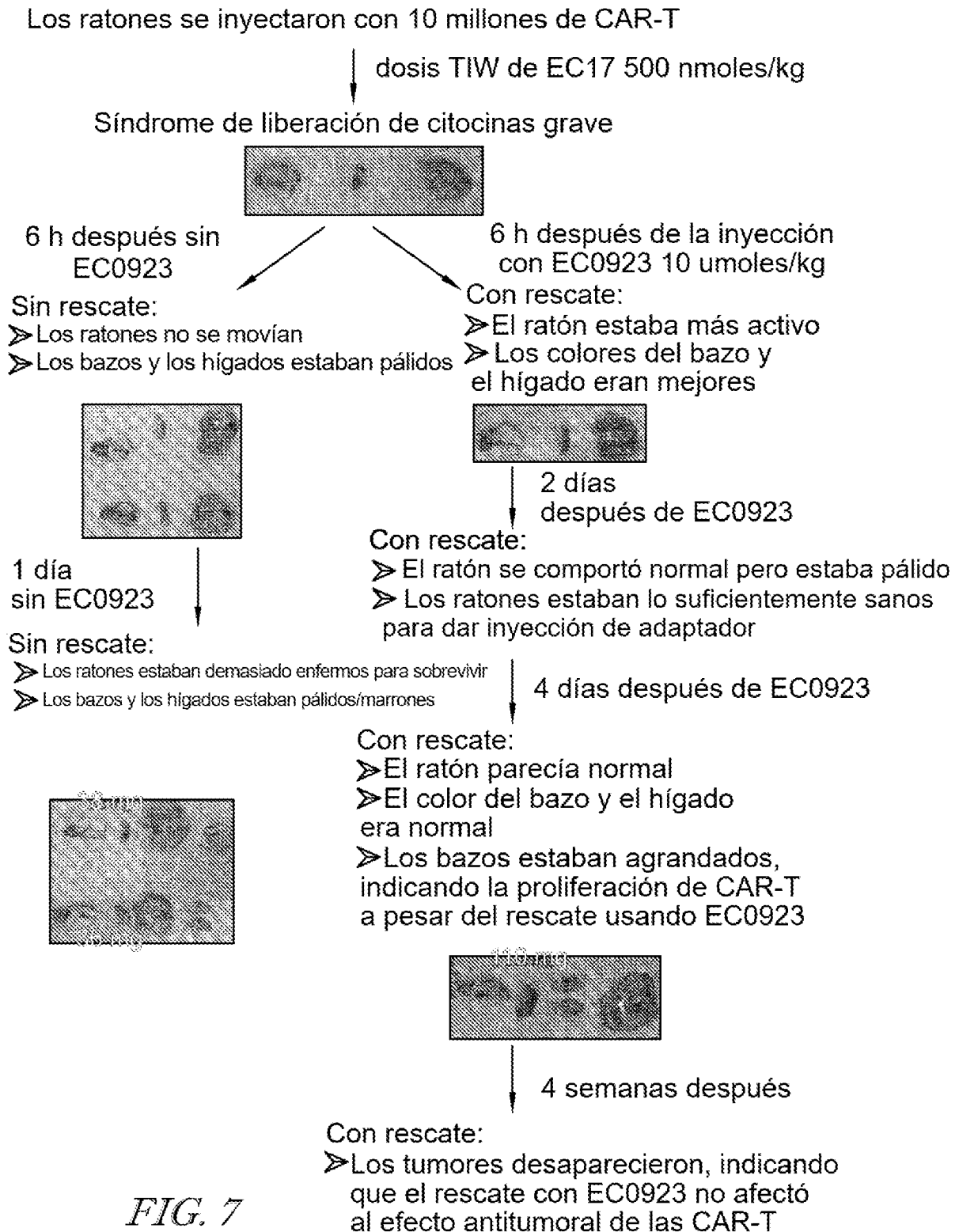


FIG. 7

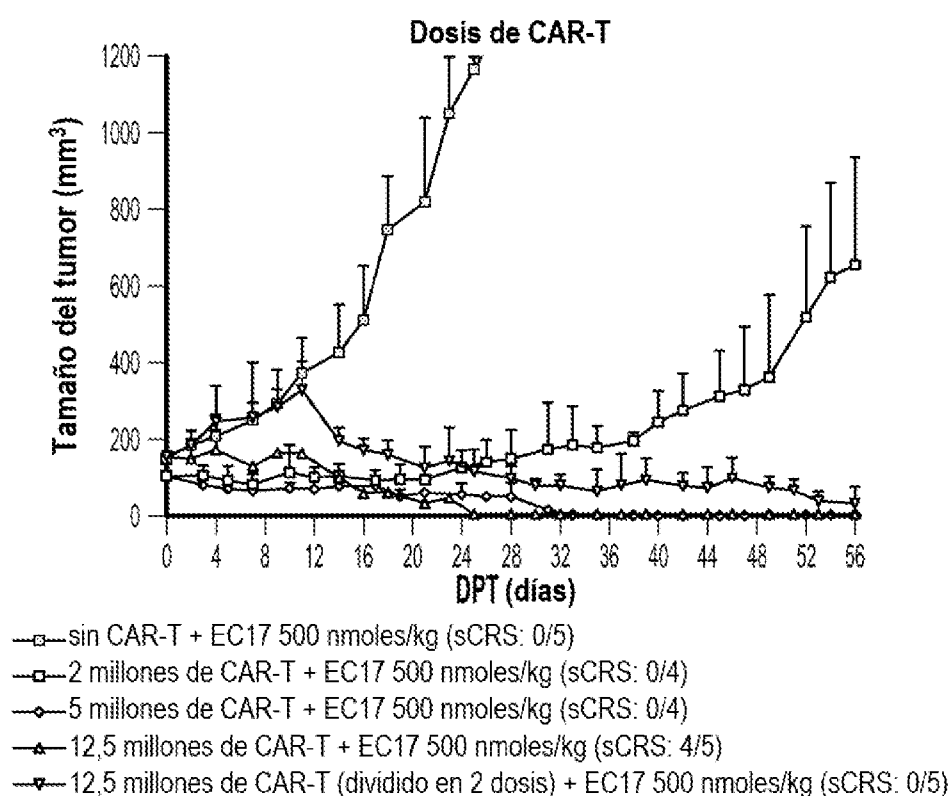


FIG. 8A

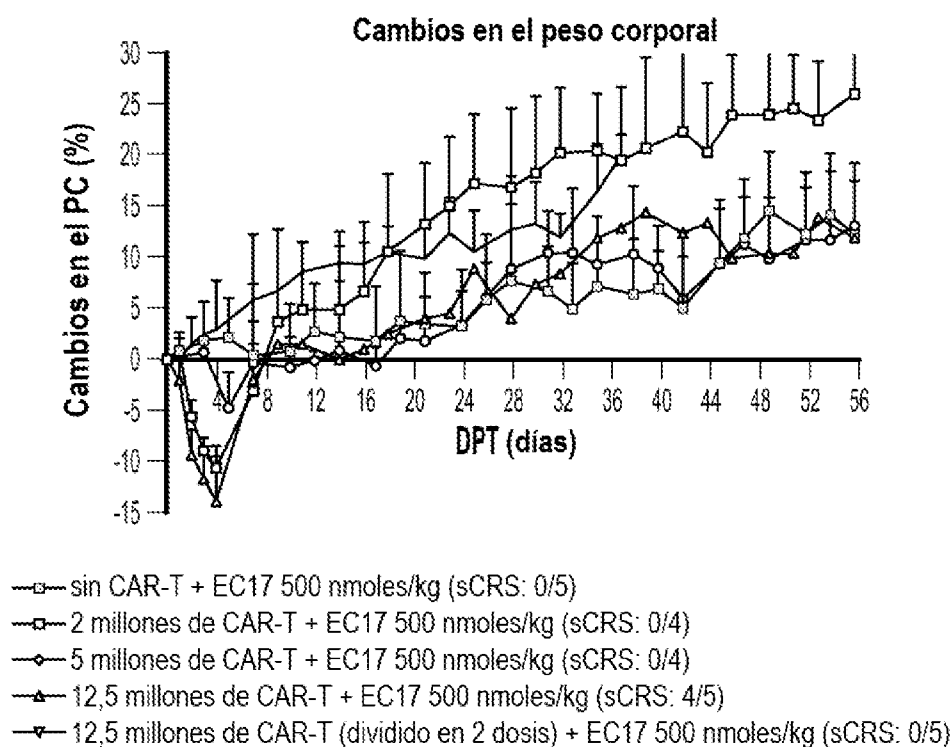


FIG. 8B

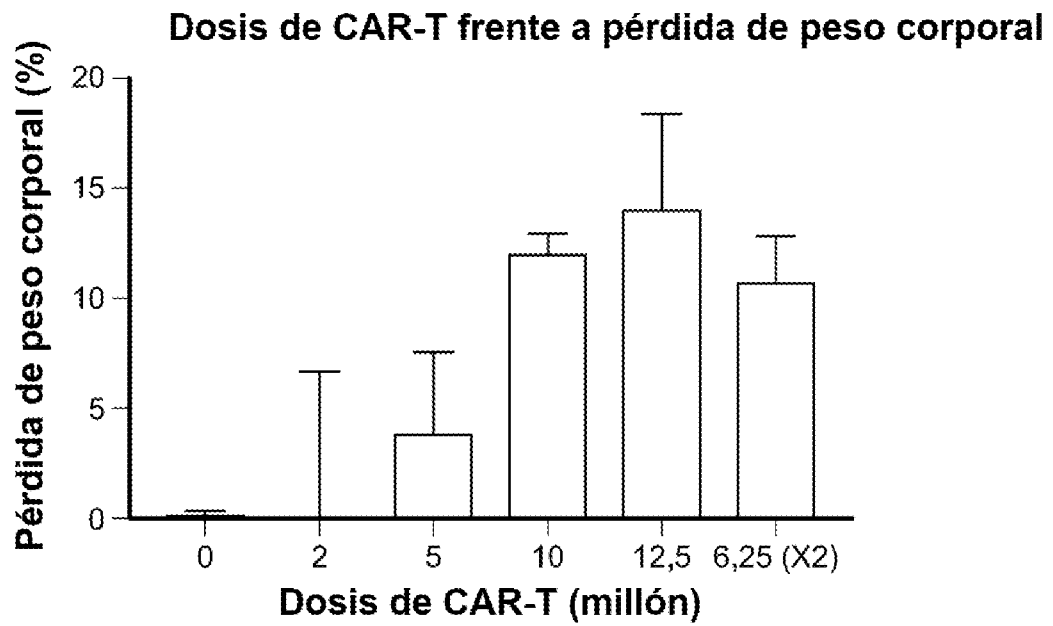


FIG. 8C

Dosis de CAR-T frente a Síndrome de liberación de citocinas grave

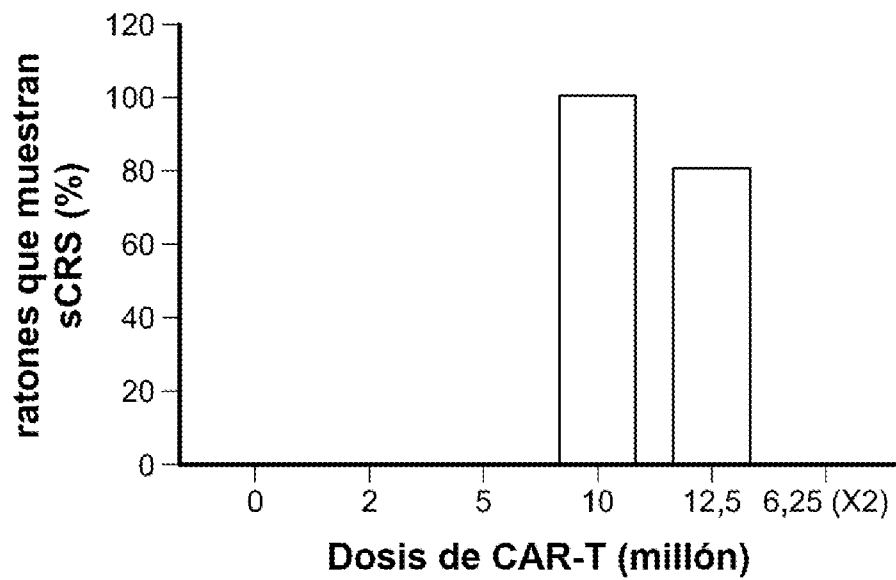


FIG. 8D

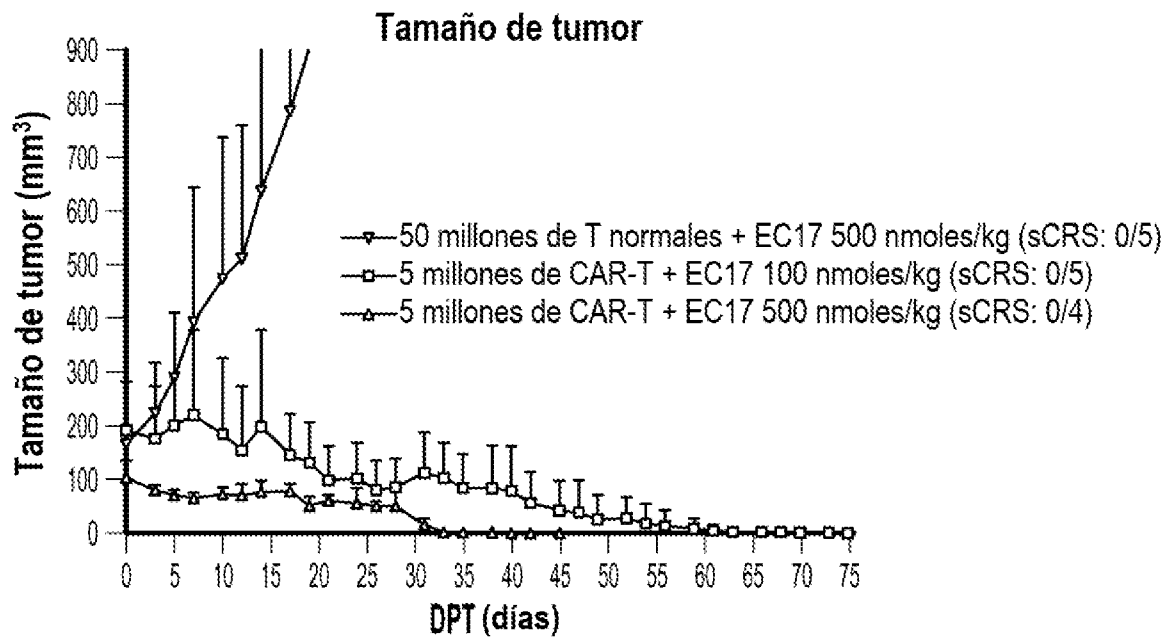


FIG. 9A

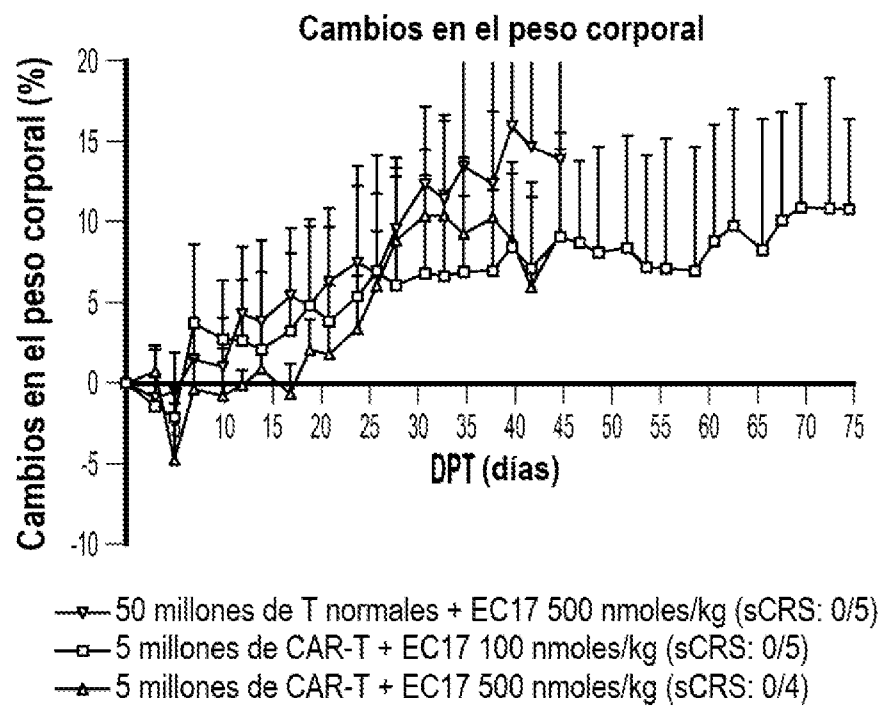
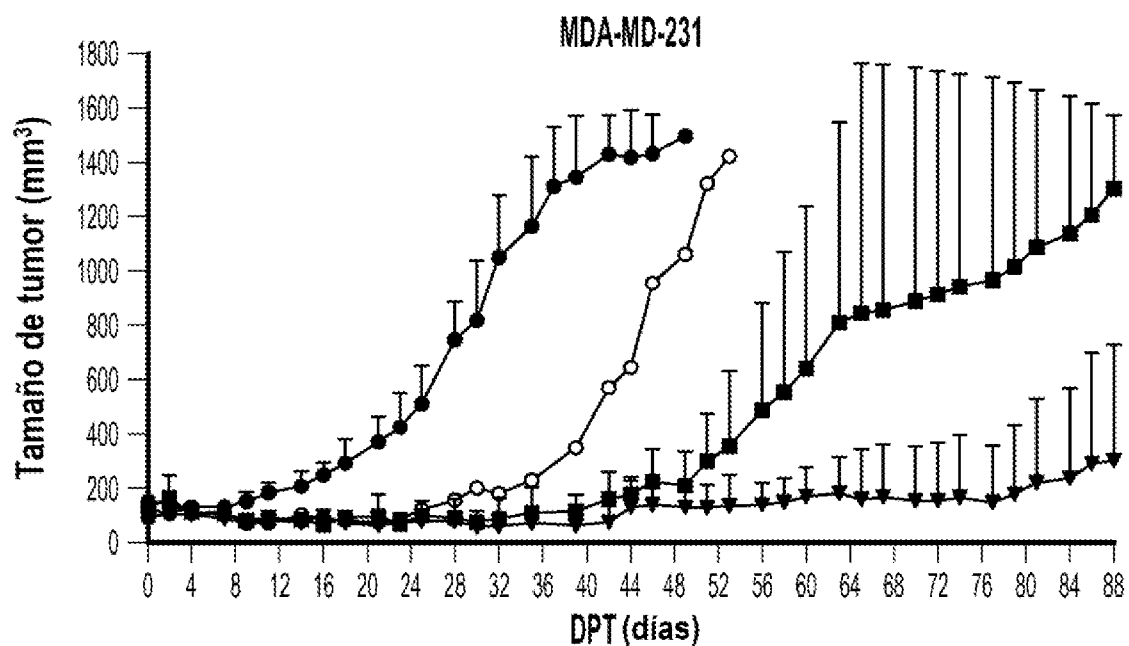
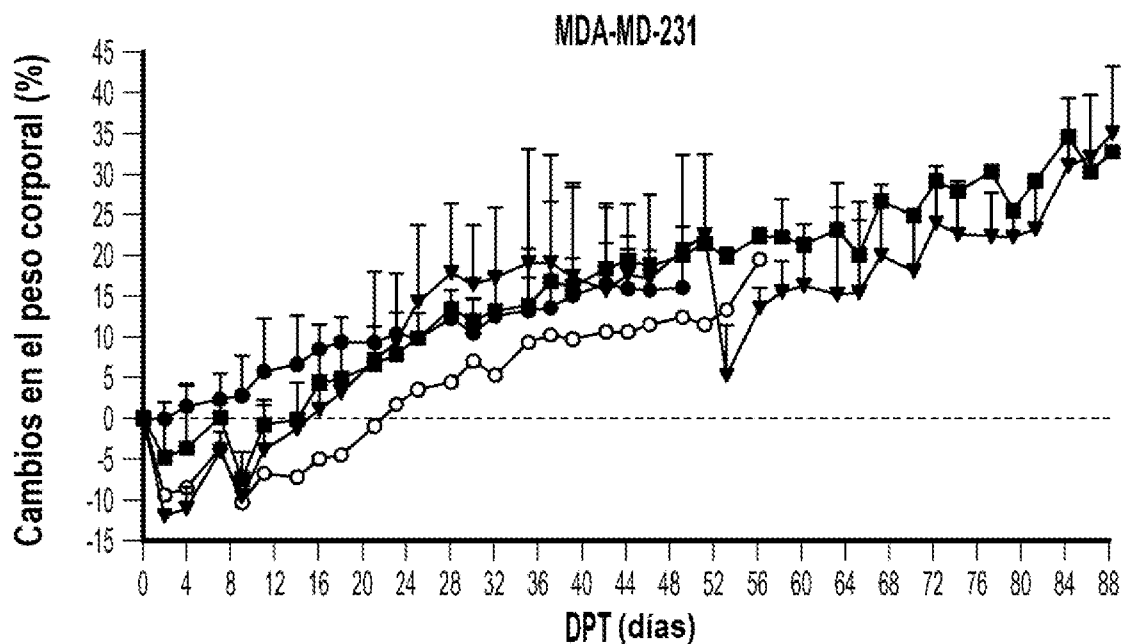


FIG. 9B



sin CAR-T
 CAR-T el Día 0
 CAR-T el Día 0, T no modificados el Día 52
 CAR-T el Día 0, el Día 46, el Día 52

FIG. 10A



sin CAR-T
 CAR-T el Día 0
 CAR-T el Día 0, T no modificados el Día 52
 CAR-T el Día 0, el Día 46, el Día 52

FIG. 10B

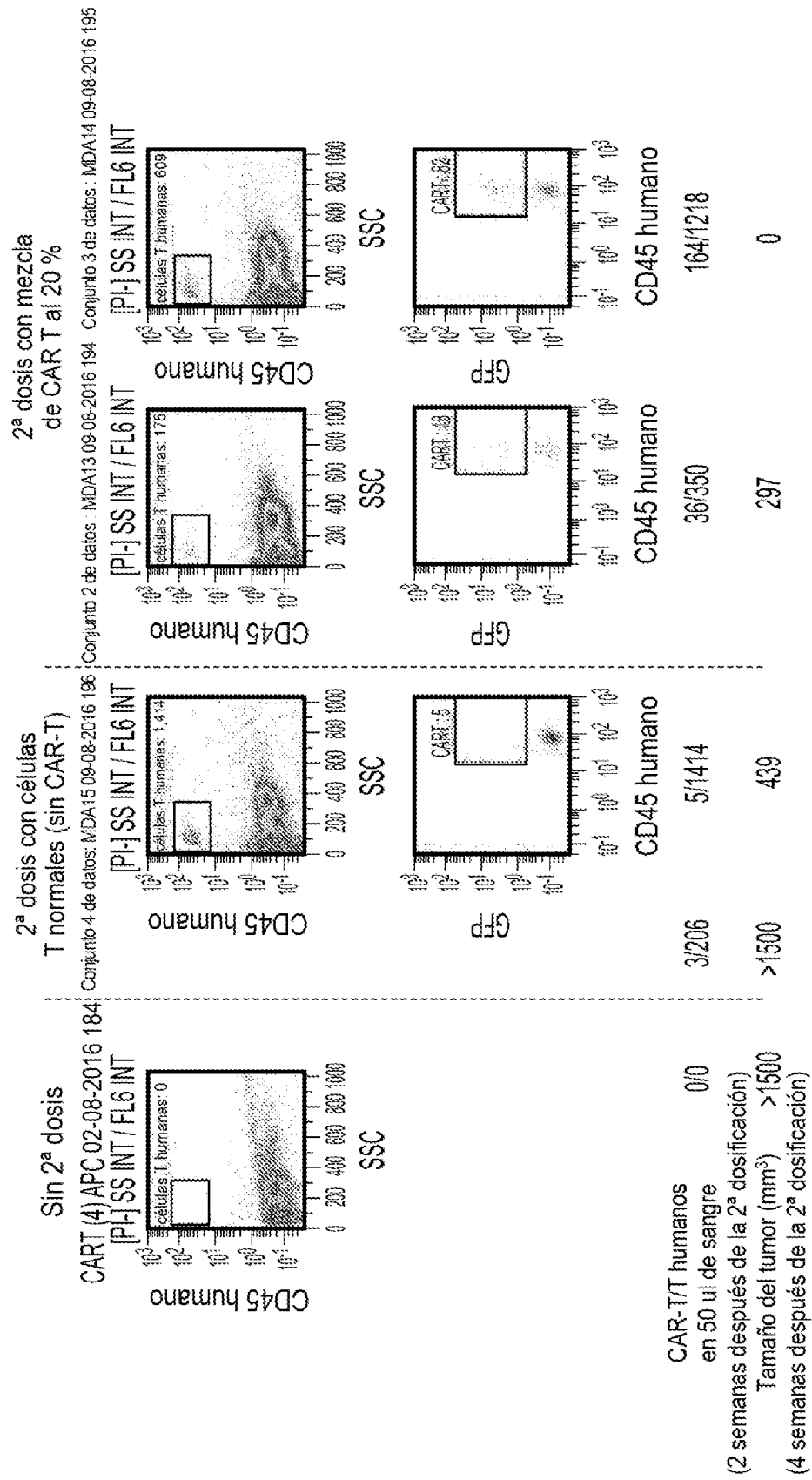


FIG. 10C

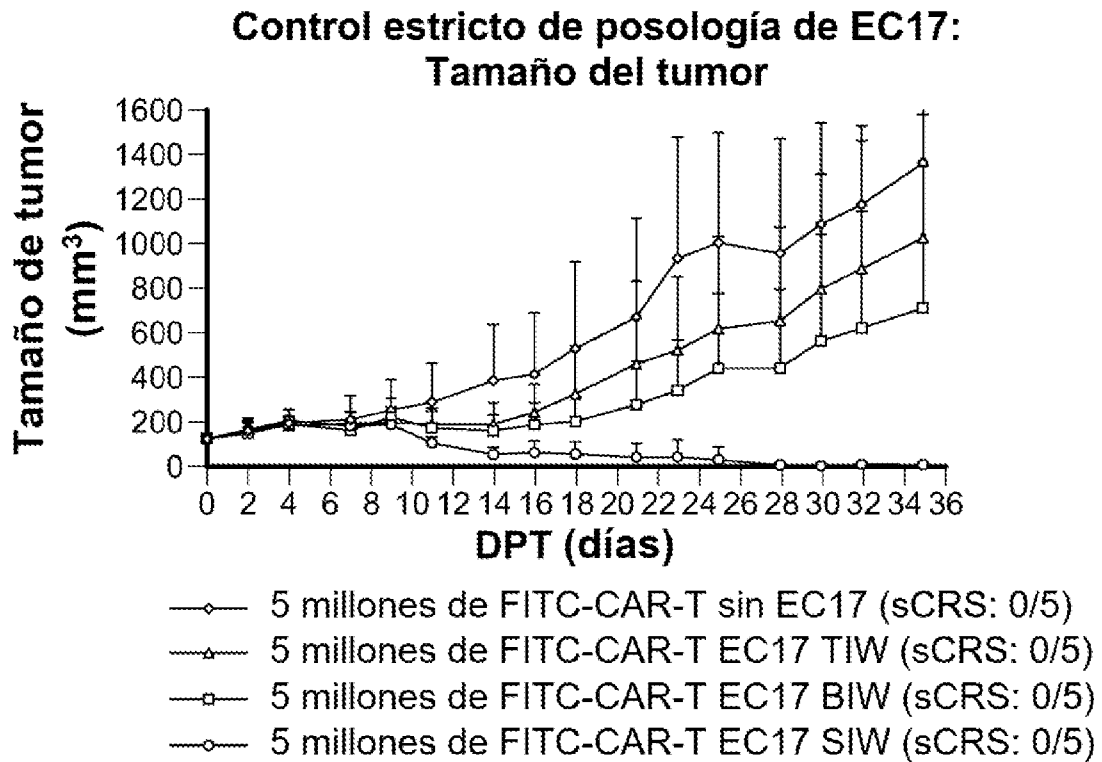


FIG. 11A

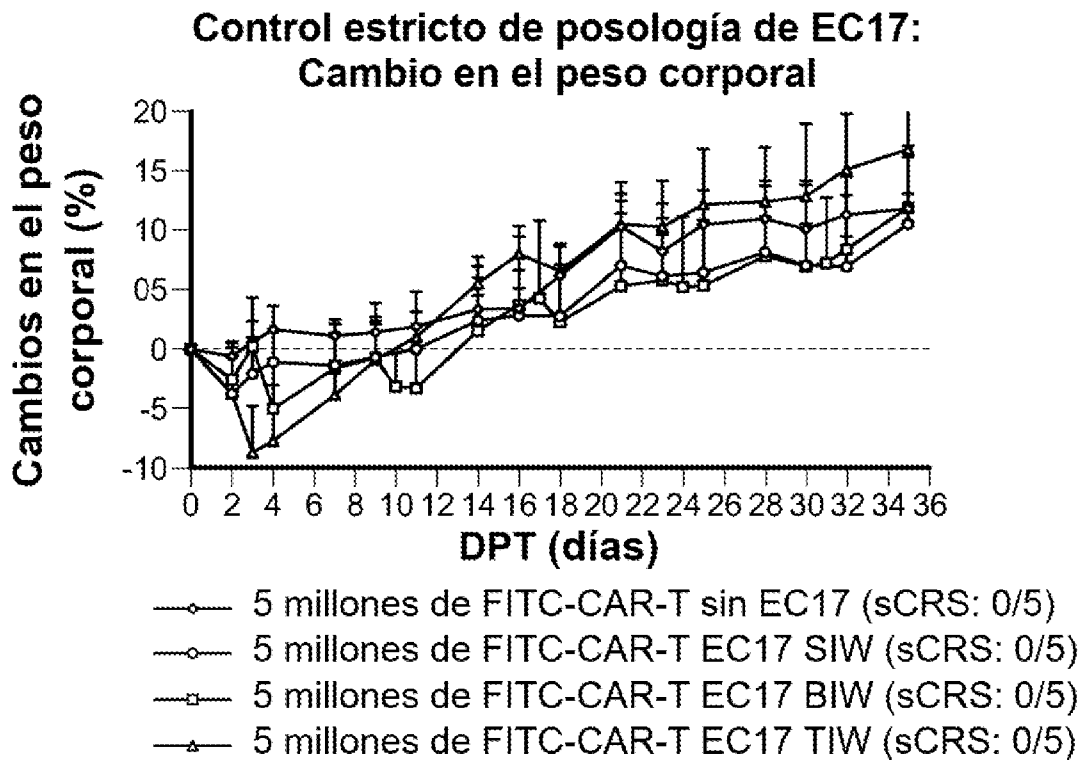
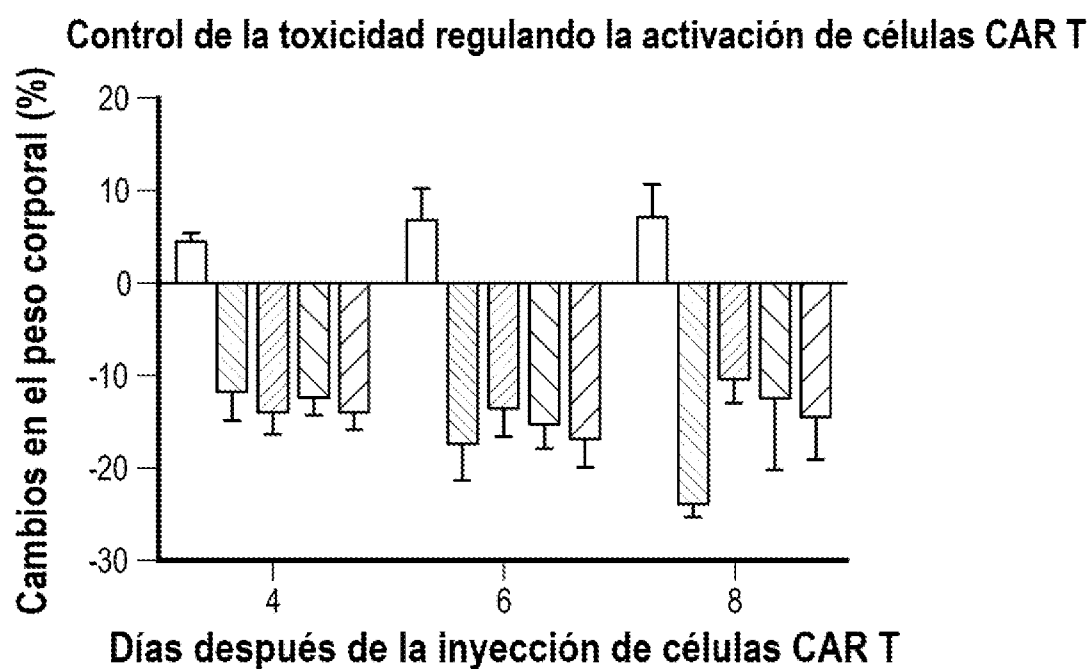


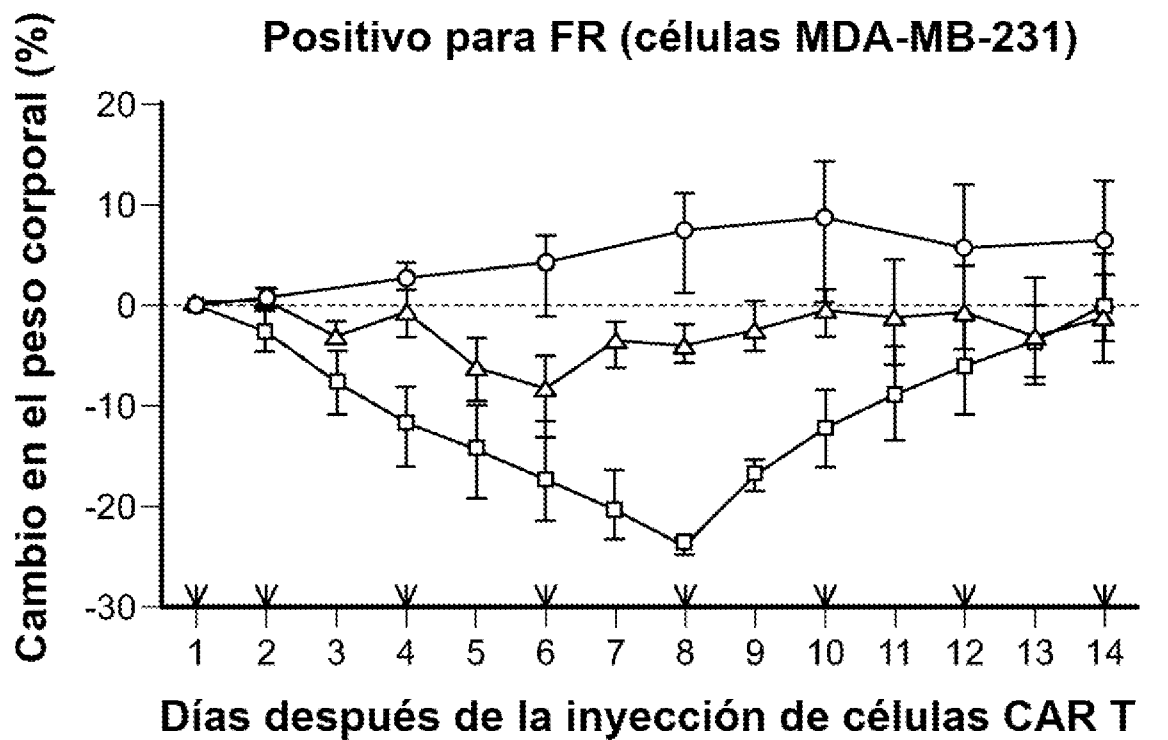
FIG. 11B



- Célula CAR T + PBS
- ▨ Célula CAR T + FITC-Folato (500 nmol/kg)_Dosis continua
- ▩ Célula CAR T + FITC-Folato (500 nmol/kg)_Interrupción + Competidor FA
- ▤ Célula CAR T + FITC-Folato (500 nmol/kg)_Interrupción
- ▥ Célula CAR T + FITC-Folato (500 nmol/kg)_Competidor FA

El porcentaje de supervivencia en la primera semana de tratamiento					
	PBS	FITC-FA (500 nmol/kg)			
		Continua	Competidor FA (100x)	Interrupción	Interrupción + Competidor FA (100x)
%	100(5/5)	40(2/5)	100(3/3)	100(3/3)	100(5/5)

FIG. 12

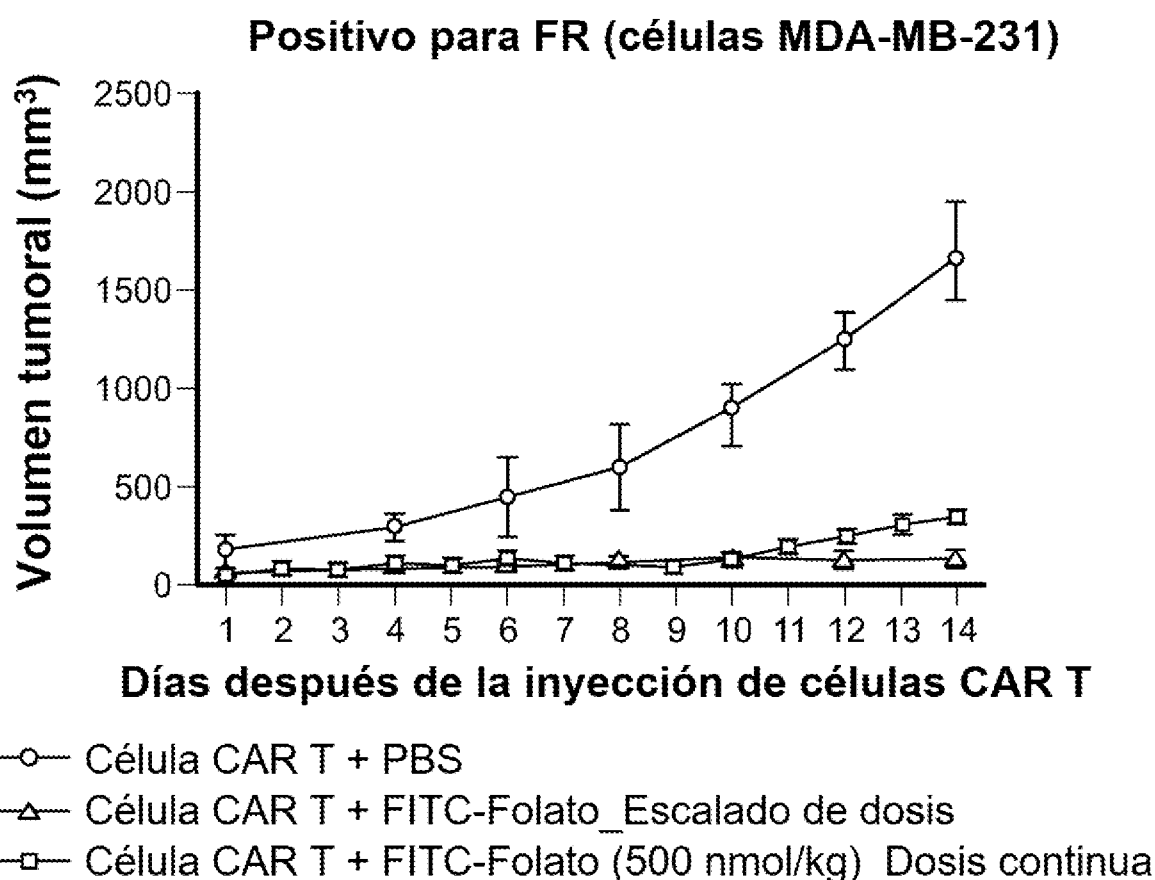


- Célula CAR T + PBS
- △— Célula CAR T + FITC-Folato_Escalado de dosis
- Célula CAR T + FITC-Folato (500 nmol/kg)_Dosis continua

*Nota

1. Inyección de EC17 en el grupo de Escalado de dosis
 - Día 1 y 2: EC17 (0,5 nmol/kg)
 - Día 4: EC17 (5 nmol/kg)
 - Día 6 y 8: EC17 (50 nmol/kg)
 - Día 10, 12 y 14: EC17 (500 nmol/kg)
2. Inyección de EC17 en el grupo de Continua
 - Cada dos días a partir del Día 1
3. Célula CAR T: 15×10^6 células CAR T el Día 1

FIG. 13A

*FIG. 13B*

El porcentaje de supervivencia en la primera semana de tratamiento			
	PBS	Continua	Escalado de dosis
%	100	40 (2/5)	100 (4/4)

*Nota: 1 ratón en el grupo de escalado de dosis estaba muerto durante la inyección de células CAR T

