

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 557**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2016 PCT/EP2016/060113**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16177846**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2016 E 16723968 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3292153**

54 Título: **Combinación de un anticuerpo CD30XCD16A con un anticuerpo antagonista anti-PD-1 para terapia**

30 Prioridad:

04.05.2015 EP 15166303

25.01.2016 EP 16152650

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

20.04.2020

73 Titular/es:

AFFIMED GMBH (100.0%)

Im Neuenheimer Feld 582

69120 Heidelberg, DE

72 Inventor/es:

TREDER, MARTIN;

REUSCH, UWE;

MARSCHNER, JENS-PETER y

KNACKMUSS, STEFAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 754 557 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

Combinación de un anticuerpo CD30XCD16A con un anticuerpo antagonista anti-PD-1 para terapia

5 La Invención se refiere a una combinación de (i) un anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 en una célula tumoral y que tiene especificidad hacia CD16A en una célula asesina natural (NK) y (ii) un anticuerpo antagonista anti-PD-1 para uso en el tratamiento de un linfoma CD30⁺, en particular linfoma de Hodgkin (HL).

10 Debido a que las células NK median la inmunidad innata y se encuentran constitutivamente activadas, son candidatas para inmunoterapia para el cáncer. Un diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem (TandAb®) se une a células NK mediante CD16A y tiene un segundo dominio de unión para CD30, una diana específica para cáncer, por ejemplo, células de linfoma de Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) CD30⁺. Dicho diacuerpo en tándem recluta y redirige las células NK hacia células tumorales CD30⁺ y une ambas dianas con afinidad alta, estableciendo un puente a través del cual las células NK se activan y se redirigen para eliminar las células tumorales. Mayor potencia citotóxica con respecto a anticuerpos nativos y de Fc mejorado se han informado para este diacuerpo para CD30/CD16A en tándem (véase Reusch U. et al., MABS. 2014; 6(3):727-738). El diacuerpo para CD30/CD16A en tándem se tolera bien y se activa en pacientes con linfoma de Hodgkin (véase Rothe A. et al., Blood. 2015; 125(26):4024-4031). A pesar de estos resultados prometedores, se desean mejoras adicionales en cuando a esta inmunoterapia de unión de células NK dirigidas a tumor.

20 Las moléculas de puntos de control inmunitario son proteínas de superficie celular, por ejemplo, receptores que regulan las rutas de coestimulación o coinhibición de la respuesta inmunitaria. Ejemplos de moléculas de puntos de control inmunitario son el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), proteína programada 1 de muerte celular (PD-1), ligando 1 de muerte programada (PD-L1) o ligando 2 de muerte programada (PD-L2), moléculas coestimuladoras inmunes en células NK y receptores coestimuladores de la familia del receptor de TNF, por ejemplo, CD137.

30 El receptor de PD-1 (PDCD1 o CD279) media una ruta de coinhibición. Además el PD-1 se une a PD-L1 lo que induce a la señal de coinhibición una vez sucedida la ligación receptor-ligando. La ruta de PD-1 es un punto de control para limitar la respuesta inmunitaria mediada por células T (Keir ME et al., Annu. Rev. Immunol. 2008;26:677-704). Mediante la expresión de ligandos de PD-1 en la superficie celular y la unión a células efectoras de la inmunidad PD-1⁺, los tumores pueden cooptar por la ruta de PD-1 para evadir una respuesta inmunitaria (Weber J, Semin Oncol. 2010;37:430-9; Ansell S et al., N. Engl J. Med. 2015;372:311-319). Se ha sugerido el bloqueo de los antagonistas de PD-1 con respecto a la interacción entre PD-1 y PD-L1, que se encuentra implicada en la modulación negativa de respuestas de células T y que se han estudiado en una diversidad de cánceres y combinaciones de bloqueo de PD-1 con bloqueo de CTLA-4 para regulación de inmunidad adaptativa (Dolan D y Gupta S, Cancer Control. 2014;21:231-237). El anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab ha demostrado eficacia clínica inicial en ensayos de monoterapia de brazo único en pacientes con linfoma de Hodgkin según se determina mediante la tasa de respuesta. Los ensayos clínicos en curso se conducen en estos tipos de tumores así como en un número de otras indicaciones de tumores sólidos avanzados y neoplasias hematológicas.

45 Además, los anticuerpos anti-PD-1 de manera individual o en combinación con agentes anticáncer adicionales se describieron para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, linfoma de Hodgkin (Dawn E Dolan et al: Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center, 2014, página 231).

50 Se proporciona en la presente una combinación de un anticuerpo multifuncional que tiene especificada hacia CD30 y CD16A y un anticuerpo antagonista anti-PD-1 para uso en un método de tratamiento de un linfoma CD30⁺, en particular linfoma de Hodgkin (HL). Esta combinación da como resultado una eliminación de células tumorales mejorada, debido a que la combinación de un anticuerpo multifuncional dirigido al tumor y de unión a células NK con el agente de modulación inmunitaria tiene un efecto antitumoral sinérgico a través de una respuesta inmunitaria integrada que involucra células NK, células T, macrófagos y células dendríticas. Por lo tanto, todas las subpoblaciones inmunes se activan y se inducen para infiltrar los tumores mediante el tratamiento de combinación. Una combinación de anticuerpo biespecífico para CD30/CD16A y anticuerpo antagonista anti-PD-1 mejora de manera significativa la respuesta inmunitaria innata inicial mediante infiltración tumoral mejorada de las células inmunizadoras innatas, en particular, células NK, macrófagos y células dendríticas. En estudios preclínicos del linfoma de Hodgkin con animales usando material autólogo del paciente, a saber xenoinjerto derivado del paciente (PDX) y células inmunizadoras a partir de la sangre (PBMC) del mismo donante, el tumor establecido se trató con un anticuerpo biespecífico para CD30/CD16 en combinación con un agente que modula un anticuerpo anti-PD1 tanto de manera individual como en combinación. Mientras el tratamiento con solo el agente mostró una reducción significativa del crecimiento tumoral en la mayoría de las moléculas en comparación con el grupo de tratamiento de control (IgG irrelevante), la combinación de anticuerpo multifuncional biespecífico para CD30/CD16 y anticuerpo anti-PD-1 mostró eficacia antitumoral mejorada. En comparación con el tratamiento con IgG, se observó que en animales que se trataron con combinaciones de anticuerpo CD30/CD16 y un anticuerpo anti-PD-1 la población de células NK en el tumor aumentaba. A partir de los 2 días posteriores al tratamiento (día 30), la monoterapia de diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem indujo una infiltración de ambas células NK y macrófagos en los tumores.

Este efecto mejoró con el tiempo y ambas poblaciones de células inmunizadoras demostraron fuerte infiltración tumoral a partir de la mediación del diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem hacia el final del experimento (día 58). Cuando el diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem se combinó con el anticuerpo inmunomodulador anti-PD-1, el efecto en la inmunidad innata se impulsó inicialmente por el diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem de manera individual, pero el tratamiento con anti-PD-1 dio como resultado una infiltración de células innatas más pronunciada al final del experimento. De manera adicional, mientras que existió un pequeño incremento de células T en animales que se trataron solamente con anticuerpo CD30/CD16, las células T citotóxicas, que se detectaron en animales que se trataron con anticuerpo CD30/CD16 en combinación con un agente que modula una molécula de punto de control inmunitario aumentaron.

Mientras que la monoterapia con anti-PD-1 induce infiltración de células T hasta cierto punto, el anticuerpo CD30/CD16 en combinación con un anti-PD-1 mejoró la infiltración de ambas células CD4⁺ y CD8⁺ en tumores. Las células T y células dendríticas se indujeron de manera significativa mediante la combinación de anticuerpo CD30/CD16 y anti-PD-1 en comparación con cualquier monoterapia de anticuerpo CD30/CD60 o anti-PD-1 (Figura 8B). La combinación de anticuerpo CD30/CD60 y anti-PD-1 indujo de manera ventajosa una infiltración de células dendríticas en el tumor poco después de la administración (día 30 y día 40). La combinación de anticuerpo CD30/CD16 y anti-PD-1 aumentó de manera significativa la infiltración tumoral para todas las subpoblaciones inmunes, tales como células T, células NK, macrófagos y células dendríticas, en comparación con las monoterapias mediante anticuerpo CD30/CD16 y anti-PD-1, respectivamente (Figura 8B).

Por lo tanto, la combinación de (i) un anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 y que tiene especificidad hacia CD16A y (ii) un anticuerpo antagonista anti-PD-1 aumenta de manera sinérgica la eliminación de células tumorales lo que da como resultado una regresión del tumor significativamente aumentada. La regresión del tumor notable se alcanza mediante la acción coordinada, a saber, integrada de todas las subpoblaciones inmunes, tales como células T CD4⁺ y CD8⁺ y células NK, macrófagos y células dendríticas así como mediante el aumento intratumoral de citocinas inflamatorias, tales como en particular IFN- γ , a través de la actividad combinada del anticuerpo multifuncional de unión a células NK y del agente modulador de la molécula de punto de control inmunitario. La terapia de combinación provista en la presente demuestra por primera vez que la eficacia de inducir una respuesta inmunitaria innata mediante un anticuerpo dirigido a tumor y de unión a células NK puede aumentarse mediante un anticuerpo antagonista anti-PD-1 que se conoce por estimular la respuesta inmunitaria adaptativa mediante el bloqueo de la ruta de PD-1.

La combinación del anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 y CD16A y del anticuerpo antagonista PD-1 se usa para aumentar la respuesta inmunitaria innata en comparación con aquella del anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 y CD16A de manera individual en un método de tratamiento de un tumor, en particular, linfoma de Hodgkin (HL). En particular, la respuesta inmunitaria innata se aumenta mediante infiltración celular de células innatas, en particular, macrófagos, células dendríticas y células NK en el tumor. Además, se aumenta la infiltración intratumoral de células T CD4⁺ y CD8⁺.

“Respuesta inmunitaria innata” se refiere a la activación de uno o más leucocitos del sistema inmunológico innato (o sistema inmunológico no específico o sistema de inmunidad congénito). Los leucocitos activados de la respuesta inmunitaria innata comprenden células asesinas naturales (NK), macrófagos y células dendríticas. El sistema inmunológico innato difiere con respecto al sistema inmunológico adaptativo (o sistema inmunológico específico) que incluye linfocitos similares a células T CD4⁺ o CD8⁺.

“Combinación” se refiere a una terapia de combinación, terapia combinada o politerapia que usa más de una medicación para el tratamiento de un tumor, a saber, enfermedad única. En la presente invención, “combinación” se usa para una terapia de combinación que abarca las etapas de administración de un anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 y CD16A, por ejemplo, un diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem, y un anticuerpo antagonista anti-PD-1 para uso en el tratamiento de un tumor, por ejemplo, linfoma de Hodgkin. Por lo tanto, el diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem y el anticuerpo antagonista anti-PD-1 se suministran en combinación. En contraste, “monoterapia” se refiere a una terapia que abarca la administración de una medicación única de manera individual, por ejemplo, ya sea el diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem o el anticuerpo anti-PD-1.

