

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 636**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2017** **PCT/GB2017/051596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017** **WO17208018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2017** **E 17734131 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** **EP 3464380**

54 Título: **Régimen de dosificación de la proteína de fusión TCR - scfv anti-cd3 específica de gp100**

30 Prioridad:

**02.06.2016 GB 201609683**

**13.07.2016 GB 201612193**

**14.07.2016 GB 201612260**

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

**24.03.2025**

73 Titular/es:

**IMMUNOCORE LIMITED (100.00%)**  
**92 Park Drive, Milton Park**  
**Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB**

72 Inventor/es:

**COUGHLIN, CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 3 008 636 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

Régimen de dosificación de la proteína de fusión TCR - scfv anti-cd3 específica de gp100

La presente invención se relaciona con el tratamiento del cáncer, particularmente cánceres gp100 positivos. En particular, se relaciona con un régimen de dosificación para una terapia biespecífica de redirección de células T que comprende una fracción de diana que se une al complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 fusionado a una fracción de redirección de células T que se une a CD3.

La información técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la invención, que se define exclusivamente por medio de las reivindicaciones adjuntas. Dicha información técnica adicional que no entra dentro del ámbito de las reivindicaciones anexas, no forma parte de la invención. Las referencias a procedimientos de tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos para uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por medio de terapia correspondientes.

La glicoproteína humana 100 (gp100) es uno de un panel de antígenos asociados al melanoma frente a los que el organismo puede montar una respuesta inmunitaria natural. La proteína es una glicoproteína de 661 aminoácidos asociada a la membrana melanosomal que se expresa en los melanocitos normales y se sobreexpresa ampliamente en la mayoría de las células cancerosas de melanoma. Por ejemplo, un estudio (Trefzer et al., (2006) Melanoma Res. 16(2): 137-45) descubrieron que el 82% de 192 metástasis de melanoma de 28 pacientes con melanoma expresaban gp100. Varios estudios informaron de mayores niveles de expresión de gp100 en tejidos de melanoma (Hofbauer et al., (2004) J Immunother. 27(1): 73-78, Barrow et al., (2006) Clin Cancer Res. 12:764-71). Aunque la mayoría de los cánceres positivos para gp100 son melanomas, la bibliografía también contiene numerosos informes de otras formas de cáncer tales como el sarcoma de células claras y varios subtipos de cáncer cerebral que expresan gp100, tal y como se detecta, por ejemplo, por medio de inmunohistoquímica con un anticuerpo denominado HMB-45, un anticuerpo de diagnóstico específico de gp100 ampliamente utilizado (Huang et al., (2015) Int J Clin Exp Pathol. 8(2):2171-5, Ozuguz et al., (2014) Indian Dermatol Online J 5(4): 488-90, Taddei et al., Appl Immunohistochem Mol Morphol (2001) 9(1):35-41). Se desconoce la función exacta de la proteína, pero parece estar implicada en la maduración de los melanosomas (Hoashi et al., 2005; Kawakami y Rosenberg, 1997). El antígeno gp100 ha sido, y sigue siendo, el objetivo de varios ensayos clínicos de melanoma basados en inmunoterapia.

La inmunoterapia dirigida a gp100 temprana implicaba estrategias de vacunación con péptidos o virus que expresaban la proteína gp100 en su totalidad, o porciones de la misma (revisado en (Lens (2008) Expert Opin Biol Ther.). 8(3): 315-323.)). Estos ensayos han tenido un éxito limitado, lo que se cree que se debe a la generación de una respuesta inmunitaria insuficiente más que a un reflejo de la validez de la diana. Por lo tanto, el principio de utilizar gp100 como diana del melanoma sigue siendo un enfoque válido para la inmunoterapia específica del melanoma.

El desarrollo de una nueva terapia biespecífica que comprende una fracción diana específica de gp100 basada en un receptor de células T fusionada con una fracción redireccionadora de células T de unión a CD3 proporciona una nueva opción de tratamiento (Liddy et al., (2012).). Nat Med. 8: 980-987). El mecanismo de acción de esta terapia es significativamente diferente al de otras inmunoterapias predecesoras y da lugar a la rápida y potente reorientación de células T no específicas de gp100 para destruir células gp100 positivas *in vitro*; por lo tanto, existen motivos fundados para esperar tanto mejores resultados de eficacia clínica en los pacientes como toxicidades en-diana no tumorales de la actividad contra tejidos normales gp100 positivos, tales como los melanocitos de la piel.

Los péptidos YLEPGPVTA (SEQ ID No: 1) corresponde a los aminoácidos 280-288 de la gp100. El péptido YLEPGPVTA (SEQ ID No: 1) es presentado por moléculas HLA de clase I en células cancerosas gp100<sup>+</sup>/HLA-A\*02<sup>+</sup> (Salgaller et al., (1996) Cancer Res 56: 4749-4757). El documento WO2011/001152 describe TCRs que se unen al péptido YLEPGPVTA presentado como un complejo péptido-HLA-A\*02. Los TCR están mutados con respecto a los dominios variables alfa y/o beta de un TCR gp100 nativo para mejorar la afinidad de unión y/o la semivida de unión al complejo, y pueden asociarse (covalentemente o de otro modo) con un agente terapéutico. Uno de estos agentes terapéuticos es un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento funcional o variante de dicho anticuerpo anti-CD3, tal como un fragmento variable de cadena simple (scFv). El anticuerpo anti-CD3 o fragmento puede estar unido covalentemente al terminal C o N de la cadena alfa o beta del TCR. Tales TCR se han utilizado para tratar el melanoma en pacientes (identificador de ensayo clínico NCT01211262).

IMCgp100 es un agente terapéutico biespecífico redireccionador de células T que comprende un TCR soluble mejorado por afinidad que se une al complejo péptido YLEPGPVTA -HLA-A\*02, fusionado a un scFv anti-CD3. Se ha demostrado que IMCgp100 funciona *in vitro* uniéndose a células diana gp100 positivas e induciendo la muerte por medio del reclutamiento de células T específicas y no específicas de tumores. Una vez unido al complejo péptido-HLA-A\*02 en la superficie de una célula diana gp100 positiva, IMCgp100 reticula la célula diana a la célula T por medio de la interacción de la porción scFv anti-CD3 de la molécula. El entrecruzamiento de las dos células a través de la terapéutica biespecífica da lugar a la formación de una sinapsis inmunitaria, la activación de la célula T y la redirección de una respuesta de la célula T contra la célula diana gp100 positiva. IMCgp100 puede activar tanto las células T CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup>; sin embargo, su función principal es inducir respuestas de células T CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, también conocidos como linfocitos T citotóxicos (LTC), desempeñan un papel esencial en el repertorio del

sistema inmunitario natural para combatir el cáncer. Los LTC son citolíticos y su función es inducir la lisis de la célula tumoral a través de la vía apoptótica.

Como se ha mencionado anteriormente, la gp100 se expresa en células sanas normales, incluidos los melanocitos, lo que plantea la posibilidad de reactividad en-diana, no tumorales en un entorno clínico. Se sabe que los niveles de expresión de gp100 en los melanocitos son más bajos que en los tumores. Durante las pruebas preclínicas de IMCgp100, se confirmó que IMCgp100 era capaz de redirigir la actividad de las células T contra los melanocitos normales, pero con una potencia inferior a la de las células tumorales, siendo la potencia en este contexto directamente proporcional al número de epítopos mostrados en la superficie de las células diana (Liddy et al., (2012). Nat Med. 8: 980-987). Aunque estos datos indican una posible ventana terapéutica entre la reactividad dentro y fuera del tumor, no puede excluirse la reactividad dentro y fuera del tumor con el tratamiento con IMCgp100. Se espera que cualquier reactividad a los melanocitos en la piel durante los ensayos clínicos se manifieste como toxicidad relacionada con la piel, tal como erupciones cutáneas, vitiligo y los efectos de la liberación localizada de citoquinas y quimioquinas, que pueden tratarse con hidrocortisona. Durante los ensayos preclínicos *in vitro* de IMCgp100 no se identificaron otros problemas de seguridad, incluida ninguna evidencia de reactividad cruzada fuera de diana. IMCgp100 fue aprobado para pruebas clínicas basándose en estos datos. Como apreciarán los expertos en la materia, los niveles de dosis terapéutica adecuados no pueden predecirse *a priori* y dependen tanto del mecanismo de acción del fármaco como del perfil de expresión del antígeno diana. De ello se deduce que, aunque se conocen las toxicidades en-diana y no tumorales de numerosas vacunas específicas de gp100 y terapias autólogas de células T que se han evaluado en la clínica, seguiría siendo imposible predecir una dosis terapéutica adecuada para una terapéutica de redirección de células T *a priori*. Esto se debe a que, mientras que las vacunas y las terapias con células T autólogas hacen que sólo una pequeña proporción de las células T del paciente sean capaces de reconocer las células gp100 positivas, una terapia de redirección de células T puede, en teoría, proporcionar a todas las células T CD3 positivas del paciente la capacidad de reconocer las células gp100 positivas y reaccionar ante ellas.