FIG. 13C

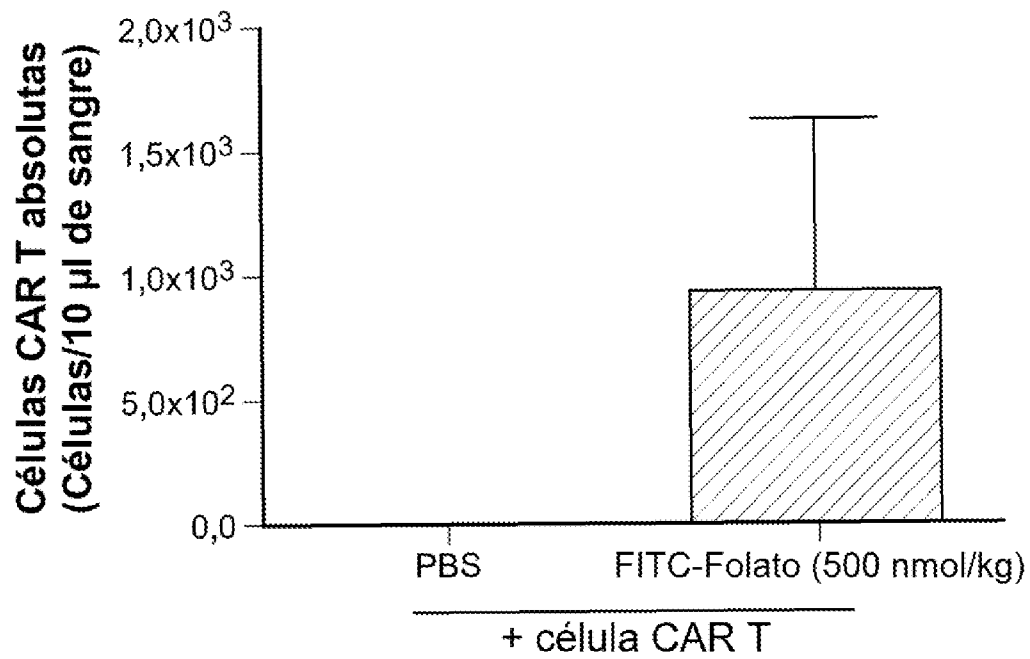


FIG. 14A

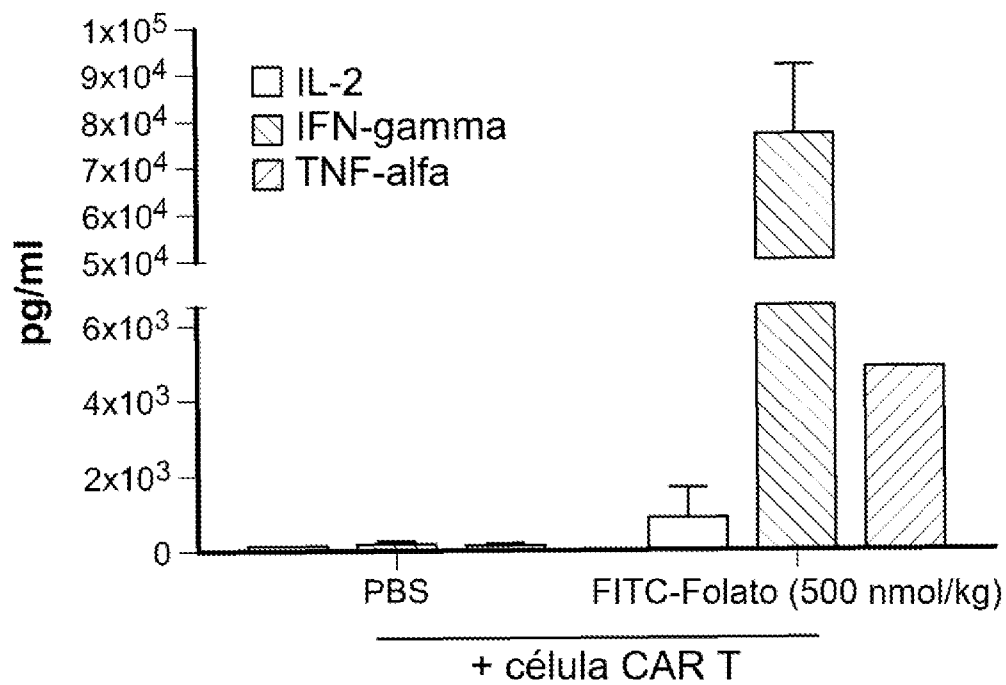


FIG. 14B

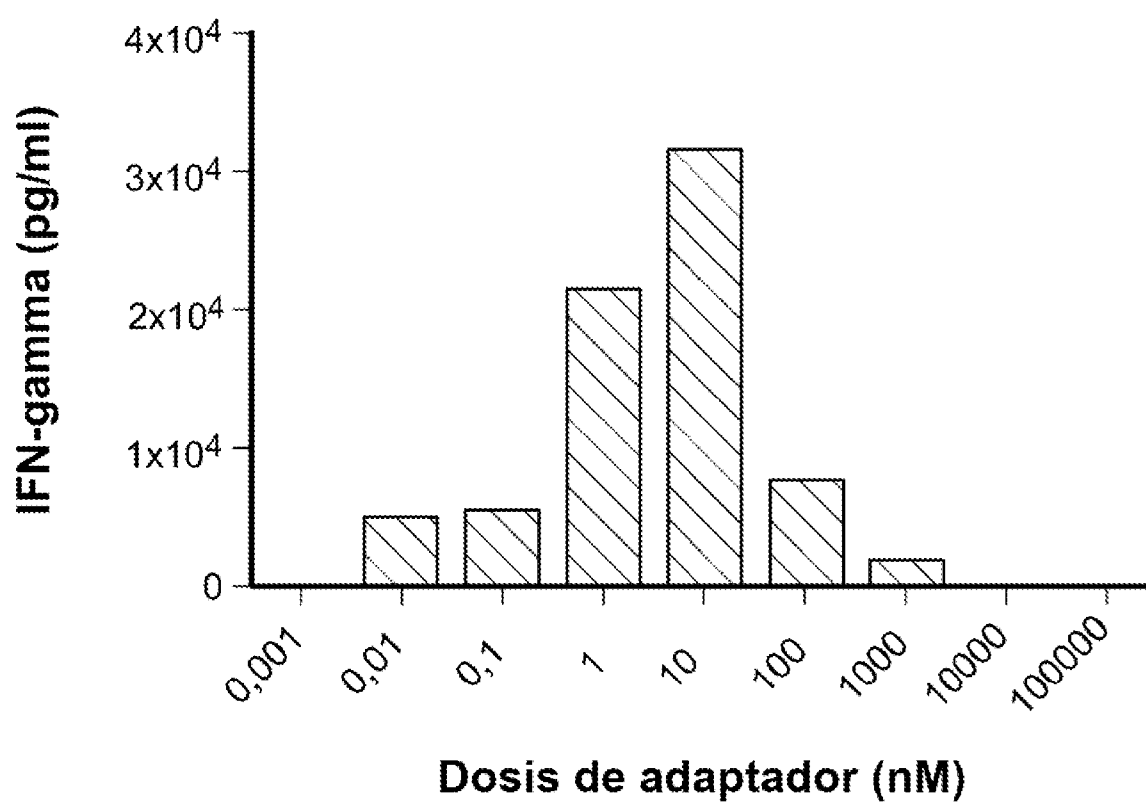


FIG. 15

Producción de citocinas

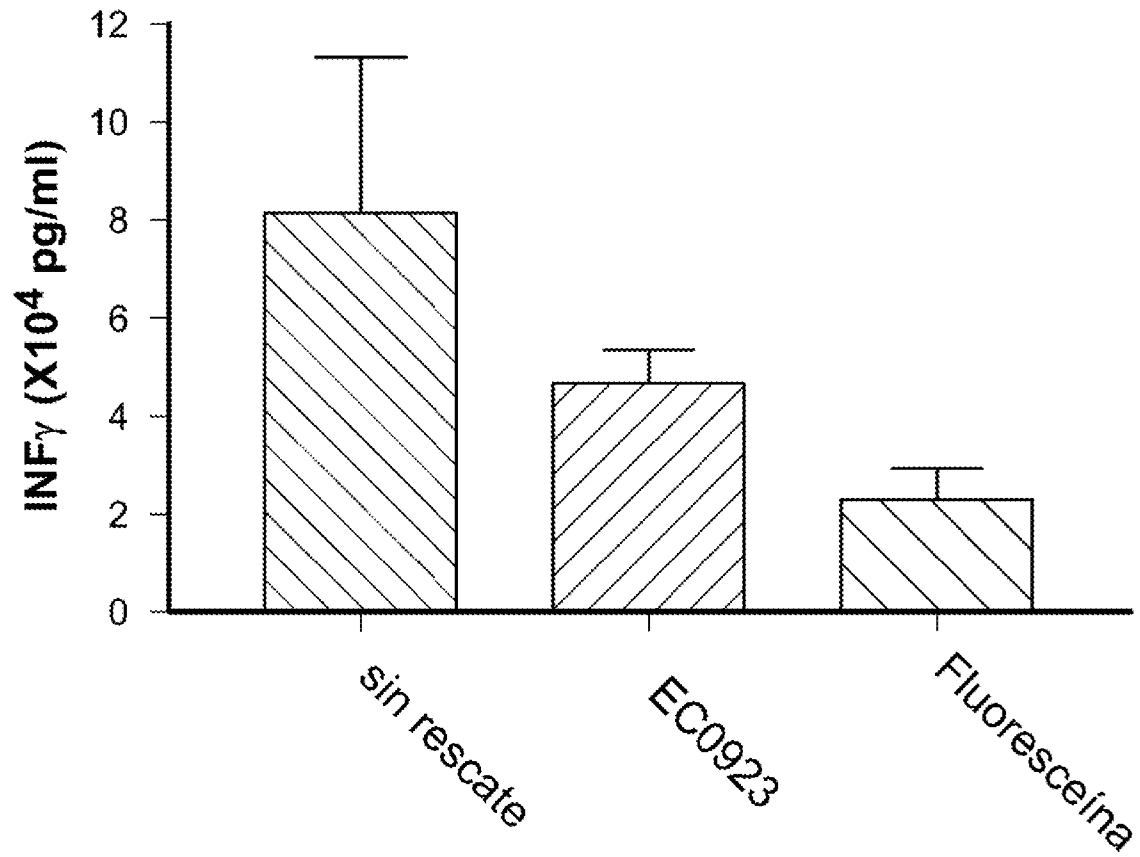
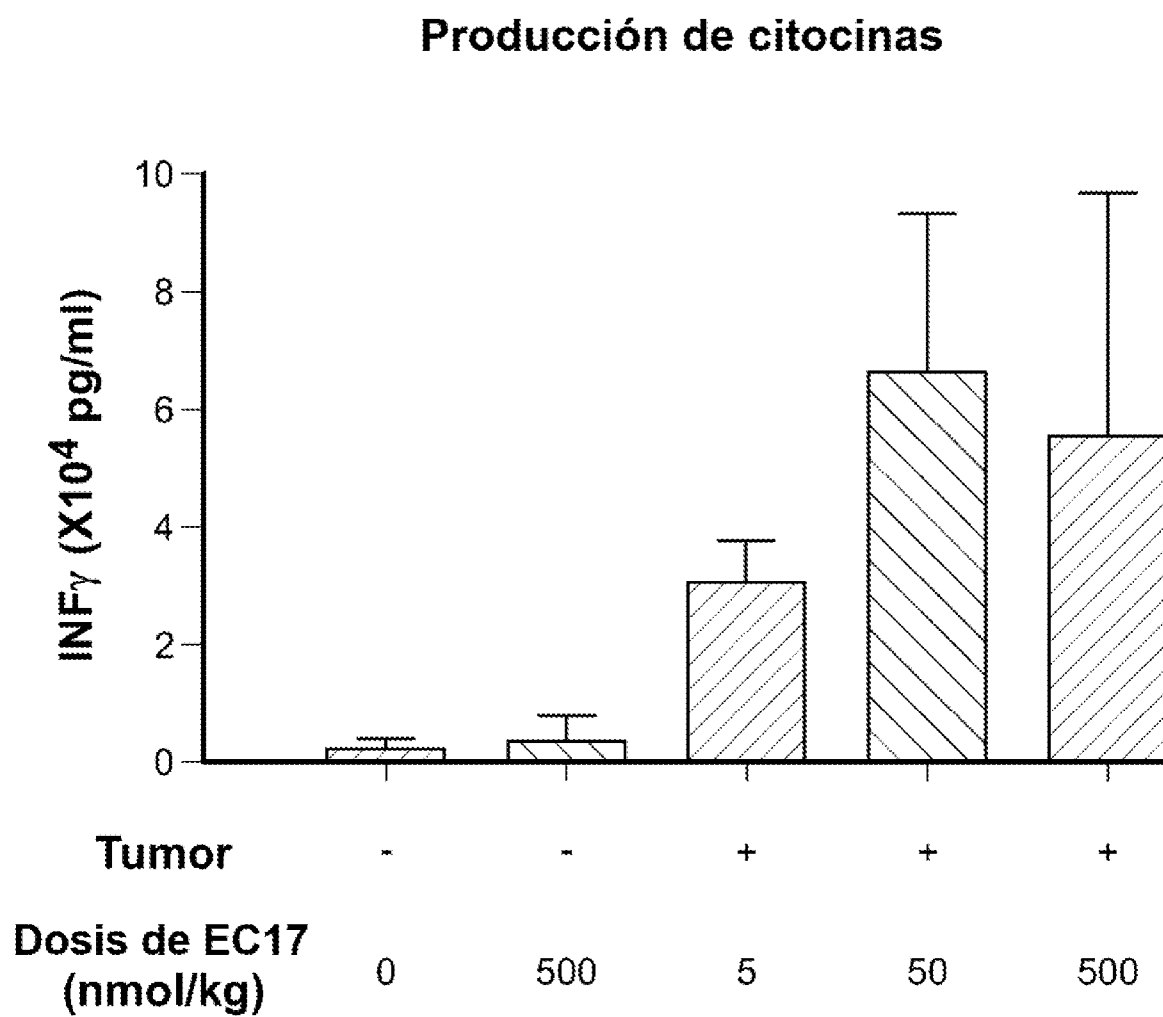
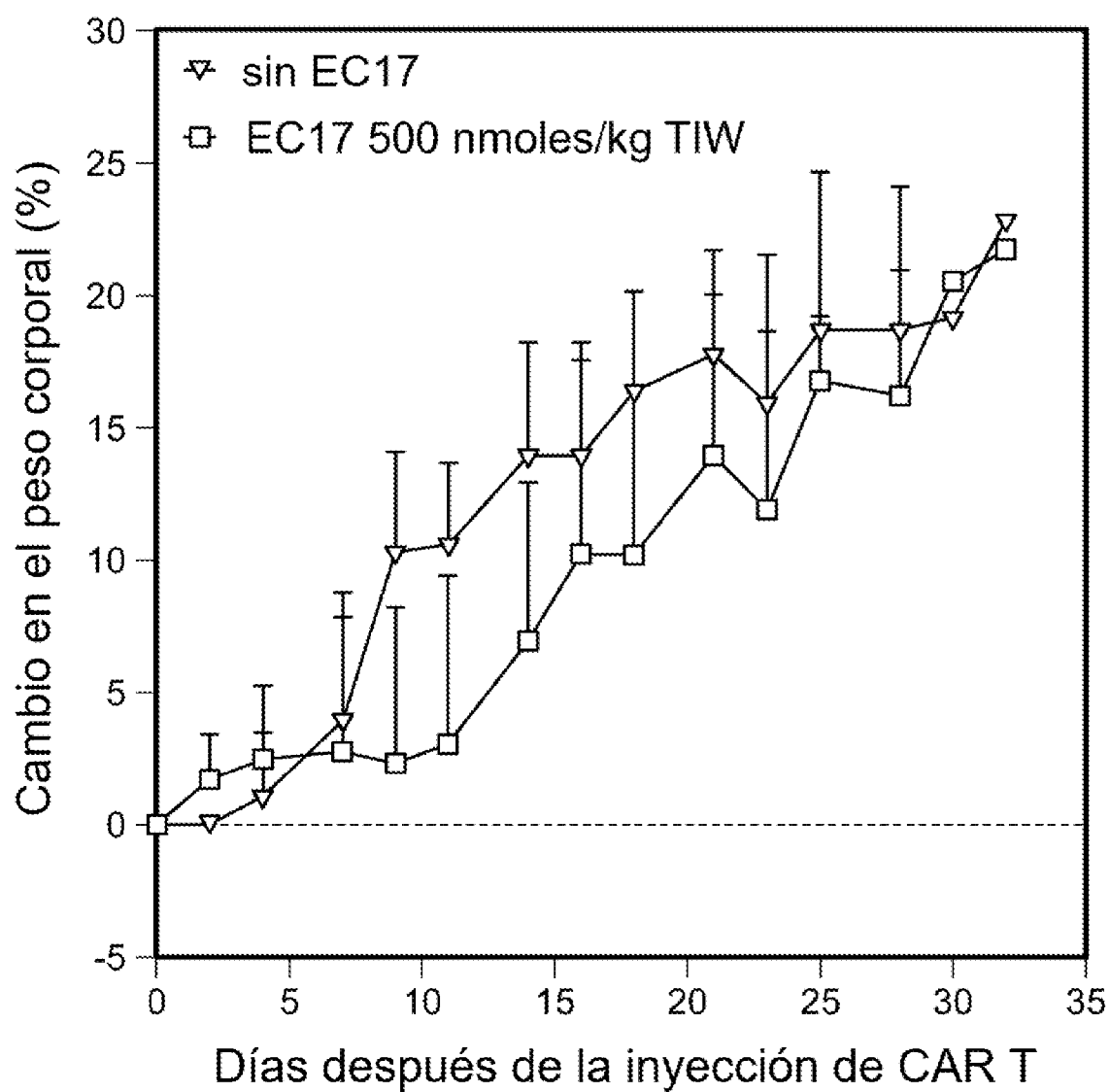
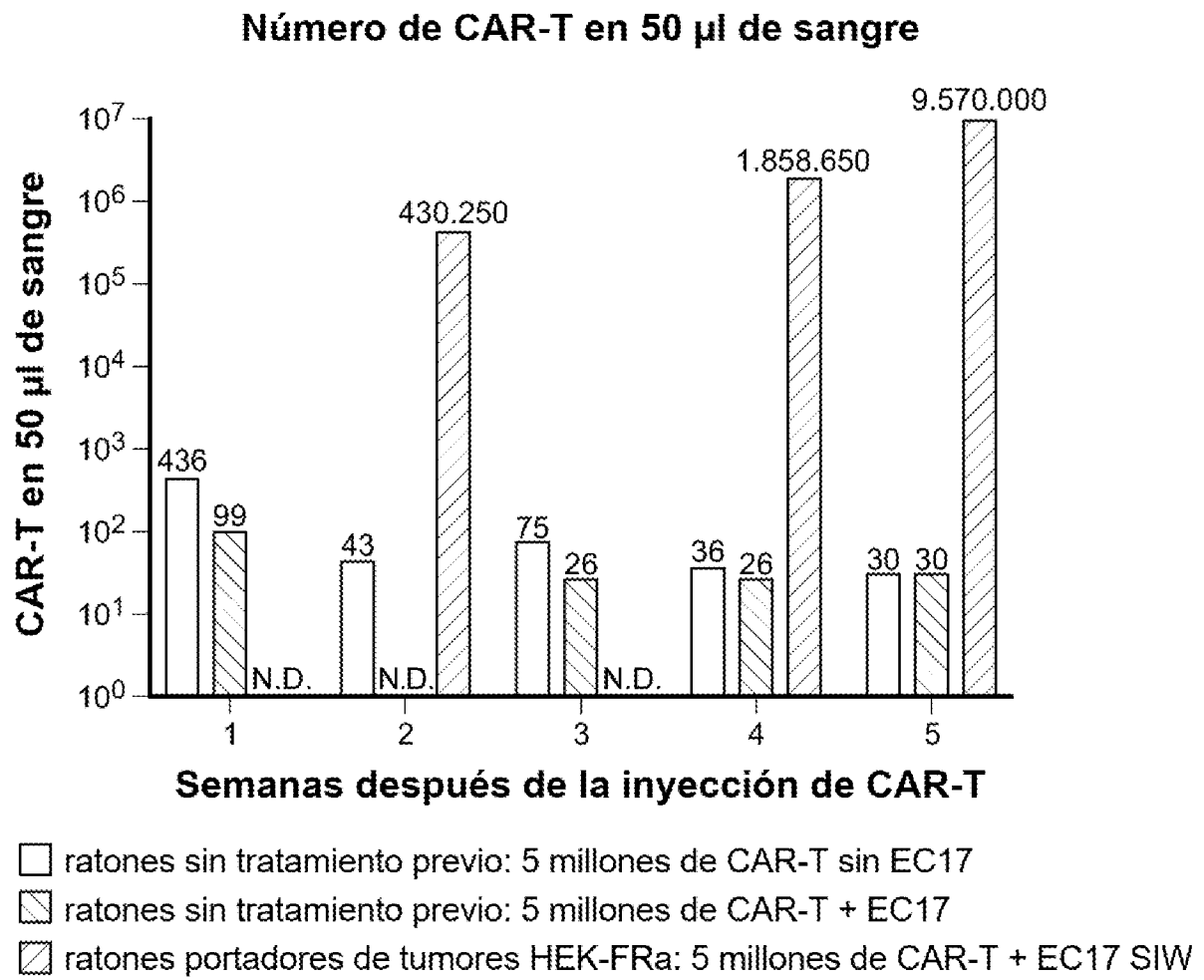
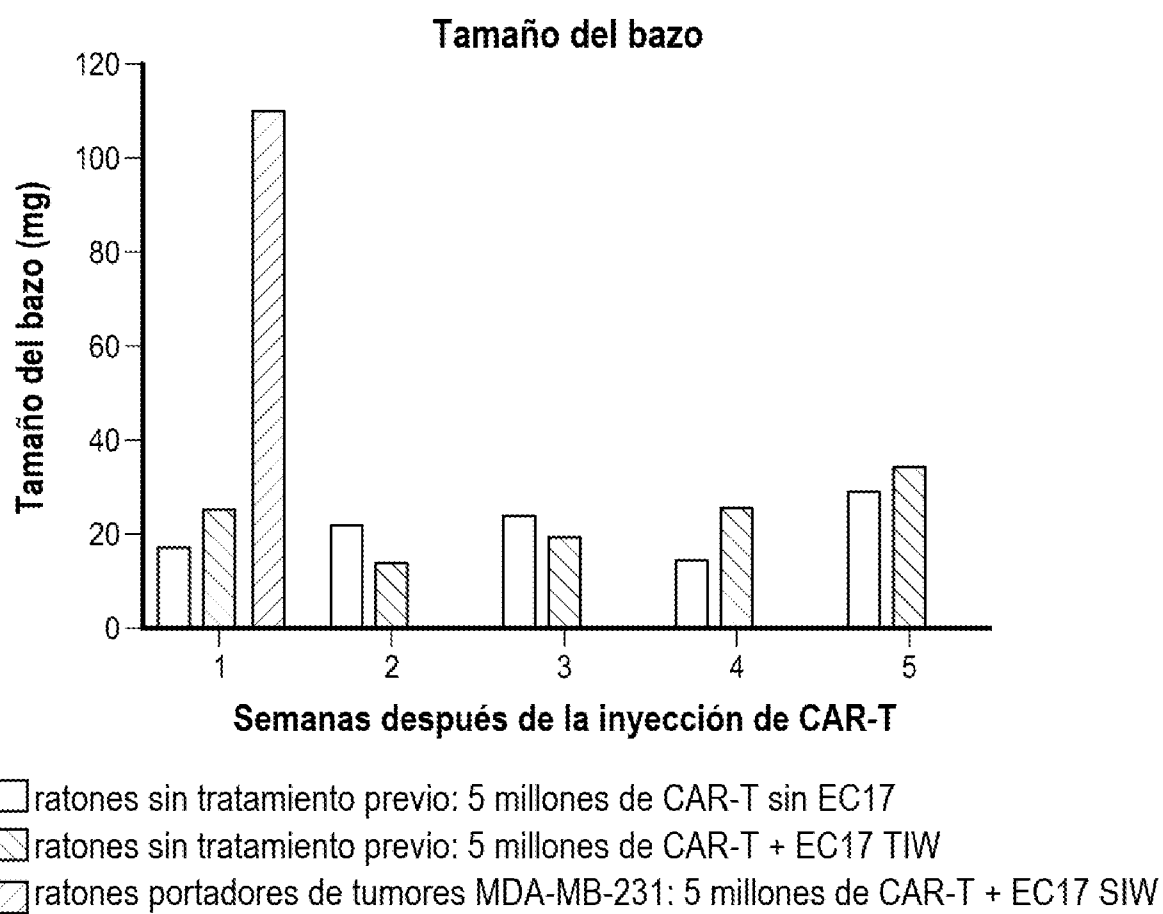