La combinación comprende un anticuerpo multifuncional para uso en una inmunoterapia basada en células NK de un tumor. El término “multifuncional” según se usa en la presente se refiere a que el anticuerpo exhibe dos o más funciones biológicas diferentes. Por ejemplo, las funciones biológicas diferentes son especificidades diferentes para antígenos diferentes. En determinados casos, el anticuerpo multifuncional es multiespecífico, por ejemplo, biespecífico, trispecífico, etc. Dichas proteínas de unión multiespecíficas, por ejemplo, biespecíficas incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales biespecíficos de las clases IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, así como fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos que incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv, Fv de cadena sencilla, Fv de cadena sencilla en tándem (scFv)₂, anticuerpos redirigidos de doble afinidad (DARTTM), diacuerpo y diacuerpo en tándem (TandAb®), diacuerpos de cadena sencilla (scDb) y flexicuerpos. El término “anticuerpo” según se usa en la presente se refiere a anticuerpos monoclonales así como fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos que comprenden un dominio de unión a anticuerpo. Diversos formatos de anticuerpos pueden generarse

a partir de fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos que tiene especificidad de unión a anticuerpo similar con respecto a un anticuerpo nativo, pero que difieren en validez y función efectora debido al número de dominios de unión o ausencia de la región Fc. Ejemplos de formatos de anticuerpos para anticuerpos biespecíficos se describen en Spiess, C. et al., *Mol Immunol.* 2015 Oct;67(2 Pt A):95-106 y Kontermann, R.E., Brinkmann, U., *Drug Discov. Today* 2015 Jul;20(7):838-47.

En realizaciones determinadas, el anticuerpo multifuncional es un diacuerpo multiespecífico, por ejemplo, biespecífico, en tándem (TandAb®). Un diacuerpo en tándem se construye mediante la unión de cuatro dominios variables de las cadenas pesada y ligera (VH y VL) de dos o más dominios de unión a Fv diferentes en un único polipéptido. Los dominios se posicionan de manera tal que VH y VL correspondientes pueden emparejarse cuando dos moléculas del polipéptido se alinean en un patrón cabeza con cola. Los enlaces cortos entre los dominios (12 o menos aminoácidos) impiden el emparejamiento intramolecular del Fv. El formato de anticuerpo de un diacuerpo en tándem y su fabricación se describen en Weichel et al., *European Pharmaceutical Review* 2015, vol. 20:27-32, Kipriyanov

SM: *Methods Mol. Biol.* 2009;562:177-93 o Kipriyanov SM: *Methods Mol Biol* 2003;207:323-33.

En realizaciones determinadas, en primer lugar el anticuerpo multifuncional, por ejemplo, diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem se administra y posteriormente, se administra el agente que constituye una molécula inmunomoduladora, a saber, anticuerpo antagonista anti-PD-1. Por lo tanto, los anticuerpos CD30/CD16A y antagonista anti-PD-1 pueden administrarse de manera secuencial, normalmente durante un período de tiempo determinado. La administración del anticuerpo multifuncional y del antagonista anti-PD-1 puede efectuarse mediante diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. En algunas realizaciones, la vía de administración depende de la clase de terapia y de la clase de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosis se determinará por el médico a cargo y considerando otros factores clínicos. Las dosis para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial del cuerpo, la edad, el sexo, el compuesto en particular para administrar, el tiempo, y la vía de administración, la clase de terapia, el estado de salud general y los otros fármacos que se administran de manera simultánea. Un "dosis efectiva" se refiere a las cantidades del ingrediente activo que resultan suficientes para afectar el curso y la severidad de la enfermedad, lo que conduce a la reducción o remisión de dicha patología. Una "dosis efectiva" que resulta útil para el tratamiento de un tumor puede determinarse usando métodos que se conocen. Por lo tanto, la invención abarca un método de tratamiento, a saber, una terapia de combinación, que comprende la etapa de administración de dosis efectivas de una combinación de un anticuerpo multifuncional y de un antagonista anti-PD-1 (anticuerpo PD-1) a un sujeto que sufre de un tumor CD30+, por ejemplo, linfoma de Hodgkin, en la que el anticuerpo multifuncional tiene especificidad hacia CD30 y CD16, por ejemplo, constituye un anticuerpo CD30/CD16A.

El enfoque inmunoterapéutico del reclutamiento de células NK mediado por anticuerpos para tumores usando anticuerpos multifuncionales puede usarse para el tratamiento de tumores, por ejemplo, linfoma de Hodgkin. Por lo tanto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 y CD16A, por ejemplo, diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem, y un anticuerpo antagonista anti-PD-1 para uso en una terapia de combinación para tratar un tumor, por ejemplo, linfoma de Hodgkin o linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

El anticuerpo multifuncional recluta células NK mediante la unión de manera exclusiva a la isoforma de CD16, CD16A. Ejemplos de dominios de unión a anti-CD16A y su generación se describen en WO 2006/125668. En realizaciones determinadas, el dominio de unión a anti-CD16A comprende CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena pesada que se establece en SEQ ID NO:4 y CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena ligera que se establece en SEQ ID NO:5. En realizaciones particulares, el dominio de unión a anti-CD16A comprende el dominio de variable de la cadena pesada que se establece en SEQ ID NO:4 y el dominio variable de la cadena ligera que se establece en SEQ ID NO:5.

Ejemplos de dominios de unión a anticuerpo CD30 adecuados para el anticuerpo multifuncional de acuerdo con la invención se divulgan en Arndt MA et al., *Blood.* 1999; 94:2562-8; Schlapschy M. et al., *Protein Eng Des Sel.* 2004; 12:847-60 y Reusch U. et al., *MABS.* 2014; 6(3):727-738. En realizaciones determinadas, el dominio de unión a anti-CD30 es una IgG HRS-3 anti-CD30 modificada (Reusch U. et al., 2014) y comprende CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena pesada que se establece en SEQ ID NO:2 y CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena ligera que se establece en SEQ ID NO:3. En realizaciones particulares, el anti-CD30 tiene los dominios de unión a Fv de una IgG HRS-3 anti-CD30 modificada (Reusch U. et al., 2014) y comprende el dominio variable de la cadena pesada que se establece en SEQ ID NO:2 y el dominio variable de la cadena ligera que se establece en SEQ ID NO:3.

En una realización determinada de la invención el anticuerpo multifuncional es un diacuerpo tetravalente biespecífico para CD30/CD16A en tándem, que es un homodímero de dos cadenas de polipéptidos que se asocian de manera no covalente, en la que cada una de las cadenas de polipéptidos del diacuerpo en tándem tiene la secuencia de aminoácidos que se establecen en SEQ ID NO:1. El ejemplo 1 describe el diacuerpo para CD30/CD16A en tándem que recluta de manera específica células NK mediante la unión de manera exclusiva a la isoforma CD16A. Los

diacuerpos en tándem tienen dos sitios de unión para cada antígeno, pero no dominios Fc. El diacuerpo para CD30/CD16A en tándem del ejemplo 1 tiene un peso molecular de aproximadamente 104 kDa y puede producirse en bacterias o en células mamíferas, por ejemplo, CHO. Se dirige de manera específica a CD30 en células de linfoma de Hodgkin y recluta y activa células NK mediante la unión a CD16A. La construcción y producción de este diacuerpo en tándem se describe en Reusch U. et al., MABS. 2014; 6(3):727-738 y la eficacia de este diacuerpo para CD30/CD16A en tándem se informa en Rothe A. et al., Blood. 2015; 125(26):4024-4031.

En realizaciones determinadas, el antagonista PD-1 es un anticuerpo PD-1 o un anticuerpo PD-L1. Ejemplos de anticuerpos PD-1 (anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-1) incluyen nivolumab, pembrolizumab (MK3475, Keytruda) y un ejemplo de anticuerpo PD-L1 (anti-PD-L1 o anticuerpo anti-PD-L1) es pidilizumab.

La combinación de un anticuerpo CD130/CD16A multifuncional, por ejemplo, biespecífico, y anticuerpo antagonista anti-PD-1 puede usarse para el tratamiento de tumores CD30⁺, tales como, por ejemplo, linfoma Hodgkin o linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

En realizaciones determinadas, en primer lugar, se administra el anticuerpo CD30/CD16A, por ejemplo, el diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem y el anticuerpo antagonista anti-PD-1 se administra posteriormente. Por ejemplo, el anticuerpo antagonista anti-PD-1 se administra, 10-72 h, por ejemplo, 1 día después de la administración del anticuerpo CD30/CD16, por ejemplo, diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem.

En realizaciones determinadas, la combinación, a saber, la terapia de combinación, comprende la administración de un agente adicional para modular otra molécula de punto de control inmunitario, por ejemplo, un anticuerpo antagonista que bloquea una ruta coinhibidora o un anticuerpo agonista que induce una ruta coestimuladora a través de la unión con la molécula de punto de control inmunitario respectiva. Dichos anticuerpos se conocen además como inhibidores de puntos de control (CPI) o agonistas de puntos de control (CPA) y se han descrito y probado de manera clínica.

Ejemplos de otras moléculas de puntos de control inmunitarios para la combinación, a saber, terapia de combinación, son CTLA-4 y CD137.

CTLA-4 induce una señal que inhibe la respuesta de células T. Ejemplos de anticuerpos CTLA-4 para la combinación son ipilimumab y tremelimumab.

CD137 (4-1BB) o superfamilia 9 del receptor del TNF (TNFRSF9) es un receptor coestimulador que corresponde a la superfamilia del receptor del TNF, un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral que se involucra en la regulación de la activación de células inmunizadoras. El rol funcional de CD137 es mejorar las respuestas citotóxicas de células T. Un ejemplo de un anticuerpo agonista CD137 que mejora la respuesta de células T es urelumab.

En realizaciones determinadas, la combinación, a saber, la terapia de combinación, de acuerdo con la invención comprende además un anticuerpo que se selecciona a partir del grupo que consiste de anticuerpo anti-CTLA4 y anticuerpo anti-CD137.

En una realización particular, ambos anticuerpos, anticuerpo antagonista anti-PD-1 y anticuerpo anti-CD137 se administran en combinación con el anticuerpo biespecífico para CD30/CD16. Por lo tanto, en esta realización determinada, la combinación, a saber, la terapia de combinación, comprende las etapas de administración de uno biespecífico para CD30/CD16A, un antagonista anti-PD-1 y un anti-CTLA4.

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1 muestra un ensayo de liberación de cromo. El porcentaje de lisis se determinó después de cultivos de células NK preactivadas, purificadas, en proporciones de célula efectora:diana (KARPAS-299) variables con células de linfoma etiquetadas con ⁵¹Cr en medio solo (sin anticuerpos) o con un único (aCD137, aPD1, aCTLA4) o múltiples anticuerpos (aCD137 y aPD1), en el que "a" consiste en una abreviatura de "anti"

Figura 2 muestra un ensayo de liberación de cromo. El porcentaje de lisis se determinó después de cultivos de células NK preactivadas, purificadas, en proporciones de célula efectora:diana (KARPAS-299) variables con células de linfoma etiquetadas con ⁵¹Cr en medio solo (sin anticuerpos) o con un único (aCD137, aPD1, aCTLA4) o múltiples anticuerpos (aCD137 y aPD1), el diacuerpo CD30/CD16A en tándem se usó a concentraciones de 1 pM, en el que "a" consiste en una abreviatura de "anti"

Figura 3 muestra resultados de un modelo de PDX *in vivo*. AFM13 designa un diacuerpo CD30/CD16A

en tándem

- Figura 4 muestra resultados de un modelo de PDX *in vivo*. AFM13 designa el diacuerpo CD30/CD16A en tándem
- Figura 5 modelo de PDX *in vivo*: linfocitos aumentados en ratones que se trataron con diacuerpo CD30/CD16A en tándem
- Figura 6 muestra resultados de cuatro modelos de PDX *in vivo* en el día 30: (A) tamaños de tumor; IgG designa un anticuerpo de IgG de control irrelevante, AFM13 designa un diacuerpo CD30/CD16A en tándem, AFM22 designa un diacuerpo en tándem de control irrelevante (EGFRvIII/CD16A), anti-PD-1 designa pembrolizumab; (B) poblaciones de linfocitos intratumorales
- Figura 7 muestra resultados de cuatro modelos de PDX *in vivo* en el día 44: (A) tamaños de tumor; IgG designa un anticuerpo de IgG de control irrelevante, AFM13 designa un diacuerpo en tándem de CD30/CD16A, AFM22 designa un diacuerpo en tándem de control irrelevante (EGFRvIII/CD16A), anti-PD-1 designa pembrolizumab; (B) poblaciones de linfocitos intratumorales
- Figura 8 muestra resultados de cuatro modelos PDX *in vivo* en el día 58: (A) tamaños de tumor; IgG designa un anticuerpo de IgG de control irrelevante, AFM13 designa un diacuerpo CD30/CD16A en tándem, AFM22 designa un diacuerpo en tándem de control irrelevante (EGFRvIII/CD16A), anti-PD-1 designa pembrolizumab; (B) poblaciones de linfocitos intratumorales
- Figura 9 muestra perfil de citocina intratumoral de cuatro modelos de PDX *in vivo* en el día 58
- Figura 10 muestra perfiles de leucocitos humanos intratumorales. Ratones Rag2^{-/-} E2Py^{nu} se injertaron con piezas tumorales de pacientes HL en el día 0 y se reconstituyeron con PBMC autólogo derivado de pacientes mediante inyección *i.p.* en el día 28. El tratamiento con anticuerpos comenzó en el día 28 con inyección *i.p.* de 5 mg/kg de AFM13 o diacuerpo AFM22 en tándem de control o IgG e inyección de anti-PD-1 con un día de retraso una vez por semana durante un total de tres ciclos. En el día 30 (A, C) y en el día 58 (B, D) se sacrificaron ratones y se cuantificaron células NK CD3⁺/CD56⁺ y macrófagos CD11b⁺/HLA-DR⁺/CD163⁺ de infiltración tumoral (A, B) o células T CD3⁺/CD8⁺, células T CD3⁺/CD4⁺ y células dendríticas CD11c⁺/CD80⁺/CD86⁺ (C, D).

