



REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3313441 (13) T2

(51) Int. Cl: C07K 16/28 (2006.01.01)
A61K 39/39 (2006.01.01)
A61K 39/395 (2006.01.01)
C07K 16/30 (2006.01.01)
A61P 37/04 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0463 (22) Data de depozit: 2016.06.24 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16815351.8, 2016.06.24 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3313441, 2018.05.02 (31) Numărul cererii prioritare: 201562184018 P; 201562249546 P; 201562250566 P; 201562263307 P; 201662331489 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.06.24; 2015.11.02; 2015.11.04; 2015.12.04; 2016.05.04 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 08/2024, 2024.08.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 08/2024, 2024.02.21 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 06/2018, 2018.06.30
(71) Solicitant: JANSSEN BIOTECH INC., US (72) Inventatori: AHMADI Tahamtan, US; CASNEUF Tineke, NL; LOKHORST Henk M., NL; MUTIS Tuna, NL; SASSER Amy, US (73) Titular: JANSSEN BIOTECH INC., US (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Modularea imună și tratament al tumorilor solide cu anticorpi care leagă specific CD38

(57) Rezumat:

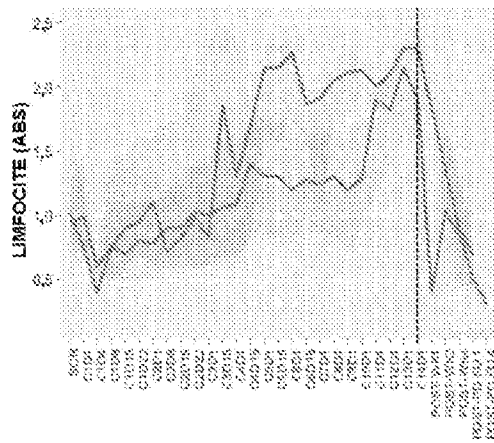
1
Prezenta invenție se referă la metode de imunomodulare și tratament al pacienților care au tumori solide, cu anticorpi care se leagă specific la CD38.

Revendicări: 15

2
Figuri: 18

MD/EP 3313441 T2 2024.08.31

Figura 1



(54) Immune modulation and treatment of solid tumors with antibodies that specifically bind CD38

(57) Abstract:

1

The present invention relates to methods of immunomodulation and treating patients having solid tumors with antibodies that specifically bind CD38.

2

Claims: 15

Fig.: 18

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI**

Prezenta divulgare se referă la utilizarea medicală a modulării imune și la tratamentul tumorilor solide cu anticorpi care se leagă specific la CD38.

BAZELE INVENȚIEI

Sistemul imunitar este strâns controlat printr-o rețea de liganzi și receptori costimulatori și coinhibitori. Aceste molecule furnizează semnale secundare pentru activare celulelor T și furnizează o rețea echilibrată de semnale pozitive și negative pentru a maximiza răspunsurile imune împotriva infecției și tumorilor, în timp ce limitează imunitatea față de sine (Wang și colab., (Epub 7 martie, 2011) J Exp Med 208(3):577-92; Lepenies și colab., (2008) Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 8:279-288).

Terapia punctului de control imun pentru a trata tumorile solide, care țintește căile coinhibitoare din celulele T pentru a promova răspunsuri imune antitumorale, a condus la avantaje în îngrijirea clinică a pacienților cu cancer cu aprobarea anticorpilor anti-CTLA-4 și anti-PD-1 YERVOY® (ipilimumab), KEYTRUDA® (pembrolizumab) și OPDIVO® (nivolumab). În timp ce anticorpii anti-PD-1/PD-L1 demonstrează răspunsuri clinice încurajatoare la pacienții cu multiple tumori solide, ratele de răspuns sunt încă destul de scăzute, de aproximativ 15% - 20% la pacienții pretratați (Swaika și colab., (2015) Mol Immunol doi: 10.1016/j.molimm, 2015.02.009).

În timp ce celulele ucigăse natural (NK), celulele dendritice (DC) și celulele T efectoare sunt capabile să conducă răspunsuri antitumorale potente, celulele tumorale induc adesea un micromediu imunosupresiv, favorizând dezvoltarea populațiilor imunosupresive de celule imune, cum ar fi celulele supresoare derivate din mieloid (MDSC), celulele T regatoare (Treg) sau celulele B regatoare (Breg), care contribuie la toleranța imună tumorală și la eșuarea regimurilor de imunoterapie la pacienții cu cancer și pe modelele tumorale experimentale.

Astfel, rămâne o necesitate de a dezvolta noi imunoterapii pentru cancer, care să inducă răspuns imun adaptiv împotriva tumorilor sau să țină seama de celulele imune imunosupresoare.

M de Weers și colab. (2010) The Journal of Immunology vol. 186, nr. 3, din 27 decembrie

2010, paginile 1840-1848, divulgă faptul că, daratumumabul, un nou anticorp monoclonal terapeutic CD38, induce uciderea mielomului multiplu și a altor tumori hematologice.

Chillemi și colab. (2013) Molecular Medicine, vol. 19, nr. 1, paginile 99-108, discută caracteristicile moleculei țintă CD38 și a terapiei cu anticorpi anti-CD38.

WO 2015/009726 A2 divulgă utilizări medicale ale agonistilor CD38. WO 2012/092612 A1 divulgă anticorpi anti-CD38 și anumite utilizări terapeutice și de diagnostic ale acestora.

REZUMATUL INVENȚIEI

Invenția este definită prin revendicări. Specific, invenția furnizează un anticorp care se leagă specific la CD38 pentru utilizare în tratarea unui pacient care are o tumoră solidă, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5, în care anticorpul este de izotip IgG1.

Orice referiri în descriere la metode de tratament, se referă la compuși, compozițiile farmaceutice și medicamentele din prezenta invenție pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul corpului uman (sau animal) prin terapie (sau pentru diagnostic). Anticorpul din prezenta invenție este pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui pacient care are o tumoră solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp.

Anticorpii din prezenta divulgare pot fi de asemenea utili într-o metodă pentru tratarea unui pacient care are o boală mediată de celulele T regatoare (Treg), cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp.

Anticorpii din prezenta divulgare pot fi de asemenea utili într-o metodă pentru tratarea unui pacient care are o boală mediată de celulele supresoare derivate din mieloid (MDSC), cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp.

Anticorpul din prezenta divulgare poate fi de asemenea util într-o metodă pentru tratarea unui pacient care are o boală mediată de celulele B regatoare (Breg), cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp.

Anticorpii din prezenta divulgare pot fi de asemenea utili într-o metodă de suprimare a activității celulelor T regatoare (Treg), cuprinzând punerea în contact a Treg-urilor cu anticorpii.

Anticorpii din prezenta divulgare pot fi de asemenea utili într-o metodă de suprimare a activității unei celule supresoare derivate din mieloid (MDSC), cuprinzând punerea în contact a MDSC cu anticorpii.

Anticorpilor din prezenta divulgare pot fi de asemenea utili într-o metodă de suprimare a activității unei celule B reglatoare (Breg), cuprinzând punerea în contact a Breg cu anticorpilor.

Anticorpilor din prezenta divulgare pot fi de asemenea utili într-o metodă de amplificare a unui răspuns imun la un pacient, cuprinzând administrarea anticorpilor la pacient.

5 Anticorpilor pentru utilizare din prezenta invenție pot fi de asemenea utili în tratarea unui pacient care are o tumoră solidă cuprinzând reducerea numărului de celule Treg la pacient.

Anticorpilor pentru utilizare din prezenta invenție pot fi de asemenea utili în tratarea unui pacient care are o tumoră solidă, cuprinzând reducerea numărului de celule supresoare derivate din mieloid (MDSC-uri) la pacient.

10 Anticorpilor din prezenta divulgare pot fi de asemenea utili într-o metodă de suprimare a activității unei celule supresoare imune, cuprinzând punerea în contact a celulei supresoare imune cu anticorpilor.

Anticorpilor din prezenta divulgare pot fi de asemenea utili într-o metodă de tratare a unui pacient care are o infecție virală, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de acesta, a anticorpului.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

15 **Figura 1** arată că numărul mediu de limfocite a crescut la pacienții care au răspuns la tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) la doze de 8 mg/kg (linia superioară) sau 16 mg/kg (linia inferioară) în timp, și că numărul de limfocite a revenit la valorile inițiale după terminarea tratamentului. Studiu: SIRIUS. Axa X indică timpul exprimat ca ciclu de tratament și zile de dozare în fiecare ciclu de tratament (C1D1: ciclul 1, ziua 1; C1D4: ciclul 1, ziua 4, etc). SCR: inițial; EOT: sfârșitul tratamentului; WK: săptămână; POST-WK: posttratament în săptămânile indicate; post-PD FU: urmărire după progres. Zonele evidențiate în nuanțe de gri indică intervalul intercuartil (IQR) de 25-27% pentru punctele de date pentru fiecare vizită pentru respondenți.

25 **Figura 2** arată modificarea procentuală (%) a numărului inițial absolut de celule T CD3⁺ din sângele periferic la pacienții tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) pentru fiecare pacient individual (linii gri deschis). Studiu: SIRIUS (MMY2002). Axa X indică timpul exprimat ca ciclu de tratament și zile de dozare în fiecare ciclu de tratament (C1D1: ciclul 1, ziua 1; C1D4: ciclul 1, ziua 4, etc). WK: săptămână; POST-WK: post-tratament în săptămânile indicate; POST-PD FU: urmărire după progres. Linia neagră prezintă modificarea % medie pentru toți pacienții.

30 **Figura 3** arată modificarea procentuală (%) a numărului inițial absolut de celule T CD4⁺ din sângele periferic la pacienții tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) pentru fiecare pacient individual (linii gri deschis). Studiu: SIRIUS. Axa X indică timpul exprimat ca ciclu de tratament și zile de dozare în fiecare ciclu de tratament (C1D1: ciclul 1, ziua 1; C1D4: ciclul 1, ziua 4, etc). WK: săptămână; POST-TMT: post-tratament. Linia neagră prezintă modificarea % medie pentru toți pacienții.

35 **Figura 4** arată modificarea procentuală (%) a numărului inițial absolut de celule T CD8⁺ din sângele periferic la pacienții tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) pentru fiecare pacient individual (linii gri deschis). Studiu: SIRIUS. Axa X indică timpul exprimat ca ciclu de tratament și zile de dozare în fiecare ciclu de tratament (C1D1: ciclul 1, ziua 1; C1D4: ciclul 1, ziua 4, etc). WK: săptămână; Pre-PD FU: urmărire înaintea de progres; Post-PD FU: urmărire după progres. Linia neagră prezintă modificarea % medie pentru toți pacienții.

40 **Figura 5** arată că numărul de celule CD45⁺CD3⁺ (măsurat ca procent din limfocite) din aspiratele măduvei osoase a crescut în timpul tratamentului cu

45 DARZALEX™ (daratumumab) în timp la dozele de 8 mg/kg sau 16 mg/kg. Graficul include atât respondenții cât și nerespondenții cum s-a indicat. Studiu: SIRIUS. Axa X indică timpul exprimat ca ciclu de tratament și zile de dozare în fiecare ciclu de tratament (C2D22: ciclul 2, ziua 22; etc). SCR: inițial; Post-PD FU1: urmărire după progres. Zonele evidențiate în nuanțe de gri indică intervalul intercuartilă (IQR) de 25-27% pentru punctele de date pentru fiecare vizită pentru nerespondenții dozați la 8 mg/kg, pentru respondenții dozați la 16 mg/kg, sau respectiv pentru nerespondenții dozați la 16 mg/kg. NR: nerespondent; R: respondent.

50 **Figura 6** arată că numărul de celule CD45⁺CD3⁺ CD8⁺ (măsurat ca procent din limfocite) din aspiratele măduvei osoase a crescut în timpul tratamentului cu

55 DARZALEX™ (daratumumab) în timp la dozele de 8 mg/kg sau 16 mg/kg. Graficul include atât respondenții cât și nerespondenții cum s-a indicat. Studiu: SIRIUS. Axa X indică timpul exprimat ca ciclu de tratament și zile de dozare în fiecare ciclu de tratament (C2D22: ciclul 2, ziua 22; etc). SCR: inițial; Post-PD FU1: urmărire după progres. Zonele evidențiate în nuanțe de gri indică intervalul intercuartil (IQR) de 25-27% pentru punctele de date pentru fiecare vizită pentru nerespondenții dozați la 8 mg/kg, pentru respondenții dozați la 16 mg/kg, sau respectiv pentru nerespondenții dozați la 16 mg/kg. NR: nerespondent; R: respondent.

Figura 7A arată că raportul celulelor CD8⁺/Treg și CD8⁺/CD4⁺ din sângele periferic exprimat ca valori medii ale tuturor pacienților tratați, a crescut în timp în timpul tratamentului cu DARZALEX™

(daratumumab). Momente de timp: C1D1: ciclul 1 ziua; C3D1: ciclul 3 ziua 1; C4D1: ciclul 4 ziua 1. Studiu: SIRIUS. SRC: inițial.

Figura 7B arată că raportul celulelor CD8⁺/Treg din aspiratele măduvei osoase exprimat ca valori medii ale tuturor pacienților tratați, a crescut în timp, în timpul tratamentului cu DARZALEX[™] (daratumumab). Momente de timp: C1D1: ciclul 1 ziua; C3D1: ciclul 3 ziua 1; C4D1: ciclul 4 ziua 1. Studiu: SIRIUS.

Figura 8A arată că respondenții au crescut clonalitatea celulelor T CD8⁺ în comparație cu nerespondenții, după cum s-a măsurat utilizând modificarea % în abundența (CIA) anumitor celule clonate. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 8B arată modificarea plierii în clonalitatea celulelor T CD8⁺ la pacienții individuali pre vs. post tratamentul cu DARZALEX[™] (daratumumab). Respondenții sunt indicați cu stelută. Clonalitatea a fost măsurată ca modificare a plierii în abundența (CIA) anumitor celule clonate. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 8C arată că respondenții (grupul A) au avut o expansiune totală mai mare în repertoriul TCR, măsurată utilizând CIA (modificarea în abundență) în comparație cu nerespondenții (grupul B). P=0,037. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 8D arată suma modificării absolute în abundență (CIA) la respondenți și nerespondenți pentru fiecare clonă expandată a celulelor T. P=0,035 între respondenți (grupul A) și nerespondenți (grupul B). Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 8E arată CIA maximă a unei singure clone a celulei T la respondenți (grupul A) și nerespondenți (grupul B). Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 8F arată că respondenții (grupul A) au avut o expansiune maximă mai mare a unei singure clone, măsurată utilizând CIA % maximă, în comparație cu nerespondenții (grupul B). P=0,0477. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 9A arată procentajul (%) de celule naive CD8⁺ din sângele periferic la nerespondenți (NR, pătrate negre) și la pacienții care au cel puțin răspuns minimal inițial (MR, pătrate albe) la DARZALEX[™] (daratumumab), sau la 2 săptămâni, 4 săptămâni sau 8 săptămâni de tratament, sau după recidivă. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți. $*p=1,82 \times 10^{-4}$.

Figura 9B arată procentajul de celule de memorie centrală CD8⁺ (Tem) din sângele periferic la nerespondenți (NR, pătrate negre) și la pacienții care au cel puțin răspuns minimal inițial (MR, pătrate albe) la DARZALEX[™] (daratumumab), sau la 2 săptămâni, 4 săptămâni sau 8 săptămâni de tratament, sau după recidivă. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți. $*p=4,88 \times 10^{-2}$.

Figura 9C arată creșterea procentuală a celulelor T CD8⁺ restricționate de clasa I a HLA, din sângele periferic inițial, sau la 1, 4 sau 8 săptămâni de tratament, sau după recidivă. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 9D arată că CD38 este exprimată la niveluri scăzute în celulele T naive CD8⁺ și în celulele de memorie centrală CD8⁺ (Tem) inițiale din sângele periferic sau pe tratament. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți. MFI: Intensitate fluorescență medie.

Figura 10A arată o histogramă de analize FACS care prezintă frecvența inițială a Tregurilor (CD3⁺ CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}) (histograma de sus, populația de celule P4) și frecvența inițială a Tregurilor CD38⁺ în populația de Treg-uri (histograma de jos, populația de celule P5) la pacienții cu mielom multiplu. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 10B arată o histogramă de analize FACS care prezintă frecvența Tregurilor (CD3⁺ CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}) (histograma de sus, populația de celule P4) și frecvența Tregurilor CD38⁺ în populația de Treg-uri (histograma de jos, populația de celule P5) la pacienții cu mielom multiplu, după tratamentul cu DARZALEX[™] (daratumumab). Tratamentul cu DARZALEX[™] (daratumumab) a depletat Treg-urile CD38⁺. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 10C arată acea frecvență a Tregurilor CD38^{ridicat} CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} la pacienții tratați cu DARZALEX[™] (daratumumab) inițial, sau la 1 săptămână, 4 săptămâni,

8 săptămâni, după recidivă sau la sfârșitul tratamentului la 6 luni (EOT). Frecvența Tregurilor CD38^{ridicat} a fost redusă cu tratamentul cu DARZALEX[™] (daratumumab) și a revenit la valoarea inițială la EOT. Axa Y: % de Treg-uri CD38^{ridicat} CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} din celulele T CD3⁺. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 10D arată raportul celulelor CD8⁺/Treg la respondenți și nerespondenți, inițial, la 1 săptămână, 4 săptămâni și 8 săptămâni de tratament. Raportul celulelor CD8⁺/Treg a fost semnificativ mai ridicat la respondenți vs. nerespondenți (p=0,00955) în săptămâna 8 de tratament. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 10E arată că proliferarea celulelor efectoare este inhibată mai eficient în prezența Tregurilor CD38⁺ în comparație cu Treg-urile CD38⁻ sau cu controalele negative. Barele de eroare reprezintă

eroarea standard. Asteriscurile denotă modificări semnificative. Mostrele au fost obținute de la mai mulți donatori sănătoși. Proliferarea celulară a fost evaluată prin diluția esterului succinimidilic al carboxifluoresceinei (CFSE).

Figura 11 arată că celulele supresoare derivate din mieloid (MDSC) sunt prezente la pacienții cu mielom multiplu (graficul de sus, celulele încadrate) și că aproximativ jumătate din celule au exprimat CD38 (graficul din mijloc, celulele încadrate). Populația de MDSC CD38^{ridicat} a fost depletată la pacienții tratați cu o perfuzie de DARZALEXTM (daratumumab) (graficul de jos, celulele încadrate). Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 12 arată că numărul de MDSC-uri CD38^{ridicat} (CD11b+HLADR-CD14-CD33+CD15+) a fost redus la pacienți după 1 săptămână, 4 săptămâni sau 8 săptămâni de tratament cu DARZALEXTM (daratumumab) în comparație cu valorile inițiale, și a revenit aproape de valorile inițiale după sfârșitul tratamentului (EOT). Pacienții recidivați, încă au demonstrat MDSC-uri CD38^{ridicat} reduse. Pătrate negre: nerespondenți; pătrate albe: pacienți cu cel puțin răspuns minimal la tratamentul cu DARZALEXTM (daratumumab). Liniile verticale au indicat valorile medii din fiecare grup. Pacienții 2, 4, 15, 16 și 17 au demonstrat o populație de MDSC-uri CD38^{ridicat} inițială mare. Studiu: GEN501 17 subgrup de pacienți.

Figura 13 arată că pacienții cu cele mai mari MDSC-uri CD38^{ridicat} (pacienții 2, 4, 15, 16 și 17) au avut cea mai mare supraviețuire fără progres (PFS). Acești pacienți fie au avut răspuns parțial (PR) sau fie au avut răspuns minimal (MR) la tratamentul cu DARZALEXTM (daratumumab). SD : boală stabilă; PD : boală progresivă. Axa X arată PFS pentru fiecare pacient numerotat individual.

Figura 14 arată că MDSC-urile sunt sensibile la ADCC indusă de DARZALEXTM (daratumumab). Celulele Daudi au fost utilizate ca control pozitiv pentru celulele țintă din teste. A fost măsurată lizarea celulară procentuală.

Figura 15A arată că Breg-urile CD38⁺ au fost depletate la pacienții tratați cu DARZALEXTM (daratumumab) în săptămâna 1, săptămâna 4 și săptămâna 8 de tratament. **Figura 15B** arată că Breg-urile CD38⁺ secretă IL-10 după stimulare.

Figura 16A arată răspunsul antiviral măsurat prin producția de IFN-γ a CMV, EBV și virusului gripal specific (CEF) în PBMC-urile de la pacienții tratați cu DARZALEXTM (daratumumab) cu VGPR inițial și la momentele de timp indicate în timpul tratamentului. OD: densitatea optică. Bară albă: control negativ; bară neagră: CEF adăugat; bară punctată: numai PBMC-uri alogeneice. Asterixul indică o modificare semnificativă statistic. Pre 4, 8, 10 = săptămâna 4, 8 sau 10 de tratament.

Figura 16B arată răspunsul antiviral măsurat prin producția de IFN-γ a CMV, EBV și virusului gripal specific (CEF) în PBMC-urile de la pacienții tratați cu DARZALEXTM (daratumumab) cu CR inițial și la momentele de timp indicate în timpul tratamentului. OD: densitatea optică. Bară albă: control negativ; bară neagră: CEF adăugat; bară punctată: numai PBMC-uri alogeneice. Asterixul indică o modificare semnificativă statistic. Pre 4, 8, 10 = săptămâna 4, 8 sau 10 de tratament.

Figura 16C arată răspunsul antiviral măsurat prin producția de IFN-γ a CMV, EBV și virusului gripal specific (CEF) în PBMC-urile de la pacienții tratați cu DARZALEXTM (daratumumab) cu PD inițial și la momentele de timp indicate în timpul tratamentului. OD: densitatea optică. Bară albă: control negativ; bară neagră: CEF adăugat; bară punctată: numai PBMC-uri alogeneice. Ns: nesemnificativ. Pre 4, 8 = săptămâna 4 sau 8 de tratament.

Figura 16D arată răspunsul antiviral măsurat prin producția de IFN-γ a CMV, EBV și virusului gripal specific (CEF) în PBMC-urile de la pacienții tratați cu DARZALEXTM (daratumumab) cu MR inițial și la momentele de timp indicate în timpul tratamentului. OD: densitatea optică. Bară albă: control negativ; bară neagră: CEF adăugat; bară punctată: numai PBMC-uri alogeneice. Ns: nesemnificativ. Pre 4, 8 = săptămâna 4 sau 8 de tratament.

Figura 16E arată procentajul (%) de celule T reactive la virus, care proliferază în PBMCurile de la pacienții tratați cu DARZALEXTM (daratumumab) cu VGPR inițial și la momentele de timp indicate în timpul tratamentului. Bară albă: control negativ; bară neagră: CEF adăugat. Asterixul indică o modificare semnificativă statistic. Pre 4, 8, 10 = săptămâna 4, 8 sau 10 de tratament.

Figura 16F arată procentajul (%) de celule T reactive la virus care proliferază în PBMCurile de la pacienții tratați cu DARZALEXTM (daratumumab) cu CR inițial și la momentele de timp indicate în timpul tratamentului. Bară albă: control negativ; bară neagră: CEF adăugat. Asterixul indică o modificare semnificativă statistic. Pre 4, 8, 10 = săptămâna 4, 8 sau 10 de tratament.

Figura 17A arată o histogramă de analize FACS prezentând nivelurile de expresie CD38 pe celulele ucigașe naturale (NK), monocite, celulele B și celulele T de la un donator sănătos.

Figura 17B arată o histogramă de analize FACS prezentând nivelurile de expresie CD38 pe celulele din plasmă, celulele ucigașe natural (NK), monocite, celulele B și celulele T de la un pacient cu mielom multiplu.

Figura 17C arată o comparație a intensității fluorescenței medii (MFI) a CD38 în CD38+ Treg-uri, Breg-uri, NK, celulele B și celulele T de la pacienți cu mielom multiplu recidivat și refractar. CD38 a fost exprimat la un nivel mai scăzut în celulele B și celulele T în comparație cu Treg-urile CD38+, Breg-urile și celulele NK.

Figura 18 arată că proteina PD-L1 este subreglată în mostrele PBMC de la respondenți (R) și suprareglată în timp în mostrele de la nerespondenți (NR). SD: boală stabilă. C1D1: ciclul 1 ziua 1; C3D 1, ciclul 3, ziua 1. Axa Y prezintă valorile concentrației de proteină log2.

DESCRIERE DETALIATĂ

Așa cum s-a utilizat în această descriere și revendicările anexate, formele la singular „o”, „un”, și formele articulate, includ referințe plurale, în afară de cazul când conținutul dictează clar altfel. Astfel, de exemplu, referința la „o celulă” include o combinație de două sau mai multe celule, și altele asemenea.

„CD38” se referă la proteina CD38 umană (sinonime: ADP-ribozil ciclază 1, cADPr hidrolază 1, ADP-riboză hidrolază ciclică 1). CD38 umană are o secvență de aminoacizi prezentată în numărul de acces GenBank NP_001766 și în SEQ ID NO: 1. Este bine cunoscut că CD38 este o proteină membranară de tip II cu o singură trecere cu rezidurile de aminoacid 1-21 reprezentând domeniul citosolic, reziduurile de aminoacid 22-42 reprezentând domeniul transmembranar, și reziduurile 43-300 reprezentând domeniul extracelular al CD38. SEQ ID NO: 1

```
MANCEFSVPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSVLVLVVLAVVVPRWRQQWSGPGT
TKRFPETVLARCVKYTEIHPMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLM
KLGITQTPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQORDMFTLEDTLGLYADDLTWCGEFN
TSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVFKETYSRRFAEAACDVVHYMNGSRSEKIFDK
NSTFGSVEVHNLQPEKVQTEAWVIHGGREDSDLCQDPTIKLESIKERNIQFSC
KNIYRPDKFLQCVENPEDSSCTSEI
```

„Anticorpii” așa cum s-au utilizat în acest document sunt înțeleși într-un sens larg și includ molecule de imunoglobulină care includ anticorpi monoclonali incluzând anticorpi monoclonali murini, umani, umanizați și himerici, fragmente de anticorp, anticorpi bispecfici sau multispecfici, anticorpi dimerici, tetramerici sau multimerici, anticorpi monocatenari, anticorpi de domeniu și orice alte configurații modificate ale moleculei de imunoglobulină care cuprind un situs de legare la antigen de specificitate necesară.

Imunoglobulina poate fi asignată la cinci clase majore, și anume IgA, IgD, IgE, IgG și IgM, depinzând de secvența de aminoacizi a domeniului constant al lanțului greu. IgA și IgG sunt subclasificate mai departe ca izotipuri IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4. Lanțurile ușoare de anticorpi ale oricăror specii vertebrate pot fi asignate unuia dintre cele două tipuri distincte clare, și anume kapa (κ) și lambda (λ), pe baza secvențelor de aminoacizi ale domeniilor lor constante. „Fragmentele de anticorp” se referă la o porțiune a unei molecule de imunoglobulină care reține situsul de legare la antigen al lanțului greu și/sau al lanțului ușor, cum ar fi regiunile determinante de complementaritate (HCDR) 1, 2 și 3 ale lanțului greu, regiunile determinante de complementaritate (LCDR) 1, 2 și 3 ale lanțului ușor, o regiune variabilă a lanțului greu (VH), sau o regiune variabilă a lanțului ușor (VL). Fragmentele de anticorp includ un fragment Fab, un fragment monovalent constând din domeniile VL, VH, CL și CH1; un fragment F(ab)₂, un fragment bivalent cuprinzând două fragmente Fab legate printr-o punte disulfură la regiunea balama; un fragment Fd constând din domeniile VH și CH1; un fragment Fv constând din domeniile VL și VH ale unui singur braț al unui anticorp; un fragment de anticorp de domeniu (dAb) (Ward și colab., Nature 341: 544-6, 1989), care constă dintr-un domeniu VH. Domeniile VH și VL pot fi modificate genetic și legate împreună printr-un liant sintetic pentru a forma diferite tipuri de concepte de anticorp monocatenar în care domeniile VH/VL se împerechează intramolecular, sau intermolecular în acele cazuri când domeniile VH și VL sunt exprimate prin construcții separate de anticorpi monocatenari, pentru a forma un situs monovalent de legare la antigen, cum ar fi Fv monocatenar (scFv) sau diacorpul; descris de exemplu în publicațiile ce brevete internaționale nr. WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804, și WO1992/01047. Aceste fragmente de anticorp sunt obținute utilizând tehnici bine cunoscute, familiare celor calificați în domeniu, și fragmentele sunt selectate pentru utilitate în aceeași manieră ca și anticorpii de lungime completă.

„Anticorpul izolat” se referă la un anticorp sau fragment de anticorp care este substanțial fără alți anticorpi având diferite specificități antigenice (de exemplu, un anticorp izolat care se leagă specific la CD38 este substanțial fără anticorpi care se leagă specific la alți antigeni în afară de CD38 uman). Un

anticorp izolat care se leagă specific la CD38 totuși, poate avea reactivitate încrucișată cu alți antigeni, cum ar fi ortologi ai CD38 uman, cum ar fi CD38 de *Macaca fascicularis* (cynomolgus). În cazul unui anticorp bispecific, anticorpul bispecific se leagă specific la doi antigeni de interes, și este substanțial fără anticorpi care se leagă specific la alți antigeni în afara celor doi antigeni de interes. Mai mult, un anticorp izolat poate fi substanțial fără alt material celular și/sau substanțe chimice. „Anticorpul izolat” cuprinde anticorpi care sunt izolați la o puritate mai ridicată, cum ar fi anticorpii care sunt 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% puri.

„Legarea specifică” sau „se leagă specific” sau „se leagă” se referă la o legare a anticorpului la un antigen sau la un epitop din antigen cu afinitate mai mare decât pentru alți antigeni. De obicei, anticorpul se leagă la antigenul sau epitopul din antigen cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de aproximativ 1×10^{-8} M sau mai mică, de exemplu de aproximativ 1×10^{-9} M sau mai mică, de aproximativ 1×10^{-10} M sau mai mică, de aproximativ 1×10^{-11} M sau mai mică, sau de aproximativ 1×10^{-12} M sau mai mică, de obicei cu o K_D care este de cel puțin o sută de ori mai mică decât K_D a sa pentru legare la un antigen nespecific (de exemplu, BSA, caseina). Constanta de disociere poate fi măsurată utilizând proceduri standard. Anticorpii care se leagă specific la antigen sau la epitopul din antigen pot totuși, avea reactivitate încrucișată cu alți antigeni înrudiți, de exemplu cu același antigen de la alte specii (omologi), cum ar fi umani sau de maimuță, de exemplu *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno), *Pan troglodytes* (cimpanzeu, chimp) sau *Callithrix jacchus* (marmoset obișnuit, marmoset). În timp ce un anticorp monospecific se leagă specific la un antigen sau la un epitop, un anticorp bispecific se leagă specific la doi antigeni distincți sau la doi epitopi distincți.

O regiune variabilă a unui anticorp constă dintr-o regiune „cadru” întreruptă de trei „situri de legare la antigen”. Siturile de legare la antigen sunt definite utilizând diferiți termeni: regiunile determinate de complementaritate (regiuni CDR), trei în VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) și trei în VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) sunt pe baza variabilității secvenței (Wu și Kabat (1970) J Exp Med 132:211-50; Kabat și colab Sequences of Proteins of Immunological Interest, ed. a 5-a Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); „regiunile hipervariabile”,

„HVR”, sau „HV”, trei în VH (H1, H2, H3) și trei în VL (L1, L2, L3) se referă la regiunile domeniilor variabile ale anticorpului care sunt hipervariabile în structură cum s-a definit de către Chotia și Lesk (Chotia și Lesk (1987) Mol Biol 196:901-17). Alți termeni includ „regiunile CDR IMGT”

(Lefranc și colab., (2003) Dev Comparat Immunol 27:55-77) și „Specificity Determining Residue Usage” (SDRU) (Almagro (2004) Mol Recognit 17:132-43). Baza de date International ImunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) furnizează o numerotare standardizată și definiție a situsurilor de legare la antigen. Corespondența între regiunile CDR, HV și delimitările IMGT este descrisă în Lefranc și colab., (2003) Dev Comparat -Immunol 27:55-77.

„Reziduurile Chotia” așa cum s-au utilizat în acest document sunt reziduurile VL și VH ale anticorpului numerotate în conformitate cu Al-Lazikani (Al-Lazikani și colab., (1997) J Mol Biol 273:927-48).

„Cadrul” sau „secvențele cadru” sunt secvențele rămase ale unui regiuni variabile, altele decât cele definite ca fiind situri de legare la antigen. Deoarece siturile de legare la antigen pot fi definite prin diferiți termeni cum s-a descris mai sus, secvența exactă de aminoacizi a unui cadru depinde de cum a fost definit situsul de legare la antigen.

„Anticorpul umanizat” se referă la un anticorp în care siturile de legare la antigen sunt derivate din specii neumane și cadrele regiunii variabile sunt derivate din secvențe de imunoglobulină umană. Anticorpii umanizați pot include substituții în regiunile cadru astfel încât cadrul poate să nu fie o copie exactă a imunoglobulinei umane exprimate sau a secvențelor genei liniei germinative.

„Anticorpul uman” se referă la un anticorp având regiuni variabile ale lanțului greu și ușor în care atât cadrul cât și siturile de legare la antigen sunt derivate din secvențe de origine umană. Dacă anticorpul conține o regiune constantă, regiunea constantă este de asemenea derivată din secvențe de origine umană.

Un anticorp uman cuprinde regiuni variabile ale lanțului greu sau ușor care sunt „derivate din” secvențe de origine umană în care regiunile variabile ale anticorpului sunt obținute de la un sistem care utilizează imunoglobulina liniei germinative umane sau gene de imunoglobulină rearanjate. Astfel de sisteme includ biblioteci de gene de imunoglobulină umană afișate pe bacteriofagi, și animale neumane transgenice cum ar fi șoarecii care poartă loci de imunoglobulină umană. Un „anticorp uman” poate conține diferențe de aminoacizi la comparația cu imunoglobulina liniei germinative umane sau cu genele de imunoglobulină rearanjate, din cauza de exemplu, mutațiilor somatice care apar natural sau a introducerii intenționate de substituții în cadrul sau situsul de legare la antigen, sau în ambele. De obicei, „anticorpul uman” este cel puțin aproximativ 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identic în secvența de aminoacizi cu o secvență de aminoacizi codificată de imunoglobulina liniei germinative umane sau de genele de imunoglobulină rearanjate. În unele cazuri, „anticorpus uman” poate conține secvențe cadru consens derivate din analizele secvenței cadru umane, de exemplu cum s-a descris în Knappik și colab., (2000) J Mol Biol 296:57-86, sau din HCDR3 sintetică încorporată în bibliotecile de gene de imunoglobulină umană afișate pe bacteriofagi, de exemplu cum s-a descris în Shi și colab., (2010) J Mol Biol 397:385-96, și publicația de brevet internațional nr. WO2009/085462.

Anticorpii umani derivați din secvențele de imunoglobulină umană pot fi generați utilizând sisteme cum ar fi afișarea pe bacteriofagi care încorporează regiuni CDR sintetice și/sau cadre sintetice, sau pot fi supuși la mutagenză *in vitro* pentru a îmbunătăți proprietățile anticorpului, conducând la anticorpi care nu există natural în repertoriul liniei germinative a anticorpului uman *in vivo*.

Anticorpii la care situsurile de legare la antigen sunt derivate dintr-o specie neumană, nu sunt incluși în definiția anticorpului uman.

„Anticorpus recombinant” include toți anticorpii care sunt preparați, exprimați, creați sau izolați prin mijloace recombinante, cum ar fi anticorpii izolați dintr-un animal, de exemplu un șoarece sau un șobolan care este transgenic sau transcromozomial pentru genele de imunoglobulină umană sau un hibridom preparat din acesta (descrie mai departe mai jos), anticorpii izolați dintr-o celulă gazdă transformată pentru a exprima anticorpus, anticorpi izolați dintr-o bibliotecă de anticorpi recombinanți, combinatoriali, și anticorpi preparați, exprimați, creați sau izolați prin orice alt mijloc care implică îmbinarea secvențelor de gene de imunoglobulină umană cu alte secvențe ADN, sau anticorpi care sunt generați *in vitro* utilizând modificarea brațului Fab, cum ar fi anticorpii bispecfici.

„Anticorpus monoclonal” se referă la o preparare a moleculelor de anticorpus ale unei singure compoziții moleculare. O compoziție a unui anticorpus monoclonal afișează o singură specificitate de legare și afinitate pentru un anumit epitop, sau în cazul unui anticorpus monoclonal bispecific, o specificitate de legare duală la doi epitopi distincți. „Anticorpus monoclonal” se referă prin urmare la o populație de anticorpi cu o singură compoziție de aminoacizi în fiecare lanț greu și fiecare lanț ușor, cu excepția posibilelor bine cunoscute modificări cum ar fi îndepărtarea lizinei Cterminale de lanțul greu al anticorpului. Anticorpii monoclonali pot avea glicozilare eterogenă în cadrul populației de anticorpi. Anticorpus monoclonal poate fi monospecific sau multispecific, sau monovalent, bivalent sau multivalent. Un anticorpus bispecific este inclus în termenul anticorpus monoclonal.