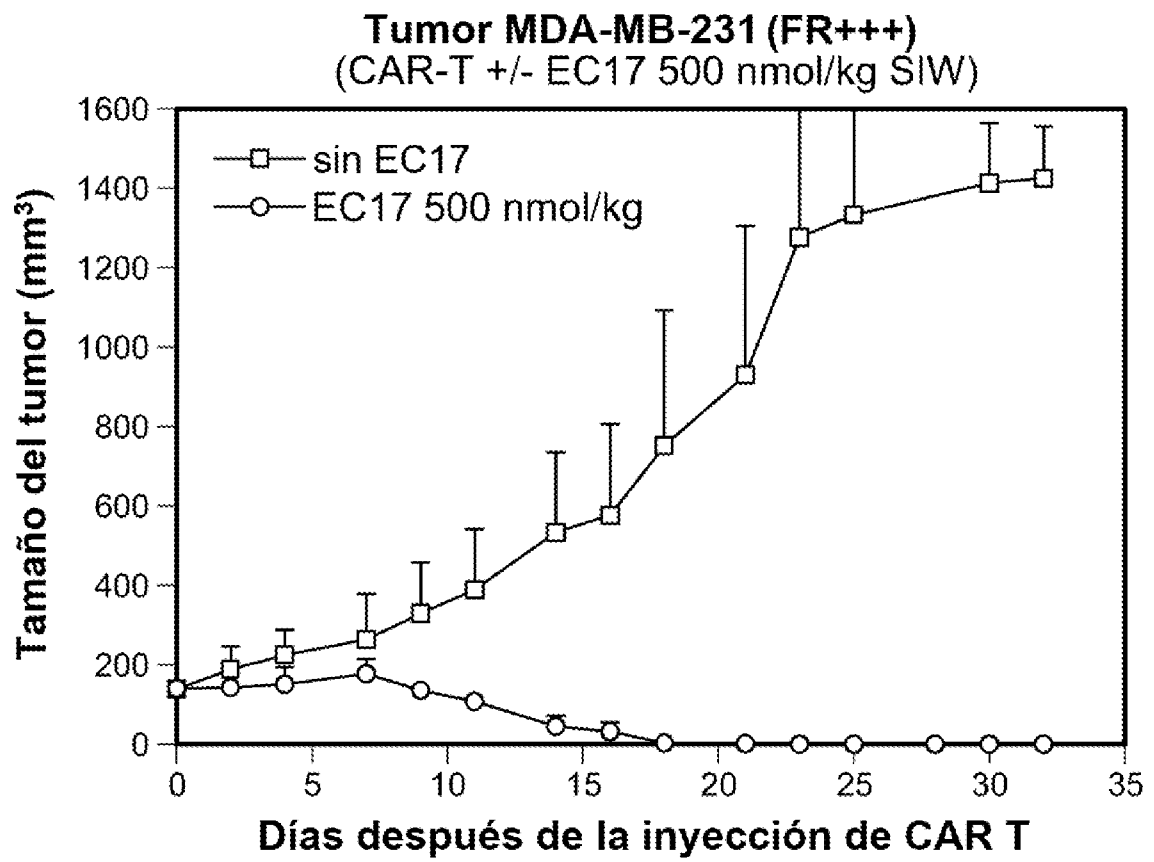
FIG. 16

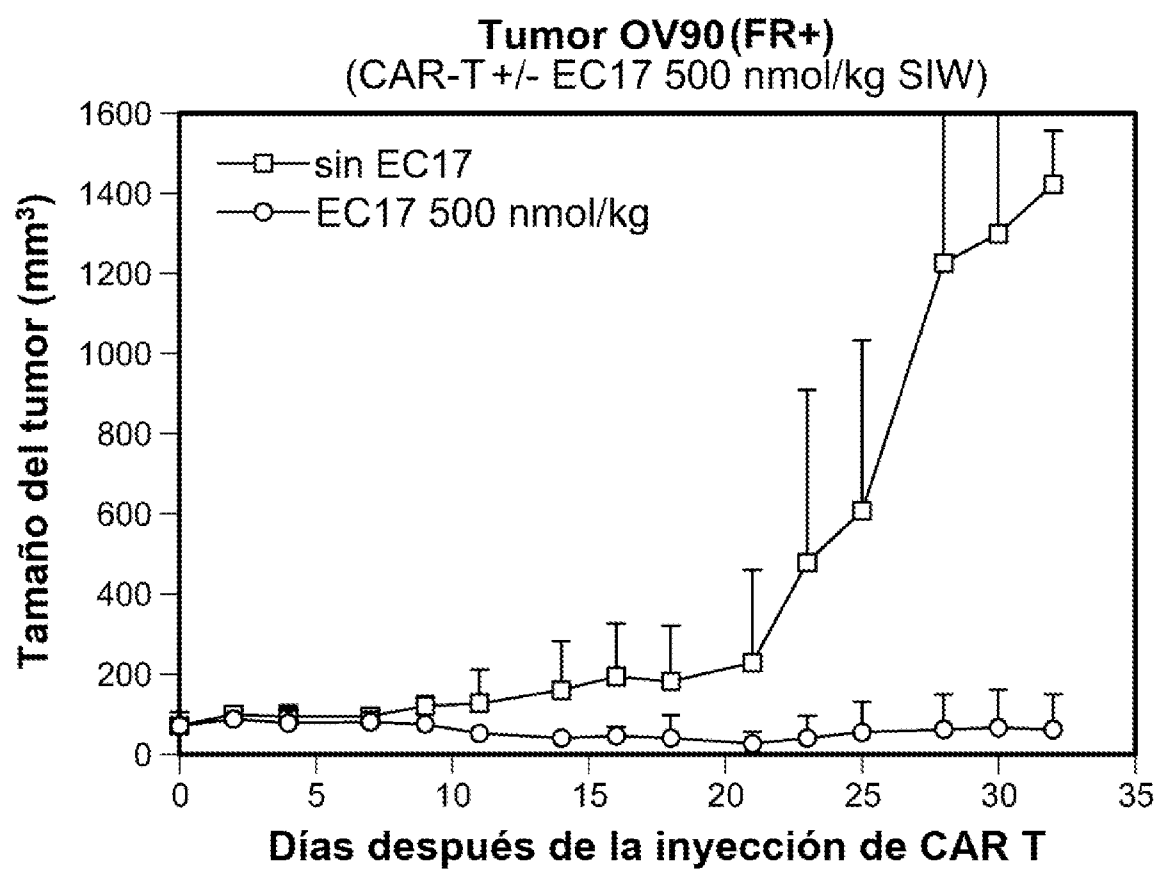
*FIG. 17*

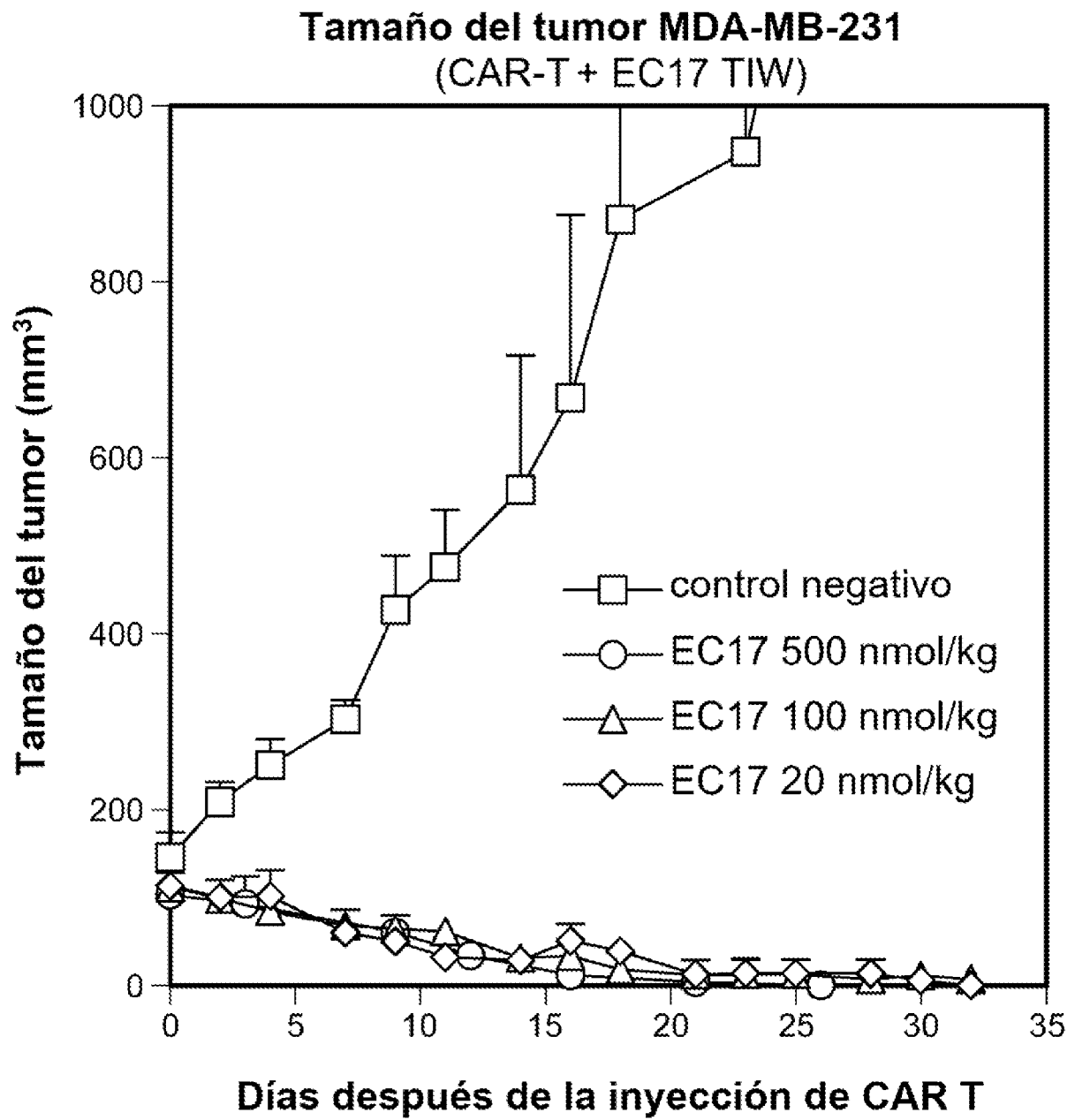
*FIG. 18A*

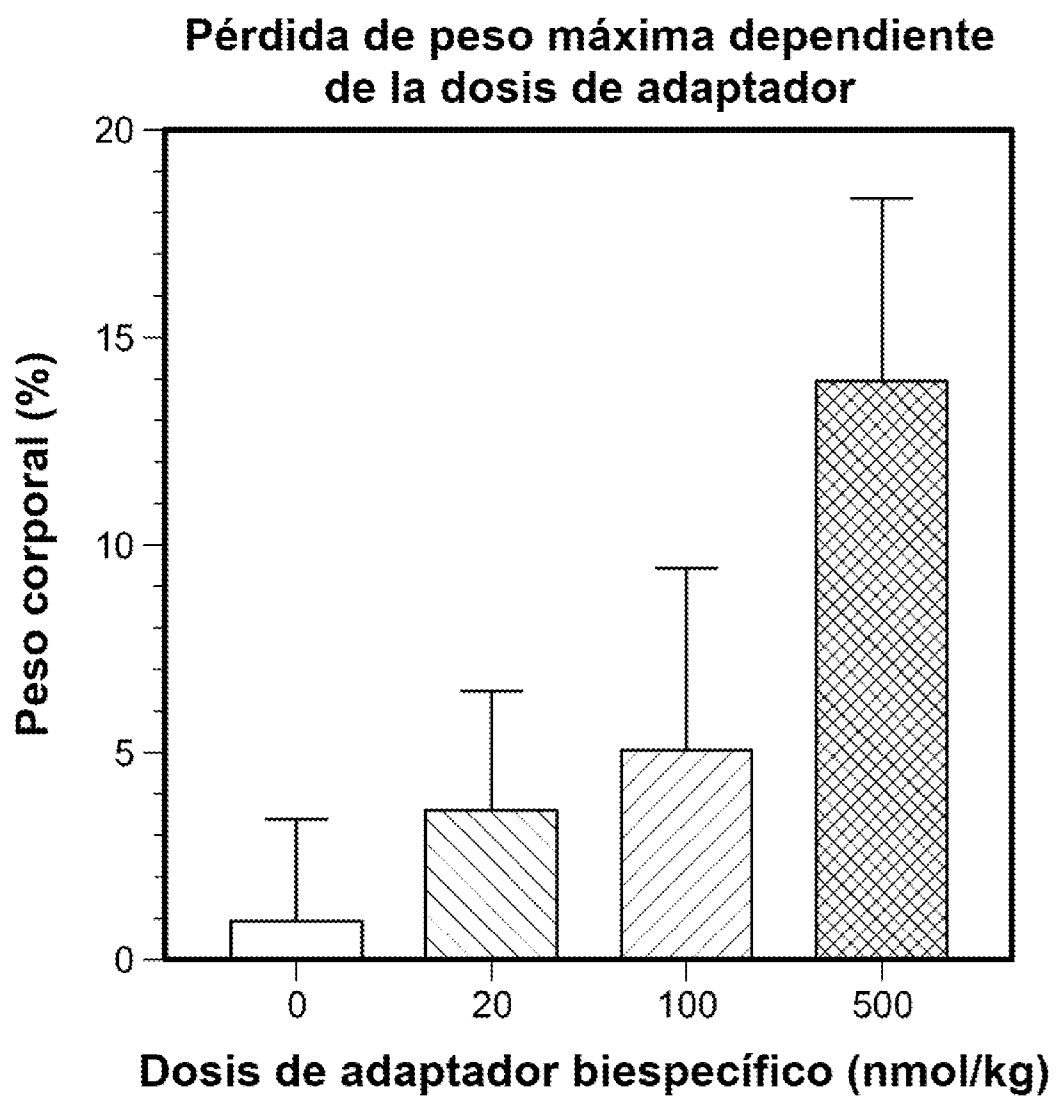
*FIG. 18B*

*FIG. 18C*

*FIG. 19A*

*FIG. 19B*

*FIG. 20A*

*FIG. 20B*

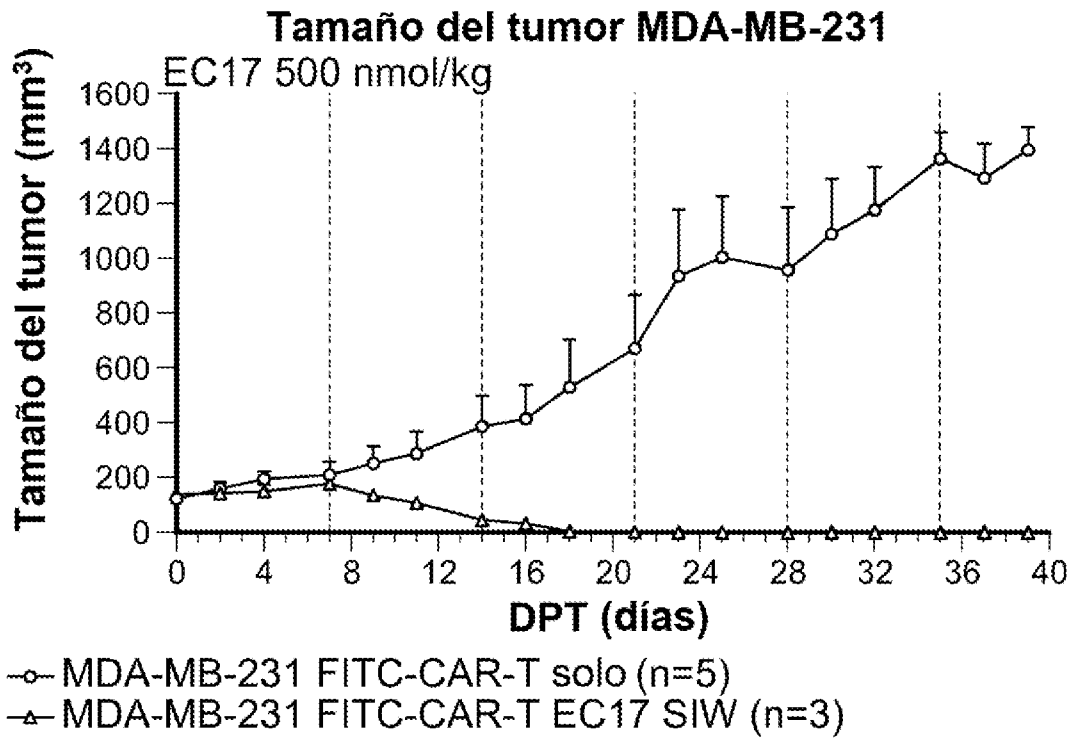


FIG. 21A

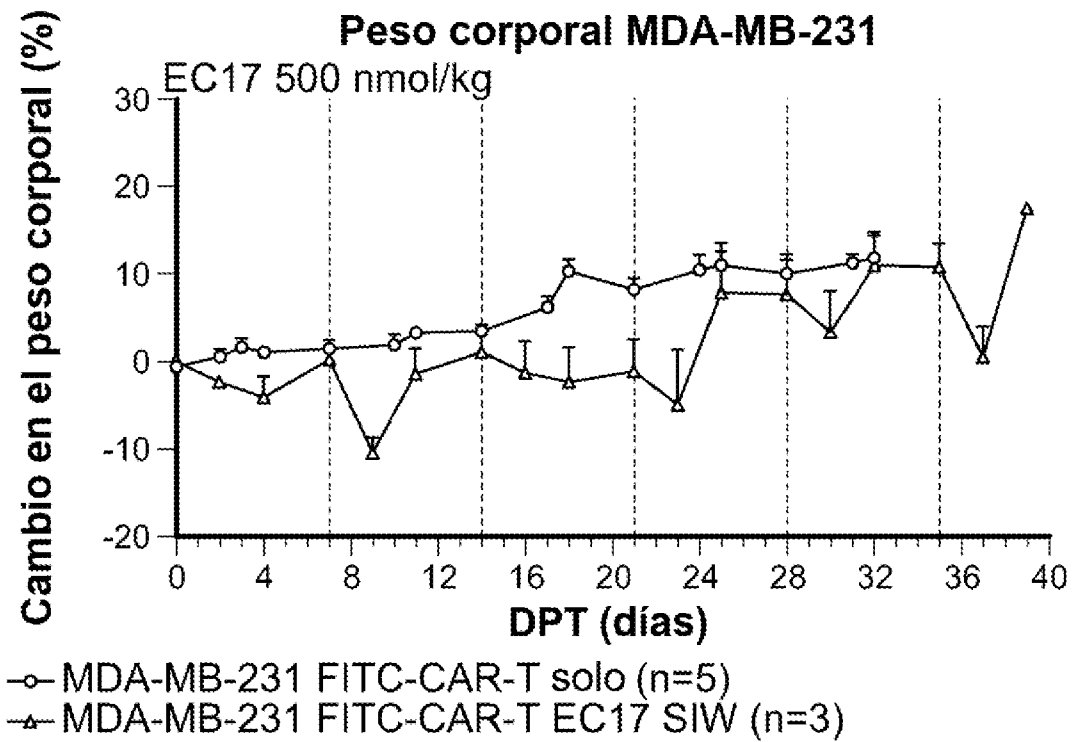


FIG. 21B

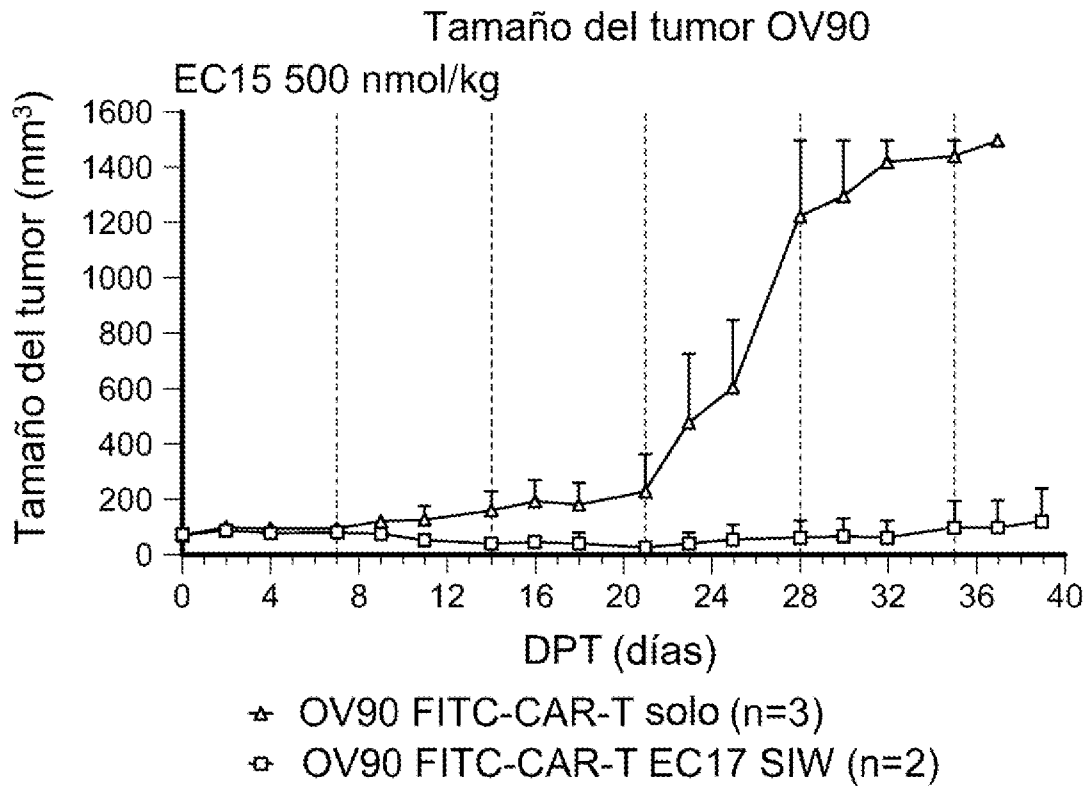


FIG. 22A

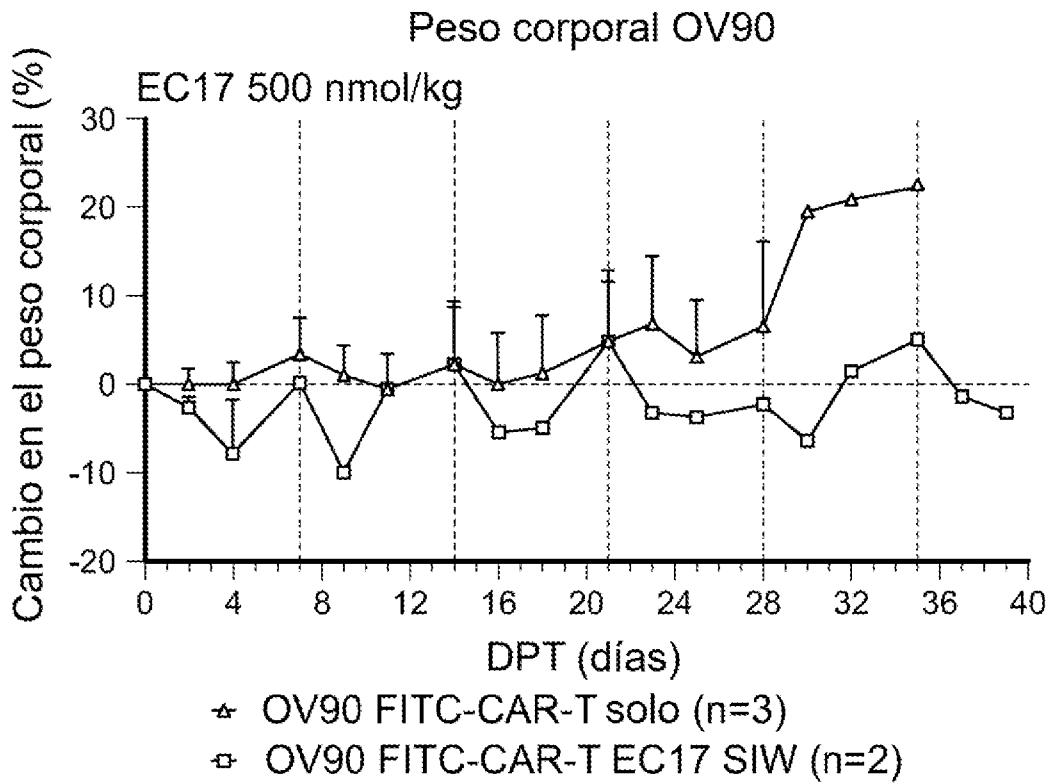


FIG. 22B

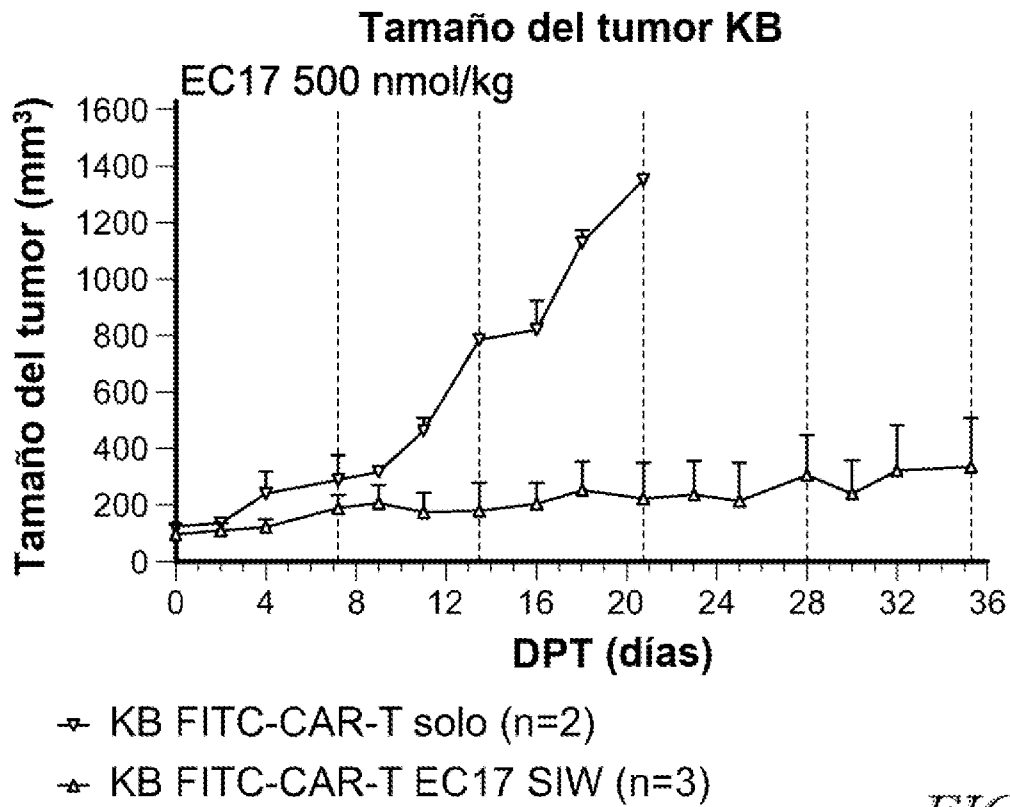


FIG. 23A

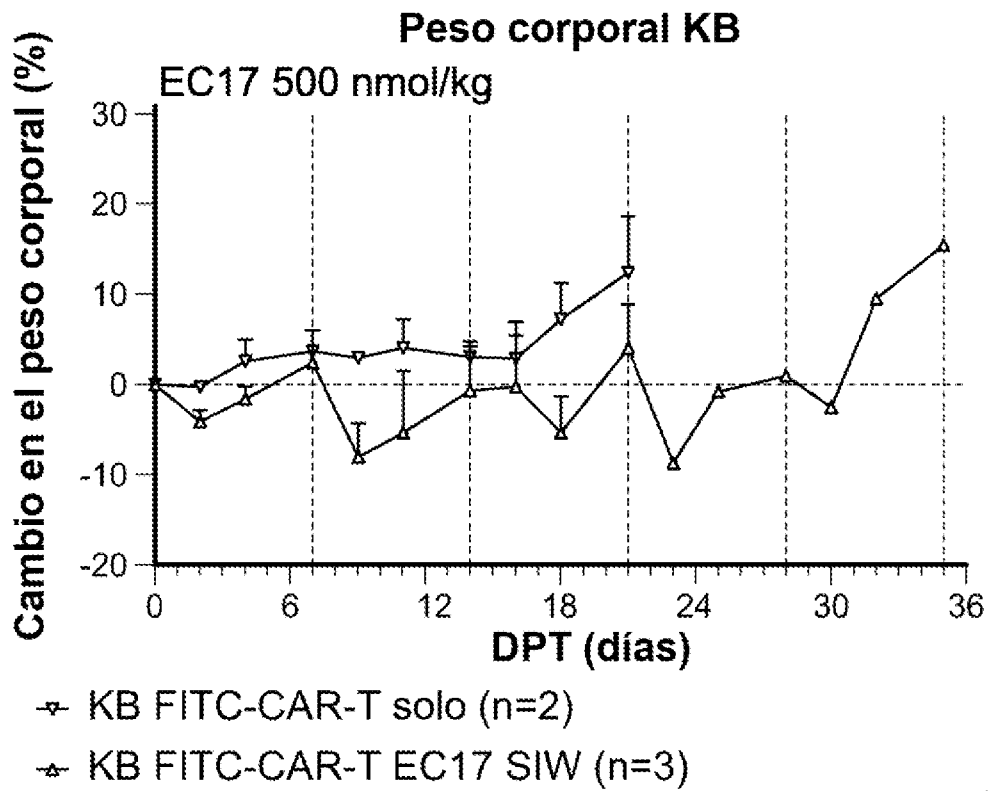


FIG. 23B

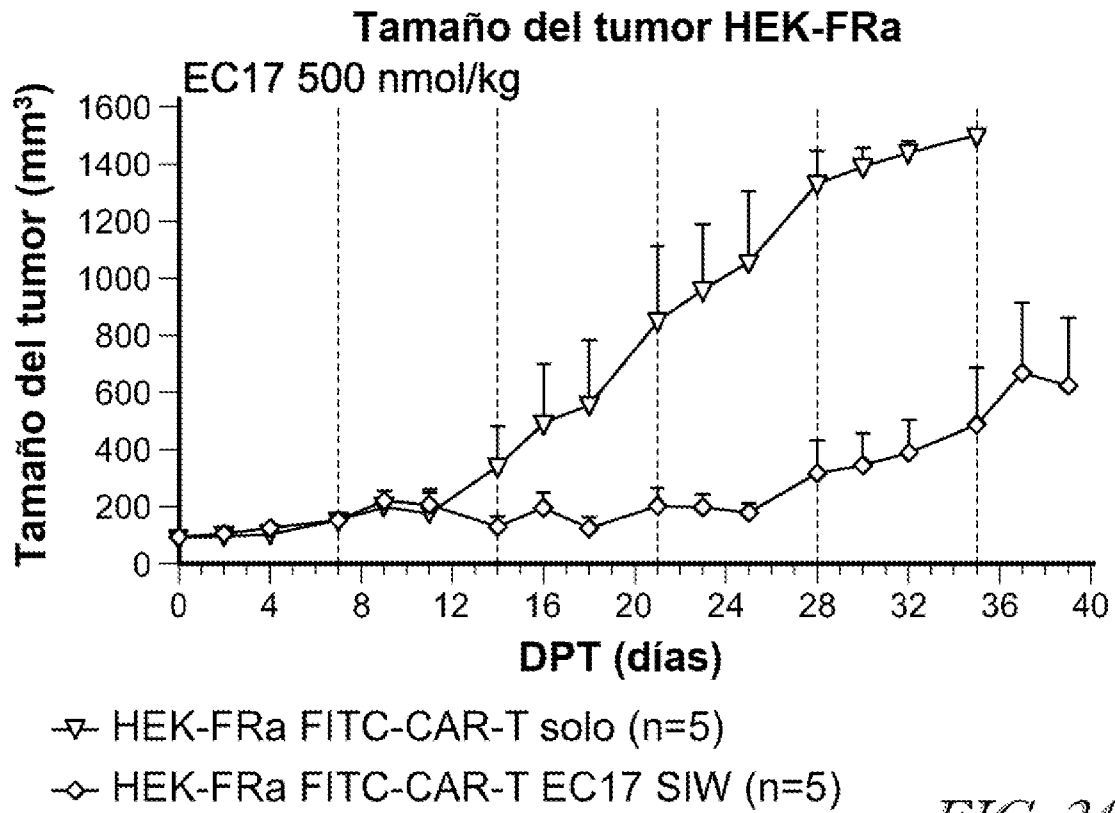


FIG. 24A

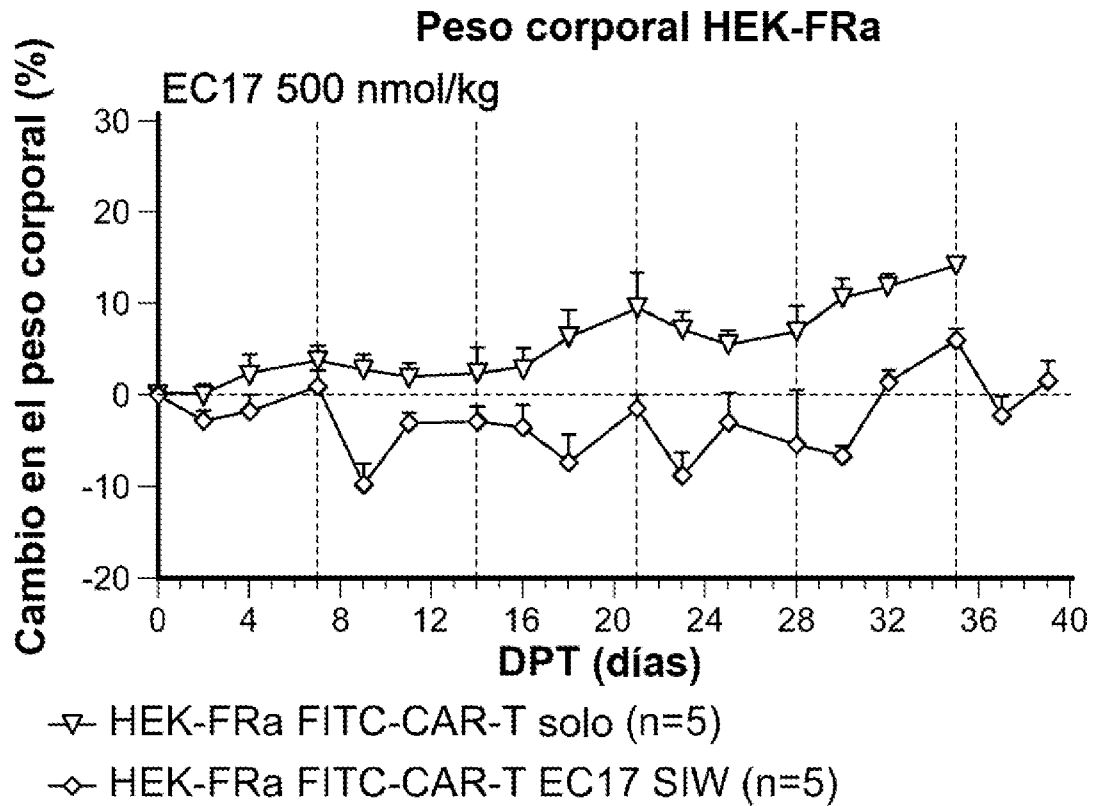


FIG. 24B

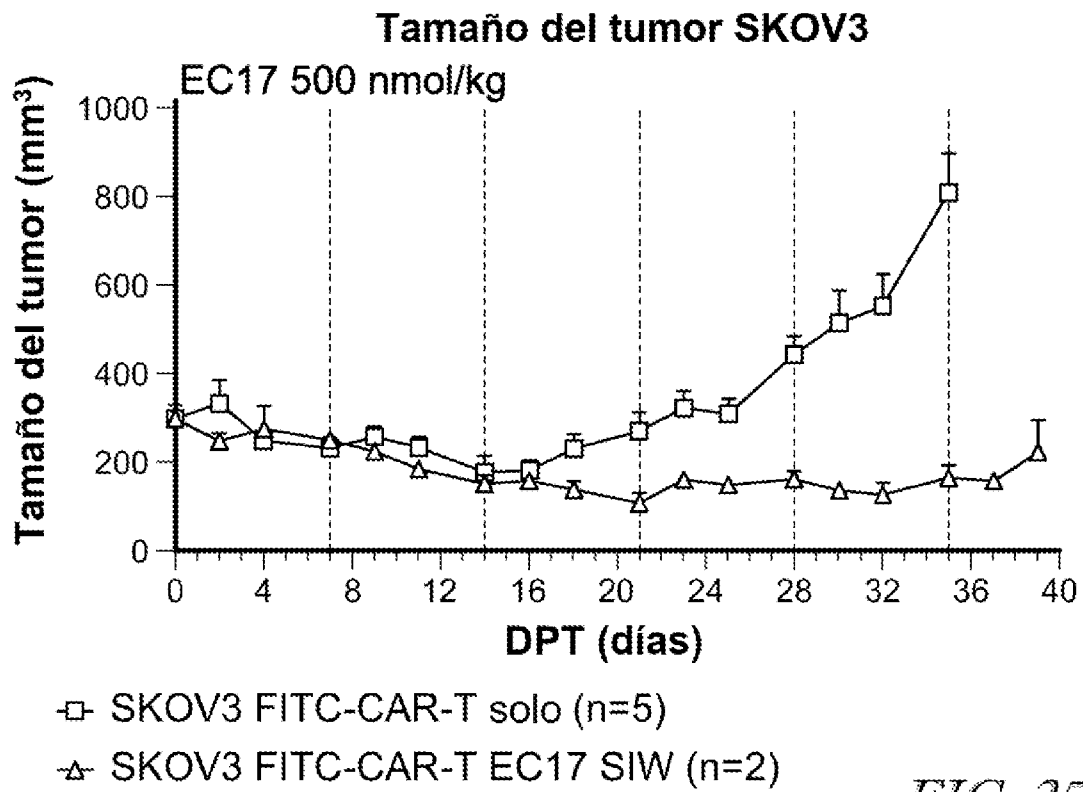


FIG. 25A

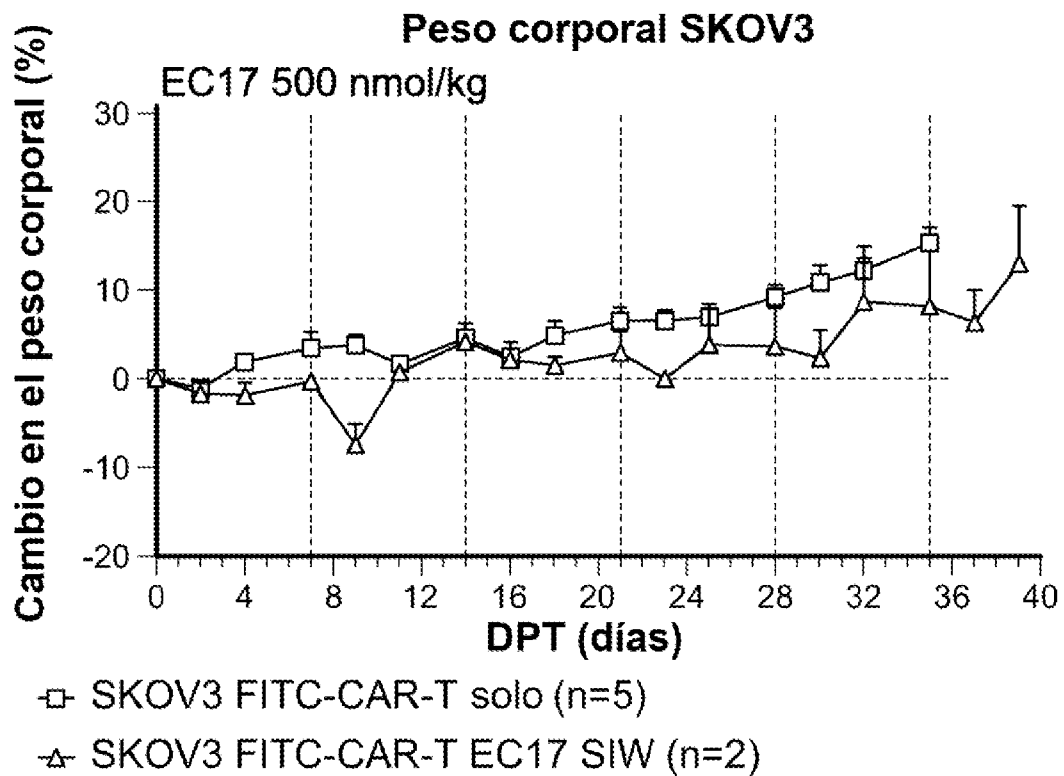


FIG. 25B

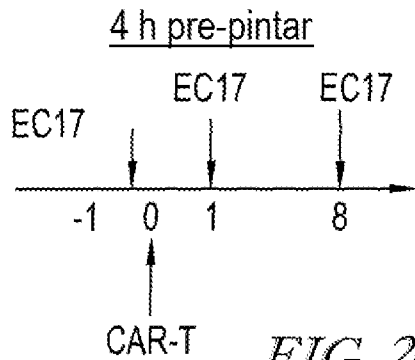


FIG. 26A

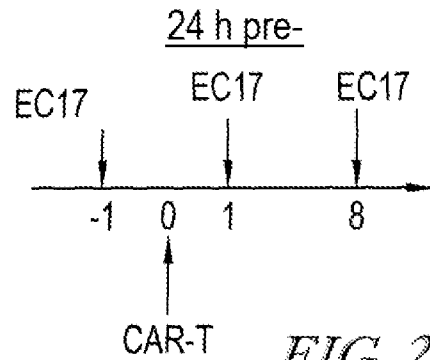


FIG. 26B

	Ratones muertos debido a sCRS			Ratones que sobrevivieron
	Semana 2	Semana 3	Semana 4	>5 Semanas
4 h pre-pintar	33%	33%	17%	17%
24 h pre-pintar	17%	0	0	83%

FIG. 26C

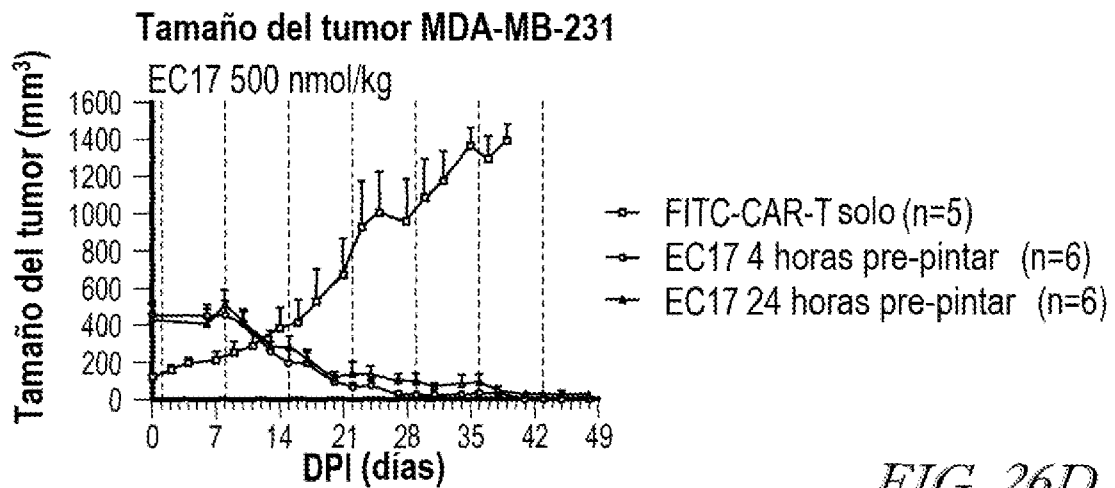


FIG. 26D

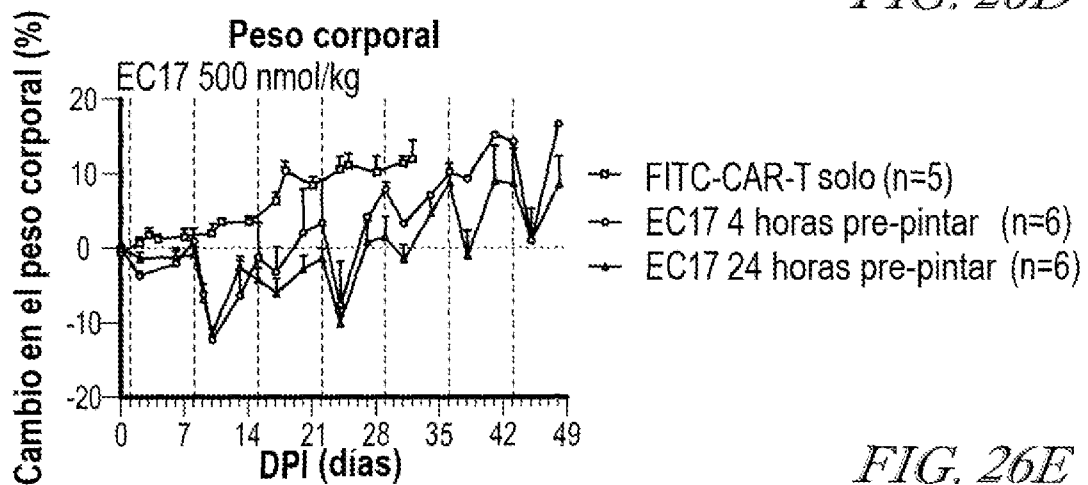


FIG. 26E

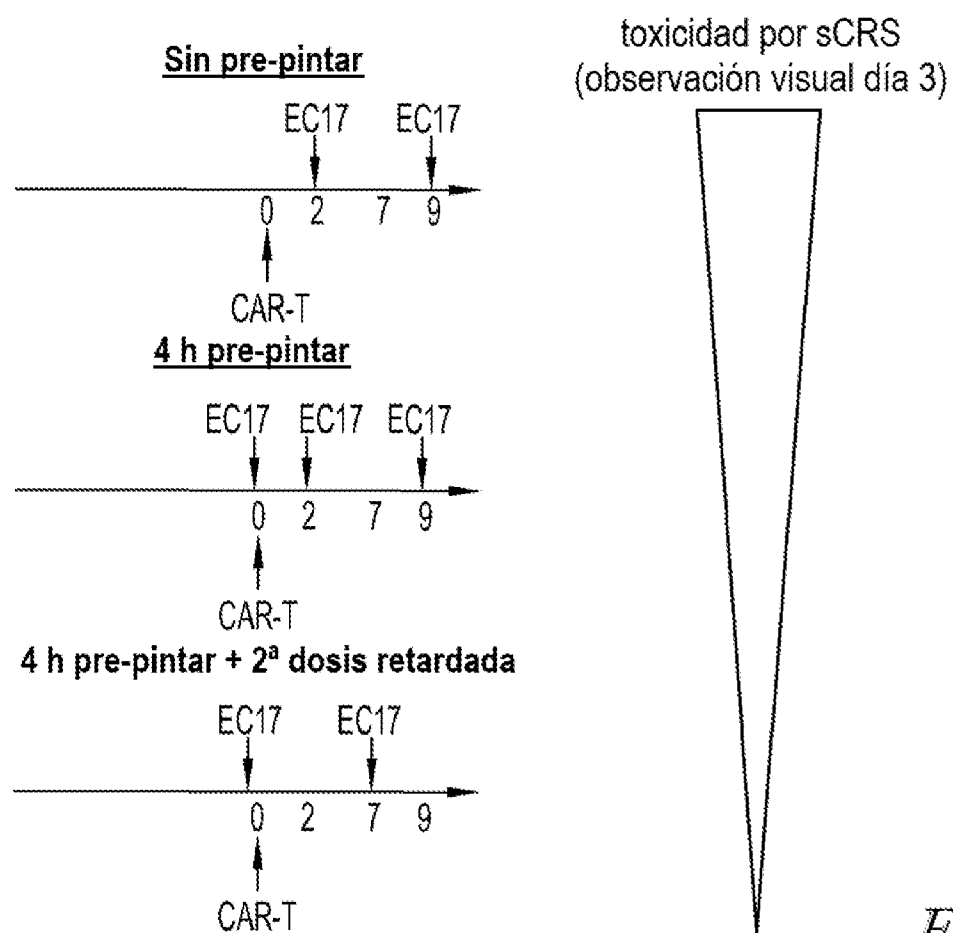


FIG. 27A

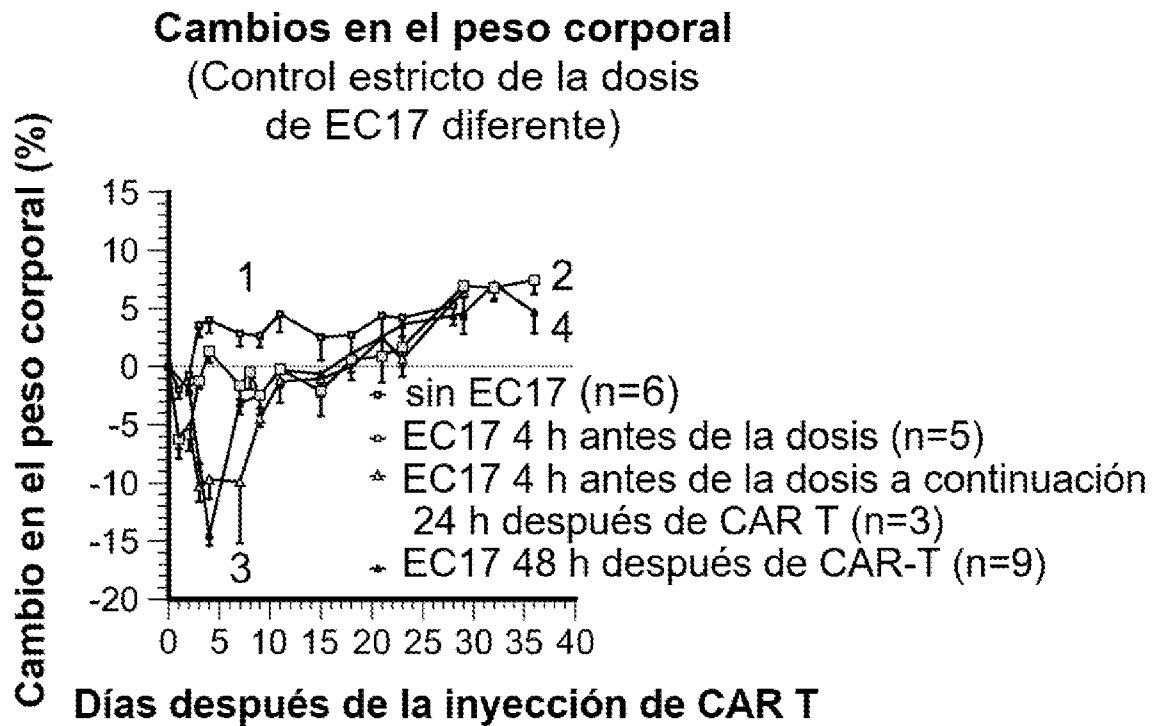


FIG. 27B

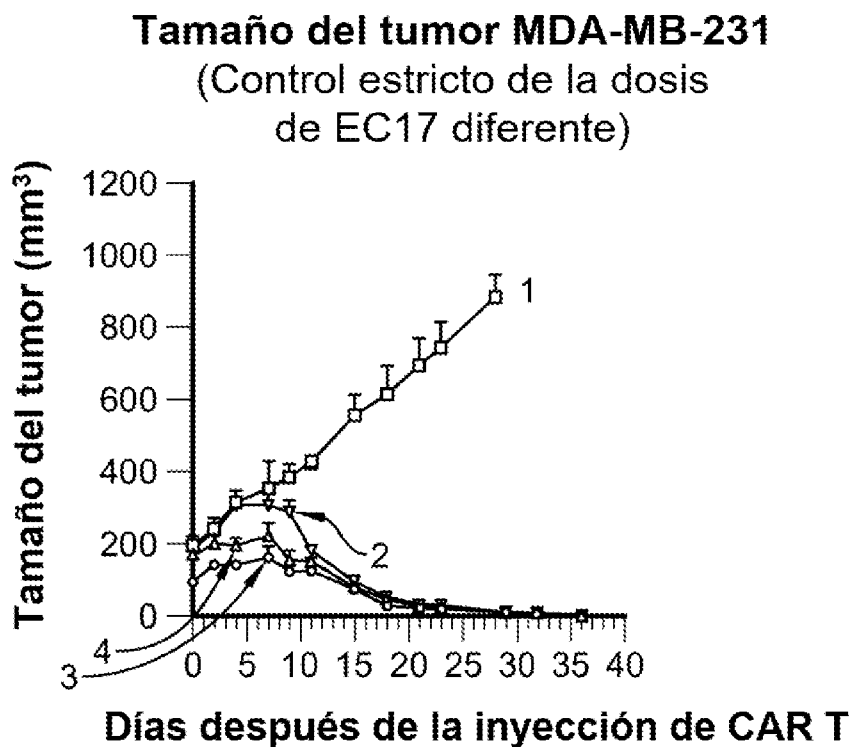


FIG. 27C

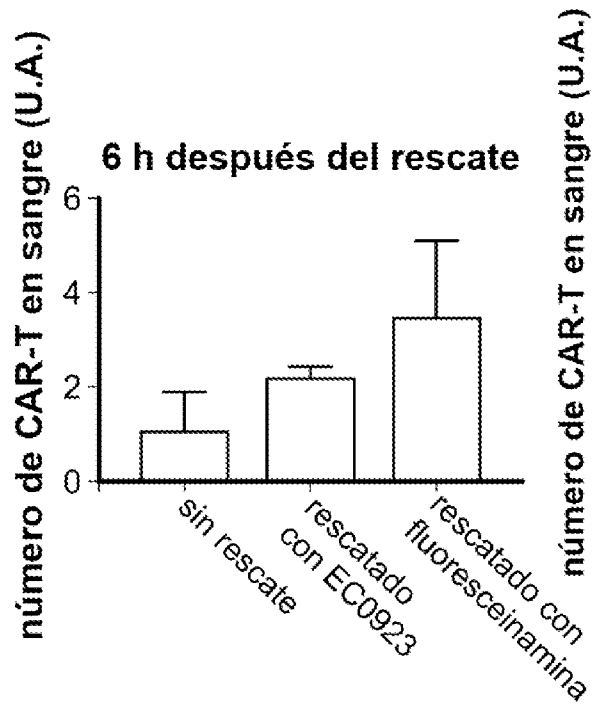


FIG. 28A

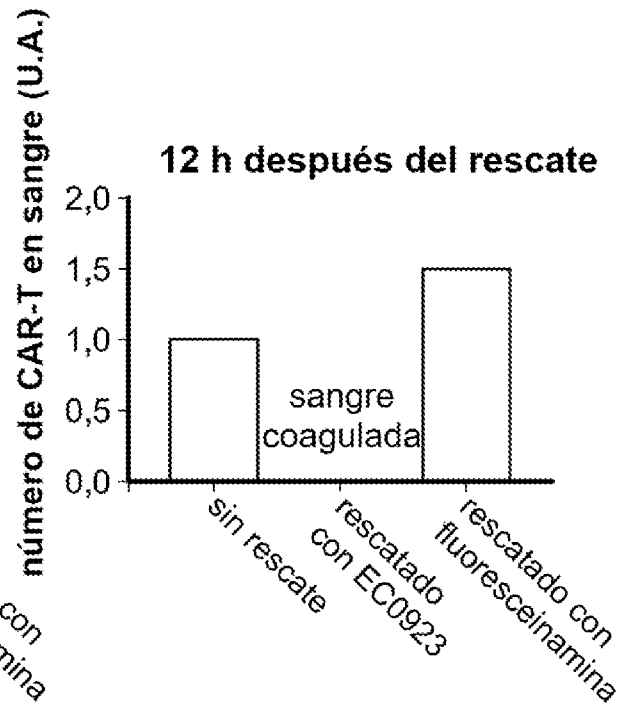


FIG. 28B

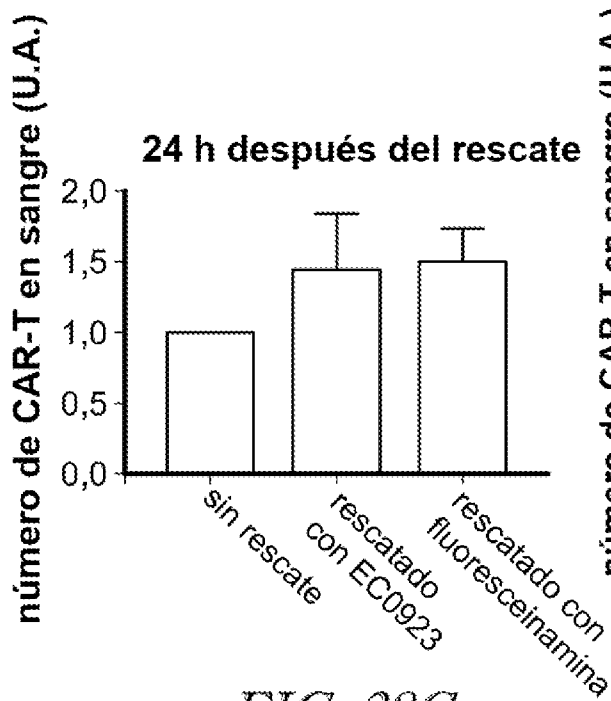


FIG. 28C

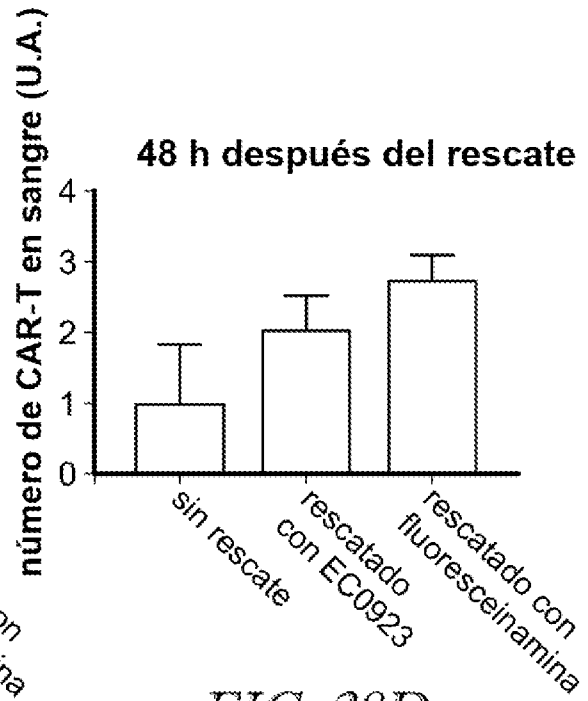
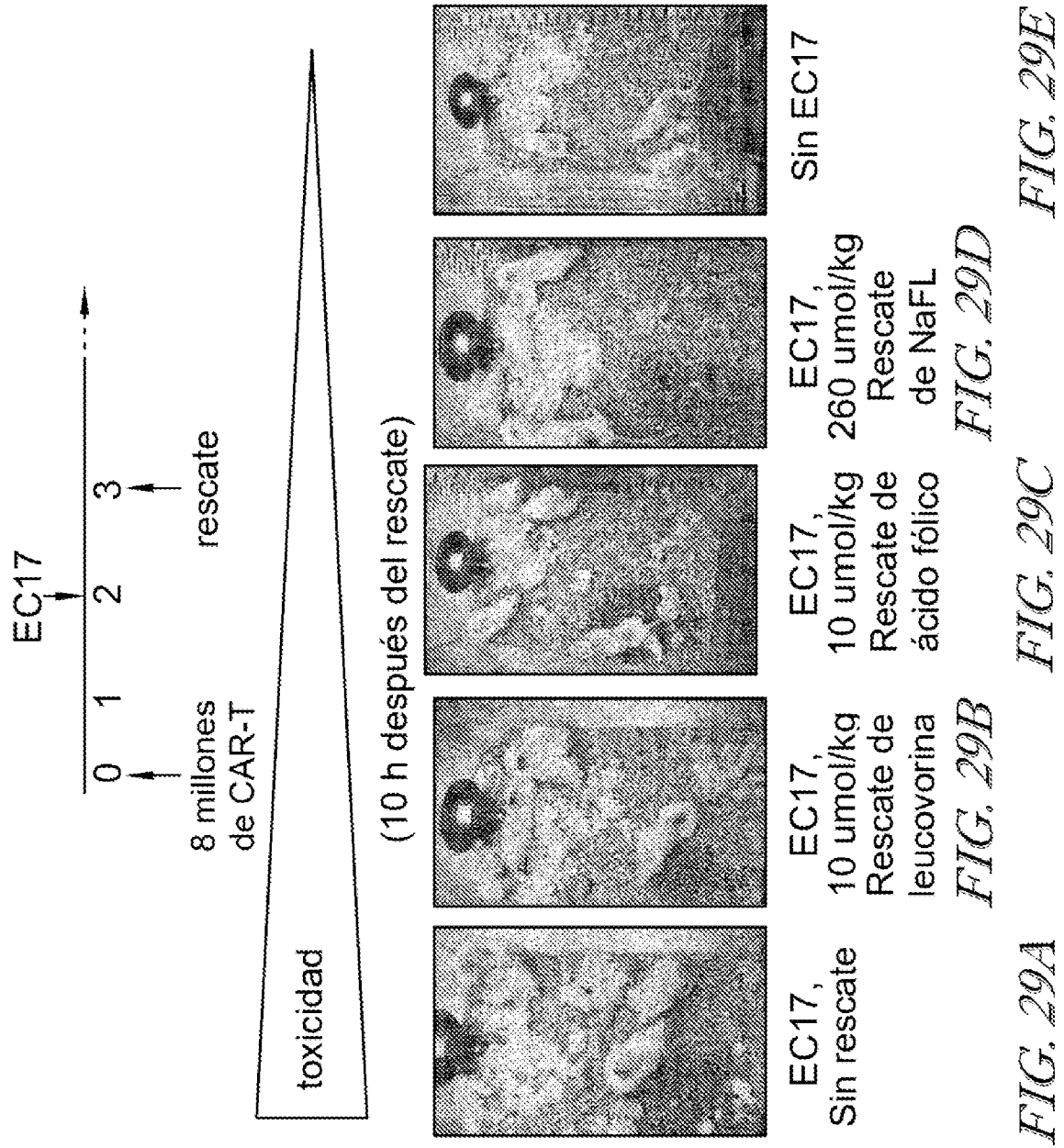


FIG. 28D



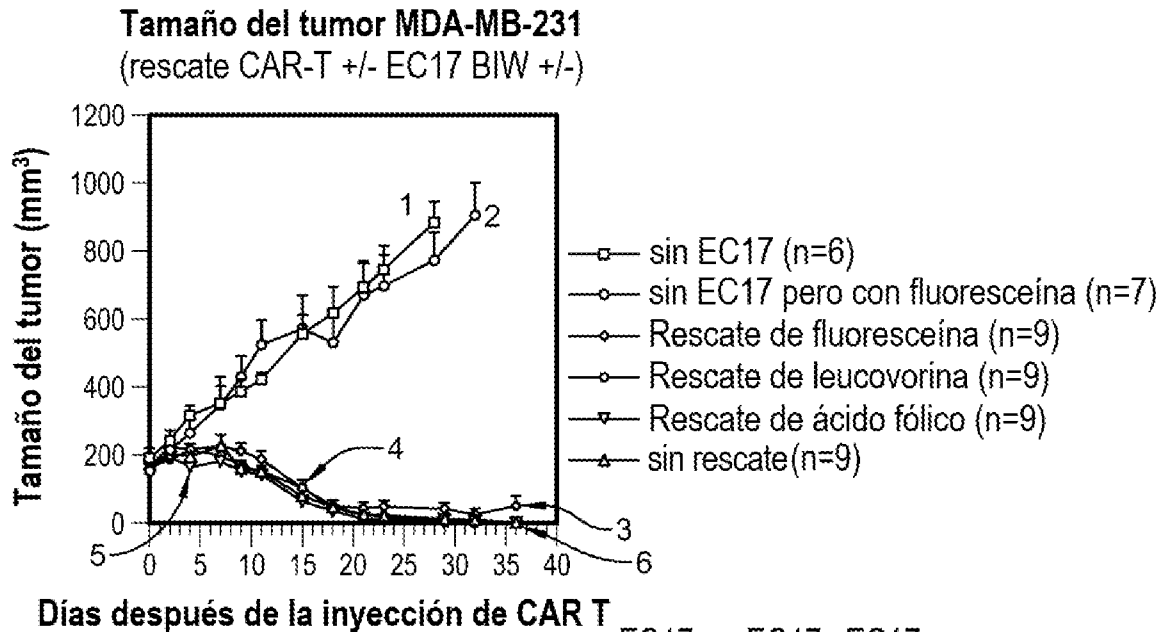


FIG. 30A

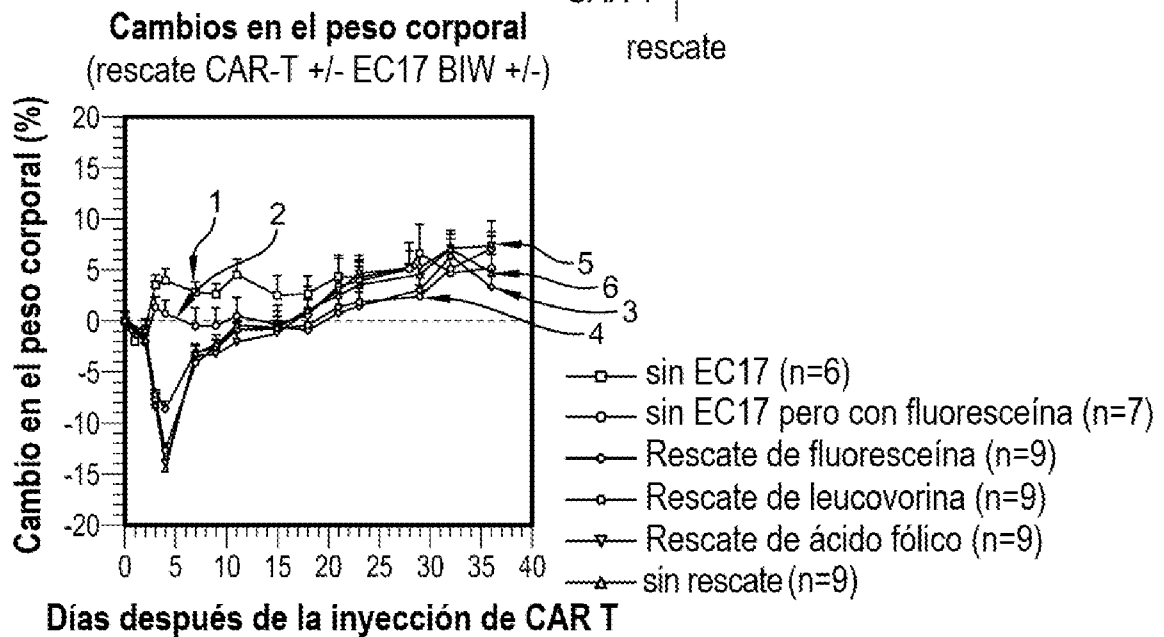
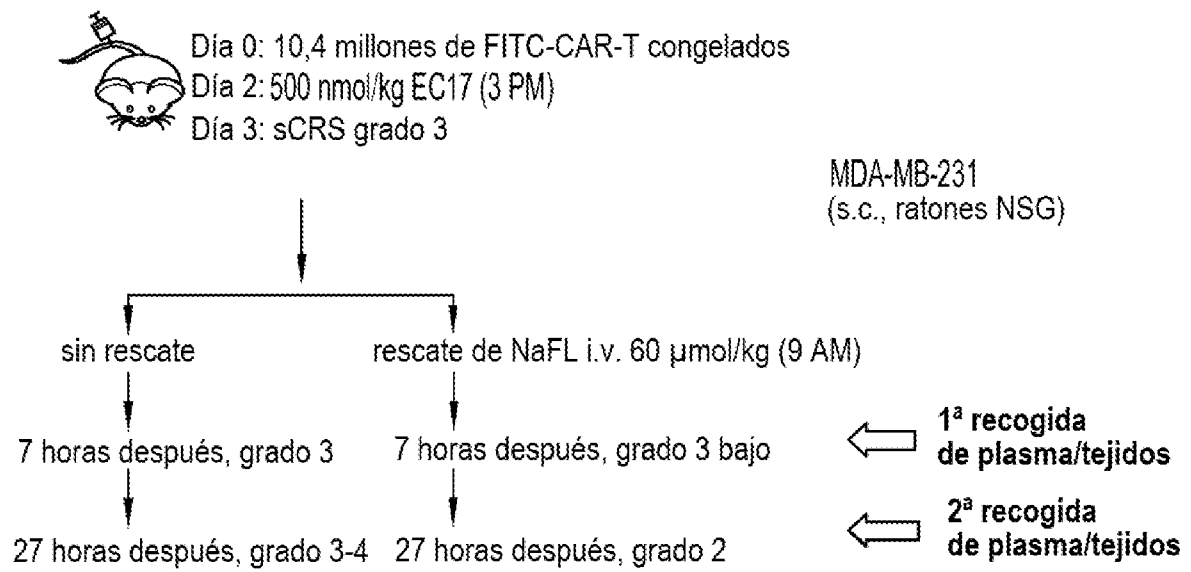