La seguridad y tolerabilidad de IMCgp100 en pacientes con melanoma avanzado se ha investigado en un ensayo de fase I (identificador de ensayo clínico NCT01211262). Se han presentado resultados provisionales de este estudio (Middleton et al., (2015) Cancer Res 2015;75 (15 Suppl):Abstract nr CT106). Se determinó que la dosis máxima tolerada para la administración semanal era de 600 ng/kg, que pasó a ser una dosis recomendada de fase II (RP2D) de 50 µg por dosis, independientemente del peso del paciente. Durante la fase de aumento de dosis del estudio, se observó hipotensión grave (grado 3/4) como principal toxicidad limitante de la dosis. Posteriormente, una cohorte de pacientes recibió una dosis semanal de RP2D y se notificaron nuevos episodios de hipotensión grave. Otros efectos adversos frecuentes fueron erupción cutánea, prurito, pirexia y edema. Los efectos adversos suelen manifestarse poco después de la primera o segunda dosis del fármaco. Las dosis semanales adicionales de IMCgp100 más allá de la dosis 2 dieron lugar a menos reacciones adversas y a una mejora general de la gravedad de estos acontecimientos. Para aumentar la tolerabilidad durante las primeras dosis, la primera dosis semanal de IMCgp100 se redujo en un 20% a 40 µg, como es práctica habitual, seguida de una dosificación a RP2D en las semanas siguientes. Sin embargo, siguieron produciéndose casos de hipotensión grave. La expresión de gp100 en los melanocitos de la piel proporciona un gran depósito de células positivas al antígeno en el órgano más grande del cuerpo. La potente orientación de las células gp100 positivas por IMCgp100 conduce a una actividad redirigida de las células T contra los melanocitos cutáneos gp100 positivos. Esto se manifiesta como toxicidad cutánea en los pacientes. El análisis del suero de los pacientes y las muestras de biopsia demuestran la liberación localizada de citocinas y quimioquinas tanto en la piel como en los tumores, lo que da lugar a un elevado volumen de células T que pasan de la circulación periférica a los tejidos en un espacio de tiempo extremadamente corto.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una terapéutica biespecífica de redirección de células T que comprende (i) una fracción diana que se une al complejo YLEPGPVT-A-HLA-A2 fusionada a (ii) una fracción de redirección de células T de unión a CD3, en la que la fracción diana es un receptor de células T (TCR), la fracción de redirección de células T de unión a CD3 es un anticuerpo anti-CD3, y la terapéutica biespecífica comprende una secuencia de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO: 4, y una secuencia cadena beta anti-CD3 del TCR de SEQ ID NO: 5, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer gp100 positivo en un paciente que comprende la administración del terapéutico biespecífico a dicho paciente mediante infusión intravenosa en

(a) al menos una primera dosis comprendida entre 10 y 30 µg;

(b) al menos una segunda dosis comprendida entre 20 y 40 µg, en la que la o cada una de las segundas dosis es superior a la primera; y a continuación

(c) al menos una dosis comprendida entre 50 y 70 µg,

en el que cada dosis se administra cada 5-10 días.

Los inventores han encontrado sorprendentemente un régimen de escalado de dosis intrapaciente que proporciona una tolerabilidad mejorada para tratar tumores gp100 positivos con una terapéutica biespecífica que emplea un mecanismo de acción mediado por redirección de células T. La presente invención proporciona un régimen de dosificación escalonada en el que se reducen significativamente los efectos secundarios indeseables, como la hipotensión grave. El régimen de dosificación es útil para reducir la gravedad de la toxicidad en-diana, no tumorales

en los pacientes, reduciendo así la necesidad de que los pacientes permanezcan hospitalizados y/o sean ingresados en cuidados intensivos durante las primeras semanas de tratamiento. Un beneficio adicional y sorprendente es que, al mejorar los efectos sobre la actividad de las células T en el objetivo y fuera del tumor por medio del uso del régimen de dosificación, los pacientes pueden tolerar de forma segura niveles de dosis terapéuticas globales más altos que el R2P2 existente de 50µg, lo que se espera que resulte en una eficacia clínica mejorada. Sin querer estar limitados por la teoría, los inventores plantean la hipótesis de que la toxicidad limitante de la dosis de hipotensión está impulsada por los niveles de exposición  $C_{max}$  de la terapia biespecífica, la presencia de una gran cantidad de melanocitos gp100 positivos en el compartimento cutáneo y el grado de expresión tumoral de gp100 en el paciente con respecto tanto a la carga de la enfermedad del paciente como al nivel de expresión de gp100 en los tumores del paciente. Los inventores creen que el régimen de dosificación puede permitir una destrucción suficiente de los melanocitos normales de la piel que expresan altos niveles de gp100 para permitir posteriormente una administración más segura de dosis terapéuticas más altas que resulten en una mejor focalización de las células tumorales gp100 positivas restantes y, por lo tanto, mejoren la eficacia clínica.

Los inventores observaron que los pacientes con tumores de mayor diámetro o mayor carga global de enfermedad experimentaron respuestas tumorales objetivas a exposiciones globales más altas a IMCgp100 que los pacientes con tumores o carga de enfermedad más pequeños. Basándose en estos datos, los inventores plantean la hipótesis de que una mayor exposición al fármaco en las semanas siguientes a la mitigación de las toxicidades anteriormente limitantes de la dosis mediante el uso del régimen de dosificación de la invención puede conducir a una mayor respuesta tumoral.

En la presente invención, las dosis respectivas se expresan como un peso especificado de terapéutico con independencia del peso del paciente o de si se administraría la misma cantidad de terapéutico si se calculara mediante uno de los otros procedimientos utilizados rutinariamente para calcular una dosis adecuada para un paciente, tales como peso de terapéutico por Kg de peso corporal, superficie corporal o masa muscular magra, etc. Es preferente que el peso especificado del fármaco se administre a intervalos semanales, por ejemplo, los días 1, 8, 15, 22, etc. del régimen de tratamiento, pero el intervalo de dosificación puede ser más largo o más corto. El intervalo de dosificación puede depender de las características de unión al antígeno del terapéutico biespecífico redireccionador de células T y de su semivida de eliminación. Así, cada dosis puede administrarse cada 6-9 o 6-8 días. Preferentemente, cada dosis se administra cada 7 días. Las dosis respectivas pueden estar separadas por intervalos diferentes. Alternativamente, pueden estar separados por el mismo intervalo.

La primera dosis está en el intervalo de 10-30 µg. Puede oscilar entre 13-27 µg, 15-25 µg o 18-22 µg. La dosis puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 µg. Una primera dosis preferente es de 20 µg, que puede administrarse semanalmente. Puede administrarse una primera dosis. Alternativamente, puede administrarse más de una primera dosis, preferentemente de 2 a 5 primeras dosis y más preferentemente dos primeras dosis. Es preferente que, si se administran dos o más primeras dosis, sean iguales. Sin embargo, pueden ser diferentes.

La segunda dosis está en el intervalo de 20-40µg y es superior a la primera dosis. La segunda dosis puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 µg superior a la primera dosis. Puede oscilar entre 23-37 µg, 25-35 µg o 28-32 µg. La dosis posterior puede ser de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 µg. Una segunda dosis preferente es de 30 µg, que puede administrarse semanalmente. Puede administrarse una segunda dosis. Alternativamente, puede administrarse más de una segunda dosis, preferentemente de 2 a 5 segundas dosis y más preferentemente dos segundas dosis. Se prefiere que, si se administran dos o más segundas dosis, sean iguales. Sin embargo, pueden ser diferentes.

La dosis después de la segunda dosis está en el intervalo de 50-70 µg. La dosis puede ser de al menos 50, 55, 60, o 65 µg. Una dosis preferente después de la segunda dosis es de 50 µg. Otro es de 60 µg y otro de 70 µg. La misma dosis puede utilizarse posteriormente. Alternativamente, se puede aumentar la dosis. Por ejemplo, la dosis puede ser 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 µg más alta.

La primera dosis puede ser de 20 µg, la segunda dosis puede ser de 30 µg y/o la dosis después de la segunda dosis puede ser de 50 µg o mayor.

La terapéutica biespecífica de redirección de células T útil en la presente invención comprende (i) una fracción de diana que se une al complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 fusionada a (ii) una fracción de redirección de células T de unión a CD3, como se define en la reivindicación 1.

El residuo diana es un receptor de células T (TCR). Los TCR se describen mediante el uso de la nomenclatura TCR de International Immunogenetics (IMGT) y enlaces a la base de datos pública de secuencias de TCR de IMGT. Las secuencias distintivas definidas por la nomenclatura IMGT son ampliamente conocidas y accesibles para quienes trabajan en el campo de los TCR. Por ejemplo, pueden encontrarse en "T cell Receptor Factsbook", (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8; Lefranc, (2011), Cold Spring Harb Protoc2011(6): 595-603 Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 1O Lefranc, (2003), Leukemia 17(1): 260-266y en la página web del IMGT ([www.IMGT.org](http://www.IMGT.org))

Los TCR desvelados en la presente memoria descriptiva pueden estar en cualquier formato conocido por aquellos en la técnica. Por ejemplo, los TCR de la invención pueden ser heterodímeros αβ, o pueden estar en formato

monocatenario (como los descritos en el documento WO9918129). Los TCR monocatenarios incluyen polipéptidos de TCR  $\alpha\beta$  del tipo  $V\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\beta$ -L- $V\alpha$ ,  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ ,  $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$  o  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$ , opcionalmente en la orientación inversa, en la que  $V\alpha$  y  $V\beta$  son regiones variables TCR  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente,  $C\alpha$  y  $C\beta$  son regiones constantes TCR  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, y L es una secuencia enlazadora. El TCR en la terapia biespecífica de redirección de células T para su uso en la invención está en una forma soluble (es decir, no tiene dominios transmembrana o citoplasmáticos). Para la estabilidad, tales TCRs solubles tienen preferentemente un enlace disulfuro introducido entre los restos de los dominios constantes respectivos, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/020763. Los TCR preferentes de este tipo incluyen los que tienen una secuencia de dominio constante TRAC1 y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 excepto que Thr 48 de TRAC1 y Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 se sustituyen por residuos de cisteína, formando dichas cisteínas un enlace disulfuro entre la secuencia de dominio constante TRAC1 y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR. Otros TCR desvelados en la presente memoria descriptiva pueden contener cadenas alfa y beta de longitud completa.

