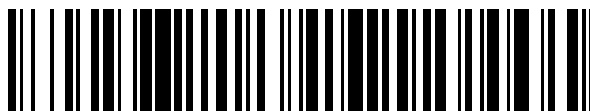


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 878 156**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2017 PCT/EP2017/063045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017 WO17207574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2017 E 17728484 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 3465214**

54 Título: **Métodos para predecir el beneficio terapéutico de una terapia anti-CD19 en pacientes**

30 Prioridad:

30.05.2016 EP 16171885

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

18.11.2021

73 Titular/es:

**MORPHOSYS AG (100.0%)
Simmelweisstrasse 7
82152 Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**ENDELL, JAN;
WINDERLICH, MARK y
BOXHAMMER, RAINER**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 878 156 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para predecir el beneficio terapéutico de una terapia anti-CD19 en pacientes

5 Campo de la invención

La presente divulgación está dirigida a identificar características y biomarcadores en pacientes que se benefician del tratamiento con anticuerpos anti-CD19.

10 Antecedentes

La CD19 es una glicoproteína transmembrana de 95 kDa de la superfamilia de inmunoglobulinas que contiene dos dominios extracelulares similares a las inmunoglobulinas y una cola citoplasmática extensa. La proteína es un receptor de superficie de linfocitos pan-B y se expresa ubicuamente desde las etapas más tempranas del desarrollo de las células pre-B en adelante hasta que se regula por disminución durante la diferenciación terminal en células plasmáticas. Es específica del linaje de linfocitos B y no se expresa en células madre hematopoyéticas ni en otras células inmunes, excepto en algunas células dendríticas foliculares. La CD19 funciona como un regulador positivo de la señalización del receptor de células B (BCR) y es importante para la activación y proliferación de células B y en el desarrollo de respuestas inmunes humorales. Actúa como una molécula coestimuladora junto con CD21 y CD81 y es fundamental para las respuestas de las células B a los antígenos dependientes de las células T. La cola citoplasmática de CD19 está asociada físicamente con una familia de tirosina quinasas que desencadenan vías de señalización descendentes a través de la familia src de proteínas tirosina quinasas. La CD19 es un objetivo atractivo para los cánceres de origen linfóide, ya que se expresa en gran medida en casi todas las leucemias linfocíticas crónicas (CLL) y linfomas no Hodgkin (NHL), así como en muchos otros tipos diferentes de leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda (ALL) y leucemia de células pilosas (HCL).

El desarrollo clínico de anticuerpos dirigidos contra CD19 había estado previamente limitado por la internalización del antígeno de CD19, sin embargo, la tecnología mejorada de modificación de anticuerpos ha restaurado este potencial objetivo terapéutico. MOR00208 (anteriormente llamado XmAb5574) es un anticuerpo monoclonal humanizado modificado de Fc que se une a CD19. El aumento en la unión de MOR00208 Fc a FcγR, debido a mutaciones diseñadas de XmAb, mejora significativamente la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) in vitro, la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y los efectos citotóxicos directos (apoptosis) sobre el tumor con respecto al anticuerpo no modificado. No se ha demostrado que MOR00208 medie la citotoxicidad dependiente del complemento.

MOR00208 se ha estudiado o se está estudiando actualmente en ensayos clínicos en CLL, ALL y NHL. Específicamente, se han completado un ensayo de Fase I titulado Seguridad y tolerabilidad de XmAb5574 en leucemia linfocítica crónica, y un ensayo de Fase IIa titulado Estudio de anticuerpo anti-CD19 optimizado para Fc (MOR00208) para tratar la leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL). Un ensayo de fase I del anticuerpo para CD19 diseñado de Fc XmAb5574 (MOR00208) demostró seguridad y eficacia preliminar en CLL en recaída (Woyach et al., Blood 124, no. 24: 3553-60 (4 de diciembre de 2014)). Un ensayo de Fase IIa titulado Estudio de anticuerpo anti-CD19 optimizado para Fc (MOR00208) para tratar el linfoma no Hodgkin (NHL) ha completado el reclutamiento. Y los siguientes ensayos están planificados/en curso: un ensayo de Fase II/III titulado Un ensayo para evaluar la eficacia y seguridad de MOR00208 con bendamustina (BEN) frente a rituximab (RTX) con BEN en pacientes adultos con linfoma de células B grandes difusas en recaída o refractarias (DLBCL) (B-MIND), un ensayo de Fase II titulado Estudio para evaluar la eficacia y seguridad de MOR00208 con idelalisib en pacientes con R/R CLL/SLL pretratados con BTKi, un ensayo de Fase II titulado Estudio para evaluar la seguridad y eficacia de lenalidomida con MOR00208 en pacientes con R-R DLBCL, y un ensayo de Fase II titulado MOR00208 de Fase II en combinación con lenalidomida para pacientes con CLL, SLL o PLL en recaída o refractaria, o pacientes mayores con CLL, SLL o PLL sin tratar. En otro ensayo actual de Fase II (COSMOS) se estudia la eficacia y seguridad de MOR00208 en combinación con idelalisib o venetoclax en pacientes con CLL, SLL en recaída o refractaria.

Se ha informado la eficacia de agente individual de MOR00208 en CLL y NHL. Sin embargo, las tasas de respuesta variable general de los pacientes a las terapias con anticuerpos monoclonales indican que se necesitan métodos para predecir con precisión qué pacientes es probable que respondan a dichas terapias con anticuerpos, de tal manera que el tratamiento pueda administrarse a aquellos pacientes que es más probable que reciban beneficios. Pueden encontrarse biomarcadores o características particulares de los pacientes para los cuales una concentración o intervalo particular para cada biomarcador se correlaciona con la capacidad de respuesta a dicha terapia.