„Epitop” înseamnă o porțiune a unui antigen la care se leagă specific un anticorpus. Epitopii constau uzual din grupări de suprafață active chimic (cum ar fi polare, nepolare sau hidrofobe) de radicali cum ar fi catenele laterale de aminoacizi sau polizaharide și pot avea caracteristici structurale tridimensionale specifice, precum și caracteristici de încărcare specifice. Un epitop poate fi compus din aminoacizi contigui și/sau necontigui care formează o unitate spațială conformațională. Pentru un epitop necontiguu, aminoacizii din diferite porțiuni ale secvenței liniare a antigenului vin în imediata apropiere în spațiul 3-dimensional prin plierea moleculei de proteină.

„Varianta” se referă la o polipeptidă sau o polinucleotidă care diferă de o polipeptidă de referință sau de o polinucleotidă de referință prin una sau mai multe modificări de exemplu, substituții, inserții sau deleții.

„În combinație cu”, înseamnă că doi sau mai mulți agenți terapeutici sunt administrați unui subiect împreună într-un amestec, concomitent ca agenți singuri, sau secvențial ca agenți singuri în orice ordine. În general, fiecare agent va fi administrat la o doză și/sau la un program în timp, determinate pentru acel agent.

„Tratează” sau „tratament” se referă la tratamentul terapeutic în care obiectivul este de a încetini (micșora) o modificare fiziologică nedorită sau boală, cum ar fi dezvoltarea sau împrăștierea unei tumori sau celule tumorale, sau pentru a furniza un rezultat clinic benefic sau dorit în timpul tratamentului. Rezultatele clinice benefice sau dorite includ ameliorarea simptomelor, diminuarea gradului bolii, stabilizarea (adică, neagravarea) stării bolii, întârzierea sau încetinirea progresului bolii, lipsa metastazei, ameliorarea sau alinarea stării de boală, și remisia (indiferent dacă este parțială sau totală), indiferent dacă este detectabilă sau nedetectabilă. „Tratamentul” poate însemna de asemenea prelungirea supraviețuirii în comparație cu supraviețuirea așteptată dacă un subiect nu a primit tratament. Cei care au nevoie de tratament includ acei subiecți care au deja o modificare fiziologică nedorită sau boală precum și acei subiecți predispuși să aibă o modificare fiziologică sau boală.

„Cantitatea eficientă terapeutică” se referă la o cantitate eficientă, la doze și pe perioade de timp necesare, pentru a obține un rezultat terapeutic dorit. O cantitate eficientă terapeutică poate varia în conformitate cu factori cum ar fi starea de boală, vârsta, sexul, și greutatea individului, și capacitatea unui agent terapeutic sau a unei combinații de agenți terapeutici de a declanșa un răspuns dorit la individ. Exemplele de indicatori ai unui agent terapeutic sau a unei combinații de agenți terapeutici eficienți

inclus, de exemplu, îmbunătățirea stării de bine a pacientului, reducerea încărcării tumorale, oprirea sau încetinirea creșterii unei tumori, și/sau absența metastazei celulelor canceroase la alte locații din corp.

„Inhibarea creșterii” (de exemplu cu referire la celulele tumorale) se referă la o scădere măsurabilă sau întârziere în creșterea celulei tumorale sau a țesutului tumoral *in vitro* sau *in vivo* când sunt puse în contact cu un agent terapeutic sau cu o combinație de agenți terapeutici sau medicamente, în comparație cu scăderea sau întârzierea creșterii aceleiași celule tumorale sau țesut tumoral în absența agentului terapeutic sau a combinației de medicamente terapeutice. Inhibarea creșterii unei celule tumorale sau țesut tumoral *in vitro* sau *in vivo* poate fi cel puțin de aproximativ 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, sau 100%.

„Celulele T reglatoare” sau „Treg-urile” sau „Treg” se referă la limfocitele T care reglează activitatea altor celule T și/sau a altor celule imune, uzual prin suprimarea activității lor. Treg-urile pot fi celule T CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}. Se apreciază că Treg-urile ar putea să nu fie complet restricționate la acest fenotip, și pot exprima Foxp3.

„Celulele T efectoare” sau „Tef-urile” sau „Tef” se referă la limfocitele T care efectuează o funcție a unui răspuns imun, cum ar fi uciderea celulelor tumorale și/sau activarea unui răspuns imun antitumoral care poate conduce la eliminarea celulelor tumorale din corp. Tef-urile pot fi CD3⁺ cu CD4⁺ sau CD8⁺. Tef-urile pot secreta, conține sau exprima markeri cum ar fi IFN-γ, granzima B și ICOS. Se apreciază că Tef-urile ar putea să nu fie complet restricționate la aceste fenotipuri.

„Funcția Treg-urilor” sau „funcția Treg” se referă la o funcție supresivă a Treg-urilor care este legată de reglarea răspunsurilor imune ale gazdei și/sau de prevenirea autoimunității. Funcția Treg-urilor poate fi supresia unui răspuns antitumoral provocat de celulele T CD8⁺, celulele ucigăse natural (NK), celulele MØ, celulele B, sau celulele dendritice (DC-uri), sau supresia proliferării celulelor T efectoare.

„Inhibarea funcției Treg-urilor” sau „inhibarea funcției Treg” se referă la scăderea nivelului de funcționare a Treg-urilor *in vitro* sau *in vivo* la un animal sau subiect uman, care poate fi determinată prin tehnicile convenționale cunoscute în domeniu. Nivelul funcției Treg-urilor poate fi scăzut cu, de exemplu, cel puțin aproximativ 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

80%, 90%, 95%, 99% sau 100%. „Inhibarea funcției Treg-urilor” include reducerea numărului de Treg-uri, de exemplu prin uciderea Treg-urilor prin funcțiile efectoare ale anticorpului, cum ar fi citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC).

„Celulele supresoare derivate din mieloide” sau „MDSC-uri” sau „MDSC” se referă la o populație specializată de celule care sunt de descendență hematopoietică și exprimă markerul macrofag/monocitar CD11b și markerul granulocitar Gr-1/Ly-6G. Fenotipul MDSC-urilor poate fi de exemplu CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺. MDSC-urile exprimă scăzut sau nedetectabil expresia markerilor celulari MHC de clasă II și F480 care prezintă antigenul matur. MDSC-urile sunt celule imature de origine mieloidă și se pot diferenția suplimentar în câteva tipuri de celule, incluzând macrofage, neutrofile, celule dendritice, monocite sau granulocite. MDSC-urile pot fi găsite natural în măduva osoasă adultă normală a omului și animalelor sau în situsuri de hematopoieză normală, cum ar fi splina.

„Inhibarea funcției MDSC-urilor” sau „inhibarea funcției MDSC” se referă la scăderea nivelului funcției MDSC-urilor *in vitro* sau *in vivo* la un animal sau subiect uman, care poate fi determinată prin tehnicile convenționale cunoscute în domeniu. Nivelul funcției MDSC poate fi scăzut cu, de exemplu, cel puțin aproximativ 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% sau 100%.

„Inhibarea funcției MDSC” include reducerea numărului de MDSC-uri, de exemplu prin uciderea MDSC-urilor prin funcțiile efectoare ale anticorpului, cum ar fi ADCC. MDSC-urile pot suprima răspunsurile celulelor T cum ar fi proliferarea, expansiunea clonală sau producție de citokine, prin diferite mecanisme cum ar fi producția de specii reactive de oxigen, peroxinitriți, metabolismul crescut al arginazei din cauza nivelurilor ridicate de arginază, și sintazei crescute de prooxid de azot. MDSC-urile pot răspunde la IFN-γ și la câteva citokine cum ar fi IL-4 și IL-13. IFN-γ poate activa MDSC-urile care induc activitatea de sintază a oxidului nitric 2 (NOS2). Alternativ, citokinele Th2, cum ar fi interleukina-4 (IL-4) și IL-13, pot activa MDSC-urile care pot conduce la inducerea activității arginazei-1 (ARG1). Metabolismul L-argininei, fie prin NOS2 sau fie prin ARG1, poate conduce la inhibarea proliferării celulelor T, și activitatea ambelor enzime împreună poate conduce la apoptoza celulelor T prin producția de specii reactive de oxid de azot.

„Boala legată de Treg” se referă la o boală sau tulburare legată de celulele reglatoare T (Treg-uri). Boala legată de Treg poate fi cauzată de funcția Treg, de exemplu, supresia unui răspuns antitumoral sau supresia proliferării celulelor T efectoare. Boala mediată de Treg de poate fi cancerul. „Boala legată de Treg” și „boala mediată de Treg” sunt utilizate interschimbabil aici.

„Îmbunătățirea răspunsului celulelor T efectoare” sau „îmbunătățirea răspunsului celulelor T” se referă la îmbunătățirea stimulării celulelor T efectoare *in vitro* sau *in vivo* la un animal sau subiect uman

pentru a avea o funcție biologică susținută sau amplificată, sau să reînnoiască sau să reactiveze celulele T extenuate sau inactive. Exemple de răspunsuri ale celulelor T sunt proliferarea, secreția de γ -interferon din celulele T CD 8⁺, responsivitatea la antigen, sau expansiunea clonală. Maniera de măsurare a acestei îmbunătățiri este cunoscută cuiva având calificare obișnuită în domeniu.

5 „Boala legată de MDSC” se referă la o boală sau tulburare legată de celulele supresoare derivate din mieloide (MDSC-uri). Boala legată de MDSC poate fi cauzată de o funcție a MDSC, de exemplu, supresia unui răspuns antitumoral sau proliferarea celulelor T efectoare. Boala mediată de MDSC de poate fi cancerul. „Boala legată de MDSC” și „boala mediată de MDSC” sunt utilizate interschimbabil aici.

10 „Celulele B reglatoare” sau „Breg” sau „Breg-uri” se referă la limfocitele B care suprimă răspunsurile imune. Breg-urile pot fi celule CD19⁺CD24⁺CD38⁺, și pot suprima răspunsurile imune prin inhibarea proliferării celulelor T mediată de IL-10 secretată de către Breg-uri. Se apreciază că există și alte subseturi de Breg-uri, și sunt descrise de exemplu în Ding și colab., (2015) Human Immunology 76: 615-621.

15 „Boala legată de Breg” se referă la o boală sau tulburare legată de celulele B reglatoare. Boala legată de Breg poate fi cauzată de, de exemplu supresia mediată de Breg a unui răspuns antitumoral sau a proliferării celulelor T efectoare. Boala mediată de Breg de poate fi cancerul. „Boala legată de Breg” și „boala mediată de Breg” sunt utilizate interschimbabil aici.

20 „Pacientul” include orice om sau animal neuman. „Animalul neuman” include toate vertebratele, de exemplu, mamifere și nemamifere, cum ar fi primat neumane, oi, câini, pisici, cai, vaci, pui de găină, amfibieni, reptile, etc. „Pacient” și „subiect” sunt utilizați interschimbabil aici.

Invenția furnizează un anticorp care se leagă specific la CD38 pentru utilizare în tratarea unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5, în care anticorpul este de izotip IgG1.

25 Invenția se referă la utilizarea medicală a respectivului anticorp într-o metodă pentru tratarea unui pacient care are o tumoare solidă, cu un anticorp care se leagă specific la CD38 indiferent dacă celulele tumorale exprimă CD38 sau nu. Divulgarea se referă de asemenea la metode pentru tratarea unui pacient care are o boală mediată de celulele T reglatoare (Treg), celulele supresoare derivate din mieloide (MDSC) sau celulele B reglatoare (Breg). Divulgarea se referă de asemenea la metode pentru modularea activității Treg-urilor, MDSC-urilor sau Bregurilor pentru a trata tumorile solide care sunt

30 CD38 pozitive și/sau asociate cu niveluri ridicate ale acestor celule supresoare imune. Invenția se bazează, cel puțin parțial, pe descoperirea că anticorpul anti-CD38 DARZALEX[™] (daratumumab) are o activitate imunomodulatoare la pacienți, reducând numărul de Treg-uri supresive imune, MDSC-uri și Breg-uri, crescând numărul de celule T CD8⁺ și raportul dintre CD8⁺ și Treg-uri, promovând formarea celulelor de memorie centrală CD8⁺ și creșterea clonalității celulelor T.

35 DARZALEX[™] (daratumumab) și alți anticorpi anti-CD38 sunt evaluați în clinică pentru eficacitatea lor în tratarea malignităților heme și a tulburărilor celulelor plasmatice, incluzând mielomul multiplu, prin capacitatea anticorpului de a elimina celulele CD38-pozitive de către funcțiile efectoare ale anticorpului, cum ar fi ADCC, CDC, ACDP și apoptoza, dar activitatea lor imunomodulatoare în promovarea răspunsurilor imune adaptive nu a fost recunoscută. Alți anticorpi imunomodulatori (anti-PD1, anti-CTLA4) funcționează prin ținerea componentelor sistemului imunitar care suprimă răspunsurile antitumorale. De exemplu, s-a demonstrat că anticorpii anti-PD1 cresc proliferarea celulelor T, stimulează răspunsurile de memorie specifice antigenului, și atenuează parțial supresia mediată de Treg-uri a celulelor T efectoare *in vitro* (de exemplu, vezi brevetul S.U.A. nr. 8.779.105). Doi anticorpi

45 anti-PD-1 sunt în prezent aprobați pentru tratamentul melanomului, OPDIVO[®] (nivolumab) și KEYTRUDA[®] (pembrolizumab) și acești anticorpi sunt în dezvoltare clinică pentru diferite tumori solide, cum ar fi carcinomul pulmonar nonmicrocelular, cancerul de prostată, de cap și gât, gastrointestinal, la stomac, la prostată, al trompelor uterine, ovarian, pancreatic, la sân și la creier, renal, la vezică, uretral, esofageal și colorectal. Anticorpul anti-CTLA-4 YERVOY[®] (ipilimumab) a fost aprobat pentru

50 tratamentul melanomului. YERVOY[®] (ipilimumab) și un alt anticorp anti-CTLA-4, tremelimumab, sunt de asemenea dezvoltate pentru cancerul la prostată, pulmonar nonmicrocelular, ovarian, gastrointestinal, la stomac, colorectal, renal, esofageal, și genitourinar.

Fără a dori să fie legați de nici o teorie particulară, pe baza efectelor imunomodulatoare observate cu DARZALEX[™] (daratumumab) descrise aici, DARZALEX[™] (daratumumab) și alți anticorpi

55 anti-CD38 pot fi eficienți în tratamentul tumorilor solide. Din cauza activării generale a răspunsului imun observată la pacienții tratați cu DARZALEX[™] (daratumumab), pacienții care au tumori solide CD38-negative pot răspunde de asemenea la terapiile cu anticorpi anti-CD38.

Invenția furnizează un anticorp care se leagă specific la CD38, pentru utilizare în tratarea unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5, în care

anticorpu este de izotip IgG1. Invenția se referă la utilizarea medicală a respectivului anticorp, într-o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38 pe o perioadă suficientă de timp pentru a trata tumoarea solidă.

5 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o boală mediată de celulele T reglatoare (Treg), cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38 pe o perioadă suficientă de timp pentru a trata boala mediată de Treg.

10 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient care are o boală mediată de celulele supresoare derivate din mieloid (MDSC), cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38 pe o perioadă suficientă de timp pentru a trata boala mediată de MDSC.

15 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient care are o boală mediată de celulele B reglatoare (Breg), cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38 pe o durată suficientă de timp pentru a trata boala mediată de Breg.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de suprimare a activității celulelor T reglatoare (Treg), cuprinzând punerea în contact a celulelor T reglatoare cu un anticorp care se leagă specific la CD38.

20 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de suprimare a activității celulelor supresoare derivate din mieloid (MDSC), cuprinzând punerea în contact a MDSC-urilor cu un anticorp care se leagă specific la CD38.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de suprimare a activității celulelor B reglatoare (Breg), cuprinzând punerea în contact a Breg-urilor cu un anticorp care se leagă specific la CD38.

25 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient care are o tumoare solidă, cuprinzând reducerea numărului de celule T reglatoare (Treg) la pacient prin administrarea la pacient a unui anticorp care se leagă specific la CD38.

30 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient care are o tumoare solidă, cuprinzând reducerea numărului de celule supresoare derivate din mieloid (MDSC) la pacient prin administrarea la pacient a unui anticorp care se leagă specific la CD38.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient care are o tumoare solidă, cuprinzând reducerea numărului de celule B reglatoare (Breg) la pacient prin administrarea la pacient a unui anticorp care se leagă specific la CD38.

35 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de amplificare a unui răspuns imun la un pacient, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de acesta, a unui anticorp care se leagă specific la CD38 pe o durată suficientă de timp pentru a îmbunătăți răspunsul imun.

În unele cazuri, pacientul are o infecție virală.

40 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a infecției virale la un pacient, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de acesta, a unui anticorp care se leagă specific la CD38 pe o durată suficientă de timp pentru a trata infecția virală.

În unele realizări, răspunsul imun este un răspuns al celulelor T efectoare (Tef).

În unele realizări, răspunsul Tef este mediat de celulele T CD4⁺ sau de celulele T CD8⁺.

În unele realizări, răspunsul Tef este mediat de celulele T CD4⁺.

În unele realizări, răspunsul Tef este mediat de celulele T CD8⁺.

45 În unele realizări, răspunsul Tef este o creștere a numărului de celule T CD8⁺, o creștere a proliferării celulelor T CD8⁺, o creștere a expansiunii clonale a celulelor T, o creștere a formării celulelor de memorie CD8⁺, o creștere a producției de anticorpi dependentă de antigen, sau o creștere a producției de citokine, chemokine sau interleukine.

50 Proliferarea celulelor T poate fi evaluată de exemplu prin măsurarea ratei de sinteză ADN utilizând timidină tritiată sau prin măsurarea producției de interferon- γ (IFN- γ) *in vitro*, sau prin măsurarea numărului absolut sau a procentajului celulelor T dintr-o populație de celule din mostrele pacientului utilizând metode cunoscute.

Expansiunea clonală poate fi evaluată de exemplu, prin secvențiere TCR dintr-un grup de celule T utilizând metode cunoscute.

55 Formarea celulelor de memorie poate fi evaluată prin măsurarea raportului dintre celulele T naive (CD45RO⁻/CD62L⁺) și celulele T de memorie (CD45RO⁺/CD62L^{ridicat}) utilizând de exemplu FACS.

Producția de citokine, chemokine sau interleukine, cum ar fi producția de interferon- γ (IFN γ), factor de necroză tumorală-alfa (TNF- α), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL16, IL-

18 și IL-23, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CCL4 poate fi evaluată utilizând metode standard cum ar fi ELISA sau testul ELLISPOT.

Producția de anticorpi specifici antigenului poate fi evaluată din mostre derivate de la pacient utilizând metode standard, cum ar fi ELISA sau radioimunotestul (RIA).

5 Semnificația termenilor „crește” sau „creșterea” diferitelor răspunsuri Tef este cu ușurință înțeleasă. Creșterea poate fi o creștere de cel puțin aproximativ 5%, de cel puțin aproximativ 10%,

25%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400% sau mai mult într-o mostră de test sau la un subiect în comparație cu controlul, de exemplu, la un pacient tratat cu anticorp anti-CD38 în comparație cu același pacient înainte de tratament, sau la un pacient sau grup de pacienți care sunt responsivi la tratamentul cu anticorpi anti-CD38 în comparație cu un pacient sau un grup de pacienți care sunt neresponsivi la același tratament. De obicei, creșterea este semnificativă statistic.

15 În mod similar, semnificația termenilor „reduce” sau „reducerea” sau „scăderea” sau „scade” numărul de Treg-uri, MDSC-uri și/sau Breg-uri este cu ușurință înțeleasă. Scăderea poate fi cel de puțin aproximativ 10%, 25%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250%, 300%,

350%, 400% sau mai mult într-o mostră de test sau la un subiect, în comparație cu controlul, de exemplu, la un pacient tratat cu un anticorp anti-CD38 în comparație cu același pacient înainte de tratament, sau la un pacient sau grup de pacienți care sunt responsivi la tratamentul cu anticorpi anti-CD38 în comparație cu un pacient sau un grup de pacienți care sunt neresponsivi la același tratament. De obicei, scăderea este semnificativă statistic.

25 În unele realizări, anticorpul care se leagă specific la CD38, inhibă funcționarea celulelor supresoare imune.

În unele realizări, celulele supresoare imune sunt celule T reglatoare (Treg-uri), celule supresoare derivate din mieloide (MDSC-uri) sau celule B reglatoare (Breg-uri).

30 În unele realizări, Treg-urile sunt celule T CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}.

În unele realizări, celulele CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} exprimă Foxp3.

În unele realizări, celulele T CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} exprimă CD38.

Funcția Treg-urilor, cum ar fi capacitatea lor de a suprima celulele Tef, poate fi evaluată utilizând metode cunoscute, cum ar fi evaluarea capacității Treg-urilor de a suprima proliferarea Tef în reacția limfocitară mixtă (MLR).

Funcția Treg-urilor poate fi inhibată prin de exemplu reducerea numărului relativ de Treguri în comparație cu Tef-urile (de exemplu creșterea raportului de celule CD8⁺/Treg) prin uciderea directă a Treg-urilor sau a unei subpopulații de Treg-uri, cum ar fi Treg-urile CD38⁺. În unele realizări, funcția Treg-urilor este inhibată prin uciderea celulelor Treg.

40 În unele realizări, uciderea Treg-urilor este mediată de citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp, indusă de anticorp (ADCC), fagocitoza celulară dependentă de anticorp (ADCP), citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) sau apoptoza indusă de un anticorp care se leagă specific la CD38.

În unele realizări, uciderea Treg este mediată de ADCC.

În unele realizări, Treg-urile CD38⁺ sunt ucise.

45 În unele realizări, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% sau 60% din Treg-uri sunt ucise.

Deoarece CD38 este exprimat numai într-o porțiune a Treg-urilor și MDSC-urilor, este de așteptat ca tratamentul pacienților cu tumori solide să nu conducă la depleția sistemică a Tregurilor și MDSC-urilor, furnizând probabil prin urmare un profil de siguranță îmbunătățit. În unele realizări, MDSC-urile sunt celule CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺.

În unele realizări, MDSC-urile CD11b⁺HLA-DR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺ exprimă CD38.

Funcția MDSC poate fi inhibată de exemplu prin reducerea numărului de MDSC-uri prin uciderea directă a celulelor.

55 În unele realizări, funcția MDSC este inhibată prin uciderea MDSC CD38⁺.

În unele realizări, uciderea MDSC este mediată de citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp, indusă de anticorp (ADCC), fagocitoza celulară dependentă de anticorp (ADCP), citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) sau apoptoza indusă de anticorpul care se leagă specific la CD38.

În unele realizări, uciderea MDSC este mediată de ADCC.

În unele realizări, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% sau 60% dintre MDSC-uri sunt ucise. În unele realizări, Breg-urile sunt celule CD19⁺CD24⁺CD38⁺.

Funcția Breg poate fi inhibată de exemplu prin reducerea numărului de Breg-uri prin uciderea directă a Breg-urilor.

În unele realizări, funcția Breg este inhibată prin uciderea Breg-urilor CD38⁺.

În unele realizări, uciderea Breg este mediată de citotoxicitatea celulară indusă de anticorp, indusă de anticorp (ADCC), fagocitoza celulară dependentă de anticorp (ADCP), citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) sau apoptoza indusă de anticorpii care se leagă specific la CD38.

În unele realizări, uciderea Breg este mediată de ADCC.

În unele realizări, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% sau 60% dintre Breg-uri sunt ucise.

Treg-urile joacă un rol critic în întreținerea autotoleranței periferice. Treg-urile CD4⁺CD25^{ridicat} care apar natural, sunt produse în timus și exprimă Foxp3, un factor transcripțional necesar pentru stabilirea și întreținerea identității și funcției supresoare a descendenților Treg-urilor. Treg-urile se pot acumula la situsul unei boli (de exemplu într-o tumoră), unde ele suprimă funcția efectoră a celulelor T specifică antigenului tumoral, conducând la răspunsuri antitumorale insuficiente. Densitățile crescute al Treg-urilor Foxp3⁺ care se infiltrează în tumoare, au fost asociate cu prognoza slabă în diferite tumori solide, incluzând carcinomul pancreatic, ovarian, și hepatocelular. Depleția Treg-urilor conduce la îmbunătățirea imunității antitumorale și respingerea tumorii în modelele murine, dar poate conduce de asemenea la dezvoltarea bolilor autoimune.

Celulele supresoare derivate din mieloide (MDSC) sunt o populație eterogenă de descendente mieloide timpurii, granulocite imature, macrofage, și celule dendritice la diferite stadii de diferențiere. Ele se acumulează în număr mare la pacienții cu cancer și ele au funcții imunosupresive potente, suprimând atât activitățile citotoxice ale celulelor ucigașe natural (NK) și celulelor T ucigașe natural (NKT), cât și răspunsul imun adaptiv mediat de celulele T CD8⁺. În timp ce mecanismul de inhibare al celulelor NK nu este în prezent bine înțeles, multiple căi sunt responsabile pentru supresia celulelor T mediată de MDSC-uri, incluzând producția de arginază 1/ARG1 și suprareglarea sintazei de oxid nitric 2 (NOS2). ARG1 și NOS2 metabolizează Larginina și fie împreună sau fie separat, blochează translația catetei CD3zeta a celulelor T, inhibă proliferarea celulelor T, și promovează apoptoza celulelor T. Suplimentar, MDSC-urile secretă citokine imunosupresive și induc dezvoltarea celulelor T reglatoare.

MDSC-urile sunt induse de citokine proinflamatorii și sunt găsite în număr crescut în afecțiunile patologice infecțioase și inflamatorii. Ele se acumulează în sânge, măduva osoasă, și organele limfoide secundare ale șoarecilor purtători de tumori și s-a sugerat că prezența lor în micromediul tumoral are un rol cauzativ în promovarea supresiei imune asociate tumorii.

MDSC-urile au fost descrise la pacienții cu carcinom de colon, melanom, carcinom hepatocelular, carcinom de cap și gât cu celule scuamoase, carcinom pulmonar nonmicrocelular, carcinom cu celule renale, adenocarcinom pancreatic și carcinom mamar (Mandruzzato și colab., (2009) J Immunol 182: 6562-6568; Liu și colab., (2009) J Cancer Res Clin Oncol 136: 35-45; Ko și colab., (2009) Clin Cancer Res 15: 2148-2157; Morse și colab., (2009) Expert Opin Biol Ther 9: 331-339; Diaz-Montero și colab., (2009) Cancer Immunol Immunother 58: 49-59; Corzo și colab., (2009) J Immunol 182: 5693-5701). La pacienții cu cancer, Diaz și colab (Diaz-Montero și colab., (2009) Cancer Immunol Immunother 58: 49-59) propune că acumularea de MDSC-uri se corelează cu boala mai avansată și prognoza slabă.

Breg-urile care se infiltrează în tumoare au fost identificate în tumori solide, și Breg-urile pot promova creșterea tumorii și metastaza prin diferite mecanisme cum ar fi suprimarea activității antitumorale a celulelor T CD8⁺ și a celulelor NK, cum s-a descris de exemplu în Ding și colab., (2015) Human Immunology 76:615-62.

„Citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp”, „citotoxicitatea mediată de celulele dependente de anticorp” sau „ADCC” este un mecanism pentru inducerea morții celulare care depinde de interacțiunea celulelor țintă acoperite cu anticorpi cu celulele efector care posedă activitate litică, cum ar fi celulele ucigașe natural, monocitele, macrofagele și neutrofilele prin receptori gama Fc (FcγR) exprimate pe celule efector. De exemplu, celulele NK exprimă FcγRIIIa, în timp ce monocitele exprimă FcγRI, FcγRII și FcγRIIIa. Moartea celulelor țintă acoperite cu anticorp, cum ar fi celulele care exprimă

CD38, are loc ca rezultat al activității celulelor efectoare prin secreția proteinelor și proteazelor care formează porii membranei. Pentru a evalua activitatea ADCC a unui anticorp care se leagă specific la CD38, anticorpul poate fi adăugat la celulele care exprimă CD38 în combinație cu celulele efectoare imune, care pot fi activate de către complexii anticorpului antigenului conducând la citoliza celulelor țintă. Citoliza este detectată în general prin eliberarea etichetei (de exemplu substraturi radioactive, coloranți fluorescenți sau proteine intracelulare naturale) din celulele lizate. Exemplele de celule efectoare pentru astfel de teste includ celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) și celulele NK. Exemplele de celule țintă includ Treg-uri sau MDSC-uri care exprimă CD38. Într-un test exemplificativ, celulele țintă sunt marcate cu 20 μ Ci de ^{51}Cr timp de 2 ore și spălate extensiv. Concentrația celulară a celulelor țintă poate fi ajustată până la 1×10^6 celule/ml, și se adaugă anticorpi anti-CD38 la diferite concentrații. Testele sunt începute prin adăugarea de celule țintă la un raport de celule efectoare: țintă de 40:1. După incubare timp de 3 ore la 37°C, testele sunt oprite prin centrifugare și eliberarea de ^{51}Cr din celulele lizate este măsurată într-un contor de scintilație. Procentajul citotoxicității celulare poate fi calculat ca % din lizarea maximă care poate fi indusă prin adăugarea a 3% acid percloric la celulele țintă.

„Fagocitoza celulară dependentă de anticorp” („ADCP”) se referă la un mecanism de eliminare a celulelor țintă acoperite cu anticorp, prin internalizare cu celule fagocitice, cum ar fi macrofagele sau celulele dendritice. ADCP poate fi evaluată utilizând Treg-uri sau MDSC-uri care exprimă CD38 ca celule țintă modificate genetic pentru a exprima GFP sau altă moleculă marcată. Efector: raportul celulelor țintă poate fi de exemplu de 4: 1. Celulele efectoare pot fi incubate cu celule țintă timp de 4 ore cu sau fără anticorp anti-CD38. După incubare, celulele pot fi detașate utilizând acutaza. Macrofagele pot fi identificate cu anticorpi anti-CD11b și anti-CD 14 cuplați la o etichetă fluorescentă, și procentajul de fagocitoză poate fi determinat pe baza % de GFP fluorescentă în macrofagele CD11⁺CD14⁺ utilizând metode standard.

„Citotoxicitatea dependentă de complement”, sau „CDC”, se referă la un mecanism pentru inducerea morții celulare în care un domeniu efector Fc al unui anticorp legat la țintă se leagă și activează componenta complementară C1q care în schimb activează cascada complementului conducând la moartea celulelor țintă. Activarea complementului poate conduce de asemenea la depunerea de componente complementare pe celula suprafața celulei țintă care facilitează ADCC prin legarea receptorilor complementului (de exemplu, CR3) pe leucocite.

Capacitatea anticorpilor monoclonali de a induce ADCC, poate fi îmbunătățită prin modificarea genetică a componentei lor oligozaharidă. IgG1 sau IgG3 umane sunt N-glicozilate la Asn297 cu majoritatea glicanilor în bine cunoscutele forme biantenare G0, G0F, G1, G1F, G2 sau G2F. Anticorpii produși din celule CHO nemodificate genetic, au de obicei un conținut de fucoză glican de cel puțin aproximativ 85%. Îndepărtarea miezului fucozei din oligozaharidele de tip complex biantenar atașate la regiunile Fc îmbunătățesc ADCC a anticorpilor prin legarea îmbunătățită a Fc γ RIIIa, fără modificarea legării la antigen sau a activității CDC. Astfel de mAburi pot fi obținute utilizând diferite metode raportate că, conduc la expresia cu succes a anticorpilor defucozilați relativ mari care poartă complexul biantenar de oligozaharide de tip Fc cum ar fi controlul osmolalității culturii (Konno și colab., (2012) Cytotechnology 64:249-65), aplicarea unei variante a liniei CHO Lec13 ca linie celulară gazdă (Shields și colab., (2002) J Biol Chem 277:26733-26740), aplicarea unei variante a liniei CHO EB66 ca linie celulară gazdă (Olivier și colab., (2010) MAb 2(4), Epub ahead of print; PMID:20562582), aplicarea unei linii celulare hibridom de șobolan YB2/0 ca linie celulară gazdă (Shinkawa și colab., (2003) J Biol Chem 278:3466-3473), introducerea unei mici interferări specifice ARN împotriva genei α 1,6fucosiltransferază (*FUT8*) (Mori și colab., (2004) Biotechnol Bioeng 88:901-908), sau coexprimarea de β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferază III și Golgi α -manosidază II sau un inhibitor potent de alfa-manosidază I, kifunenzină (Ferrara și colab., (2006) J Biol Chem 281:5032-5036; Ferrara și colab., (2006) Biotechnol Bioeng 93:851-861; Xhou și colab., (2008) Biotechnol Bioeng 99:652-65). ADCC-urile declanșate de către anticorpii anti-CD38 utilizați în invenție, și în unele realizări ale fiecăreia dintre realizările numerotate listate mai jos, pot fi de asemenea îmbunătățite prin anumite substituții în anticorpul Fc. Exemplele de substituții sunt de exemplu substituțiile la pozițiile de aminoacizi 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 sau 430 (numerotarea reziduurilor în conformitate cu indicele EU) cum s-a descris în brevetul S.U.A. nr. 6.737.056.

În unele realizări, anticorpul care se leagă specific la CD38 cuprinde o substituție în anticorpul Fc.

În unele realizări, anticorpul care se leagă specific la CD38 cuprinde o substituție în anticorpul Fc în pozițiile de aminoacizi 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 sau 430 (numerotarea reziduurilor în conformitate cu indicele EU).

În unele realizări, anticorpii care se leagă specific la CD38 are o structură de glican biantenar cu conținutul de fucoză de la aproximativ 0% până la aproximativ 15%, de exemplu de 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% sau 0%.

În unele realizări, anticorpii care se leagă specific la CD38 are o structură de glican biantenar cu conținutul de fucoză de aproximativ 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% sau 0%.

Substituțiile în Fc și conținutul redus de fucoză pot îmbunătăți activitatea ADCC a anticorpului care se leagă specific la CD38.

„Conținutul de fucoză” înseamnă cantitatea de monozaharidă fucoză din catena de zahăr la Asn297. Cantitatea relativă de fucoză este procentajul de structuri care conțin fucoză, legate de toate glicostructurile. Aceasta poate fi caracterizată și cuantificată prin mai multe metode, ca de exemplu: 1) prin utilizarea MALDI-TOF mostrei tratate cu N-glicosidază F (de exemplu structuri complexe, hibride și oligo și ridicate de manoză) cum s-a descris în publicația de brevet internațional nr. WO2008/077546; 2) prin eliberarea enzimatică a glicanilor Asn297 cu derivatizarea ulterioară și detecția/cuantificarea prin HPLC (UPLC) cu detecție cu fluorescență și/sau HPLC-MS (UPLC-MS); 3) prin analiza proteinei intacte a mAb-urilor native sau reduse, cu sau fără tratament cu glicani Asn297 cu Endo S sau cu altă enzimă care clivează între prima și cea de a doua monozaharidă GlcNAc, lăsând fucoza atașată la primul GlcNAc; 4) prin digestia mAb-ului la peptida constituantă prin digerare enzimatică (de exemplu, tripsină sau endopeptidază Lys-C), și separarea ulterioară, detecția și cuantificarea prin HPLC-MS (UPLC-MS) sau 5) prin separarea oligozaharidelor mAb de proteina mAb prin deglicozilare enzimatică specifică cu PNGaza F la Asn 297. Oligozaharida eliberată poate fi marcată cu un fluorofor, separată și identificată prin diferite tehnici complementare care permit: caracterizarea fină a structurilor glican prin spectrometrie de masă cu ionizare cu desorbție laser asistată de matrice (MALDI) prin compararea maselor experimentale cu masele teoretice, determinarea gradului de sialilare prin HPLC cu schimb de ioni (GlicoSep C), separarea și cuantificarea formelor de oligozaharide în conformitate cu criteriile de hidrofilitate prin HPLC cu fază normală (GlicoSep N), și separarea și cuantificarea oligozaharidelor prin fluorescență indusă cu laser prin electroforeză capilară de înaltă performanță (HPCE-LIF).

„Fucoză scăzută” sau „conținut scăzut de fucoză” așa cum s-au utilizat în acest document se referă la anticorpii cu un conținut de fucoză de aproximativ 0% - 15%.

„Fucoză normală” sau „conținut normal de fucoză” așa cum s-a utilizat în acest document se referă la anticorpii cu un conținut de fucoză de aproximativ peste 50%, de obicei aproximativ peste 60%, 70%, 80% sau peste 85%.

În unele realizări, anticorpii care se leagă specific la CD38 poate induce uciderea Tregurilor, MDSC-urilor și/sau Breg-urilor prin apoptoză. Metodele pentru evaluarea apoptozei sunt bine cunoscute, și includ de exemplu colorarea anexinei IV utilizând metode standard. Anticorpii anti-CD38 utilizați în invenție pot induce apoptoza în aproximativ 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 100% din celule.