El dominio constante de cadena alfa y/o beta de los TCR desvelados en la presente memoria descriptiva puede truncarse en relación con las secuencias TRAC/TRBC nativas/naturales. Además, las TRAC/TRBC pueden contener modificaciones. Por ejemplo, la secuencia extracelular de la cadena alfa puede incluir una modificación con respecto a TRAC nativo/natural por la que el aminoácido T48 del TRAC, con referencia a la numeración IMGT, se sustituye por C48. Asimismo, la secuencia extracelular de la cadena beta puede incluir una modificación con respecto a TRBC1 o TRBC2 nativo/natural por la que S57 de TRBC1 o TRBC2, con referencia a la numeración IMGT, se sustituye por C57. Estas sustituciones de cisteína con respecto a las secuencias extracelulares nativas de las cadenas alfa y beta permiten la formación de un enlace disulfuro no nativo intercatenario que estabiliza el TCR soluble replegado, es decir, el TCR formado replegando las cadenas extracelulares alfa y beta (documento WO 03/020763). Este enlace disulfuro no nativo facilita la presentación de los TCR correctamente plegados sobre los fagos (Li et al., Nat Biotechnol 2005 Mar;23(3):349-54). Además, el uso del TCR soluble estable unido por disulfuro permite una evaluación más conveniente de la afinidad de unión y de la semivida de unión. Se describen posiciones alternativas para la formación de un enlace disulfuro no nativo en el documento WO 03/020763.

Los TCR desvelados en la presente memoria descriptiva pueden ser diseñados para incluir mutaciones. Los procedimientos para producir variantes mutadas de TCR de alta afinidad, tales como la presentación por fagos y la mutagénesis específica dirigida al sitio, son conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, véase el documento WO 04/044004, y Li et al., Nat. Biotechnol., marzo de 2005, 23(3):349-354).

Los TCR útiles en la presente invención pueden tener una afinidad de unión para, y/o una semivida de unión para, el complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 al menos el doble que la de un TCR que tiene la secuencia de cadena alfa extracelular SEQ ID Núm.: 2 y la secuencia de la cadena extracelular beta SEQ ID NO: 3. Los TCR útiles en la invención pueden tener un  $K_D$  para el complejo de  $\leq 8 \mu M$ ,  $\leq 5 \mu M$ ,  $\leq 1 \mu M$ ,  $\leq 0,1 \mu M$ ,  $\leq 0,01 \mu M$ ,  $\leq 0,001 \mu M$ , o  $\leq 0,0001 \mu M$  y/o tener una semivida de unión ( $T_{1/2}$ ) para el complejo de  $\geq 15s$ ,  $\geq 3s$ ,  $\geq 10s$ ,  $\geq 20s$ ,  $\geq 40s$ ,  $\geq 60s$ ,  $\geq 600s$ , o  $\geq 6000s$ . Un  $K_D$  y/o semivida de unión ( $T_{1/2}$ ) preferentes son aproximadamente 10-100pM y aproximadamente 6-48 horas respectivamente. Una  $K_D$  y/o semivida de unión ( $T_{1/2}$ ) particularmente preferentes son aproximadamente 24 pM y aproximadamente 24 horas.

La afinidad de unión (inversamente proporcional a la constante de equilibrio  $K_D$ ) y la semivida de unión (expresada como  $T_{1/2}$ ) pueden determinarse mediante cualquier procedimiento apropiado. Se apreciará que la duplicación de la afinidad de un TCR resulta en la reducción a la mitad de la  $K_D$ .  $T_{1/2}$  se calcula como  $\ln 2$  dividido por la tasa de desactivación ( $k_{off}$ ). Por lo tanto, duplicando los resultados de  $T_{1/2}$  los valores de  $k_{off}$  se reducen a la mitad. Los valores de  $K_D$  y  $k_{off}$  para los TCR se miden normalmente para las formas solubles del TCR, es decir, aquellas formas truncadas para eliminar los residuos del dominio transmembrana. Por lo tanto, debe entenderse que un TCR dado cumple el requerimiento de tener una afinidad de unión y/o una semivida de unión mejoradas para el complejo YLEPGPVTA-HLA-A2, si una forma soluble de ese TCR cumple tal requerimiento. Preferentemente, la afinidad de unión o la semivida de unión de un TCR dado se mide varias veces, por ejemplo 3 veces o más, utilizando el mismo protocolo de ensayo, y se toma un promedio de los resultados. Estas mediciones pueden realizarse mediante el uso del procedimiento de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) del ejemplo 3 de WO2011/001152. El TCR gp100 de referencia - que tiene la secuencia de cadena alfa extracelular SEQ ID No: 2 y la secuencia de la cadena beta extracelular SEQ ID NO: 3 - tiene un  $K_D$  de aproximadamente 19  $\mu M$  medido por ese procedimiento, y un  $k_{off}$  de aproximadamente  $1 s^{-1}$  (es decir,  $T_{1/2}$  de aproximadamente 0,7s).

Los TCR desvelados en la presente memoria descriptiva pueden asociarse con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento funcional o variante de dicho anticuerpo anti-CD3, y pueden ser como se describe en WO2011/001152. Los fragmentos y variantes/análogos de anticuerpos que son adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva incluyen, pero no se limitan a, minicuerpos, fragmentos Fab, fragmentos  $F(ab')_2$ , fragmentos dsFv y scFv, Nanocuerpos™ (estos constructos, comercializados por Ablynx (Bélgica), comprenden un dominio pesado variable de inmunoglobulina única sintética derivado de un camélido (por ejemplo, camello o llama) y anticuerpos de dominio (Domantis (Bélgica), que comprenden un dominio pesado variable de inmunoglobulina única madurado por afinidad o un dominio ligero variable de inmunoglobulina).

El terapéutico biespecífico de redirección de células T para uso en la presente invención comprende una fracción de redirección de células T de unión a CD3 que es un anticuerpo anti-CD3, como se define en la reivindicación 1. La

terapia biespecífica comprende una secuencia de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO: 4, y una secuencia cadena beta anti-CD3 del TCR de SEQ ID NO: 5.

Las fusiones TCR-anti CD3 desveladas en la presente memoria descriptiva incluyen una secuencia de aminoácidos de cadena alfa de TCR seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 (i) la secuencia de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO: 2, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia de SEQ ID No: 4, en la que el aminoácido en la posición 1 es S;
- (ii) la secuencia de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO: 2, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia de SEQ ID No: 4, en la que el aminoácido en la posición 1 es A;
- 10 (iii) la secuencia de cadena pesada de TCR alfa de SEQ ID NO: 2, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia de SEQ ID No: 4, en la que el aminoácido en la posición 1 es G;
- (iv) la secuencia de cadena pesada de TCR alfa de SEQ ID NO: 2, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia de SEQ ID No: 4, en la que el aminoácido en la posición 1 es S y la terminal C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 hasta S203, ambos inclusive, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2;
- 15 (v) la secuencia de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO: 2, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia de SEQ ID No: 4, en la que el aminoácido en la posición 1 es A y la terminal C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 hasta S203, ambos inclusive, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2;
- 20 (vi) la secuencia de cadena alfa TCR de SEQ ID NO: 2, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia de SEQ ID No: 4, el aminoácido en la posición 1 es G y la terminal C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 hasta S203, ambos inclusive, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2; y

una secuencia de aminoácidos cadena beta-anti-CD3 del TCR seleccionada del grupo que consiste en:

- 25 (vii) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente;
- (viii) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente;
- (ix) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q respectivamente;
- 30 (x) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente los aminoácidos en las posiciones 108-131 se sustituyen por RTSGPGDGGKGGPGKGPGEKGTGPGG (SEQ ID No: 6), y los aminoácidos en las posiciones 254-258 se sustituyen por GGEGGGSEGGGGS (SEQ ID No: 7);
- (xi) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;
- 35 (xii) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;
- (xiii) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;
- 40 (xiv) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;
- 45 (xv) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;
- 50 (xvi) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xvii) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que el aminoácido en las posiciones 1 y 2 es A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

5 (xviii) la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que el aminoácido en las posiciones 1 y 2 es A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xix) y la cadena beta-anti-CD3 del TCR comprende la secuencia de SEQ ID No: 5, en la que el aminoácido en las posiciones 1 y 2 es A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

10 Ejemplos de tales fusiones TCR-anti CD3 desveladas en la presente memoria descriptiva son aquellas en las que:

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (vi);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (x);

15 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (ix);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (vii);

20 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xi);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xii);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiii);

25 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiv);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xv);

30 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xvi);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xvii);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xviii);

35 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xix);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xi);

40 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xii); y

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiii).