Se evaluó la influencia del recuento de células asesinas naturales (NK) sobre la supervivencia de pacientes con DLBCL tratados con rituximab, ciclofosfamida, clorhidrato de doxorubicina (hidroxiadonomicina), sulfato de vincristina (Oncovin) y prednisona (R-CHOP). Kim et al., Blood Research, 49:3, 162-169 (septiembre de 2014). Anteriormente, se ha informado que el recuento de células NK periféricas se asoció con el resultado clínico en pacientes con aalPI 2-3 DLBCL. Plonquet et al., Ann Oncol 2007; 18: 1209-15. La US 2014/328842 A1 divulga un método para identificar a un sujeto que tiene linfoma no Hodgkin (NHL) que responde a tratamiento con un

anticuerpo anti-CD20, en donde la respuesta al tratamiento se basa en el polimorfismo de CD16 (también conocido como FcγRIIIA). La US 2015/0239974 A1 divulga que la trogocitosis (cepillado de antígeno) inducido por un anticuerpo anti-CD22 humanizado (hRBF4) desempeña un papel significativo en la determinación de la eficacia del anticuerpo y la respuesta a la enfermedad para el tratamiento de enfermedades de células B, como cánceres hematopoyéticos, disfunción del sistema inmune y/o enfermedad autoinmune.

Está claro que se necesitan esfuerzos e inversiones significativos para descubrir e identificar las características y biomarcadores de tales pacientes predictivos de la eficacia.

Resumen de la invención

MOR00208 se ha estudiado en pacientes con CLL, ALL, NHL y SLL. Por consiguiente, hasta la fecha se ha completado un análisis exhaustivo de los datos clínicos hasta la fecha para identificar las características o los biomarcadores de los pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con MOR00208.

MOR00208 se dirige específicamente al antígeno de superficie de CD19 y media la muerte directa de células tumorales a través de su función efectora ADCC mejorada. En estudios preclínicos, se ha demostrado que MOR00208 mejora significativamente la ADCC, ADCP y los efectos citotóxicos directos (apoptosis) in vitro sobre líneas de células tumorales CD19⁺ que abarcan una amplia variedad de linfomas y leucemias humanos (linfoma de Burkitt, CLL, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia mieloide crónica (CML) CD19⁺, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) y leucemia linfoblástica aguda (ALL), que expresan niveles de antígeno de CD19 que varían entre 15.000 y 105.000 moléculas/célula. También se han observado efectos similares en relación con las células de CLL o ALL de pacientes recién aisladas y también se espera que se traduzcan en células de linfoma no Hodgkin (NHL) primario ya que el intervalo de expresión informado para las células B de ALL y CLL cubre el intervalo observado para las células B de NHL (Ginaldi et al., 1998; Olejniczak et al., 2006). En base a la expresión superficial amplia y homogénea de CD19 en varios tipos de neoplasias de células B, el efecto de MOR00208 en el presente estudio puede transferirse a una amplia variedad de linfomas y leucemias humanos, como CLL, ALL, NHL y SLL y subtipos de los mismos.

Los datos del ensayo de Fase IIa titulado Estudio de anticuerpo anti-CD19 optimizado para Fc (MOR00208) para tratar el linfoma no Hodgkin (NHL) se han analizado a fondo. Como resultado de estos esfuerzos, la siguiente divulgación proporciona características y biomarcadores de pacientes en los que los anticuerpos anti-CD19 son eficaces.

Específicamente, se evaluaron por lo menos las siguientes características de los pacientes: a) edad, b) género, c) si los pacientes habían recibido una dosis de Rituximab en los últimos 6 meses, d) si los pacientes eran refractarios a Rituximab, e) si los pacientes tenían el alelo de alta o baja afinidad de FCγRIIIa, f) si los pacientes tienen el alelo de alta o baja afinidad FCγRIIIa, g) si los pacientes tuvieron una duración de la respuesta al tratamiento anterior de más de 12 meses, h) recuentos de células T periféricas de referencia (células/μl), i) recuento de células NK periféricas de referencia (células/μl) y j) expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas (anticuerpos unidos por células, -ABC).

Tanto 1) el recuento de células NK periféricas de referencia como 2) la expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas mostraron claras correlaciones con las respuestas de los paciente s con la terapia de MOR00208. Específicamente, los pacientes que tienen un recuento de células NK periféricas de referencia más alto por μl se correlacionan con una tasa de control de la enfermedad (DCR) más alta. La DCR incluye pacientes que tienen respuesta completa (CR) + respuesta parcial (PR) + enfermedad estable (SD). Además, tales pacientes tenían una supervivencia libre de progresión (PFS) significativamente mejor en comparación con los pacientes que tenían recuentos de células NK más bajos. Además, los pacientes que tenían una expresión de CD16 de referencia en células NK de por lo menos 60.000 (ABC) se correlacionaron con una tasa de control de enfermedad (DCR) más alta.

Por lo tanto, los pacientes diagnosticados con CLL, ALL, NHL y SLL y que tienen a) un recuento de células NK periféricas alto o 2) una expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 ABC tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con MOR00208.

Tanto 1) los recuentos de células NK periféricas de referencia como 2) la expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas mostraron claras correlaciones con las respuestas de los pacientes con la terapia de MOR00208. Específicamente, los pacientes que tienen un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/μl se correlacionan con una tasa de control de enfermedad (DCR) más alta. La DCR incluye pacientes que tienen respuesta completa (CR) + respuesta parcial (PR) + enfermedad estable (SD). Además, los pacientes que tenían un recuento de células NK de referencia de por lo menos 50 células/μl tenían una supervivencia libre de progresión (PFS) significativamente mejor en comparación con los pacientes que tenían recuentos de células NK más bajos. Además, los pacientes que tenían una expresión de CD16 de referencia en células NK de por lo menos 60.000 (ABC) se correlacionaron con una tasa de control de enfermedad (DCR) más

alta.