În unele realizări, Tef-urile sau celulele supresoare imune rezidă în măduva osoasă sau în sângele periferic.

În unele realizări, Tef-urile sau celulele supresoare imune rezidă în măduva osoasă.

În unele realizări, Tef-urile sau celulele supresoare imune rezidă în sângele periferic.

În unele realizări, anticorpii care se leagă specific la CD38 crește raportul dintre celulele T CD8⁺ și Treg-uri.

În unele realizări, anticorpii care se leagă specific la CD38 crește raportul dintre celulele de memorie centrală CD8⁺ și celulele naive CD8⁺. Celulele de memorie centrală CD8⁺ pot fi identificate ca celule CD45RO⁺/CD62L^{ridicat}. Celulele naive CD8⁺ pot fi identificate ca celule CD45RO⁺/CD62L⁺.

Un anticorp neagonistic care se leagă specific la CD38 se referă la un anticorp care după legarea la CD38 nu induce proliferarea semnificativă a unei mostre a celulelor mononucleare din sângele periferic *in vitro*, în comparație cu proliferarea indusă de un anticorp de control al izotipului sau mediului singur.

În unele realizări, anticorpii neagonistici care se leagă specific la CD38, induce proliferarea celulelor mononucleare din sângele periferic (PBMC) într-o manieră nesemnificativă statistic. Proliferarea PBMC-urilor poate fi evaluată prin izolarea PBMC-urilor de la donatori sănătoși și cultivarea celulelor la 1×10^5 celule/godeu în plăci cu fund plat cu 96 de godeuri în prezența sau absența unui anticorp de test în 200 μ l RPMI. După patru zile de incubare la 37°C, se pot adăuga 30 μ l ³H-timidină (16,7 μ Ci/ml), și cultura poate fi continuată peste noapte. Incorporarea de ³H-timidină poate fi evaluată utilizând un contor gama Packard Cobra (Packard Instruments, Meriden, CT, SUA), în conformitate cu instrucțiunile fabricantului. Datele pot fi calculate ca media cpm ($\pm$ SEM) a PBMC-urilor obținute de la câțiva donatori. Semnificația statistică sau însemnificația între mostrele cultivate în prezența sau absența anticorpului de test este calculată utilizând metode standard.

Un exemplu de anticorp anti-CD38 care poate fi utilizat în invenție este DARZALEX™ (daratumumab). DARZALEX™ (daratumumab) cuprinde o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu (VH) și o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor (VL) prezentate în SEQ ID NO: 4 și respectiv 5, o regiune determinantă de complementaritate 1 a lanțului greu (HCDR1), o HCDR2 și o HCDR3 din SEQ ID NO: 6, 7 și respectiv 8, și o regiune determinantă de complementaritate 1 a lanțului ușor (LCDR1), o LCDR2 și o LCDR3 din SEQ ID NO: 9, 10 și respectiv 11, și este de subtip IgG1/κ și descris în brevetul S.U.A. nr. 7.829.693. Secvența de aminoacizi a lanțului greu al DARZALEX™ (daratumumab) este prezentată în SEQ ID NO: 12 și secvența de aminoacizi a lanțului ușor este prezentată în SEQ ID NO: 13. SEQ ID NO: 1

MANCEFSPPVSGDKPCCRLSRRRAQLCLGVSIILVVLAVVVPRWRQQWSGPGT
TKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLM
KLGITQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQORDMFTLEDTLGLYLAADDLTWCGEFN
TSKINYQSCPQDWRKDCSNNPVSFVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMNGSRSKIFDK
NSTFGSVEVHNLQPEKVQTLQAWVIHGGREDSDRLCQDPTIKFLESISKRSNIQFSC

KNIYRPDKFLOCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO: 2

SKRNIQFSCKNIYR

SEQ ID NO: 3

EKVQTLQAWVIHGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA

ISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNSENKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDK

ILWFGEVPVFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 5

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYD

ASNRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQ

GTKVEIK

SEQ ID NO: 6

SFAMS

SEQ ID NO: 7

AISGSGGGTYYADSVKG

SEQ ID NO: 8

DKILWFGEVPVFDY

SEQ ID NO: 9

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO: 10

DASNRRAT

SEQ ID NO: 11

QQRSNWPPTF

SEQ ID NO: 12

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG

GGTYYADSVKGRFTISRDNSENKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEVPV

DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKRV

EPKSCDKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMHSTRPEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN

HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISISLEPEDFAVYYCQQRSNWFFTFGQGTKVEIKRTVAAP
 SYFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSITYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Anticorpul pot fi evaluați pentru concurența lor cu un anticorp de referință cum ar fi DARZALEX™ (daratumumab) având VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 pentru legare la CD38, utilizând bine cunoscutele metode *in vitro*. Într-o metodă exemplificativă, CD38 care exprimă recombina

5 urmată de incubarea cu un exces de anticorp de test marcat fluorescent timp de

45 min la 4°C. După spălarea în PBS/BSA, fluorescența poate fi măsurată prin citometrie de flux utilizând metode standard. Într-o altă metodă exemplificativă, porțiunea extracelulară a CD38 uman poate fi acoperită pe suprafața unei plăci ELISA. Excesul de anticorp de referință nemarcat poate fi adăugat timp de aproximativ 15 minute și ulterior pot fi adăugați anticorpii de test biotinilați. După spălări în PBS/Tween, legarea anticorpului de test biotinilat poate fi detectată utilizând streptavidină conjugată cu peroxidază din hrean (HRP) și semnalul poate fi detectat utilizând metode standard. Este cu ușurință evident că în testele concurențiale, anticorpul de referință poate fi marcat și anticorpul de test nemarcat. Anticorpul de test concurează cu anticorpul de referință când anticorpul de referință inhibă legarea anticorpului de test, sau anticorpul de test inhibă legarea anticorpului de referință la CD38 cu cel puțin 80%, de exemplu cu 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%. Epitopul anticorpului de test poate fi definit suplimentar, de exemplu prin mapearea peptidei sau prin teste de protecție ale hidrogenului/deuteriului utilizând metode cunoscute, sau prin determinarea structurii cristaline.

20 Anticorpul care se leagă la regiunea SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) și la regiunea EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) a CD38 umană (SEQ ID NO: 1) pot fi generați de exemplu prin imunizarea șoarecilor cu peptide având secvențele de aminoacizi prezentate în SEQ ID NO: 2 și 3 utilizând metodele standard și pe cele descrise aici, și care caracterizează anticorpii obținuți pentru legare la peptide utilizând de exemplu ELISA sau studii de mutagenază.

25 Un anticorp anti-CD38 divulgat aici se leagă la regiunea SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) și la regiunea EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) a CD38 umană (SEQ ID NO: 1). Epitopul anticorpului utilizat în invenție include unele sau toate reziduurile având secvențele prezentate în SEQ ID NO: 2 sau SEQ ID NO: 3. În unele realizări, epitopul anticorpului cuprinde cel puțin un aminoacid în regiunea SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) și cel puțin un aminoacid în regiunea EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) a CD38 umană (SEQ ID NO: 1). În unele realizări, epitopul anticorpului cuprinde cel puțin doi aminoacizi în regiunea SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) și cel puțin doi aminoacizi în regiunea EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) a CD38 umană (SEQ ID NO: 1). În unele realizări, epitopul anticorpului cuprinde cel puțin trei aminoacizi în regiunea SKRNIQFSCCKNIYR (SEQ ID NO: 2) și cel puțin trei aminoacizi în regiunea EKVQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3) a CD38 umană (SEQ ID NO: 1).

35 Anticorpul care se leagă specific la CD38 cuprinde secvențele de aminoacizi HCDR1, HCDR2 și HCDR3 din SEQ ID NO: 6, 7 și respectiv 8.

Anticorpul care se leagă specific la CD38 cuprinde secvențele de aminoacizi LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 9, 10 și respectiv 11.

40 Anticorpul care se leagă specific la CD38 cuprinde secvențele de aminoacizi HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 și respectiv 11.

Anticorpul care se leagă specific la CD38 cuprinde VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5.

În unele realizări, anticorpul care se leagă specific la CD38 cuprinde lanțul greu din SEQ ID NO: 12 și lanțul ușor din SEQ ID NO: 13.

45 Alte exemple de anticorpi anti-CD38 care pot fi utilizați în conformitate cu divulgarea sunt: mAb003 cuprinzând secvențele VH și VL din SEQ ID NO: 14 și respectiv 15, și descris în brevetul S.U.A. nr. 7.829.693. VH și VL ale mAb003 pot fi exprimate ca IgG1/κ. SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIF
 LGLANSAQKFTQGRVITLADKSTSTAY

MDLSSLRSEDTAVYYCARDIAALGFFDYWGQGTLLVTVSSAS

SEQ ID NO: 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAWYQOKPEKAPKSLIVAASSLQS

GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLP

EDFATYYCQQVNSYPRTFGGQTKVEIK;

mAb024 cuprinzând secvențele VH și VL din SEQ ID NO: 16 și respectiv 17, este descris în brevetul S.U.A. nr. 7.829.693. VH și VL ale mAb024 pot fi exprimate ca IgG1/κ. SEQ ID NO: 16

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWVGHIYPH

DSDARYSPSFQGVTFPSADKSISTAY

LQWSSLKASDTAMYYCARHVGWGSRYWYFDLWGRGTLTVSS

5 SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLIYDASNRAT

GIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEP

EDFAVYYCQQRSNWPFTFGGQTKVEIK;

MOR-202 (MOR-03087) cuprinzând secvențele VH și VL din SEQ ID NO: 18 și respectiv 19, este descris în brevetul S.U.A. nr. 8.088.896. VH și VL ale MOR-202 pot fi exprimate ca IgG1/κ. SEQ ID NO: 18

QVQLVESGGGLVQPQGSRLSCAASGFTSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGD

PSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY

10

LQMNSLRADTAIVYYCARDLPLVYTGFAWVGQGLTVSS

SEQ ID NO: 19

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYVYVWYQKPGQAPVLVIYGDSCRPS

GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ;

Isatuximab; cuprinzând secvențele VH și VL din SEQ ID NO: 20 și respectiv 21, este descris în brevetul S.U.A. nr. 8.153.765. VH și VL ale Isatuximab pot fi exprimate ca IgG1/κ.

15

SEQ ID NO 20:

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFDYYWMQWVKQRPGQGLEWIGT

IYPGDGDTGYAQKFGGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGD

YYGSNSLDYWGQGTSTVSS

SEQ ID NO: 21:

DIVMTQSHLSMSTSLQDPVSITCKASQDVSTVVAWYQOKPGQSPRLIYS

ASYRYIGVPRFTGSGAGTDFITITSSVQAEDLAVYYCQGHYSPPYTFGG

GTKLEIK

20

Alte exemple de anticorpi anti-CD38 care pot fi utilizați în metodele din divulgare îi includ pe cei descriși în publicația de brevet internațional nr. WO05/103083, publicația de brevet internațional nr. WO06/125640, publicația de brevet internațional nr. WO07/042309, publicația de brevet internațional nr. WO08/047242 sau publicația de brevet internațional nr. WO 14/178820.

25

Invenția furnizează un anticorp care se leagă specific la CD38 pentru utilizare în tratarea unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5, în care anticorpul este de izotip IgG1.

30

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 14 și VL din SEQ ID NO: 15 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

35

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 16 și VL din SEQ ID NO: 17 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

40

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 18 și VL din SEQ ID NO: 19 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 20 și VL din SEQ ID NO: 21 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

- 5 În unele realizări, tumoarea solidă este un melanom.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer pulmonar.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer pulmonar nonmicrocelular scuamos (NSCLC).
În unele realizări, tumoarea solidă este un NSCLC nescuamos.
În unele realizări, tumoarea solidă este un adenocarcinom pulmonar.
- 10 În unele realizări, tumoarea solidă este un carcinom cu celule renale (RCC) (de exemplu, un carcinom renal cu celule clare sau un carcinom renal cu celule papilare), sau o leziune metastatică a acestora.
În unele realizări, tumoarea solidă este un mezoteliom.
În unele realizări, tumoarea solidă este un carcinom nazofaringeal (NPC).
- 15 În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer colorectal.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la prostată sau cancer la prostată rezistent la castrare.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la stomac.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer ovarian.
- 20 În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer gastric.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer hepatic. În unele realizări, tumoarea solidă este cancer pancreatic.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la tiroidă.
În unele realizări, tumoarea solidă este un carcinom cu celule scuamoase de cap și gât.
- 25 În unele realizări, tumoarea solidă este un carcinom de esofag sau tract gastrointestinal.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la sân.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer al trompelor uterine.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la creier.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer uretral.
- 30 În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer genitourinar.
În unele realizări, tumoarea solidă este o endometrioză.
În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer de col uterin.
În unele realizări, tumoarea solidă este o leziune metastatică a cancerului.
În unele realizări, tumorii solide îi lipsește expresia detectabilă a CD38.
- 35 Tumorii solide îi lipsește expresia detectabilă a CD38, când expresia CD38 în țesutul tumorii solide sau pe celulele izolate din tumoarea solidă este statistic nesemnificativă în comparație cu un control, de exemplu expresie detectată cu anticorp anti-CD38 vs expresie detectată cu un anticorp de control al izotipului utilizând metode bine cunoscute.
- 40 Anticorpilor anti-CD38 utilizați în metodele din divulgare pot fi de asemenea selectați *de novo* din, de exemplu, o bibliotecă de afișare pe bacteriofagi, unde bacteriofagii sunt modificați genetic pentru a exprima imunoglobuline umane sau porțiuni din acestea cum ar fi Fab-urile, anticorpii monocatenari (scFv), sau regiunile variabile neîmperecheate sau împerecheate ale anticorpului (Knappik și colab., (2000) J Mol Biol 296:57-86; Krebs și colab., (2001) J Immunol Meth 254:67-84; Vaughan și colab., (1996) Nature Biotechnology 14:309-314; Sheets și colab., (1998) PITAS (SUA) 95:6157-6162;
- 45 Hoogenboom și Winter, (1991) J Mol Biol 227:381; Marks și colab., (1991) J Mol Biol 222:581). Domeniile variabile de legare la CD38 pot fi izolate din de exemplu, bibliotecile de afișare pe bacteriofagi care exprimă regiunile variabile ale lanțului greu și ușor ale anticorpului, ca proteine de fuziune cu proteina acoperită cu bacteriofagul pIX cum s-a descris în Shi și colab., (2010) J Mol Biol 397:385-96, și publicația de brevet internațional nr. WO09/085462. Bibliotecile de anticorpi pot fi selectate pentru
- 50 legarea la domeniul extracelular al CD38 uman, clonele pozitive obținute pot fi caracterizate suplimentar, Fab-urile izolate din lizatele clonelor, și clonate ulterior ca anticorpi cu lungime completă. Astfel de metode de afișare pe bacteriofagi pentru izolarea anticorpilor umani sunt stabilite în domeniu. Vezi de exemplu: brevetul S.U.A. nr. 5.223.409, brevetul S.U.A. nr. 5.403.484, brevetul S.U.A. nr.
- 55 5.571.698, brevetul S.U.A. nr. 5.427.908, brevetul S.U.A. nr. 5.580.717, brevetul S.U.A. nr.
5. 969.108, brevetul S.U.A. nr. 6.172.197, brevetul S.U.A. nr. 5.885.793, brevetul S.U.A. nr.
6. 521.404, brevetul S.U.A. nr. 6.544.731, brevetul S.U.A. nr. 6.555.313, brevetul S.U.A. nr.
- 6.582.915, și brevetul S.U.A. nr. 6.593.081.

Anticorpul anti-CD38 este de IgG1.

Porțiunea Fc a anticorpului poate media funcțiile efectoare ale anticorpului, cum ar fi citotoxicitatea mediată de celulele dependente de anticorp (ADCC), fagocitoza celulară dependentă de anticorp (ADCP) sau citotoxicitatea dependentă de complement (CDC). O astfel de funcție poate fi mediată prin legarea unui domeniu efector Fc la un receptor Fc pe o celulă imună cu activitate fagocitică sau litică sau prin legarea unui domeniu efector Fc la componentele sistemului complementar. De obicei, efectul mediat de celulele care se leagă la Fc sau de componentele complementare, conduce la inhibarea și/sau depleția celulelor țintă, de exemplu celulele care exprimă CD38. Izotipurile IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4 IgG umane prezintă o capacitate diferită pentru funcțiile efectoare. ADCC poate fi mediată de IgG1 și IgG3, ADCP poate fi mediată de IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4, și CDC poate fi mediată de IgG1 și IgG3.

Anticorpii care sunt substanțial identici cu anticorpul care cuprinde VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 pot fi utilizați în invenție. Termenul „substanțial identic” așa cum s-a utilizat în acest document înseamnă că cele două secvențe de aminoacizi VH sau VL ale anticorpului care sunt comparate, sunt identice sau au „diferențe nesubstanțiale”. Diferențele nesubstanțiale sunt substituții de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, sau 15 aminoacizi într-un lanț greu sau lanț ușor al anticorpului, care nu afectează advers proprietățile anticorpului. Identitatea procentuală poate fi determinată de exemplu prin alinierea împerecheată utilizând setările implicite ale modulului AlignX al Vectorului NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Secvențele proteice de aici pot fi utilizate ca secvență de interogare pentru a efectua o căutare în bazele de date publice ale brevetelor pentru, de exemplu, a identifica secvențele înrudite. Exemple de programe utilizate pentru a efectua astfel de căutări sunt programele XBLAST sau BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sau suita GenomeQuest™ (GenomeQuest, Westborough, MA) utilizând setările implicite. Exemplele de substituții care pot fi făcute anticorpilor care se leagă specific la CD38, sunt de exemplu substituțiile conservative cu un aminoacid având o sarcină, caracteristici hidrofobe sau stereochemice similare. Substituțiile conservative pot fi făcute de asemenea pentru a îmbunătăți proprietățile anticorpului, de exemplu stabilitatea sau afinitatea, sau pentru a îmbunătăți funcțiile efectoare ale anticorpului. Pot fi făcute 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, sau 15 substituții de aminoacizi, de exemplu la lanțul greu sau lanțul ușor ale anticorpului anti-CD38. Mai mult, orice reziduu nativ în VH sau VL poate fi de asemenea substituit cu alanină, așa cum au s-a descris anterior pentru mutageneza cu scanarea alaninei (MacLennan și colab., Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67, 1998; Sasaki și colab., Adv Biophys 35:1-24, 1998). Substituțiile dorite de aminoacizi pot fi determinate de către cei calificați în domeniu, în momentul când astfel de substituții sunt dorite. Substituțiile de aminoacizi pot fi făcute de exemplu prin mutageneză PCR (brevetul S.U.A. nr. 4.683.195). Bibliotecile de variante pot fi generate utilizând metode bine cunoscute, de exemplu utilizând codoni aleatori (NNK) sau nealeatori, de exemplu codoni DVK, care codifică 11 aminoacizi (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp) și selectând bibliotecile pentru variantele cu proprietățile dorite. Variantele generate pot fi testate pentru legarea lor la CD38, capacitatea lor de a induce ADCC, ADCP sau apoptoza, sau de a modula activitatea enzimatică a CD38 *in vitro* utilizând metodele descrise aici.

În unele realizări, anticorpul care se leagă specific la CD38, se poate lega la CD38 uman cu un interval de afinități (K_D). Într-o realizare conform invenției, și în unele realizări ale fiecăreia dintre realizările numerotate listate mai jos, anticorpul care se leagă specific la CD38, se leagă la CD38 cu afinitate ridicată, de exemplu, cu o K_D egală sau mai mică de aproximativ 10^{-7} M, cum ar fi, dar fără a se limita la, $1-9,9$ (sau la orice interval sau valoare din acesta, cum ar fi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, sau 9) $\times 10^{-8}$ M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-11} M, 10^{-15} M sau la orice interval sau valoare din acesta, după cum s-a determinat prin rezonanță plasmonică de suprafață sau prin metoda Kinexa, așa cum se practică de către cei calificați în domeniu. Un exemplu de afinitate este egal sau mai mic de 1×10^{-8} M. Un alt exemplu de afinitate este egal sau mai mic de 1×10^{-9} M.

În unele realizări, anticorpul care se leagă specific la CD38 este un anticorp bispecific. Regiunile VL și/sau VH ale anticorpilor anti-CD38 existenți sau regiunile VL și VH identificate *de novo* cum s-a descris aici, pot fi modificate genetic în anticorpi bispecifici cu lungime completă. Astfel de anticorpi bispecifici pot fi realizați prin modularea interacțiunilor CH3 între lanțurile grele ale anticorpului monospecific pentru a forma anticorpi bispecifici utilizând tehnologii cum ar fi cele descrise în brevetul S.U.A. nr. 7.695.936; publicația de brevet internațional nr. WO04/111233; publicația de brevet S.U.A. nr. US2010/0015133; publicația de brevet S.U.A. nr. US2007/0287170; publicația de brevet internațional nr. WO2008/119353; publicația de brevet S.U.A. nr. US2009/0182127; publicația de brevet S.U.A. nr. US2010/0286374; publicația de brevet S.U.A. nr. US2011/0123532; publicația de brevet internațional nr. WO2011/131746; publicația de brevet internațional nr. WO2011/143545; sau publicația de brevet S.U.A. nr. US2012/0149876. Structuri bispecifice suplimentare în care pot fi încorporate regiunile VL și/sau VH ale anticorpilor invenției, sunt de exemplu imunoglobulinele domeniului variabil dual

(publicația de brevet internațional nr. WO2009/134776), sau structuri care includ diferite domenii de dimerizare pentru a conecta cele două brațe ale anticorpului cu specificități diferite, cum ar fi fermoarul de leucină sau domeniile de dimerizare ale colagenului (publicația de brevet internațional nr. WO2012/022811, brevetul S.U.A. nr. 5.932.448; brevetul S.U.A. nr. 6.833.441).

De exemplu, anticorpii bispecifici pot fi generați *in vitro* într-un mediu fără celule, prin introducerea de mutații asimetrice în regiunile CH3 a doi anticorpi homodimerici monospecifici și formând anticorpu homodimeric bispecific din doi anticorpi homodimerici monospecifici parentali în condiții reducătoare pentru a permite izomerizarea legăturii disulfură în conformitate cu metodele descrise în publicația de brevet internațional nr. WO2011/131746. În metode, primul anticorp bivalent monospecific (de exemplu, anticorpu anti-CD38) și cel de al doilea anticorp bivalent monospecific sunt modificate genetic pentru a avea anumite substituții la domeniul CH3 care promovează stabilitatea heterodimerului; anticorpii sunt incubati împreună în condiții reducătoare, suficiente pentru a permite cisteinelor din regiunea balama să sufere izomerizarea legăturii disulfură, generând prin urmare anticorpu bispecific prin modificarea brațului Fab. Condițiile de incubare pot fi refăcute în mod optim la nereducătoare. Exemple de agenți de reducere care pot fi utilizați sunt 2-mercaptoetilamină (2-MEA), ditiotritol (DTT), ditiocritritol (DTE), glutationă, tris(2-carboxietil)fosfină (TCEP), L-cisteină și beta-mercaptoetanol, preferabil un agent reducător selectat din grupul constând din: 2-mercaptoetilamină, ditiotritol și tris(2-carboxietil)fosfină. De exemplu, poate fi utilizată incubarea timp de cel puțin 90 min la o temperatură de cel puțin 20°C în prezența a cel puțin 25 mM 2-MEA sau în prezența a cel puțin 0,5 mM ditiotritol la un pH de de la 5-8, de exemplu la pH de 7,0 sau la pH de 7,4.

Exemplele de mutații CH3 care pot fi utilizate într-un prim lanț greu și într-un al doilea lanț greu al anticorpului bispecific sunt K409R și/sau F405L.

Anticorpu invenției poate fi utilizat pentru a trata un pacient animal aparținând oricărei clasificări. Exemplele de astfel de animale includ mamifere cum ar fi oameni, rozătoare, câini, pisici și animale de fermă.

Administrare/ compoziții farmaceutice

Anticorpii care se leagă specific la CD38 pot fi furnizați în compoziții farmaceutice adecvate cuprinzând anticorpu care se leagă specific la CD38 și un purtător acceptabil farmaceutic. Purtătorul poate fi diluant, adjuvant, excipient, sau vehicul cu care sunt administrați anticorpii care se leagă specific la CD38. Astfel de vehicule pot fi lichide, cum ar fi apă și uleiuri, incluzându-le pe cele din petrol, de origine animală, vegetală sau sintetică, cum ar fi uleiul de arahide, uleiul de soia, uleiul mineral, uleiul de susan și altele asemenea. De exemplu, pot fi utilizate 0,4% soluție salină și 0,3% glicină. Aceste soluții sunt sterile și în general fără particule. Ele pot fi sterilizate prin tehnici de sterilizare convenționale, bine cunoscute (*de exemplu*, filtrare). Compozițiile pot conține substanțe auxiliare acceptabile farmaceutic după cum este necesar pentru a aproxima condițiile fiziologice cum ar fi ajustarea pH-ului și agenți de tamponare, agenți de stabilizare, îngroșare, lubrifiere și de colorare, etc. Concentrația anticorpilor care se leagă specific la CD38 într-o astfel de formulare farmaceutică poate varia pe larg, *adică*, de la mai puțin de aproximativ 0,5%, uzual până la cel puțin aproximativ 1% sau până la mai mult de 15 sau 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% sau 50% din masă și va fi selectată în primul rând pe baza cerințelor de doză, volume de fluid, vâscozități, etc., în conformitate cu modul de administrare particular selectat. Vehiculele adecvate și formulările, inclusiv ale altor proteine umane, de exemplu, albumină din ser uman, sunt descrise, de exemplu, în Remington: The Science and Practice of Pharmacy, a 21-a ediție, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams și Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Partea 5, Pharmaceutical Manufacturing pag. 691-1092, vezi în special pag. 958-989.

Modul de administrare al anticorpilor care se leagă specific la CD38 poate fi orice cale adecvată cum ar fi administrarea parenterală, de exemplu, intradermală, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă sau subcutanată, pulmonară, transmucozală (orală, intranazală, intravaginală, rectală) sau alte căi apreciate de către specialistul calificat, așa cum este bine cunoscut în domeniu. Anticorpii care se leagă specific la CD38 pot fi administrați intratumoral, la un situs de drenaj al ganglionilor limfatici pentru livrarea locală în tumoare, utilizând metode cunoscute.

Anticorpii care se leagă specific la CD38 pot fi administrați unui pacient pe orice cale adecvată, de exemplu parental prin perfuzie intravenoasă (*i.v.*) sau injecție bolus, intramusculară sau subcutanată sau intraperitoneală. Perfuzia *i.v.* poate fi administrată timp de, de exemplu 15, 30, 60, 90, 120, 180, sau 240 minute, sau de la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 sau 12 ore.

Doza administrată unui pacient este suficientă pentru a atenua sau cel puțin opri parțial boala care este tratată („cantitate eficientă terapeutică”) și poate fi uneori de la 0,005 mg până la aproximativ 100 mg/kg, de exemplu de la aproximativ 0,05 mg până la aproximativ 30 mg/kg sau de la aproximativ 5 mg până la aproximativ 25 mg/kg, sau de aproximativ 4 mg/kg, de aproximativ 8 mg/kg, de aproximativ 16 mg/kg sau de aproximativ 24 mg/kg, sau de exemplu de aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 mg/kg,

dar poate fi chiar mai ridicată, de exemplu de aproximativ 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 sau 100 mg/kg.

O doză unitară fixată poate fi de asemenea administrată, de exemplu, la 50, 100, 200, 500 sau 1000 mg, sau doza poate fi pe baza ariei suprafeței pacientului, de exemplu, de 500, 400, 300, 250, 200, sau 100 mg/m². Uzual, pot fi administrate între 1 și 8 doze, (de exemplu, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sau 8), dar pot fi administrate și 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau mai multe doze.

Administrarea anticorpilor care se leagă specific la CD38 poate fi repetată după o zi, două zile, trei zile, patru zile, cinci zile, șase zile, o săptămână, două săptămâni, trei săptămâni, o lună, cinci săptămâni, șase săptămâni, șapte săptămâni, două luni, trei luni, patru luni, cinci luni, șase luni sau mai mult. Cursurile repetate de tratament sunt de asemenea posibile, la fel ca la administrarea cronică. Administrarea repetată poate fi la aceeași doză sau la o doză diferită. De exemplu, anticorpul care se leagă specific la CD38 pot fi administrați la 8 mg/kg sau la 16 mg/kg la interval săptămânal timp de 8 săptămâni, urmați de administrarea la 8 mg/kg sau la 16 mg/kg la fiecare două săptămâni timp de 16 săptămâni suplimentare, urmați de administrarea la 8 mg/kg sau la 16 mg/kg la fiecare patru săptămâni prin perfuzie intravenoasă.

Anticorpul care se leagă specific la CD38 pot fi prin terapie de întreținere, cum ar fi, de exemplu o dată pe săptămână pe o perioadă de 6 luni sau mai mult.

De exemplu, anticorpul care se leagă specific la CD38 pot fi furnizați ca dozaj zilnic într-o cantitate de aproximativ 0,1-100 mg/kg, cum ar fi de 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 sau 100 mg/kg, pe zi, în cel puțin una dintre zilele 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, sau 40, sau alternativ, în cel puțin una dintre săptămânile 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 sau 20 după începerea tratamentului, sau orice combinație a acestora, utilizând doze unice sau divizate la fiecare 24, 12, 8, 6, 4, sau 2 ore, sau orice combinație a acestora.

Anticorpul care se leagă specific la CD38 pot fi de asemenea administrați profilactic pentru a reduce riscul de a dezvolta cancer, pentru a întârzia debutul apariției unui eveniment în progresul cancerului, și/sau pentru a reduce riscul de recurență când un cancer este în remisie. Acest lucru poate fi în special util pacienților la care este dificil de localizat o tumoră despre care se știe că este prezentă din cauza altor factori biologici.

Anticorpul care se leagă specific la CD38 pot fi liofilizați pentru depozitare și reconstituiri într-un purtător adecvat înainte de utilizare. S-a dovedit că această tehnică este eficientă cu preparări proteice convenționale și pot fi utilizate tehnici de liofilizare și reconstituire bine cunoscute.

Anticorpul care se leagă specific la CD38 pot fi administrați în combinație cu un al doilea agent terapeutic.

Anticorpul care se leagă specific la CD38 pot fi administrați împreună cu oricare unul sau mai multe medicamente chimioterapeutice sau alți agenți terapeutici anticancer, cunoscuți celor calificați în domeniu. Agenții chimioterapeutici sunt compuși chimici utili în tratamentul cancerului și includ agenți inhibitori ai creșterii sau alți agenți citotoxici și includ agenți alchilanți, antimetaboliți, inhibitori antimicrotubule, inhibitori de topoizomerază, inhibitori ai receptorului tirozin kinază, inhibitori ai angiogenezei și altele asemenea. Exemplele de agenți chimioterapeutici includ agenți alchilanți cum ar fi tiotepa și ciclofosfamidă (CITOXAN®); alchil sulfonați cum ar fi busulfan, improsulfan și piposulfan; aziridine cum ar fi benzodopa, carbocuna, meturedopa, și uredopa; etilenimine și metilamelamine incluzând altretamină, trietilenmelamină, trietilenfosforamidă, trietilenfosfaoramidă și trimetilolomelamină; iperite de azot cum ar fi clorambucil, clomafazină, colofosamidă, estramustină, ifosamidă, mecloretamină, clorhidrat de oxid de mecloretamină, melfalan, novembichin, fenesterină, prednimustină, trofosamidă, iperite de uracil; nitrozuree cum ar fi carmustină, clorozotocin, fotemustină, lomustină, nimustină, ranimustină; antibiotice cum ar fi aclacinomizina, actinomicină, autramicină, azaserină, bleomicină, cactinomicină, caliceamicină, carabicină, carminomicină, carzinofilină, cromomicină, dactinomicină, daunorubicină, detorubicină, 6-diazo-5-oxo-L-norleucină, doxorubicină, epirubicină, esorubicină, idarubicină, marcelomicină, mitomicină, acid micofenolic, nogalamicină, olivomicină, peplomicină, potfiromicină, puromicină, cuelamicină, rodorubicină, streptonigrină, streptozocină, tubercidină, ubenimex, zinostatină, zorubicină; anti-metaboliți cum ar fi metotrexat și 5-FU; analogi ai acidului folic cum ar fi denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; analogi de purină cum ar fi fludarabină, 6-mercaptopurină, tiamiprină, tioguanină; analogi de pirimidină cum ar fi ancitabină, azacitidină, 6-azauridină, carmofur, citarabină, dideoxiuridină, doxifluridină, enocitabină, floxuridină; androgeni cum ar fi calusteronă, propionat de dromostanolonă, epitiostanol, mepitiostan, testolactonă; antiadrenali cum ar fi aminoglutetimidă, mitotan, trilostan; agenți de completare ai acidului folic cum ar fi acidul frolinic; aceglatonă; glicozidă aldofosfamidă; acid aminolevulinic; amsacrină;

bestrabucil; bisantrenă; edatraxat; defofamină; demecolcină; diazicuonă; elfomitină; acetat de eliptiniu; etoglucid; nitrat de galiu; hidroxiuree; lentinan; lonidamină; mitoguazonă; mitoxantronă; mopidamol; nitracrină; pentostatina; fenamet; pirarubicină; acid podofilinic; 2-etilhidrazidă; procarbazină; PSK[®]; razoxan; sizofiran; spirogermaniu; acid tenuazonic; triazicuonă; 2,2',2''-trichlorotrietilamină; uretan; vindezina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitozina; arabinozidă („AraC"); ciclofosfamidă; tiotepa; membri ai familiei oftaxoide sau taxane, cum ar fi paclitaxel (TAXOL[®] docetaxel (TAXOTERE[®]) și analogi ai acestora; clorambucil; gemcitabină; 6-tioguanină; mercaptopurină; metotrexat; analogi de platină cum ar fi cisplatină și carboplatină; vinblastină; platină; etoposidă (VP-16); ifosfamidă; mitomicină C; mitoxantronă; vincristină; vinorelbina; navelbina; novantronă; teniposida; daunomicină; aminopterina; xelodă; ibandronat; CPT-11; inhibitor de topoizomerază RFS 2000; difluorometilomihină (DMFO); acid retinoic; esperamicină; capecitabină; inhibitori ai receptorului tirozin kinază și/sau angiogenezei, incluzând NEXAVAR[®] (sorafenib), SUTENT[®] (sunitinib), VOTRIENT[™] (pazopanib),

PALLADIA[™] (toceranib), ZACTIMA[™] (vandetanib), RECENTIN[®] (cediranib), regorafenib (BAY 734506), axitinib (AG013736), lestaurtinib (CEP-701), TARCEVA[®] (erlotinib), IRESSA[™] (gefitinib), Gilotrif[®] (afatinib), TYKERB[®] (lapatinib), neratinib, și altele asemenea, și săruri acceptabile farmaceutice, acizi sau derivați ai oricăroră din cele de mai sus. De asemenea incluși în această definiție sunt agenții antihormonali care acționează pentru reglarea sau inhibarea acțiunii hormonilor asupra tumorilor cum ar fi antiestrogenii care includ de exemplu tamoxifen, raloxifenă,

4(5)-imidazoli care inhibă aromataza, 4-hidroxitamoxifen, trioxifenă, keoxifenă, LY 117018, onapristonă, și FARESTON[®] (toremifenă); și antiandrogeni cum ar fi flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolid, și goserelin; și săruri acceptabile farmaceutice, acizi sau derivați ai oricăroră din cele de mai sus. Sunt de asemenea aplicabili, și alți compuși chimici citotoxici convenționali, cum ar fi cei divulgați în Wiemann și colab., 1985, în Medical Oncology (Calabresi și colab., eds.), Capitolul 10, McMillan Publishing.

Exemplele de agenți care pot fi utilizați în combinație cu anticorpul care se leagă specific la CD38, includ inhibitori ai tirozin kinazei și terapii anticancer țintite cum ar fi IRESSA[™] (gefitinib) și Tarceva[®] (erlotinib) și alți antagoniști ai HER2, HER3, HER4 sau VEGF. Exemplele de antagoniști HER2 includ CP-724-714, HERCEPTIN[™] (trastuzumab), OMNITARG[™] (pertuzumab), TAK-165, TYKERB[®] (lapatinib) (inhibitori EGFR și HER2), și GW-282974. Exemplele de antagoniști HER3 includ anticorpi anti-Her3 (vezi de exemplu, publicația de brevet S.U.A. nr. 2004/0197332). Exemplele de antagoniști HER4 include ARNsi-urile anti-HER4 (vezi de exemplu, Maatta și colab., Mol Biol Cell 17: 67-79, 2006). Un exemplu de antagonist VEGF este (Avastin[™] (Bevacizumab).