45 Alternativamente, una fracción diana en un terapéutico biespecífico redireccionador de células T desvelado en la presente memoria descriptiva puede ser un anticuerpo. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno, ya sean naturales o producidas parcial o totalmente de forma sintética. El término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, anticuerpos humanizados, incluido cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético, y cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea

50

un dominio de unión a anticuerpo o que sea homólogo con el mismo. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o un equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en el documento EP-A-0120694 y en el documento EP-A-0125023. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo modificado que tiene las regiones variables de un anticuerpo no humano, por ejemplo, murino, y la región constante de un anticuerpo humano. Los procedimientos para fabricar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. Núm. 5225539. Algunos ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) y sus subclases isotópicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión al antígeno, tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo monoclonal puede denominarse aquí "mab".

Es posible tomar un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, y utilizar la tecnología del ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conserven la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (RCD), de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones marco, de una inmunoglobulina diferente (véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400). Un hibridoma (u otra célula que produzca anticuerpos) puede estar sujeto a mutaciones genéticas u otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Algunos ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que está formado por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que está formado por los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que está formado por los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. *et al.*, Nature, 1989 Oct 12;341(6242):544-6) que consiste en un dominio VH; (v) regiones RCD aisladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird *et al.*, Science. 1988 Oct 21;242(4877):423-6; Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1988 Ago;85(16):5879-83); (viii) dímeros de Fv de cadena única biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión de genes (WO94/13804 P. Hollinger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Jul 15;90(14):6444-8). Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, y cada polipéptido comprende un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, y los dos dominios están unidos (por ejemplo, por un conector peptídico), pero no pueden asociarse entre sí para formar un sitio de unión al antígeno: los sitios de unión al antígeno se forman por la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (documento WO94/13804). Cuando se vayan a utilizar anticuerpos biespecíficos, puede tratarse de anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse de diversas maneras (Hollinger y Winter, Curr. Opin. Biotechnol., 1993 Ago;4(4):446-9), por ejemplo, preparado químicamente o a partir de hibridomas, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Puede ser preferente utilizar diacuerpos o dímeros de scFv en lugar de anticuerpos enteros. Los diacuerpos y los scFv pueden construirse sin región Fc, mediante el uso de únicamente dominios variables, lo que reduce potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica. Otras formas de anticuerpos biespecíficos son los "Janusins" de cadena única descritos en Trautnecker *et al.*, EMBO J. 1991 dic;10(12):3655-9). Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como los fragmentos de anticuerpos) con las especificidades de unión adecuadas pueden seleccionarse fácilmente por medio de la presentación por fagos (documento WO94/13804) a partir de bancos. Si uno de los brazos del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces puede prepararse un banco en el que se varíe el otro brazo y se seleccione un anticuerpo de especificidad adecuada. Un "dominio de unión al antígeno" es la parte de un anticuerpo que comprende la zona que se une específicamente a un antígeno y es complementaria a una parte o a la totalidad del mismo. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte concreta del antígeno, que se denomina epítipo. Uno o más dominios variables de anticuerpo pueden proporcionar un dominio de unión al antígeno. Un dominio de unión al antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

El residuo de unión puede ser una molécula similar a un TCR que ha sido diseñada para unirse específicamente a un complejo péptido-MHC. Se prefieren especialmente los anticuerpos que imitan el TCR, tales como, por ejemplo, los descritos en el documento WO2007143104 y Sergeeva *et al.*, Blood, 2011 Abr 21;117(16):4262-72 y/o Dahan y Reiter. Expert. Rev. Mol. Med., 2012 Feb 24;14:e6.

También se divulgan en el presente documento fracciones de unión basados en andamios proteicos diseñados. Los andamios proteicos se derivan de estructuras proteicas naturales estables y solubles que han sido modificadas para proporcionar un sitio de unión para una molécula objetivo de interés. Entre los ejemplos de andamiajes proteicos diseñados se encuentran, pero no se limitan a, las aficuerpos, que se basan en el dominio Z de la proteína A estafilocócica que proporciona una interfaz de unión en dos de sus hélices a (Nygren, FEBS J. 2008 Jun;275(11):2668-76); las anticalinas, derivadas de las lipocalinas, que incorporan sitios de unión para pequeños ligandos en el extremo abierto de un pliegue de barril beta (Skerra, FEBS J. 2008 Jun;275(11):2677-83), nanocuerpos y DARPin. Los andamiajes proteínicos diseñados suelen estar dirigidos a unirse a las mismas proteínas antigénicas que los

anticuerpos y son potenciales agentes terapéuticos. Pueden actuar como inhibidores o antagonistas o como vehículos de transporte para dirigir moléculas, tales como toxinas, a un tejido específico *in vivo* (Gebauer y Skerra, Curr. Opin. Chem. Biol., junio de 2009, 13(3):245-155). También pueden utilizarse péptidos cortos para unirse a una proteína diana. Los filómeros son péptidos naturales estructurados derivados de genomas bacterianos. Estos péptidos representan una amplia gama de pliegues estructurales de proteínas y pueden utilizarse para inhibir/interrumpir las interacciones proteína-proteína *in vivo* (Watt, Nat. Biotechnol., 2006 Feb;24(2):177-83)].

Como se ha descrito anteriormente en relación con los TCR, una fracción de redirección de células T de unión a CD3 puede ser un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento funcional o variante de dicho anticuerpo anti-CD3, y puede ser como se describe en el documento WO2011/001152.

Un terapéutico biespecífico redireccionador de células T desvelado en la presente memoria descriptiva puede ser para uso en un procedimiento que comprende administrar a un paciente una dosis de no más de 20 µg de un terapéutico biespecífico redireccionador de células T en la semana 1, una dosis de no más de 30 µg en la semana 2, y una dosis de al menos 50 µg en la semana 3 y semanas posteriores, en el que la fracción del TCR del tratamiento biespecífico está asociada a un anticuerpo anti-CD3 redireccionador de células T o a un fragmento del mismo y tiene una afinidad de unión y/o una semivida de unión al complejo YLEPGPVT-A-HLA-A2 de al menos el doble que la de un TCR con la secuencia de cadena alfa extracelular SEQ ID No: 2 y la secuencia de la cadena beta extracelular SEQ ID NO: 3.

El terapéutico biespecífico redireccionador de células T para uso en la presente invención se administra mediante infusión intravenosa. Las vías alternativas de administración incluyen otras vías parenterales, tales como la infusión subcutánea o intramuscular, la vía enteral (incluida la vía oral o rectal), la vía inhalatoria o la vía intranasal.

El terapéutico biespecífico para uso en la presente invención puede administrarse como monoterapia. Alternativamente, puede administrarse en combinación con una o más terapias anticancerígenas, preferentemente terapias inmunomoduladoras. La posibilidad de una activación inmunitaria adicional con los tratamientos combinados aumenta el riesgo de toxicidades no tumorales. Estas terapias incluyen:

- agentes quimioterápicos, tales como la dacarbazina y la temozolamida,
- agentes inmunoterapéuticos, tales como la interleucina-2 (IL-2) y el interferón (IFN)
- inhibidores de puntos de control, tales como agentes dirigidos contra PD-1 o PD-L1, por ejemplo, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab, avelumab y durvalumab, y agentes dirigidos contra CTLA-4, como ipilimumab y tremelimumab,
- Inhibidores de BRAF, tales como vemurafenib y dabrafenib,
- Inhibidores de MEK, tales como trametinib,
- Inhibidores del TGF-β tales como el galunisertib,
- Inhibidores de la cinasa MET tales como el merestinib.

Las terapias de combinación preferentes utilizan durvalumab, tremelimumab, galunisertib y merestinib en combinación con un terapéutico biespecífico redireccionador de células T como se ha descrito anteriormente. Cuando merestinib - véase el documento WO2010011538 o un amidofenoxiindazol similar descrito en el mismo- se utiliza en combinación con el terapéutico biespecífico, la dosis de merestinib puede estar en el intervalo de 40 a 120 mg una vez al día, preferentemente en el intervalo de 80 a 120 mg una vez al día.

El terapéutico biespecífico puede administrarse solo para la primera dosis y las siguientes, añadiéndose después los agentes terapéuticos adicionales o *viceversa*. En las realizaciones de la presente invención en las que se administran en combinación una terapia biespecífica de redirección de células T y otra terapia contra el cáncer, la terapia biespecífica de redirección de células T puede administrarse sola en las semanas 1 y 2 y la otra terapia puede añadirse en la semana 3 y siguientes.

Las terapias combinadas pueden conducir a un aumento de la activación inmunitaria, incluyendo la secreción de citoquinas y quimioquinas y el tráfico de linfocitos, y por tanto a un mayor riesgo de efectos secundarios como hipotensión grave. En consecuencia, la dosis de un terapéutico biespecífico redireccionador de células T puede administrarse inicialmente como agente único antes de la dosificación combinada. En una realización preferente, se administra una dosis no superior a 20 µg en la semana 1, una dosis no superior a 30 µg en la semana 2 y una dosis de al menos 50 µg en la semana 3 y siguientes. La dosificación de una o más terapias inmunomoduladoras adicionales puede administrarse a partir de la semana 3.