Por lo tanto, los pacientes diagnosticados con CLL, ALL, NHL y SLL y que tienen a) un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/ μ l o 2) una expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 ABC tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con MOR00208.

Tanto 1) los recuentos de células NK periféricas de referencia como 2) la expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas mostraron claras correlaciones con las respuestas de los pacientes con la terapia de MOR00208. Específicamente, los pacientes que tienen un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/ μ l se correlacionan con una tasa de control de enfermedad (DCR) más alta. La DCR incluye pacientes que tienen respuesta completa (CR) + respuesta parcial (PR) + enfermedad estable (SD). Además, los pacientes que tenían un recuento de células NK de referencia de por lo menos 100 células/ μ l tenían una supervivencia libre de progresión (PFS) significativamente mejor en comparación con los pacientes que tenían recuentos de células NK más bajos. Además, los pacientes que tenían una expresión de CD16 de referencia en células NK de por lo menos 60.000 (ABC) se correlacionaron con una tasa de control de enfermedad (DCR) más alta.

Por lo tanto, los pacientes diagnosticados con CLL, ALL, NHL y SLL y que tienen a) un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/ μ l o 2) una expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 ABC tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento de MOR00208.

La invención proporciona un método para identificar a un sujeto que tiene linfoma no Hodgkin (NHL) que responde al tratamiento con un anticuerpo anti CD19, dicho método comprendiendo:

- a. proporcionar una muestra de sangre obtenida de dicho sujeto antes del tratamiento con anticuerpo anti-CD19.
- b. determinar el nivel de por lo menos un biomarcador en dicha muestra seleccionada del grupo que consiste de:
 - i. recuento de células NK periféricas, y
 - ii. niveles de expresión de CD16 en células NK periféricas,
- c. comparar el nivel de dicho por lo menos un biomarcador en dicha muestra con un nivel de punto de corte predeterminado.

en donde los niveles de dicho por lo menos un biomarcador en o por encima de un nivel de punto de corte predeterminado es indicativo de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo anti-CD19.

La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD19 para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene linfoma no de Hodgkin (NHL) identificado de acuerdo con el método de la invención.

Descripción de dibujos

La **Figura 1** muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables y las CDR de MOR00208.

La **Figura 2** muestra las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas completas de MOR00208.

La **Figura 3** muestra el análisis de la característica operativa de recepción (ROC) de los recuentos de células NK periféricas como predictor de DCR.

La **Figura 4** muestra el análisis ROC de los niveles de expresión de CD16 en células NK periféricas (ABC) como predictor de DCR.

La **Figura 5** muestra el análisis ROC del recuento de células T periféricas como un predictor potencial de DCR.

La **Figura 6** muestra que los recuentos de células NK periféricas y los niveles de expresión de CD16 en células NK periféricas son variables independientes y no correlacionadas.

La **Figura 7** muestra el diagrama de bosque con DCR en subgrupos de pacientes con características de valor de referencia y biomarcadores específicos

La **Figura 8** muestra la diferencia de supervivencia libre de progresión entre pacientes que tienen por lo menos 100 células/ μ l de recuentos de células NK periféricas frente a pacientes que tienen recuentos de células NK más bajos.

La **Figura 9** muestra la diferencia de supervivencia libre de progresión entre pacientes que tienen por lo menos 60.000 ABC en la expresión de CD16 en células NK periféricas frente a pacientes que tienen una expresión de

CD16 más baja en células NK.

La **Figura 10** muestra la diferencia de supervivencia libre de progresión entre pacientes que tienen por lo menos 500 células/μl de recuentos de células T periféricas frente a pacientes que tienen recuentos de células T más bajos.

Descripción detallada

El término "**anticuerpo**" significa anticuerpos monoclonales, incluyendo cualquier isotipo, como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Un anticuerpo IgG se compone de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable. Cada región variable contiene tres segmentos llamados "**regiones determinantes de la complementariedad**" ("**CDR**") o "**regiones hipervariables**", que son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente desde el extremo N-terminal. Las porciones más altamente conservadas de las regiones variables fuera de las CDR se denominan "**regiones marco**". Un "**fragmento de anticuerpo**" significa un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' F(ab')₂ u otro fragmento, que contiene por lo menos una cadena pesada variable o ligera variable, cada una conteniendo CDR y regiones marcos.

"**VH**" se refiere a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. "**VL**" se refiere a la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

"**Región Fc**" significa la región constante de un anticuerpo, que en humanos puede ser de la subclase IgG1, 2, 3, 4 u otras. Las secuencias de las regiones Fc humanas están disponibles en IMGT, Human IGH C-REGIONS, www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu_IGHCallgenes.html (recuperado el 16 de mayo de 2011).

El término paciente incluye a un humano.