Exemplele de agenți care pot fi utilizați în combinație cu anticorpul care se leagă specific la CD38, includ medicamentele standard de îngrijire pentru tumorile solide, sau un inhibitor al punctului de control imun.

Al doilea agent terapeutic poate fi un inhibitor al punctului de control imun.

În unele realizări, inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-1, un anticorp anti-PD-L1, un anticorp anti-PD-L2, un anticorp anti-LAG3, un anticorp anti-TIM3, sau un anticorp anti-CTLA-4.

În unele realizări, inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-1 antagonistic, un anticorp anti-PD-L1 antagonistic, un anticorp anti-PD-L2 antagonistic, un anticorp anti-LAG3 antagonistic, sau un anticorp anti-TIM3 antagonistic.

În unele realizări, inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-1.

În unele realizări, inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-L1.

În unele realizări, inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-L2.

În unele realizări, inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-LAG3.

În unele realizări, inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-TIM3.

În unele realizări, inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-CTLA-4.

Pot fi utilizați orice anticorpi anti-PD-1 antagonistici. Exemplele de anticorpi anti-PD-1 care pot fi utilizați sunt OPVIDO[®] (nivolumab) și KEYTRUDA[®] (pembrolizumab).

OPVIDO[®] (nivolumab) este descris în, de exemplu brevetul S.U.A. nr. 8.008.449 (anticorp 5C4) și cuprinde VH din SEQ ID NO: 24 și VL din SEQ ID NO: 25. KEYTRUDA[®] (pembrolizumab) este descris în de exemplu, brevetul S.U.A. nr. 8.354.509 și cuprinde VH din SEQ ID NO: 22 și VL din SEQ ID NO: 23. Secvențele de aminoacizi ale nivolumabului și pembrolizumabului sunt de asemenea disponibile prin registrul CAS. Anticorpii PD-1 suplimentari care pot fi utilizați sunt descriși în brevetul S.U.A. nr. 7.332.582, publicația de brevet S.U.A. nr. 2014/0044738, publicația de brevet internațional nr. WO2014/17966 și publicația de brevet S.U.A. nr. 2014/0356363.

„Antagonist” se referă la o moleculă care, când este legată la o proteină celulară, suprimă cel puțin o reacție sau activitate care este indusă de un ligand natural al proteinei. O moleculă este un antagonist când cea cel puțin o reacție sau activitate este suprimată cu cel puțin aproximativ 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, sau 100% mai mult, în raport cu cea cel puțin o reacție sau activitate suprimată în absența antagonistului (de exemplu, control negativ), sau când supresia este semnificativă statistic în comparație cu supresia în absența antagonistului. Antagonistul poate fi un anticorp, un ligand solubil, o moleculă mică, un ADN sau ARN cum ar fi ARNsi. O reacție sau activitate tipică care este indusă de exemplu prin legarea PD-1 la receptorul său PD-L1 sau PD-L2, poate fi o proliferare redusă a celulelor CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului sau o producție redusă de interferon- γ (IFN- γ) de către celulele T, conducând la supresia răspunsurilor imune împotriva de exemplu tumorii. O reacție sau activitate tipică care este indusă de legarea TIM-3 la receptorul său, cum ar fi galectin9, poate fi o proliferare redusă a celulelor CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, o producție redusă de IFN- γ de către celulele T, sau o expresie redusă a suprafeței CD137 pe celulele CD4⁺ sau CD8⁺, conducând la supresia răspunsurilor imune împotriva de exemplu tumorii. Prin urmare, un anticorp PD-1 antagonist care se leagă specific la PD-1, la un PD-L2 antagonist, la un anticorp antagonist care se leagă specific la TIM-3, induce răspunsuri imune prin inhibarea căilor inhibitoare.

SEQ ID NO: 22

QVQLVQSGVEVKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGGGLEWMGG
INPSNGGTFNEKFKNRVLTITDSSITTAAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM
GFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 23

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLAS

YLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 24

QVQLVESGGGVVQPGSRRLDCKASGITTSNMGMIHWVRQAPGKGLFWYAVIWIY
DGSKRYAYADSVKGRFTISRDNSENITFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 25

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRAT

GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGGGKVEIK

Pot fi utilizați anticorpi anti-PD-L1 care ameliorează răspunsul imun (de exemplu anticorpi anti-PD-L1 antagonisti). Exemplele de anticorpi anti-PD-L1 care pot fi utilizați sunt durvalumab, atezolizumab și avelumab, și cei descriși în, de exemplu, publicația de brevet S.U.A. nr. 2009/0055944, brevetul S.U.A. nr. 8.552.154, brevetul S.U.A. nr. 8.217.149 și brevetul S.U.A. nr. 8.779.108.

Durvalumab cuprinde VH din SEQ ID NO: 26 și VL din SEQ ID NO: 27.

Atezolizumab cuprinde VH din SEQ ID NO: 28 și VL din SEQ ID NO: 29. Avelumab cuprinde VH din SEQ ID NO: 30 și VL din SEQ ID NO: 31. SEQ ID NO: 26

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAN

IKQDQSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG

QWFGELAFDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 27

EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQRYSSSYLAWYQQKPGQAPRLIY

DASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFG

QGTKVEIK

SEQ ID NO: 28

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAW

ISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSENTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRH

WPGGFDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 29

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS

ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQ

GTKVEIK

SEQ ID NO: 30

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYIMMWVRQAPGKGLEWVSS
 IYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSENKNTLYLQMNSLRADTAVYYCARIK
 LGTVTTVDYWGQGTLVTVSS
 SEQ ID NO: 31
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMF
 YDVSNRPSGVSNRPSGSKSGNTASLTISGLQAEDVYCSSYTSSTRV
 FGTGTVTVL

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-1 care cuprinde VH din SEQ ID NO:

24 și VL din SEQ ID NO: 25 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 22 și VL din SEQ ID NO: 23 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 26 și VL din SEQ ID NO: 27 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 28 și VL din SEQ ID NO: 29 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 30

și VL din SEQ ID NO: 31 pe o durată de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de amplificare a unui răspuns imun la un pacient, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 24 și VL din SEQ ID NO: 25 pe o durată de timp suficientă pentru a ameliora răspunsul imun.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de amplificare a unui răspuns imun la un pacient, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 22 și VL din SEQ ID NO: 23 pe o durată de timp suficientă pentru a ameliora răspunsul imun.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de amplificare a unui răspuns imun la un pacient, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 26 și VL din SEQ ID NO: 27 pe o perioadă de timp suficientă pentru a ameliora răspunsul imun.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de amplificare a unui răspuns imun la un pacient, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 28 și VL din SEQ ID NO: 29 pe o durată de timp suficientă pentru a ameliora răspunsul imun.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de amplificare a unui răspuns imun la un pacient, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 30 și VL din SEQ ID NO: 31 pe o durată de timp suficientă pentru a ameliora răspunsul imun.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer colorectal, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-1 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul colorectal.

5 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer colorectal, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul colorectal.

10 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer colorectal, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-L2 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul colorectal.

15 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer pulmonar, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-1 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul pulmonar.

20 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer pulmonar, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul pulmonar.

25 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer pulmonar, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-L2 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul pulmonar.

30 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer la prostată, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-1 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul la prostată.

35 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer la prostată, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul la prostată.

40 Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având un cancer la prostată, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, în combinație cu un anticorp anti-PD-L2 antagonist pe o durată de timp suficientă pentru a trata cancerul la prostată.

Anticorpul anti-LAG-3 care îmbunătățește răspunsul imun, pot fi utilizați în invenție. Exemplele de anticorpi anti-LAG-3 care pot fi utilizați sunt cele descrise în, de exemplu, publicația de brevet internațional nr. WO2010/019570.

45 Anticorpul anti-CTLA-4 care îmbunătățește răspunsul imun, pot fi utilizați în invenție. Un exemplu de anticorp anti-CTLA-4 care poate fi utilizat este ipilimumabul.

Anticorpul anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-LAG3, anti-TIM3 și anti-CTLA-4 care pot fi utilizați în invenție, pot fi de asemenea generați *de novo* utilizând metodele descrise aici.

50 În unele realizări, pot fi utilizați anticorpii anti-PD1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 32 și VL din SEQ ID NO: 33.

În unele realizări, pot fi utilizați anticorpii anti-PD1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 34 și VL din SEQ ID NO: 35.

În unele realizări, pot fi utilizați anticorpii anti-TIM-3 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 36 și VL din SEQ ID NO: 37.

55 În unele realizări, pot fi utilizați anticorpii anti-TIM-3 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 38 și VL din SEQ ID NO: 39.

SEQ ID NO: 32

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGGIPIF

DTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL

DYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 33

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT

GIPARFSCSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 34

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYDMSWVRQAPGKGLSVAYISGG
GANTYYLDNVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYSYFDVWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 35

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSDYLHWYQQKPGQAPRLIISASQSSISG
IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNGHSFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 36

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 37

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNDYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQGGHAPITFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 38

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLEWMAIYP
GDGDIRYTQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARWEKSTTVQ
RNYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 39

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCKASENVGTFVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRY
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCGQSYSPYTFGQGTKLEIK

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 32 și VL din SEQ ID NO: 33 pe o perioadă de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 34 și VL din SEQ ID NO: 35 pe o durată de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-TIM-3 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 36 și VL din SEQ ID NO: 37 pe o durată de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Divulgarea se referă de asemenea la o metodă de tratare a unui pacient având o tumoare solidă, cuprinzând administrarea la pacientul care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp care se leagă specific la CD38, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5 în combinație cu un anticorp anti-TIM-3 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 38 și VL din SEQ ID NO: 39 pe o durată de timp suficientă pentru a trata tumoarea solidă.

Combinația dintre anticorpii care se leagă specific la CD38 și cel de al doilea agent terapeutic poate fi administrată pe orice cadru de timp convenabil. De exemplu, anticorpii care se leagă specific la CD38 și cel de al doilea agent terapeutic pot fi administrați unui pacient în aceeași zi, și chiar în aceeași perfuzie intravenoasă. Totuși, anticorpii care se leagă specific la CD38 și cel de al doilea agent terapeutic pot fi de asemenea administrați în zile alternative sau săptămâni sau luni alternative, și altele asemănătoare. În unele metode, anticorpii care se leagă specific la CD38 și cel de al doilea agent terapeutic pot fi administrați cu suficientă proximitate în timp astfel ca ele să fie prezente simultan (de exemplu, în ser) la niveluri detectabile în pacientul care este tratat. În unele metode, un curs întreg de tratament cu anticorpii care se leagă specific la CD38, constă dintr-un număr de doze pe o perioadă de timp, care este urmat sau precedat de un curs de tratament cu al doilea agent terapeutic, constând dintr-un număr de doze. O perioadă de recuperare de 1, 2 sau câteva zile sau săptămâni poate fi utilizată între administrarea anticorpului care se leagă specific la CD38 și cel de al doilea agent terapeutic.

Anticorpii care se leagă specific la CD38, sau o combinație dintre anticorpii care se leagă specific la CD38 și cel de al doilea agent terapeutic, pot fi administrate împreună cu orice formă de

terapie cu radiație, incluzând radiația cu fascicul extern, terapia cu radiație modulată în intensitate (IMRT), radiații concentrate, și orice formă de radiochirurgie incluzând Gama knife, Cyberknife, Linac, și radiația interstițială (de exemplu semințe radioactive implantate, balon GriaSite), și/sau cu chirurgie.

Metodele de radiații concentrate care pot fi utilizate includ radiochirurgia stereotactică, radiochirurgia stereotactică fracționată, și terapia cu radiație modulată în intensitate (IMRT). Este evident că radiochirurgia stereotactică implică furnizarea precisă a radiației la un țesut tumoral, de exemplu, o tumoare cerebrală, în timp ce se evită țesutul netumoral, normal din jur. Dozajul de radiație aplicată utilizând radiochirurgia stereotactică poate varia, de obicei de la 1 Gy până la aproximativ 30 Gy, și poate cuprinde intervale intermediare incluzând, de exemplu, de la 1 până la 5, 10, 15, 20, 25, până la 30 Gy în doză. Din cauza dispozitivelor de fixare neinvazive, radiația stereotactică nu trebuie să fie livrată într-un singur tratament. Planul de tratament poate fi duplicat în mod fiabil de la zi la zi, permițând prin urmare livrarea mai multor doze de radiație fracționate. Când este utilizată pentru a trata o tumoare în timp, radiochirurgia este cea la care se face referire ca „radiochirurgie stereotactică fracționată” sau FSR. În schimb, radiochirurgia stereotactică se referă la un tratament cu o singură sesiune. Radiochirurgia stereotactică fracționată poate conduce la un raport terapeutic ridicat, adică, o rată ridicată de ucidere a celulelor tumorale și un efect redus asupra țesutului normal. Tumoarea și țesutul normal răspund diferit la doze unice ridicate de radiație vs. mai multe doze mai mici de radiație. Dozele mari unice de radiație pot ucide mai multe țesuturi normale decât o pot face câteva doze mai mici de radiație. Corespunzător, mai multe doze mai mici de radiație pot ucide mai multe celule tumorale în timp ce menajează țesutul normal. Dozajul de radiație aplicat utilizând radiația stereotactică fracționată poate varia în intervalul de la 1 Gy până la aproximativ 50 Gy, și poate cuprinde intervale intermediare incluzând, de exemplu, de la 1 până la 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, până la 50 Gy în doze hipofracționate. Terapia cu radiație modulată în intensitate (IMRT) poate fi de asemenea utilizată. IMRT este un mod avansat de terapie cu radiație conformă tridimensională de precizie ridicată (3DCRT), care utilizează acceleratori liniari controlați de calculator pentru a livra doze precise de radiație la o tumoare malignă sau la zone specifice din tumoare. În 3DCRT, profilul fiecărui fascicul de radiație este modelat să se potrivească cu profilul țintei din vederea oculară a fascicolului (BEV) utilizând un colimator multifrunză (MLC), producând prin urmare un număr de fascicule. IMRT permite dozei de radiație să se conformeze mai precis la forma tridimensională (3-D) a tumorii prin modularea intensității fasciculului de radiație în mai multe volume mici. Corespunzător, IMRT permite ca doze mai ridicate de radiație să fie concentrate la regiuni din tumoare în timp ce minimizează doza către structurile critice normale din jur. IMRT îmbunătățește capacitatea de a conforma volumul de tratament cu formele concave ale tumorii, de exemplu, când tumoarea este înfășurată în jurul unei structuri vulnerabile, cum ar fi măduva spinării sau un organ major sau vas de sânge.

Administrarea subcutanată a compozițiilor farmaceutice cuprinzând un anticorp care se leagă specific la CD38 și o hialuronidază

Anticorpul care se leagă specific la CD38 poate fi administrat subcutanat ca compoziție farmaceutică cuprinzând anticorpul care se leagă specific la CD38, și o hialuronidază.

Concentrația de anticorp care se leagă specific la CD38 din compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate fi de aproximativ 20 mg/ml.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde între aproximativ 1.200 mg – 1.800 mg de anticorp care se leagă specific la CD38.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde aproximativ 1.200 mg de anticorp care se leagă specific la CD38.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde aproximativ 1.600 mg de anticorp care se leagă specific la CD38.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde aproximativ 1.800 mg de anticorp care se leagă specific la CD38.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde între aproximativ 30.000 U – 45.000 U de hialuronidază.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde aproximativ 1.200 mg de anticorp care se leagă specific la CD38 și aproximativ 30.000 U de hialuronidază.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde aproximativ 1.800 mg de anticorp care se leagă specific la CD38 și aproximativ 45.000 U de hialuronidază.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde aproximativ 1.600 mg de anticorp care se leagă specific la CD38 și aproximativ 30.000 U de hialuronidază.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde aproximativ 1.600 mg de anticorp care se leagă specific la CD38 și aproximativ 45.000 U de hialuronidază.

Compoziția farmaceutică administrată subcutanat poate cuprinde hialuronidază rHuPH20 având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 40.

rHuPH20 este o hialuronidază recombinantă (HYLENEXOO recombinant) și este descrisă în publicația de brevet internațională nr. WO2004/078140.

- 5 Hialuronidaza este o enzimă care degradează acidul hialuronic (EC 3.2.1.35) și scade vâscozitatea hialuronanului în matricea extracelulară, crescând prin urmare permeabilitatea țesutului.

SEQ ID NO: 40

MGVLKFKHIEFRSFVKSSGVSQIVFTFLIPCCITLNERAPPVIPNVPLWAWNAPS
EFCIGKFEPLDMSLPSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIP
QKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRS
IELVQQQNVQLSLTEATEKAKQFEFEKAGEDFLVETIKLGLKLLRPNHILWGYYLFPD
CYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNBDSLWLNWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLY
VRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGA
SGHVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAARMCSQVLCQEQQVCIR
KNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTYRGKPTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCK
EKADVKTDTAVDVCIADGVCIDAFLEKPPMETEEOHIFYNASFTLSATMFTVSILFLI
ISSVASL

- 10 Administrarea compoziției farmaceutice care cuprinde anticorpul care se leagă specific la CD38, și hialuronidaza, poate fi repetată după o zi, două zile, trei zile, patru zile, cinci zile, șase zile, o săptămână, două săptămâni, trei săptămâni, patru săptămâni, cinci săptămâni, șase săptămâni, șapte săptămâni, două luni, trei luni, patru luni, cinci luni, șase luni sau mai mult. Cursurile repetate de tratament sunt de asemenea posibile, ca și la administrarea cronică. Administrarea repetată poate fi la aceeași doză sau la o doză diferită. De exemplu, compoziția farmaceutică cuprinzând anticorpul care se leagă specific la CD38 și hialuronidază, poate fi administrată o dată săptămânal timp de opt săptămâni, urmată de o dată la două săptămâni timp de 16 săptămâni, urmată de o dată la patru săptămâni. Compozițiile farmaceutice care urmează să fie administrate pot cuprinde aproximativ 1.200 mg de anticorp care se leagă specific la CD38, și aproximativ 30.000 U de hialuronidază, în care concentrația de anticorp care se leagă specific la CD38 în compoziția farmaceutică este de aproximativ 20 mg/ml.
- 20 Compozițiile farmaceutice care urmează să fie administrate pot cuprinde aproximativ 1.800 mg de anticorp care se leagă specific la CD38 și aproximativ 45.000 U de hialuronidază. Compozițiile farmaceutice care urmează să fie administrate pot cuprinde aproximativ 1.600 mg de anticorp care se leagă specific la CD38 și aproximativ 30.000 U de hialuronidază. Compozițiile farmaceutice care urmează să fie administrate pot cuprinde aproximativ 1.600 mg de anticorp care se leagă specific la CD38 și aproximativ 45.000 U de hialuronidază.

Compoziția farmaceutică cuprinzând anticorpul care se leagă specific la CD38 și hialuronidaza poate fi administrată subcutanat în regiunea abdominală.

Compoziția farmaceutică cuprinzând anticorpul care se leagă specific la CD38 și hialuronidaza, poate fi administrată într-un volum total de aproximativ 80 ml, 90 ml, 100 ml, 110 ml sau 120 ml.

- 30 Pentru administrare, 20 mg/ml de anticorp care se leagă specific la CD38 în 25 mM acetat de sodiu, 60 mM clorură de sodiu, 140 mM D-manitol, 0,04% polisorbato 20, la pH 5,5, pot fi amestecate cu rHuPH20, 1,0 mg/mL (75-150 kU/mL) în 10 mM L-histidină, 130 mM NaCl, 10 mM L-metionină, 0,02% polisorbato 80, la pH 6,5 înainte de administrarea amestecului la un subiect.

- 35 În timp ce s-a descris invenția în termeni generali, realizările invenției vor fi divulgate mai departe în următoarele exemple, care nu trebuie să fie interpretate ca limitând domeniul de aplicare al revendicărilor.

Exemplul 1. Materiale și metode generale Colectarea și procesarea mostrei

- Aspiratele din sângele periferic și măduva osoasă au fost colectate în tuburi heparinizate la momentul inițial imediat înainte de prima perfuzie și la momentele de timp specificate în timpul tratamentului. Majoritatea mostrelor au fost evaluate utilizând citometria de flux în timp real, pe măsură ce ele au ajuns la un laborator central, la 24-48 ore după colectare. Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC-uri) au fost obținute din sângele integral, izolate prin centrifugare cu gradient de densitate, și depozitate congelate până la analiză. Pentru activarea celulelor T, clonalitate, și teste de supresie a Treg CD38⁺, mostrele pre și posttratament au fost analizate în același timp, utilizând mostre PBMC congelate.
- 40
- 45

Analiza citometrică a fluxului acestor mostre a fost efectuată la laboratorul central global BARC pentru evaluarea celulelor NK, T, B, de mielom (CD138⁺) și a expresiei CD38 utilizând un test de imunofenotipare prevalidat. Pe scurt, mostrele de sânge și mostrele de măduvă osoasă au fost colorate cu următoarele panouri de anticorpi multifluorocrome: panou de descendență celulară: PerCP-Cy5,5-CD19 (clonă HIB19; Becton Dickinson [BD]), APC-CD24 (SN3; eBioscience), PC7-CD3 (UCHT-1; Beckman Coulter), V500-CD16 (3G8; BD), și PE-CD56 (MY; BD); panou de celule T reglatoare (T_{reg}): APC-CD25 (2A3; BD), PE-CD127 (HIL-7RM21; BD), APC-H7-CD4 (RPA-T4; BD), și PerCP-CD4 (L200; BD); panou de celule T naive/de memorie: APC-H7-CD4 (RPA-T4; BD), PerCP-Cy5,5-CD8 (RPA-T4 BD), PE-CD62L (SK11; BD), și APC-CD45RA (HI100; BD). Expresia CD38 a fost evaluată utilizând anticorpii marcați cu Alexa 647, mAb 003 descris în brevetul S.U.A. nr. 7.829.693 având secvențele VH și VL din SEQ ID NO: 14 și SEQ ID NO: 15. Mostrele de sânge au fost preparate utilizând diferite metode de spălare cu liză. Pentru mostrele de aspirate de măduvă osoasă, a fost efectuată o colorare fie a membranei sau fie intracelulară cu diferiți anticorpi. Soluția de FACS Lizare Becton Dickinson a fost utilizată pentru lizarea celulelor roșii sanguine din mostrele de sânge periferic și reactivii de permeabilizare ai celulelor Fix și Perm de la Invitrogen, au fost utilizați pentru colorarea intracelulară a mostrelor aspirate de măduvă osoasă. Mostrele colorate au fost obținute pe citometre de flux FACS Canto II și datele au fost analizate utilizând software-ul FACS Diva. A fost determinat numărul absolut de populații de celule imune din mostrele de sânge și ca procente de limfocite în mostrele de măduvă osoasă la toate momentele de timp testate.

Secvențierea receptorului celulelor T (TCR)

Diversitatea celulelor T a fost analizată prin secvențierea profundă a rearanjamentelor TCR pentru a evalua clonalitatea celulelor T CD8⁺ utilizând ADN genomic din mostrele PBMC. Secvențierea TCR a fost efectuată utilizând testul comercial Immunoseq[™] Adaptive

Biotechnologies, și analiza a fost efectuată utilizând teste precalificate de reacție în lanț mediată de polimeraza multiplex (PCR) (TR2015CRO-V-019), care au fost compuse din inițiatori direcți și inverși care au țintit direct familia de gene variabile (V) (inițiatori direcți) și de gene de alaturare (J) (inițiatori inverși). Fiecare inițiator al genelor V și J a acționat ca perechi de inițiatori pentru a amplifica TCR-urile recombinante somatic, și fiecare inițiator a conținut o secvență ADN universală specifică. După amplificarea PCR inițială, fiecare amplicon a fost amplificat a doua oară cu inițiatori direcți și inverși conținând secvența universală și secvența adaptor necesare pentru secvențierea ADN de către Illumina.

Răspunsurile celulelor T la antigeni virali și aloantigeni

PBMC-urile pacientului au fost însămânțate pe plăci cu 96 de godeuri (2×10⁵ celule/godeu) și stimulate timp de 5 zile cu un cocktail de 23 de peptide virale majore restricționate de clasă I a complexului de histocompatibilitate (MHC) de la citomegalovirusul uman (CMV), virusul Epstein-Barr (EBV), și virusul gripal (2 μg/ml; grup de peptide CEF; PANATecs[®]) sau un număr echivalent de PBMC-uri alogeneice iradiate cu 25-Gy, de la donatori sănătoși. PBMC-urile nestimulate și PBMC-urile stimulate cu perle acoperite cu anti-CD3/CD28 au servit ca controale negative și respectiv pozitive. În ziua 5, interferonul γ (IFN-γ) din supernatantul fără celule a fost măsurat prin test sandwich cu imunosorbant legat de enzimă (ELISA; ELISA gama IFN uman gata setat de funcționare; eBioscience) și servit ca marker surrogat pentru activarea celulelor T.

Supresia de către celulele T reglatoare (Treg) a funcțiilor celulelor efectoare: test de diluție al succinimidil carboxifluoresceinei (CFSE)

PBMC-urile de la donatorii sănătoși au fost etichetate cu PerCP-Cy5,5-CD3 (SK7; BD), KO-CD45, (J33; Beckman Coulter), V450-CD4 (SK3; BD), PE-CD25 (M-A251, BD), PE-Cy7-CD127 (HIL-7R-M21; BD), și APC-CD38 (HB-7; BD) și sortate după aria FACS (BD). Celulele efectoare sortate au fost etichetate cu ester succinimidil de carboxifluoresceină (CFSE; eBioscience) și stimulate cu perle acoperite cu anti-CD3/CD28 în prezența sau absența Tregurilor CD38⁺ sau a Tregurilor CD38⁻ (raport 1:1 între Treg-uri și celulele efectoare) în RPMI plus 10% ser fetal de vițel. După 72 ore, a fost efectuată citometria de flux și diluția procentuală a CFSE a fost utilizată ca surrogat pentru proliferarea celulelor T.

Fenotiparea celulelor supresoare derivate din mieloide (MDSC) și a ADCC-urilor mediate de DARZALEX[™] (daratumumab)

PBMC-urile de la trei donatori sănătoși normali au fost cocultivate cu linii celulare tumorale de mielom (RPMI8226, U266, H929) timp de șase zile, și evaluate pentru producția de MDSC-uri granulocitare (G-MDSC) (CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁺CD15⁺CD33⁺) cum s-a descris în Gorgun și colab., Blood 121:2975-87, 2013. G-MDSC-urile nu au fost prezente în PBMC-urile sănătoase normale, totuși, după cocultura cu toate cele trei linii celulare de mielom, G-MDSC-urile au fost prezente ca 5-25% din totalul populației de PBMC-uri (datele nu sunt prezentate). Strategia de intrare pentru evaluarea citometrică a fluxului G-MDSC-urilor a inclus CD11b⁺ ca primă intrare, urmată de intrarea lui CD14⁺ și

HLA-DR⁺, și urmate apoi de intrarea lui CD15⁺ și CD33⁺. G-MDSCurile au fost sortate celular și evaluate pentru nivelurile de expresie CD38 și sensibilitatea la

ADCC-uri mediată de DARZALEX™ (daratumumab). Pentru a evalua efectul DARZALEX™ (daratumumab) asupra ADCC/CDC ale MDSC-urilor, la testele ADCC s-a adăugat complement care conține ser sau un control cu izotip.

Analiza celulelor T naive și de memorie

Mostrele heparinizate din sângele periferic au fost obținute de la pacienți înainte de fiecare perfuzie de DARZALEX™ (daratumumab). Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) au fost izolate prin centrifugare Ficoll-Hypaque cu gradient de densitate și depozitate în mediu de crioconservare (RPMI suplimentat cu 10% ser uman și 10% dimetil sulfoxid) în azot lichid. Pentru analiza FACS, PBMC-urile au fost dezghețate și 2×10⁶ celule/panou au fost resuspendate în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) cu 0,05% azidă și 0,1% HAS.

Analiza datelor

Toate analizele de date și generarea de grafice relevante au fost efectuate exclusiv utilizând software-ul R (R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011, ISBN 3900051-07-0 <http://www.R-project.org/>). Toți subiecții tratați cu un răspuns evaluabil au fost incluși în analizele de date. În mod consistent, respondenții sunt definiți ca subiecți cu un cel mai bun răspuns per IRC al sCR, VGPR și PR, și nerespondenții sunt definiți ca subiecți cu un cel mai bun răspuns per IRC al MR, SD și PD.

Diferitele comparații statistice au inclus (i) nivelurile inițiale între respondenți și nerespondenți, (ii) valori inițiale versus de tratament pentru respondenți și pentru nerespondenți, (iii) modificări procentuale între respondenți și nerespondenți, (iv) modificările raportului valorilor inițiale versus de tratament. Fiecare comparație a inclus mai întâi un test pentru normalitate cu un test Shapiro-Wilk (Royston (1995) Remark AS R94: A remark on Algorithm AS 181: The W test for normality. Applied Statistics, 44, 547-551). Aproape exclusiv, s-a constatat că datele nu au o distribuție normală. Testarea nivelului diferențial a inclus efectuarea atât a unui test neparametric de sumă a rangului Wilcoxon (Hollander și Wolfe (1973), Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons. Paginile 27-33 (o mostră), 68-75 (două mostre), cât și testarea după o transformare Box Cox (Weisberg, S. (2014) Applied Linear Regression, ediția a patra, Wiley Wiley, Capitolul 7). Pentru transformarea Box Cox, s-a adăugat un număr mic (1e07) la valorile egale cu zero. În toate cazurile, cele două teste au corespuns. Valorile p ale testului Wilcoxon cu suma rangului sunt prezentate în tabelele din specificație, dacă nu se indică altfel. La testarea diferențelor dintre valorile inițiale versus de tratament pentru respondenți și nerespondenți, a fost efectuat un test cu două grupuri împerecheate per subiect, în toate celelalte cazuri fiind efectuat un test cu două grupuri neîmperecheate.

Deoarece mostrele pentru analiza diferitelor populații de limfocite nu au fost luate la momente identice de timp pentru diferitele programe de dozare, a fost efectuată modelarea populației. Ajustarea modelului a fost făcută pe rangul vizitelor. Modelarea populației pe celulele NK totale și activate a implicat ajustarea unui model rupt lipit (Lutz și colab., „Statistical model to estimate a threshold dose and its confidence limits for the analysis of sublinear dose-response relationships, exemplified for mutagenicity data”. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 678.2 (2009): 118-122.). Modelele liniare cu efect mixt cu interceptare aleatorie și pantă au fost ajustate în datele populației de pacienți cu subpopulații de celule B, celule T, și leucocite, monocite, neutrofile și limfocite (Bates și colab., (2014). „lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4”. ArXiv e-print; depusă la Journal of Statistical Software, <http://arxiv.org/abs/1406.5823>). Această modelare liniară mixtă a fost făcută în ziua relativă de la începerea tratamentului (ADY). Ajustarea modelului liniar mixt a fost făcută pe variabilele de răspuns transformate logaritmice. În cazul valorilor variabilelor de răspuns egale cu zero, s-a adăugat 0,1 la toate valorile variabilelor de răspuns pentru a permite modelarea pe scară logaritmă.

Exemplul 2. Conceptul studiului 54767414MMY2002 (SIRIUS)

Populația țintă pentru studiul 54767414MMY2002 (SIRIUS) o constituie pacienții cu mielom multiplu avansat care au primit cel puțin 3 linii anterioare de terapie incluzând un inhibitor de proteazom (PI) și un medicament imunomodulator (IMiD) sau dublu refractar la un PI și un IMiD. Evaluările răspunsului pentru analiza obiectivului primar/final au fost pe baza evaluărilor de la un Comitet de revizuire independent (IRC) și de la un algoritm computerizat, utilizând instrucțiunile IMWG 2011 (Raport studiu clinic: un studiu de fază 2, cu etichetă deschisă, multicentru care investighează eficacitatea și siguranța DARZALEX™ (daratumumab) la subiecții cu mielom multiplu care au primit cel puțin 3 linii anterioare de terapie (incluzând un inhibitor de proteazom și IMiD) sau sunt dublu refractari la inhibitorul de proteazom și la un IMiD (EDMS-ERI-92399922; de Weers și colab., (2011) J Immunol 186(3): 1840-1848).

Aceste evaluări au inclus: rata de răspuns global (ORR), durata răspunsului, timpul de răspuns și cel mai bun răspuns, rata beneficiului clinic, timpul până la progres (TTP), supraviețuirea fără progres (PFS), și supraviețuirea globală (OS).

Un total de 124 de subiecți au fost tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) în acest studiu (de Weers și colab., (2011) J Immunol 186(3): 1840-1848). 18 subiecți au fost tratați cu 8 mg/kg și 106 subiecți au fost tratați cu 16 mg/kg. Programul de dozare a fost după cum urmează:

Grupul A: DARZALEX™ (daratumumab) 16 mg/kg: Ciclurile 1 și 2: zilele 1, 8, 15, și 22 (săptămânal), ciclurile 3 până la 6: zilele 1 și 15 (în fiecare altă săptămână), ciclurile 7+: ziua 1 (la fiecare 4 săptămâni). Fiecare ciclu a fost de 4 săptămâni.

Grupul B: DARZALEX™ (daratumumab) 8 mg/kg: Ciclul 1+: ziua 1 (la fiecare 4 săptămâni).

Obiectivul primar al studiului a fost de a determina eficacitatea a 2 regimuri de tratament cu DARZALEX™ (daratumumab), după cum s-a măsurat prin ORR (CR + PR), la subiecții cu mielom multiplu care au primit cel puțin 3 linii anterioare de terapie incluzând un PI și un IMiD, sau a căror boală este dublu refractară atât la un PI cât și la un IMiD (raport studiu clinic: un studiu de fază 2, cu etichetă deschisă, multicentru, care investighează eficacitatea și siguranța DARZALEX™ (daratumumab) la subiecții cu mielom multiplu care au primit cel puțin 3 linii anterioare de terapie (incluzând un inhibitor de proteazom și IMiD), sau sunt dublu refractari la un inhibitor de proteazom și un IMiD. EDMS-ERI-92399922).

Obiectivele secundare ale acestui studiu au inclus evaluarea siguranței și tolerabilității DARZALEX™ (daratumumab), demonstrarea unor măsuri suplimentare de eficacitate (de ex., beneficiu clinic, TTP, PFS, și OS) împreună cu evaluarea farmacocineticii, imunogenității, farmacodinamicilor, și explorarea biomarkerilor predictivi ai răspunsului la DARZALEX™ (daratumumab). Informații suplimentare legate de studiu sunt disponibile din protocolul studiului clinic (raport studiu clinic: un studiu de fază 2, cu etichetă deschisă, multicentru, care investighează eficacitatea și siguranța DARZALEX™ (daratumumab) la subiecții cu mielom multiplu care au primit cel puțin 3 linii anterioare de terapie (incluzând un inhibitor de proteazom și IMiD), sau sunt dublu refractari la un inhibitor de proteazom și la un IMiD. EDMSERI-92399922).

În etapa 1 a părții 1, 1 subiect (6%) a răspuns din grupul cu 8 mg/kg, și 5 subiecți (31%) au răspuns din grupul cu 16 mg/kg. Prin urmare, numai grupul cu 16 mg/kg a fost extins în etapa 2 a părții 1 și în partea 2.

În grupul cu 16 mg/kg, 31 subiecți au obținut răspuns de PR sau mai bun pe baza evaluării IRC; ORR a fost 29% (95% CI: 21%, 39%). Trei subiecți (3%) au obținut sCR, și 13 subiecți (12%) au obținut VGPR sau mai bine.

Exemplul 3. Efectul DARZALEX™ (daratumumab) asupra expansiunii și activității celulelor T la pacienții înscriși în studiul 54767414MMY2002 (SIRIUS)

CD38 este exprimată pe o varietate de celule imune și hematopoietice. Profilarea imună amplă prin citometrie de flux a fost efectuată pentru a examina efectul

DARZALEX™ (daratumumab) asupra subseturilor de celule imune și asocierea nivelurilor inițiale ale acestor celule cu răspunsul clinic. Diferite populații de celule, incluzând celulele T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ și celulele T reglatoare (Treg)), celulele B (CD19⁺), celulele NK, monocitele (CD14⁺), leucocitele, și neutrofilele au fost evaluate prin citometrie de flux în aspiratele din sângele periferic și măduva osoasă, inițial și după tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) pentru a monitoriza modificările în aceste populații celulare la respondenți și nerespondenți.

Limfocite, leucocite, monocite și neutrofile

Numărul de leucocite, limfocite, monocite, și neutrofile a fost studiat în sângele periferic la respondenți și nerespondenți. S-a găsit că limfocitele totale au crescut cu tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) la respondenți atât cu doza de 8 mg/kg cât și cu doza de 16 mg/kg (**Figura 1**). Modelarea liniară cu efect mixt a dezvăluit o creștere de $0,8 \times 10^6$ celule/ μ L pe scară logaritmică per 100 zile (CI = 0,06, 0,11). O creștere ușoară a fost găsită pentru monocite și leucocite cu o creștere semnificativă de $0,03 \times 10^6$ celule/ μ L (CI = 0,01, 0,04) și $0,03 \times 10^6$ celule/ μ L pe scară logaritmică (CI = 0,01, 0,05) pentru fiecare 100 zile respectiv. Numărul median de neutrofile a fost consistent cu valorile inițiale și nu a variat semnificativ, deși s-a observat neutropenie la unii pacienți.