La presente invención está relacionada con el tratamiento de los cánceres gp100 positivos. Uno de estos cánceres es el melanoma. El melanoma maligno sigue representando un importante problema de salud pública en todo el mundo. Se estima que en 2016 se realizarán casi 76.000 nuevos diagnósticos de melanoma en Estados Unidos y se espera que casi 10.000 personas mueran de melanoma (American Cancer Society Statistics, 2016). Además, la tasa de

- diagnóstico de melanoma sigue aumentando a un ritmo significativo; de acuerdo con los datos de Surveillance, Epidemiology, and End Results de 2015, la tasa de incidencia media aumentó un 1,4% cada año durante la última década, y el melanoma es ahora el quinto diagnóstico de cáncer más común en los Estados Unidos. Mientras que el pronóstico para los pacientes con enfermedad en estadio inicial es bueno tras la resección quirúrgica, la mediana de supervivencia desciende rápidamente con la progresión de la enfermedad, cayendo a menos de un año para los pacientes con enfermedad metastásica distal (Garbe et al., *Oncologist* 2011; 16:5-24). El aumento de la incidencia del melanoma, combinado con los malos resultados de la quimioterapia estándar y las señales tempranas de la terapia inmunitaria, han llevado a una intensa investigación de nuevos enfoques y combinaciones para mejorar la respuesta inmunitaria antitumoral.
- El melanoma a tratar de acuerdo con la presente invención puede ser melanoma cutáneo o melanoma uveal (también conocido como melanoma ocular). Alternativamente, puede ser cualquiera de melanoma sobre lentigo maligno, melanoma de extensión superficial, melanoma lentiginoso asncral, melanoma mucoso, melanoma nodular, melanoma polipoide, melanoma desmoplásico, melanoma amelanótico, melanoma de tejidos blandos, melanoma de células pequeñas con pequeñas células similares a nevus y melanoma spitzoide.
- El melanoma a tratar es generalmente enfermedad en estadio tardío (enfermedad avanzada), caracterizada típicamente por lesiones metastásicas. Por ejemplo, estadio III y/o estadio IV, (Balch et al., *J Clin Oncol* 2009; 27:6199-206).
- El melanoma uveal (MU) es un tipo raro de melanoma biológicamente distinto del melanoma cutáneo. La MU es una neoplasia extremadamente maligna que afecta a las capas vasculares del ojo (iris, cuerpo ciliar y coroides). A pesar de su escasa tasa de incidencia (representa aproximadamente el 3% de los casos de melanoma, unos 4.000 casos anuales en todo el mundo), (Papastefanou et al., (2011) *J Skin Cancer* ;2011:573974). El entorno supresivo y la falta de actividad de la inhibición de los puntos de control en la MU sugieren que la movilización de células T activadas con un enfoque específico del tumor puede tener actividad antitumoral en el contexto de esta enfermedad.
- Como se ha mencionado anteriormente otros cánceres no melanoma se han descrito en la literatura como gp100 positivos, siendo ejemplos el sarcoma de células claras y cánceres neurológicos tales como algunos gliomas. La presente invención puede utilizarse para tratar tales cánceres.
- También se desvela en la presente memoria descriptiva un procedimiento para tratar cáncer gp100 positivo en un paciente que comprende administrar un terapéutico biespecífico redireccionador de células T a dicho paciente, en el que cada dosis se administra cada 5-10 días, al menos la primera y la segunda dosis son inferiores a 40 µg y la segunda dosis es superior a la primera dosis.
- También se desvela en la presente memoria descriptiva un terapéutico biespecífico de redirección de células T que comprende (i) una fracción de diana que se une al complejo YLEPGPVT-A-HLA-A2 fusionado a (ii) una fracción de redirección de células T de unión a CD3, para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer gp100 positivo en un paciente que comprende los siguientes pasos secuenciales:
- (a) administrar al paciente una dosis semanal en el intervalo de 10-30µg del terapéutico biespecífico;
  - (b)(i) si el paciente experimenta hipotensión de grado 1 o inferior relacionada con el tratamiento, aumentar la dosis administrada al paciente a una dosis semanal en el intervalo de 20-40µg del terapéutico biespecífico, o bien
  - (b)(ii) si el paciente experimenta hipotensión relacionada con el tratamiento de grado 2 o superior, continuar administrando al paciente una dosis semanal en el intervalo de 10-30µg del terapéutico biespecífico hasta que el paciente experimente hipotensión relacionada con el tratamiento de grado 1 o inferior y, a continuación, aumentar la dosis administrada al paciente a una dosis semanal en el intervalo de 20-40µg del terapéutico biespecífico; y
  - (c)(i) si el paciente experimenta hipotensión de grado 1 o inferior relacionada con el tratamiento, aumentar la dosis administrada al paciente a una dosis semanal de al menos 50µg del terapéutico biespecífico o
  - (c)(ii) si el paciente experimenta hipotensión relacionada con el tratamiento de grado 2 o superior, continuar administrando al paciente una dosis semanal en el intervalo de 20-40µg del terapéutico biespecífico hasta que el paciente experimente hipotensión relacionada con el tratamiento de grado 1 o inferior y, a continuación, aumentar la dosis administrada al paciente a una dosis semanal de al menos 50µg del terapéutico biespecífico.
- El procedimiento anterior puede comprender además, entre las etapas (b) y (c), la etapa de:
- (d)(i) si el paciente experimenta hipotensión de grado 1 o inferior relacionada con el tratamiento, aumentar la dosis administrada al paciente a una dosis semanal en el intervalo de 30-45µg del terapéutico biespecífico, o bien
  - (d)(ii) si el paciente experimenta hipotensión relacionada con el tratamiento de grado 2 o superior, continuar administrando al paciente una dosis semanal en el intervalo de 20-40µg del terapéutico biespecífico hasta que el paciente experimente hipotensión relacionada con el tratamiento de grado 1 o inferior y, a continuación, aumentar la dosis administrada al paciente a una dosis semanal en el intervalo de 30-45µg del terapéutico biespecífico.

El grado de hipotensión puede ser evaluado por un médico.

La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que tal documento esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

Se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la cadena alfa del TCR gp100 de referencia (SEQ ID No; 2);  
  
La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la cadena beta del TCR gp100 de referencia (SEQ ID No; 3);  
  
La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena TCR  $\alpha$  específica de gp100 (SEQ ID No: 4);
- 10 La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo scFv anti-CD3 (en negrita) fusionado por medio de un enlazador, concretamente GGGGS (subrayado), en el extremo N-terminal de una cadena  $\beta$  de TCR específica de gp100 (SEQ ID Núm. 5);  
  
La Figura 5 muestra la aparición de toxicidades, incluida la hipotensión grave y/o severa, en relación con el número de dosis de IMCgp100;
- 15 La figura 6 muestra el tráfico de linfocitos desde la periferia tras la primera dosis de IMCgp100;  
  
La figura 7 muestra la proliferación de células T con IMCgp100 en presencia o ausencia de anti-CTLA-4;  
  
La figura 8 muestra la proliferación de células T con IMCgp100 en presencia o ausencia de anti- PD-L1;  
  
La figura 9 muestra la secreción de citocinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 con IMCgp100 en presencia o ausencia de anti-CTLA-4; y
- 20 La Figura 10 muestra la secreción de la citocina IFN $\gamma$  con IMCgp100 en presencia o ausencia de anti-CTLA-4.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1 - identificación de un régimen de dosificación para IMCgp100 que mejore la hipotensión grave relacionada con el fármaco y permita un aumento de la dosis superior.**

- 25 IMCgp100 es un agente biespecífico redireccionador de células T que comprende un TCR soluble mejorado por afinidad que se une al complejo péptido YLEPGPVTA -HLA-A\*02, fusionado a un scFv anti-CD3. [las cadenas alfa y beta de IMCgp100 son SEQ ID NOs 4 y 5 respectivamente] IMCgp100 se investigó en un estudio de detección de dosis abierto, primero-en-humano (PEH), para evaluar la seguridad y tolerabilidad de IMCgp100 en pacientes con melanoma maligno avanzado (identificador de ensayos clínicos: NCT01211262). El estudio se diseñó para identificar la dosis máxima tolerada (DMT) o dosis recomendada de fase II (DPR2) de IMCgp100 en 2 regímenes de dosificación repetidos: (Brazo 1) dosificación semanal (el RP2D-QW) y (Brazo 2) dosificación diaria x 4 días (el RP2D-QD).
- 30

- Se inscribieron en el estudio pacientes con melanoma maligno en estadio IV o en estadio III no resecable. Todos los pacientes eran HLA-A\*02 positivos, tenían más de 18 años de edad y se les clasificó con enfermedad medible de acuerdo con los criterios RECIST 1.1, con una esperanza de vida superior a tres meses y un estado de rendimiento del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 1 o inferior. No había límites en el número de terapias previas.
- 35 Se evaluó la función hematológica, renal, hepática y cardíaca de los pacientes. Se excluyó específicamente del estudio a los pacientes con metástasis cerebrales sintomáticas. En total, 84 pacientes recibieron tratamiento.