El NHL es una enfermedad maligna heterogénea que se origina en los linfocitos. En los Estados Unidos (U.S.), la incidencia se estima en 65.000/año con una mortalidad de aproximadamente 20.000 (American Cancer Society, 2006; y SEER Cancer Statistics Review). La enfermedad puede presentarse en todas las edades, el inicio habitual comienza en adultos mayores de 40 años, con la incidencia aumentando con la edad. El NHL se caracteriza por una proliferación clonal de linfocitos que se acumulan en los ganglios linfáticos, la sangre, la médula ósea y el bazo, aunque puede estar afectado cualquier órgano principal. El sistema de clasificación actual usado por patólogos y practicantes clínicos es la clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que organiza el NHL en neoplasias de células B o T precursoras y maduras. Actualmente, el PDQ está dividiendo el NHL en indolente o agresivo para su entrada en ensayos clínicos. El grupo de NHL indolente se compone principalmente de subtipos foliculares, linfoma linfocítico pequeño, MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) y zona marginal; el indolente abarca aproximadamente el 50% de los pacientes con NHL de células B recién diagnosticados. El NHL agresivo incluye a pacientes con diagnósticos histológicos de células B grandes principalmente difusas (DLBL, DLBCL o DLCL) (40% de todos los pacientes recién diagnosticados tienen células grandes difusas), de Burkitt y células del manto. El curso clínico del NHL es altamente variable. Un determinante importante del curso clínico es el subtipo histológico. La mayoría de los tipos indolentes de NHL se consideran enfermedades incurables. Los pacientes responden inicialmente a la quimioterapia o a la terapia con anticuerpos y la mayoría recae. Los estudios hasta la fecha no han demostrado una mejora en la supervivencia con una intervención temprana. En pacientes asintomáticos, es aceptable "observar y esperar" hasta que el paciente se vuelva sintomático o el ritmo de la enfermedad parezca acelerarse. Con el tiempo, la enfermedad puede transformarse en una histología más agresiva. La supervivencia mediana es de 8 a 10 años, y los pacientes indolentes a menudo reciben 3 o más tratamientos durante la fase de tratamiento de su enfermedad. El tratamiento inicial del paciente con NHL sintomático indolente ha sido históricamente la quimioterapia de combinación. Los agentes más comúnmente usados incluyen: ciclofosfamida, vincristina y prednisona (CVP); o ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona (CHOP). Aproximadamente del 70% al 80% de los pacientes responderán a su quimioterapia inicial, la duración de las remisiones dura del orden de 2-3 años. En última instancia, la mayoría de los pacientes recaen. El descubrimiento y uso clínico del anticuerpo anti-CD20, rituximab, ha proporcionado mejoras significativas en la respuesta y la tasa de supervivencia. El estándar actual de atención para la mayoría de los pacientes es rituximab + CHOP (R-CHOP) o rituximab + CVP (R-CVP). El interferón está aprobado para el tratamiento inicial del NHL en combinación con agentes alquilantes, pero tiene un uso limitado en los Estados Unidos. La terapia con rituximab ha demostrado ser eficaz en varios tipos de NHL, y actualmente está aprobado como tratamiento de primera línea tanto para NHL indolente (linfoma folicular) como agresivo (linfoma difuso de células B grandes). Sin embargo, hay limitaciones significativas del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD20, incluyendo la resistencia primaria (50% de respuesta en pacientes indolentes en recaída), resistencia adquirida (50% de tasa de respuesta tras volver al tratamiento), respuesta completa rara (2% de tasa de respuesta completa en la población con recaída), y un patrón continuo de recaída. Finalmente, muchas células B no expresan CD20, y por tanto muchos trastornos de las células B no pueden

tratarse usando una terapia de anticuerpos anti-CD20.

Además del NHL, hay varios tipos de leucemias que resultan de la desregulación de las células B. La leucemia linfocítica crónica (también conocida como "leucemia linfocítica crónica" o "CLL") es un tipo de leucemia en adultos provocada por una acumulación anormal de linfocitos B. En la CLL, los linfocitos malignos pueden parecer normales y maduros, pero no pueden hacer frente de manera eficaz a la infección. La CLL es la forma más común de leucemia en adultos. Los hombres tienen el doble de probabilidades de desarrollar CLL que las mujeres. Sin embargo, el factor de riesgo clave es la edad. Más del 75% de los casos nuevos se diagnostican en pacientes mayores de 50 años. Cada año se diagnostican más de 10.000 casos y la mortalidad es de casi 5.000 al año (American Cancer Society, 2006; y SEER Cancer Statistics Review). La CLL es una enfermedad incurable, pero progresa lentamente en la mayoría de los casos. Muchas personas con CLL llevan una vida normal y activa durante muchos años. Debido a su inicio lento, la CLL en etapa temprana generalmente no se trata, ya que se cree que la intervención temprana para la CLL no mejora el tiempo de supervivencia ni la calidad de vida. En cambio, la afección se monitoriza a lo largo del tiempo. Los tratamientos iniciales para la CLL varían dependiendo del diagnóstico exacto y la progresión de la enfermedad. Hay docenas de agentes usados para el tratamiento de la CLL. Los regímenes de quimioterapia de combinación como FCR (fludarabina, ciclofosfamida y rituximab) y BR (Ibrutinib y rituximab) son eficaces tanto en la CLL recién diagnosticada como en la recidivante. El trasplante alogénico de médula ósea (células madre) rara vez se usa como tratamiento de primera línea para la CLL debido a su riesgo.

Otro tipo de leucemia es el linfoma linfocítico pequeño (SLL) que se considera una variante de CLL que carece de la linfocitosis clonal necesaria para el diagnóstico de CLL, pero por lo demás comparte características patológicas e inmunofenotípicas (Campo et al., 2011). La definición de SLL requiere la presencia de linfadenopatía y/o esplenomegalia. Además, el número de linfocitos B en la sangre periférica no debe exceder de $5 \times 10^9/l$. En la SLL, el diagnóstico debe confirmarse mediante evaluación histopatológica de una biopsia de ganglios linfáticos siempre que sea posible (Hallek et al., 2008). La incidencia de la SLL es de aproximadamente el 25% de CLL en los Estados Unidos (Dores et al., 2007).