Nivelurile inițiale ale fiecăreia din aceste populații celulare au fost comparate între grupurile de răspuns. Nu s-a găsit nici o dovadă că nivelurile inițiale sunt diferite pentru oricare din aceste tipuri de celule între grupurile de răspuns utilizând testul Wilcoxon cu rang semnat (Tabelul 1).

Tabelul 1.

Număr inițial de celule în sângele periferic la respondenți vs nerespondenți						
		N	Median	Medie (SD)	Interval	Valoare p*
Leucocite: R		33	4,3	4,32 (1,65)	(1,6; 8,8)	
Leucocite: NR		82	4,19	4,77 (2,26)	(2,13; 13,8)	0,60987
Limfocite: R		33	0,9	1,09 (0,59)	(0,27; 2,67)	
Limfocite: NR		82	1	1,05 (0,55)	(0,3; 2,8)	0,85028
Monocite: R		33	0,43	0,5 (0,25)	(0,2; 0,97)	
Monocite: NR		82	0,5	0,51 (0,25)	(0,04; 1,3)	0,72803
Neutrofile: R		33	2,47	2,54 (1,23)	(1,06; 5,94)	
Neutrofile: NR		82	2,44	3,05 (2,08)	(1; 11,7)	0,40373
N: număr de mostre per grup						
R: respondent						
NR: nerespondent						
*nerespondent vs respondent						
SD: deviație standard						

Celule NK

Celulele NK totale (CD16⁺CD56⁺) și celulele NK activate (CD16⁺CD56^{dim}) au fost reduse cu tratamentul cu DARZALEXTM (daratumumab) în timp (datele nu sunt prezentate).

Celule B

Numărul absolut de celule B (CD45⁺CD3⁻CD19⁺) a fost măsurat în aspiratele din sângele periferic sau măduva osoasă în timpul tratamentului cu DARZALEXTM (daratumumab) în timp, la respondenți și nerespondenți. Celulele B au crescut ușor în sângele integral și s-au menținut în aspiratele măduvei osoase. Modelarea liniară mixtă a celulelor B în sângele periferic a dezvăluit o creștere minimală de $0,1 \times 10^6$ celule/ μ L [CI=0,04, 0,16 pentru fiecare 100 zile pe scară logaritmică în decursul tratamentului cu DARZALEXTM (daratumumab). Nu au fost modificări în procentajul de celule B (CD45⁺CD3⁻CD19⁺/limfocite) în aspiratele din măduva osoasă în timpul tratamentului cu daratumumab, fie la respondenți sau fie la nerespondenți ($p = 0,1$ și respectiv $0,4$). În plus, nu s-a constatat nici o dovadă că numărul de celule B inițial ar fi diferit între respondenți și nerespondenți ($p = 0,5$).

Celule T

S-a observat că limfocitele au crescut cu tratamentul cu DARZALEXTM (daratumumab) (**Figura 1**) chiar dacă celulele B au prezentat doar o creștere minimală (vezi mai sus). Pentru a investiga în continuare, au fost studiate diferite populații de celule T (celule T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, celule T reglatoare) atât în sângele periferic cât și în măduva osoasă.

Celulele T CD3⁺, CD4⁺ și CD8⁺ au crescut în sângele periferic (atât numărul absolut/ μ L cât și procentajul de limfocite) după tratamentul cu DARZALEXTM (daratumumab). **Figura 2** prezintă modificarea procentuală a numărului absolut de celule T CD3⁺ (CD45⁺CD3⁺) față de valorile inițiale în sângele periferic în timp pentru fiecare pacient. Linia neagră din figură prezintă numărul absolut median $\times 10^6$ celule/ μ L pentru toți pacienții. În figură au fost incluse doar vizitele cu mai mult de 2 observații. **Figura 3** prezintă modificarea % a numărului absolut de celule T CD4⁺ (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) față de valorile inițiale în sângele periferic în timp, pentru fiecare pacient. Linia neagră din Figură prezintă mediana pentru toți pacienții. În figură au fost incluse doar vizitele cu mai mult de 2 observații. **Figura 4** prezintă modificarea % a numărului absolut de celule T CD8⁺ (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) față de valorile inițiale în sângele periferic în timp, pentru fiecare pacient. Linia neagră din Figură prezintă mediana pentru toți pacienții. În figură au fost incluse doar vizitele cu mai mult de 2 observații. Modelarea liniară mixtă a

numărului absolut în sângele periferic, a dezvăluit în medie o creștere a celulelor T totale (CD45⁺CD3⁺) de $0,13 \times 10^6$ celule/μl pe scară logaritmică pentru fiecare 100 zile (CI = 0,1, 0,15) după tratamentul cu DARZALEX[™] (daratumumab). S-a constatat că celulele T CD8⁺ au crescut semnificativ cu $0,16 \times 10^6$ celule/μl pe scară logaritmică pentru fiecare 100 zile (CI = 0,13, 0,19). S-a constatat că celulele CD4⁺ au o creștere moderată de $0,11 \times 10^6$ celule/μl pe scară logaritmică pentru fiecare 100 zile (CI = 0,09, 0,13).

Pentru fiecare din subpopulațiile de celule T, respondenții au prezentat o modificare procentuală maximă mai ridicată a numărului absolut inițial decât nerespondenții (CD3⁺ p=3,2993e-05; CD4⁺ p=3,486e-05; CD8⁺ p=2,7172e-05; celule T reglatoare p=0,002). **Tabelul 2** prezintă rezultatele testului Wilcoxon cu rang semnat pentru comparația fiecărei subpopulații de celule T din sângele periferic între respondenți și nerespondenți pentru modificarea procentuală a numărului absolut inițial.

Tabelul 2.

Modificare procentuală a numărului absolut de celule; sânge periferic					
Mostră	N	Median	Medie (SD)	Interval	Valoare p*
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	33	86,76	118,91 (104,07)	(-16,1; 398,71)	
Modificare procentuală a numărului absolut de celule; sânge periferic					
Mostră	N	Median	Medie (SD)	Interval	Valoare p*
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	80	28,08	43,02 (69,55)	(-67,11; 286,67)	3,30E-05
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	33	72,08	77,74 (60,99)	(-21,05; 233,21)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : NR	80	19,48	29,36 (59,58)	(-68; 298,89)	3,49E-05
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : R	33	106,6	180,81 (192,37)	(-7,07; 760,51)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : NR	80	32,24	63,96 (112,44)	(-66,22; 588,89)	2,72E-05
	N: număr de mostre per grup				
	R: respondent				
	NR: nerespondent				
	*respondent vs. Nerespondent				
	SD: deviație standard				

În mod similar în măduva osoasă, s-a constatat că celulele T totale (CD45⁺CD3⁺ ca procentaj de limfocite) și celulele T CD8⁺ (CD45⁺CD3⁺CD8⁺ ca procentaj de limfocite) cresc semnificativ în timpul tratamentului cu DARZALEX[™] (daratumumab), atât pentru respondenți cât și pentru nerespondenți (respondenți CD3⁺ p=3,8147e-06, nerespondenți p=9,8225e-05; respondenți CD8⁺ p=3,8147e-06, nerespondenți p=0,0003). Nu a existat nici o modificare în celulele T CD4⁺ mediane din măduva osoasă din nici un grup de răspuns clinic. **Tabelul 3** prezintă rezultatele testului Wilcoxon cu rang semnat pentru diferite celule T ca % de limfocite în măduva osoasă. **Figura 5** prezintă procentajul (%) de celule CD45⁺CD3⁺ în timp, în timpul tratamentului cu DARZALEX[™] (daratumumab) (atât respondenții cât și nerespondenții sunt incluși în grafic). **Figura 6** prezintă % de celule CD45⁺CD3⁺CD8⁺ în timp, în timpul tratamentului cu DARZALEX[™] (daratumumab) (atât respondenții cât și nerespondenții sunt incluși în grafic).

Tabelul 3.

Populații de celule T (% din limfocite) în măduva osoasă					
Mostră		NR: valori inițiale	NR: pe tratament	R: valori inițiale	R: pe tratament
CD45 ⁺ CD3 ⁺ /limfocite	N	29	29	19	19

	Mediană	72,2	83,6	77,9	91,4
	Medie (SD)	68,57 (13,64)	80,93 (11,57)	71,82 (14,92)	87,67 (9,49)
	Interval	(36,3; 94,5)	(50,9; 97,4)	(42,2; 94,8)	(63,3; 97,2)
	Valoare p*		9,8225e-05		3,8147e-06
CD45+CD3+CD4+/ limfocite	N	29	29	19	19
	Mediană	33,7	29,2	22,7	22,8
	Medie (SD)	31,24 (12,14)	32,96 (12,57)	24,18 (7,37)	24,29 (9,58)
	Interval	(6,3; 54,2)	(9,6; 60,9)	(8,1; 36,6)	(12,5; 45,4)
	Valoare p*		0,18351		0,98432
Populații de celule T (% din limfocite) în măduva osoasă					
Mostră		NR: valori inițiale	NR: tratament	pe R: valori inițiale	R: tratament
CD45+CD3+CD8+/ limfocite	N	29	29	19	19
	Mediană	36,3	43,3	49,4	66,9
	Medie (SD)	37,39 (13,64)	47,74 (18,14)	46,91 (14,89)	62,82 (12,79)
	Interval	(15,9; 67,2)	(18,5; 81)	(24,5; 79,6)	(33,1; 83,3)
	Valoare p*		0,00026883		3,8147e-06
	N: număr de mostre per grup				
	R: respondenți				
	NR: nerespondenți				
	*valori inițiale vs. pe tratament pentru grupul de respondenți sau nerespondenți				
	SD: deviație standard				

În timp ce atât respondenții cât și nerespondenții au demonstrat creșteri ale celulelor T în sângele periferic și măduva osoasă, respondenții au avut cea mai mare modificare procentuală față de valorile inițiale. Pentru a distinge dacă respondenții sau nerespondenții au avut diferite niveluri ale celulelor T CD3⁺, CD4⁺ și CD8⁺ înainte de tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab), au fost comparate măsurătorile inițiale ale fiecărui subgrup în sângele periferic.

Nu au fost diferențe semnificative statistic între respondenți și nerespondenți în numărul inițial absolut de celule T în sângele periferic (**Tabelul 4**) sau în procentajul de celule T din limfocitele totale din măduva osoasă (**Tabelul 5**), test Wilcoxon cu rang semnat.

Tabelul 4.

Numărul inițial absolut de celule din sângele periferic înainte de tratament					
Mostră	N	Mediană	Medie (SD)	Interval	Valoare p*
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	33	574	715,91 (472,54)	(186; 2096)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	80	638	672,5 (426,36)	(85; 2407)	0,81527
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	33	190	276,91 (207,39)	(77; 1085)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : NR	80	214	251,61 (146,13)	(21; 766)	0,94965
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : R	33	332	424,55 (324,49)	(93; 1238)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : NR	80	318	398,14 (354,52)	(43; 2221)	0,56555
	N: număr de mostre per grup				
	R: respondent				
	NR: nerespondent				
	*respondent vs nerespondenți per tip de celulă				
	SD: deviație standard				

Tabelul 5.

% de celule T (% din limfocite) în măduva osoasă înainte de tratament					
Mostră	N	Mediană	Medie (SD)	Interval	Valoare p
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	23	78,4	73,66 (14,43)	(42,2; 94,8)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	65	76,5	73,5 (13,93)	(36,3; 94,5)	0,81232
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	23	25	25,57 (8,32)	(8,1; 41,4)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : NR	65	25,3	27,53 (12,76)	(6,3; 55,2)	0,76482
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : R	23	50	47,7 (13,73)	(24,5; 79,6)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : NR	65	44,3	44,73 (15,49)	(15,9; 76. 1)	0,41678
	N: număr de mostre per grup				
	R: respondent				
	NR: nerespondent				
	*respondent vs nerespondent per tip de celulă				
	SD: deviație standard				

5

Celule T reglatoare

Celulele Treg au fost identificate ca populația de celule CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} dintr-o mostră. Raportul dintre celulele T CD8⁺ și Treg-uri a fost evaluat în sângele periferic și măduva osoasă la pacienții tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) în timp. Raportul a crescut atât la periferie cât și la măduva osoasă. **Figura 7A** prezintă valorile mediane ale rapoartelor celulare CD8⁺/Treg și CD8⁺/CD4⁺ ale tuturor pacienților per moment de timp în sângele periferic. **Figura 7B** prezintă valorile mediane ale rapoartelor celulare T CD8⁺/Treg și T CD8⁺/T CD4⁺ ale tuturor pacienților per moment de timp în

10

măduva osoasă. Modificările în rapoartele numărului absolut de CD8⁺Tregs și CD8⁺/CD4⁺ au fost semnificative în sângele periferic în timp tratamentului (Tabelul 6) și în măduva osoasă (Tabelul 7), testul Wilcoxon cu rang semnat.

În analizele datelor combinate din studiile SIRIUS și GEN501 (Exemplul 6), rapoartele mediane ale celulelor CD8⁺/CD4⁺ și CD8⁺/Treg în sângele periferic au crescut în săptămâna 8 ($p = 5,1 \times 10^{-5}$ pentru CD8⁺/CD4⁺ și $p = 1,8 \times 10^{-7}$ pentru CD8⁺/Treg) și în săptămâna 16 ($p=0,00017$ pentru CD8⁺/CD4⁺ și $p = 4,1 \times 10^{-7}$ pentru CD8⁺/Treg). În mod similar, în măduvă osoasă, rapoartele mediane ale celulelor CD8⁺/CD4⁺ și CD8⁺/Treg au crescut pe tratament (săptămâna 12 ± 1 ciclu) în comparație cu valorile inițiale ($p = 0,00016$ pentru CD8⁺/CD4⁺ și $p = 2,8 \times 10^{-7}$ pentru CD8⁺/Treg). Nu s-a observat nici o diferență semnificativă între respondenți și nerespondenți.

Tabelul 6.

Rapoarte ale celulelor T în sângele periferic					
Mostră	N	Mediană	Medie (SD)	Interval	Valoare p*
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : inițiale	valori 66	119,75	191,78 (231,09)	(24,17; 1461,18)	
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : C3D1	66	204,86	222,96 (167,44)	(25,53; 867,58)	0,00046409
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : C4D1	66	210,05	215,15 (151,31)	(25,86; 798,83)	0,00042154
CD8 ⁺ /Treg-uri: inițiale	valori 66	1258,33	2338,46 (3465,12)	(206,82; 18550)	
CD8 ⁺ /Treg-uri: C3D1	66	2326,74	3361,87 (3661,61)	(155; 23066,67)	5,25E-06
CD8 ⁺ /Treg-uri: C4D1	66	2763,16	3382,86 (3629,69)	(316,67; 22087,5)	9,95E-08
*comparație cu valorile inițiale; N: număr de mostre per grup; SD: deviație standard					

Tabelul 7.

Rapoarte ale celulelor T în măduva osoasă					
Mostră	N	Mediană	Medie (SD)	Interval	Valoare p*
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ /(limfocite): inițiale	valori 31	163,18	184,4 (129,5)	(32,58; 674,58)	
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ /(limfocite): tratament	pe 31	221,89	240,85 (155,57)	(30,38; 666,4)	0,0038599
CD8 ⁺ /Tregs/(limfocite): inițiale	valori 30	1219,58	1802,73 (1582,7)	(306,41; 7960)	
CD8 ⁺ /Treg-uri/(limfocite): tratament	pe 30	2273,56	3905,72 (4232,73)	(451,22; 20825)	3,15E-07
*comparație cu valorile inițiale; N: număr de mostre per grup; SD: deviație standard					

Exemplul 4. Conceptul studiului (GEN501)

Studiul GEN501 (NCT00572488) a evaluat DARZALEX™ (daratumumab) ca monoterapie la pacienții cu MM dublu refractar. Izolarea mostrei, procesarea și analizele statistice au fost cum s-a descris în Exemplul 1 și Exemplul 2. Studiul a fost descris în Lokhorst și colab., N Eng J Med 373:1207-19, 2005.

Pe scurt, studiul GEN501 a fost primul studiu clinic pe oameni al DARZALEXTM

(daratumumab) la subiecții cu MM. Este un studiu de siguranță de fază 1/2, cu ecaladarea dozei, divizat în 2 părți. Partea 1 este un studiu cu etichetă deschisă, cu escaladarea dozei; partea 2 este un studiu cu o singură ramură, cu etichetă deschisă, cu mai multe cohorte, pe baza nivelurilor de dozare stabilite în partea 1.

În partea 1, au fost evaluate 10 niveluri de dozare ale DARZALEX™ (daratumumab): 0,005, 0,05, 0,10, 0,50, 1, 2, 4, 8, 16, și 24 mg/kg. Celor 2 cohorte cu cea mai scăzută doză, le-au fost alocați 1 (+3) subiecți fiecare, și o alocare standard de 3 (+3) subiecți a fost aplicată celor 8 cohorte de dozare rămase. Partea 2 a fost un studiu singur, cu etichetă deschisă, incluzând două niveluri de dozare, de 8 mg/kg și 16 mg/kg. Partea 1 a inclus 32 de subiecți și partea 2 a inclus 72 de subiecți.

Exemplul 5. Tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) induce clonalitatea celulelor T la pacienți

Data fiind expansiunea celulelor T CD8⁺ observată atât la periferie cât și la măduva osoasă în studiul MY2002, secvențierea de generație următoare cu randament ridicat a receptorului celulelor T (TCR) a fost efectuată utilizând testul Imunoseq™ pentru a determina dacă extinderea celulelor T CD8⁺ a fost de natură clonală, indicând un răspuns imun adaptiv. A fost evaluat un total de 17 mostre de la pacienți de subiecți care au fost înscrși în studiul GEN501 (n=6 respondenți *adică*, ≥ PR; n=11 nerespondenți *adică*, MR, SD, PD).

Secvențierea TCR a dezvăluit că tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) a crescut semnificativ clonalitatea în rândul pacienților. **Figura 8A** prezintă corelația între clonalitatea celulelor T pre vs. post tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) ($p = 0,0056$). **Figura 8B** prezintă de câte ori s-a modificat clonalitatea la pacienții individuali. Respondenții sunt marcați cu stelută. Aceste date sugerează că expansiunea celulelor T observată cu tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) poate fi de natură clonală.

Respondenții au avut o expansiune totală mai mare în repertoriul TCR (după cum s-a măsurat prin modificarea în abundență; CIA) în comparație cu nerespondenții. **Figura 8C** prezintă % de CIA pentru pacienții individuali. Grupul A: respondenți, Grupul B: nerespondenți. S-a observat o diferență semnificativă statistic între respondenți și nerespondenți ($p=0,037$). **Figura 8D** prezintă suma modificării absolute în abundență (CIA) la respondenți și nerespondenți pentru fiecare clonă extinsă a celulelor T. **Figura 8E** prezintă % maxim de CIA pentru fiecare pacient individual. Grupul A: respondenți, Grupul B: nerespondenți. S-a observat o diferență semnificativă statistic între respondenți și nerespondenți ($p=0,048$). **Figura 8F** prezintă CIA maximă a unei singure clone a celulelor T la respondenți (Grupul A) și nerespondenți (Grupul B).

CIA a fost obținută prin identificarea diferențelor semnificative în abundența clonală între două mostre utilizând testul exact al lui Fisher (DeWitt și colab. J. Virol. 2015) și însumând modificarea absolută în abundență pentru fiecare clonă extinsă.

Exemplul 6. Efectele imunomodulatoare ale DARZALEX™ (daratumumab) la pacienții înscrși în studiul GEN501

Au fost evaluate diferite populații de celule T și B la respondenții și nerespondenții înscrși în GEN501.

Limfocite

Similar cu studiul SIRIUS (MMY2002), limfocitele au crescut atât în sângele periferic cât și în măduva osoasă în timpul tratamentului cu DARZALEX™ (daratumumab). Această creștere a fost atribuită numerelor crescute atât de celule CD4⁺ cât și de celule CD8⁺.

Celule de memorie centrală CD8⁺

Fenotipul celulelor T CD8⁺ a fost studiat la pacienții tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) în timp, pe un subset de 17 pacienți înscrși în studiul GEN 501. Celulele CD8⁺ de la pacienți au fost identificate ca (CD45RO-/CD62L⁺) naive (T_N) sau celule de memorie centrală (T_{CM}) (CD45RO⁺/CD62L^{+ridicată}) utilizând protocoale standard.

Figura 9A prezintă % de celule naive CD8⁺ (% din celulele CD8⁺) și **Figura 9B** prezintă % de celule de memorie centrală CD8⁺. Tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) a scăzut semnificativ cantitatea de celule T CD8⁺ naive ($p = 1,82 \times 10^{-4}$ în săptămâna 8) și a crescut cantitatea de celule T de memorie CD8⁺ ($p = 4,88 \times 10^{-2}$ în săptămâna 8). Acest lucru ar sugera o tranziție de la celulele T citotoxice naive la celulele T de memorie care poate fi activată împotriva unui antigen specific. Pătratele albe indică pacienții care au obținut cel puțin un răspuns minimal ($\geq$ MR) și pătratele negre indică pacienții care au boală stabilă sau boală progresivă. O scădere semnificativ mai mare a celulelor T naive CD8⁺ a fost evidentă la pacienții care au răspuns la tratament (datele nu sunt prezentate). **Figura 9C** arată că tratamentul cu

DARZALEX™ (daratumumab) a crescut procentajul celulelor T cu restricție HLA de clasa I, care conduc parțial răspunsurile celulelor T specifice virale și aloreactive. **Figura 9D** arată că

extinderea celulelor T de memorie efectoare a exprimat niveluri scăzute de CD38. Este important de observat că aceste celule T afișează o activitate funcțională normală și chiar crescută împotriva peptidelor virale și aloantigenilor (vezi **Exemplul 8**). Din aceste rezultate funcționale, s-a concluzionat că există o extindere, sau o activitate îmbunătățită, a celulelor T experimentate cu antigen împotriva virusurilor și aloantigenilor în timpul tratamentului cu DARZALEX™ (daratumumab). Aceste date sugerează că, spre deosebire de subseturile de celule reglatoare, celulele T efectoare nu necesită expresia CD38 pentru a funcționa corespunzător și a se extinde.

Celule T reglatoare pozitive la CD38

Observarea extinderii robuste și a activității crescute a celulelor T citotoxice împreună cu literatura recentă care arată că câteva subseturi de celule imunosupresive exprimă CD38, a determinat examinarea efectelor DARZALEX™ (daratumumab) asupra populațiilor de celule reglatoare, celule T reglatoare (Treg-uri), celule supresoare derivate din mieloid (MDSC-uri) și celule B reglatoare (Breg-uri).

Celulele T reglatoare (Treg-uri) (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}) au fost izolate utilizând protocoale standard. Frecvența Treg-urilor a fost analizată utilizând citometria de flux.

O subpopulație de Treg-uri periferice (10% ± 10%) a exprimat niveluri ridicate de CD38 înainte de activarea Treg-urilor. **Figura 10A**, panoul de sus prezintă frecvența Treg-urilor în populația inițială de celule CD3⁺CD4⁺ (populația de celule P4). **Figura 10A**, panoul de jos prezintă subsetul de Treg-uri care exprimă CD38 ridicat (populația de celule P5). Aceste Treg-uri CD38⁺ au fost extrem de sensibile la tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) și au prezentat o scădere semnificativă și aproape imediată după prima doză de DARZALEX™ (daratumumab) (n = 17 pacienți; $P = 8,88 \times 10^{-16}$ în săptămâna 1 versus valorile inițiale). Frecvența Treg-urilor după tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) este prezentată în **Figura 10B**, panoul de sus (populația de celule P4). **Figura 10B**, panoul de jos arată că Treg-urile CD38^{ridicat} (celulele P5) au constituit populația de Treg-uri cea mai semnificativ depletată după prima perfuzie cu DARZALEX™ (daratumumab). Aceste Treg-uri CD38⁺ au rămas depletate prin tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) ($p = 8,88 \times 10^{-16}$, $1,11 \times 10^{-15}$, și $1,50 \times 10^{-11}$ în săptămânile 1, 4, și respectiv 8, versus valorile inițiale). **Figura 10C** prezintă % din Treg-urile CD38^{ridicat} din totalul de celule CD3⁺ la momentul inițial, în săptămâna 1, în săptămâna 4, în săptămâna 8, la recidivă, și la 6 luni după sfârșitul tratamentului (EOT). Treg-urile CD38^{ridicat} au fost recuperate la momentul inițial, la acel moment de timp. Modificările în Treg-urile CD38⁺ au fost similare între pacienții care au și nu au răspuns la tratament, totuși raportul dintre celulele T CD8⁺:Treg-uri a fost semnificativ mai ridicat în săptămâna 8 la pacienții care au prezentat un răspuns la DARZALEX™ (daratumumab) ($P = 0,00955$; **Figura 10D**).

Pentru a evalua posibila relevanță biologică a depleției Treg-urilor CD38⁺ cu tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab), a fost evaluată capacitatea supresivă a Treg-urilor CD38⁺ versus Treg-urile CD38⁻ asupra celulelor T CD3⁺ autologe. Într-o serie de experimente efectuate cu mostre de la mai mulți donatori sănătoși, Treg-urile CD38⁺ au suprimat proliferarea celulelor T mai robust (s-a observat o proliferare celulară de 9,9%) decât Treg-urile CD38⁻ (s-a observat o proliferare celulară de 53,2%) sau controlul negativ (s-a observat o proliferare celulară de 74,9%) (**Figura 10E**).

Deoarece MDSC-urile nu au fost detectabile cu ușurință în mostrele de PBMC-uri congelate, MDSC-urile granulocitare CD38⁺ (CD11b⁺CD14⁻HLA-DR⁻CD15⁺CD33⁺) au fost generate *in vitro* din PBMC-uri izolate de la pacienți la momentul inițial și de la pacienții care au primit o perfuzie de DARZALEX™ (daratumumab). **Figura 11** prezintă histograma citometriei de flux a MDSC-urilor identificate (**Figura 11**, histograma de sus, populația celulară în casete). Aproximativ jumătate din MDSC-uri au exprimat CD38 (**Figura 11**, graficul din mijloc; populația celulară P7 încercuită). MDSC-urile CD38^{ridicat} au fost aproape depletate la pacienții tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) (**Figura 11**, graficul de jos; populația celulară P7 încercuită).

MDSC-urile nespecifice cu descendență CD38^{ridicat} au fost depletate cu tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) în timp, atât la nerespondenți cât și la pacienții care au cel puțin un răspuns minimal la tratament. **Figura 12** arată că procentajul de MDSC-uri CD38^{ridicat} a fost redus la aproape 0% la pacienți la 1 săptămână, 4 săptămâni sau 8 săptămâni de tratament. MDSC-urile nespecifice cu descendență CD38^{ridicat} au revenit la valorile inițiale după sfârșitul tratamentului.

Pacienții cu cele mai mari populații de CD38⁺ din cadrul MDSC-urilor nespecifice cu descendență au demonstrat cele mai bune și mai durabile răspunsuri la tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab). **Figura 13** arată că pacienții 2, 4, 15, 16 și 17 având cel mai mare procentaj de MDSC-uri CD38^{ridicat} (așa cum se arată în **Figura 11**) și clasificați ca pacienți cu PR sau MR, au avut o supraviețuire fără progresie (PFS) de cel puțin 8 luni.

MDSC-urile nespecifice cu descendență CD38^{ridicat} au fost de asemenea sensibile la ADCC indusă de DARZALEX™ (daratumumab) *in vitro*. Testele ADCC au fost efectuate utilizând MDSC-uri CD38^{ridicat} de la doi donatori și celule Daudi ca celule țintă de control cu un raport dintre celulele

efectoare: celulele țintă de 50:1. **Figura 14** prezintă rezultatele experimentului de la un donator. DARZALEX™ (daratumumab) a indus lizarea celulelor MDSC.

Breg-urile CD38⁺ au fost măsurate la pacienții tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) (n = 16) și, similar cu Treg-urile CD38⁺, au fost depletate după prima doză de DARZALEX™ (daratumumab) ($p = 0,0018$ în săptămâna 1 comparativ cu valorile inițiale; test împerecheat cu rang Wilcoxon) și au rămas scăzute în timp ce pacienții au fost în tratament (**Figura 15A**). Bregurile sortate FACS, când au fost stimulate, au produs IL-10 (**Figura 15B**).

Colectiv, aceste observații sugerează că depleția MDSC-urilor CD38⁺ imunosupresive, Breg-urilor, și Treg-urilor este un mecanism contributor semnificativ la modificările induse de DARZALEX™ (daratumumab) în populațiile de celule T și clonalitate.

Exemplul 7. Celulele MDSC CD38⁺ sunt prezente la pacienții cu cancer

Procentajul de MDSC (Lin⁺CD14⁺HLADR^{scăzut/-}) și expresia lor CD38 au fost studiate în sângele periferic al pacienților cu NSCLC sau cancer la prostată utilizând citometria de flux.

Procentajul de MDSC-uri a fost între aproximativ 10%-37% și între aproximativ 10%-27% din PBMC-uri în mostrele analizate de la pacienții cu NSCLC și respectiv cancer la prostată. Expresia CD38 a fost identificată în 80-100% din MDSC-urile Lin⁺CD14⁺HLADR^{scăzut} din PBMC-urile de la pacienții cu NSCLC și în 70-100% din MDSC-urile din PBMC-urile de la pacienții cu cancer la prostată.

Exemplul 8. DARZALEX™ (daratumumab) îmbunătățește răspunsurile antivirale ale celulelor T

Pentru a evalua suplimentar efectul DARZALEX™ (daratumumab) asupra activării și funcționalității celulelor T, a fost măsurată producția de IFN-γ din celulele T periferice ca răspuns la virusuri și aloantigeni, la pacienții tratați cu DARZALEX™ (daratumumab) (n = 7) cu o serie de rezultate clinice. Pacienții cu un PR sau mai bun au demonstrat o creștere semnificativă a secreției de IFN-γ ca răspuns la virusuri și aloantigeni după tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab), comparativ cu valorile inițiale, pentru cel puțin un moment de timp în timpul tratamentului, sugerând că funcția celulelor T nu este alterată de expresia scăzută a CD38 (vezi Exemplul 6, Figura 9C). Similar cu datele de clonalitate TCR, această creștere a fost mai marcată la pacienții care au răspuns la DARZALEX™ (daratumumab) decât la cei care nu au răspuns. **Figura 16A** prezintă răspunsul antiviral al unui pacient reprezentativ cu VGPR. **Figura 16B** prezintă răspunsul antiviral al unui pacient reprezentativ cu CR. **Figura 16C** prezintă răspunsul antiviral al unui pacient reprezentativ cu PD. **Figura 16D** prezintă răspunsul antiviral al unui pacient reprezentativ cu MR. În Figuri, barele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei culturilor duplicate. Asteriscul înseamnă modificări semnificative statistic între comparațiile indicate. Este prezentat cel mai bun răspuns de la Comitetul de revizuire independent. În mod consistent cu aceste rezultate, celulele T reactive la virus de la pacienții cu VGPR (Figura 16E) sau CR (Figura

16F) au demonstrat o creștere a capacității proliferative în timpul tratamentului cu DARZALEX™ (daratumumab).

Exemplul 9. Mecanism de sensibilitate al subtipurilor de celule imune care exprimă CD38, la DARZALEX™ (daratumumab)

Datele din ambele studii GEN501 și SIRIUS au indicat că unele celule imune care exprimă CD38 sunt depletate (celulele NK, celulele T reguloare (Treg-urile), celulele B reguloare (Bregurile), și celulele supresoare derivate din mieloide (MDSC-urile)), în timp ce altele, care exprimă CD38 cresc ca număr (celulele T citotoxice și ajutătoare) cu terapia cu DARZALEX™ (daratumumab).

Pentru a aborda mecanismul de sensibilitate, nivelurile de expresie ale CD38 au fost evaluate în diferite subpopulații de celule imune de la donatori sănătoși și la pacienții cu mielom multiplu înscrși fie în studiul GEN501 sau fie în studiul SIRIUS. **Figura 17A** prezintă o histogramă a expresiei lui CD38 în celulele imune de la un donator sănătos, și **Figura 17B** prezintă o histogramă a expresiei lui CD38 în celulele imune de la un pacient cu mielom multiplu. La un donator sănătos, expresia lui CD38 a fost cea mai mare pe celulele NK, urmată de monocite, bandă de celule T. La un pacient cu mielom multiplu, expresia lui CD38 a fost cea mai mare pe celulele plasmatiche, urmată de un subset de celule B, celule NK, monocite, celule B și celule

T. **Figura 17C** prezintă o comparație a intensității fluorescente medii (MFI) a CD38 în celulele NK, Treg-uri, Breg-uri, celule B și celule T de la pacienții cu mielom recidivat și refractar, demonstrând că, după celulele plasmatiche, celulele NK au exprimat cele mai mari niveluri de CD38, urmate de celulele T reguloare (Treg-uri) și celulele B reguloare (Breg-uri).

În plus față de expresia CD38, alte proteine de suprafață celulară, cum ar fi proteinele inhibitoare de complement (CIP-uri; CD46, CD55, CD59) pot contribui la sensibilitatea sau rezistența la DARZALEX™ (daratumumab). Prin evaluarea *in vitro* a CIP-urilor în subpopulațiile de celule imune s-a constatat că celulele NK exprimă niveluri foarte scăzute ale CD59 și CD55, în timp ce alte populații de

celule T și B exprimă niveluri mult mai ridicate. Acest lucru ar putea contribui de asemenea la variabilitatea sensibilității DARZALEX™ (daratumumab) în subtipurile de celule imune (datele nu sunt prezentate).

Discuție

Acest studiu descrie efecte imunomodulatoare necunoscute anterior ale DARZALEX™ (daratumumab) prin reducerea populațiilor celulare imunosupresive CD38⁺ și inducerea concomitentă a extinderii celulelor T ajutătoare și citotoxice, producției de IFN-γ ca răspuns la peptidele virale, și clonalitatea TCR crescută, care indică un răspuns imun adaptiv îmbunătățit.

Acest studiu demonstrează că MDSC-urile și Breg-urile exprimă CD38 și au fost susceptibile la tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab). Aceste celule sunt cunoscute ca fiind prezente în micromediul tumoral și contribuind la creșterea tumorii, evaziunii imune, angiogenezei, metastazei, și producției de citokine supresive. În plus față de aceste subseturi celulare supresive CD38⁺, a fost identificată o nouă subpopulație de celule T reglatoare (CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}) care au exprimat de asemenea niveluri ridicate de CD38 și au demonstrat capacități supresive superioare celulelor T autologe. Aceste celule au fost de asemenea sensibile la DARZALEX™ (daratumumab) și au fost semnificativ reduse la pacienții care au primit tratament. Eliminarea mediată de DARZALEX™ (daratumumab) a acestor celule imunoreglatoare CD38⁺, poate reduce supresia locală imună în micromediul mielomului și permite celulelor efectoare imune pozitive să se extindă și să contribuie la răspunsul antitumoral.

Într-adevăr, creșterea semnificativă pe larg a populațiilor de celule T, incluzând atât CD4⁺ cât și CD8⁺, a fost observată atât la sângele periferic cât și la măduva osoasă (adică, tumoarea). Populațiile CD8⁺ specifice au fost modificate cu terapia cu

DARZALEX™ (daratumumab), incluzând scăderea semnificativă a celulelor T naive și creșterea concomitentă semnificativă a celulelor T CD8⁺ de memorie efectoare, ceea ce indică o deplasare a celulelor T efectoare către un fenotip experimentat antigenic care a reținut memoria imunologică și poate fi reactiv împotriva antigenilor tumorali. Rapoartele dintre CD8⁺:CD4⁺ și CD8⁺: Treg-uri, au crescut de asemenea semnificativ cu tratamentul, demonstrând o deplasare a reglatorilor imuni pozitivi versus negativi.

Pentru a evalua dacă extinderile celulelor T CD4⁺ și CD8⁺ au fost de natură clonală, a fost examinat repertoriul celulelor T, într-un subset al pacienților. Clonalitatea celulelor T a crescut semnificativ cu tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab), chiar și la pacienții care au avut cel mai bun răspuns de SD sau care au progresat. Prin urmare, clonalitatea crescută a celulelor T nu se poate datora simplu doar reducerii încărcării tumorale. Cu toate acestea, deformarea în clonalitatea celulelor T a fost mai mare la pacienții cu un răspuns clinic bun, și a fost corelată cu creșterea celulelor T CD8⁺, sugerând că extinderea observată a celulelor T cu tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) a fost determinată de antigen. Acest lucru este remarcabil la această populație de pacienți, care a fost pretratată puternic (mediană de 5 înainte de liniile de terapie) și nu este de așteptat să poată fi capabil să genereze un răspuns imun antitumoral puternic. În plus față de clonalitatea TCR crescută, pacienții cu un răspuns la DARZALEX™ (daratumumab) au demonstrat răspunsuri crescute ale celulei T la virale și aloantigeni preexistenți, sugerând salvarea sistemului imunitar dintr-o stare imunosupresivă.

Tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab) a cauzat o reducere a MDSC-urilor supresive imune și a celulelor T reglatoare și a celulelor B. Aceste reduceri au fost concomitente cu o extindere a celulelor T CD4⁺ ajutătoare și a celulelor T CD8⁺ citotoxice. Clonalitatea celulelor T și răspunsurile antivirale funcționale după cum s-a măsurat prin producția de IFN-γ, au crescut de asemenea cu tratamentul cu DARZALEX™ (daratumumab). Aceste observații au indicat că celulele T au continuat să funcționeze corespunzător, în ciuda expresiei scăzute a CD38, și sugerează că răspunsul crescut al celulelor T se poate datora depleției celulelor reglatoare. În plus, aceste modificări în expansiunea, activitatea, și clonalitatea celulelor T au fost mai pronunțate la pacienții care au răspuns la DARZALEX™ (daratumumab) comparativ cu cei care nu au răspuns. Recidiva de la terapia cu DARZALEX™ (daratumumab) a fost asociată cu inversarea multora din aceste modificări. Acest lucru sugerează un mecanism suplimentar, necaracterizat anterior de acțiune al DARZALEX™ (daratumumab) prin imunomodulare, care ar putea contribui la răspunsurile clinice și eficacitatea acestora.

Recent, anticorpii care promovează răspunsuri imune antitumorale, mai degrabă decât țintirea directă a cancerului, au demonstrat eficacitate într-o serie de situații. Anticorpii care inhibă CTLA-4 și PD-1 promovează expansiunea celulelor T și îmbunătățește activarea celulelor T, conducând la supraviețuirea prelungită și recurența întârziată a bolii la pacienții cu tumori solide avansate și malignități hematologice cum ar fi limfomul Hodgkin. Prin amplificarea imunității anticancer, acești anticorpi imunomodulatori pot nu numai induce răspunsuri clinice, ci de asemenea și preveni recurența bolii.

Exemplul 10. Analiza proteomică serică a subiecților cu mielom multiplu tratați cu agent singur DARZALEX™ (daratumumab) în partea 2 a studiului clinic 54767414MMY2002 (SIRIUS) Colectarea și procesarea mostrei de biomarker

Mostrele din sângele periferic au fost colectate în tuburi standard separatoare de ser (2,5 mL până la 5 mL) și alicotele serice au fost transportate congelate SomaLogic, Inc (Boulder, CO) pentru profilarea proteinelor serice multianalitice.

Profilarea proteinei serice a fost efectuată la SomaLogic utilizând un test SOMAscan prevalidat, care măsoară 1129 analiți proteici prin utilizarea moleculelor pe bază de afinitate SOMAmer. Reactivii SOMAmer sunt reactivi de afinitate proteici pe bază de ADN monocatenar. Testul utilizează cantități mici din mostra de intrare (150 μ L plasmă) și transformă semnalul proteic într-un semnal SOMAmer care este cuantificat de către o micromatrice ADN personalizată.

Fiecare SOMAmer conține 4 radicali funcționali:

1. O secvență unică de recunoaștere a proteinei
2. Biotină pentru captură
3. Liant fotoclivabil
4. Moleculă fluorescentă pentru detecție

Secvența unică de recunoaștere a proteinei utilizează ADN și încorporează nucleotide modificate chimic care imită catenele laterale ale aminoacidului, extinzând diversitatea aptamerilor standard și îmbunătățind specificitatea și afinitatea interacțiunilor proteină-acid nucleic (Gold și colab., PLoS One 5:e15004, 2010). Aptamerii sunt selectați prin SELEX. Reactivii SOMAmer sunt selectați utilizând proteine în conformațiile lor native. Ca atare, reactivii SOMAmer necesită structuri proteice terțiare, intacte, pentru legare. Proteinele inactive probabil nepliate sau denaturate, nu sunt detectate de către reactivii SOMAmer.

Amestecurile principale de reactivi SOMAmer sunt grupate pentru tipul și diluția mostrei. Reactivii sunt prelegați la perle cu streptavidină înainte de incubarea mostrei. Proteinele din mostre sunt legate la SOMAmerii înrudiți în timpul echilibrării, spălării, incubării cu biotină NHS, spălate și apoi perlele sunt expuse la lumină UV pentru a cliva liantul fotoclivabil. Eluarea conține reactivi SOMAmer legați la proteinele lor marcate cu biotină. O captură de streptavidină și spălările ulterioare elimină reactivii SOMAmer nelegați. În eluarea finală, moleculele de SOMAmer sunt eliberate de proteinele lor înrudite prin condiții de denaturare. Eluatul final este hibridizat la micromatrice ADN Agilent personalizate și fluoroforul de la moleculele SOMAmer a fost cuantificat prin unități fluorescente relative (RFU). RFU sunt proporționale cu cantitatea de proteină din mostră.

Mostrele din studiul MMY2002 au fost testate în două loturi primare. Un prim lot de 180 de mostre a conținut mostre de ser împerecheate ciclul 1 ziua 1 (C1D1, valori initiale) și C3D1 (ciclul 3 ziua 1) de la 90 subiecți. Cele 180 de mostre au fost analizate împreună pe 3 plăci SomaScan separate. Cel de al doilea lot de mostre include 50 de mostre C1D1, incluzând 35 de mostre repetate din lotul 1. **Analizele datelor**

Seturi de date de intrare și definiții

Subiecții tratați cu un răspuns evaluabil, au fost incluși în analiza datelor. Consistent pe parcursul raportării, respondenții sunt definiți ca subiecți cu un cel mai bun răspuns global (per IRC, pentru MMY2002) al sCR, VGPR, și PR, subiecți cu boală stabilă (SD) ca subiecți cu răspuns minimal (MR) sau SD, și nerespondenții sunt definiți ca subiecți cu un cel mai bun răspuns global (per IRC, pentru MMY2002) al bolii progresive (PD).

Preprocesarea datelor somalogice Alinierea lotului

Loturile 1 și 2 ale mostrelor MMY2002 au fost testate pe două versiuni diferite ale platformei SOMAscan. Diferențele între cele două versiuni au fost minore, și au inclus trei secvențe SOMAmer care s-au modificat între versiuni (CTSE: 3594-6_1 -> 3594-6_5, FCN1: 3613-62_1 -> 3613-62_5, BMPER: 3654-27_1 -> 3654-27_4). Acestea au fost îndepărtate din analiză.

Măsurătorile celor trei plăci cu lotul 1 au fost aliniate în conformitate cu fluxul de lucru standard de calibrare între plăcile SomaLogic, definind factorii de scalare de calibrare la nivelul întregii plăci pentru fiecare SOMAmer prin calcularea raportului dintre o valoare de referință globală specifică amestecului principal, și mediana a 7 măsurători calibratoare de control pe placă. Factorul de scalare specific plăcii pentru fiecare reactiv SOMAmer a fost aplicat fiecărei mostre echivalent pe placă.

Date fiind diferitele versiuni ale platformei SOMAscan a loturilor 1 și 2, corecția sistematică a variabilității între loturi a fost făcută cu o implementare modificată a fluxului de lucru de calibrare standard SomaLogic între plăci, prin valorificarea măsurării repetate a 35 de mostre din loturi. Pentru fiecare SOMAmer, raportul dintre măsurarea lotului 1 după calibrare, împărțit la măsurarea lotului 2 înainte de calibrare, a fost calculat pentru fiecare din cele 35 de mostre repetate ($r_{i,j}$). Mediana acestor 35 de rapoarte a fost utilizată pentru a defini factorul de scalare de calibrare revizuit, specific SOMAmer

pentru mostrele lotului 2 (r_i). Acești factori de scalare de calibrare au fost apoi implementați identic în procedura SOMAscan standard.

$$r_i = \left(\frac{\text{Post-Calib. Conc. Lot 12}}{\text{Pre-Calib. Conc. Lot 12}} \right) \cdot \bar{r} = (r_{i1}, r_{i2}, \dots, r_{ij}) \text{ pentru toate mostrele repetate } j$$

Factor de scalare al calibrării = mediană($\bar{r}_i$) = $\bar{r}$

Odată ce factorii de scalare revizuiți ai calibrării au fost calculați, distribuțiile tuturor factorilor de scalare pentru fiecare lot de analiză au fost reprezentate grafic pentru a evalua prezența valorilor aberante. 9 SOMAmeri cu calibratori extrem de mari sau extrem de mici ($> 0,25$ și < 3) au fost îndepărtați din analize din cauza slabei reproductibilități.

După ce alinierea lotului și filtrarea SOMAmerului au fost finalizate pentru MMY2002, a fost aplicată o transformare log2 tuturor valorilor de concentrație de proteine ale MMY2002 pentru a aduce datele mai în concordanță cu o distribuție normală și pentru a îmbunătăți performanța testelor statistice parametrice.

Corecția variabilei confuze

Estimarea porțiunii de varianță a setului de date explicată prin meta variabile (cum ar fi date demografice, clasă de răspuns, și moment de timp de prelevare) și identificarea potențialilor factori de confuzie, a fost efectuată prin analiza componentei principale pe setul de date centrat și scalat. Modelele liniare simple au fost ajustate pentru a identifica PC-ul cel mai bine notat, care a fost asociat semnificativ cu fiecare din variabilele de interes. Semnificația acestor asocieri a fost determinată utilizând un test Wald și fracțiunea de variabilitate a PC-ului explicată de către model a fost estimată prin R2-ul ajustării. Pentru datele MMY2002, s-a constatat că ID-ul situsului este corelat cu PC1 și a explicat cea mai mare porțiune a variabilității setului de date ($\geq 7,37\%$, valoare $p = 3,71 \times 10^{-9}$). Pentru a reduce impactul efectelor asociate cu situsul de achiziției al mostrei asupra datelor, a fost utilizat ComBat28 pentru a corecta efectele ID-ului situsului.

Contopirea repetată a mostrelor

Datele de la cele 35 de mostre repetate între loturile 1 și 2 ale MMY2002, au fost contopite prin calcularea mediei pentru fiecare proteină.

Analiza diferențiată a concentrației de proteină Respondenți versus nerespondenți

Comparația statistică a distribuțiilor concentrațiilor de proteine la respondenții la DARZALEXTM (daratumumab) versus nerespondenți a fost efectuată atât la momentul inițial cât și pe tratament utilizând două metode complementare (i) testul Wilcoxon cu sumă de rang (Hollander și Wolfe, Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons. 1973. 2733 (o mostră), 68-75 (două mostre) pe fiecare SOMAmer individual și (ii) analiza Limma (Ritchie, M.E., și colab., Nucleic Acids Res. 2015; 20:43(7):e47) pe toate SOMAmer-urile simultan. Toate valorile p au fost ajustate utilizând metoda Benjamini-Hochberg (BH) pentru corecție cu ipoteze multiple (Benjamini și Hochberg, (1995) J. R. Statist. Soc. B, 57: 289-300; R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2011; ISBN 3-900051-07-0). Ipoteza nulă a nici unei expresii diferențiale a fost respinsă când valoarea p ajustată a fost $< 0,05$.

Pe tratament versus momentul inițial

Au fost comparate nivelurile de proteină inițiale versus pe tratament, utilizând trei metode statistice alternative: (i) măsurări bifactoriale repetate ANOVA6 (ii) testul Wilcoxon cu rang semnat și (iii) testul Friedman (Johnson și colab., (2007) Biostatistics 8(1):118-127). Toate valorile p au fost ajustate pentru a controla FDR utilizând metoda BH pentru corecție cu ipoteze multiple (Benjamini și Hochberg, J.R. Statist. Soc. B, 57: 289-300, 1995). În plus față de semnificația tratamentului, măsurătorile ANOVA bifactoriale repetate (Chambers și colab., Analysis of variance; design experiments: Chapter 5. Statistical Models in S, Editors J.M Chambers și T.J Hastie. Wadsworth & Brookes/Cole. 1992) au fost de asemenea aplicate pentru a determina dacă a avut loc o interacțiune semnificativă timp-punct de răspuns-clasă pentru fiecare SOMAmer. Un test modificat Wilcoxon cu sumă de rang a fost aplicat ca test *post-hoc* pentru a determina specific dacă respondenții și nerespondenții au prezentat diferite efecte ale tratamentului, prin calcularea diferenței între valorile concentrațiilor de proteine pe tratament și la momentul inițial ale fiecărui subiect, și efectuarea unui test Wilcoxon cu sumă de rang. Valorile semnificative au fost ajustate utilizând metoda BH și ipoteza nulă a fost respinsă când valoarea p ajustată a fost $< 0,05$.

Instruire clasificator

Datele MMY2002 ale nivelului proteic inițial, au fost utilizate pentru a construi un clasificator de predicție a răspunsului. O abordare de validare încrucișată, de 10 ori stratificată cu buclă imbricată, s-a

repetat de 30 de ori, utilizând 4 mașini de instruire diferite: mașini vectoriale de susținere (SVM), păduri aleatorii (RF), Bayes naiv (NB), și arbori decizionali j48. Pentru fiecare cursant, procedura de instruire a început cu crearea a 10 pliuri echilibrate ale setului de date (bucă exterioră). Unul din aceste pliuri a fost menținut ca cohortă de testare în timp ce, cele 9 rămase au fost trecute într-o buclă interioară ca cohortă de instruire. În bucla interioară, cohorta de instruire a fost încă o dată împărțită în 10 pliuri echilibrate, creând seturi de instruire interioare și de testare interioare. Cursanții au fost instruiți pe fiecare din aceste seturi de instruire interioare și acest procedeu a fost repetat de 30 de ori pentru fiecare cohortă din bucla exterioră. Precizia fiecărui cursant din bucla interioară la predictarea seturilor de testare interioare a fost utilizată pentru a selecta caracteristicile și optimiza parametrii modelului. Odată ce bucla interioară 30x a fost completă pentru fiecare cohortă de instruire, performanța buclei exterioare (utilizând parametrii optimizați și caracteristicile) a fost evaluată pe fiecare cohortă de testare corespunzătoare. Întreaga procedură de buclă exterioră a fost apoi repetată de 30 de ori, producând 30 de predicții de răspuns pentru fiecare mostră din setul de date. Statisticile AUC, de sensibilitate, și specificitate obținute de la această abordare în buclă au fost o aproximare de cât de bine va funcționa modelul final, instruit pe întregul set de date original, pe noi cazuri de test.

Rezultate din studiul MMY2002

Au fost efectuate diferite comparații incluzând modificările dependente de răspunsul indus de tratament în expresia proteinei. Una dintre proteine care a prezentat o expresie scăzută la respondenți în timp, a fost PD-L1, în timp ce expresia proteinei PD-L1 a crescut la nerespondenți în timp. Angajarea PD-L1 pe celulele T conduce la o funcție redusă a celulelor T și la dezvoltarea crescută a Treg-urilor. **Figura 18** prezintă profilul expresiei de proteine al PD-L1 la respondenți, nerespondenți și la pacienții cu boală stabilă în ciclul 1 și ciclul 3.

Angajarea PD-L1 cu receptorul său PD-1 suprimă răspunsurile antitumorale și provoacă anergia și epuizarea celulelor T. În timp ce nu se dorește să fie legată de nici o teorie particulară, subreglarea PD-L1 după tratamentul cu CD38 poate conduce de asemenea la potențarea îmbunătățită a răspunsurilor imune antitumorale în tumorile solide.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- M. DE WEERS ET AL: "Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 186, no. 3, 27 December 2010 (2010-12-27), pages 1840-1848, XP055210884, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1003032
- WO-A1-2012/092612
- CHILLEMI A ET AL: "Anti-CD38 antibody therapy: windows of opportunity yielded by the functional characteristics of the target molecule", MOLECULAR MEDICINE, FEINSTEIN INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, WASHINGTON, DC; US, vol. 19, no. 1, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 99-108, XP002735274, ISSN: 1076-1551, DOI: 10.2119/MOLMED.2013.00009 [retrieved on 2013-04-17]
- WO-A1-2014/068114
- WO-A2-2008/073160
- SUZANNE L. TOPALIAN ET AL: "Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy", CANCER CELL, vol. 27, no. 4, 1 April 2015 (2015-04-01), pages 450-461, XP055372181, US ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/j.ccell.2015.03.001
- DANIEL T. PATTON ET AL: "The PI3K p110[delta] Regulates Expression of CD38 on Regulatory T Cells", PLOS ONE, vol. 6, no. 3, 1 March 2011 (2011-03-01), page e17359, XP055568720, DOI: 10.1371/journal.pone.0017359
- WO-A2-2015/009726
- CLAUDIA MAURI ET AL: "The expanding family of regulatory B cells", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 27, no. 10, 12 June 2015 (2015-06-12), pages 479-486, XP055568703, ISSN: 0953-8178, DOI: 10.1093/intimm/dxv038
- US-A1- 2009 148 449
- JAMES E TALMADGE ET AL: "History of myeloid-derived suppressor cells", NATURE REVIEWS CANCER, vol. 13, no. 10, 24 September 2013 (2013-09-24), pages 739-752, XP055568927, DOI: doi: 10.1038/nrc3581

- US-A1- 2014 099 254
- JAKUB KREJCIK ET AL: "Immunomodulatory Effects and Adaptive Immune Response to Daratumumab in Multiple Myeloma", BLOOD, vol. 126, 3 December 2015 (2015-12-03), page 3037, XP055568280,
- US-A1- 2014 356 318
- J. KREJCIK ET AL: "Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma", BLOOD, vol. 128, no. 3, 24 May 2016 (2016-05-24), pages 384-394, XP055460007, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2015-12-687749
- US-A1- 2015 125 447
- NAJJAR ET AL.: 'Abstract P227: Accumulation of MDSC Subsets in Renal Cell Carcinoma Correlates with Grade and Progression Free Survival, and is Associated with Intratumoral Expression of IL -1 b, IL -8 and CXCL5' JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER vol. 2, 06 November 2014, pages 110 - 112, XP021202495
- US-A1- 2015 246 123
- BACHIREDDY ET AL.: 'Haematological Malignancies: at the Forefront of Immunotherapeutic Innovation' NATURE REVIEWS CANCER vol. 15, 01 April 2015, pages 201 - 215, XP055341031
- YE ET AL.: 'Abstract P240: Treg Increases HepG2 Cell Growth by RANK-RANKL pathway' JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER vol. 2, 06 November 2014, pages 115 - 117, XP021202508

(57) Revendicări:

1. Un anticorp care se leagă specific la CD38 pentru utilizare în tratarea unui pacient care are o tumoră solidă, cuprinzând VH din SEQ ID NO: 4 și VL din SEQ ID NO: 5, în care anticorpul este de izotip IgG1.

2. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, în care anticorpul cuprinde aminoacizii lanțului greu din SEQ ID NO: 12, și aminoacizii lanțului ușor din SEQ ID NO: 13.

3. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1 în care anticorpul este de izotip IgG1κ.

4. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care tumoră solidă este un melanom, un cancer pulmonar, un cancer pulmonar nonmicrocelular scuamos (NSCLC), un NSCLC nescuamos, un cancer colorectal, un cancer la prostată, un cancer la prostată rezistent la castrare, un cancer la stomac, un cancer ovarian, un cancer gastric, un cancer hepatic, un cancer pancreatic, un cancer la tiroidă, un carcinom cu celule scuamoase de cap și gât, un carcinom de esofag sau tract gastrointestinal, un cancer la sân, un cancer al trompelor uterine, un cancer la creier, un cancer uretral, un cancer genitourinar, o endometrioză, un cancer de col uterin sau o leziune metastatică a cancerului.

5. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care tumorii solide îi lipsește expresia CD38 detectabilă.

6. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care anticorpul care se leagă specific la CD38 declanșează un răspuns imun la pacient, în care răspunsul imun este un răspuns al celulelor T efectoare (Tef), în care răspunsul Tef este mediat de celulele T CD8⁺, și în care răspunsul Tef este o creștere a numărului de celule T CD8⁺.

7. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care anticorpul care se leagă specific la CD38 inhibă funcția unei celule supresoare imune, în care:

a. celula supresoare imună este o celulă T regatoare (Treg), în care Treg este o celulă T CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}, în care Treg exprimă CD38, în care funcția Treg este inhibată prin uciderea Treg, și în care uciderea Treg este mediată de citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC); sau

b. celula supresoare imună este o celulă supresoare imună derivată din mioeloid (MDSC), în care MDSC este o celulă CD11b⁺HLADR⁺CD14⁺CD33⁺CD15⁺, în care celula CD11b⁺HLADR⁺CD14⁺

CD33⁺CD15⁺ exprimă CD38, în care funcția MDSC este inhibată prin uciderea MDSC, și în care uciderea MDSC este mediată de ADCC; sau

c. celula supresoare imună este o celulă B regatoare (Breg), în care Breg este o celulă CD19⁺CD24⁺CD38⁺, în care funcția Breg este inhibată prin uciderea Breg, și în care uciderea Breg este mediată de ADCC; sau

d. celulele supresoare imune rezidă în sângele periferic.

8. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care anticorpul care se leagă specific la CD38 este administrat în combinație cu un al doilea agent terapeutic, cum ar fi în care cel de al doilea agent terapeutic este un agent chimioterapeutic, o terapie țintită anticancer, un medicament standard de îngrijire pentru tratamentul tumorii solide, sau un inhibitor al punctului de control imun.

9. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 8, în care inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-1, un anticorp anti-PD-L1, un anticorp anti-PD-L2, un anticorp anti-LAG3, un anticorp anti-TIM3, sau un anticorp anti-CTLA-4.

10. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 9, în care:

a. inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-1, în care opțional anticorpul anti-PD-1 cuprinde:

i. VH din SEQ ID NO: 22 și VL din SEQ ID NO: 23; ii. VH din SEQ ID NO: 24 și VL din SEQ ID NO: 25; iii. VH din SEQ ID NO: 32 și VL din SEQ ID NO: 33; sau iv. VH din SEQ ID NO: 34 și VL din SEQ ID NO: 35; sau

b. inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-L1, în care opțional anticorpul anti-PD-L1 cuprinde:

i. VH din SEQ ID NO: 26 și VL din SEQ ID NO: 27; ii. VH din SEQ ID NO: 28 și VL din SEQ ID NO: 29; sau iii. VH din SEQ ID NO: 30 și VL din SEQ ID NO: 31; sau

c. inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-PD-L2; sau

d. inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-LAG3; sau

e. inhibitorul punctului de control imun este un anticorp anti-TIM-3; în care opțional, anticorpul anti-TIM-3 cuprinde:

i. VH din SEQ ID NO: 36 și VL din SEQ ID NO: 37; sau ii. VH din SEQ ID NO: 38 și VL din SEQ ID NO: 39.

11. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 8-10, în care al doilea agent terapeutic este administrat simultan, secvențial sau separat.

12. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-11, în care anticorpul care se leagă specific la CD38 este administrat parental prin perfuzie intravenoasă sau injecție bolus, intramuscular, subcutanat sau intraperitoneal.

13. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-12, în care anticorpul care se leagă specific la CD38 este administrat intravenos.

14. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-12, în care anticorpul care se leagă specific la CD38 este administrat subcutanat.

15. Anticorpul care se leagă specific la CD38 pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-14, în care:

a. pacientul este tratat sau a fost tratat cu terapie cu radiație; și/sau

b. pacientul a avut sau va suferi o intervenție chirurgicală.