- IMCgp100 se administró mediante infusión intravenosa mediante el uso de una bomba de infusión controlada. Los procedimientos de cribado y las pruebas para determinar la elegibilidad se realizaron como máximo 14 días antes del inicio de la administración de IMCgp100, excepto la tipificación HLA, la resonancia magnética y las evaluaciones oftalmológica, audiológica y ecocardiológica, que se realizaron en los 28 días anteriores al inicio de la administración.
- 40 Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. Se obtuvieron muestras de sangre para realizar análisis hematológicos, bioquímicos y farmacocinéticos (PK) en el momento del cribado, el día 1 antes de la infusión, a las 4, 10 y 24 horas del inicio de la infusión y los días 2, 8 y 30.

### **Dosificación semanal: Resultados de la escalada de dosis**

- 45 Se siguió un protocolo estándar de escalada de dosis de Fase I 3+3 para definir la dosis máxima tolerada (DMT). Brevemente, la dosis de IMCgp100 se escaló en cohortes de 3(+3) pacientes hasta que se cumplieron los criterios de DMT, o hasta que se alcanzó la dosis limitante objetivo. La dosis se aumentó en incrementos de tres veces, pasando a un diseño Fibonacci modificado de acuerdo con el perfil de seguridad y PK o si se notificaba una toxicidad limitante de la dosis (TLD). La DMT se definió como el nivel de dosis más alto en el que se experimentó una TLD en más del
- 50 33% de los pacientes incluidos en ese nivel. Los TLD se observaron dentro de una ventana de 8 días tras el tratamiento

y se evaluaron siguiendo los Criterios Terminológicos Comunes para Acontecimientos Adversos (CTCAE) versión 4.0 del NCI. Se excluyeron como criterios limitantes de la dosis la linfopenia transitoria de grado 3 o 4 y la erupción cutánea sin riesgo para la vida debido a los efectos farmacológicos previstos del fármaco.

5 Durante el escalado de dosis, se trataron 31 pacientes a través de ocho cohortes de dosis y recibieron desde 5 ng/kg hasta 900 ng/kg de fármaco. Se observó toxicidad limitante de la dosis (TLD) de hipotensión de grado 3 o 4 en cuatro  
10 pacientes durante la escalada de dosis a 405 ng/kg (n=1 de 6), 600 ng/kg (n=1 de 6) y 900 ng/kg (n=2 de 6). En 3 de los 4 casos de TLD de hipotensión de grado 3 o 4, el acontecimiento se produjo tras la primera dosis de IMCgp100, aproximadamente entre 12 y 18 horas después de la dosis; 1 caso de TLD de hipotensión se produjo con la segunda dosis a 405 ng/kg, en un paciente que recibía tratamiento antihipertensivo concomitante. La hipotensión en estos 4  
15 casos se trató con líquidos intravenosos (solución salina normal e infusiones de coloides); ninguno de los pacientes requirió apoyo farmacológico (inotrópico) para la presión arterial y todos fueron tratados con corticosteroides intravenosos. Todos los casos de hipotensión de grado 3 o 4 se resolvieron con fluidoterapia y corticosteroides intravenosos en un plazo de 2 días.

Tabla 1 - Resumen de las toxicidades limitantes de la dosis (TLD) para el aumento semanal de la dosis

| Nivel de dosis (mg/kg)                                                                                                      | N (pacientes) | TLD Observado                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------|
| 5                                                                                                                           | 3             | ---                                         |
| 15                                                                                                                          | 3             | ---                                         |
| 45                                                                                                                          | 3             | ---                                         |
| 135                                                                                                                         | 3             | ---                                         |
| 270                                                                                                                         | 3             | ---                                         |
| 405                                                                                                                         | 6             | Una hipotensión de grado 3 <sup>a</sup> .   |
| 600                                                                                                                         | 6             | Una hipotensión de grado 4 <sup>a</sup> .   |
| 900                                                                                                                         | 4             | Dos hipotensiones de grado 3 <sup>a</sup> . |
| TLD =Toxicidad limitante de dosis                                                                                           |               |                                             |
| a. La hipotensión de grado 3 y 4 se asoció a una disminución significativa y rápida del recuento de linfocitos periféricos. |               |                                             |

15

Basándose en estos datos, la DMT para la dosificación semanal se declaró en 600 ng/kg.

#### **Dosificación semanal: Resultados de la cohorte RP2D-QW**

20 Una revisión de los datos de PK y seguridad de las cohortes de escalado de dosis semanal sugirió que las toxicidades más graves y las exposiciones al fármaco más altas de IMCgp100 se asociaron con dosis absolutas administradas más altas. Basándose en estos datos y en el intervalo de dosis absolutas administradas a la DMT de 600 ng/kg (n=5 pts, intervalo 34-66 µg QW, dosis mediana de 54 µg), se determinó inicialmente que la dosis recomendada de fase 2 del régimen de dosificación semanal (designado RP2D-QW) era una dosis plana de 50 µg administrada  
25 semanalmente.

25 Durante este tiempo, tres pacientes adicionales experimentaron acontecimientos adversos que implicaban hipotensión de grado 2 o superior. Se observó que estos acontecimientos se limitaban a las dos primeras dosis (por ejemplo, Ciclo 1 Día 1 (C1D1) y Ciclo 1 Día 8 (C1D8)) (Figura 5). En un intento de evitar episodios de hipotensión grave, la primera dosis de IMCgp100 se redujo posteriormente a 40 µg; sin embargo, se observó hipotensión (de grado 3/4) en otros dos pacientes tras la dosificación en C1D1 y/o C1D8; en un paciente, también se experimentó hipotensión de grado 2 tras la tercera dosis. No se notificaron casos de hipotensión grave tras dosis posteriores. Cabe señalar que los  
30 inventores observaron una relación entre la frecuencia y la gravedad de la hipotensión y el nivel de expresión de la gp100 en los tumores de los pacientes; los pacientes con melanoma uveal tienen niveles particularmente elevados de expresión de la gp100 y, por tanto, un mayor riesgo de toxicidad.

35 Otros 7 pacientes (6 melanomas uveales y 1 cutáneo) con alto riesgo de toxicidad debido a los altos niveles de expresión de gp100 dentro de los tumores se inscribieron en la fase de expansión de dosis semanal recibieron una primera dosis de 20 µg (C1 D1), seguida de una segunda dosis a 30 µg (C1 D8), pasando finalmente a una dosis plana de 50 µg para la tercera dosis y posteriores. Sorprendentemente, no se notificó hipotensión grave (grado 3/4) en estos 7 pacientes a pesar de su mayor riesgo de experimentar toxicidades mediadas por la expresión de gp100.

La Tabla 2 siguiente resume los tres regímenes de dosificación utilizados en el estudio, el número de pacientes tratados con cada régimen y el número de acontecimientos adversos de hipotensión que se notificaron.

Tabla 2 - Sumario de los regímenes posológicos semanales y los episodios de hipotensión

| Régimen semanal                      | No. pacientes | Núm. de episodios de hipotensión |         |         |
|--------------------------------------|---------------|----------------------------------|---------|---------|
|                                      |               | Grado 2                          | Grado 3 | Grado 4 |
| Dosis fija (600 / 900 ng/kg / 50 µg) | 35            | 4                                | 4       | 1       |
| 40 µg (C1D1) - 50 µg                 | 3             | 2                                | 2       | 0       |
| 20 µg (C1D1) - 30 µg (C1D8) - 50 µg  | 7             | 1                                | 0       | 0       |

- 5 Estos datos demuestran el sorprendente beneficio de un régimen de escalado de dosis intrapaciente en dos etapas, en la mejora de la hipotensión grave relacionada con el fármaco cuando se tratan pacientes con cánceres gp100 positivos.

#### **La hipotensión es consecuencia del tráfico de linfocitos y la liberación de citocinas**

- 10 El análisis de sangre de un subconjunto de pacientes dosificados en RP2D semanal mostró un marcado tráfico de linfocitos después de que se hubiera administrado IMCgp100. Los niveles de linfocitos disminuyeron sustancialmente en torno a las 12-24h post-infusión, volviendo a los niveles basales el Día 8. Este efecto fue más profundo en los casos con hipotensión grave y/o severa (Figura 6). Los análisis de citocinas revelaron niveles moderados de una o más citocinas inflamatorias. Los mayores aumentos observados en la periferia se produjeron en los niveles de quimiocinas quimioatrayentes tisulares, paralelos al descenso transitorio de los linfocitos circulantes periféricos, que en general se resolvieron a las 48 horas de la dosis y alcanzaron los niveles previos a la dosis el día 8.

#### **Pruebas adicionales del régimen de dosificación intrapaciente**

- 20 Una revisión retrospectiva de los datos de respuesta tumoral de los pacientes tratados en el estudio de fase 1 anterior observó en general que se obtuvieron respuestas objetivas en pacientes que recibieron dosis absolutas más altas (aproximadamente 65-85 µg). Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que el uso de 20 µg en el C1D1 y 30 µg en el C1D8 podría permitir dosis absolutas más altas, es decir, superiores a 50 µg, en el día 15 del ciclo 1 (C1D15) y más allá, y mejorar potencialmente la eficacia.