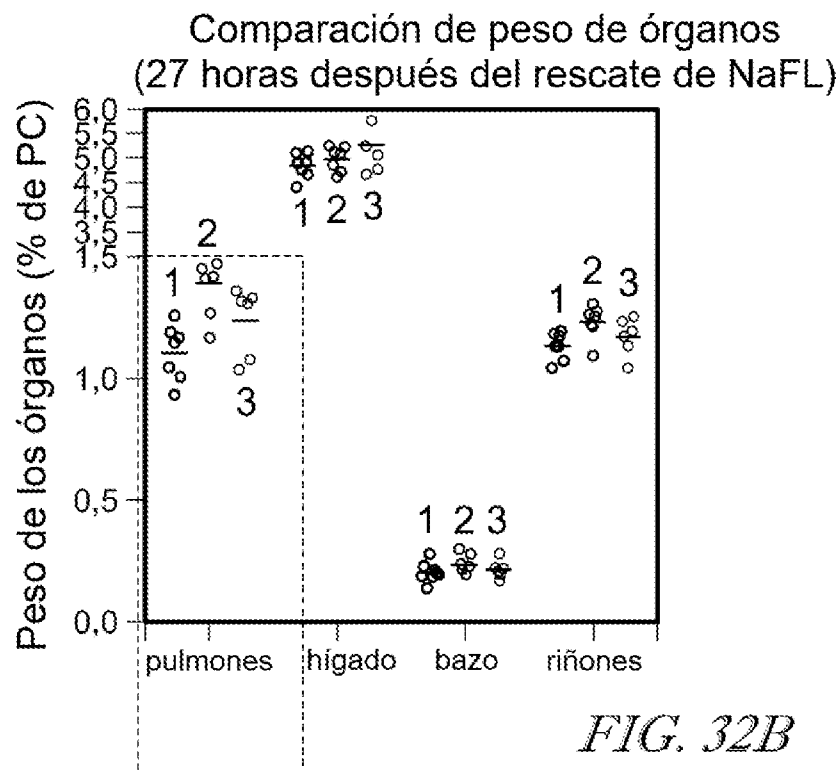
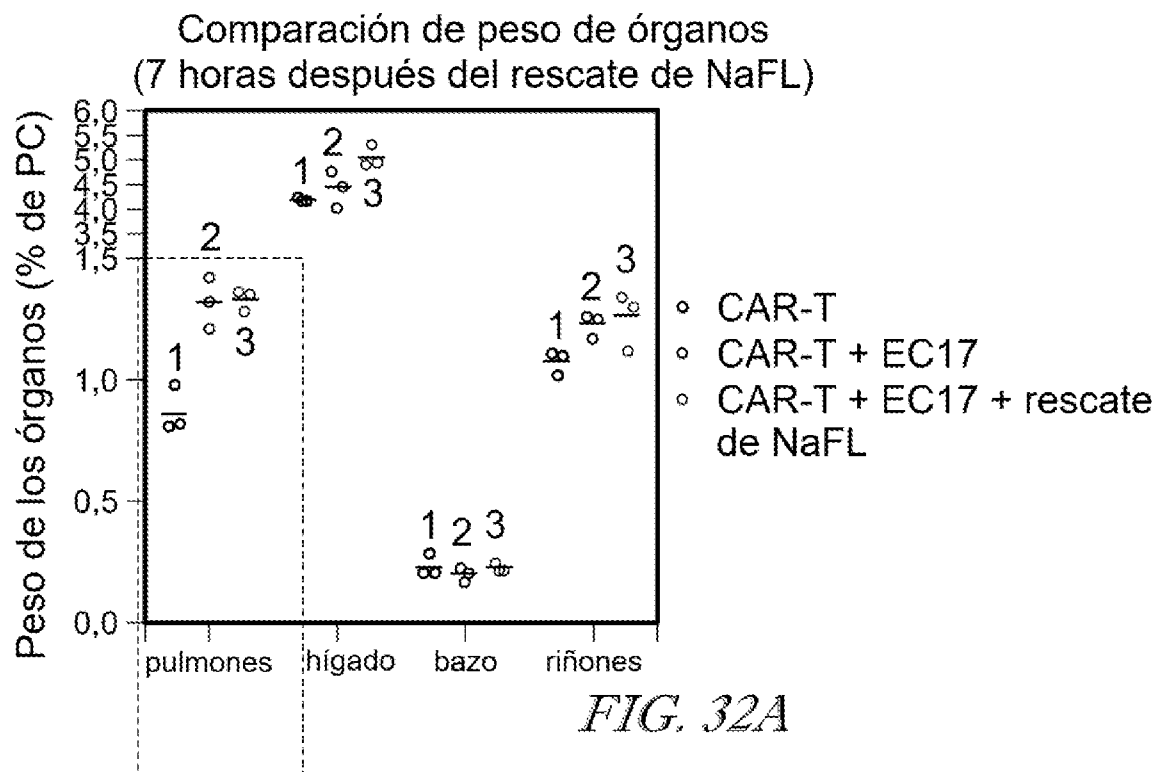
FIG. 30B



Escala de grados de CRS

0	1	2	3	4	5
Normal	~pilo	pilo	pilo, grasiento	moribundo	Muerte
	~grasiento	grasiento	amontonado, delgado	amontonado, pálido	
	todavía activo	menos activo	no activo, a menos que	letárgico	
			se estimule		

FIG. 31



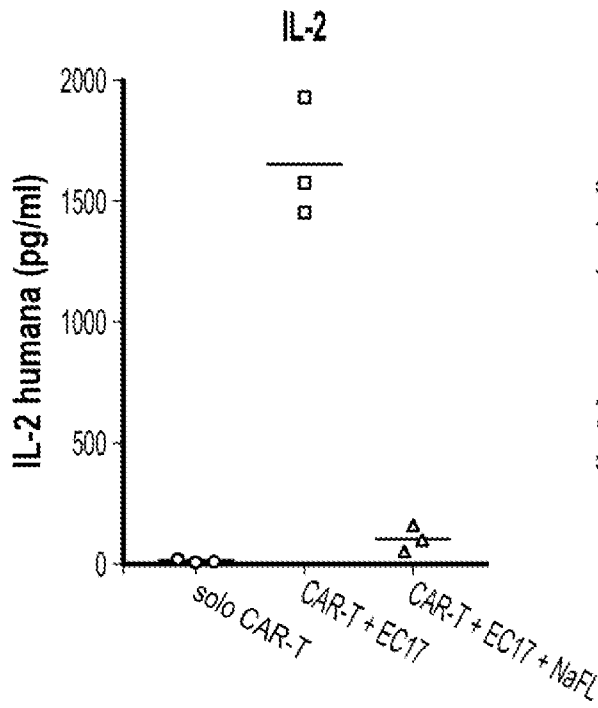


FIG. 33A

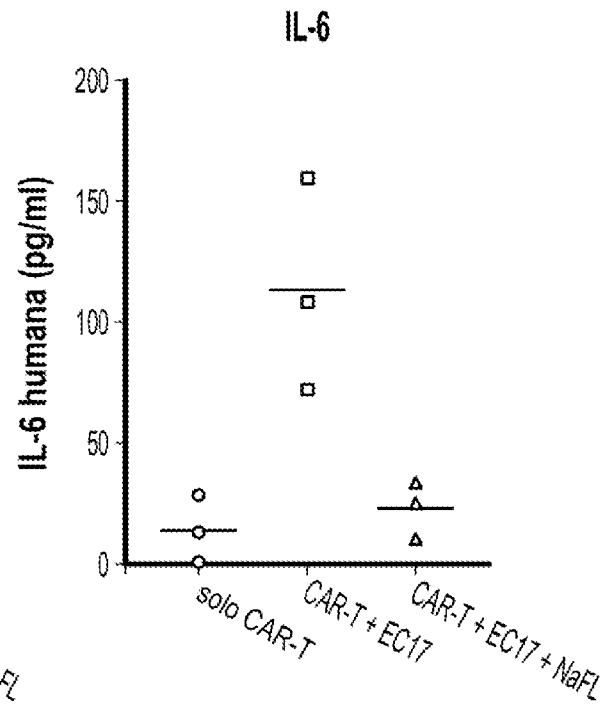


FIG. 33B

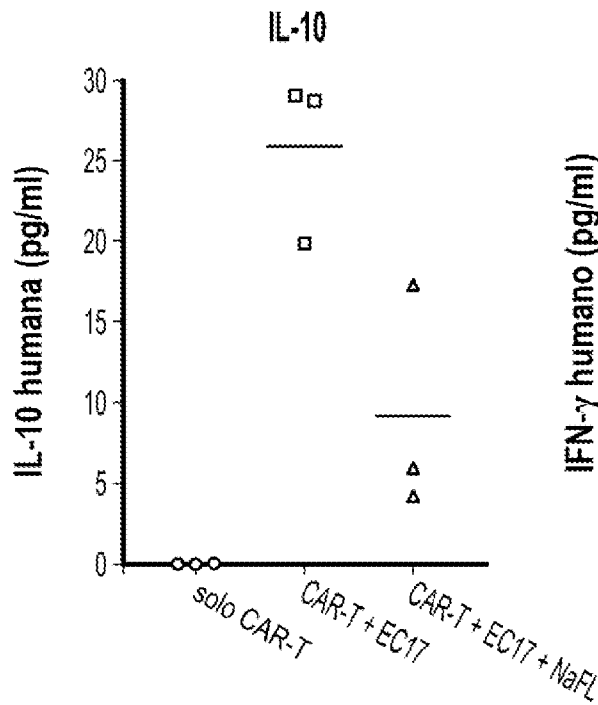


FIG. 33C

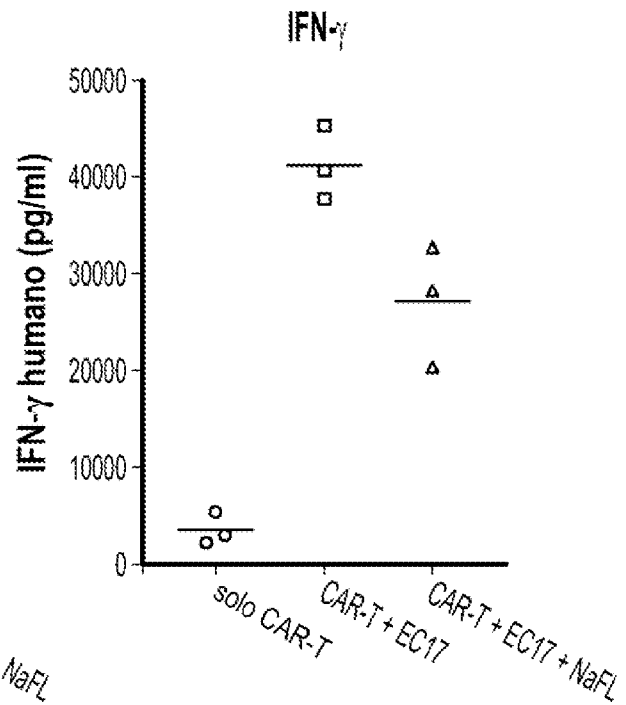


FIG. 33D

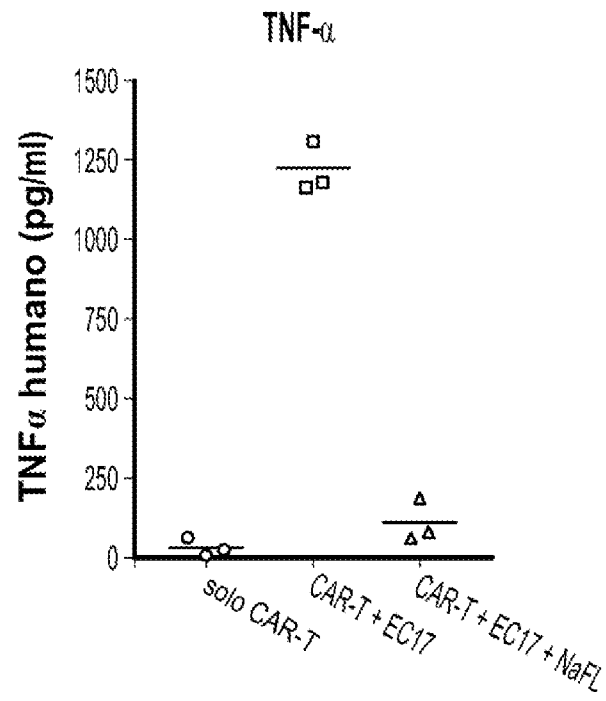


FIG. 33E

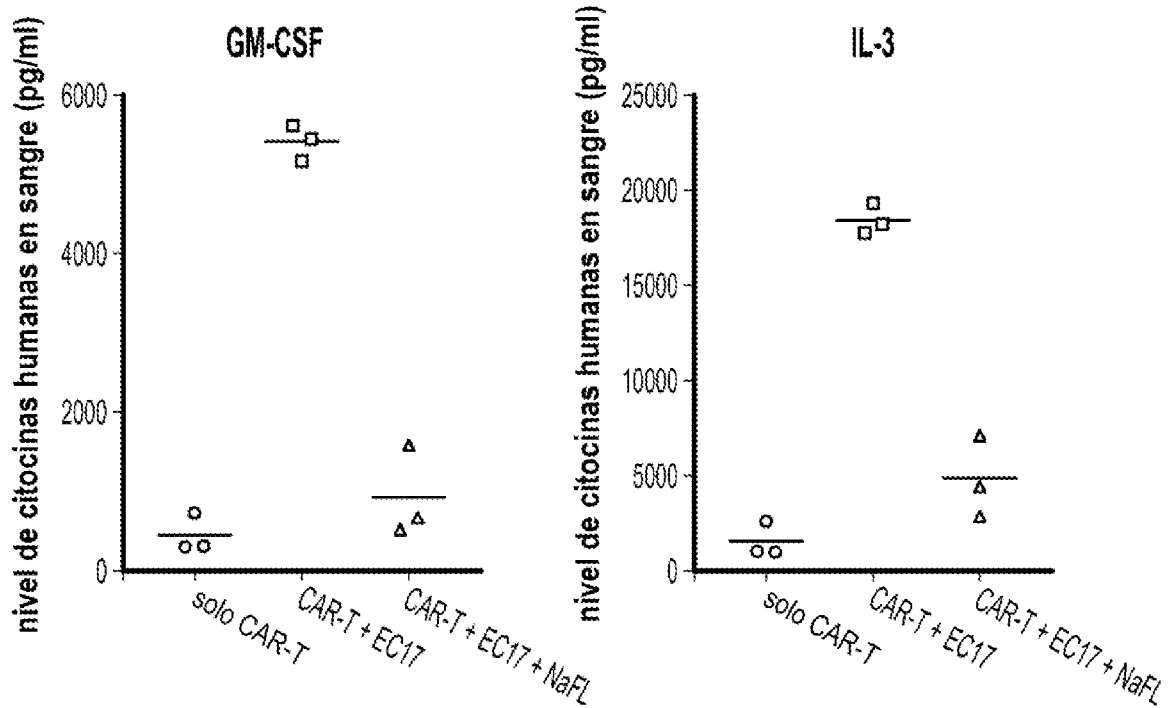
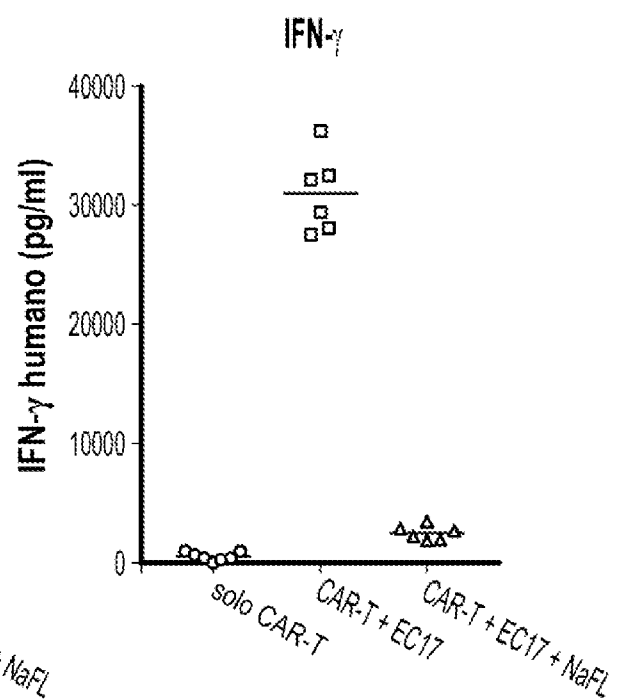
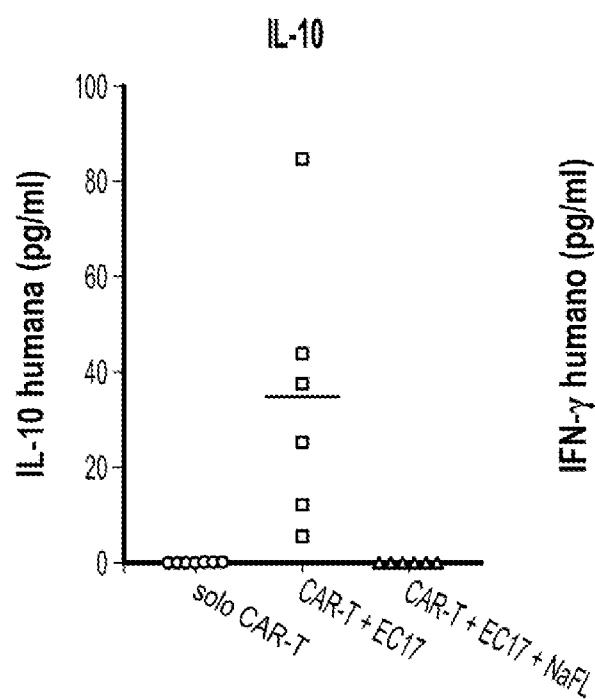
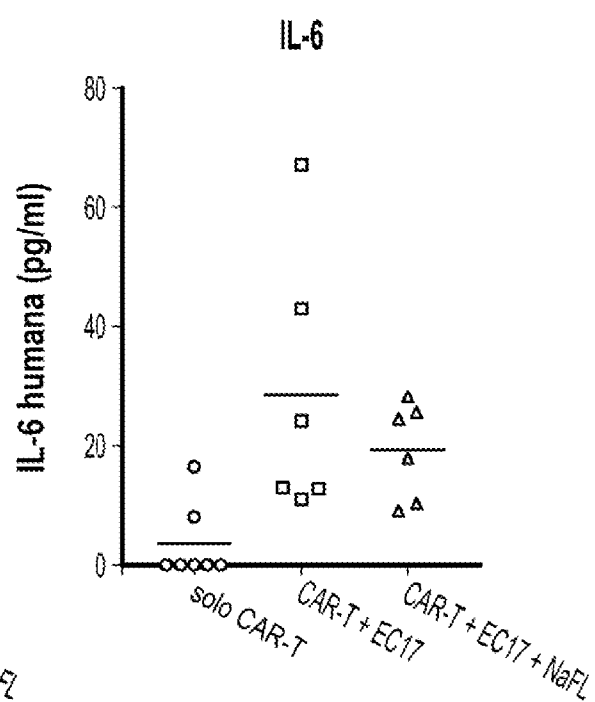
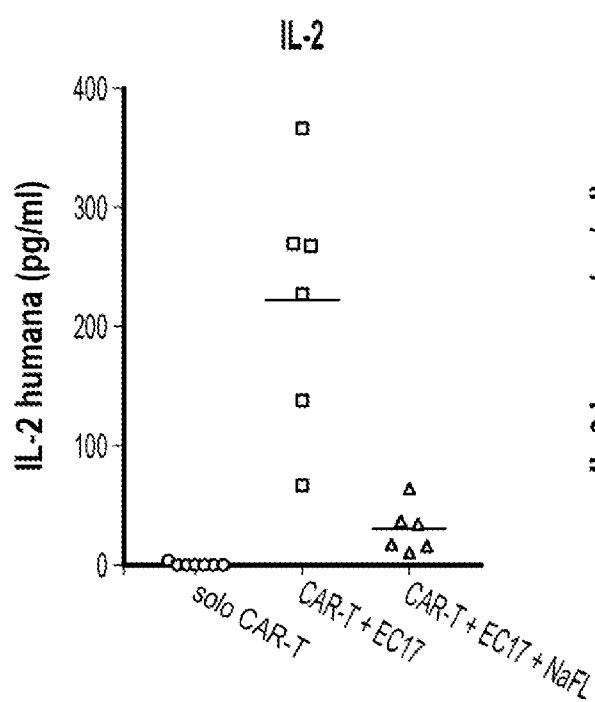
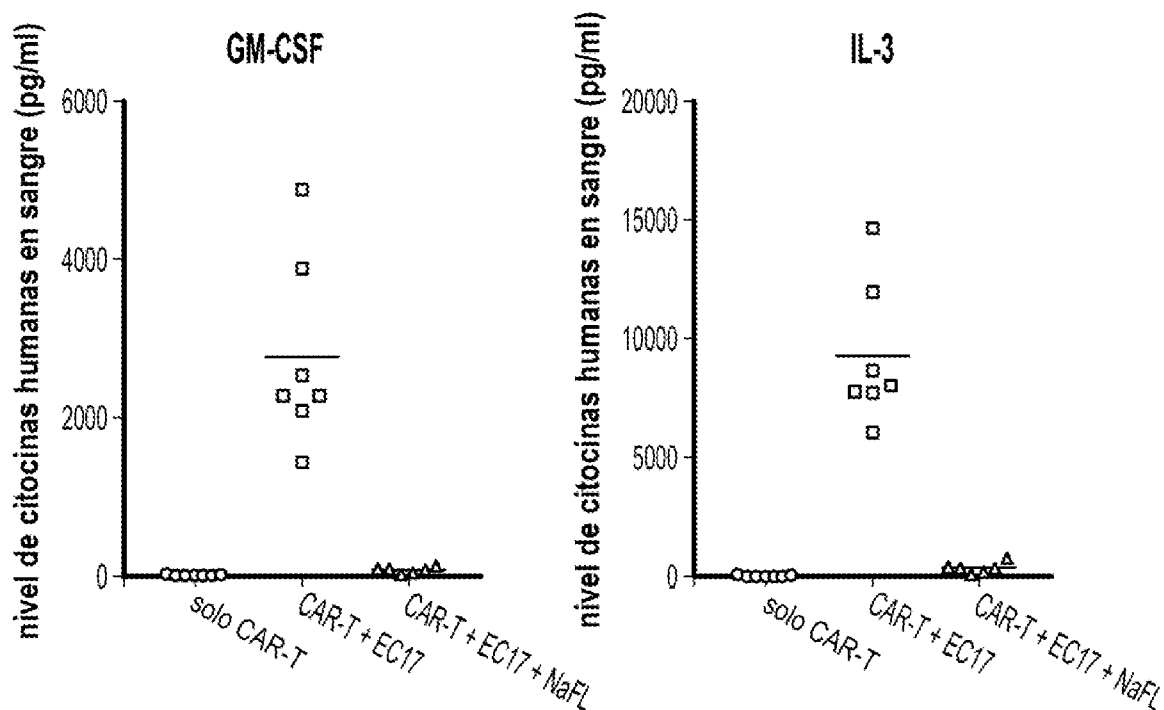
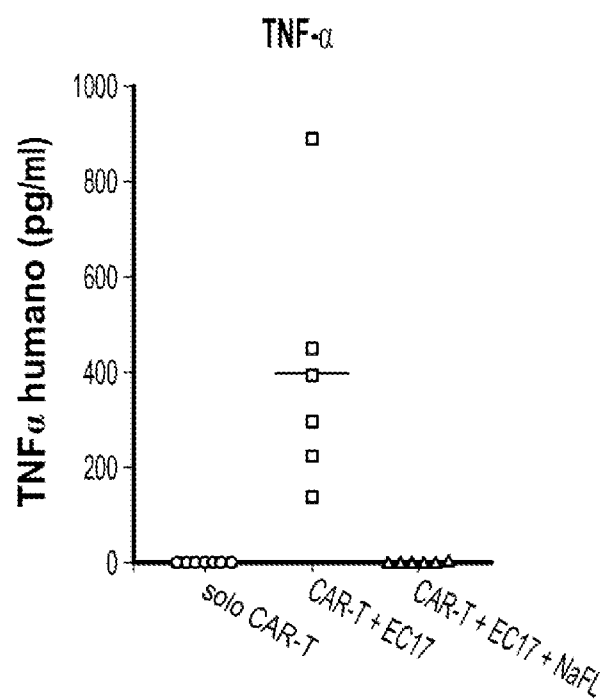


FIG. 33F

FIG. 33G





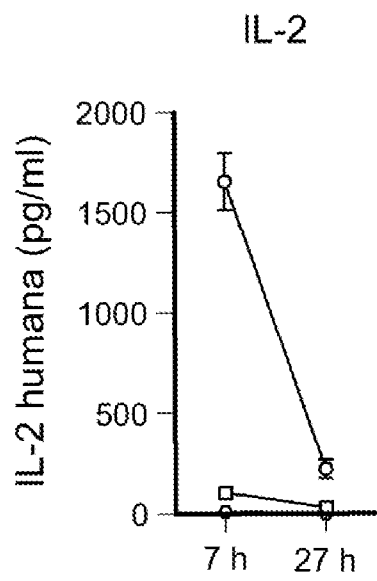


FIG. 35A

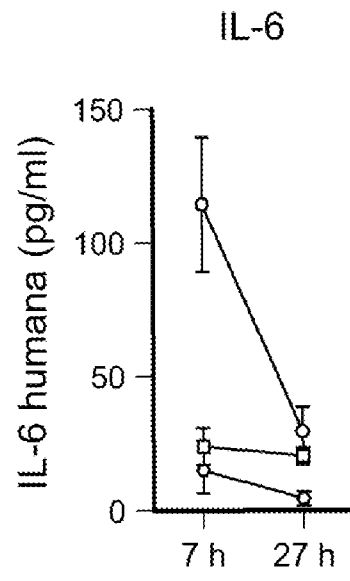


FIG. 35B

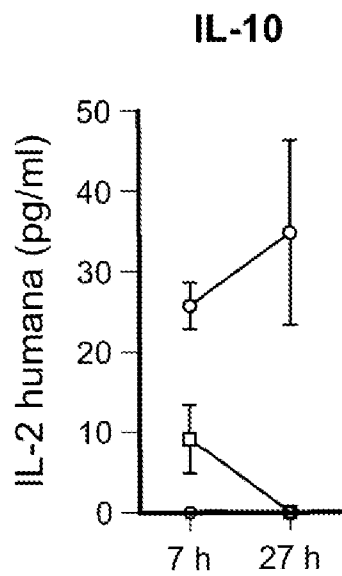


FIG. 35C

- CAR-T + EC17
- CAR-T + EC17 + rescate de NaFL
- ◇ solo CAR-T

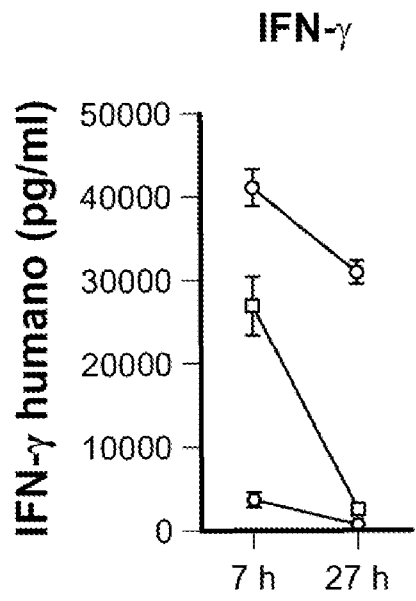


FIG. 35D

- CAR-T + EC17
- ◻ CAR-T + EC17 + rescate de NaFL
- ◊ solo CAR-T

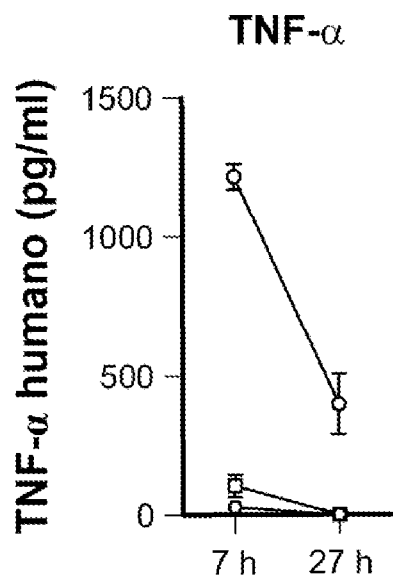


FIG. 35E

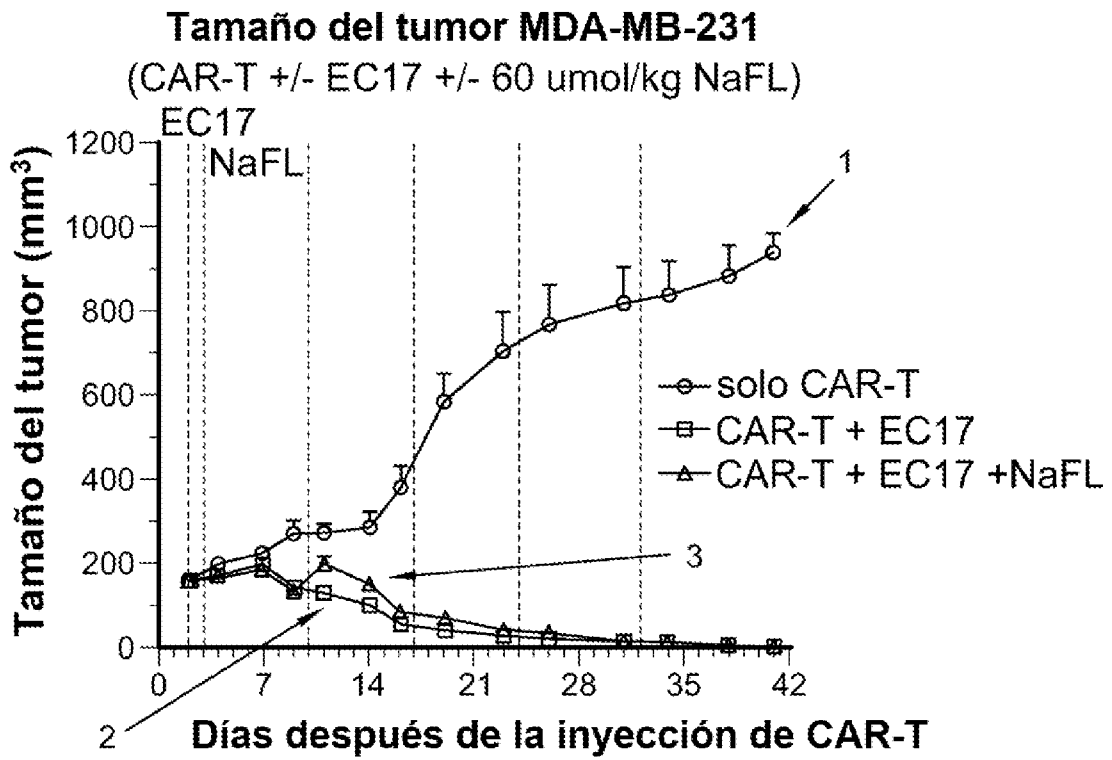


FIG. 36A

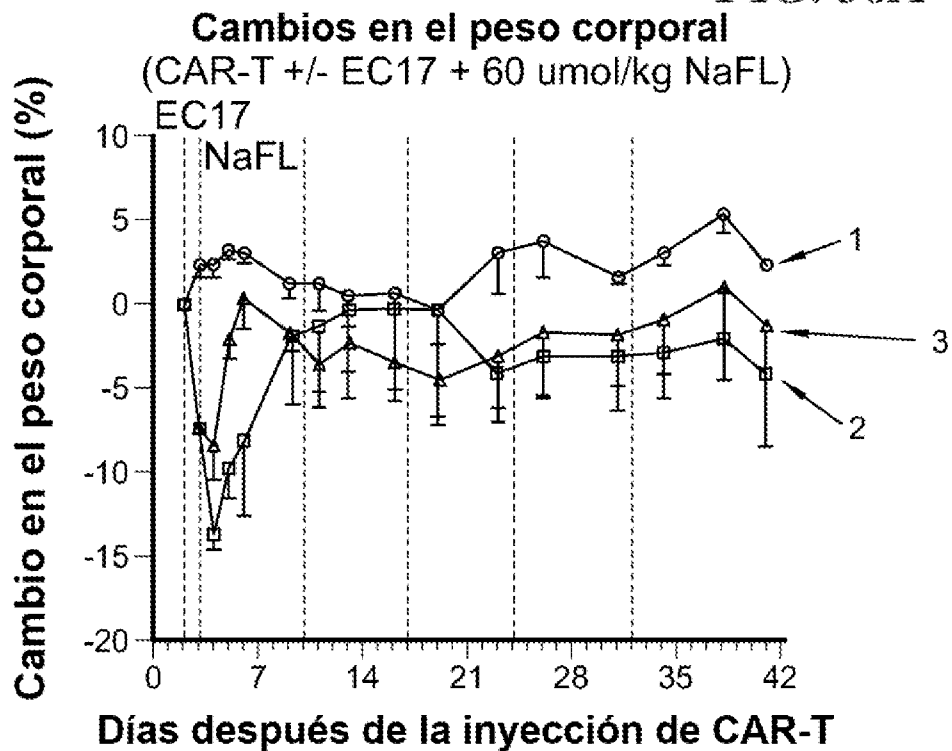
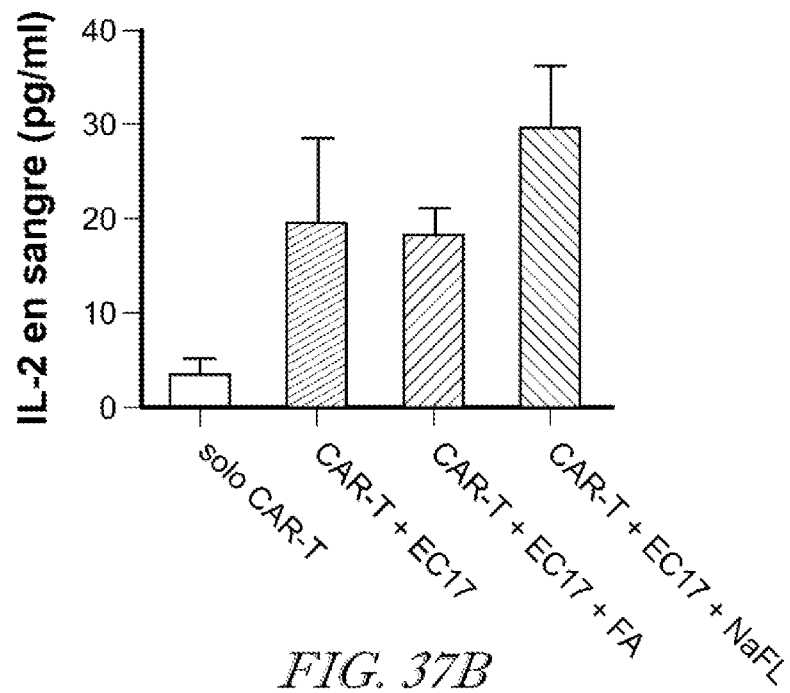
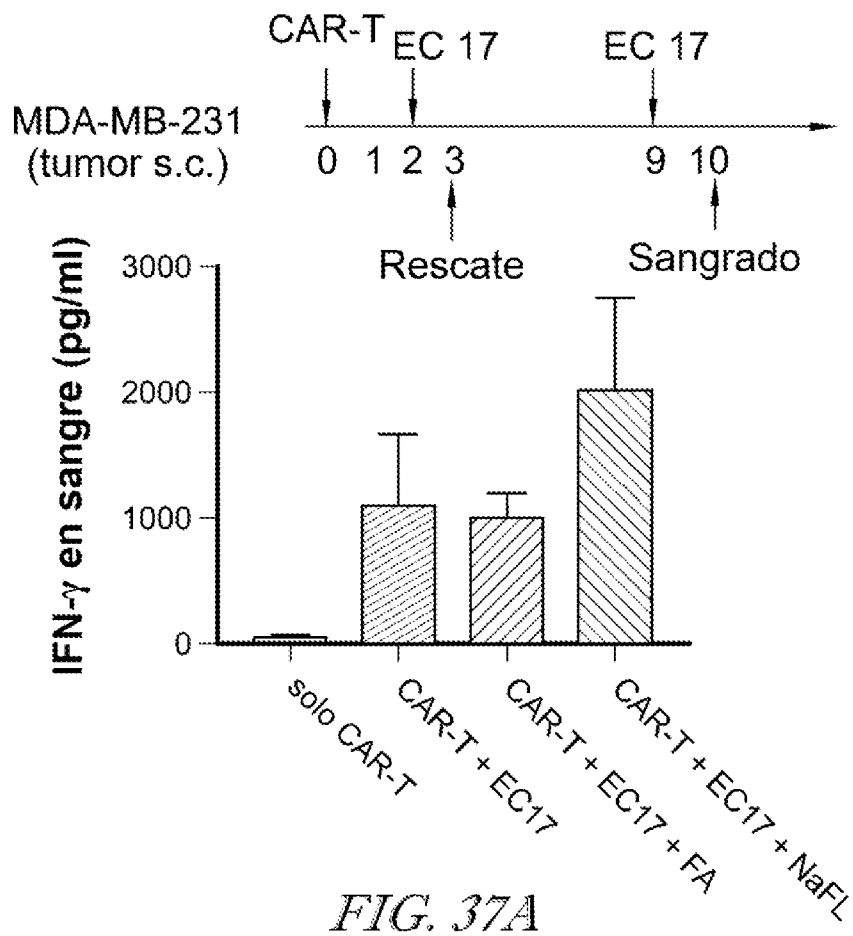


FIG. 36B



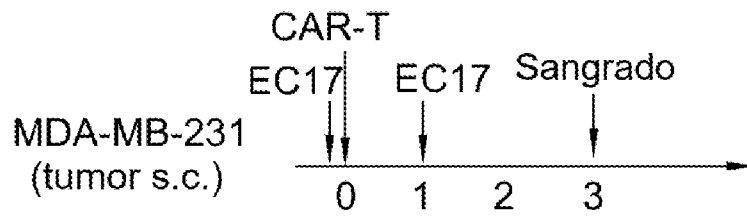


FIG. 38A

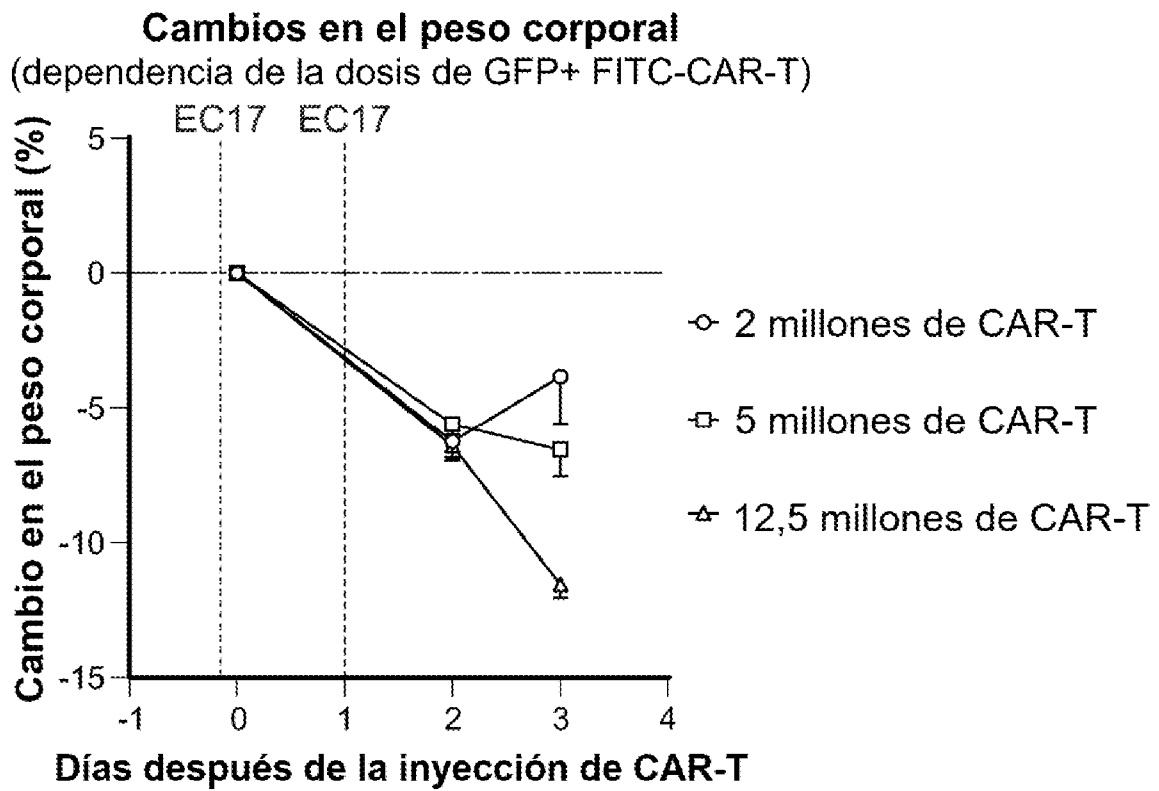


FIG. 38B

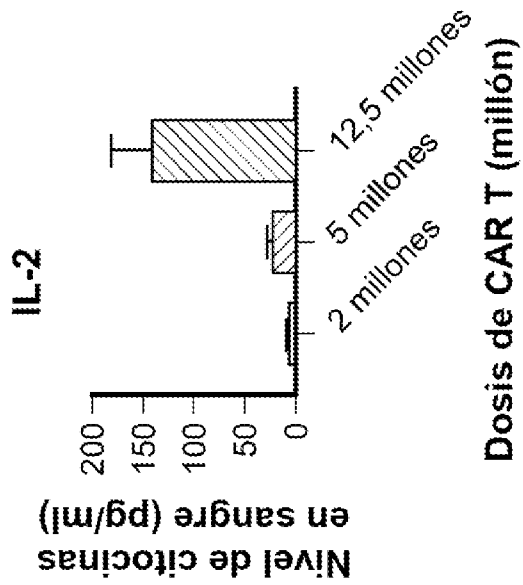


FIG. 39A

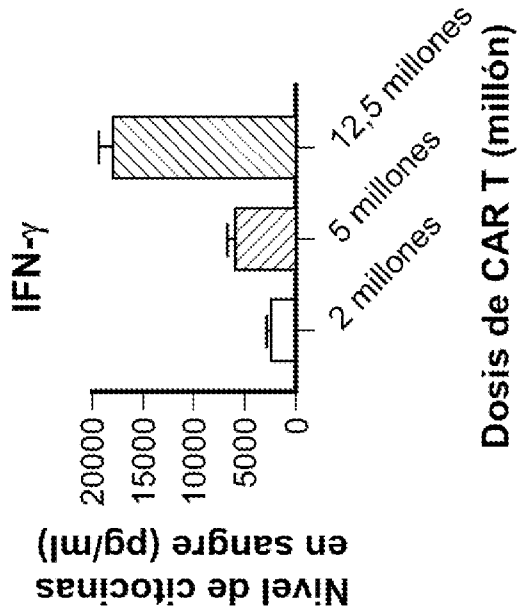


FIG. 39B

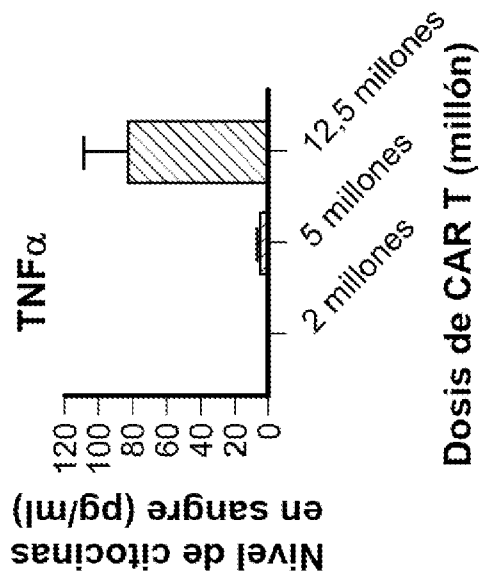


FIG. 39C

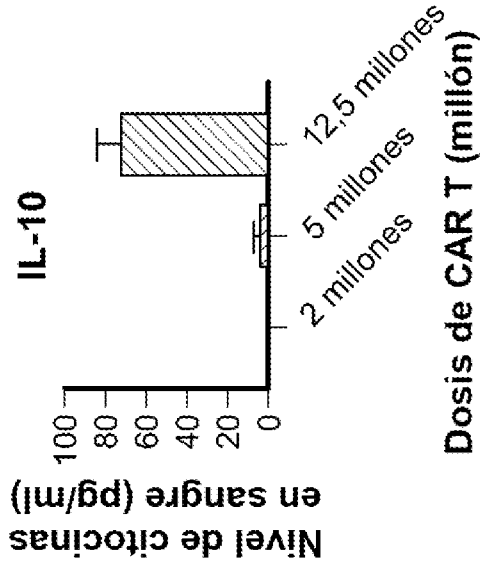


FIG. 39D

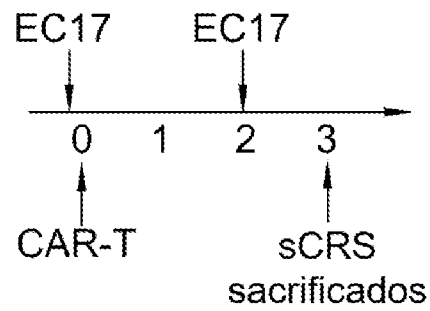
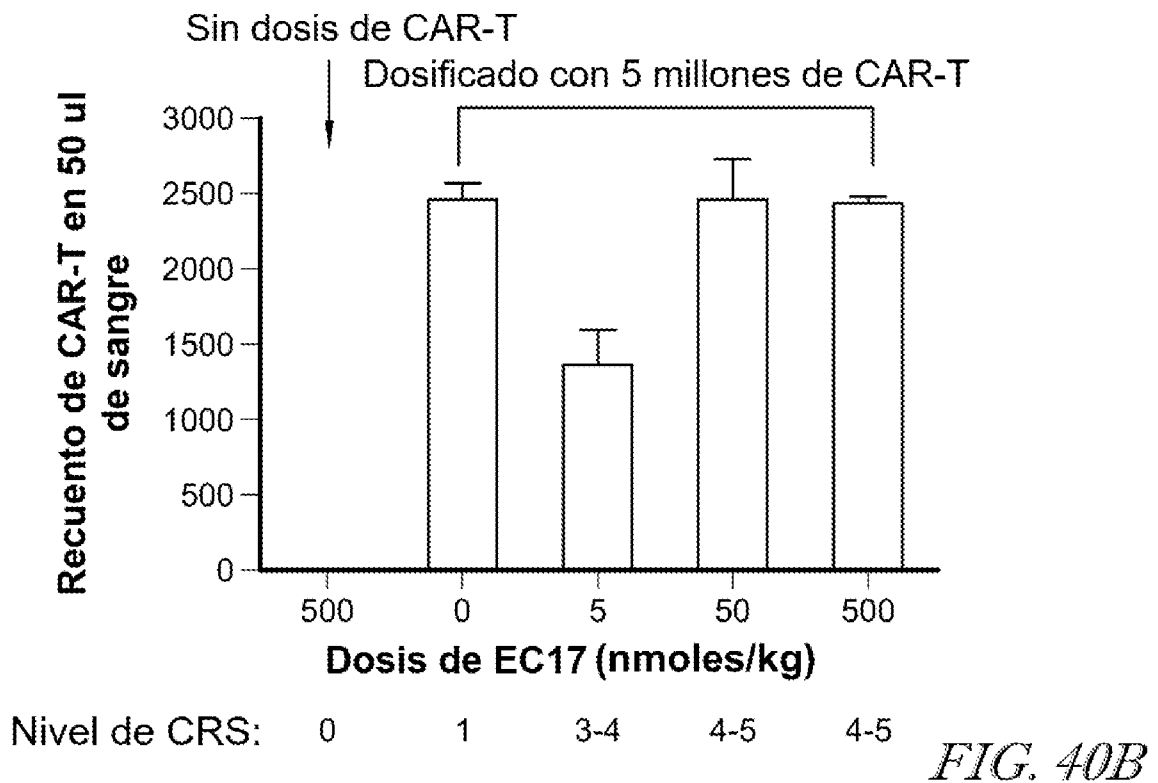