Ejemplo:

Coestimulación de CD137 y/o bloqueo de PD-1 mejora la lisis celular dirigida mediada por células NK mediante diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem

5

Métodos:

La eficacia se evaluó *in vitro* con PBMCs humanos, que se enriquecieron con NKs, y las células diana CD30⁺ así como modelos de líneas celulares y xenoinjertos derivados de pacientes *in vivo* con diacuerpo CD30/CD16A en tándem, anticuerpos anti-CTLA-4, anti-PD-1, o anti-CD137.

10

Para evaluar la citotoxicidad de células NK para líneas celulares de linfoma CD30⁺, la liberación de cromo se llevó a cabo como sigue a continuación: PBMCs se cultivaron durante 24 horas en conjunto con anti-CD30 (10 µg/mL) y se irradiaron (5.000 rads) células tumorales de linfoma CD30⁺ a una proporción de 1:1. Después de 24 horas, las células NK se aislaron de estos cultivos mediante separación de células de campo magnético negativo usando perlas de aislamiento de células NK (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células NK se evaluaron en cuanto a pureza (>90% de pureza según se define por citometría de flujo) antes del ensayo de liberación de cromo. Las células diana se etiquetaron con 150 µCi ⁵¹Cr por 1x10⁶ células durante 2 horas. El porcentaje de lisis se determinó después de 4 horas de cultivos de células NK preactivadas, purificadas en proporciones de célula efectora:diana variables con células de linfoma etiquetadas con ⁵¹Cr en medio solo, o con un único o múltiples anticuerpos.

15

20

Se observaron piezas tumorales xenoinjertadas (8x8 mm) que derivan de una muestra quirúrgica de un paciente recién diagnosticado con linfoma CD30⁺ (que incluye la enfermedad de Hodgkin), en ratones Rag2^{-/-}IL2Ry^{nu} (n~100) en cuanto a injertos y hasta 80 ratones con injertos de tamaño similar (0,5 cm²) que se distribuyeron de manera aleatoria en hasta 8 grupos en el día 28. Los PBMCs autólogos se infundieron en el día 28 (2x10⁶ PBMCs/ratón) intraperitonealmente. La terapia comienza en el día 28 y continúa semanalmente con un total de tres inyecciones intraperitoneales, todas con dosis de 15 mg/kg. Con terapia de combinación, anti-CD30/CD16A (AFM13; Reusch U. et al., MABS. 2014; 6(3):727-738) se dosificó en el día 28 y anti-CTLA4 (Ipilimumab), anti-CD137

25

(Urelumab) o anti-PDI (Pembrolizumab) se dosificaron en el día 29. El tamaño del tumor se comparó entre los grupos en el día 56. Todos los ratones se sacrifican para Inmunofenotipificación una vez que un grupo requiere eutanasia debido al crecimiento hasta el 700% del tamaño original del tumor (ap. 3,5cm²) en el día 58.

5 Se evaluaron linfocitos humanos, células mieloides y citocinas intratumorales de infiltración tumoral en los días 30, 44 y 58, a saber, 2, 16 y 30 días después del comienzo del tratamiento. Se determinaron los siguientes biomarcadores: la infiltración de células NK se determinó como CD3⁻ y CD56⁺; la infiltración de células T se determinó como CD25⁺, y CD4⁺, CD3⁺ y CD4⁺, CD3⁺ y CD8⁺; los subconjuntos de células NK se determinan como CD56dim, CD56bright, CD16A, CD69; los macrófagos se determinan como CD11b, HL-DR y CD163; las células dendríticas por CD11c, CD80 y CD86 (Figuras 6B, 7B y 8B).

El diacuerpo CD30/CD16A en tándem es el anticuerpo AFM13 que se describe en Reusch U. et al., MABS. 2014; 6 (3): 727-738. El diacuerpo CD30/CD16A en tándem comprende el dominio anti-CD30 del hibridoma HRS-3 y su construcción y expresión en bacterias se divulga en el ejemplo 19 del documento WO 2006/125668.

Resultados:

El diacuerpo CD30/CD16A en tándem demostró una mayor potencia y eficacia hacia las células diana y efectoras con respecto a otros formatos de anticuerpos CD30⁺ (EC₅₀ = 15pM). Estas propiedades favorables dieron como resultado citotoxicidad superior cuando el diacuerpo CD30/CD16A en tándem se incubó con células tumorales CD30⁺ y células NK enriquecidas (Figura 2). El tratamiento individual con diacuerpo CD30/CD16A en tándem a concentraciones subóptimas (1 pM) indujo lisis dependiente de la proporción de célula efectora con respecto a célula diana de células de linfoma CD30⁺ hasta el 40% usando células NK enriquecidas. Los anticuerpos inmunomoduladores median de manera individual lisis sustancialmente inferior (<25%) (Figura 1). Sin embargo, la adición de anti-PD-1 o anti-CD137 al diacuerpo CD30/CD16A en tándem mejoró fuertemente la lisis específica hasta un 70%, mientras que la adición de anti-CTLA-4 al diacuerpo CD30/CD16A en tándem no mostró efecto beneficioso. El aumento de eficacia más impresionante se observó cuando el diacuerpo CD30/CD16A en tándem se aplicó en conjunto con una combinación de anti-PD-1 y anti-CD137 (Figura 2). *In vivo*, se observó sinergia de combinación del diacuerpo CD30/CD16A en tándem y el anticuerpo inmunomodulador con cada anticuerpo inmunomodulador que se sometió a prueba y aumentó con anti-PDI (regresión en 9/10 tumores), anti-CTLA-4 (3/10) y anti-CD137 mAb (3/10) e se vio influida por la presencia de células T reguladoras, células NK y citocinas Th1 (Figuras 3 y 4).

En comparación con el tratamiento con IgG, se observó que en animales que se trataron con combinaciones de diacuerpo CD30/CD16A en tándem y anti-CTLA-4, anti-PD-1 y anti-CD137 la población de células NK aumentó en el tumor. Además, mientras no existió aumento de células T en animales que se trataron solo con diacuerpo CD30/CD16A en tándem o anti-CTLA-4, anti-PD-1 y anti-CD137 de manera individual, las células T citotóxicas que se detectaron en animales que se trataron con diacuerpo CD30/CD16A en tándem en combinación con anti-CTLA-4, anti-PD-1 y anti-CD137 aumentaron (Figura 5).

Los hallazgos respaldan que la terapia de doble anticuerpo aumenta la eficacia del diacuerpo CD30/CD16A en tándem y de los anticuerpos inmunomoduladores alcanzando una regresión tumoral notable.

La actividad antitumoral mejorada del diacuerpo CD30/CD16A en tándem en combinación con anticuerpos inmunomoduladores se asoció con números más altos de células NK y T de infiltración tumoral y con liberación aumentada de citocinas proinflamatorias. El tratamiento con IgG de control o diacuerpos en tándem irrelevantes que reclutan CD16A no indujo una activación de células inmunizadoras inespecíficas respaldando la activación estricta de células NK dependiente de la diana por el diacuerpo CD30/CD16A en tándem. La combinación de diacuerpo CD30/CD16A en tándem con anticuerpos anti-CTLA-4, anti-CD137 y anti-PD-1 inmunomoduladores no solo mejoró la actividad antitumoral de las células NK sino que también estimuló la infiltración de las células T y la liberación de citocinas en los tumores respaldando la interacción entre inmunidad innata y adaptativa.

En experimentos adicionales con el mismo modelo de PDX que se menciona anteriormente y tamaño de tumor de anti-PD-1 (pembrolizumab), los linfocitos humanos de infiltración tumoral, las células mieloides y las citocinas intratumorales se evaluaron en los días 30, 44 y 58, a saber, 2, 16 y 30 días después del comienzo del tratamiento. La monoterapia con diacuerpo CD30/CD16A en tándem fue más potente desde el punto de vista de la reproducibilidad en comparación con la monoterapia con anti-PD-1 y se observó sinergia cuando ambos agentes se combinaron. El análisis de los tumores en el día 58 reveló una fuerte correlación entre la inhibición del crecimiento tumoral (Figura 8A) y los niveles de células NK, células T, células mieloides (Figura 8B) y citocinas intratumorales tales como IFN γ (Figura 9) de infiltración tumoral. En contraste con respecto a la monoterapia con anti-PD-1, que solo indujo la infiltración de células T, la monoterapia con diacuerpo CD30/CD16A en tándem resultó capaz de inducir infiltración de células NK y T en los tumores, sin embargo, la combinación del diacuerpo CD30/CD16A en tándem con anti-PD-1 mejoró de manera adicional la infiltración de ambas células NK y T. El diacuerpo CD30/CD16A en tándem dio como resultado una infiltración más fuerte de macrófagos en comparación con anti-PD-1, que también se incrementó por la combinación de ambos agentes (Figura 8B), respaldando, por lo tanto, de manera adicional la interacción entre inmunidad innata y adaptativa. Además, el análisis tumoral en los puntos temporales más tempranos, día 30 (Figura 6B) y día 44 (Figura 7B) mostraron que la respuesta inmunitaria inicial se

5 caracteriza por infiltración y activación de células NK, así como por infiltración de macrófagos, mientras que la
 respuesta inmunitaria adaptativa por células T y células dendríticas activadas se pronunció en mayor proporción en
 el día 58 (Figura 8B). La combinación de diacuerpo CD30/CD16A en tándem y anti-PD-1 aumenta la infiltración y la
 activación de todas las subpoblaciones inmunizadoras (Figura 8B). Tan pronto como 2 días después del tratamiento
 (día 30), la monoterapia con diacuerpo CD30/CD16A en tándem indujo una infiltración de tanto células NK como
 macrófagos en los tumores. Este efecto se mejoró con el tiempo y ambas poblaciones de células inmunizadoras
 10 demostraron una fuerte infiltración mediada por diacuerpo en tándem de los tumores hacia el final del experimento
 (día 58). Cuando se combinó el diacuerpo CD30/CD16A en tándem con el anticuerpo inmunomodulador anti-PD-1,
 el efecto en la inmunidad innata se impulsó de manera inicial por el diacuerpo en tándem de manera individual, pero
 el tratamiento con anti-PD-1 dio como resultado una infiltración de células innatas más pronunciada al final del
 experimento (Figura 10).