- 25 Para probarlo, IMCgp100 se está investigando más a fondo en un estudio multicéntrico abierto de fase I en curso en pacientes con melanoma uveal avanzado (identificador del ensayo clínico: NCT02570308). La primera parte del estudio sigue un diseño estándar de escalada de dosis 3+3. La primera cohorte de pacientes ha recibido IMCgp100 administrado por medio de infusión intravenosa a una dosis fija de 20 µg en C1D1 y 30 µg en C1D8, seguida de una dosis de 60 µg a partir de C1D15. Los datos iniciales indican que no se notificaron acontecimientos graves relacionados con la hipotensión en los pacientes de esta cohorte (n=3). Otras cohortes de pacientes recibirán dosis más altas en el C1D15 (por ejemplo, 70 µg, 80 µg o más).

- 30 **Ejemplo 2 - Evidencia de un mayor riesgo de hipotensión grave para IMCgp100 administrado en combinación con otros fármacos inmunomoduladores.**

La activación inmunitaria mediada por IMCgp100 se investigó *in vitro* en presencia o ausencia de anticuerpos inhibidores de puntos de control frente a PD-L1/PD-1 y CTLA-4.

#### **Aumento de la potencia de la respuesta de células T con IMCgp100 en combinación con anti-CTLA-4**

- 35 En este experimento se utilizó la proliferación de células T como lectura de la potencia. IMCgp100 se utilizó a una concentración de 80 pM en presencia o ausencia de 40 µg/ml de anti-CTLA-4 (clon L3D10; Biolegend). Se utilizaron monocitos HLA-A\*02 positivos pulsados con 10 nM o 100 nM de péptido gp100 como células presentadoras de antígeno diana y se colocaron en placas a 10.000 células/pocillo. Las células T CD3+ efectoras se marcaron con Cell Tracker Violet. La proliferación de células T se midió al cabo de 5 días mediante el ensayo Intellicyt basado en FACS.

- 40 Los resultados presentados en la Figura 7 muestran que IMCgp100 en combinación con anti CTLA-4 da lugar a una respuesta de células T mejorada (a concentraciones de péptido más bajas) en relación con IMCgp100 solo, lo que indica un potencial de niveles más altos tanto de eficacia como de toxicidad específica de gp100 en el objetivo y fuera del tumor en pacientes tratados con esta combinación en relación con la monoterapia con IMCgp100.

#### **Aumento de la potencia de destrucción de células T con IMCgp100 en combinación con anti-PD-L1**

En este experimento, la destrucción de células T se utilizó como lectura de la potencia. IMCgp100 se utilizó a una concentración de 80 pM y 100 pM en presencia o ausencia de 10 ug/ml de anti-PD-L1 (clon 29E.2A3; BioLegend). Se utilizaron células Mel624 HLA-A\*02 positivas como células presentadoras de antígeno diana. Las células T CD8+ se utilizaron como células efectoras en una proporción objetivo efector de 5:1. La destrucción de células T se midió mediante el ensayo Incucyte ZOOM durante 3 días. Se monitorizó la activación de la caspasa-3/7 en las células diana como medida de la apoptosis (se tomaron imágenes cada 2 horas).

Los resultados presentados en la Figura 8 muestran que IMCgp100 en combinación con anti PD-L1 da lugar a un aumento de la destrucción de células T en relación con IMCgp100 solo, lo que indica un potencial de mayores niveles tanto de eficacia como de toxicidad específica de gp100 en el objetivo y fuera del tumor en pacientes tratados con esta combinación en relación con la monoterapia con IMCgp100.

**Aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias con IMCgp100 en combinación con anti-CTLA-4 o anti-PD-L1.**

En este experimento, la secreción de citoquinas se evaluó mediante el uso del kit de ensayo V-PLEX panel 1 proinflamatorio humano de Meso Scale Discovery.

Para IMCgp100 en combinación con anti-CTLA-4 y anti-PD-L1, se tomaron muestras de sobrenadante a las 24h del ensayo de proliferación y del ensayo de destrucción respectivamente.

Los datos mostrados en la Figura 9 demuestran secreción aumentada de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 (a bajas concentraciones de péptido) en presencia de IMCgp100 y anti-CTLA-4, en relación con IMCgp100 solo.

Los datos mostrados en la Figura 10 demuestran secreción aumentada de IFN $\gamma$  en presencia de IMCgp100 y anti-PD-L1, en relación con IMCgp100 solo.

Estos datos demuestran un aumento de la activación inmunitaria con la terapia combinada con IMCgp100 en relación con la monoterapia con IMCgp100, y por lo tanto un posible aumento del riesgo de hipotensión grave para los pacientes que reciben la terapia combinada, debido a la orientación en-diana no tumorales de los melanocitos gp100 positivos.

# REIVINDICACIONES

1. Terapéutico biespecífico de redirección de células T que comprende (i) una fracción diana que se une al complejo YLEPGPVT-A-HLA-A2 fusionada a (ii) una fracción de redirección de células T de unión a CD3, en el que la fracción diana es un receptor de células T (TCR), la fracción de redirección de células T de unión a CD3 es un anticuerpo anti-CD3, y el terapéutico biespecífico comprende una secuencia de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO: 4, y una secuencia cadena beta anti-CD3 del TCR de SEQ ID NO: 5, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer gp100 positivo en un paciente que comprende la administración del terapéutico biespecífico a dicho paciente mediante infusión intravenosa en
  - 5 (a) al menos una primera dosis comprendida entre 10 y 30 µg;
  - 10 (b) al menos una segunda dosis comprendida entre 20 y 40 µg, en la que la o cada una de las segundas dosis es superior a la primera; y a continuación
  - (c) al menos una dosis comprendida entre 50 y 70 µg,en el que cada dosis se administra cada 5-10 días.
2. El uso terapéutico biespecífico de la reivindicación 1, en el que cada dosis se administra cada 7 días.
- 15 3. El terapéutico biespecífico para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la primera dosis es de 20 µg y la segunda dosis es de 30 µg.
4. El uso terapéutico biespecífico de cualquier reivindicación precedente, en el que se administran dos segundas dosis.
5. El terapéutico biespecífico para uso de cualquier reivindicación precedente, que se administra en combinación con una o más terapias anticancerosas.
- 20 6. El terapéutico biespecífico para uso de la reivindicación 5, en el que la terapia anticancerosa es durvalumab, tremelimumab, galunisertib y merestinib.
7. El terapéutico biespecífico para uso de la reivindicación 6, en el que la terapia anticancerosa es merestinib y la dosis de merestinib está en el intervalo de 40 a 120 mg una vez al día, preferentemente en el intervalo de 80 a 120 mg una vez al día.
- 25 8. El terapéutico biespecífico para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el terapéutico biespecífico se administra como una monoterapia.
9. La terapéutica biespecífica para uso de cualquier reivindicación precedente, en la que el cáncer gp100 positivo es melanoma.
- 30 10. El uso terapéutico biespecífico de la reivindicación 9, en el que el melanoma es un melanoma en estadio III o estadio IV.
11. El terapéutico biespecífico para uso de la reivindicación 9 o reivindicación 10, en el que el melanoma incluye lesiones metastásicas.
12. El terapéutico biespecífico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el melanoma es un melanoma cutáneo:
- 35 13. El terapéutico biespecífico para uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el melanoma es un melanoma uveal;

**Figura 1**

**Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la cadena alfa del TCR gp100 de referencia (SEQ ID No; 2):**

EQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR  
LRVTLDTSRKSSSLITASRAADTASYFCATDGGDTPLVFGKGTRLSVIANIQKPDPAVYQ  
LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDF  
ACANAFNNSIIPEDTFFPSPSS

**Figura 2**

**Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la cadena beta del TCR gp100 de referencia (SEQ ID No; 3):**

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCBQNLNHDAMYWYRODPGQGLRLIYYSQIVNDFQXGDI  
AEGYSVSRENKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGFYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFP  
PEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQFA  
LNDSTRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQURAKPVTQIVSAEANGR  
AD

**Figura 3**

**Secuencia de aminoácidos de una cadena TCR  $\alpha$  específica de gp100 (SEQ ID No: 4):**

AQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKPSINNLOWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLAVTLD  
TSKKSSSLLITASRAADTASYFCATDGGSTPMQFGKGTRLSVIANIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVC  
LFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNRSDFACANAFNNSTIIPEDT

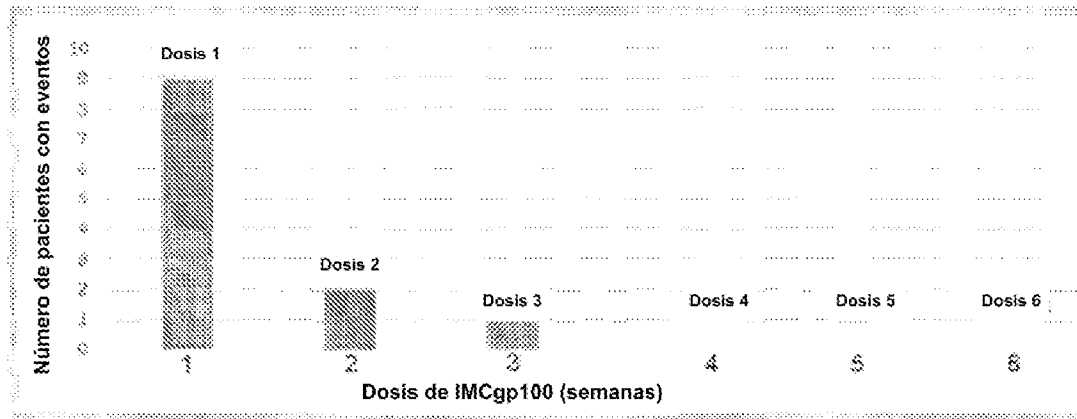
**Figura 4**

**Secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo scFv anti-CD3 (en negrita) fusionado por medio de un enlazador, concretamente GGGGS (subrayado), en el extremo N-terminal de una cadena  $\beta$  de TCR específica de gp100 (SEQ ID No 5):**