FIG. 40A

**Recuento de CAR-T dependiente de la dosis de EC17
en sangre de ratón**



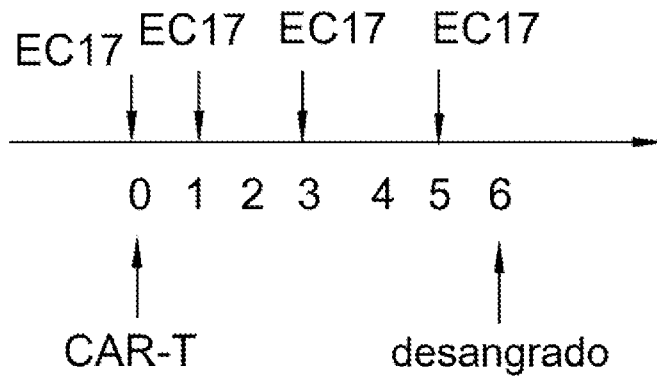
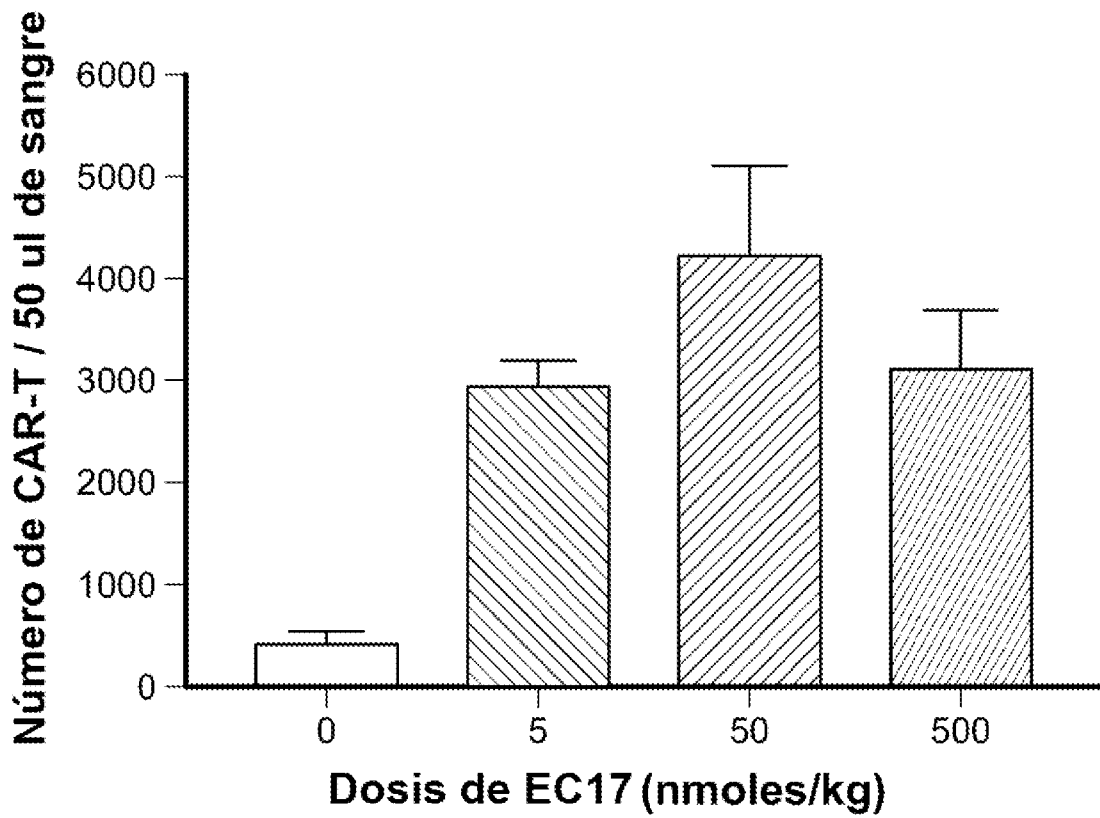


FIG. 41A



*modelo s.c. MDA-MB-231

FIG. 41B

- ratones sin tratamiento previo: 5 millones de CAR-T sin EC17
- ratones sin tratamiento previo: 5 millones de CAR-T + EC17 TIW
- Ratones con tumor: 5 millones de CAR-T sin EC17
- ◇ Ratones con tumor: 5 millones de CAR-T + EC17 TIW

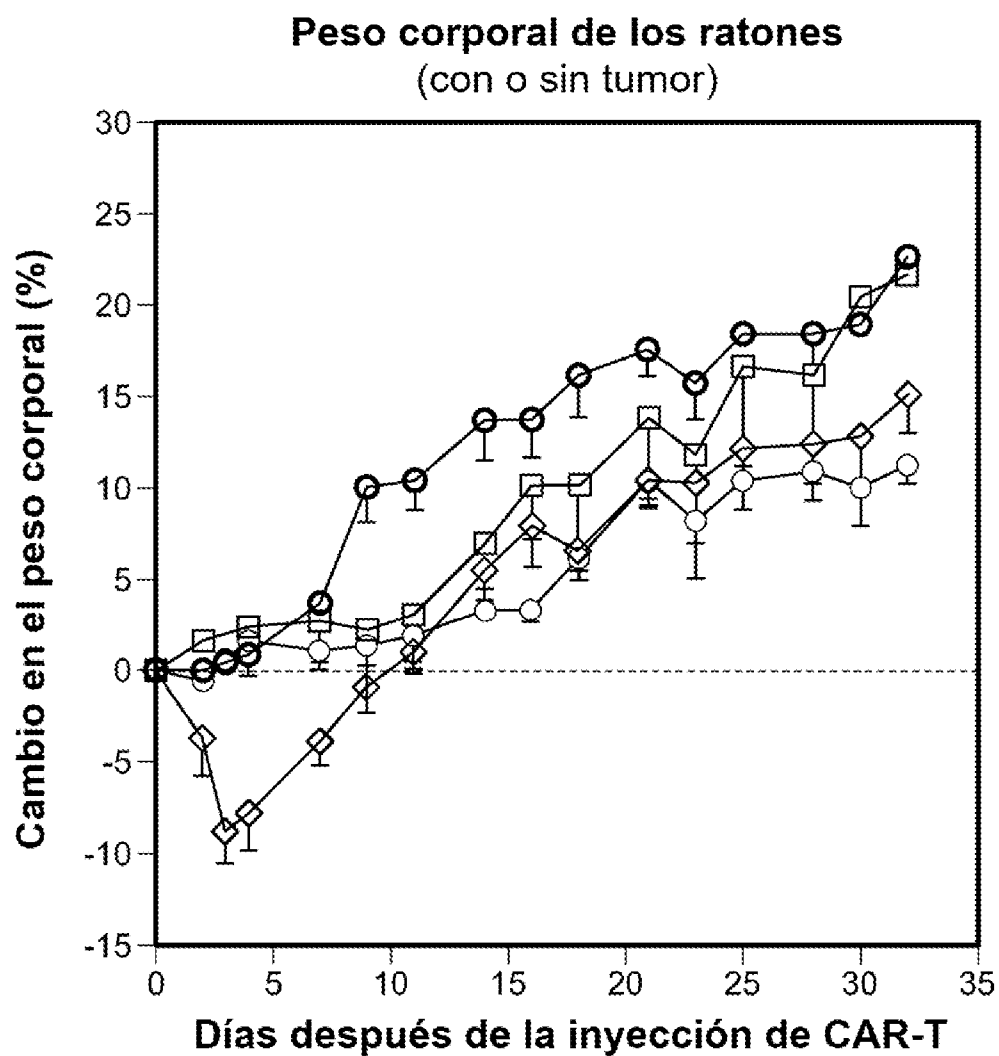


FIG. 42

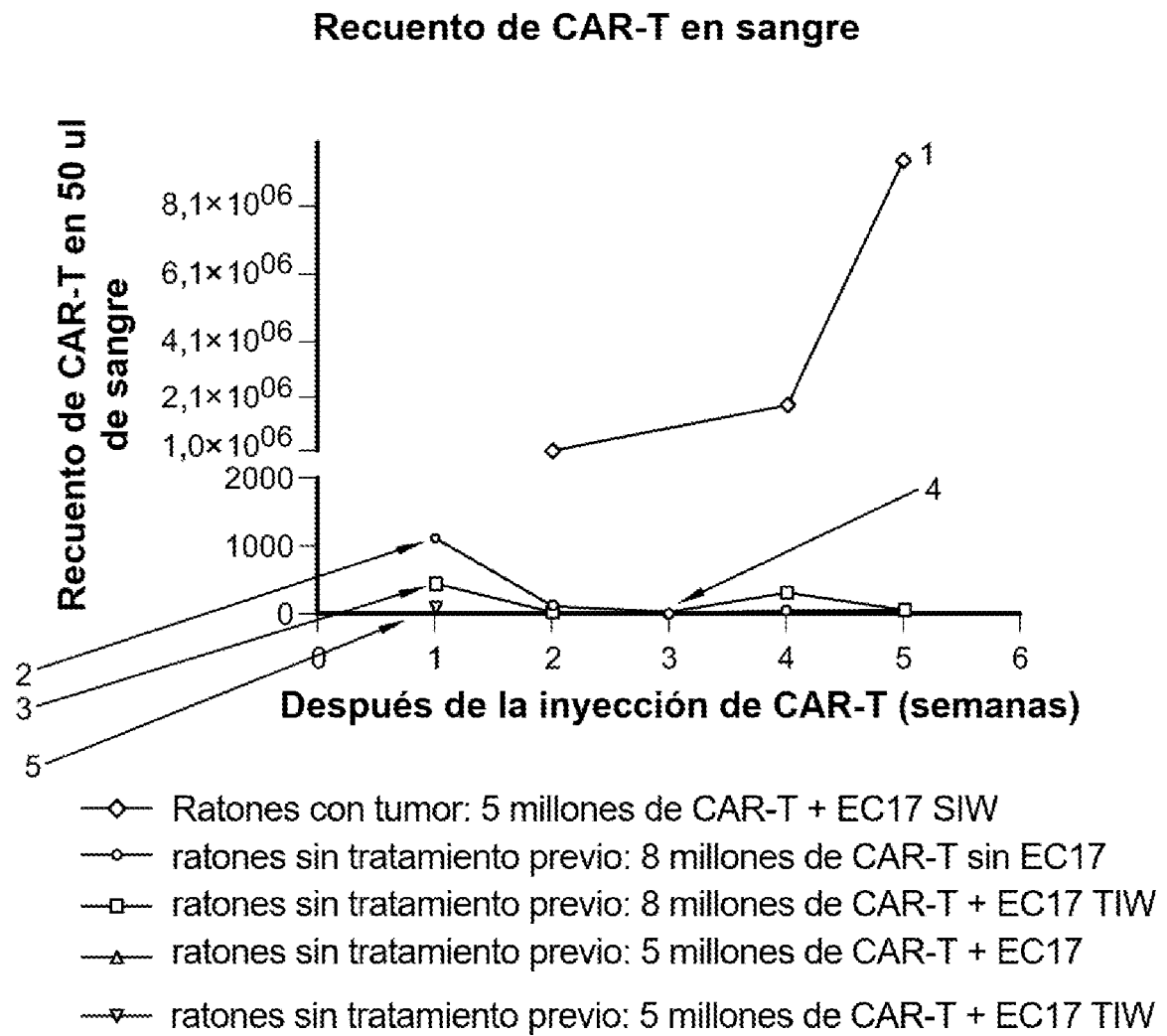


FIG. 43A

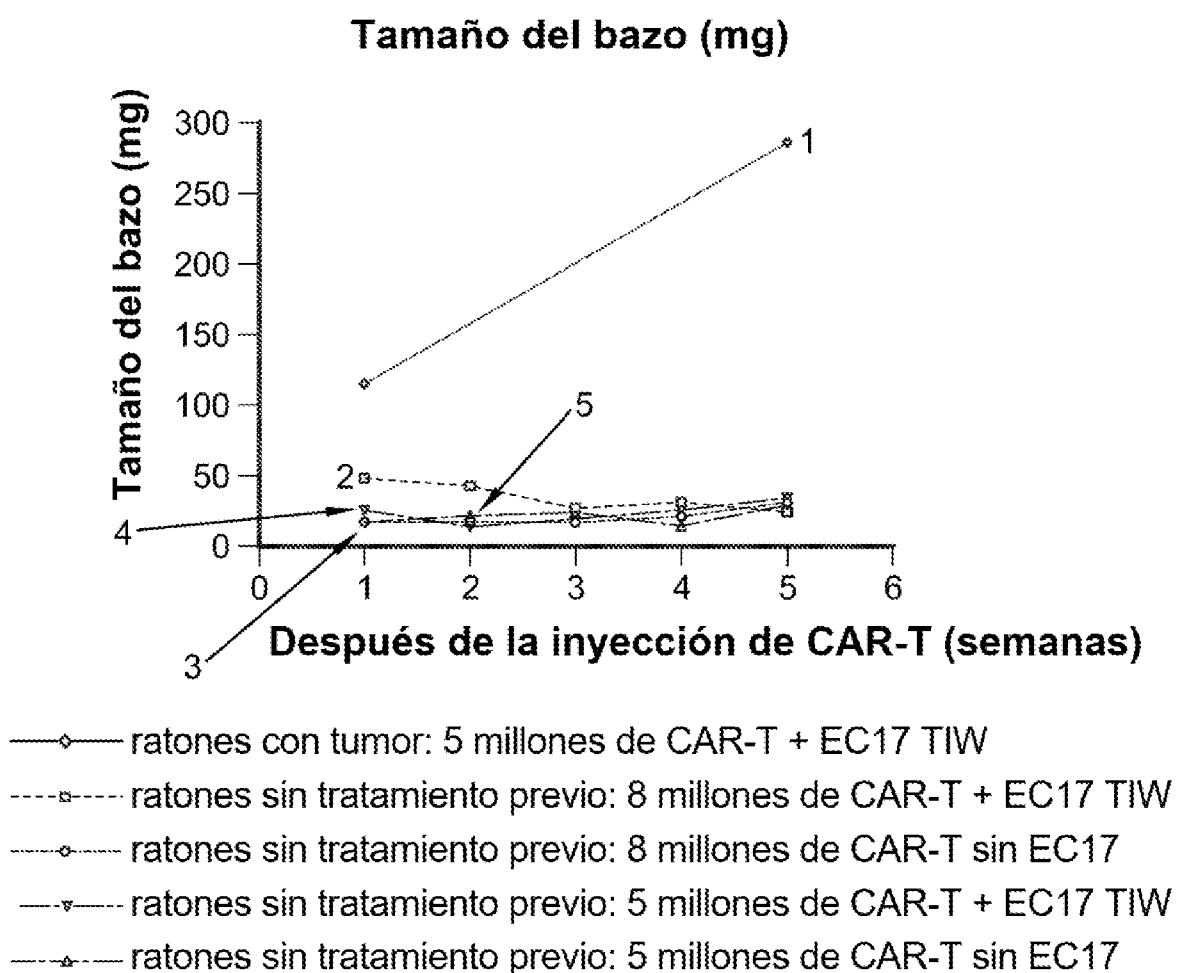


FIG. 43B

**Nivel de citocinas: 1 semana después
de la inyección de CAR-T**

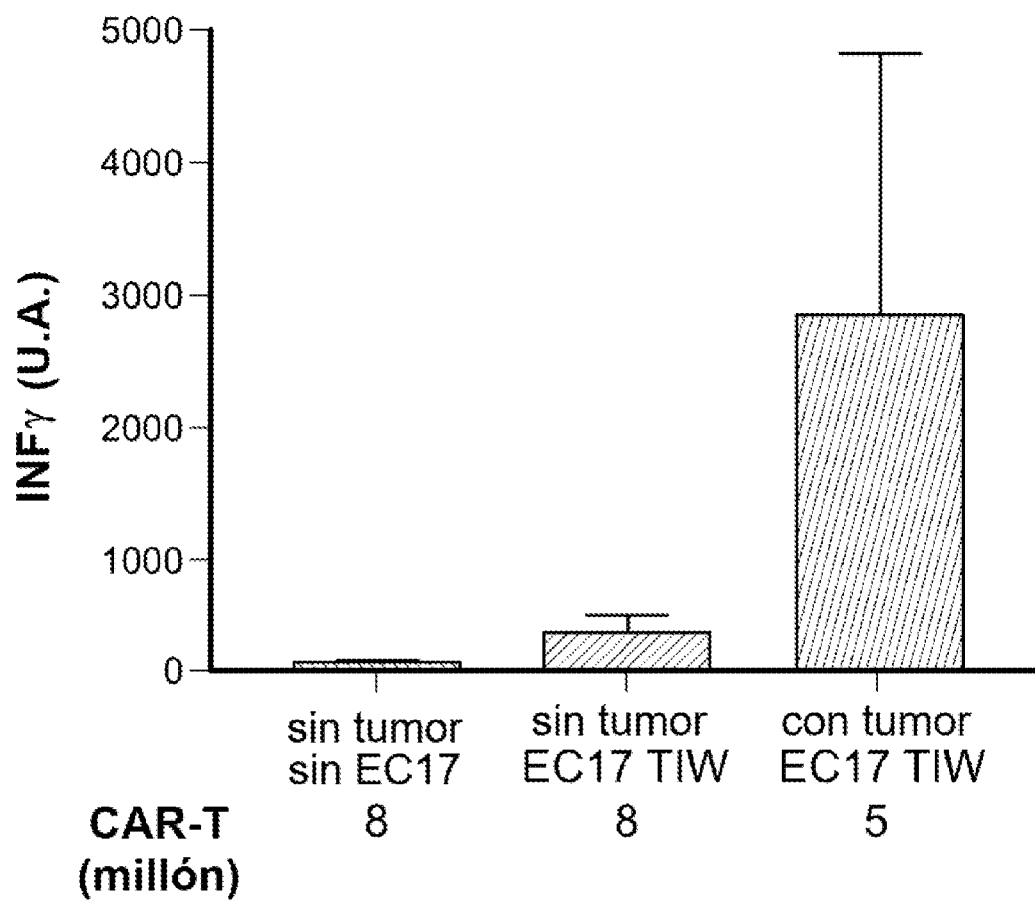


FIG. 44

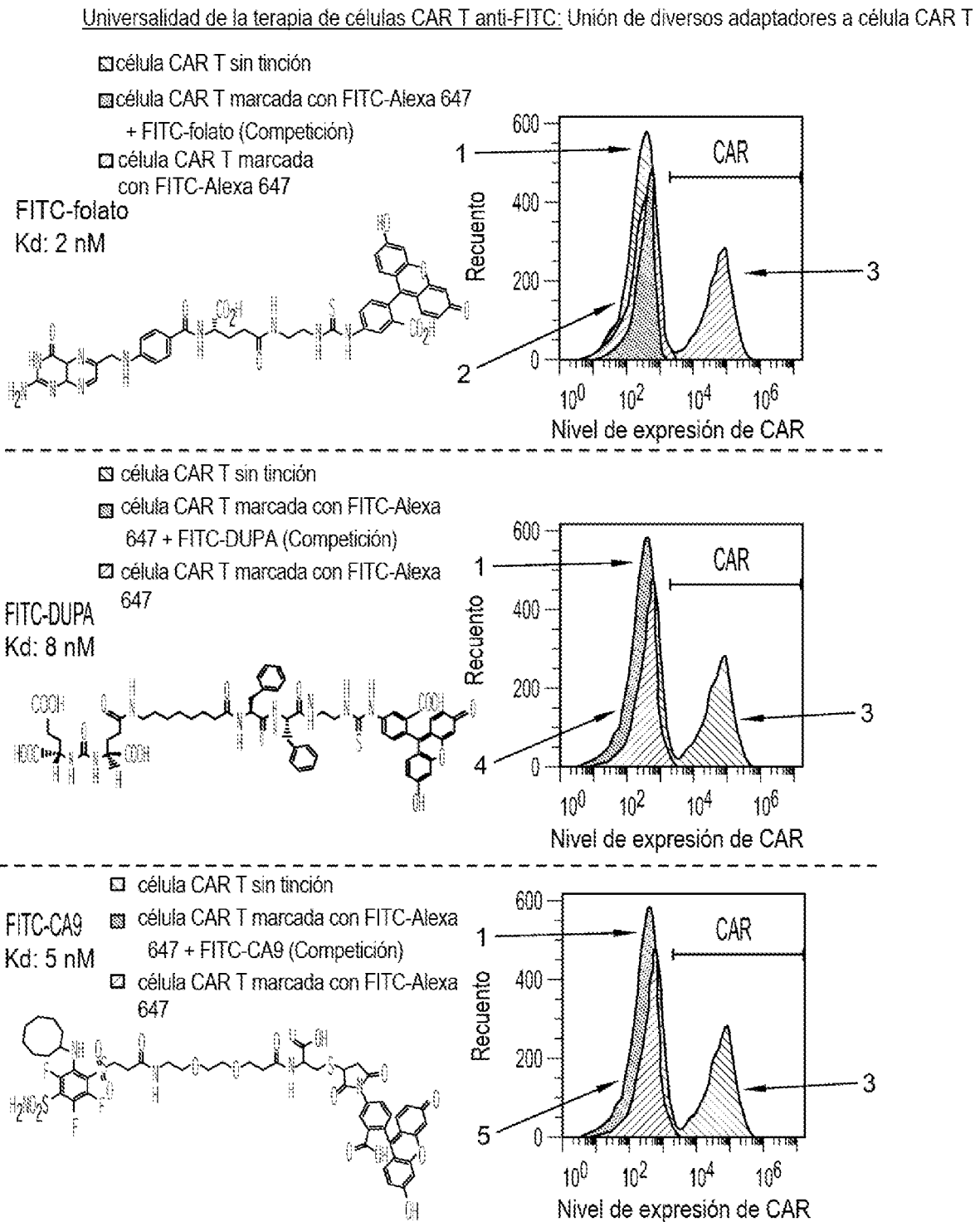


FIG. 45

Universalidad de la terapia de células CAR T anti-FITC:
Flexibilidad y especificidad del adaptador

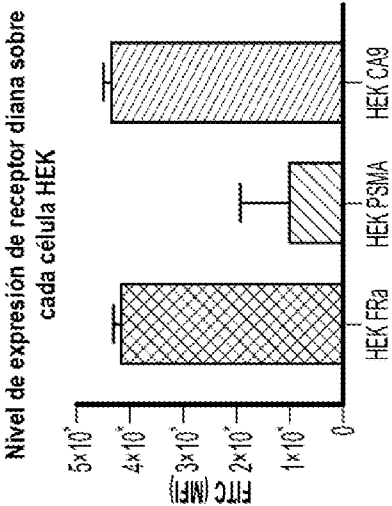


FIG. 46A

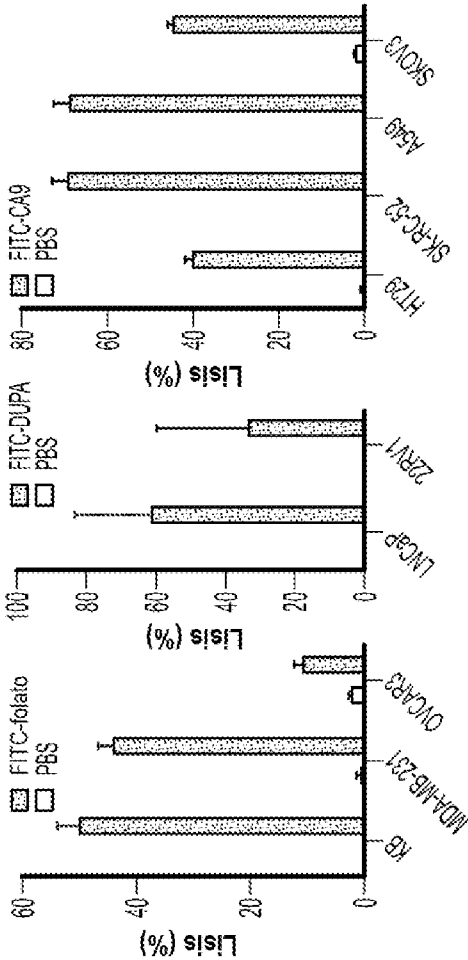
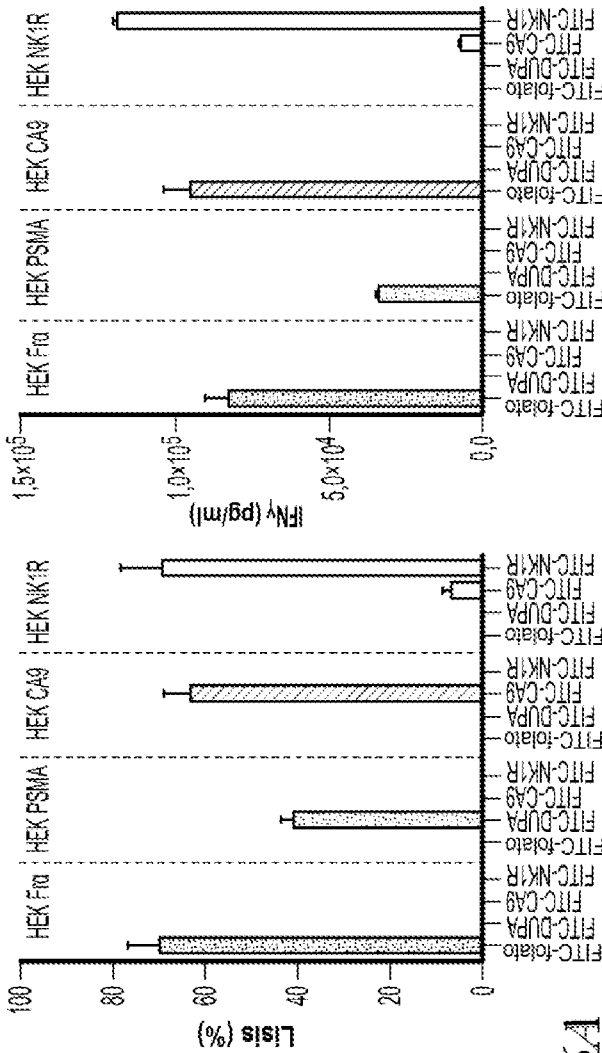


FIG. 46B

Universalidad de la terapia de células CAR T anti-FITC: Todos los adaptadores se comportan de forma similar

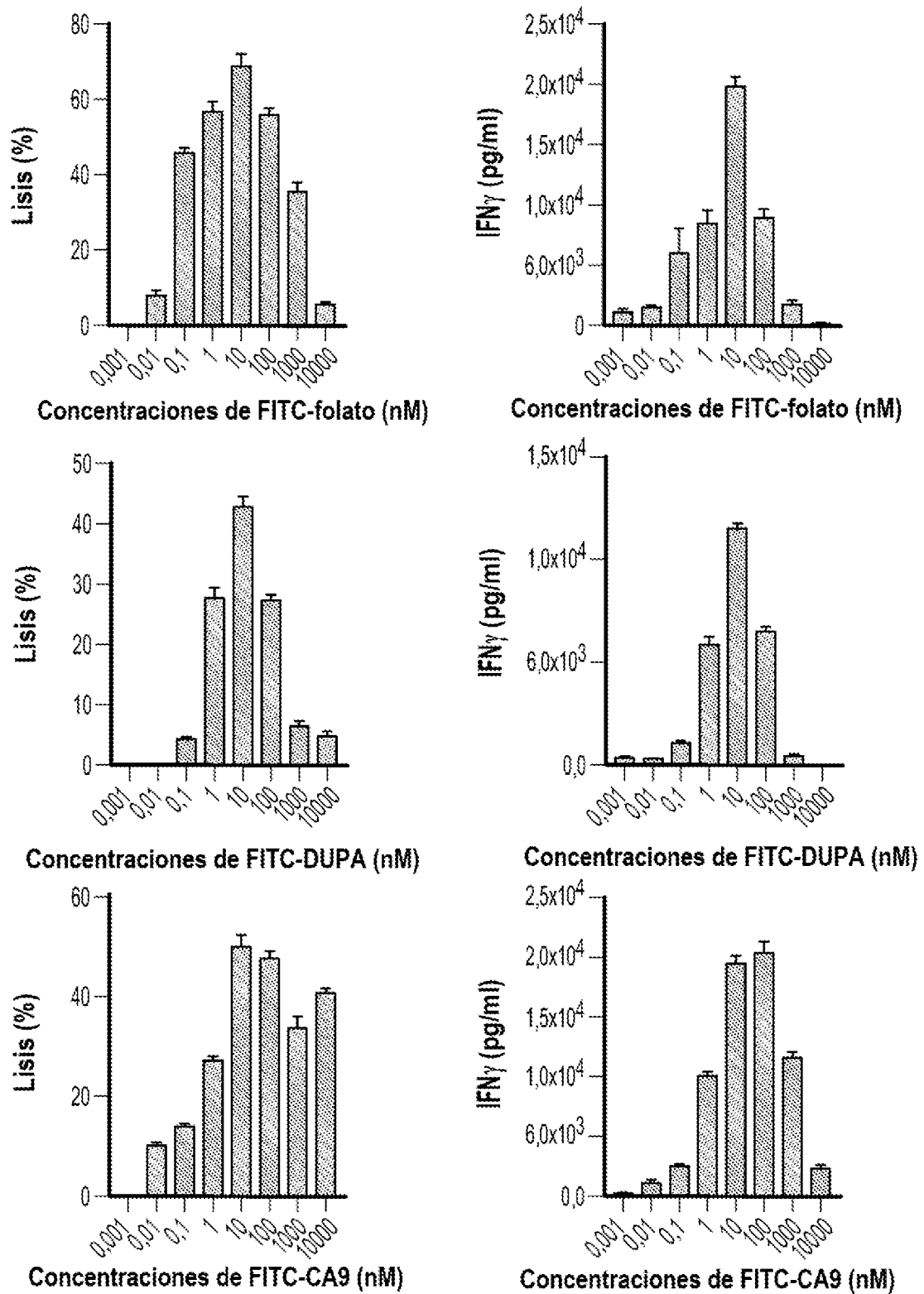


FIG. 47

Universalidad de la terapia de células CAR T anti-FITC: Todos los adaptadores pueden eliminar tumores *in vivo*

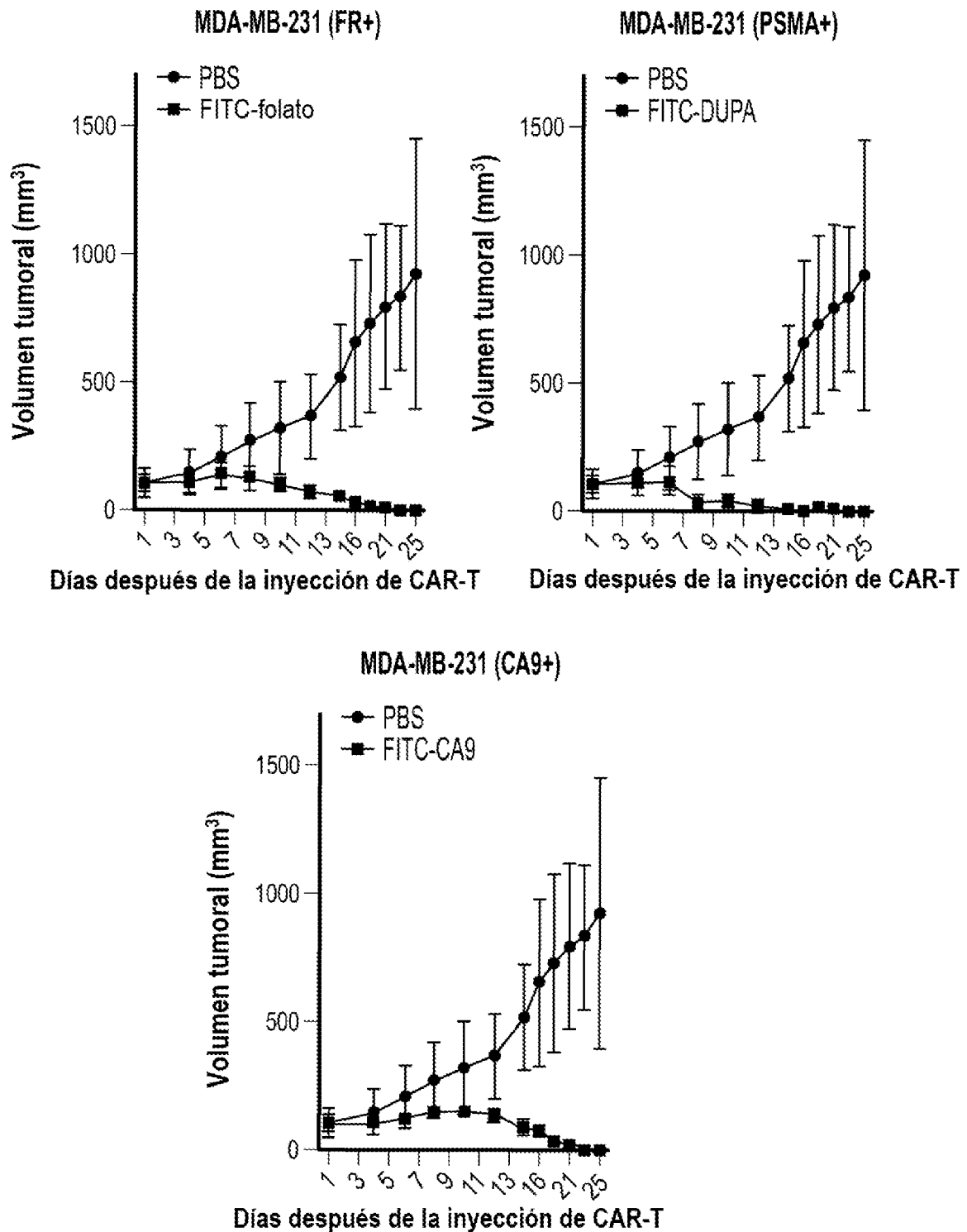
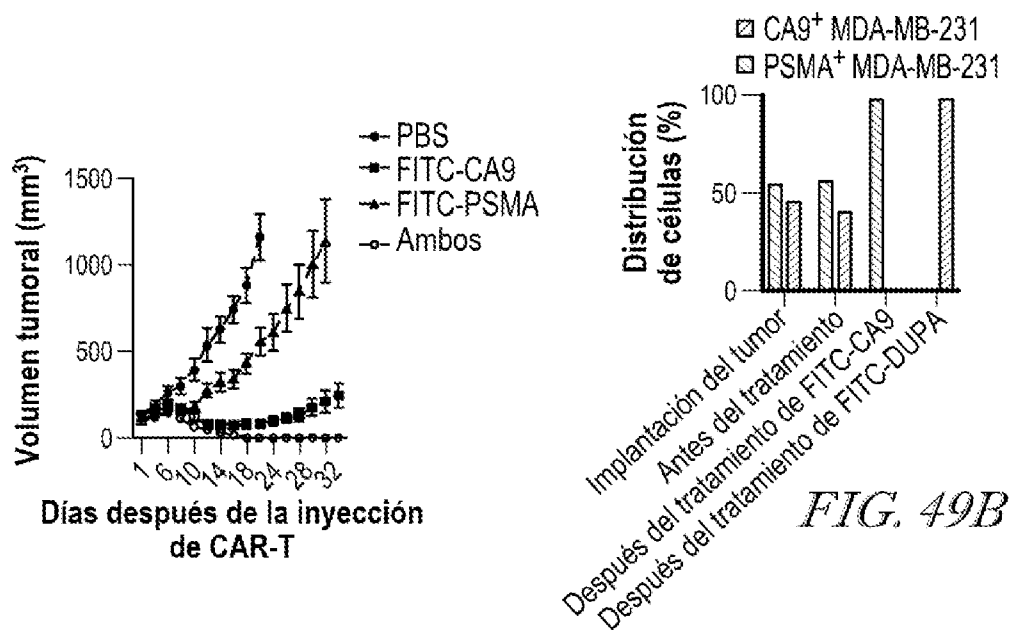
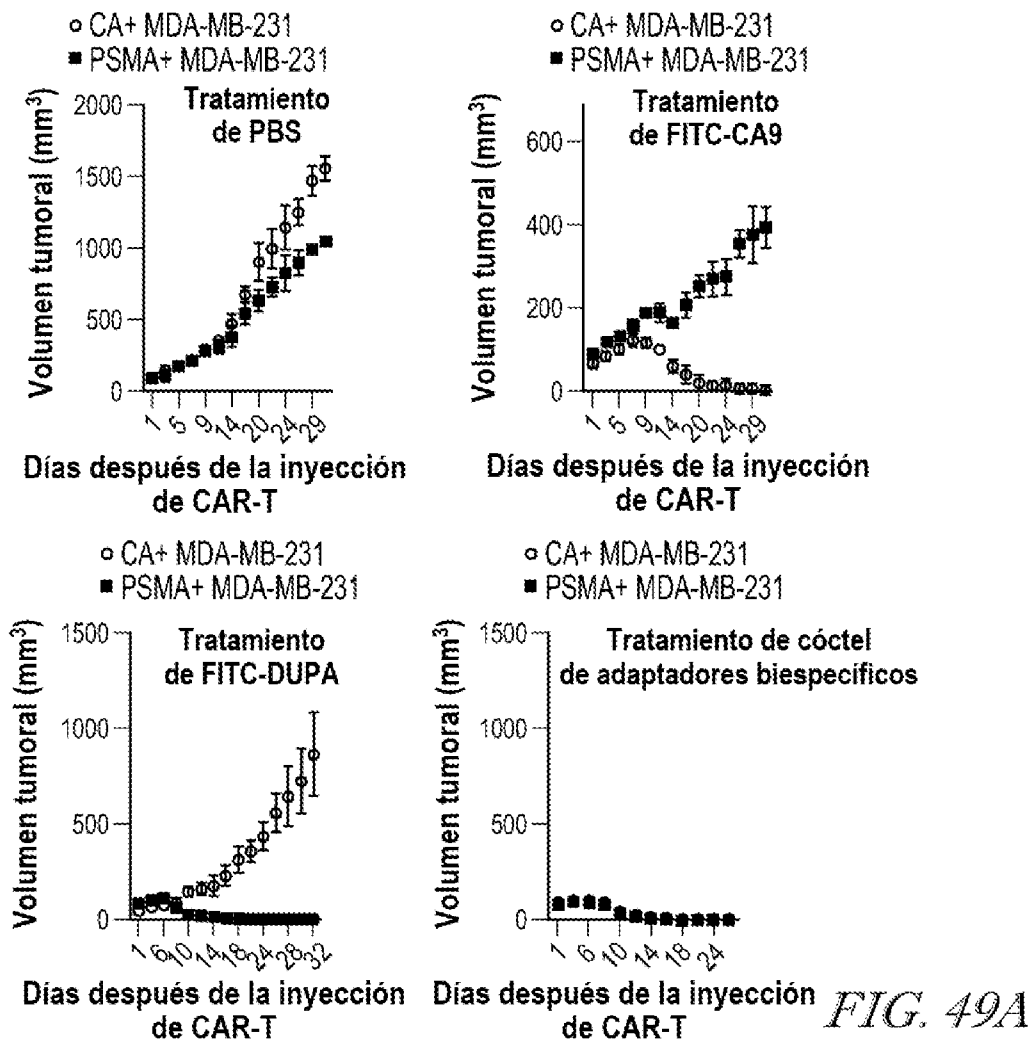