Figura 1

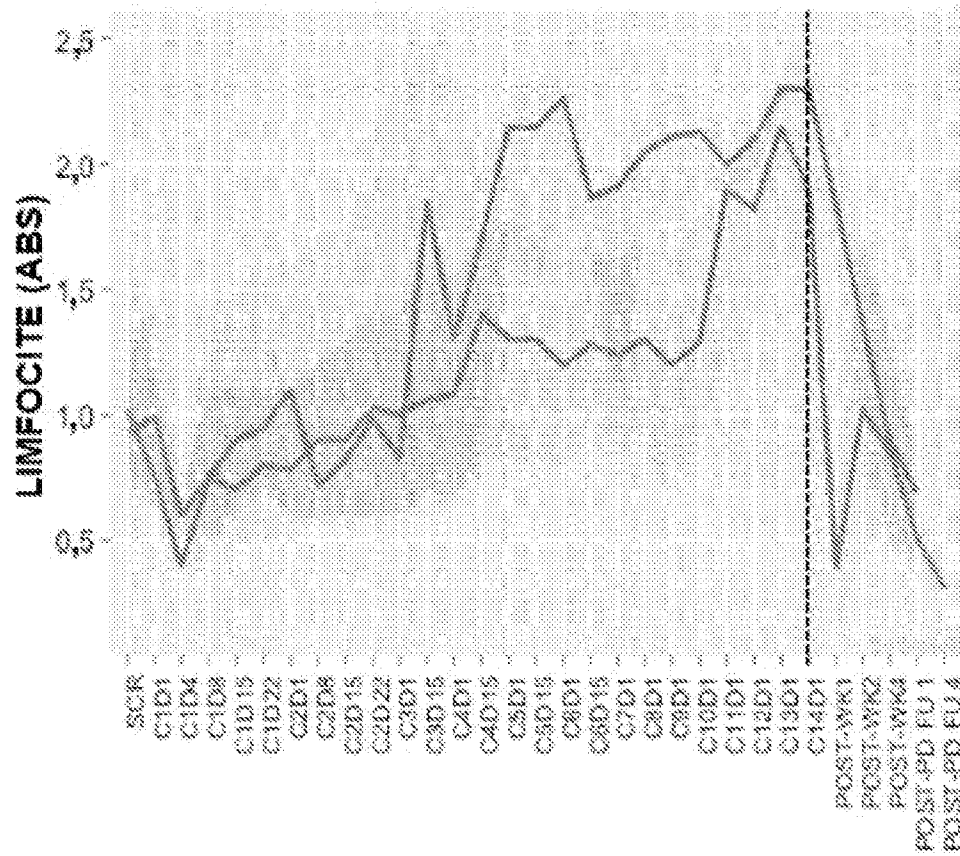


Figura 2

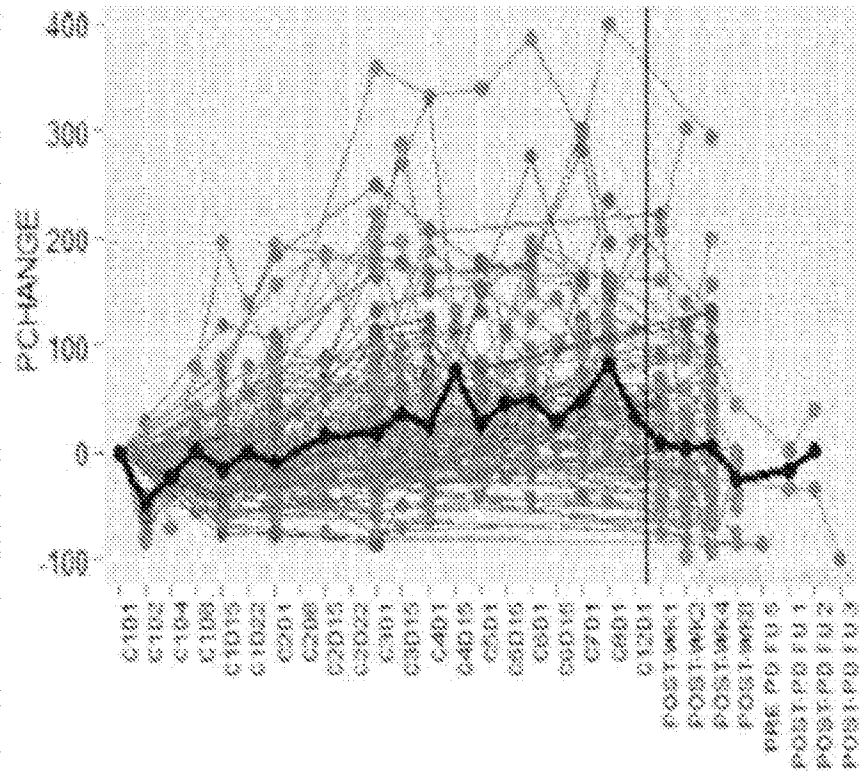


Figura 3

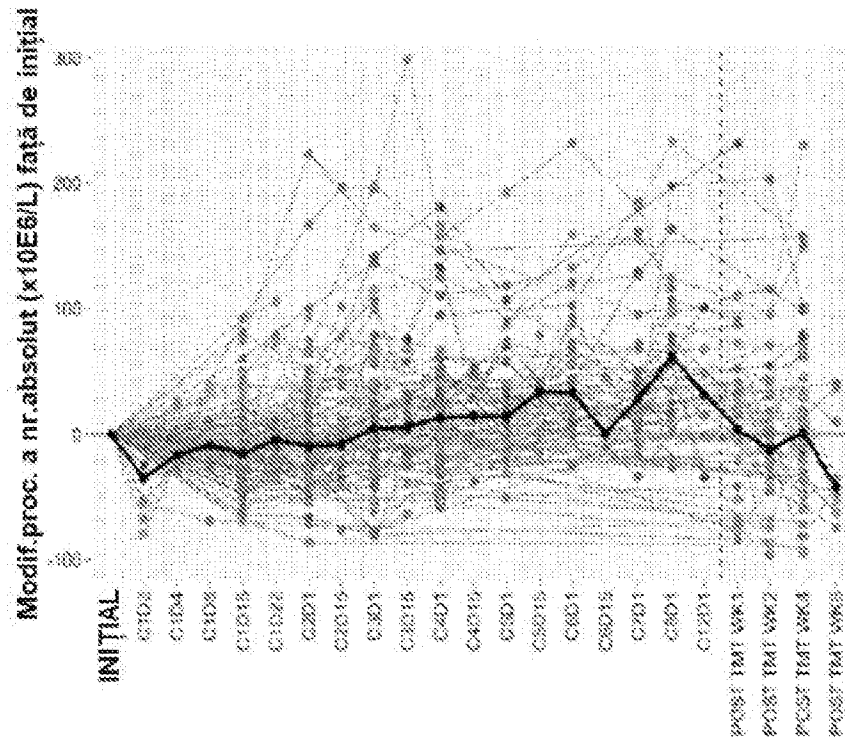


Figura 4

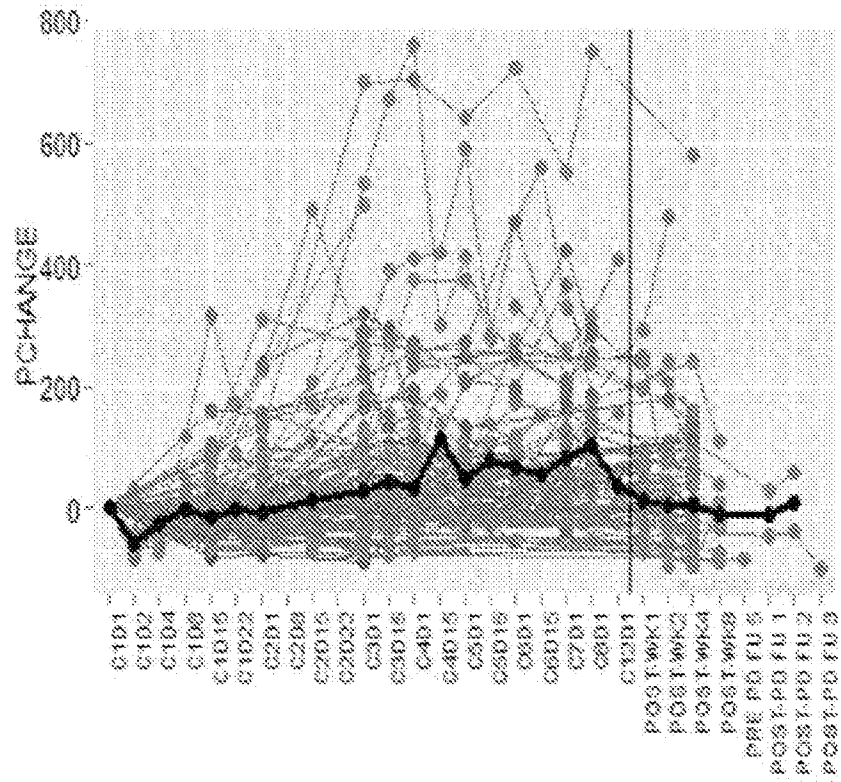


Figura 5

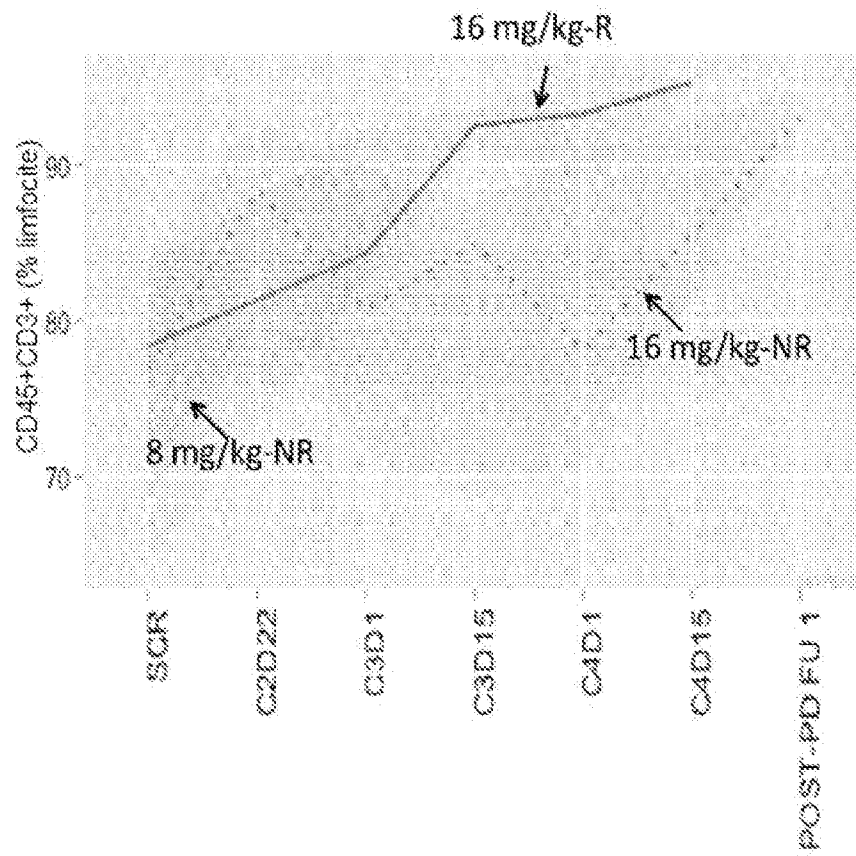


Figura 6

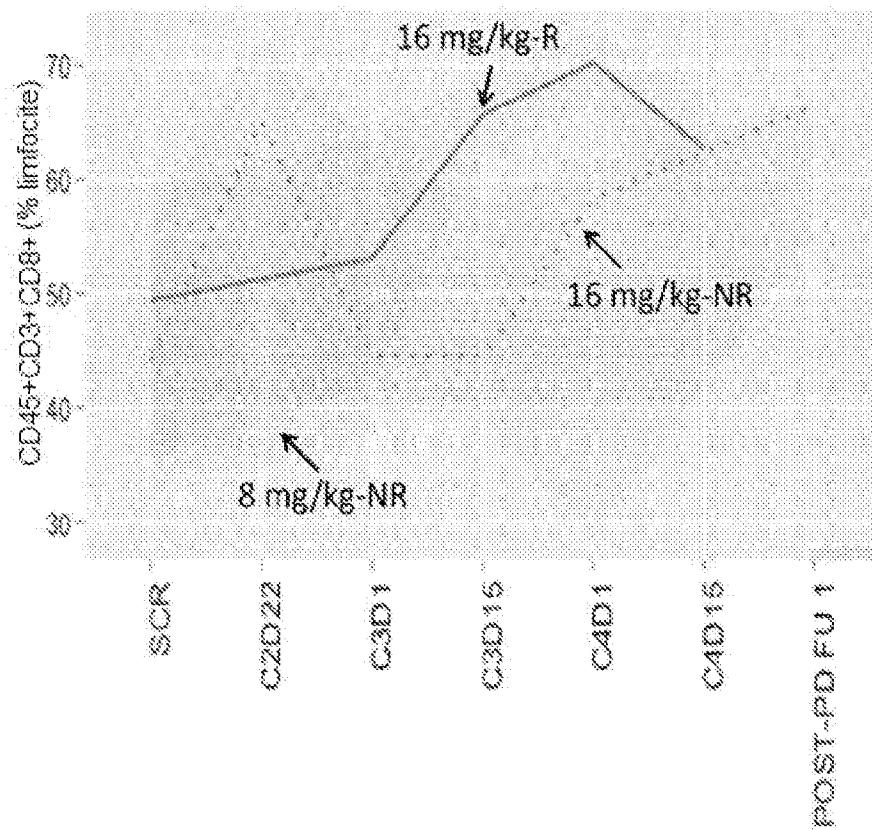


Figura 7A

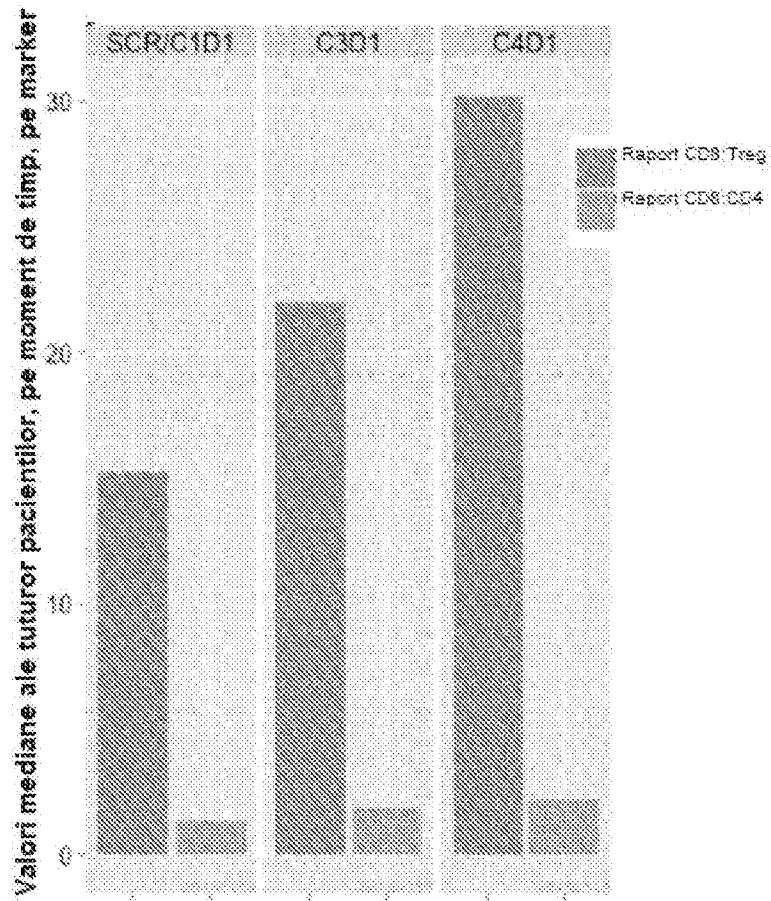


Figura 7B

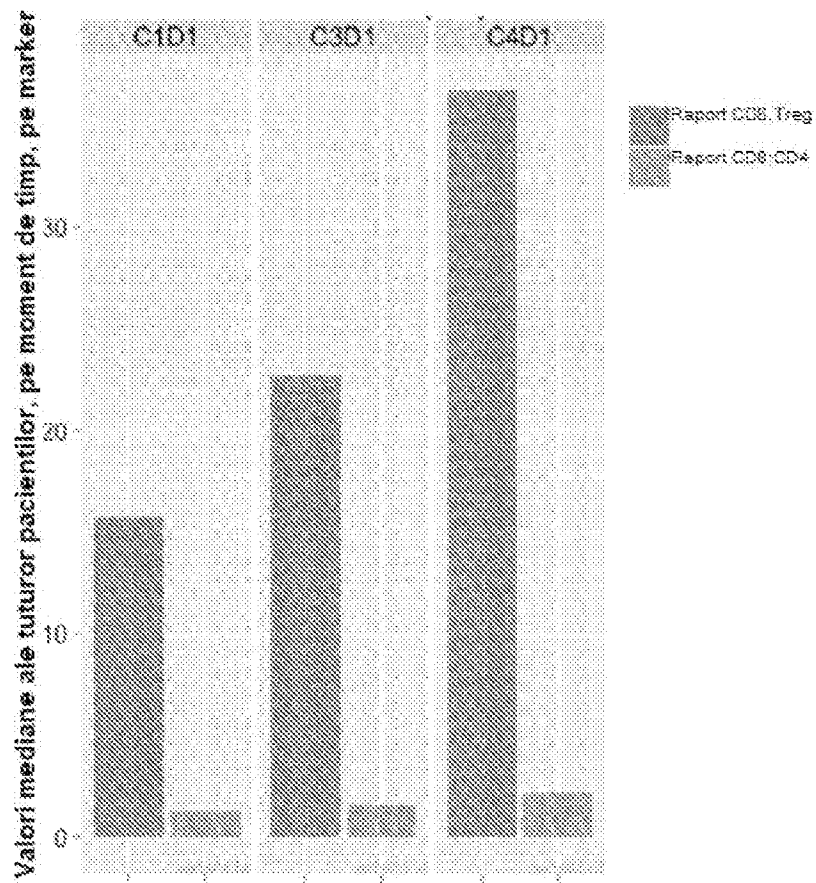


Figura 8A

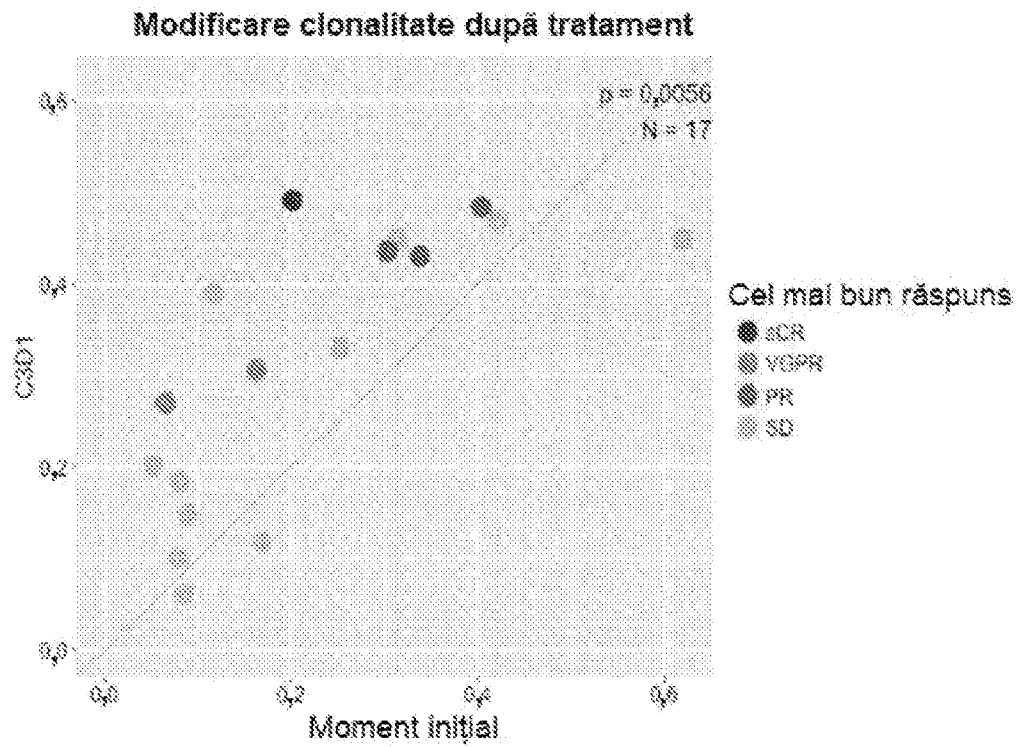


Figura 8B

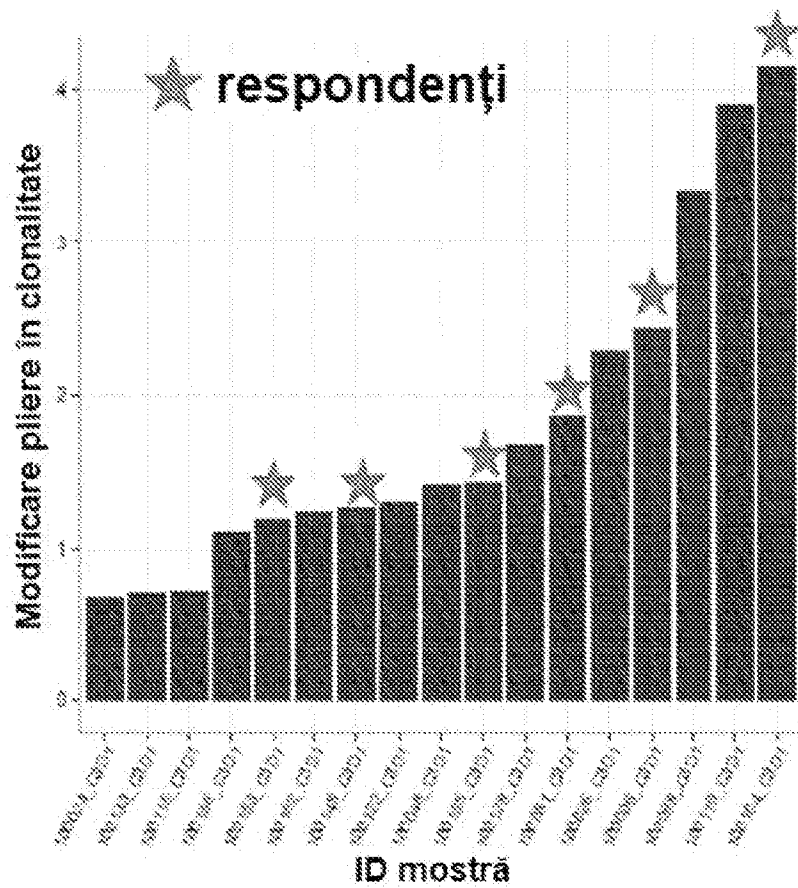


Figura 8C

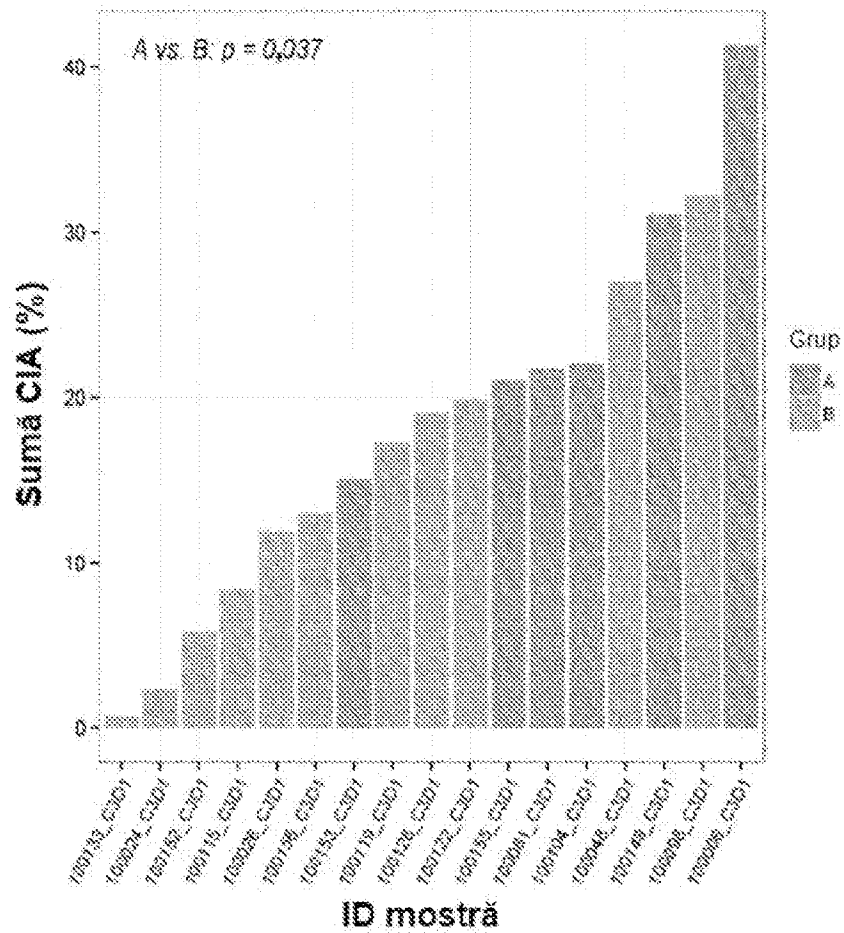


Figura 8D

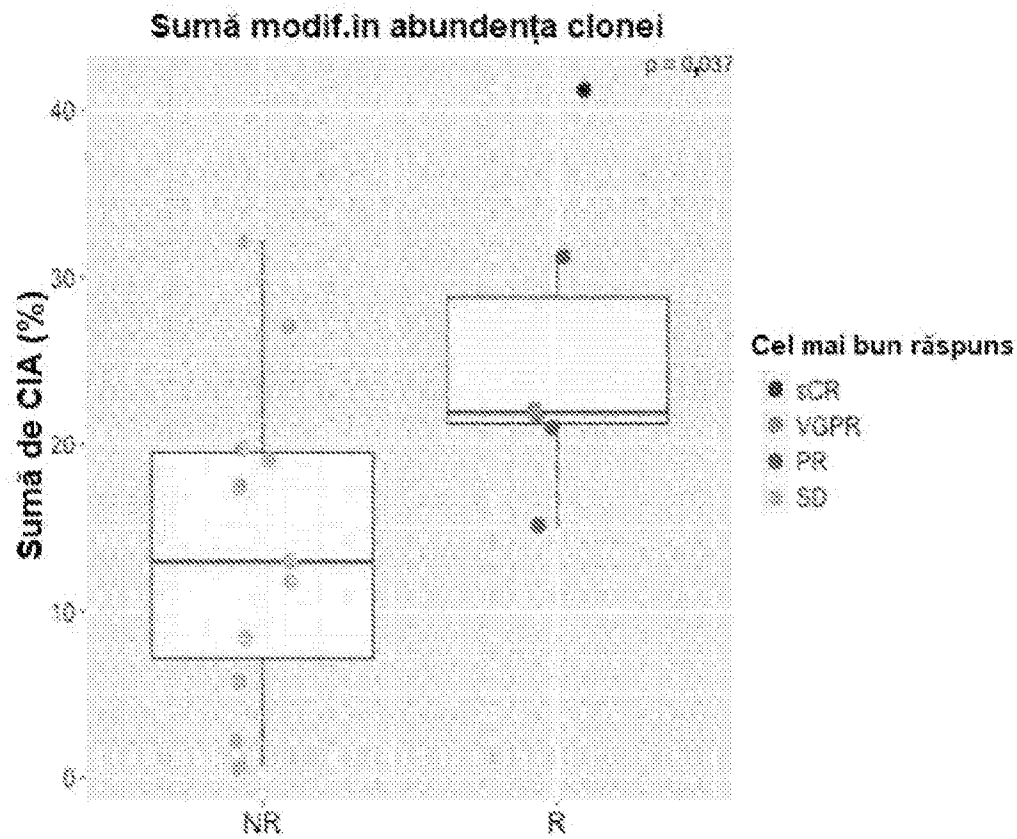


Figura 8E

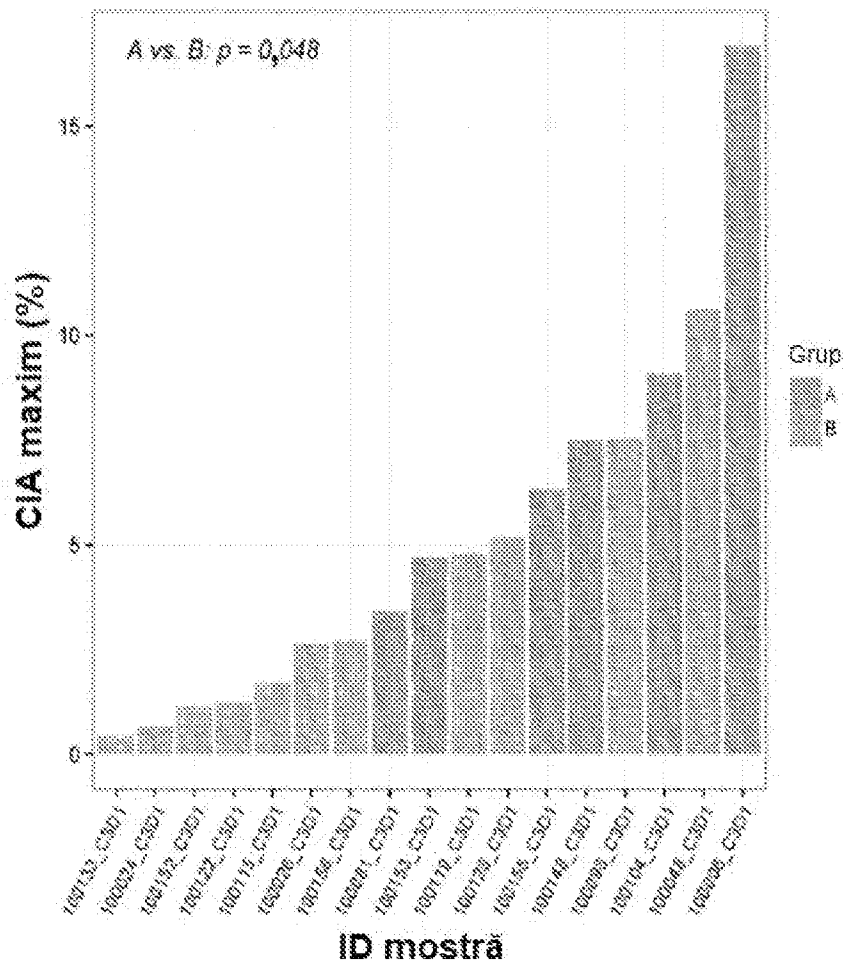


Figura 8F

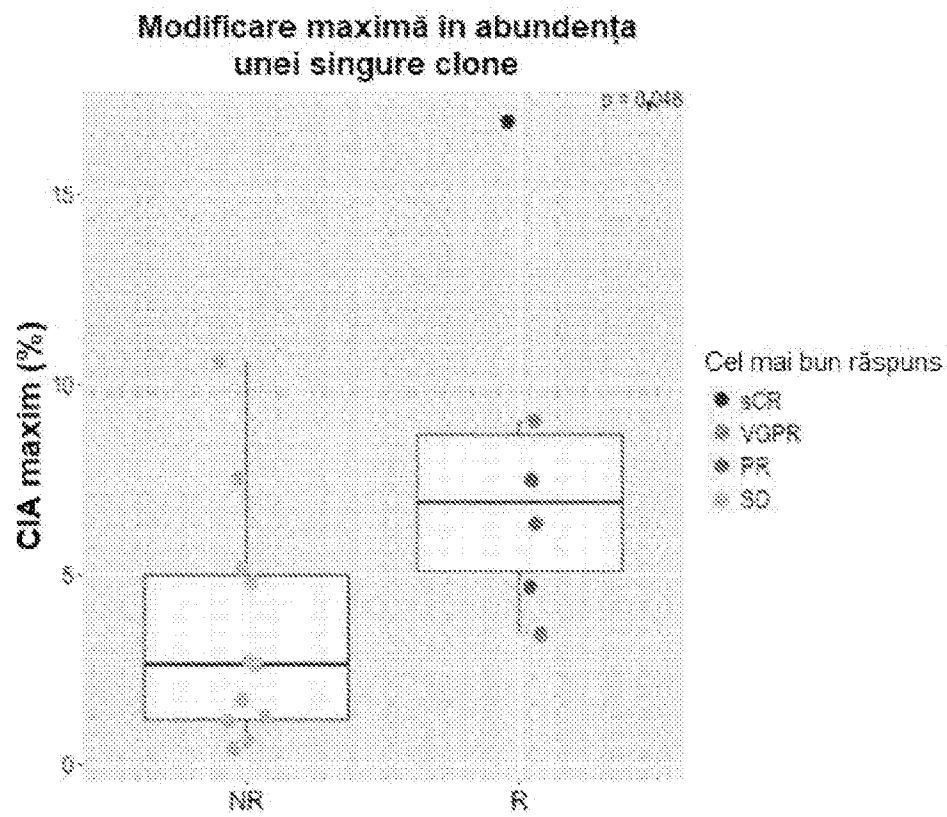


Figura 9A

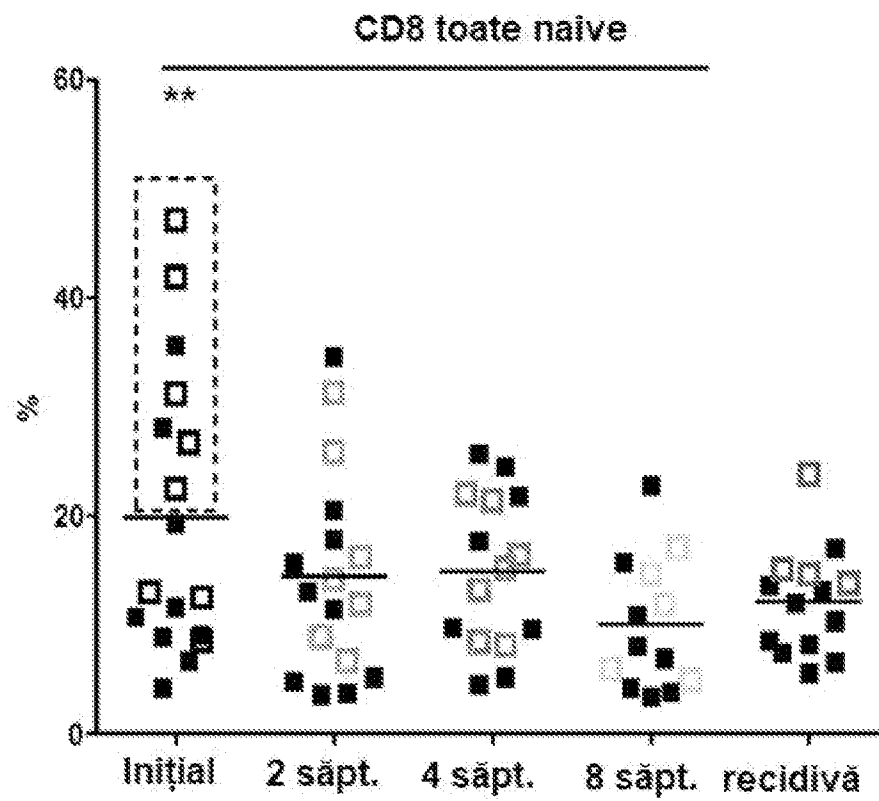


Figura 9B

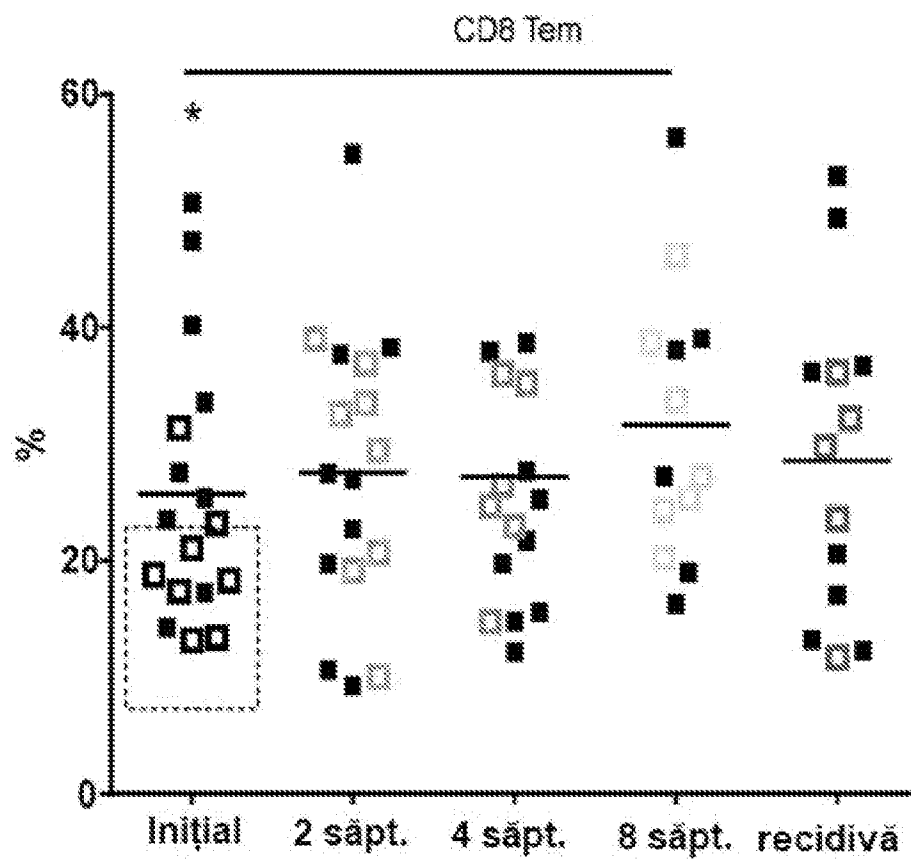


Figura 9C

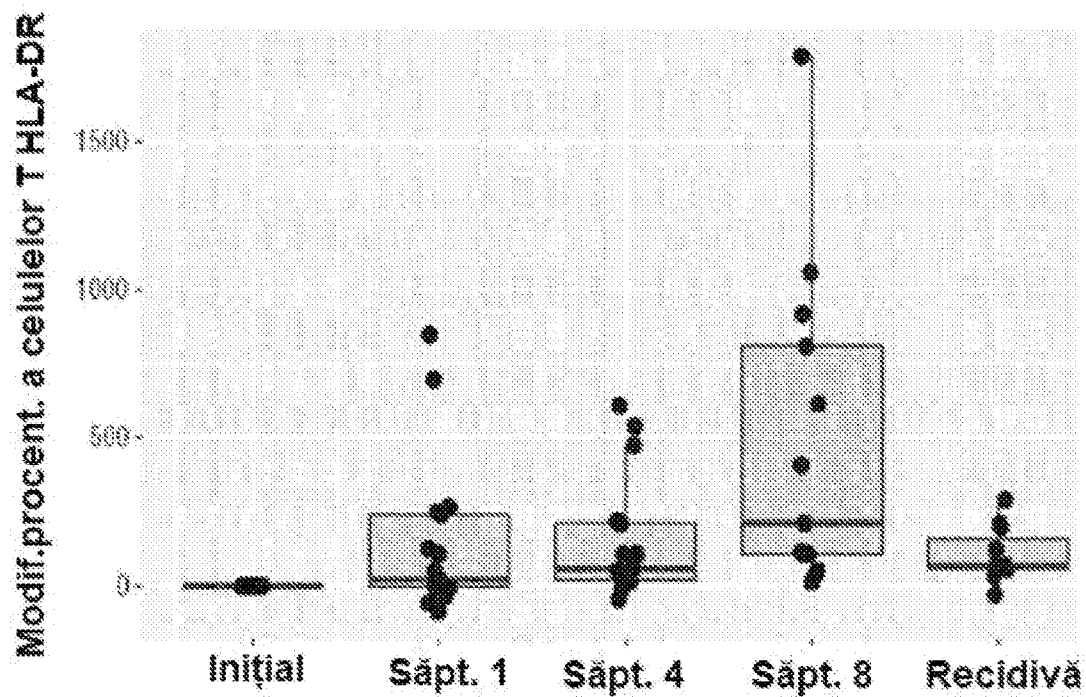


Figura 9D

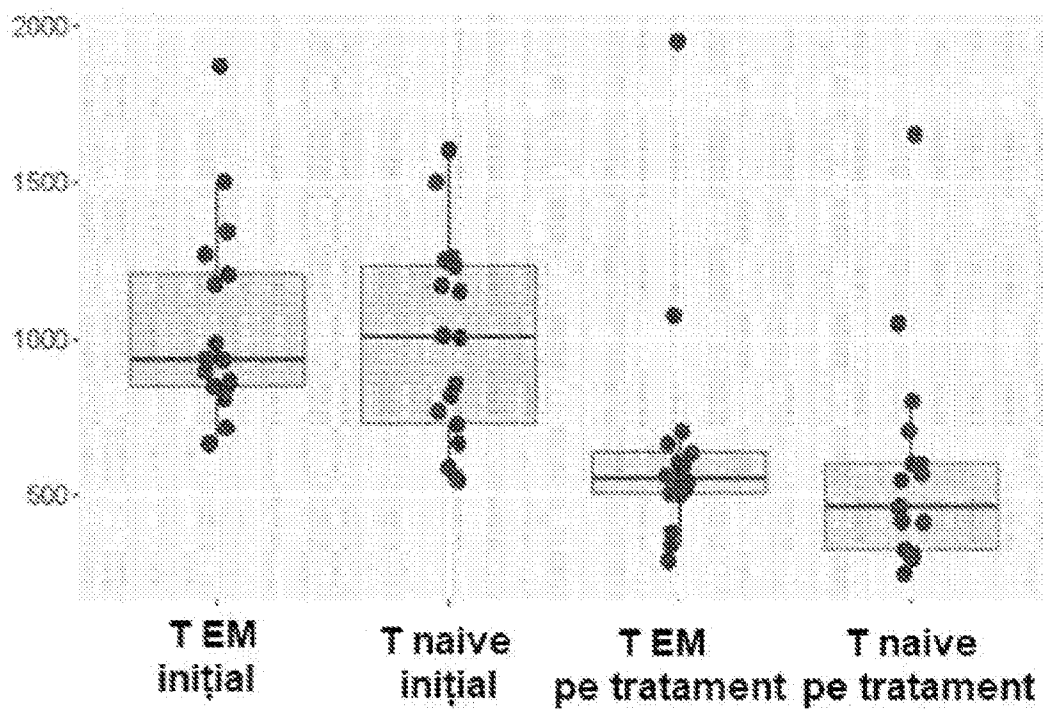


Figura 10A

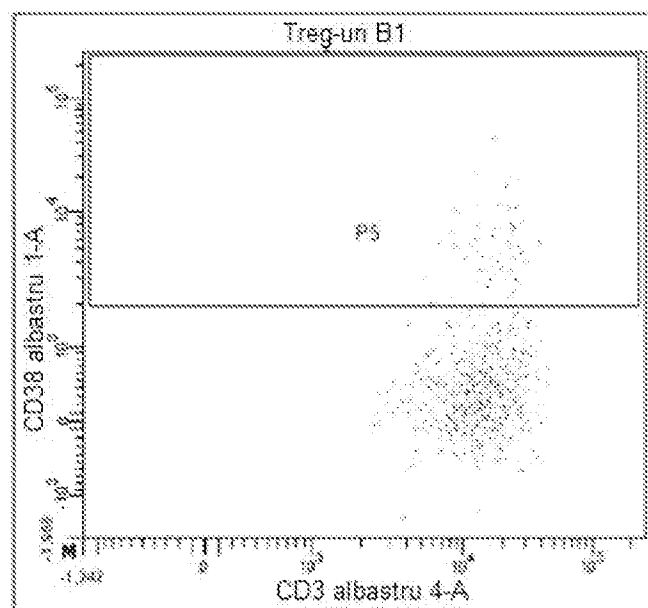
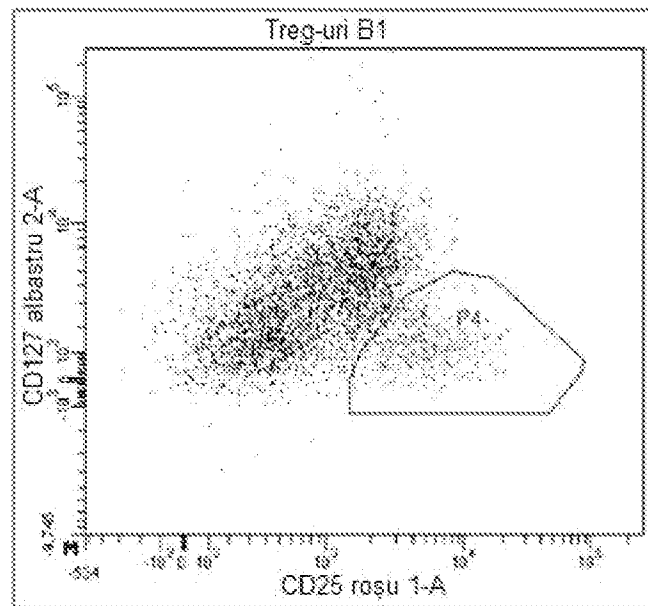


Figura 10B

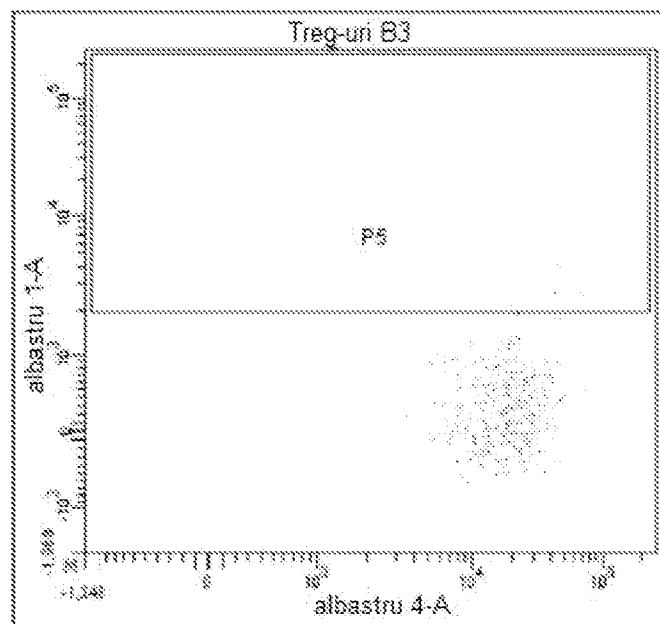
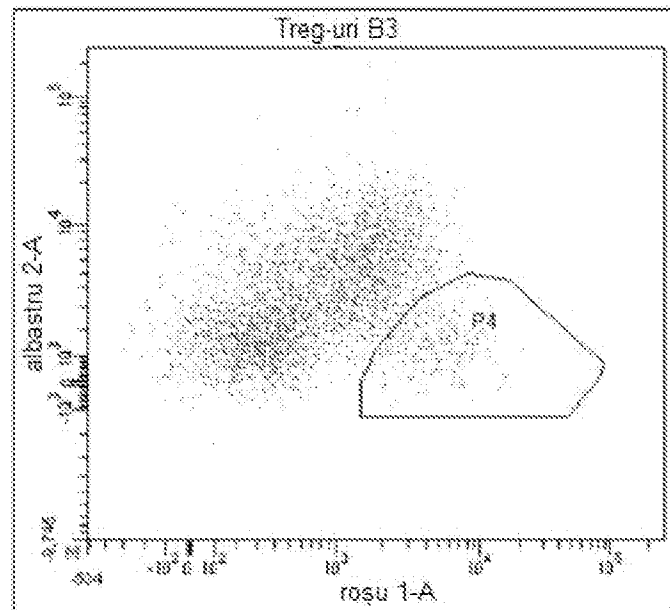