Otro tipo de leucemia es la leucemia linfoblástica aguda (ALL), también conocida como leucemia linfocítica aguda. La LLA se caracteriza por la sobreproducción y la multiplicación continua de glóbulos blancos malignos e inmaduros (también conocidos como linfoblastos) en la médula ósea. "Agudo" se refiere al estado inmaduro e indiferenciado de los linfocitos circulantes ("blastos"), y que la enfermedad progresa rápidamente con una esperanza de vida de semanas a meses si no se trata. La ALL es más común en la infancia con una incidencia máxima de 4 a 5 años de edad. Los niños de 12 a 16 años mueren más fácilmente que otros. Actualmente, por lo menos el 80% de la ALL infantil se considera curable. Cada año se diagnostican menos de 4.000 casos y la mortalidad es de casi 1.500 al año (American Cancer Society, 2006; y SEER Cancer Statistics Review).

El uso de un anticuerpo de CD19 en linfomas de células B no específicos se analiza en la WO2007076950 (US2007154473). El uso de un anticuerpo de CD19 en CLL, NHL y ALL se describe en Scheuermann et al., CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy, Leukemia and Lymphoma, vol. 18, 385-397 (1995).

Anticuerpos adicionales específicos para CD19 se describen en la WO2005012493 (US7109304), WO2010053716 (US12/266,999) (Immunomedics); WO2007002223 (US US8097703) (Medarex); WO2008022152 (12/377,251) y WO2008150494 (Xencor), WO2008031056 (US11/852,106) (Medimmune); WO 2007076950 (US 11/648,505) (Merck Patent GmbH); WO 2009/052431 (US12/253,895) (Seattle Genetics); y WO2010095031 (12/710,442) (Glenmark Pharmaceuticals), WO2012010562 y WO2012010561 (International Drug Development), WO2011147834 (Roche Glycart), y WO 2012/156455 (Sanofi).

El término "**CD19**" se refiere a la proteína conocida como CD19, que tiene los siguientes sinónimos: B4, antígeno de linfocitos B CD19, antígeno de superficie de linfocitos B B4, CVID3, antígeno de diferenciación CD19, MGC12802 y antígeno de superficie de células T Leu-12.

La CD19 humana tiene la secuencia de aminoácidos de:

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTS DGPTQQLTWSRESPLKPF
 LKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELF
 5 RWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL
 QSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMW
 VMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLI
 10 FCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLG
 RAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEEEGEGYEEDSEEDSEFY
 ENDSNLGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSP
 15 HGSAWDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGP
 DPAWGGGGGRMGWTR. (SEQ ID NO: 7)

20 **"MOR00208"** es un anticuerpo anti-CD19. La secuencia de aminoácidos de los dominios variables se proporciona en la Figura 1. La secuencia de aminoácidos de las regiones Fc de cadena pesada y ligera de MOR00208 se proporcionan en la Figura 2. "MOR00208" y "XmAb 5574" se usan como sinónimos para describir el anticuerpo mostrado en las Figuras 1 y 2. El anticuerpo MOR00208 se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 12/377.251.

25 La solicitud de patente de Estados Unidos N° 12/377.251 describe el anticuerpo denominado 4G7 H1.52 Hybrid S239D/I332E/4G7 L1.155 (más tarde llamado MOR00208) de la siguiente manera:

>4G7 H1.52 Hybrid S239D/I332E

30 EVQLVESGGGLV KPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYN
 DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGTL
 35 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 40 FNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

> 4G7 L1.155

45 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLN
 50 SGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSST
 LTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)

55 Una composición farmacéutica incluye un agente activo, por ejemplo, un anticuerpo para uso terapéutico en humanos. Una composición farmacéutica puede incluir adicionalmente portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

60 **"Administrado"** o **"administración"** se refiere a la administración de una composición farmacéutica mediante una forma inyectable como, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea o vía mucosal, por ejemplo, como un spray nasal o aerosol para inhalación o como una solución, cápsula o comprimido ingerible.

65 El anticuerpo que se administra de acuerdo con la presente divulgación se administra al paciente en una

cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para proporcionar alguna mejora de las manifestaciones clínicas de una enfermedad o trastorno dados. Como ejemplo, los pacientes en el estudio ejemplificado recibieron una dosificación de MOR00208 a 12 mg/kg una vez a la semana y en mantenimiento una vez cada dos semanas o mensualmente.

La cantidad que es eficaz para un propósito terapéutico particular dependerá de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosificación apropiada puede lograrse, usando experimentación rutinaria, construyendo una matriz de valores y probando diferentes puntos en la matriz, todo lo cual está dentro de las habilidades ordinarias de un médico o científico clínico capacitado.

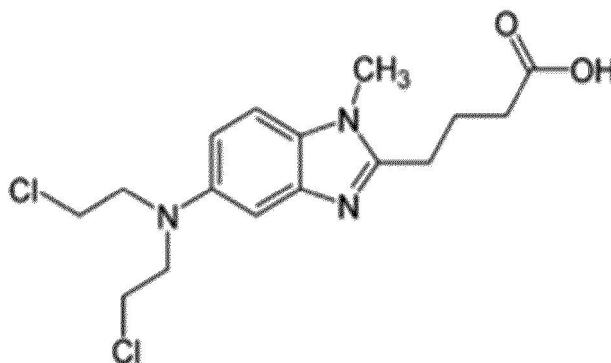
Valor de referencia significa antes de la administración de la terapia deseada. Por ejemplo, antes de la administración del anticuerpo anti-CD19 deseado.