FIG. 48



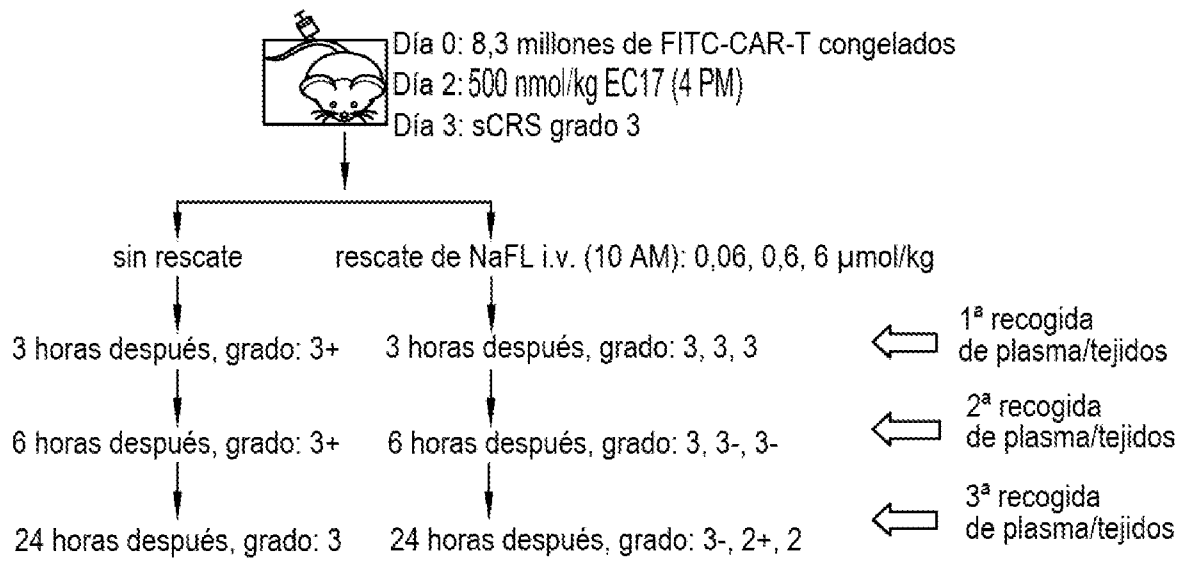
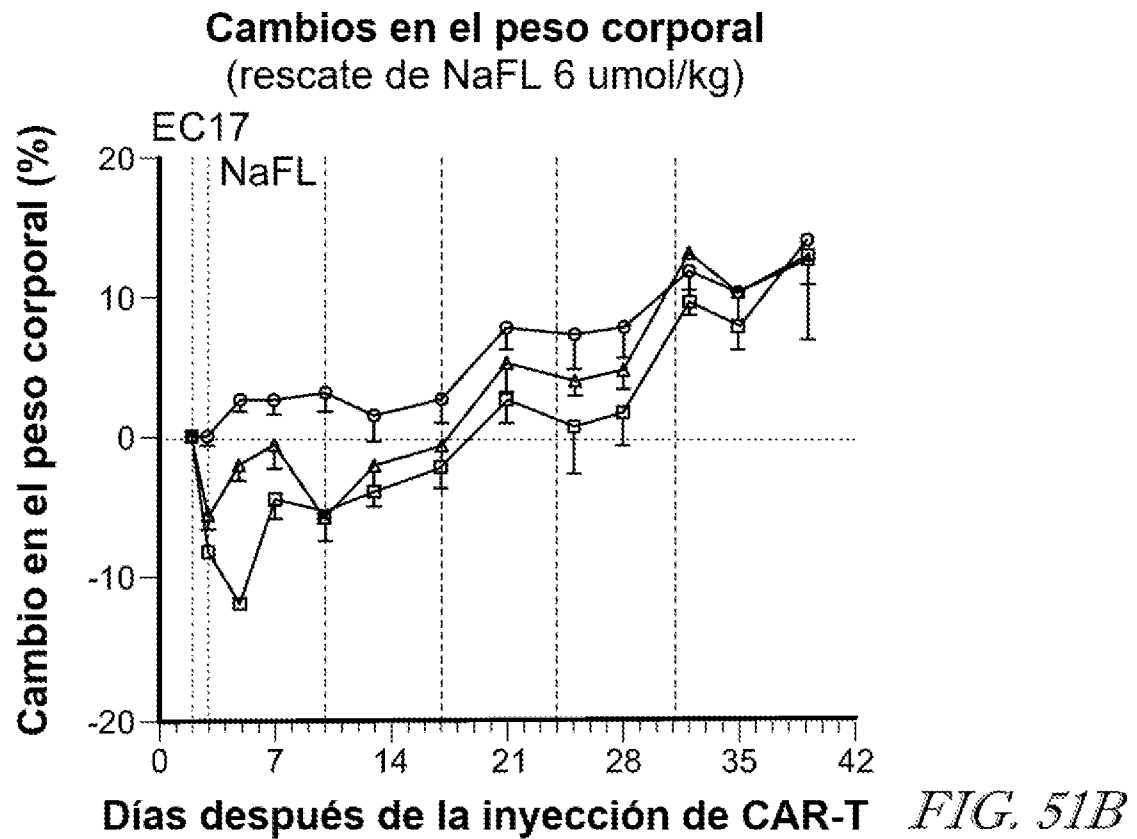
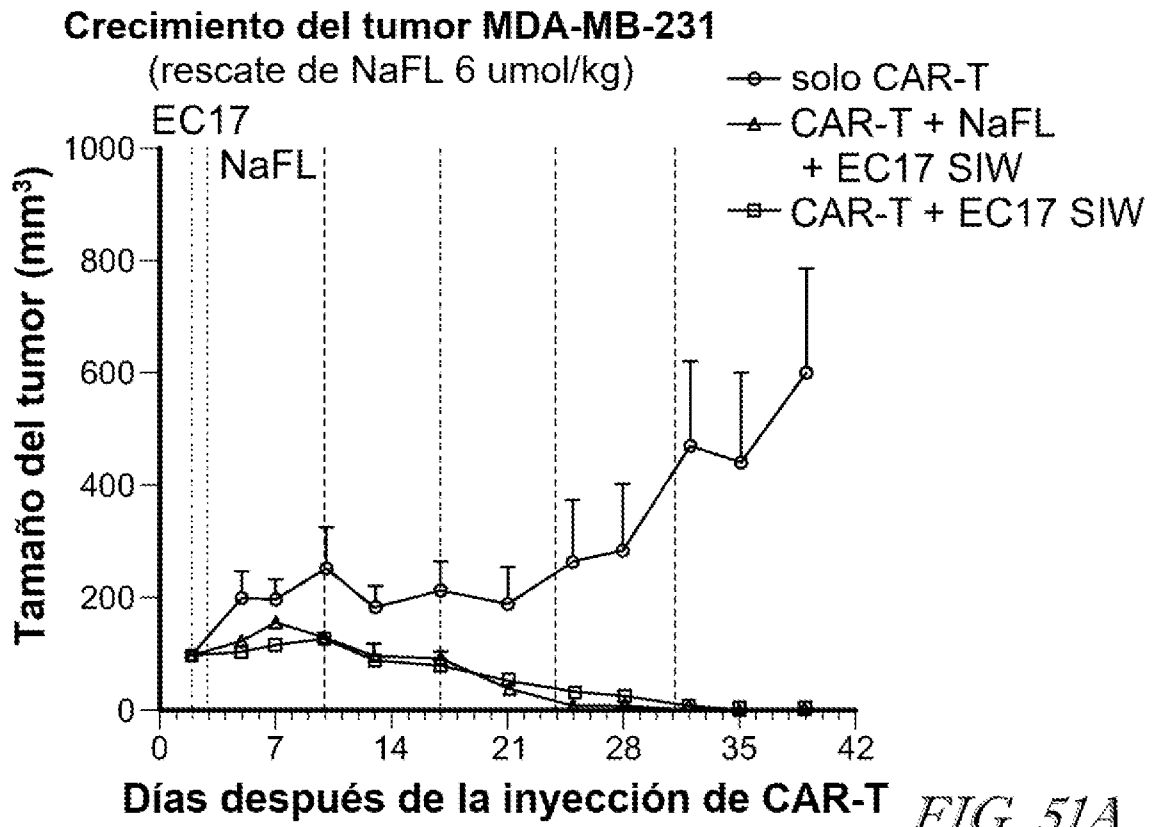


FIG. 50



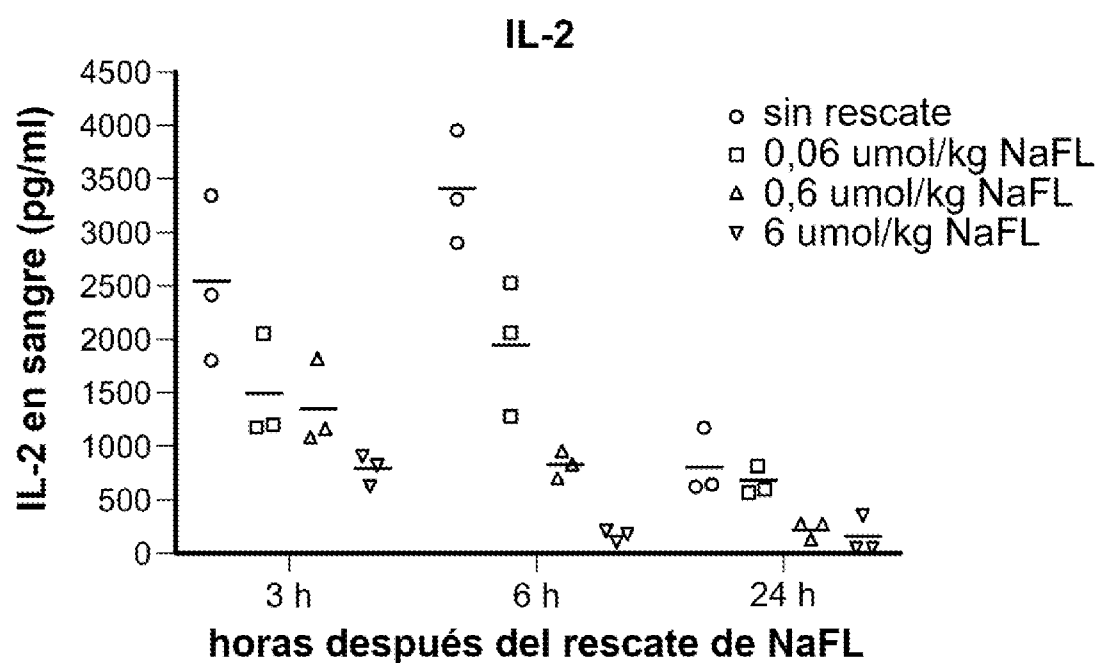


FIG. 52A

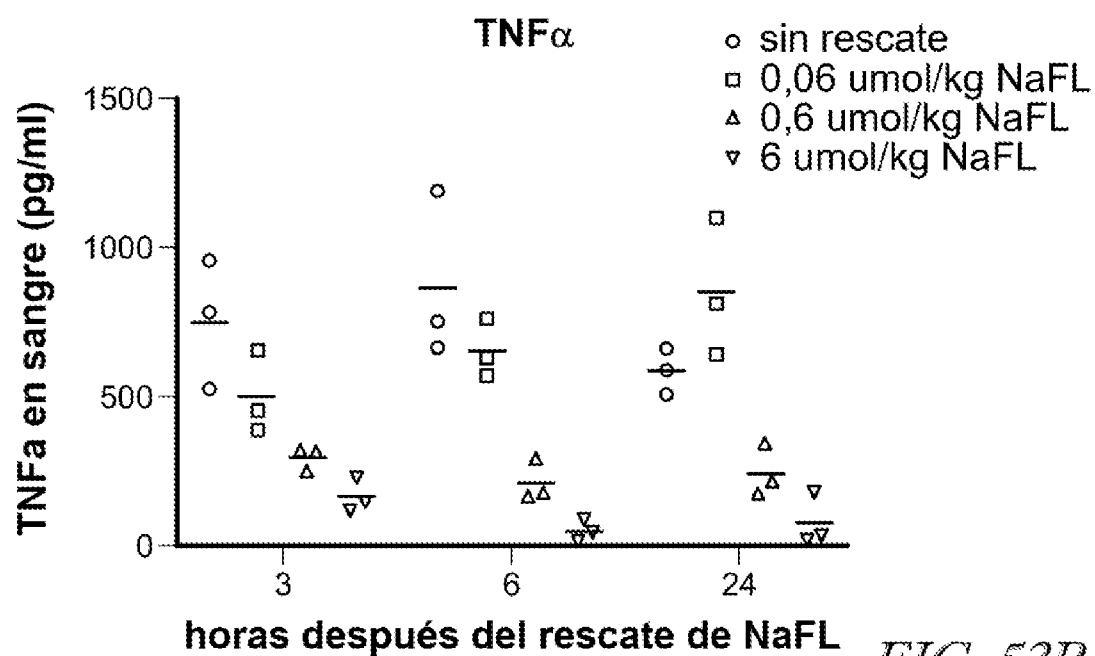


FIG. 52B

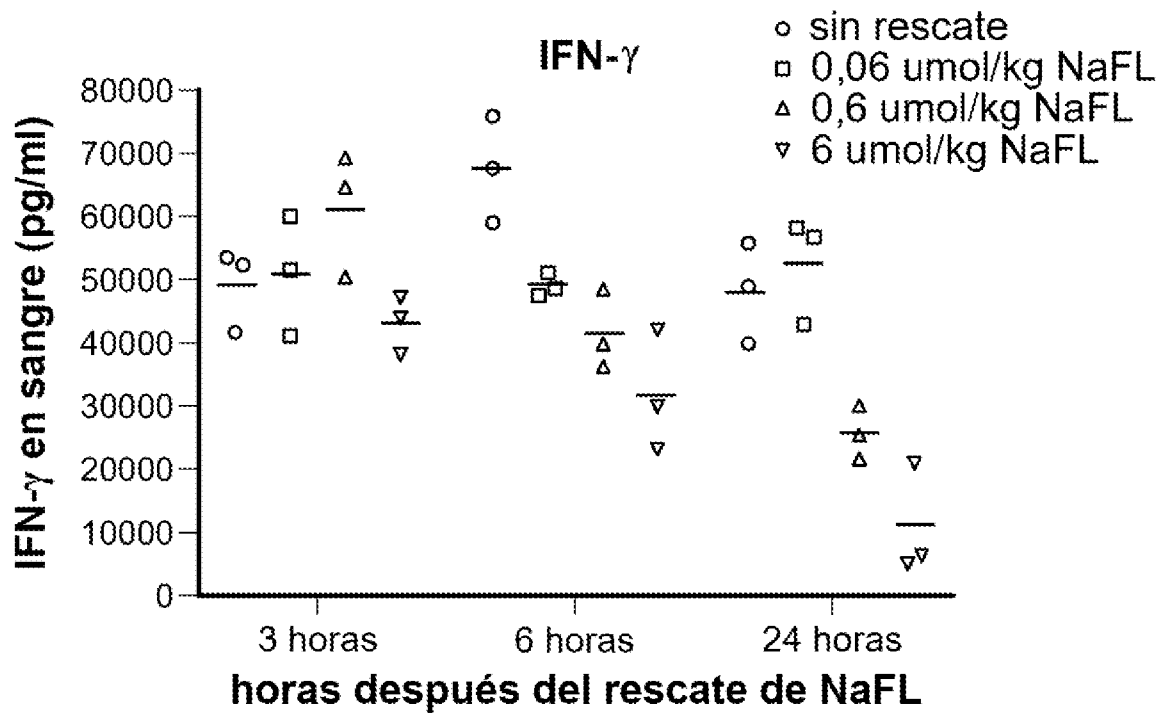


FIG. 52C

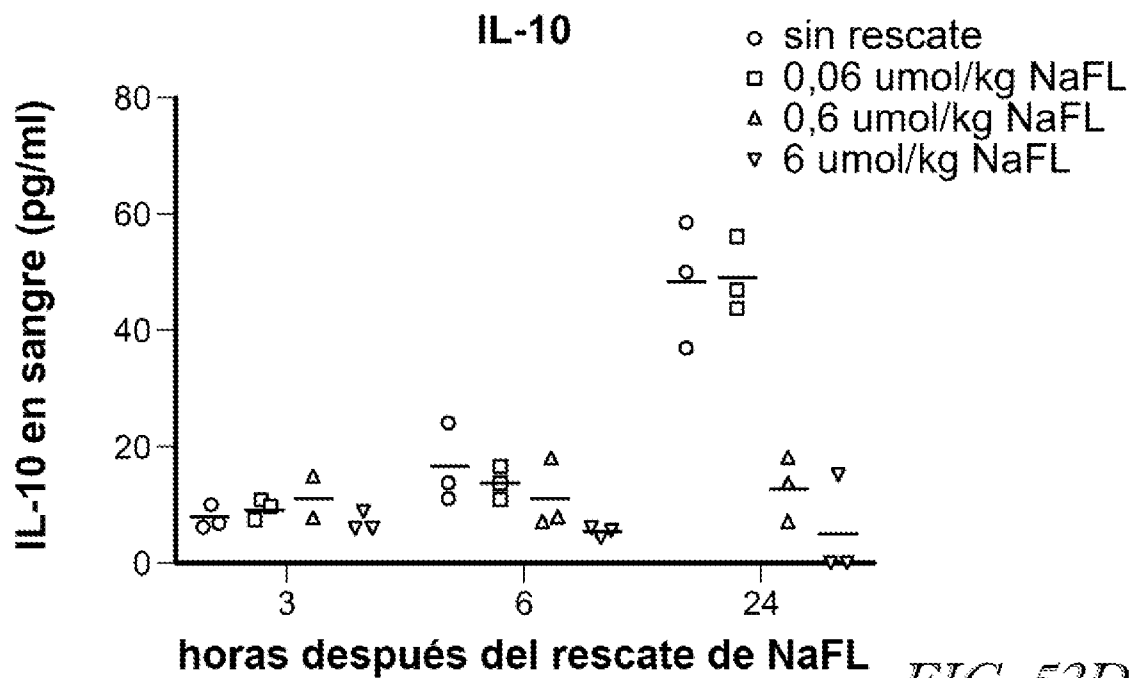
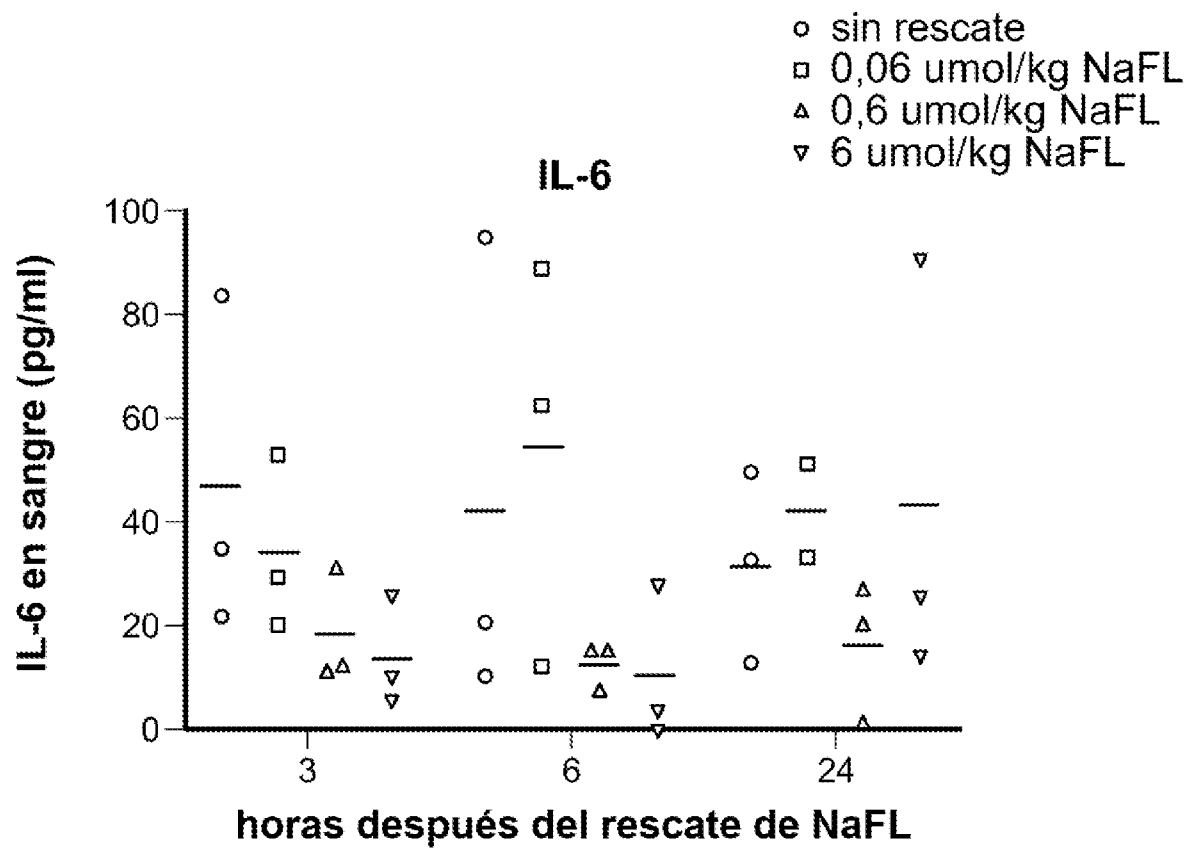


FIG. 52D

*FIG. 52E*

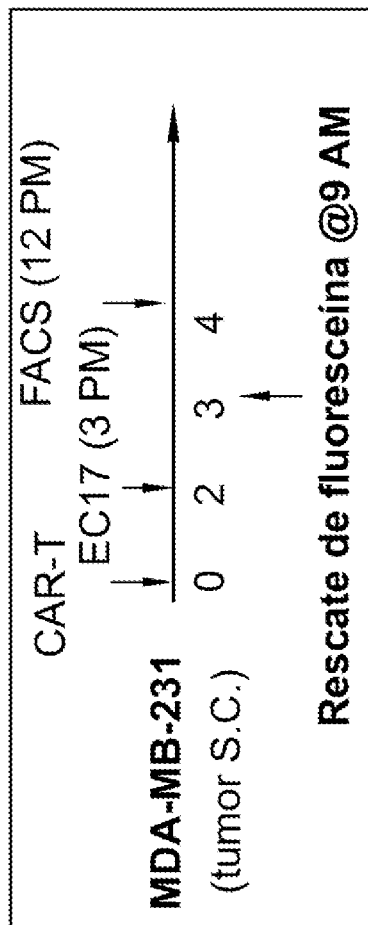


FIG. 53A

143

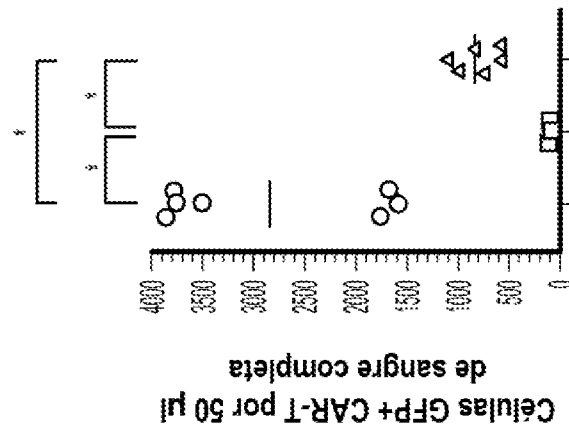
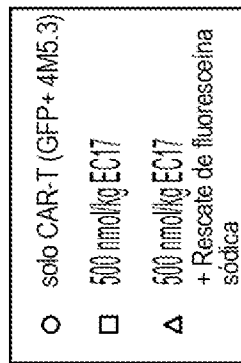


FIG. 53C

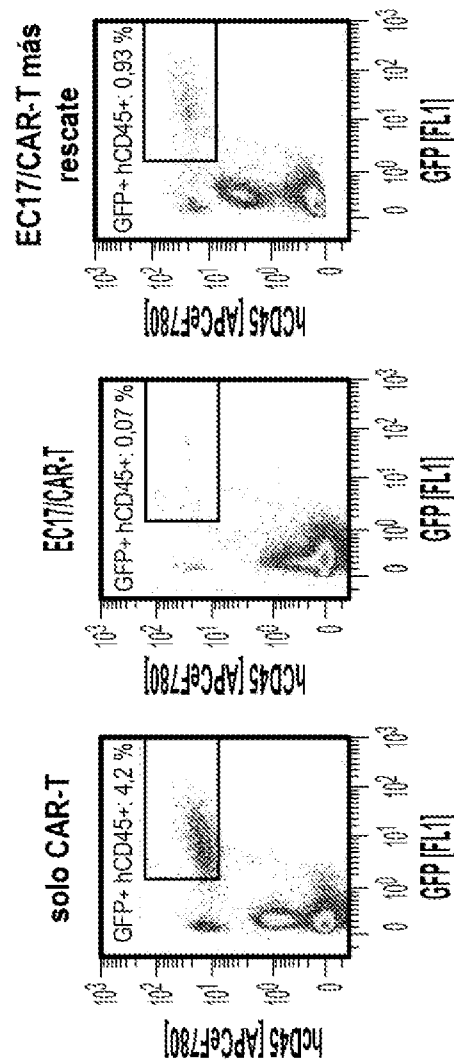


FIG. 53B

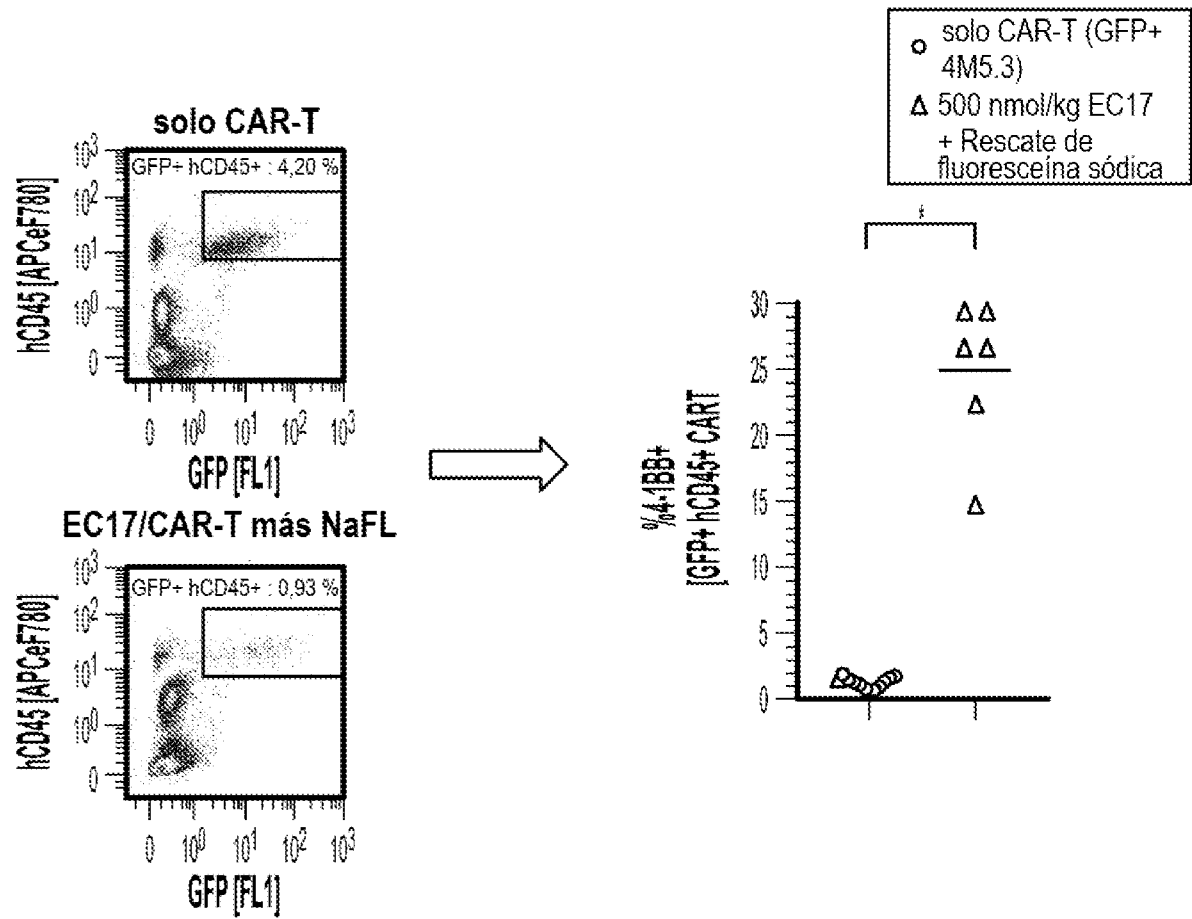


FIG. 54

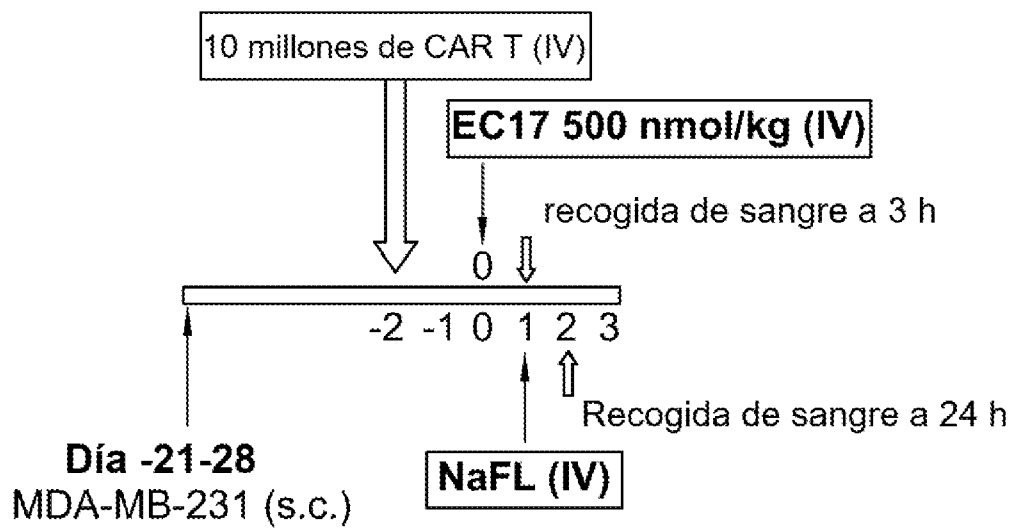


FIG. 55A

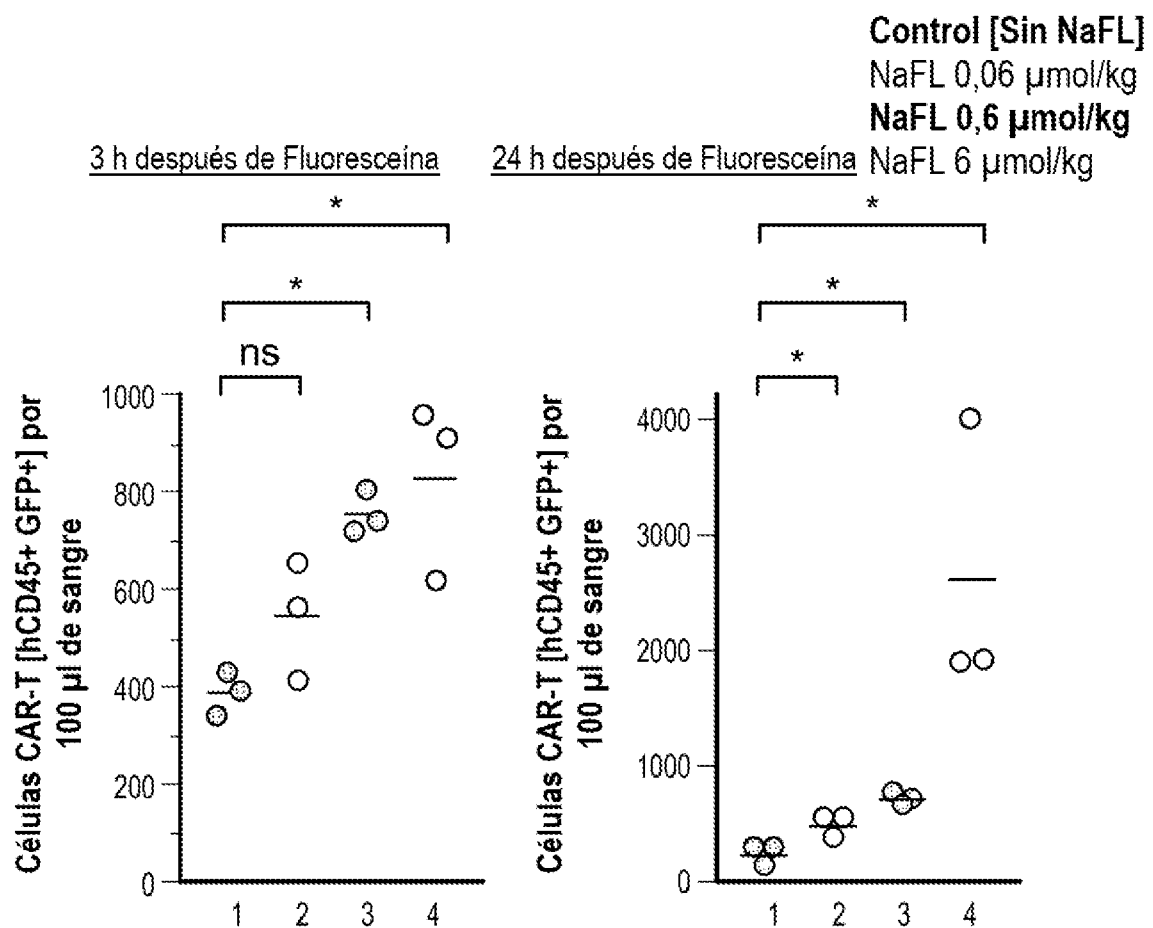

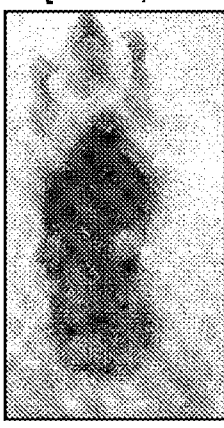


FIG. 55B

FIG. 55C

Los ratones sin tratamiento con EC17 tuvieron gran carga tumoral metastásica (¡no encontrada en el pulmón!)

<p>n.º 1-3</p> <ul style="list-style-type: none"> -aparato reproductor (ovarios, "cuernos" uterinos que son las secciones bilaterales del útero) -hígado -hueso -mesenterio en la zona caudal de la cavidad peritoneal -mesenterio cerca de los intestinos -cerebro <p>Est. 8-15 <u>mets.</u> Visibles</p>	<p>n.º 1 [Sin EC17]</p>  <p>¡Gran Met. en el ovario!</p>	<p>n.º 5 [+EC17; 5 dosis]</p>  <p>n.º 5 (nódulos pequeños)</p> <ul style="list-style-type: none"> - hígado - mesenterio en la zona caudal de la cavidad peritoneal - uno cerca del ovario (¿puede que el oviducto?) <p>Est. 4-5 <u>mets.</u> Visibles</p>
--	---	--

A

B

FIG. 56

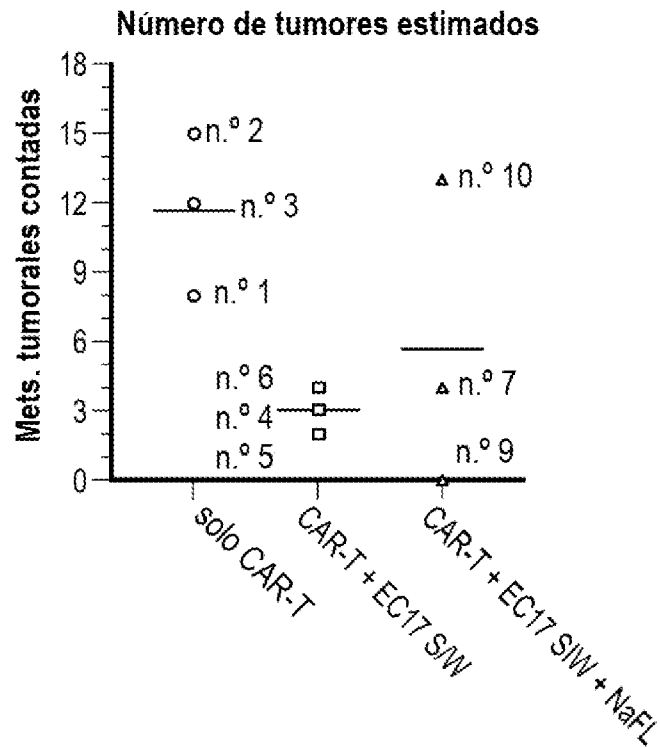


FIG. 57A

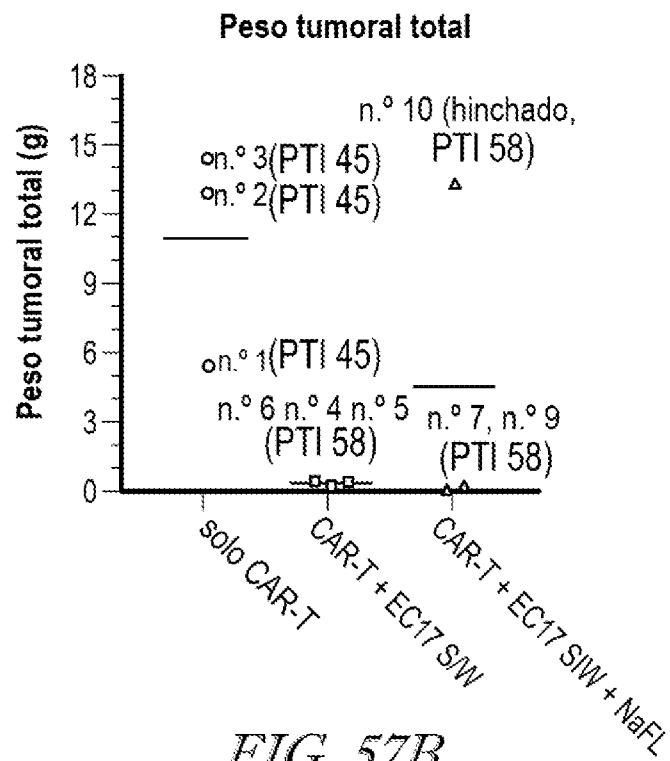


FIG. 57B

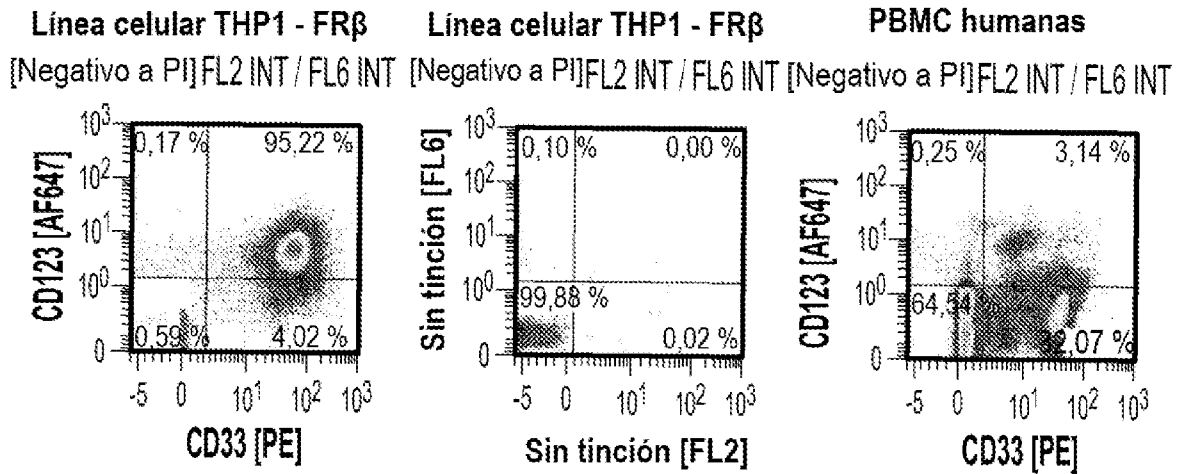


FIG. 58A

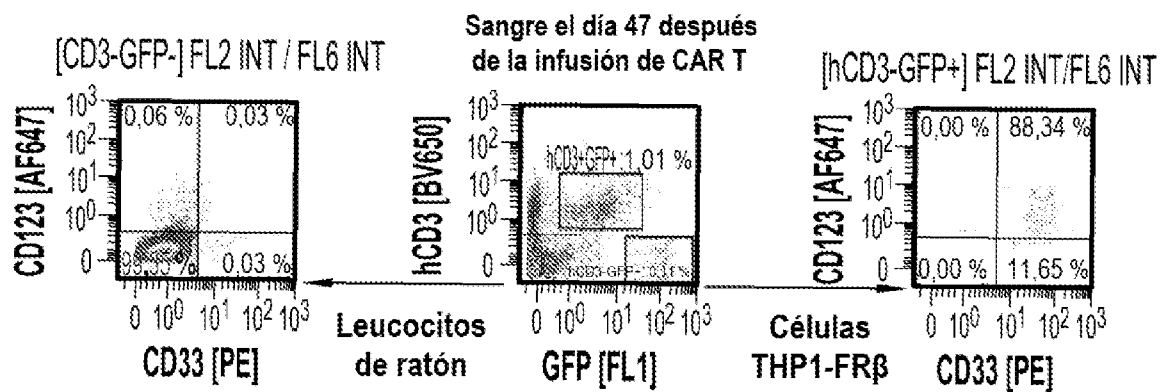


FIG. 58B

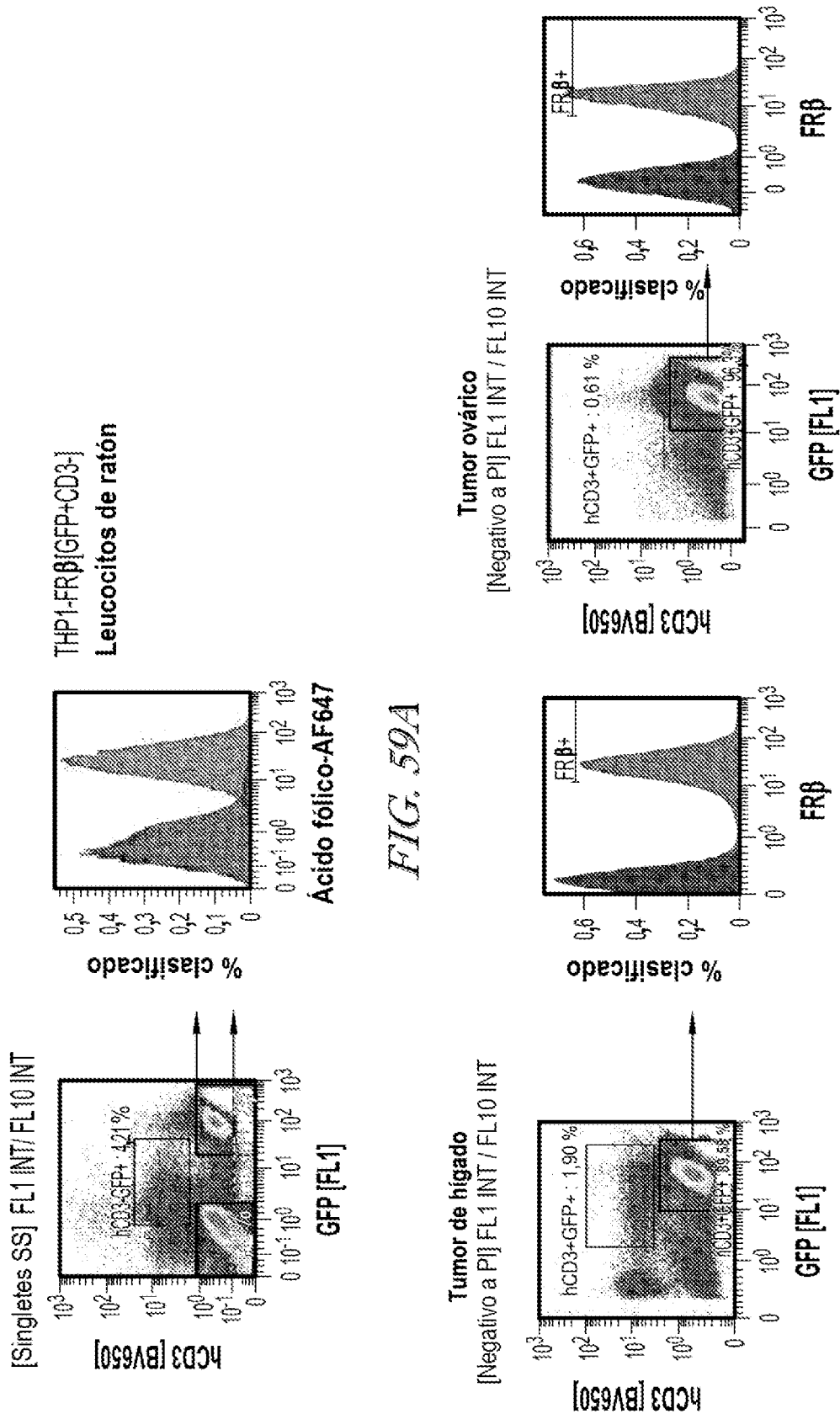
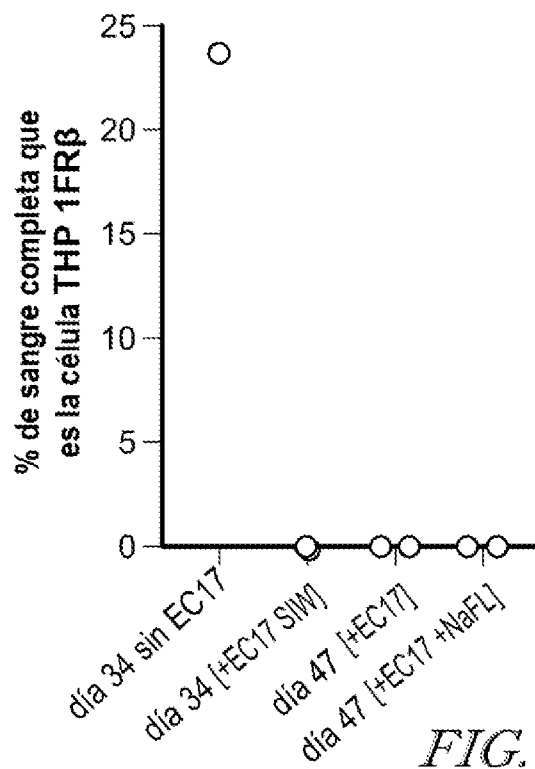
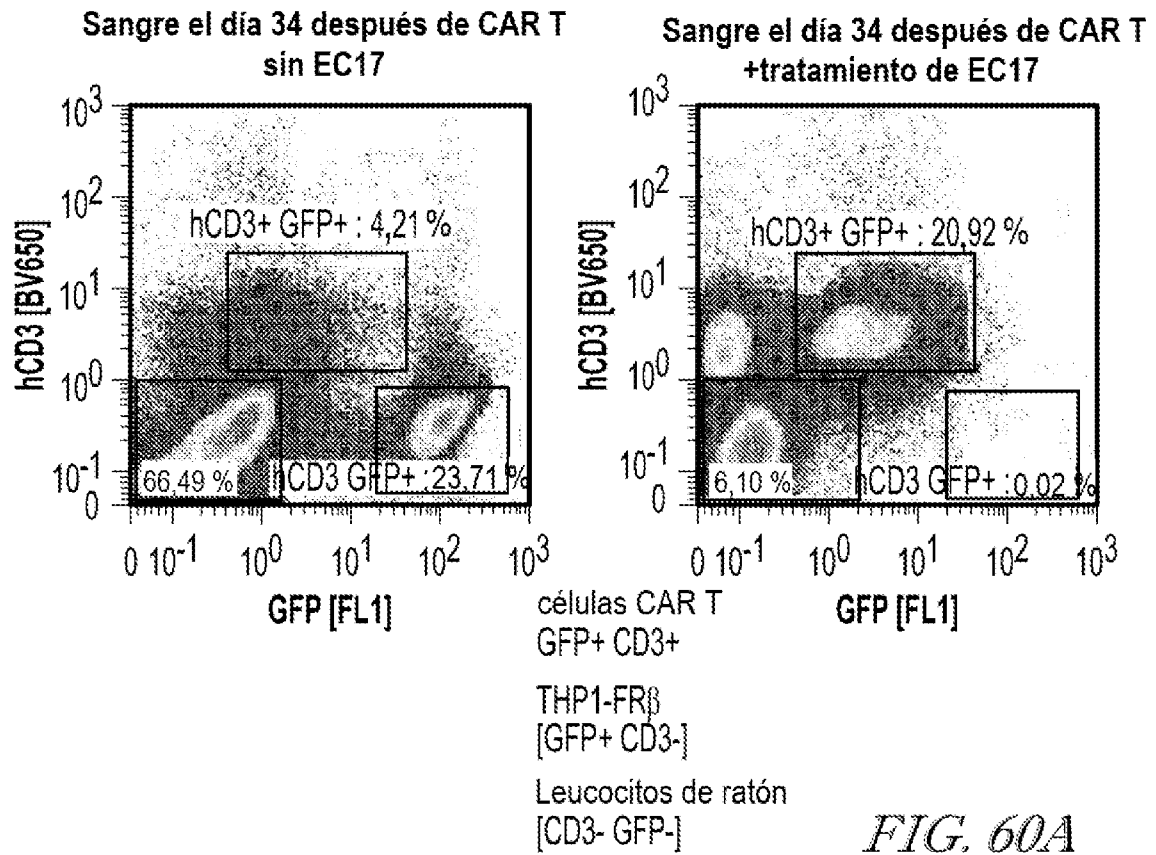