Figura 10C

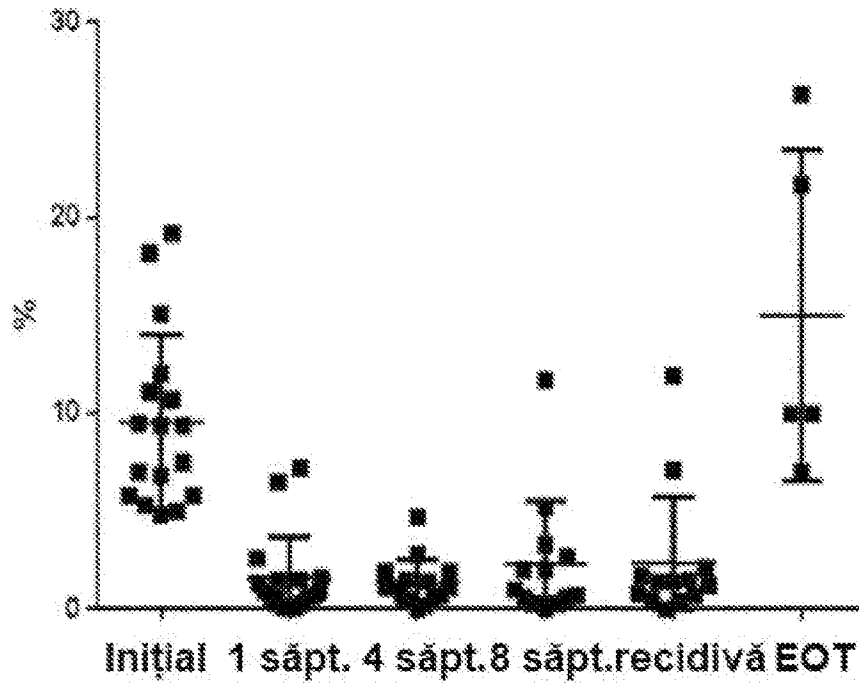


Figura 10D

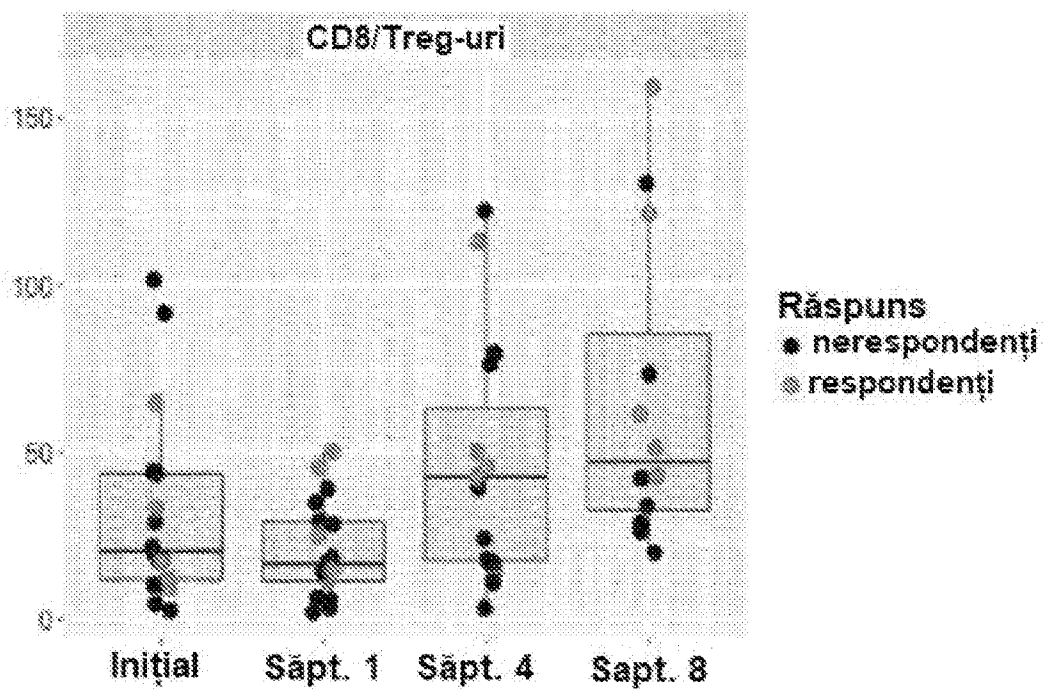


Figura 10E

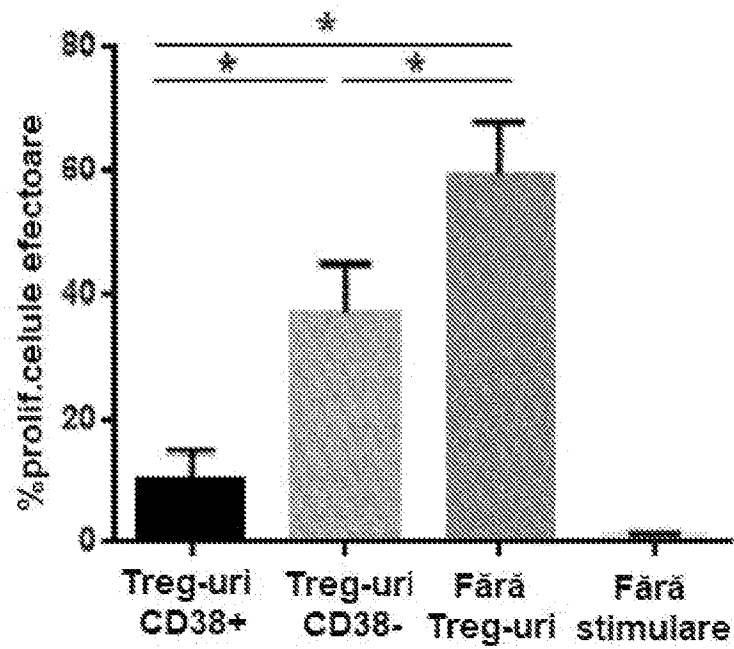


Figura 11

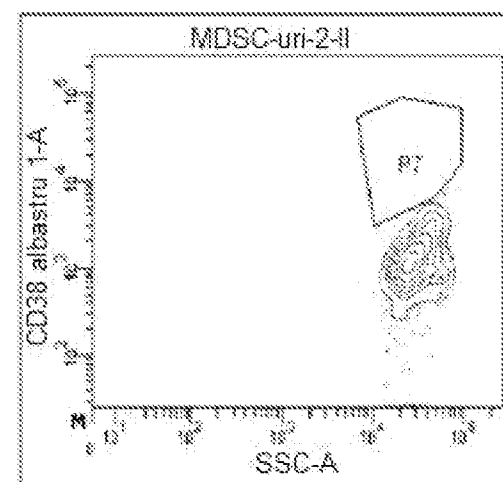
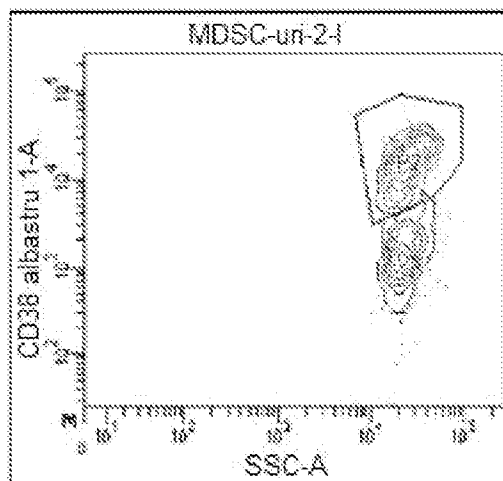
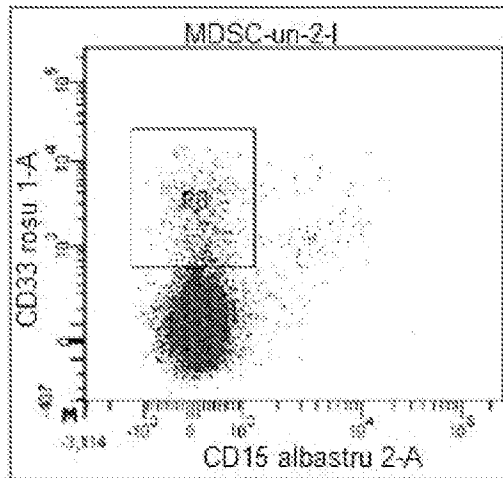


Figura 12

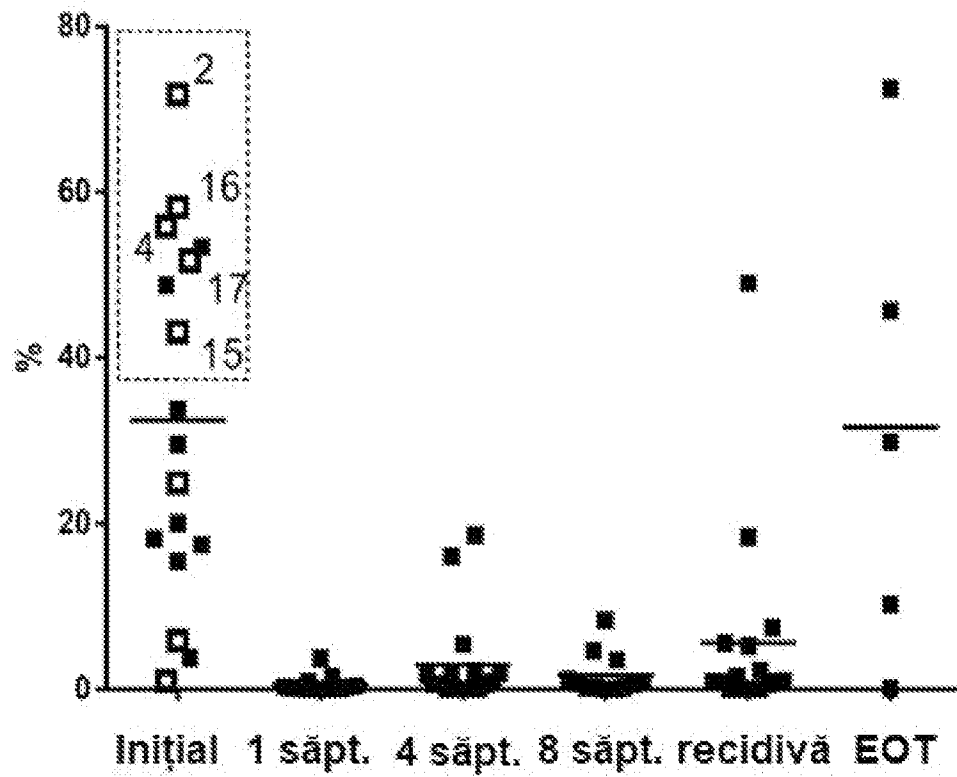


Figura 13

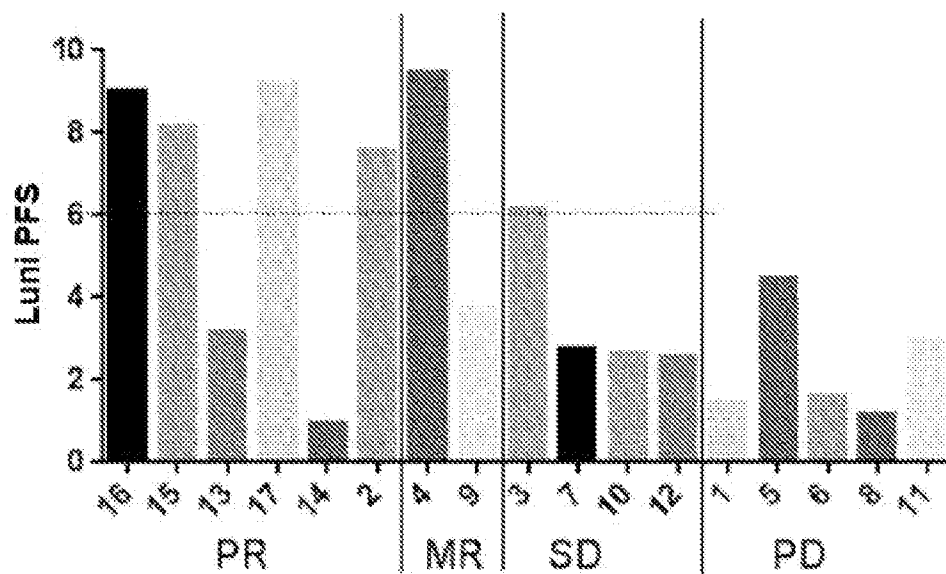


Figura 14

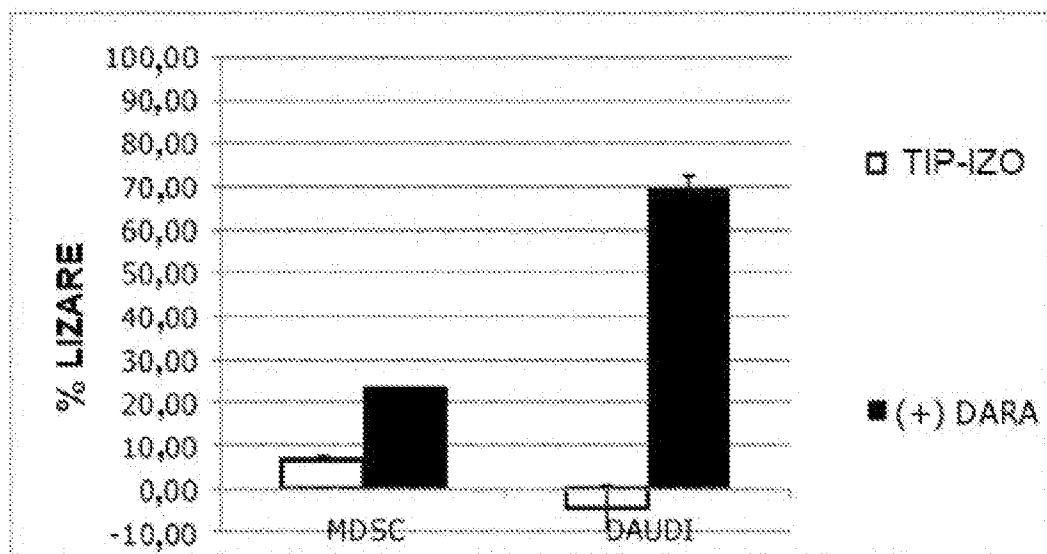


Figura 15A

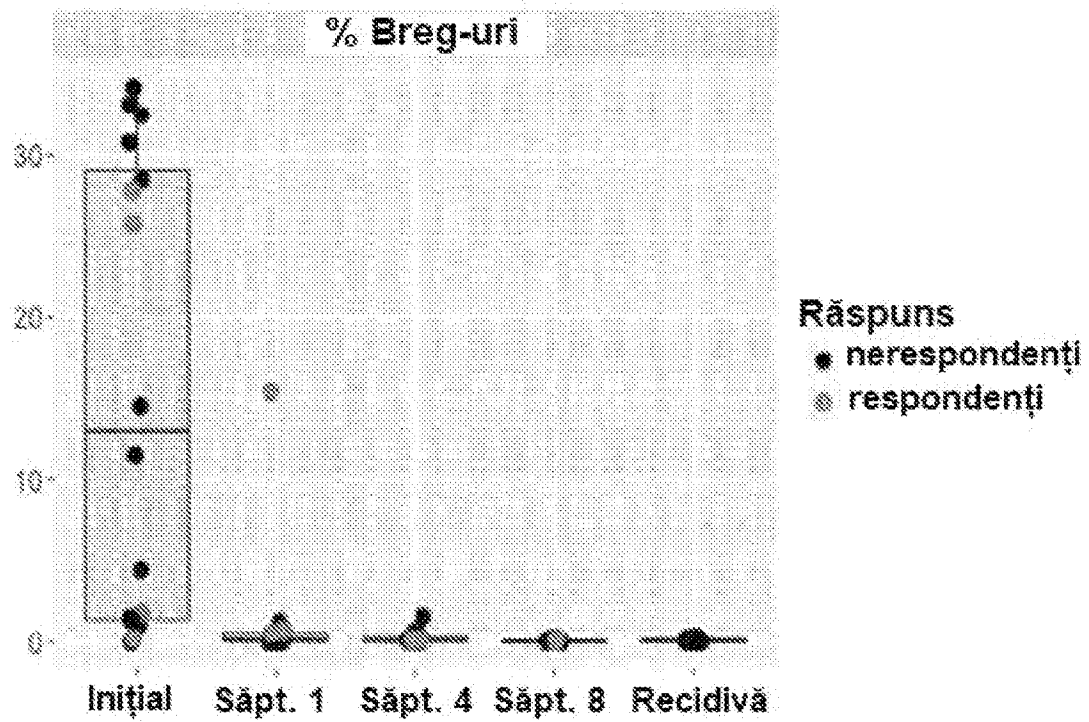


Figura 15B

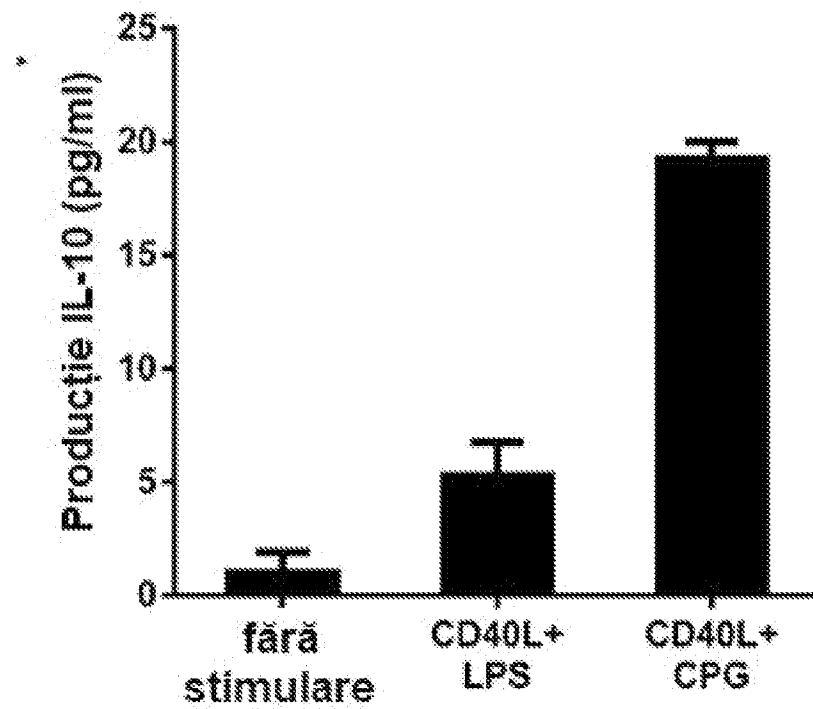


Figura 16A

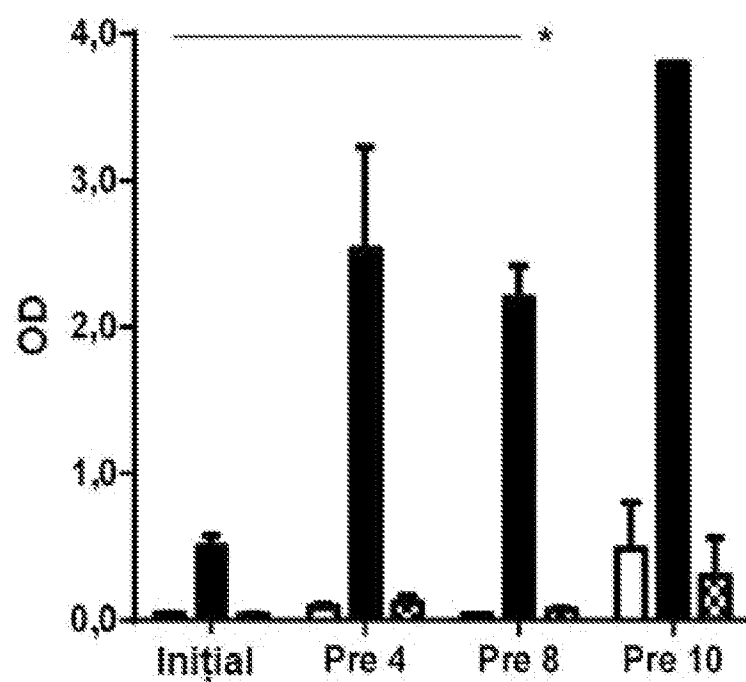


Figura 16B

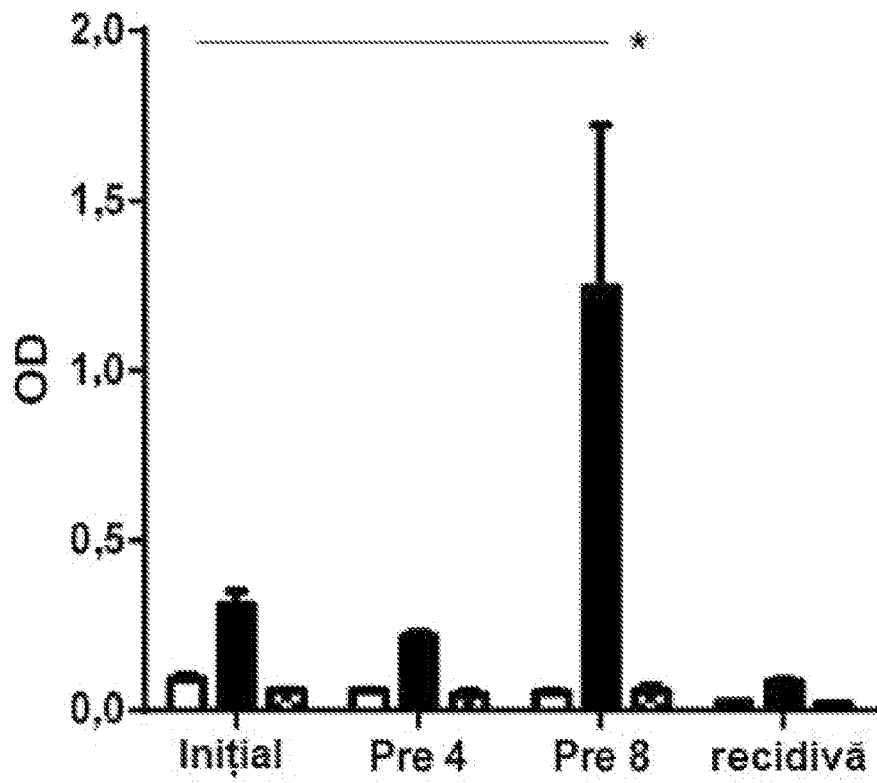


Figura 16C

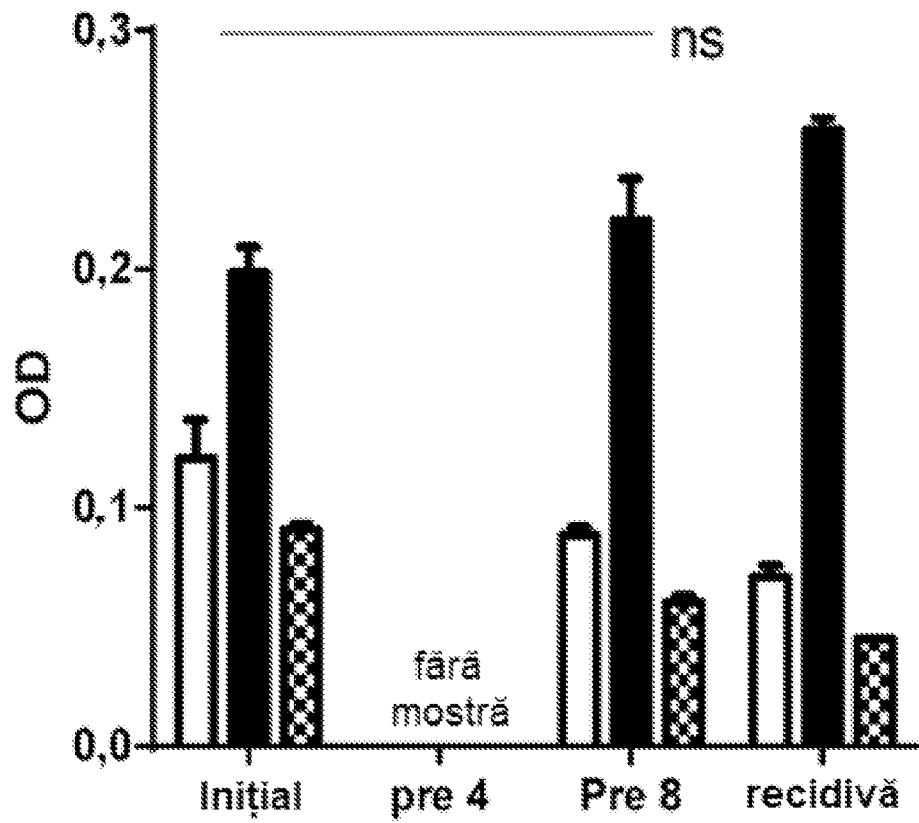


Figura 16D

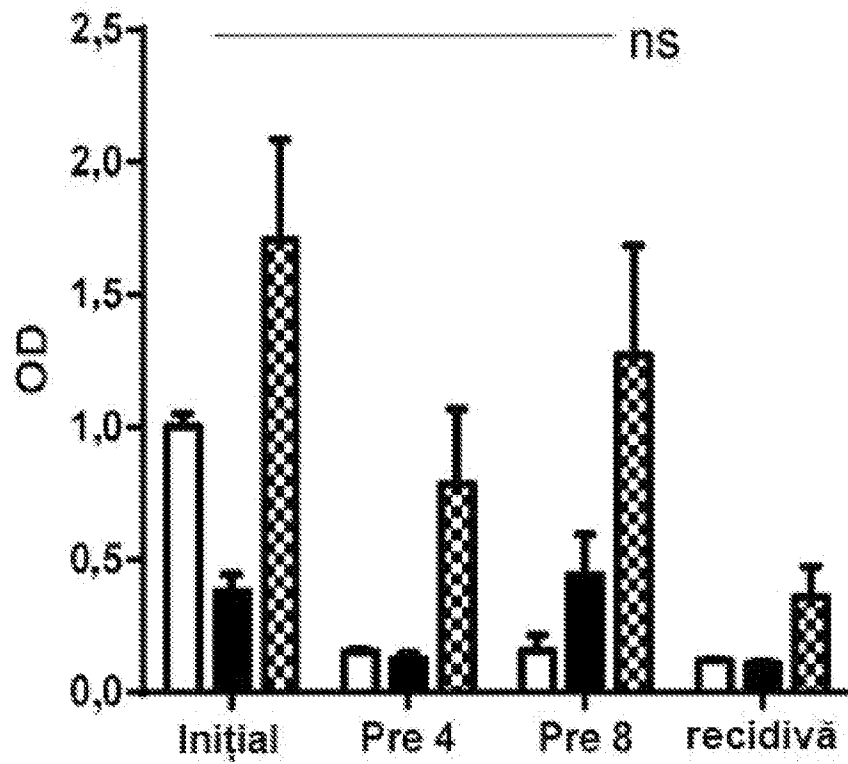


Figura 16E

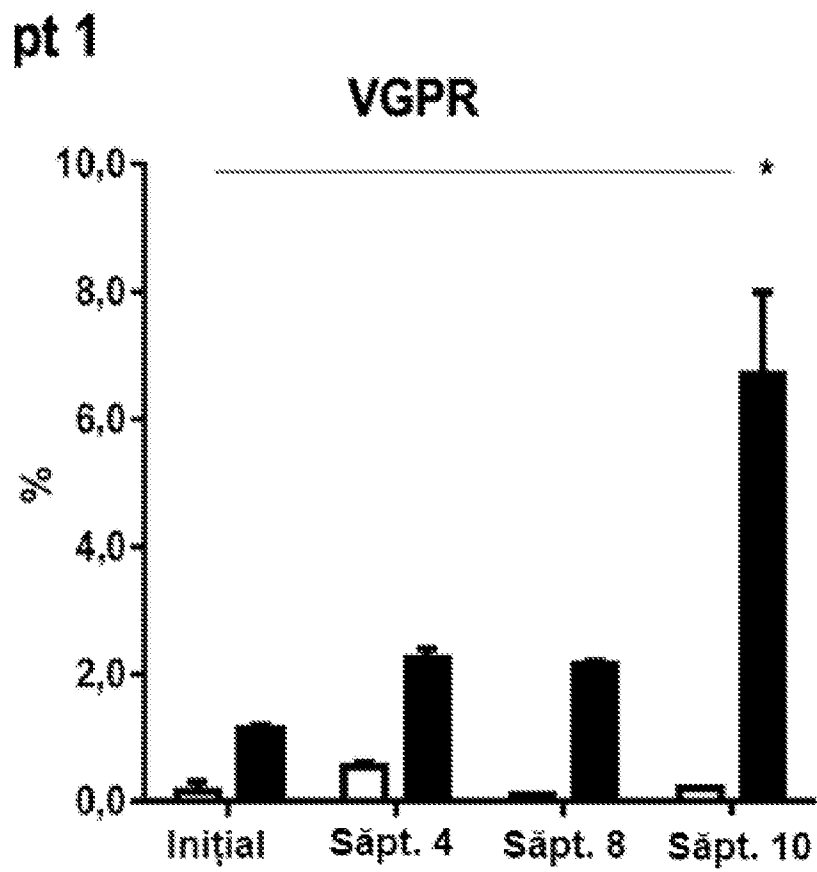


Figura 16F

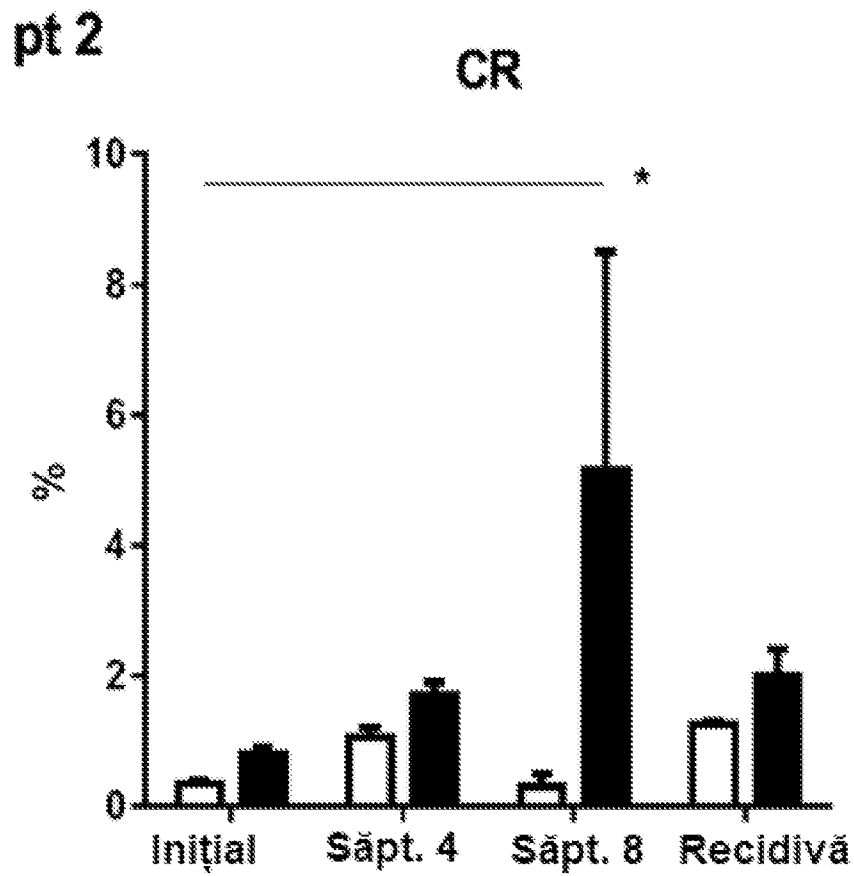


Figura 17A

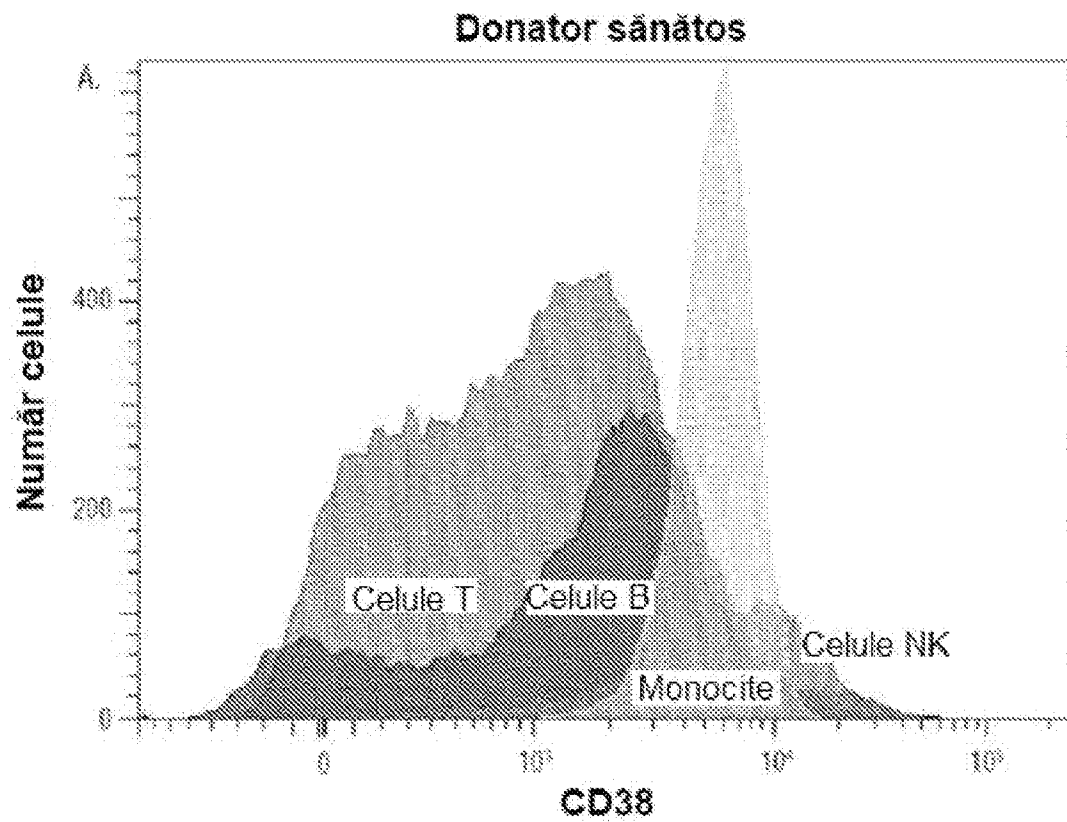


Figura 17B

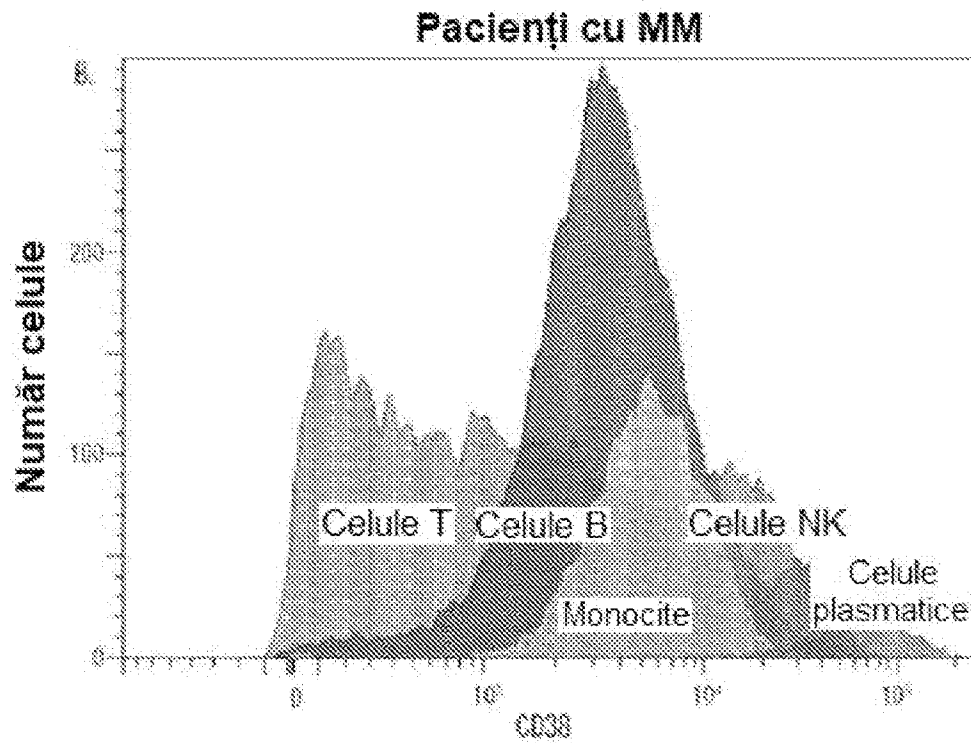


Figura 17C

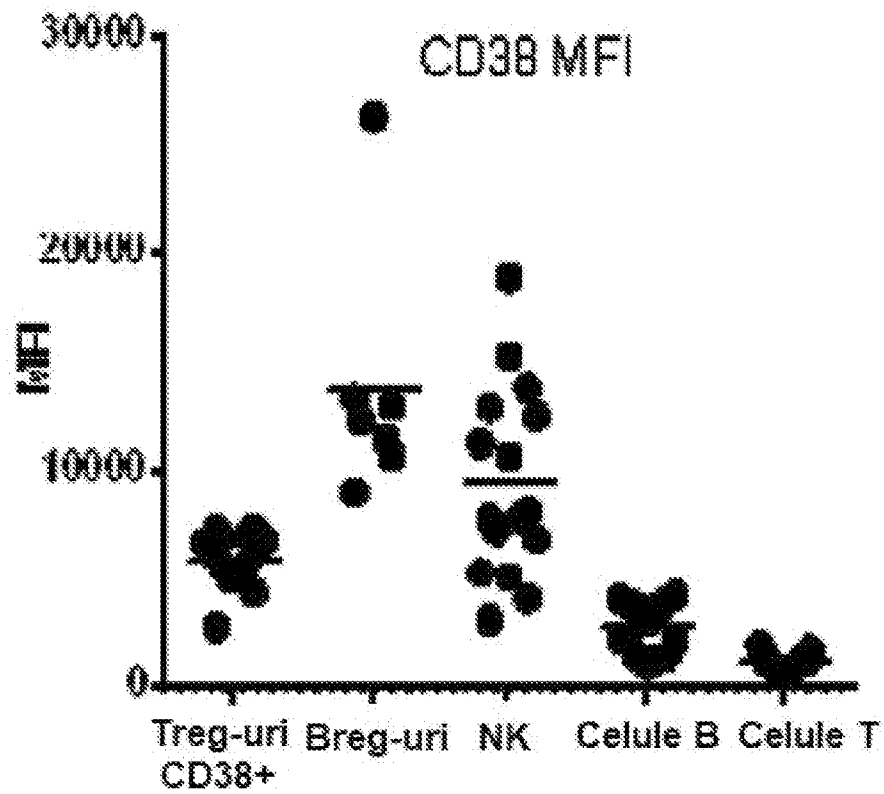


Figura 18