15 En resumen, los datos muestran una fuerte eficacia antitumoral cuando se combinan el diacuerpo CD30/CD16A en
 tándem con bloqueo de punto de control de anti-PD-1 en modelos de PDX de linfoma de Hodgkin, mediada por
 linfocitos de infiltración tumoral (células T CD4⁺ y CD8⁺, macrófagos y células dendríticas). Por lo tanto, la respuesta
 antitumoral inicial que se induce por el diacuerpo CD30/CD16A en tándem se impulsa por el reclutamiento y la
 activación de células inmunizadoras innatas tales como células NK y macrófagos, y su activación da como resultado
 una interacción entre inmunidad innata y adaptativa, tales como la correlación de células T CD4 y CD8⁺ con el
 control eficiente del crecimiento tumoral. Estas observaciones se correlacionan también con la liberación de citocinas
 20 intratumorales tales como IFN γ o TNF α .

SUMARIO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Secuencia
1	<p>Secuencia de aminoácidos de diacuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGESLKVKCKASGYTFTSYMHWVVRQAPGQG_EWMGIINPSGGSTSYAQKFGGRVTMTRDTS TSTVMESSLRSEDTAVYYCARGSAYYDFADYWGQGLTVTVSSGGSGGSDIVMTQSPKFMSTSVGDRVTVC KASQNVGTVNAWFQKPGQPKVLIYSASYRYSVGPDRFTGSGGDTFTLISNVQSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGG GTKLEINGGGGGSQVQLQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTHWVVRQRPGHLEWIGYINPSSGSDYN QNFKGTLLTADKSSNTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRADYGNVEYTWFAWVGQGLTVTVSSGGSGGSSVLT QPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTAAMDE ADYYCQVWVDNYSVLFGGGTKLTVL</p>
2	<p>Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de anti-CD30</p> <p>QVQLQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTHWVVRQRPGHLEWIGYINPSSGSDYNQNFKGTLLTADKSSN TAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRADYGNVEYTWFAWVGQGLTVTVSS</p>
3	<p>Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de anti-CD30</p> <p>DIVMTQSPKFMSTSVGDRVTVCASQNVGTVNAWFQKPGQPKVLIYSASYRYSVGPDRFTGSGGDTFTLISN VQSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGGGKLEIN</p>
4	<p>Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de anti-CD16A</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGESLKVKCKASGYTFTSYMHWVVRQAPGQGLEWMIINPSGGSTSYAQKFGGRVTMTRDTS TSTVMESSLRSEDTAVYYCARGSAYYDFADYWGQGLTVTVSS</p>
5	<p>Secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de anti-CD16A</p> <p>SVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQ AMDEADYYCQVWVDNYSVLFGGGTKLTVL</p>

Listado de secuencias

<110> Affimed GmbH

5 <120> Combinación de un anticuerpo biespecífico para CD30xCD16 con un antagonista de PD-1 de molécula inmunomoduladora para terapia

<130> A 3283PCT

10 <160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 483

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> díacuerpo de Fv en tándem

25 <400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		

ES 2 754 557 T3

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val
 130 135 140

Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr
 145 150 155 160

Asn Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu
 165 170 175

Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr
 180 185 190

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln
 195 200 205

Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro
 210 215 220

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
 245 250 255

Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 260 265 270

Thr Phe Thr Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His
 275 280 285

Asp Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp
 290 295 300

Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
305 310 315 320

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
325 330 335

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr
340 345 350

Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro
370 375 380

Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly
385 390 395 400

Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro
405 410 415

Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser
420 425 430

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
435 440 445

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
450 455 460

Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
465 470 475 480

Thr Val Leu

5

<210> 2

<211> 123

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 754 557 T3

<220>

<223> FH de dominio de anti-CD30

5 <400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

10 <211> 107

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de dominio anti-CD30

20 <400> 3

ES 2 754 557 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
 100 105

<210> 4

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> VH de anti-CD16A

15 <400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

ES 2 754 557 T3

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 5

<211> 106

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> VL de dominio de anti-CD16A

<400> 5

ES 2 754 557 T3

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Ser Cys Gly Gly His Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Tyr Ser Val Leu
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una combinación de (i) un anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 y CD16A y (ii) un anticuerpo antagonista anti-PD-1, para uso en un método de tratamiento de un linfoma CD30⁺.
2. La combinación para uso de la reivindicación 1, en la que la combinación se usa en un método para aumentar la respuesta inmunitaria innata en comparación con aquella del anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 y CD16A de manera individual.
- 10 3. La combinación para uso de la reivindicación 2, en la que la respuesta inmunitaria innata consiste en una infiltración de células intratumoral aumentada de células innatas en el tumor.
4. La combinación para uso de la reivindicación 3, en la que la infiltración intratumoral de macrófagos, células dendríticas y células NK se aumenta.
- 15 5. La combinación para uso de la reivindicación 4, en la que de manera adicional se incrementa la infiltración intratumoral de las células T CD4⁺ y CD8⁺.
- 20 6. La combinación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el linfoma es un linfoma de Hodgkin.
7. La combinación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el anticuerpo multifuncional comprende un dominio de unión a anti-CD30 y dicho dominio de unión a anti-CD30 comprende el dominio variable de la cadena pesada que se establece en la SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de la cadena ligera que se establece en la SEQ ID NO: 3.
- 25 8. La combinación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el anticuerpo multifuncional comprende un dominio de unión a anti-CD16A y dicho dominio de unión a anti-CD16A comprende un dominio variable de la cadena pesada que se establece en la SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de la cadena ligera que se establece en la SEQ ID NO: 5.
- 30 9. La combinación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el anticuerpo multifuncional es un anticuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem.
- 35 10. La combinación para uso de la reivindicación 9, en la que el anticuerpo biespecífico para CD30/CD16A en tándem tiene una secuencia de aminoácidos según se establece en la SEQ ID NO: 1.
- 40 11. La combinación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende un agente adicional que modula una molécula de punto de control inmunitario que se selecciona a partir del grupo de anticuerpos que consiste en el anticuerpo anti-CD137 y el anticuerpo anti-CTLA-4.
12. La combinación para uso de la reivindicación 11, que comprende el anticuerpo multifuncional que tiene especificidad hacia CD30 y CD16A, anticuerpo anti-CD137 y anticuerpo anti-PD-1.
- 45 13. La combinación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el anticuerpo multifuncional se administra antes del anticuerpo anti-PD-1.