Se usó un análisis de características operativas del receptor (ROC) para analizar la predictividad, la sensibilidad, la especificidad y para determinar los puntos de corte de biomarcadores potenciales, como los recuentos de células NK, los niveles de expresión de CD16 en células NK y los recuentos de células T. Existen los siguientes métodos adicionales para estimar un punto de corte óptimo: "Precisión máxima": el punto de corte que maximiza la precisión; b) "DOR máximo": el punto de corte que maximiza la razón de probabilidades de diagnóstico; c) "Tasa de error": el punto de corte que minimiza la tasa de error; d) "Área de precisión máxima": el punto de corte que maximiza el área de precisión; e) "Sensibilidad + Especificidad máximas": el punto de corte que maximiza la suma de sensibilidad con especificidad; f) "Youden máximo": el punto de corte que maximiza el índice de Youden; g) "Se = Sp": el punto de corte en el que la sensibilidad es igual a la especificidad; h) "Distancia ROC mínima": el punto de corte que minimiza la distancia entre la curva y la esquina superior izquierda del gráfico; i) "Eficiencia máxima": el punto de corte que maximiza la eficiencia; y j) "MCT mínimo": el punto de corte que minimiza el término de coste de clasificación errónea. Ver Lopez-Raton, M., Rodriguez-Alvarez, M.X, Cadarso-Suarez, C. y Gude-Sampedro, F. (2014). Optimal Cutpoints: An R Package for Selecting Optimal Cutpoints in Diagnostic Tests. Journal of Statistical Software 61(8), 1-36.

También se han probado preclínicamente anticuerpos específicos para CD19 en combinación con otros fármacos. Por ejemplo, MOR00208 se había probado en combinación con mostazas nitrogenadas, análogos de purina, análogos de talidomida, inhibidor de fosfoinositido 3-quinasa, inhibidores de BCL-2 e inhibidores de tirosina quinasa de Bruton (BTK).

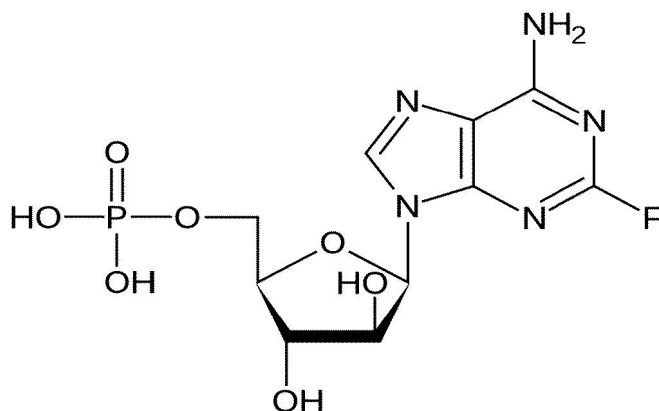
Una "**mostaza nitrogenada**" es un agente alquilante de ADN no específico que se usa como quimioterapia. Los agentes alquilantes añaden un grupo alquilo (C_nH_{2n+1}) a las bases de ácidos nucleicos, por ejemplo, añaden un grupo alquilo a la base de guanina del ADN en el átomo de nitrógeno número 7 del anillo de imidazol. Los pasos de alquilación dan como resultado la formación de enlaces cruzados entre cadenas (ICL). Estas ICL son altamente citotóxicas, ya que bloquean procesos metabólicos fundamentales como la replicación y la transcripción. Las mostazas nitrogenadas incluyen ciclofosfamida, clorambucilo, uramustina, ifosfamida, melfalán y bendamustina.

La bendamustina se comercializa con los nombres Ribomustin® y Treanda®, y también se conoce como SDX-105, por Mundipharma International Corporation Limited (licenciataria de Astellas Pharma GmbH) y Cephalon para el tratamiento de leucemias linfocíticas crónicas (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL) de células B indolente y otros linfomas. La bendamustina tiene la siguiente estructura:



Un análogo de purina es un antimetabolito, que imita la estructura de las purinas metabólicas, interfiriendo de este modo con la síntesis de ácidos nucleicos. La fludarabina, por ejemplo, puede incorporarse en el ARN y el ADN sustituyendo los nucleótidos de purina, adenina y guanina. Los análogos de purina inhiben el crecimiento de células de proliferación rápida de un individuo, por ejemplo, células cancerosas, células de la médula ósea o células

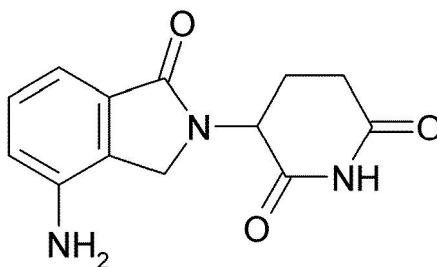
presentes en el tracto gastrointestinal. Los análogos de purina incluyen mercaptopurina, azatioprina, tioguanina y fludarabina. La fludarabina o fosfato de fludarabina (Fludara®) es un fármaco de quimioterapia que se usa en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica y los linfomas no Hodgkin indolentes. La fludarabina es un análogo de purina. La fludarabina inhibe la síntesis de ADN interfiriendo con la ribonucleótido reductasa y la ADN polimerasa y es específica de la fase S (ya que estas enzimas son muy activas durante la replicación del ADN). La fludarabina tiene la siguiente estructura:



Un **"análogo de talidomida"** incluye, pero no se limita a, la propia talidomida, lenalidomida (CC-5013, Revlimid™), pomalidomida (CC4047, Actimid™) y los compuestos divulgados en la WO2002068414 y la WO2005016326. El término se refiere a un compuesto químico sintético que usa la estructura de la talidomida como estructura principal (por ejemplo, se han añadido grupos laterales o dichos grupos se han eliminado de la estructura original). El análogo difiere en estructura de la talidomida y sus compuestos metabolitos, como por una diferencia en la longitud de una cadena de alquilo, un fragmento molecular, por uno o más grupos funcionales, o un cambio en la ionización. El término "análogo de la talidomida" también incluye los metabolitos de la talidomida. Los análogos de talidomida incluyen la mezcla racémica del enantiómero S y R de un compuesto respectivo y el enantiómero S o el enantiómero R individualmente. Se prefiere la mezcla racémica.