FIG. 59A

FIG. 59B



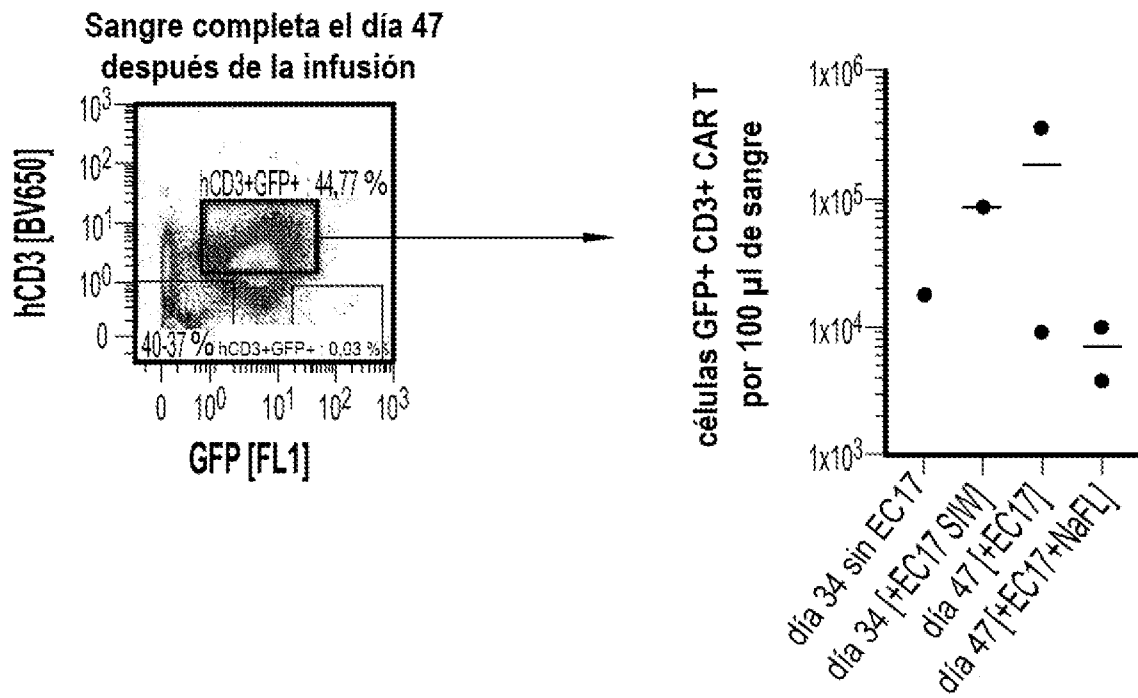


FIG. 61A

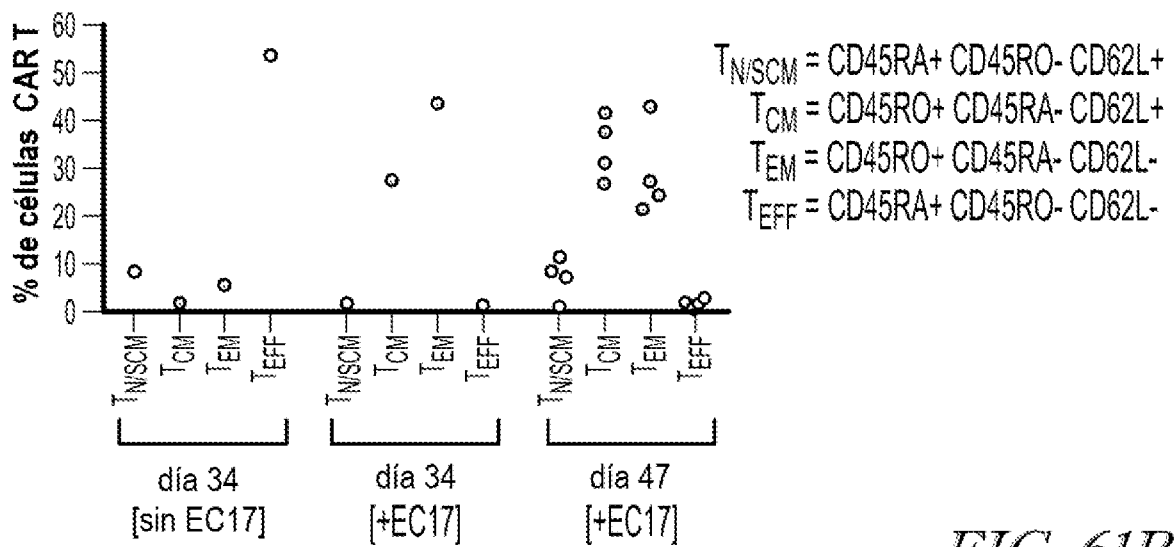


FIG. 61B

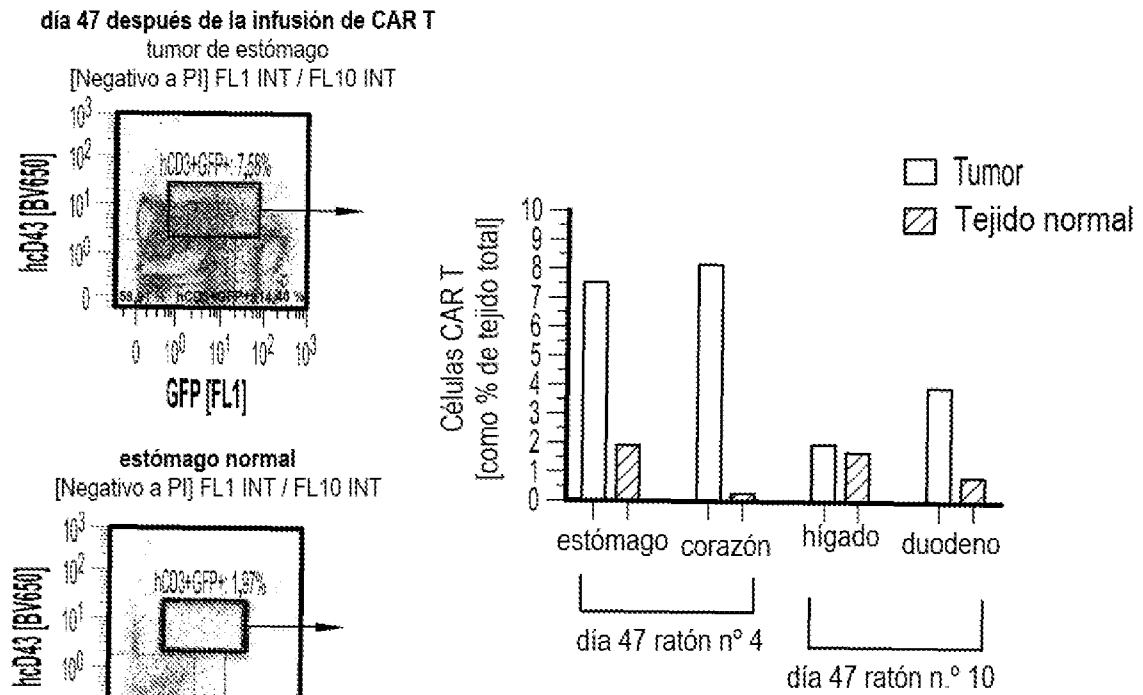


FIG. 62A

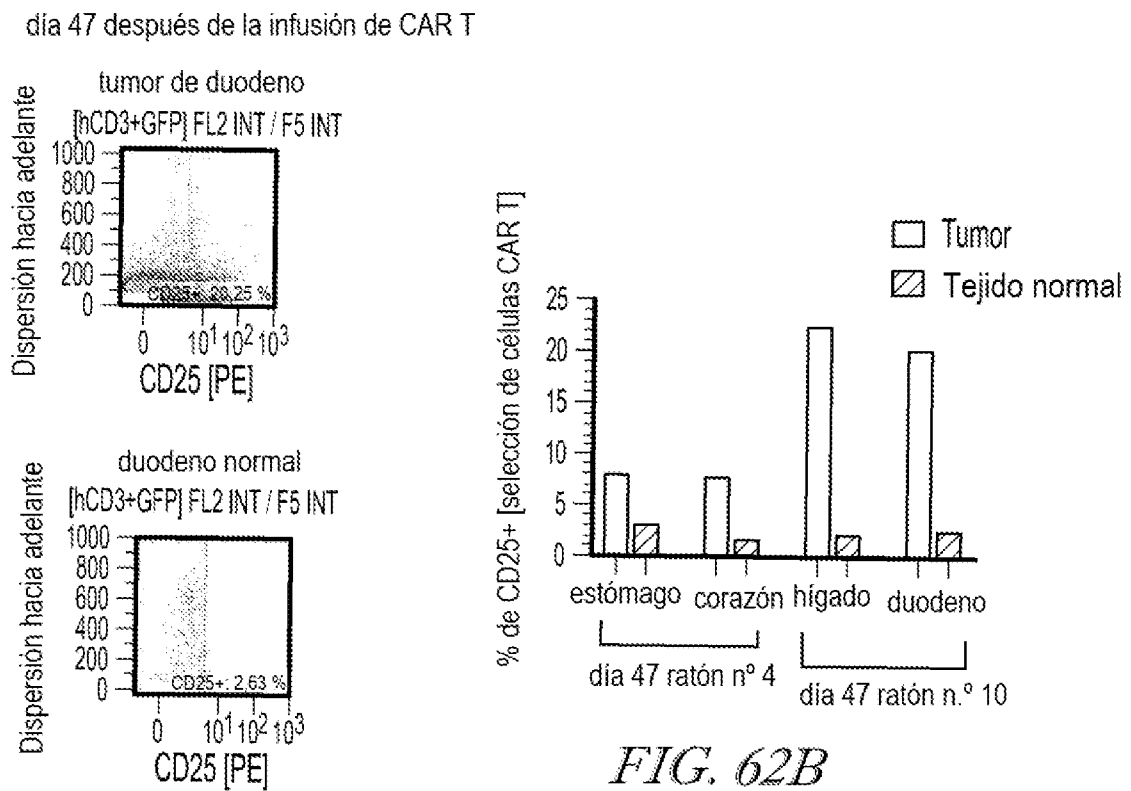


FIG. 62B

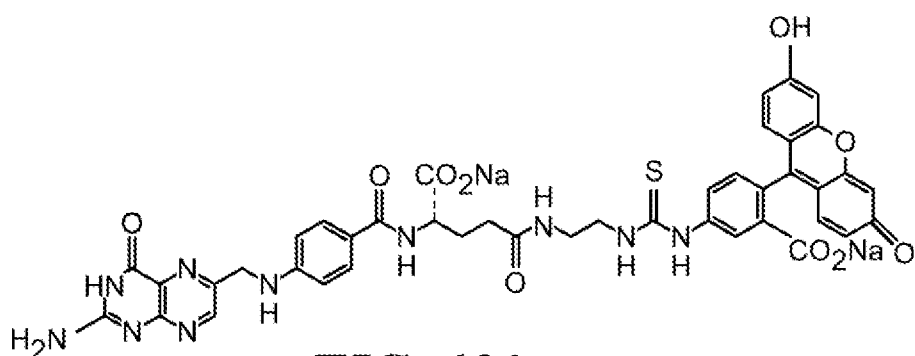


FIG. 63A

SP	Anti-FITC scFv (4M5.3)	Bisagra de CD8α y TM	4-1BB	CD3ζ
----	------------------------	----------------------	-------	------

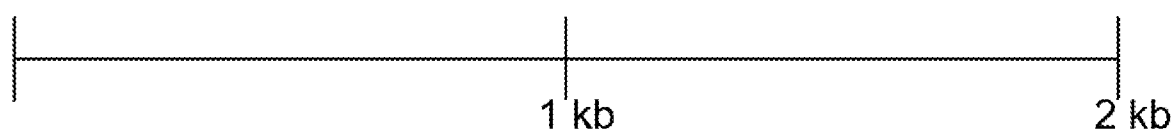


FIG. 63B

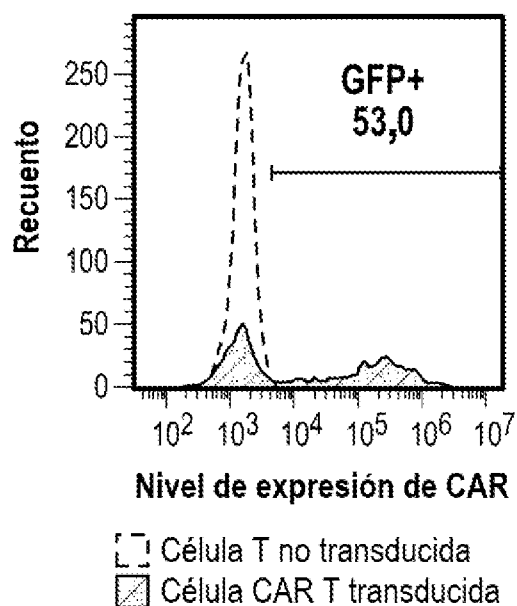


FIG. 63C

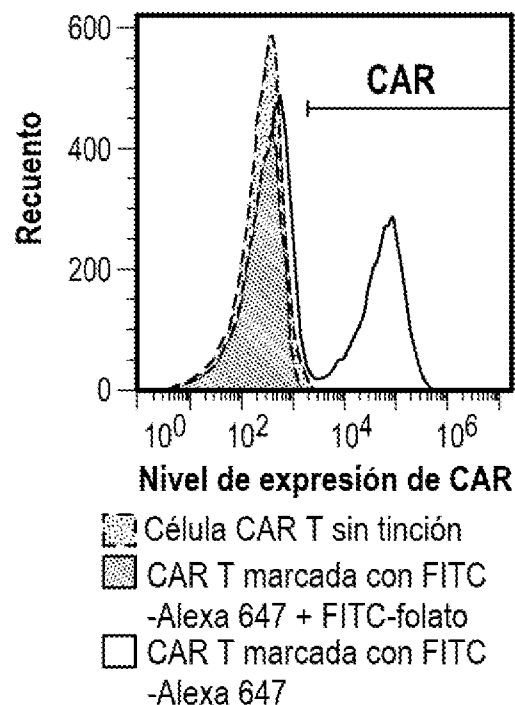


FIG. 63D

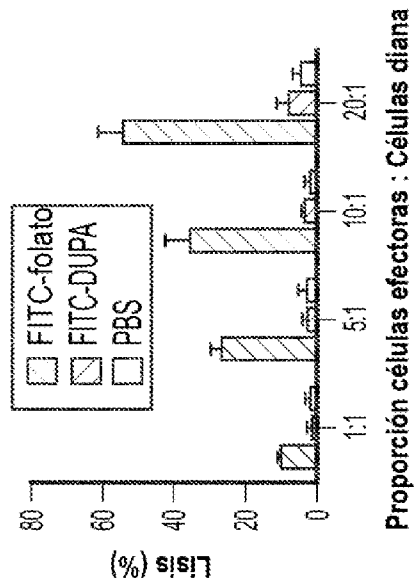


FIG. 64C

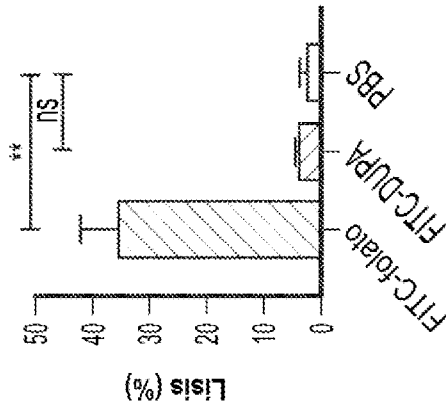


FIG. 64B

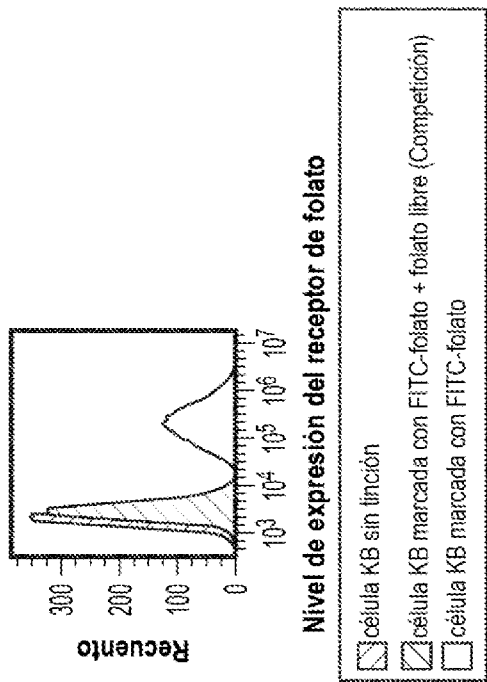


FIG. 64A

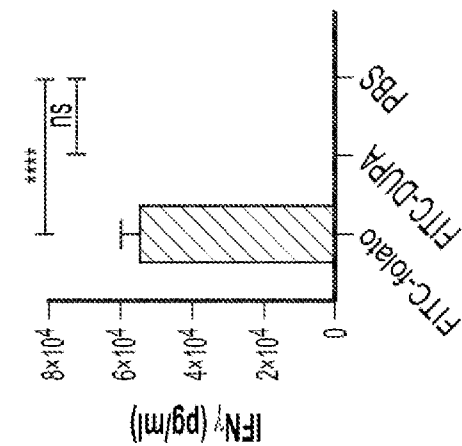


FIG. 64D

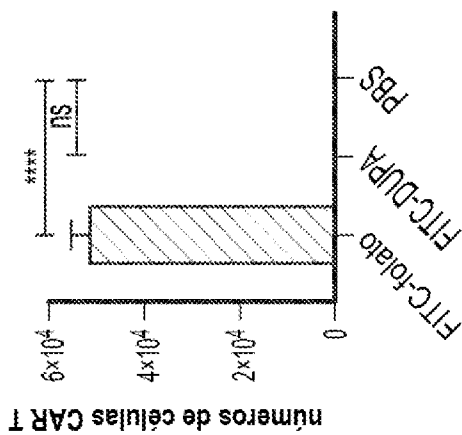


FIG. 64E

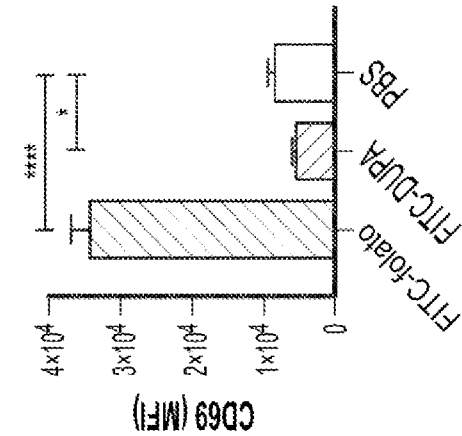


FIG. 64F

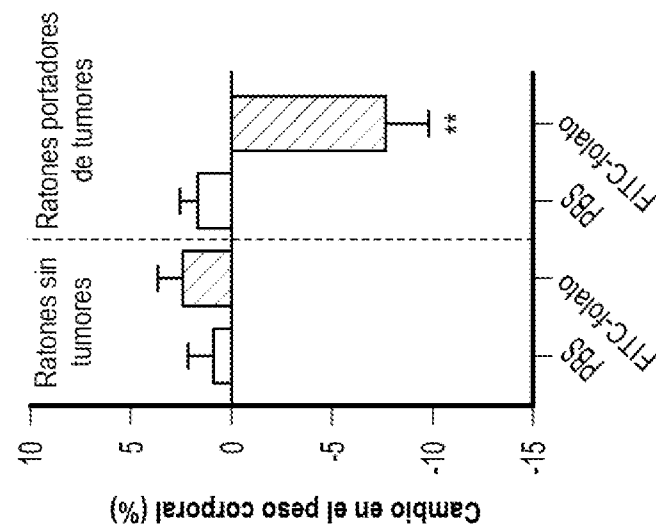


FIG. 65A

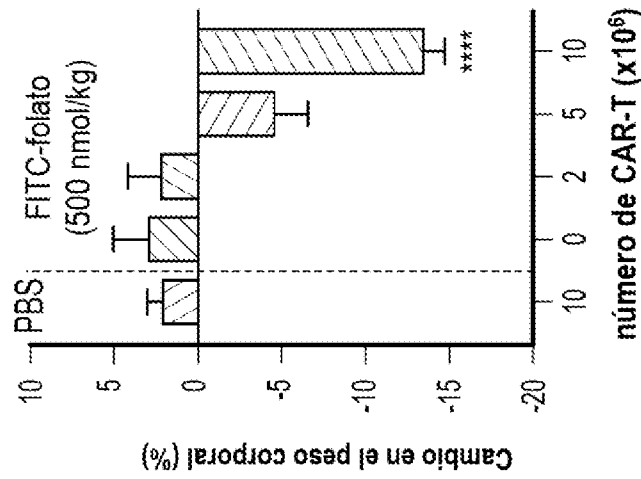


FIG. 65B

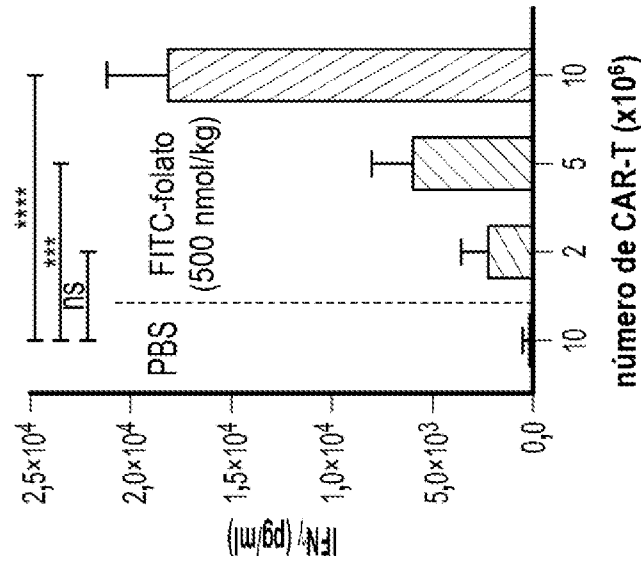


FIG. 65C

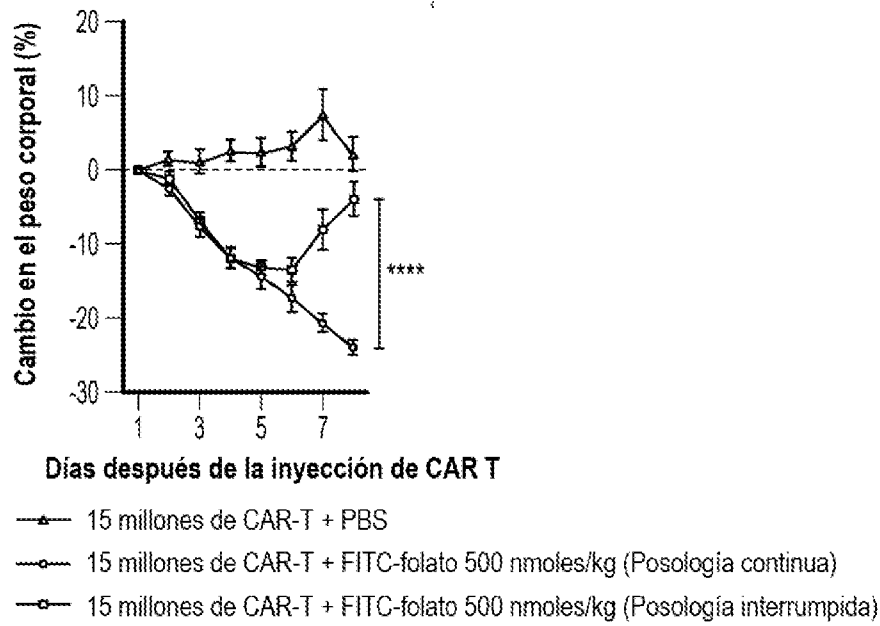


FIG. 66A

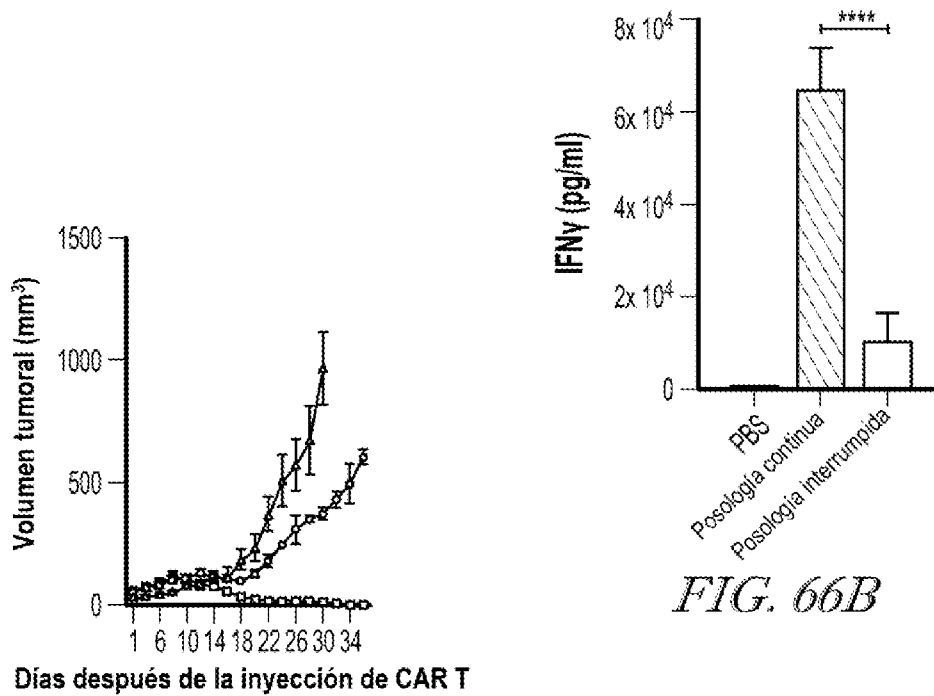
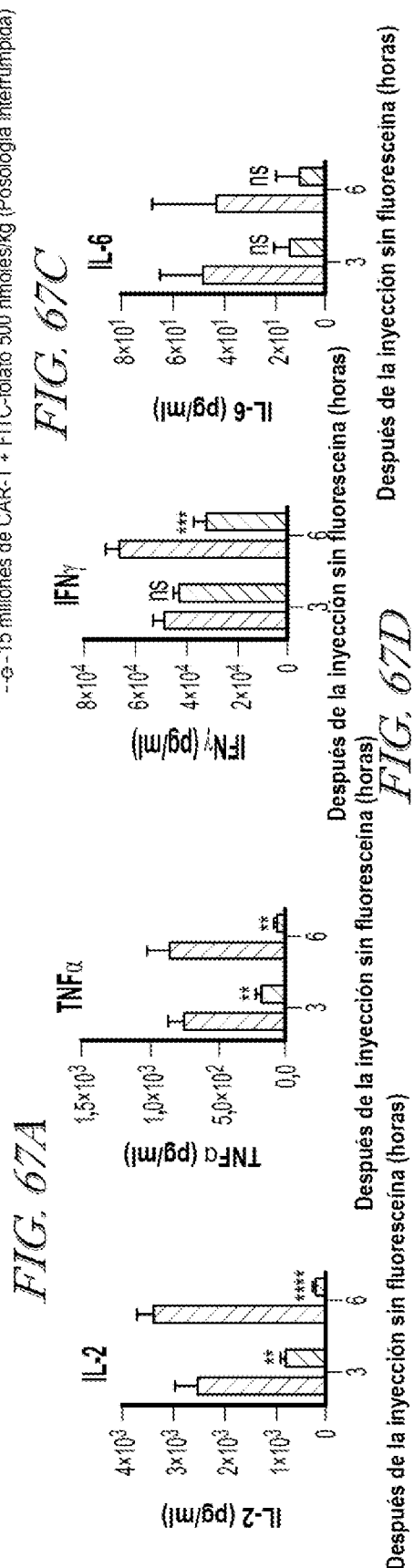
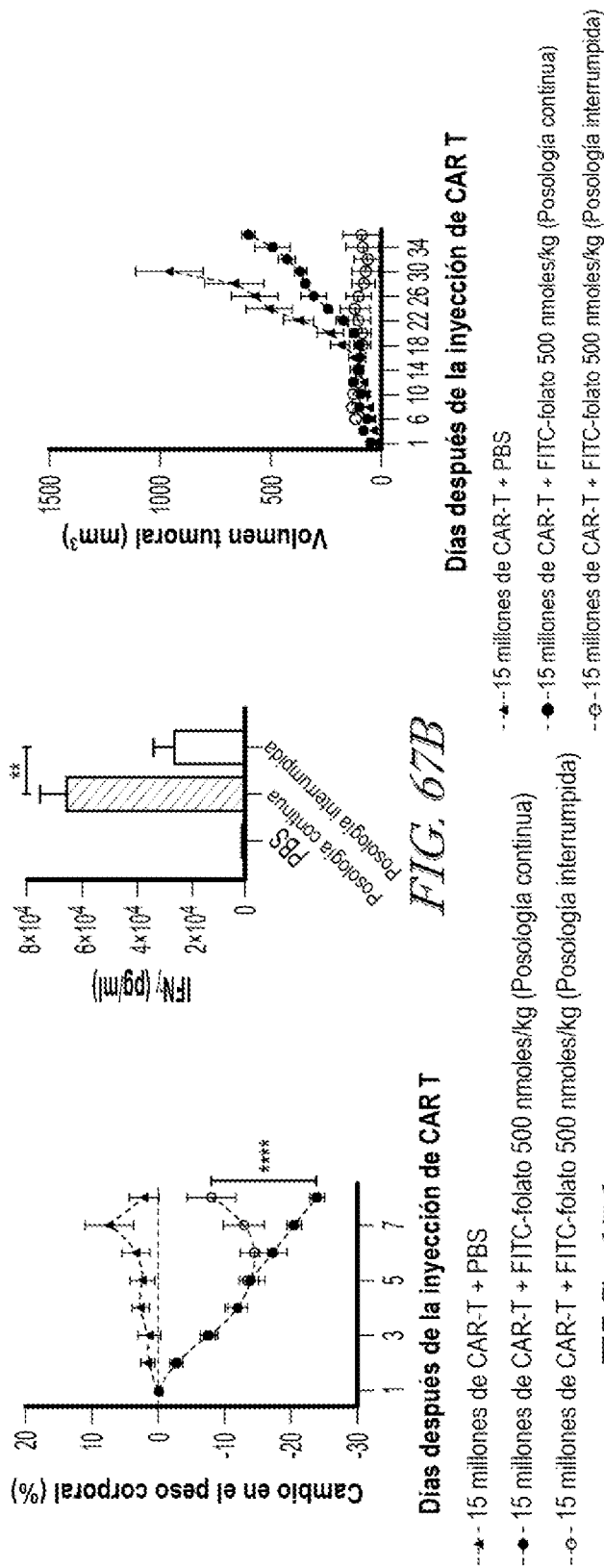


FIG. 66C



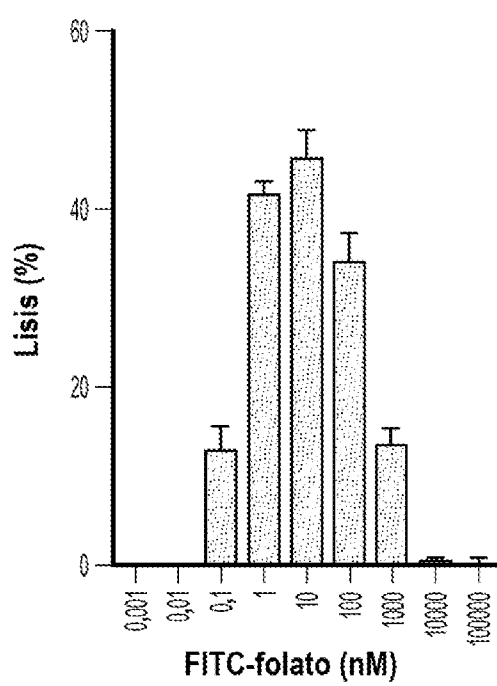


FIG. 68A

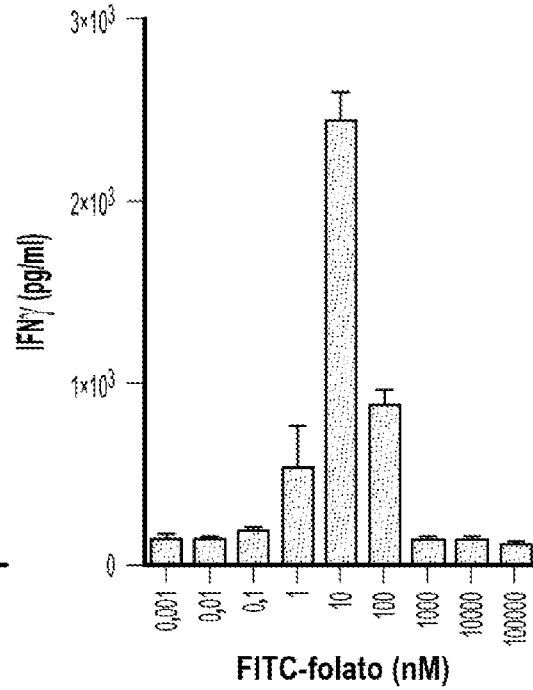


FIG. 68B

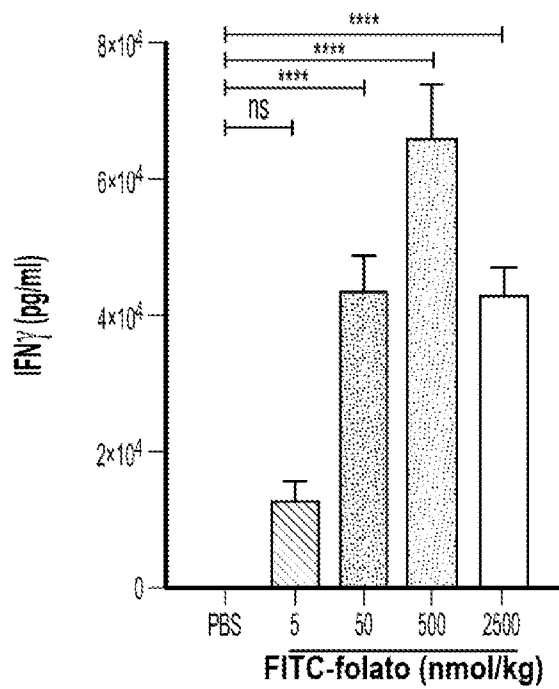
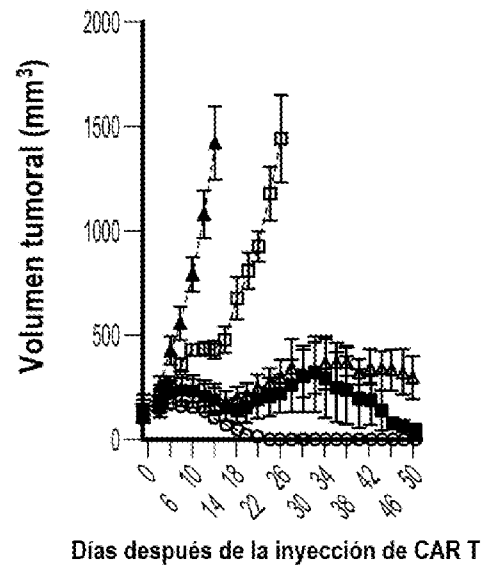
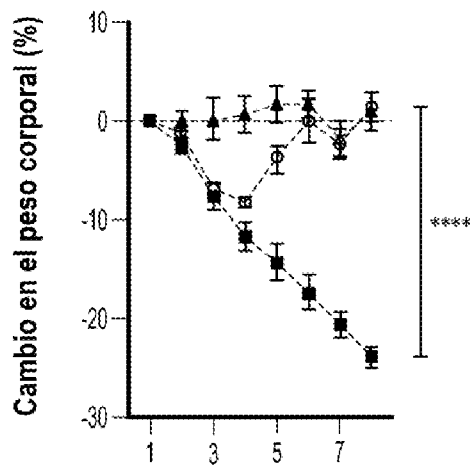


FIG. 68C



- ▲ 15 millones de CAR-T
- 15 millones de CAR-T + FITC-folato 5 nmoles/kg
- 15 millones de CAR-T + FITC-folato 50 nmoles/kg
- 15 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg
- ▲ 15 millones de CAR-T + FITC-folato 2500 nmoles/kg

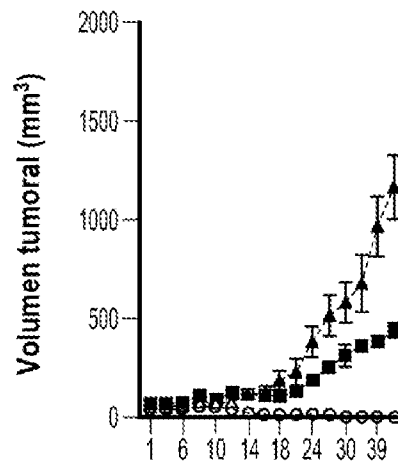
FIG. 68D



Días después de la inyección de CAR T

- ▲ 15 millones de CAR-T + PBS
- 15 millones de CAR-T + FITC-folato (Escalado de dosis)
- 15 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg (Posologia continua)

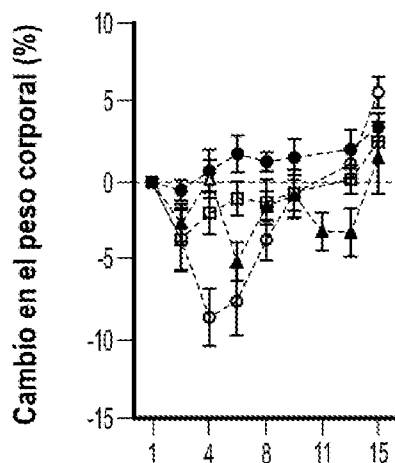
FIG. 69A



Días después de la inyección de CAR T

- ▲ 15 millones de CAR-T + PBS
- 15 millones de CAR-T + FITC-folato (Escalado de dosis)
- 15 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg (Posologia continua)

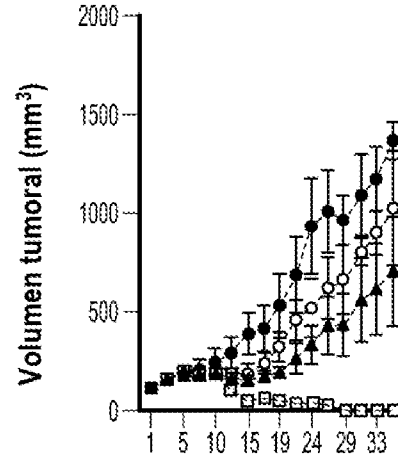
FIG. 69B



Días después de la inyección de CAR T

- 5 millones de CAR-T + PBS
- 5 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg (una dosis/semana)
- ▲ 5 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg dos dosis/semana
- 5 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg (tres dosis/semana)

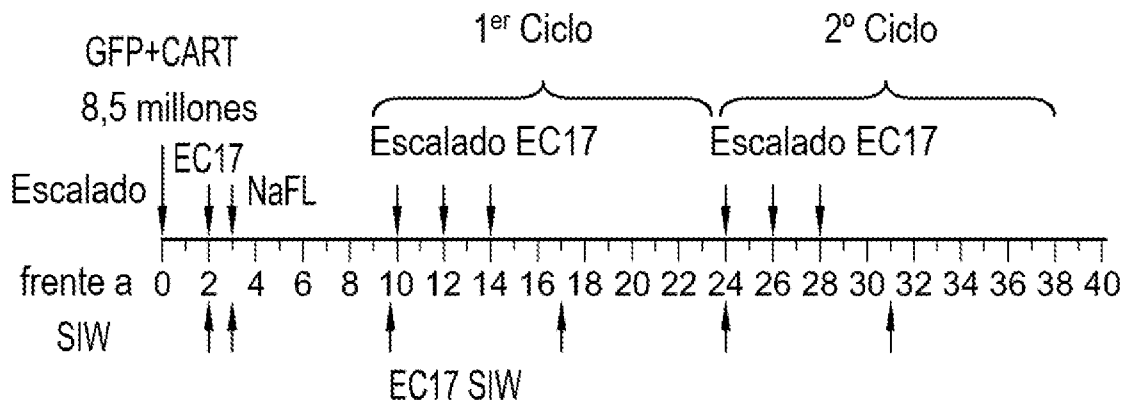
FIG. 69C



Días después de la inyección de CAR T

- 5 millones de CAR-T + PBS
- 5 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg (una dosis/semana)
- ▲ 5 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg dos dosis/semana
- 5 millones de CAR-T + FITC-folato 500 nmoles/kg (tres dosis/semana)

FIG. 69D



Día 2: 500 nmol/kg EC17;
 Días 10, 24: 5 nmol/kg EC17;
 Días 12, 26: 50 nmol/kg EC17;
 Días 14, 28: 500 nmol/kg EC17;