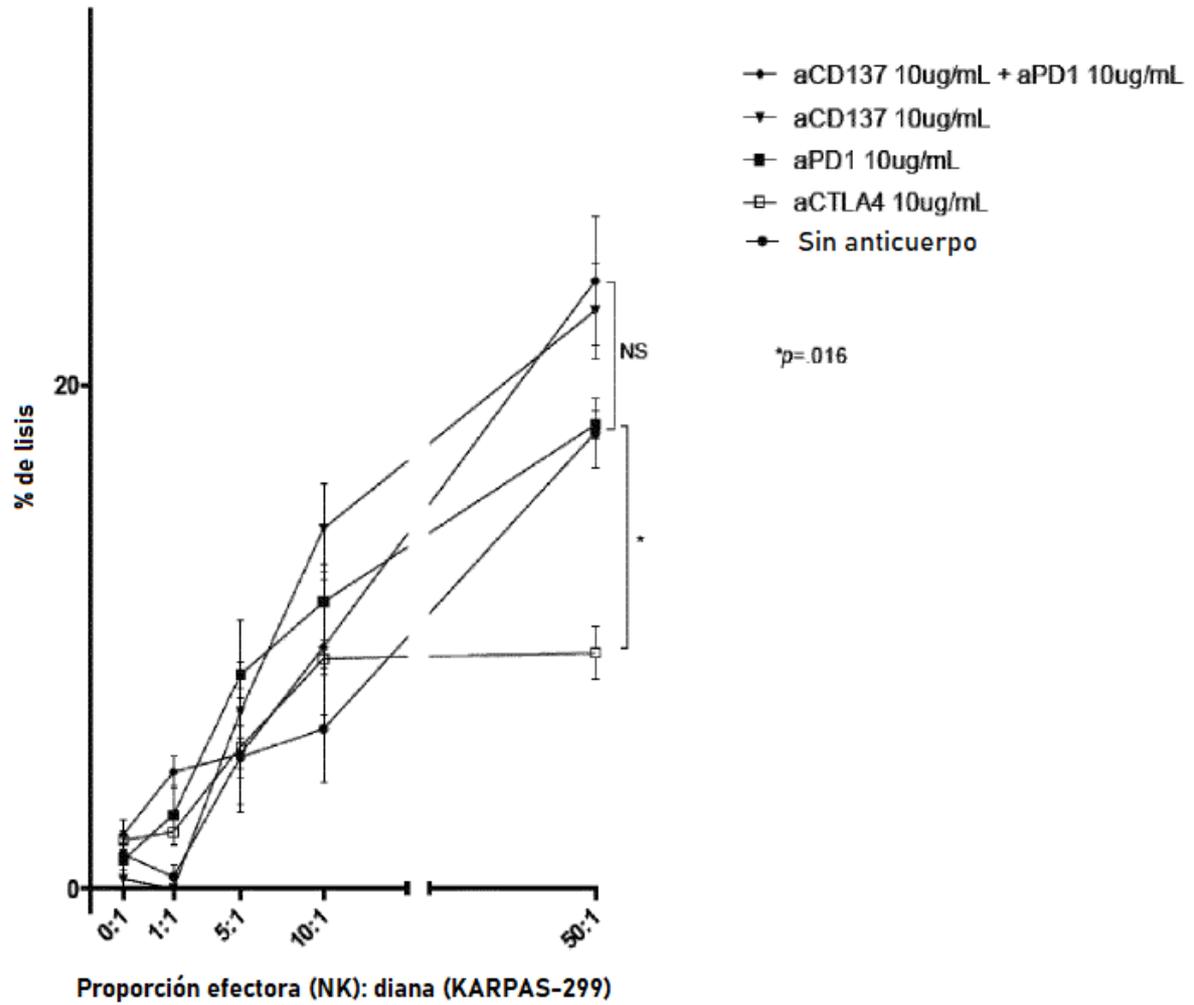


Figura 1

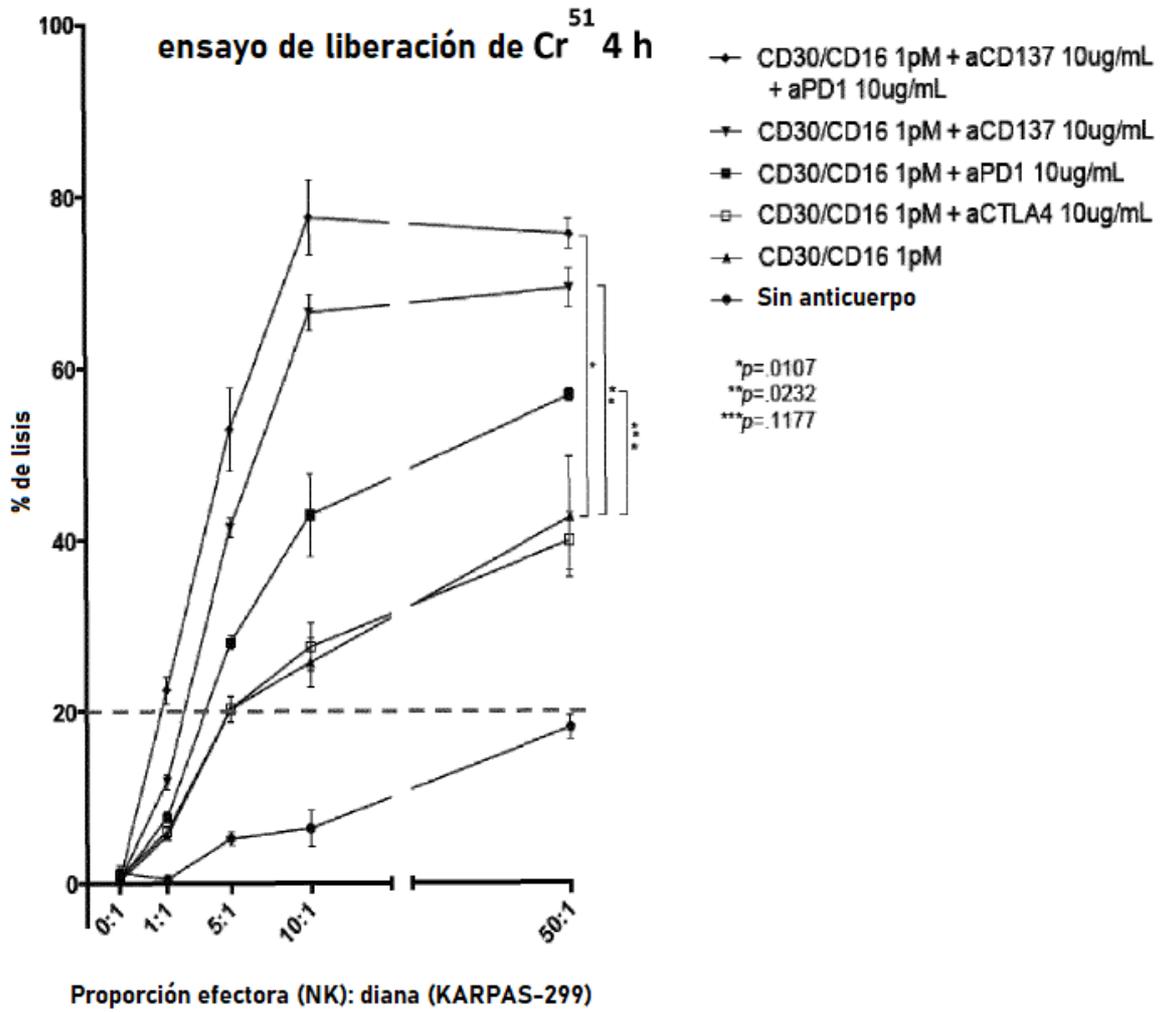


Figura 2

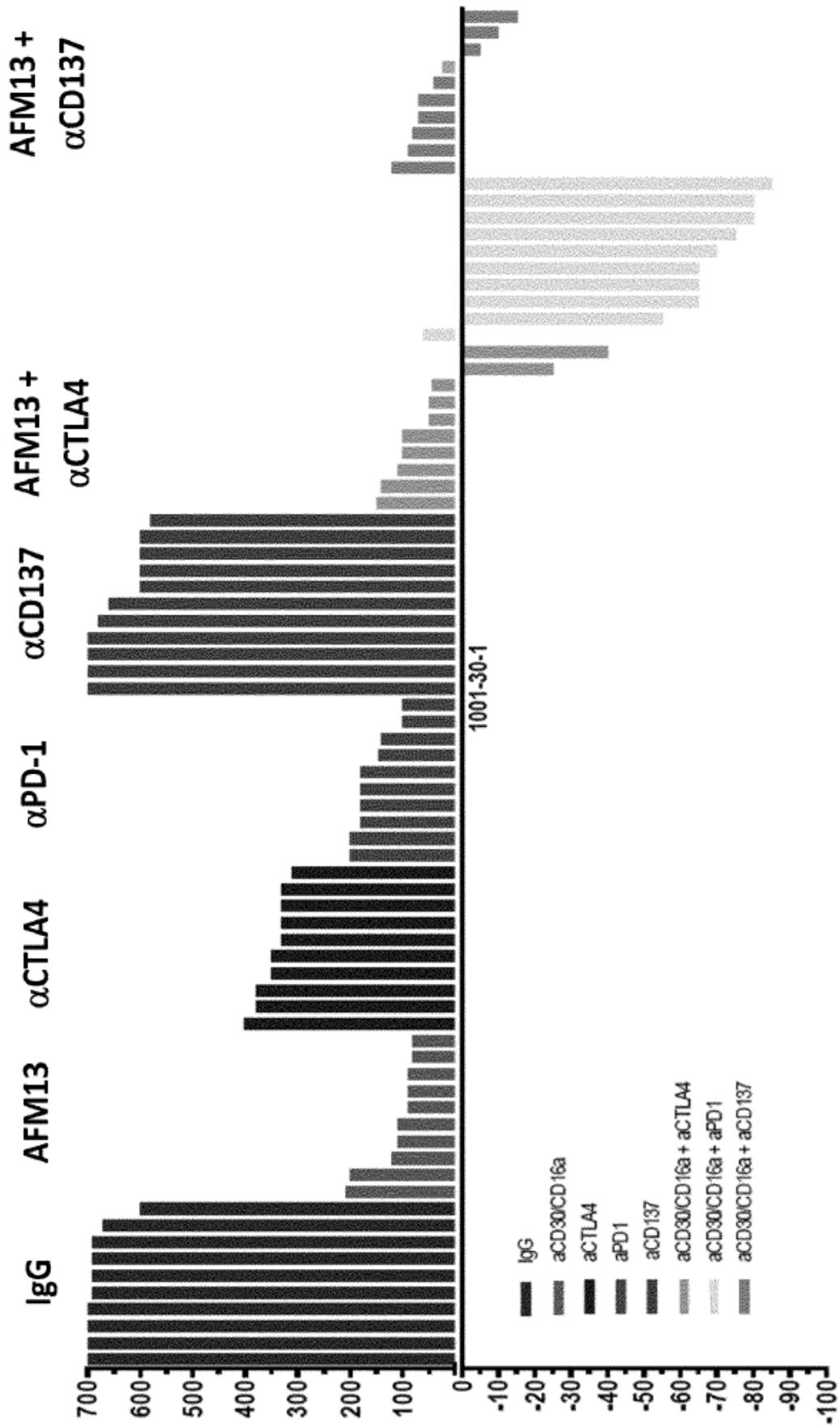


Figura 3

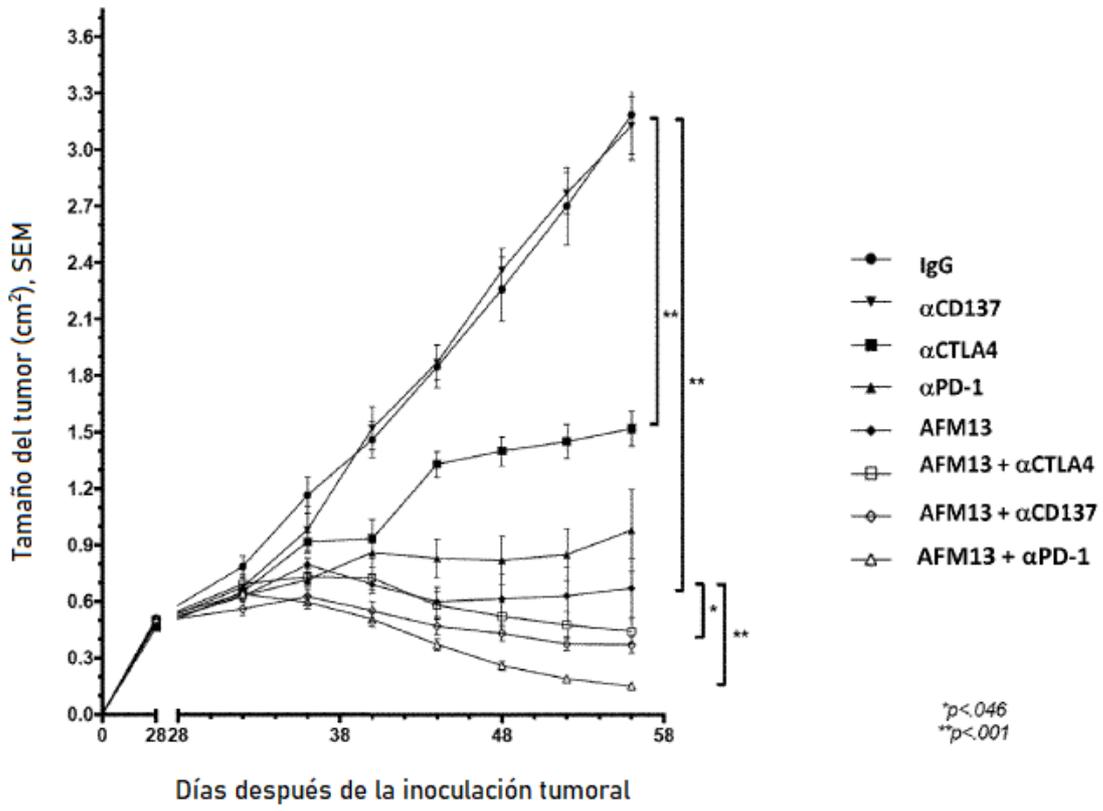