Los análogos de la talidomida incluyen los compuestos de las siguientes estructuras:

(A) Lenalidomida

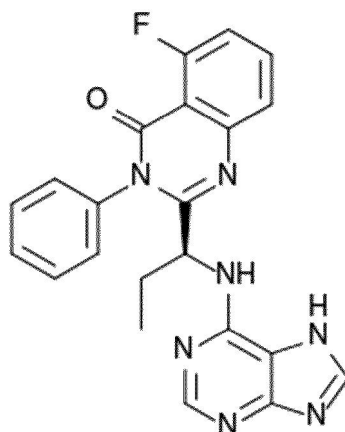


Un **"inhibidor de fosfoinositido 3-quinasa"** es una clase de fármaco médico que funciona inhibiendo una o más de las enzimas fosfoinositido 3-quinasa, que son parte de la vía PI3K/AKT/mTOR, una vía de señalización importante para muchas funciones celulares como control del crecimiento, metabolismo e inicio de la traducción.

Hay una serie de clases e isoformas diferentes de PI3K. Las PI3K de clase 1 tienen una subunidad catalítica conocida como p110, con cuatro tipos (isoformas) - p110 alfa, p110 beta, p110 gamma y p110 delta. Los inhibidores actuales que se están estudiando inhiben una o más isoformas de las PI3K de clase I.

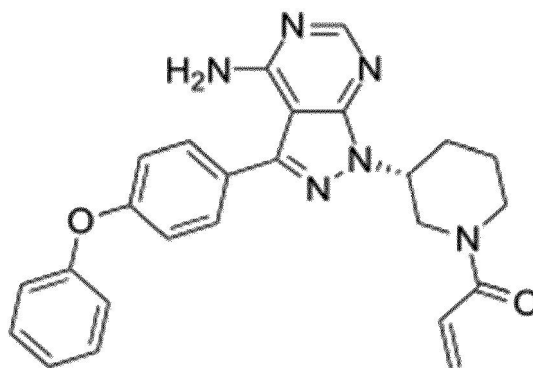
Los inhibidores de la fosfoinositida 3-quinasa incluyen por lo menos idelalisib, duvelisib y copanlisib. El idelalisib es comercializado por Gilead Sciences, Inc. (nombre comercial Zydelig, también llamado GS-1101 o CAL-101). El idelalisib está actualmente catalogado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL) recidivante, en combinación con rituximab, en pacientes para los que el rituximab solo se consideraría una terapia apropiada debido a otras comorbilidades; linfoma no Hodgkin de células B folicular recidivante (FL) en pacientes que han recibido por lo menos dos terapias sistémicas previas; linfoma linfocítico pequeño (SLL) recidivante en pacientes que han recibido por lo menos dos terapias sistémicas previas. La sustancia actúa como inhibidor de la fosfoinositida 3-quinasa; más específicamente, bloquea P110δ, la isoforma delta de la enzima fosfoinositido 3-quinasa.

La fórmula del idelalisib es:

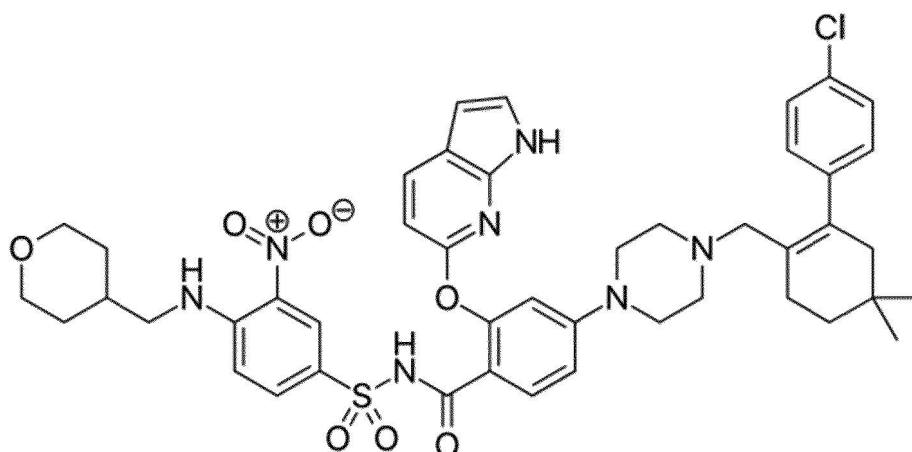


Un "inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK)" es una clase de fármaco que funciona inhibiendo la enzima tirosina-proteína quinasa BTK, que desempeña un papel importante en el desarrollo de las células B. Específicamente, BTK contiene un dominio PH que se une al fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3). La unión de PIP3 induce a Btk a fosforilar la fosfolipasa C, que a su vez hidroliza PIP2, un fosfatidilinositol, en dos segundos mensajeros, trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG), que luego modulan la actividad de las proteínas en sentido descendente durante la señalización de las células B.