FIG. 70A

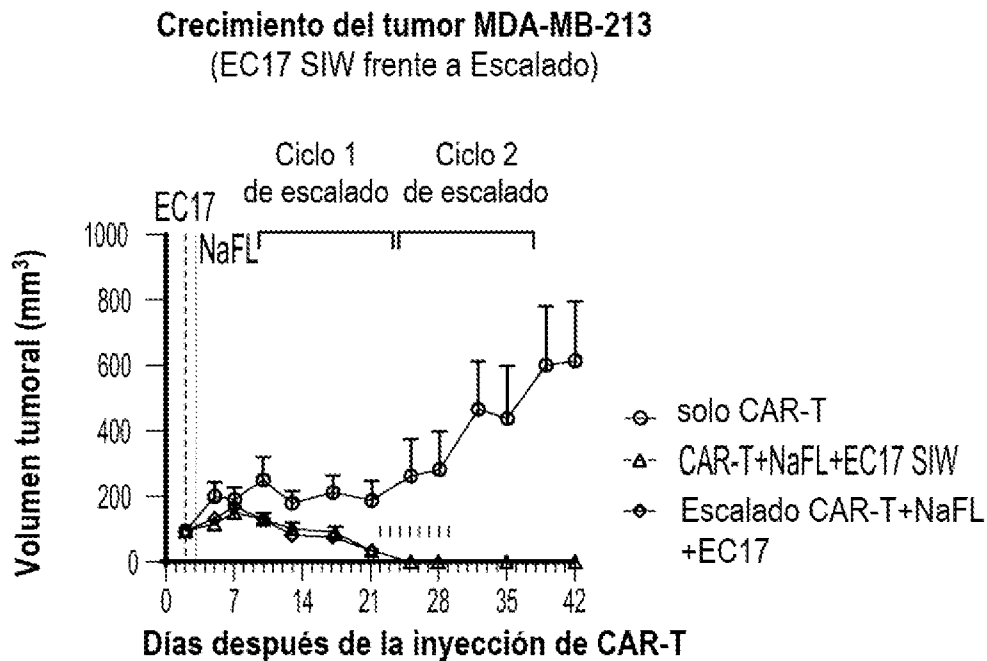


FIG. 70B

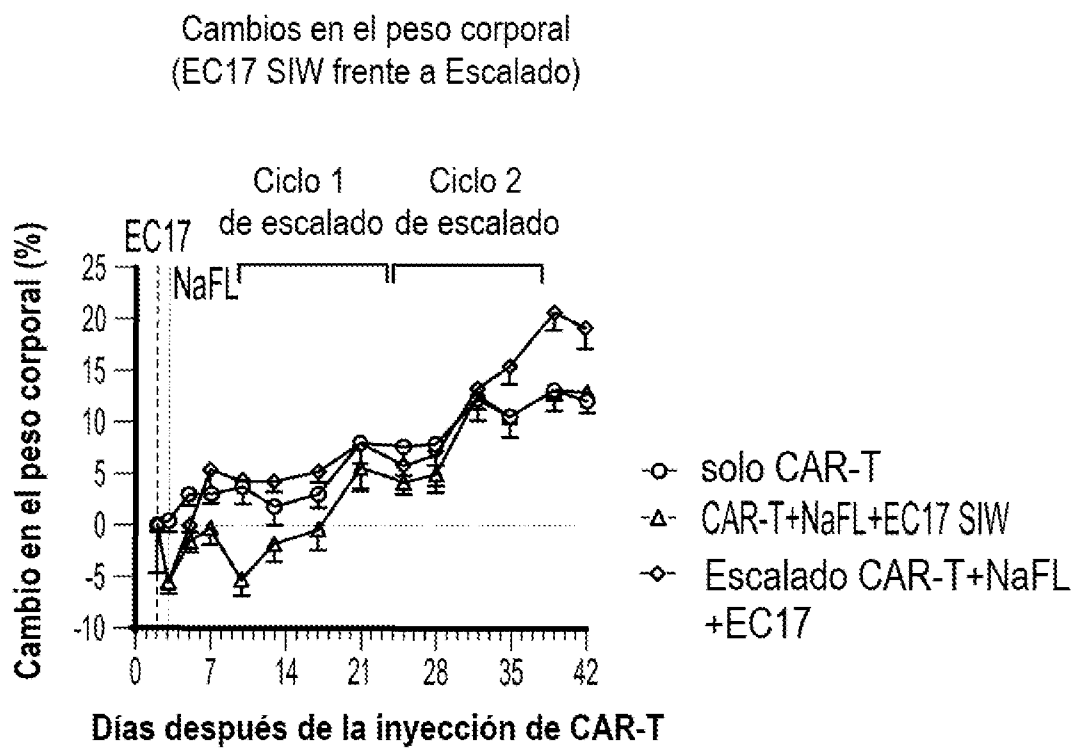


FIG. 70C

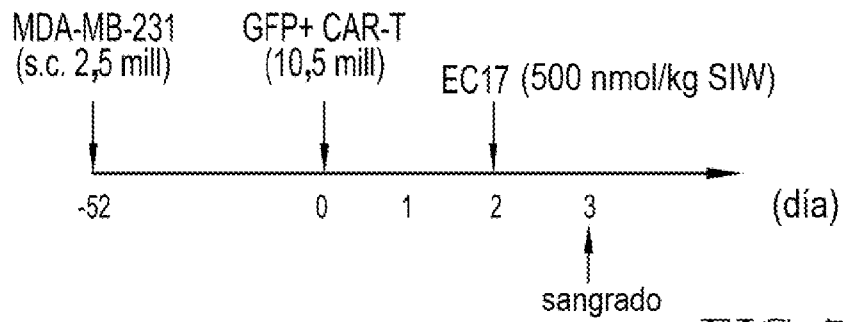
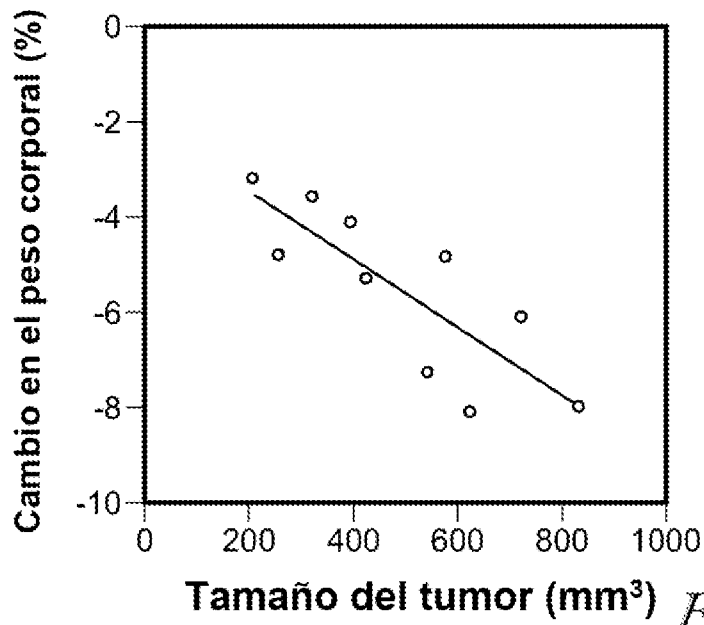
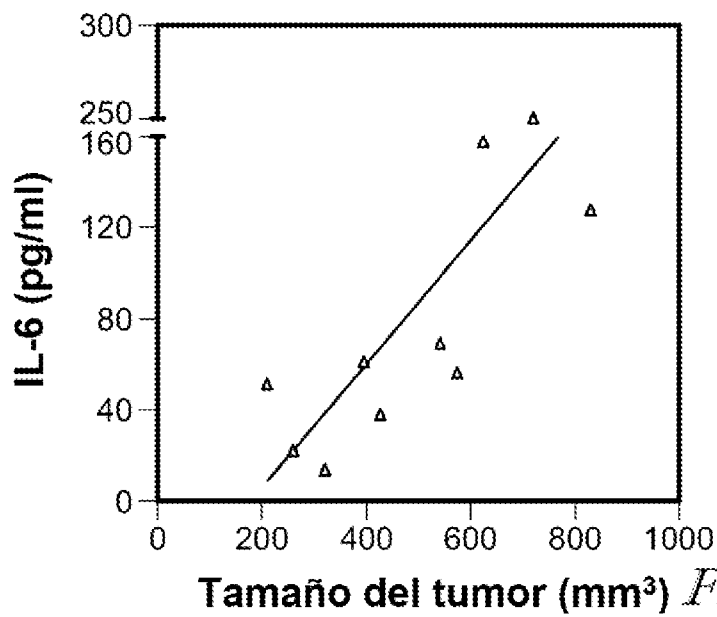


FIG. 71A



Tamaño del tumor (mm^3) FIG. 71B



Tamaño del tumor (mm^3) FIG. 71C

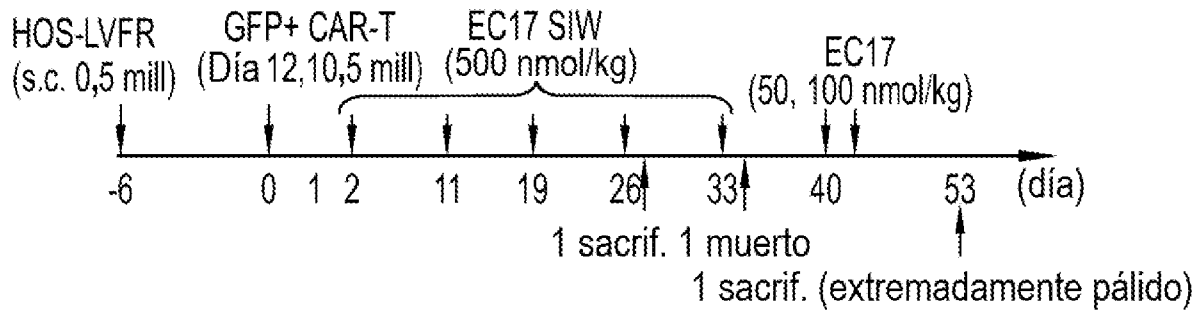


FIG. 72A

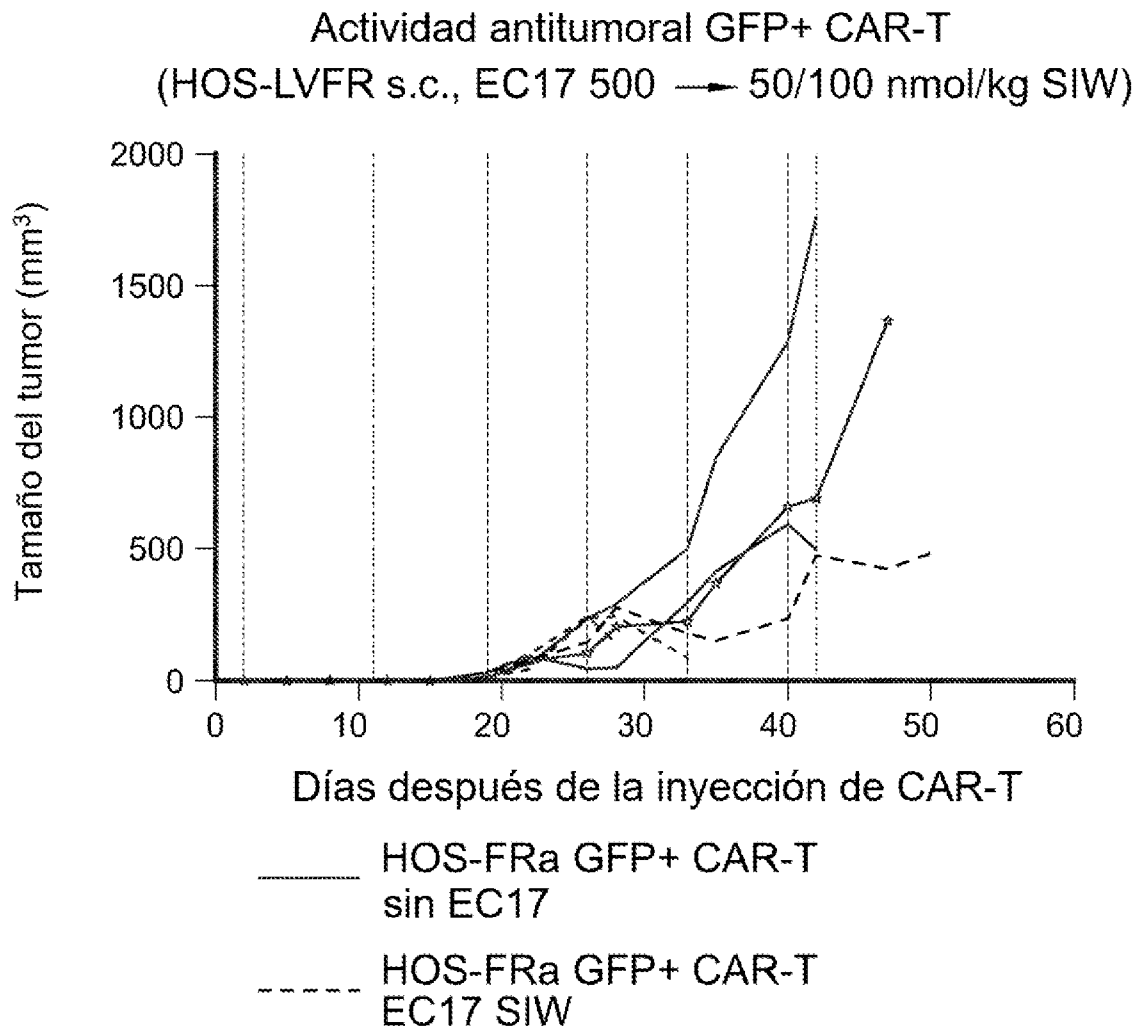
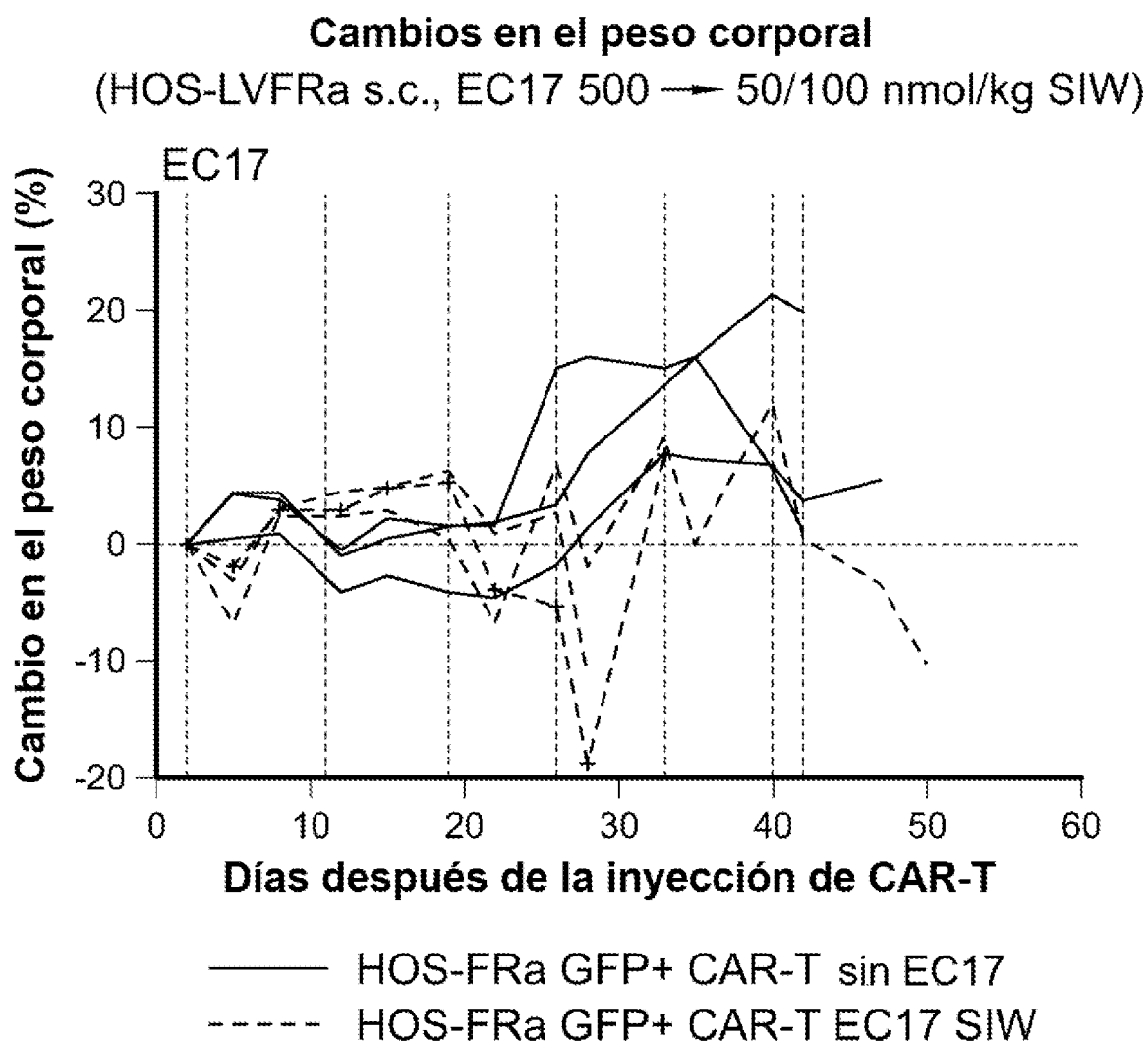
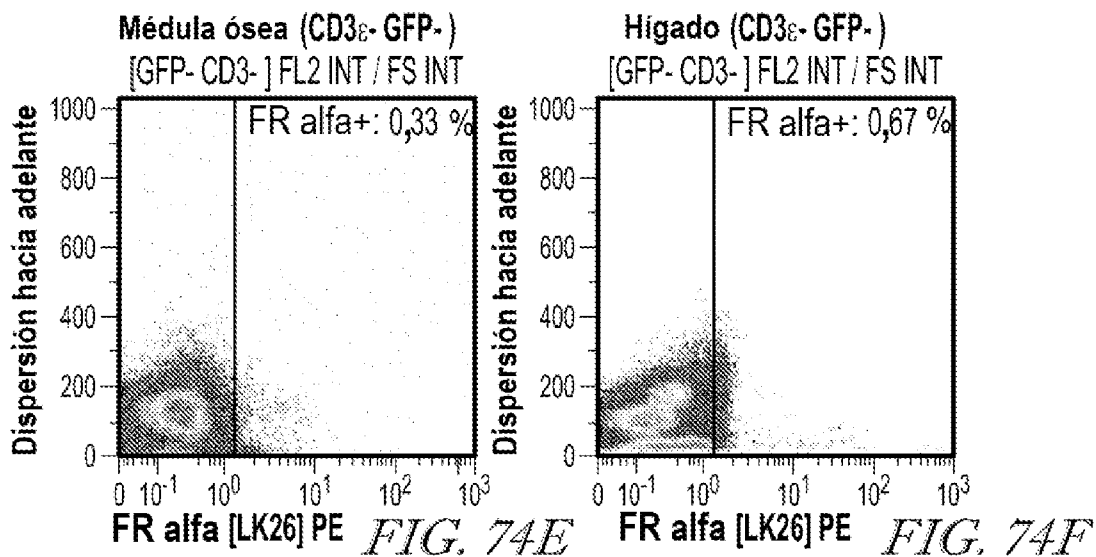
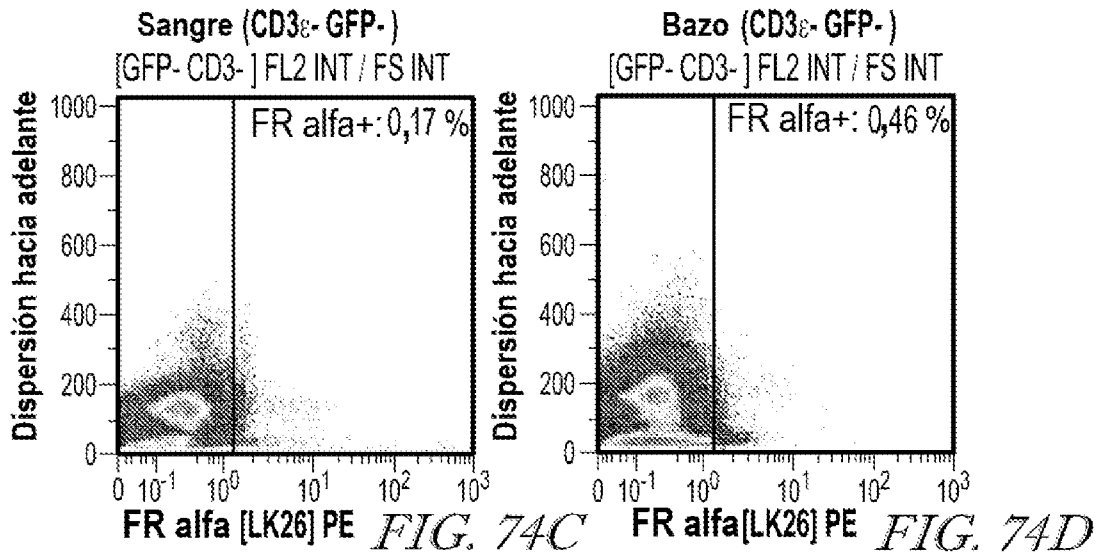
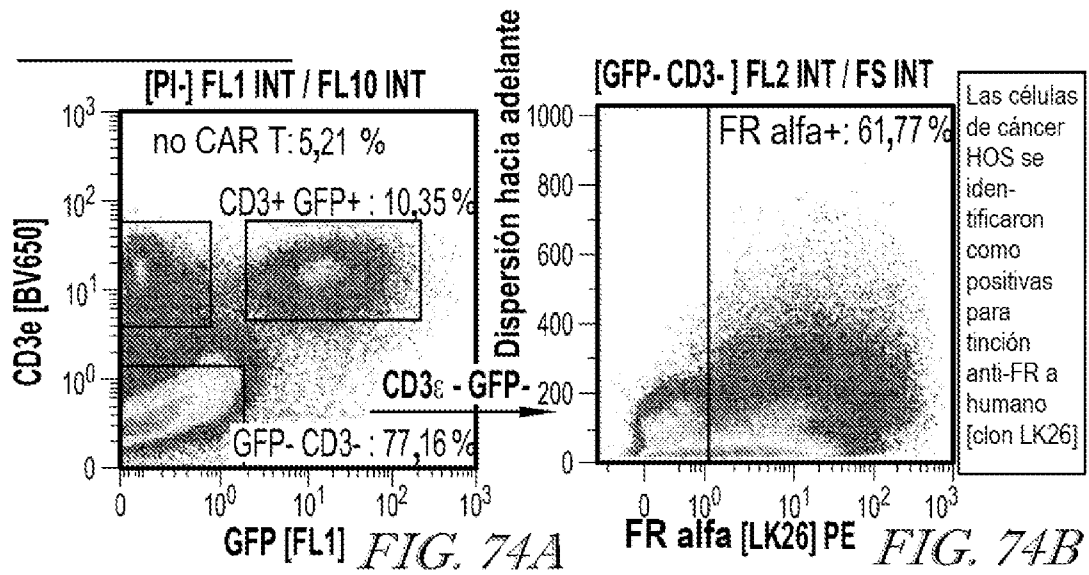


FIG. 72B

*FIG. 73*



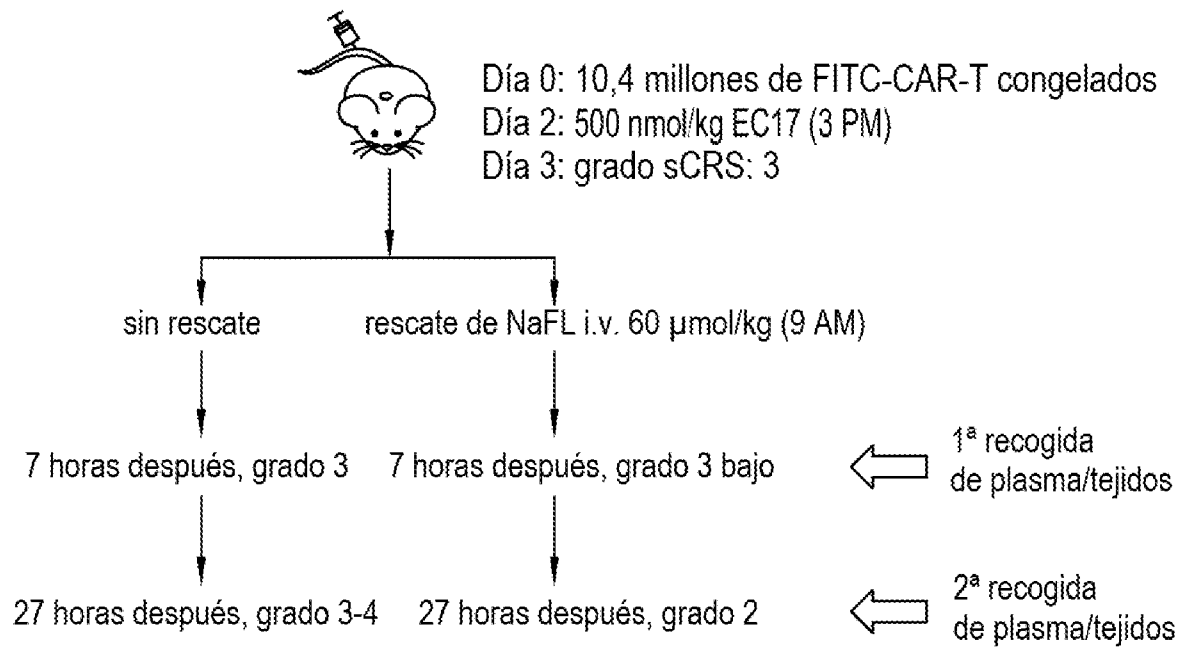
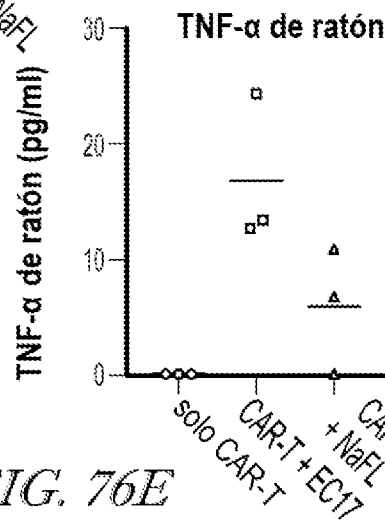
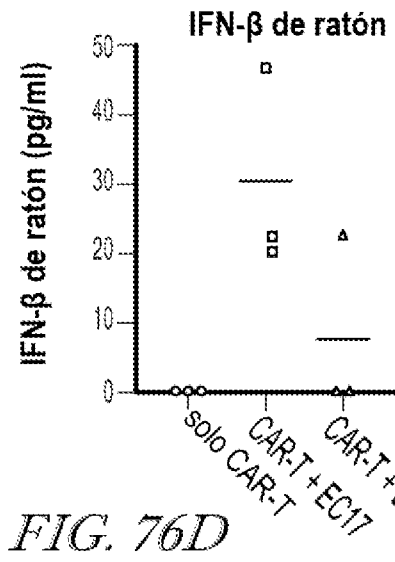
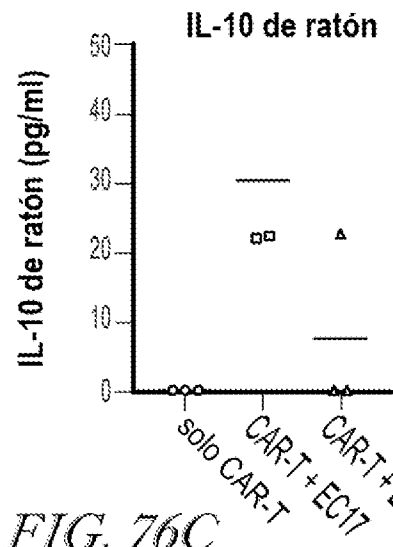
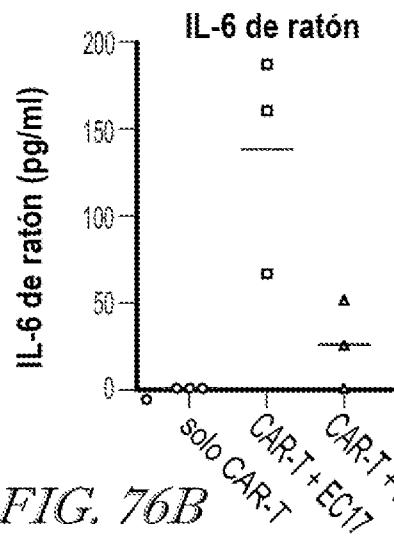
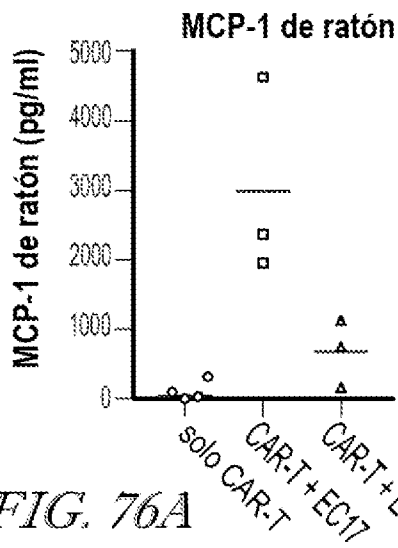


FIG. 75



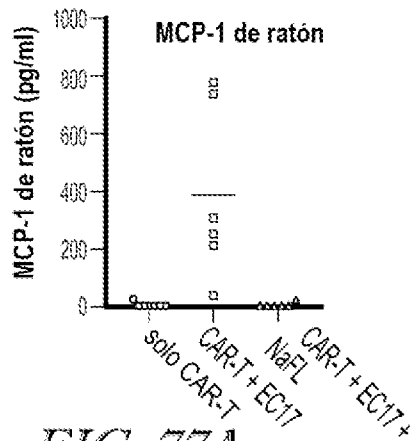


FIG. 77A

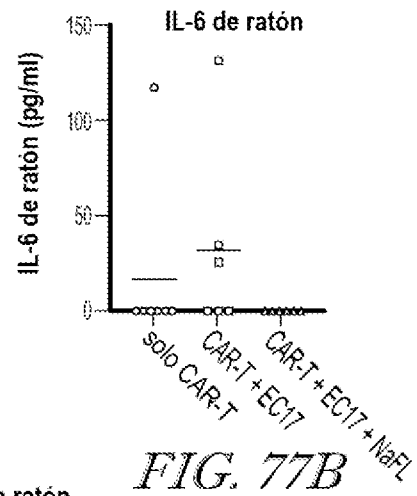


FIG. 77B

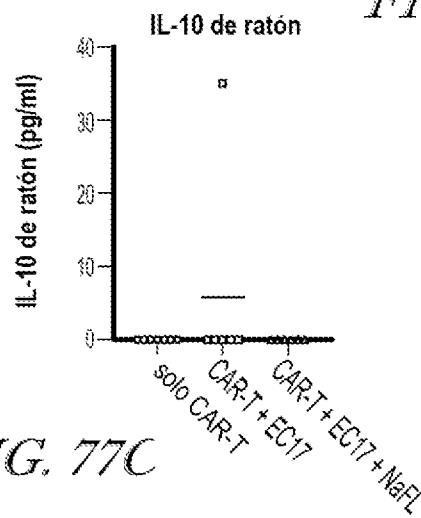


FIG. 77C

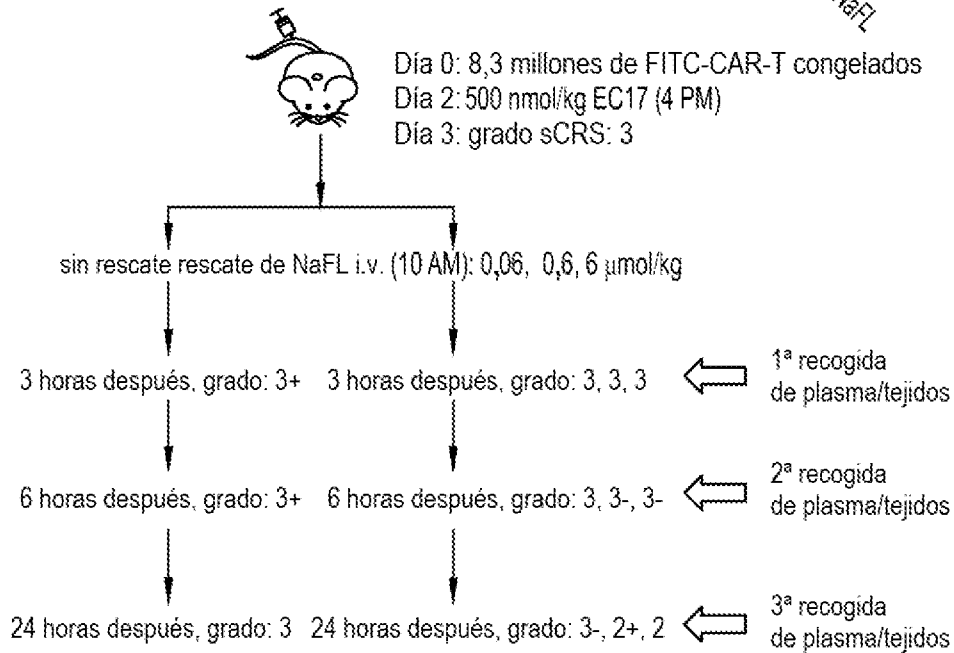


FIG. 78

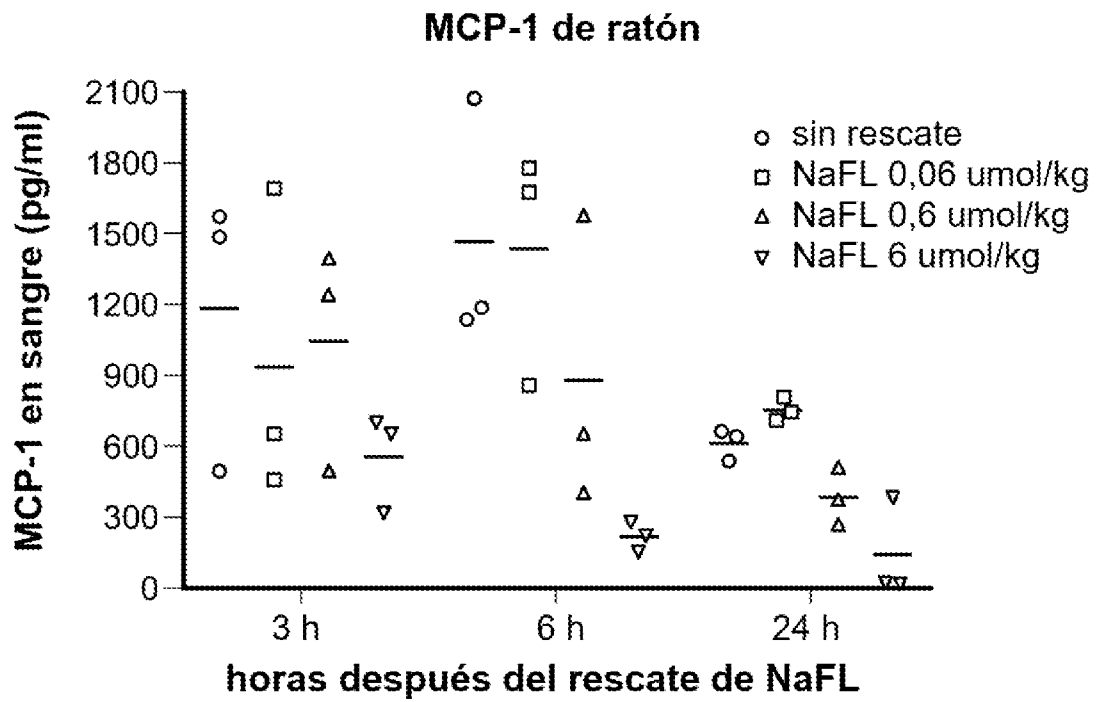


FIG. 79

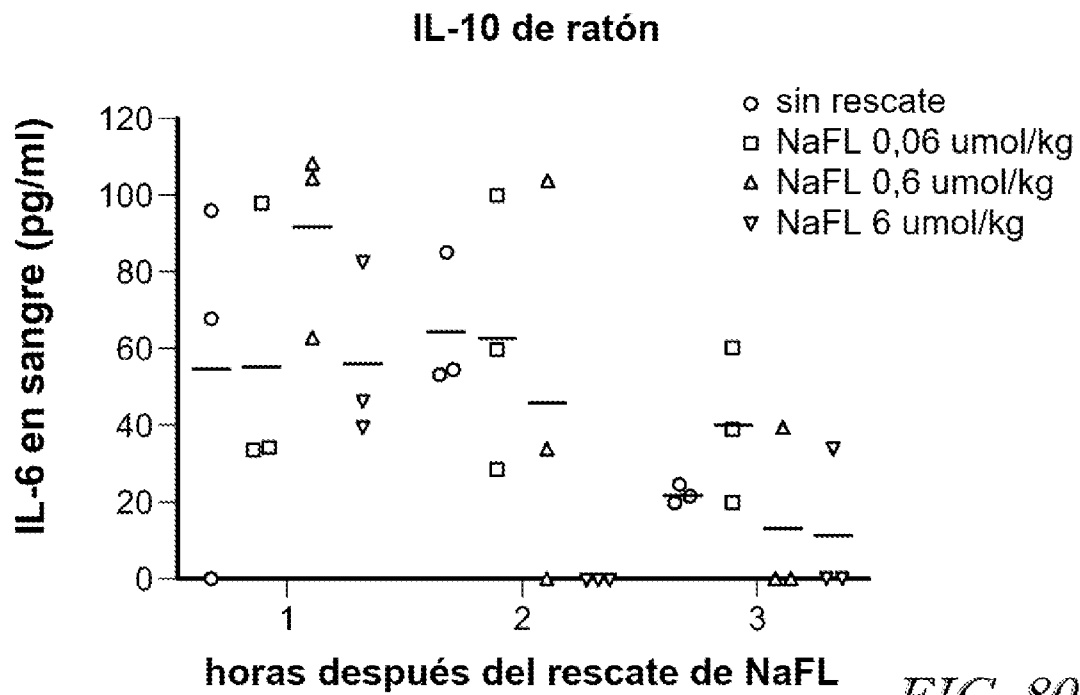
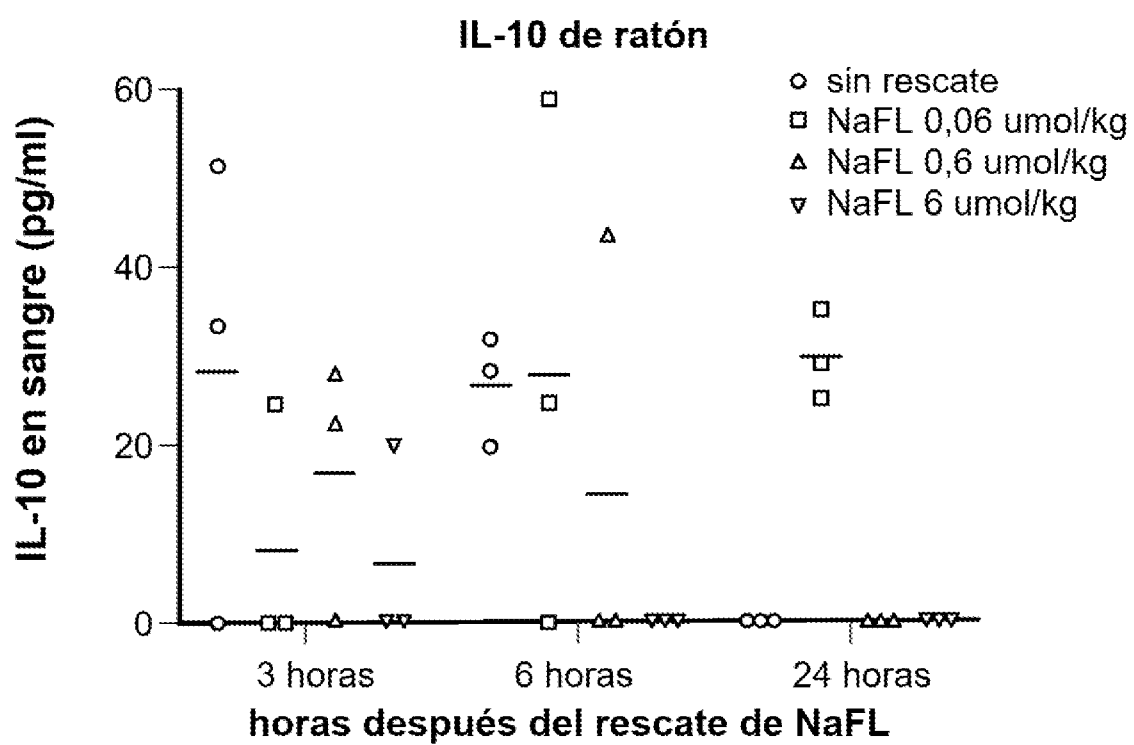


FIG. 80

*FIG. 81*

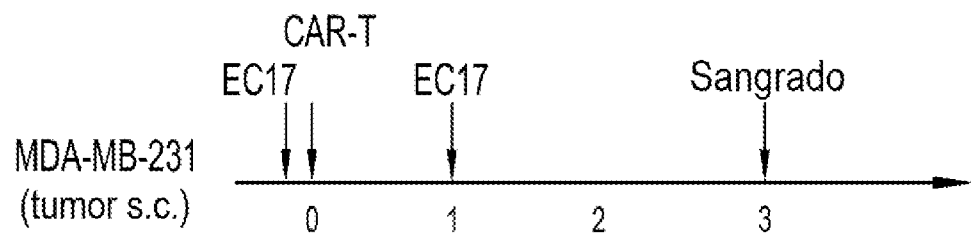


FIG. 82A

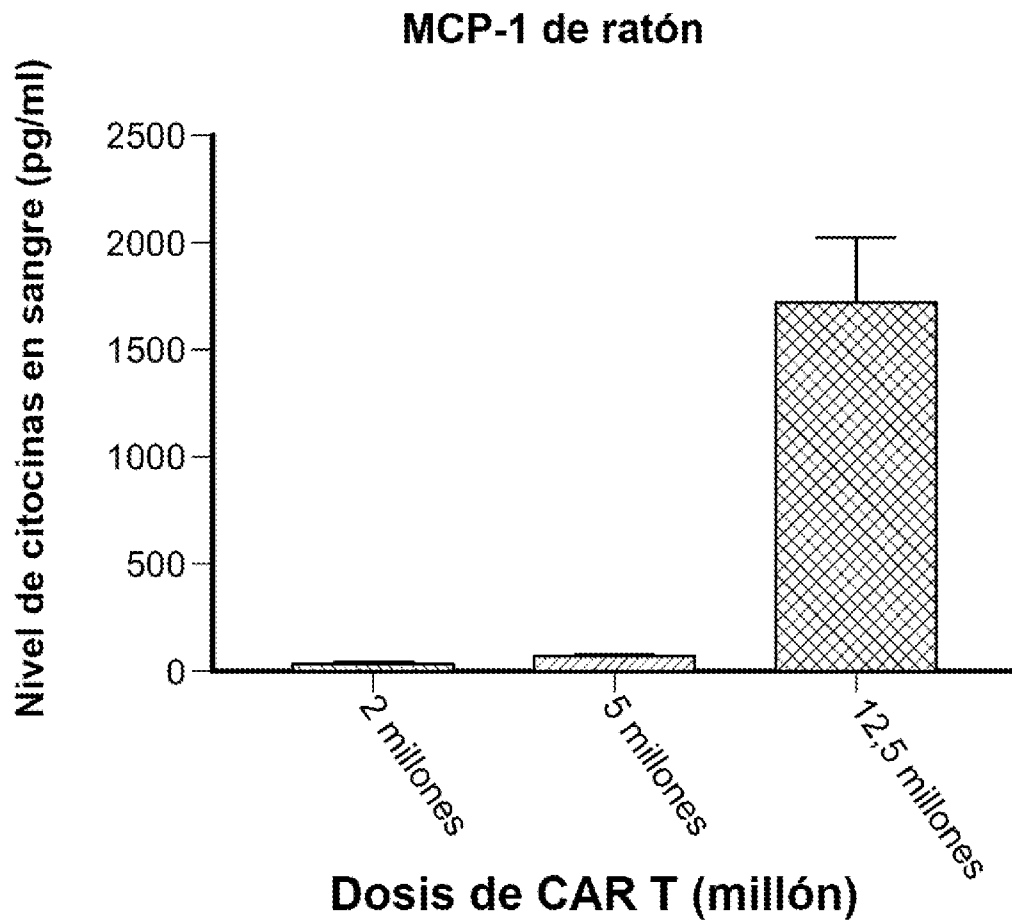


FIG. 82B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 2014100615 A1 [0007]
• US 201544229 W [0211] [0299]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15 • JENNIFER S. Y. MA *et al.* Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *PNAS*, 12 January 2016, vol. 113 (4), E450-E458 [0005]
• DAVID T. RODGERS *et al.* Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *PNAS*, 26 January 2016, vol. 113 (4), E459-E468 [0006]
• SAMBROOK *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0138]
20 [0142] [0145]
• GREEN ; SAMBROOK. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012 [0138] [0142] [0145]