Figura 4

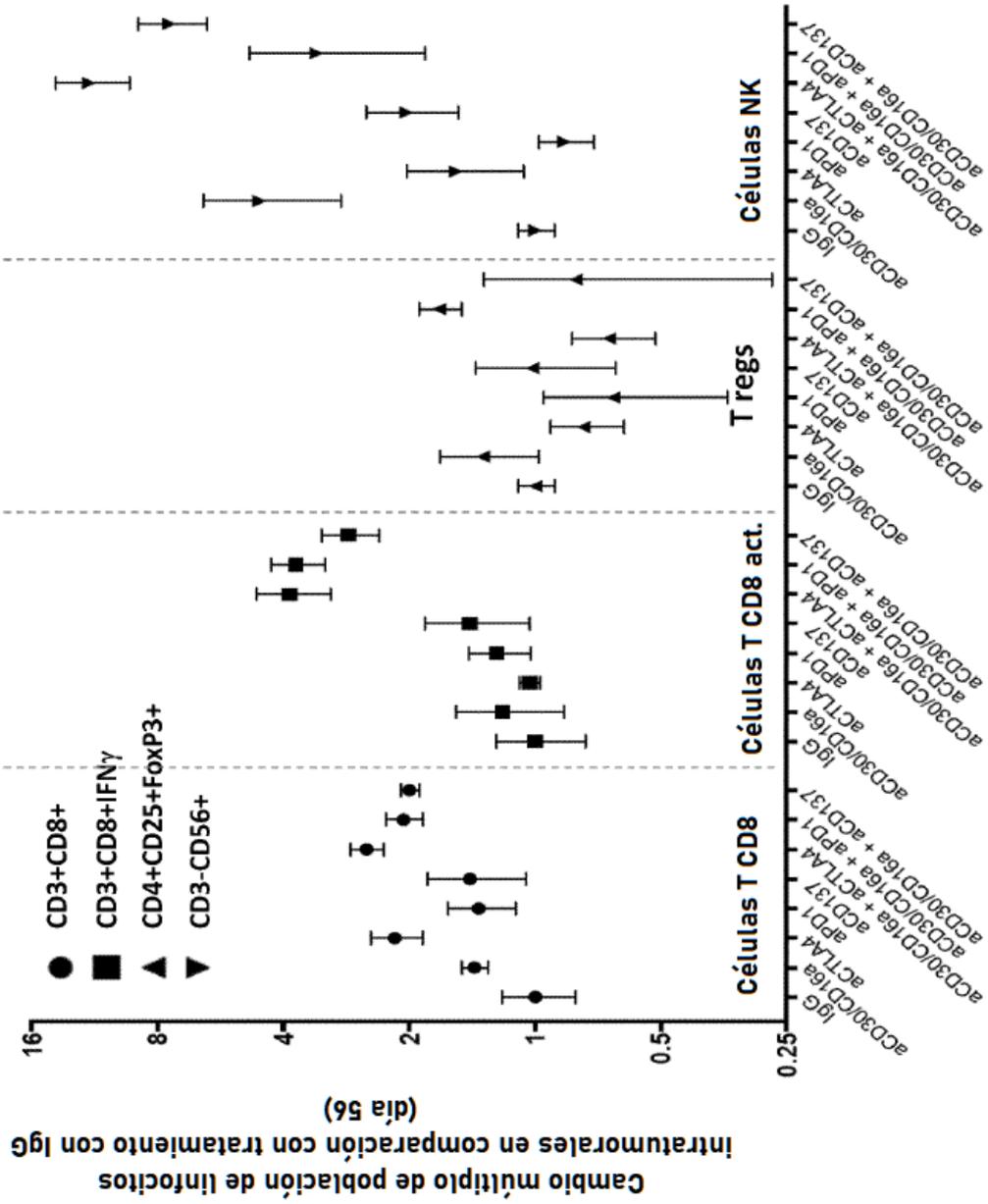


Figura 5

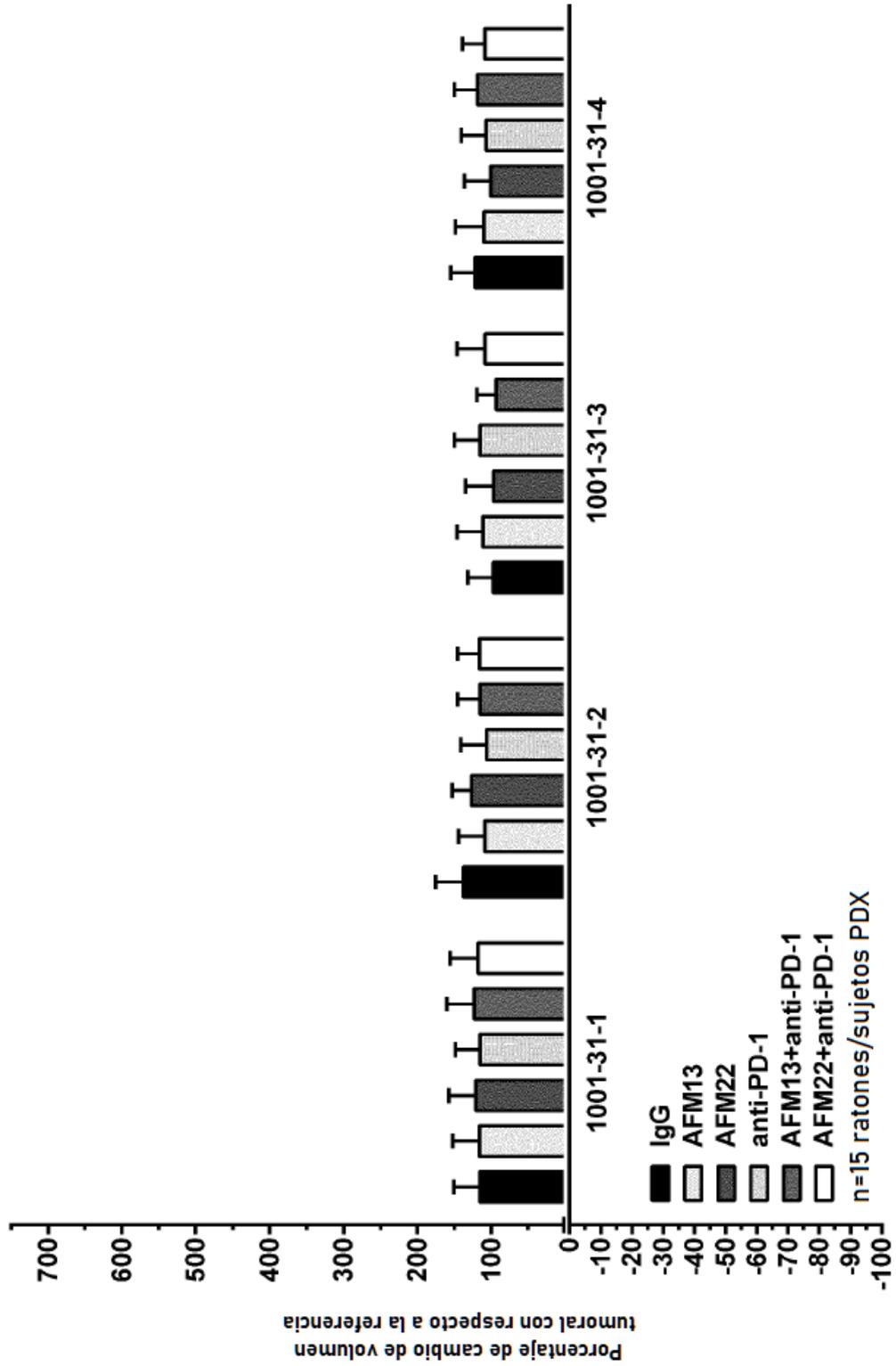


Figura 6A

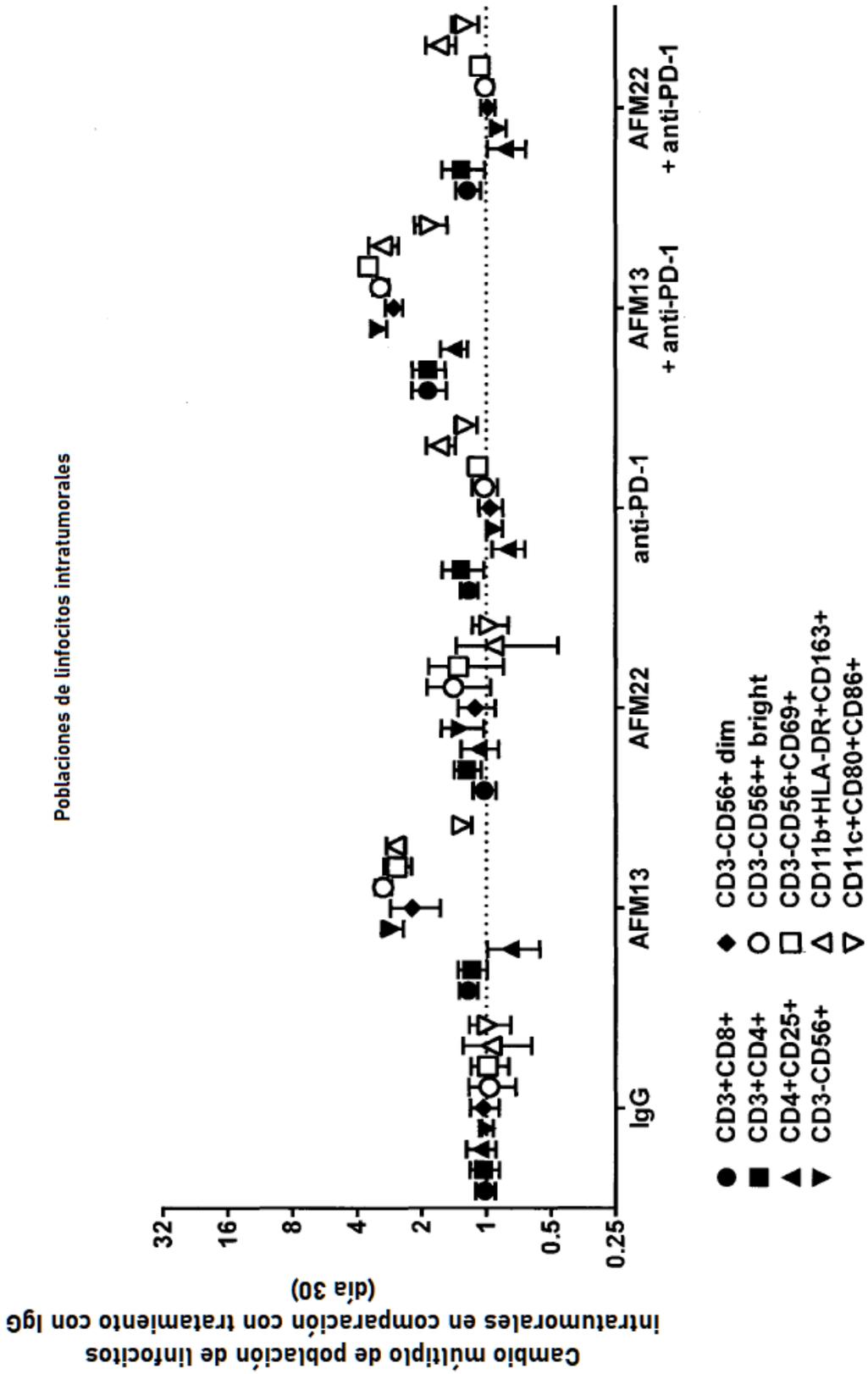


Figura 6B