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLESGVPS  
RPSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGG  
GGGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVA  
LINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYF  
DVWGQGTILVTVSSGGGGSDOGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQG  
LRLIYYSWAQGDFQKGDIAEGYSVSREKKESFFLTVTSAQKNPTAFYLCASSWGAPYEQY  
FGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGK  
EVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLVVSATFWQDPRNEFRCQVQFYGLSENDEWT  
QDRAKPVTTQIVSAEAWGRAD

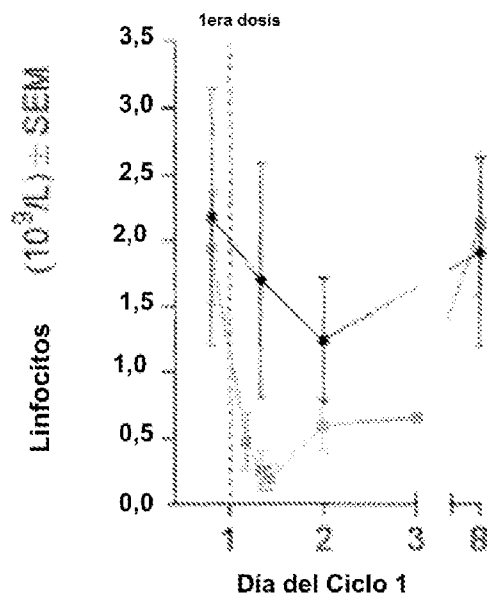
**Figura 5**

**La observación de toxicidades que incluyen la hipotensión grave y/o severa está confinada a la primera semana de dosificación**



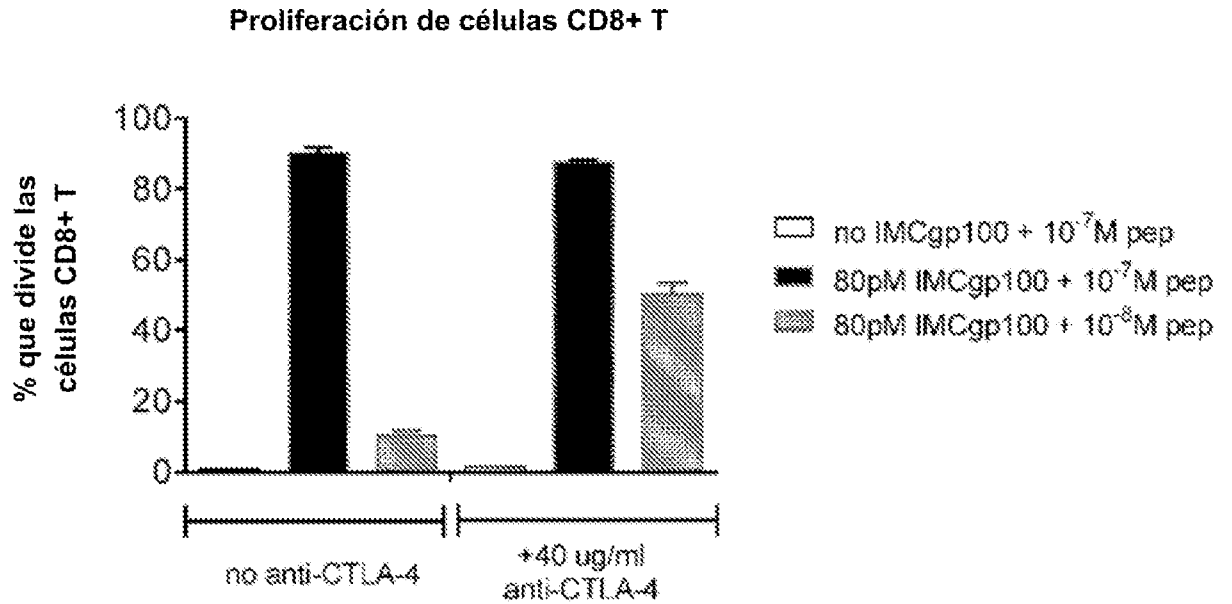
**Figura 6**

**Tráfico de linfocitos desde la periferia siguiendo una primera dosis de IMCgp100.**  
**Media de cuentas de linfocitos periféricos en la sangre en la línea base (día 1 pre-dosis) y en varios puntos del tiempo siguiendo la primera dosis de IMCgp100 (4h, 8h y/o 10h, 24, 48h y día 8 post-dosis) en un grupo de pacientes con hipertensión severa y/o seria reportada (cuadrados grises, n=6) comparados con un grupo de pacientes sin reportes de hipertensión (círculos negros n=5). Punto de dosificación indicado. La muestra del día 8 es pre-segunda dosis.**



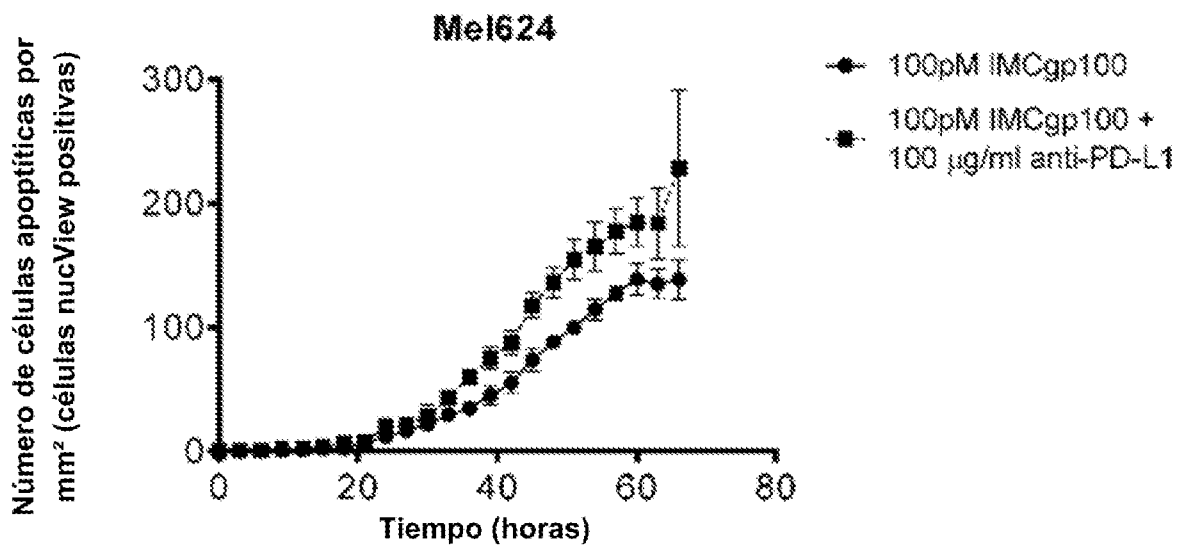
**Figura 7**

**Proliferación de células T con IMCgp100 en presencia o ausencia de anti-CTLA-4, y a dos concentraciones de epítopos diferentes**



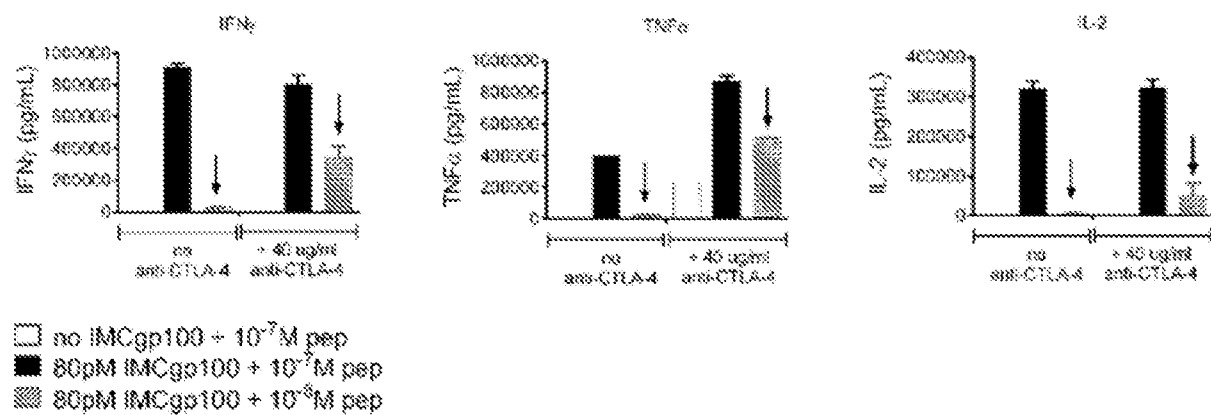
**Figura 8**

**Mejoría en el asesinato de células T de líneas de melanoma (pasaje PD-L1/PD-1)**



**Figura 9**

**Secreción de citocinas con IMCgp100 + anti-CTLA-4**



**Figura 10**

**Secreción de citocinas con IMCgp100 + anti-PD-L1**