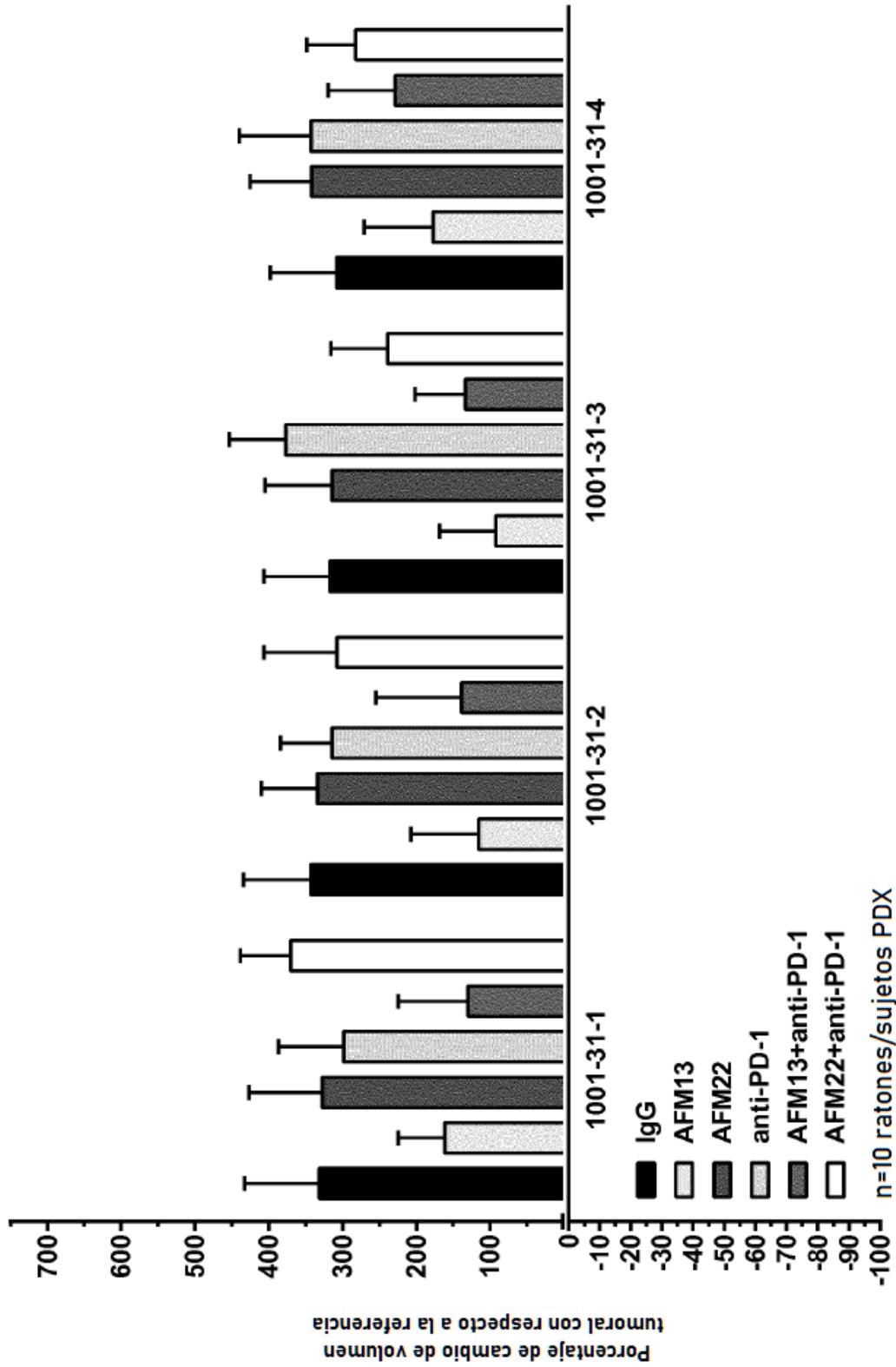


Figura 7A

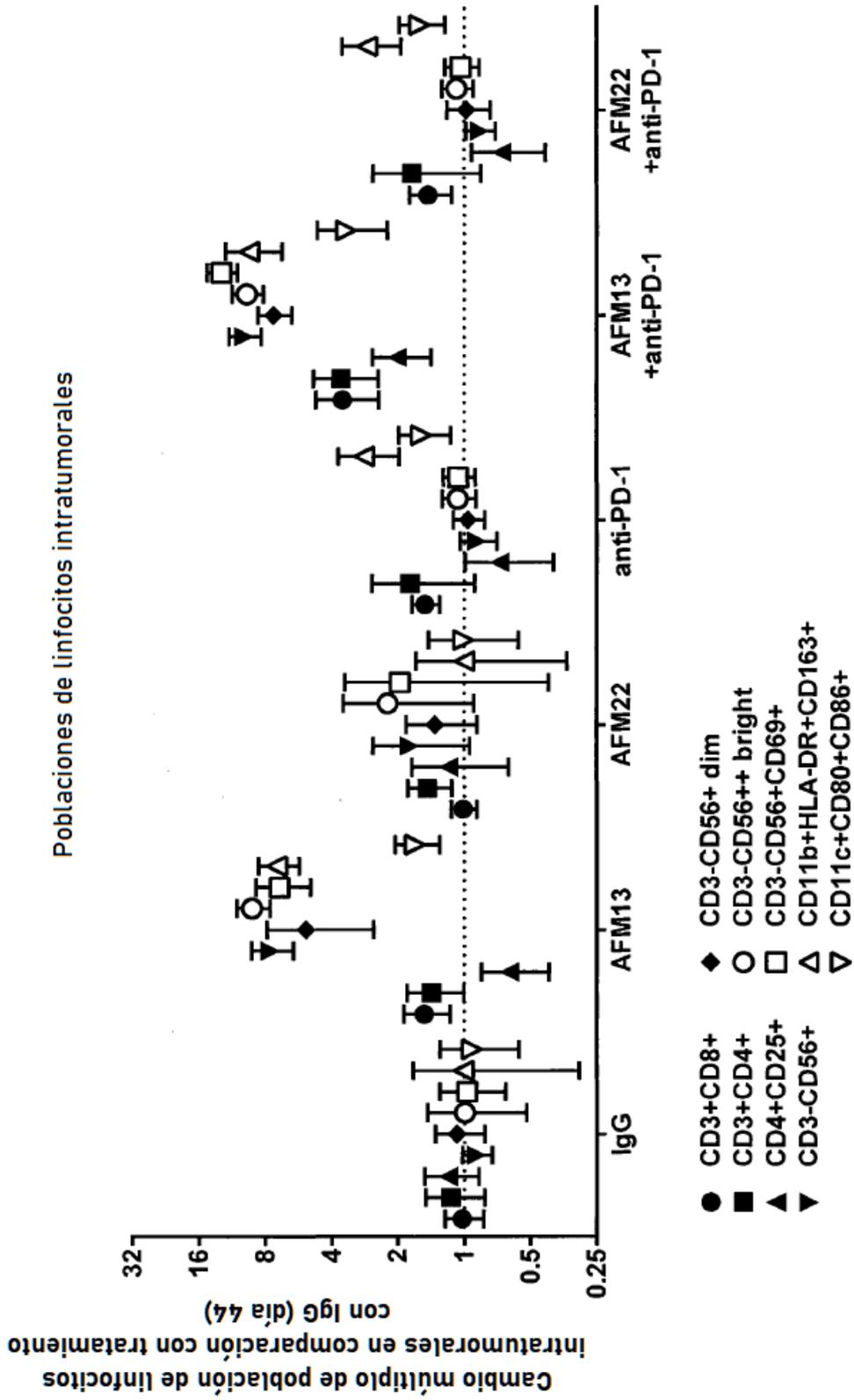


Figura 7B

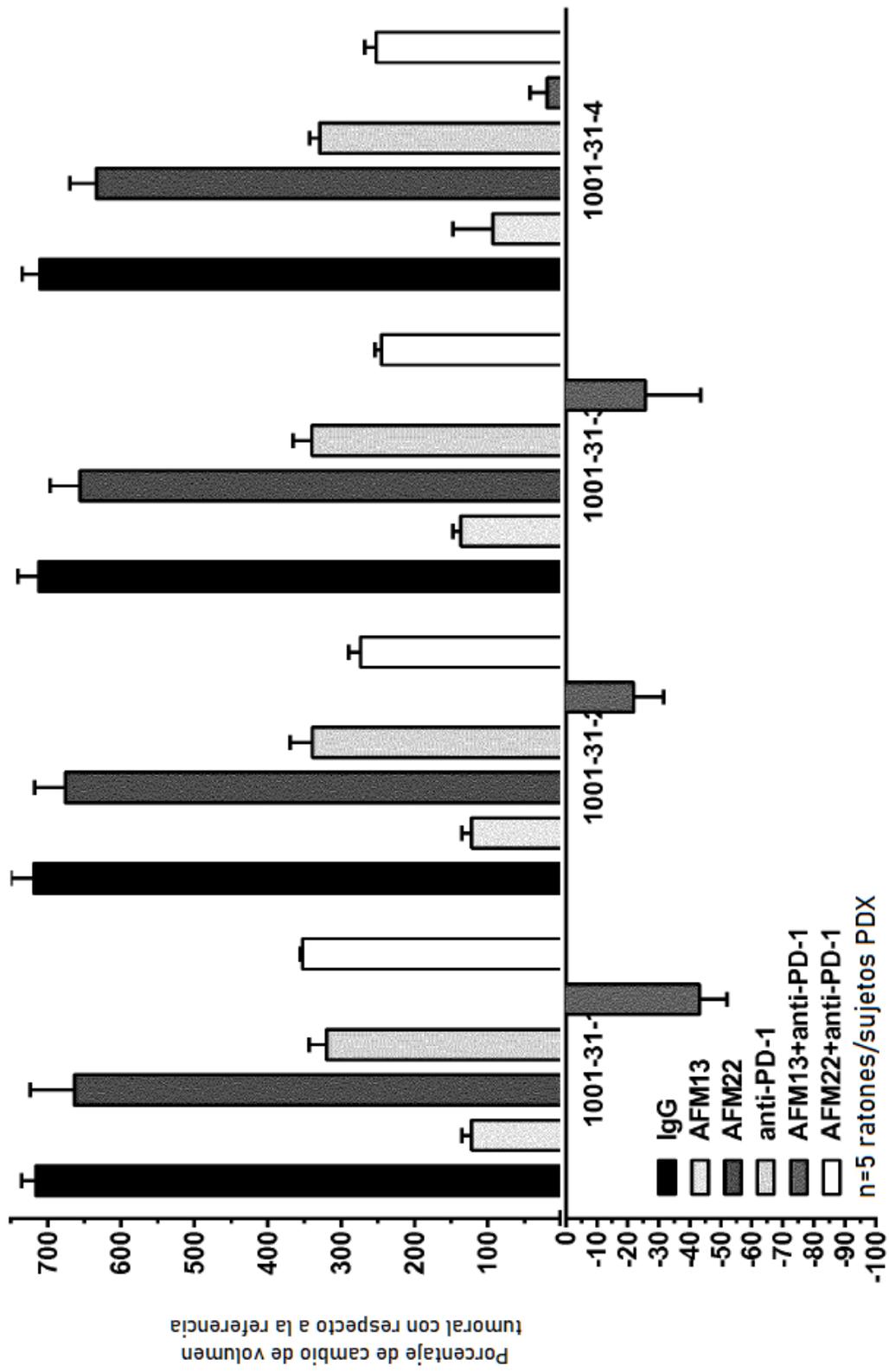


Figura 8A

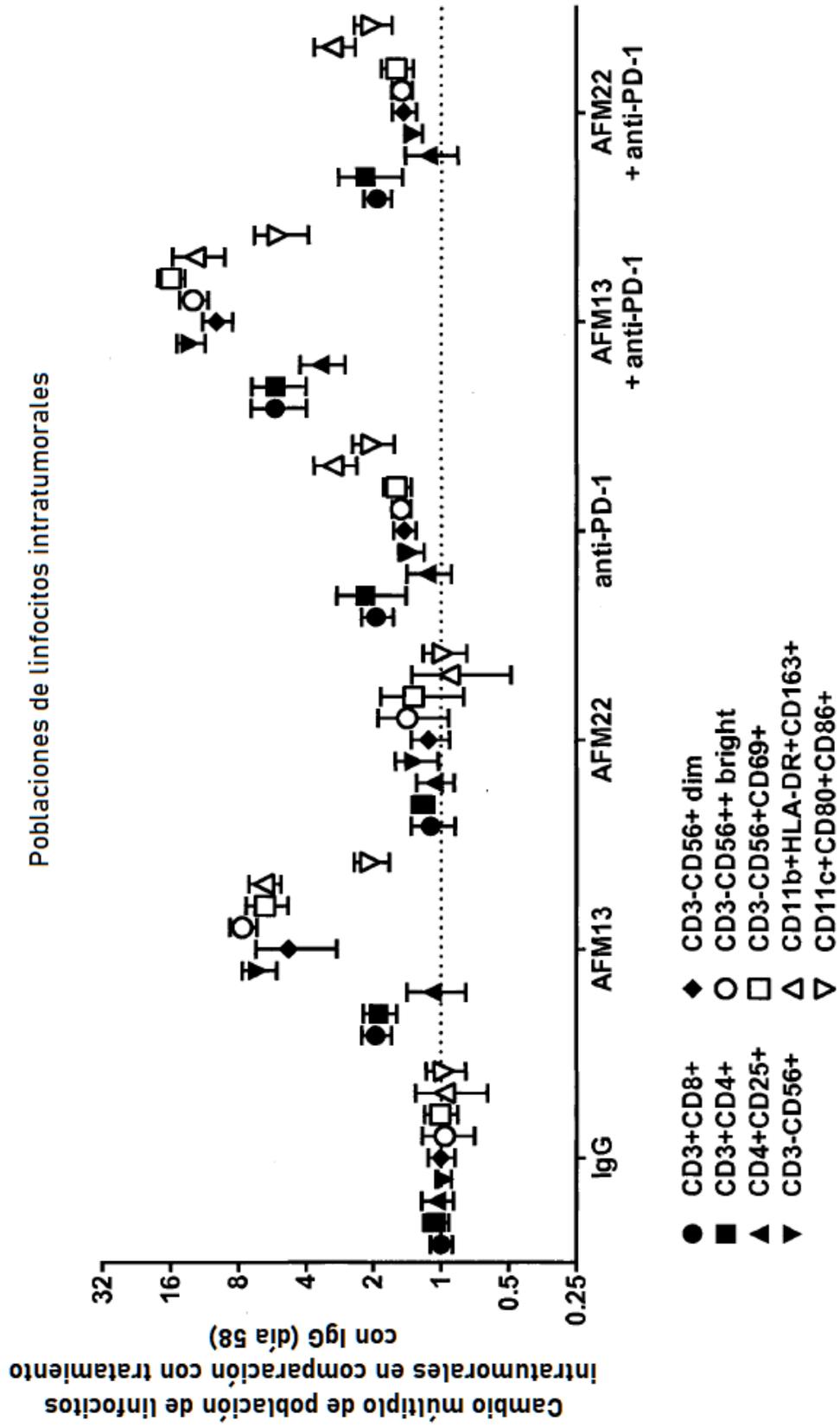


Figura 8B

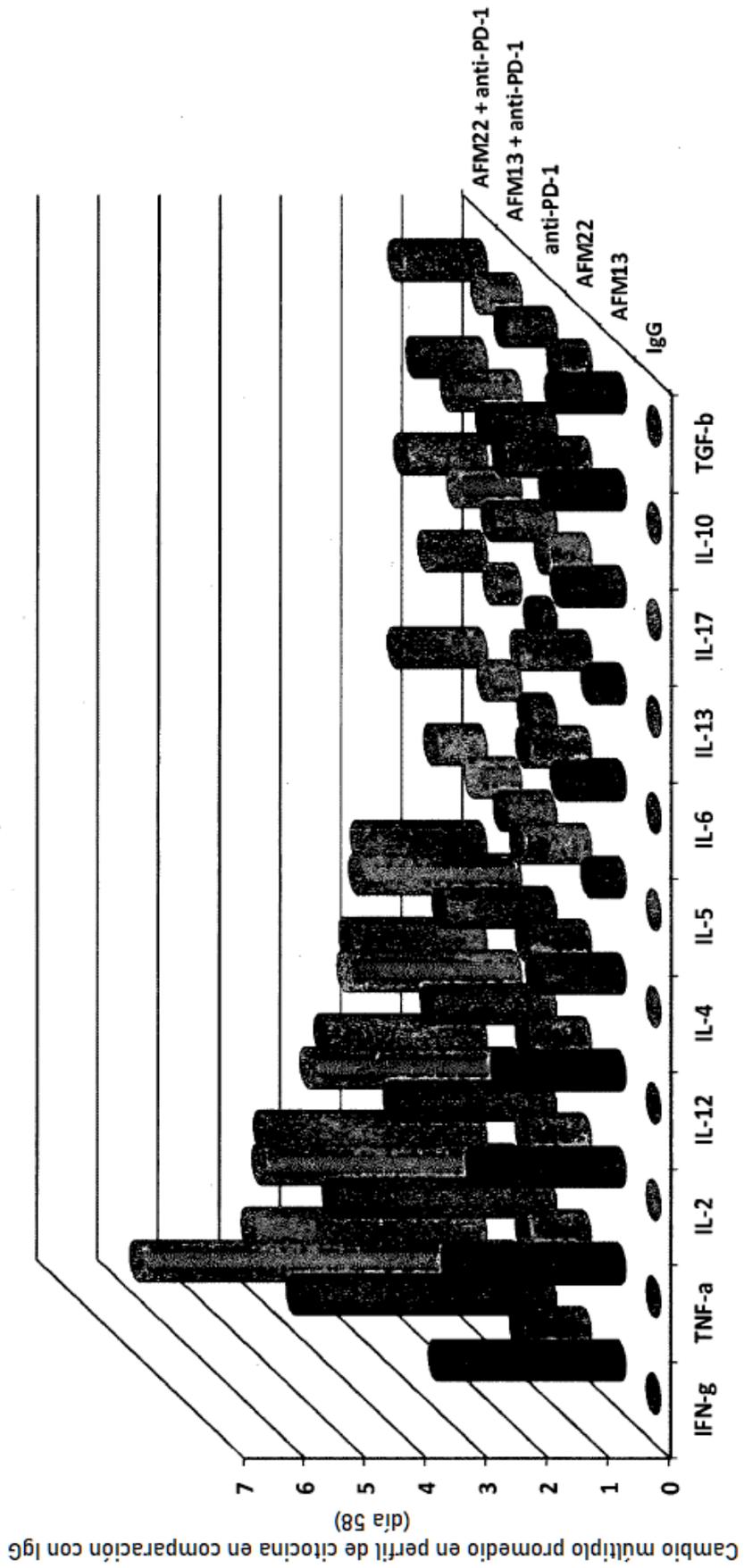


Figura 9

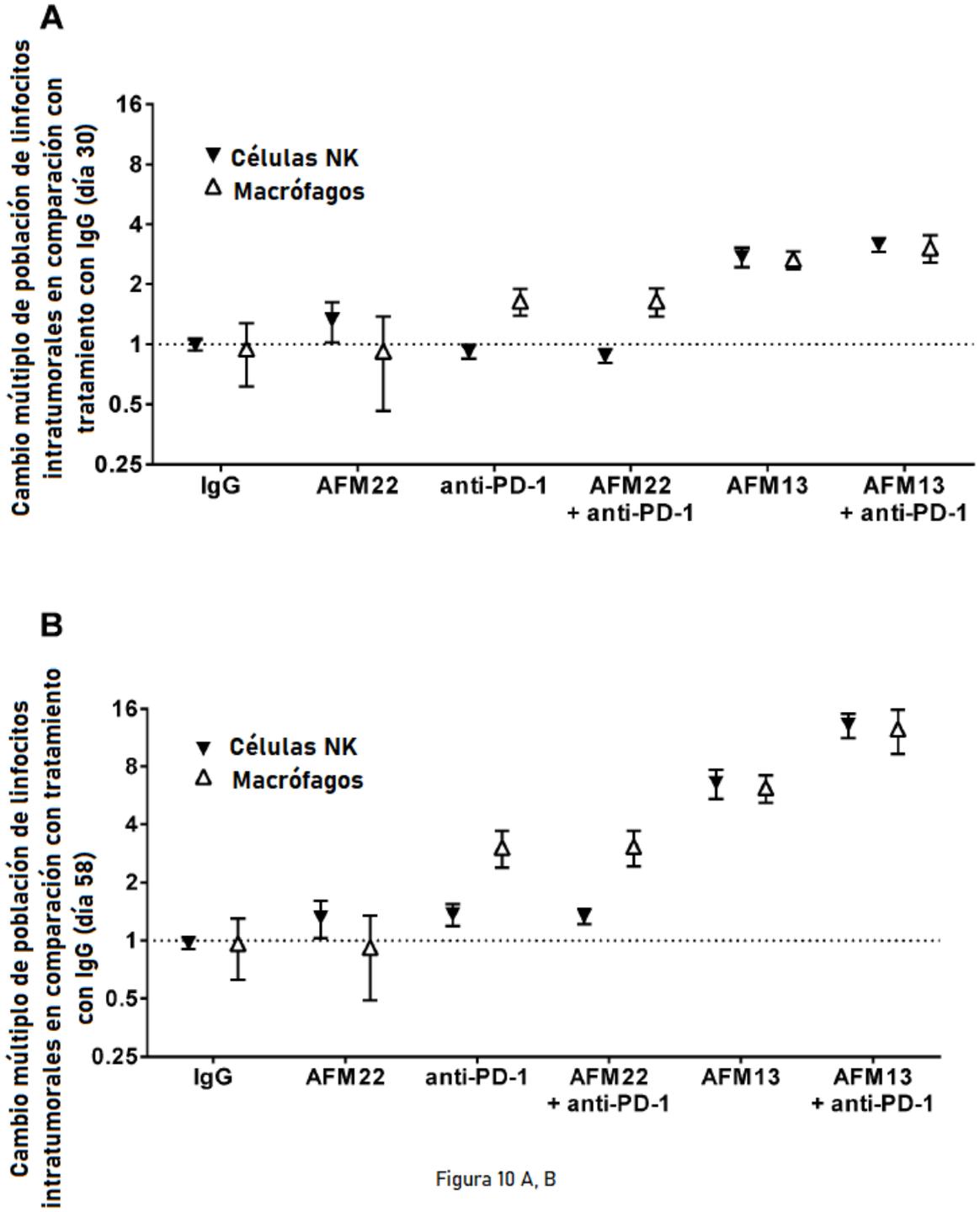


Figura 10 A, B

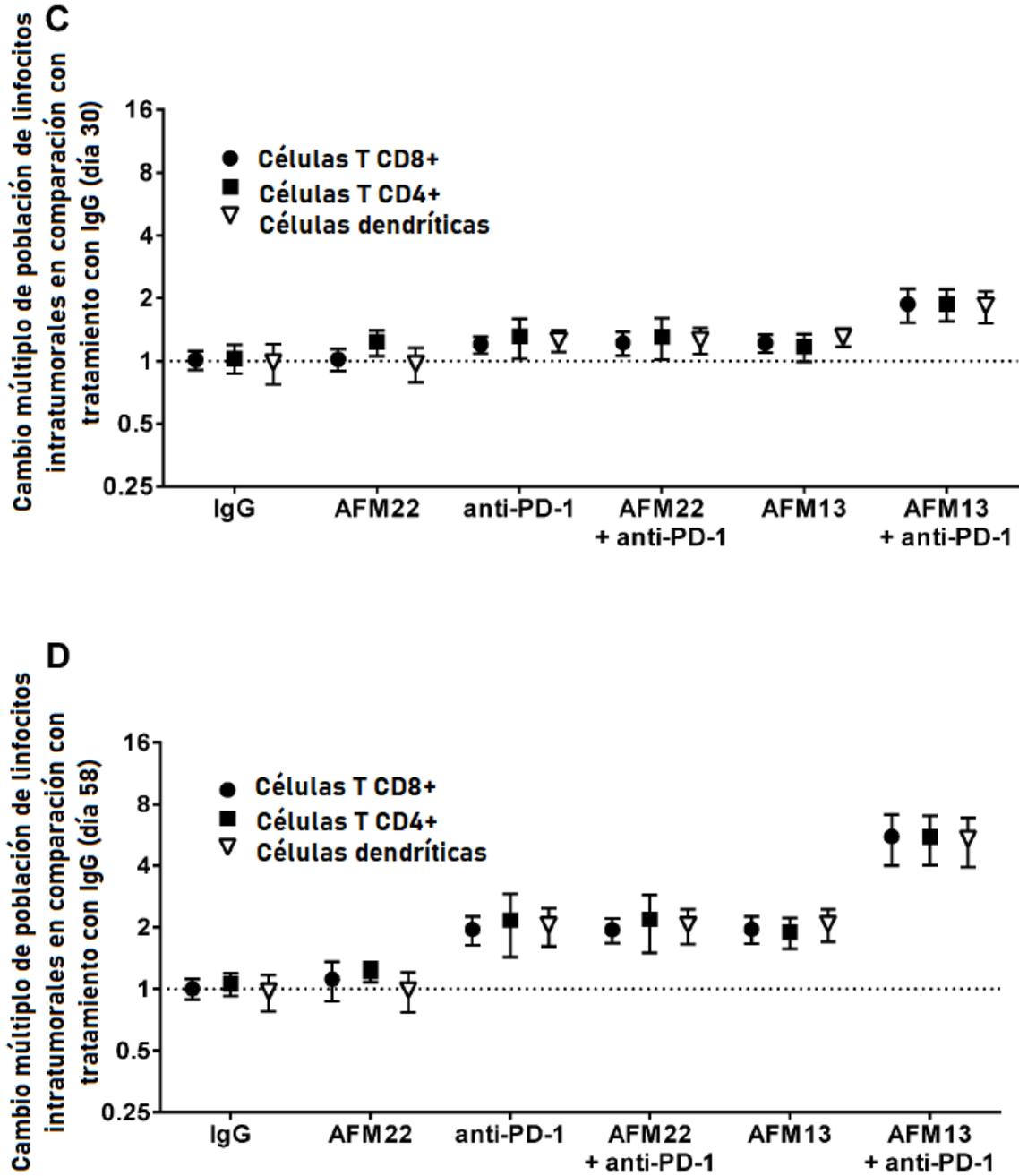


Figura 10 C, D