Los inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) incluyen ibrutinib. El ibrutinib es comercializado por Pharmacyclics, Inc y Janssen Pharmaceutical de Johnson & Johnson (nombre comercial Imbruvica, también llamado PCI-32765). El ibrutinib está catalogado actualmente para el tratamiento de pacientes con linfoma de células del manto (MCL) que han recibido por lo menos una terapia previa, leucemia linfocítica crónica (CLL) que han recibido por lo menos una terapia previa, leucemia linfocítica crónica con delección 17p y macroglobulinemia de Waldenström. La fórmula del ibrutinib es 1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-piperidinil]-2-propen-1-ona y tiene la siguiente estructura:



Un "inhibidor de BCL-2" es una clase de fármaco que funciona inhibiendo la proteína antiapoptótica del linfoma 2 de células B (Bcl-2), lo que lleva a la muerte celular programada de las células. El inhibidor de BCL-2 incluyen venetoclax. El venetoclax es comercializado por Abbvie y Genentech (nombre comercial VENCLEXTA™, también conocido como GDC-0199, ABT-199 y RG7601). El venetoclax está catalogado actualmente para el tratamiento de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) con delección 17p, detectada por una prueba aprobada por la FDA, que han recibido por lo menos una terapia previa. La fórmula de venetoclax es 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-1-ciclohexen-1-il]metil)-1-piperazinil)-N-([3-nitro-4-([tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil]amino)fenil]sulfonyl)-2-(1H-pirrol-2,3-b)piridin-5-iloxi)benzamida y tiene la siguiente estructura:



"Venetoclax", "ABT" y "ABT-199" se usan como sinónimos en la presente.

Realizaciones

Un aspecto es un método para identificar a un sujeto que tiene linfoma no Hodgkin (NHL) que responde al tratamiento con un anticuerpo anti-CD19, dicho método comprendiendo:

- proporcionar una muestra obtenida de dicho sujeto antes del tratamiento con dicho anticuerpo anti-CD19,
- determinar el nivel de por lo menos un biomarcador en dicha muestra seleccionada del grupo que consiste de:
 - recuento de células NK periféricas, y
 - niveles de expresión de CD16 en células NK periféricas,
- comparar el nivel de dicho por lo menos un biomarcador en dicha muestra con un nivel de corte predeterminado,

en donde los niveles de dicho por lo menos un biomarcador en o por encima del nivel de corte predeterminado es indicativo de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo anti-CD19.

En realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. En realizaciones, dicha muestra comprende células NK periféricas.

En realizaciones, el nivel de corte predeterminado de dicho biomarcador es un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/ μ l, por lo menos 75 células/ μ l, por lo menos 100 células/ μ l, por lo menos 125 células/ μ l, por lo menos 150 células/ μ l, por lo menos 175 células/ μ l, por lo menos 200 células/ μ l, por lo menos 225 células/ μ l o por lo menos 250 células/ μ l. En realizaciones, el nivel de corte predeterminado de dicho biomarcador son niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 45.000 ABC, por lo menos 60.000 ABC, por lo menos 75.000 ABC o por lo menos 90.000 ABC.

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/ μ l, o
- niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/ μ l, y
- niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el nivel de punto de corte predeterminado es un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/ μ l. En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador son los niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 70 células/ μ l, o
- niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- 5 a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 70 células/ μ l, y
 b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el nivel de punto de corte predeterminado es un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 70 células/ μ l. En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador son los niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

10

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- 15 a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 80 células/ μ l, o
 b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- 20 a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 80 células/ μ l, y
 b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

20

En realizaciones, el nivel de punto de corte predeterminado es un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 80 células/ μ l. En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador son los niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

25

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 90 células/ μ l, o
 b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

30

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 90 células/ μ l, y
 b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

35

En realizaciones, el nivel de punto de corte predeterminado es un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 90 células/ μ l. En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador son los niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

40

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/ μ l, o
 b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

45

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

- a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/ μ l, y
 b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

50

En realizaciones, el nivel de punto de corte predeterminado es un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/ μ l. En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador son los niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

Un aspecto es un método para identificar a un sujeto que tiene linfoma no Hodgkin (NHL), que responde al tratamiento con un anticuerpo anti-CD19, dicho método comprendiendo:

55

- a. proporcionar una muestra de sangre obtenida de dicho sujeto antes del tratamiento con dicho anticuerpo anti-CD19,
 b. determinar el nivel de por lo menos un biomarcador en dicha muestra seleccionado del grupo que consiste de:

60

- i. recuento de células NK periféricas, y
 ii. niveles de expresión de CD16 en células NK periféricas,

c. comparar el nivel de dicho por lo menos un biomarcador en dicha muestra con un nivel de punto de corte predeterminado,

65

en donde el recuento de células NK periféricas de referencia es de por lo menos 50 células/ μ l, por lo menos 60 células/ μ l, por lo menos 70 células/ μ l, por lo menos 80 células/ μ l, por lo menos 90 células/ μ l o por lo menos 100 células/ μ l y los niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas son de por lo menos 60.000 (ABC), y en donde el anticuerpo anti-CD19 comprende una región HCDR1 que comprende la secuencia SYVMH (SEQ ID NO: 1), una región HCDR2 que comprende la secuencia NPYNDG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 que comprende la secuencia GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 que comprende la secuencia RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 que comprende la secuencia RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), y una región LCDR3 que comprende la secuencia MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

Un aspecto es un método para identificar a un sujeto que tiene linfoma no Hodgkin (NHL) que responde al tratamiento con un anticuerpo anti-CD19, dicho método comprendiendo:

a. proporcionar una muestra de sangre obtenida de dicho sujeto antes del tratamiento con dicho anticuerpo anti-CD19,

b. determinar el nivel de por lo menos un biomarcador en dicha muestra seleccionada del grupo que consiste de:

i. recuento de células NK periféricas, y

ii. niveles de expresión de CD16 en células NK periféricas,

c. comparar el nivel de dicho por lo menos un biomarcador en dicha muestra con un nivel de punto de corte predeterminado,

en donde el recuento de células NK periféricas de referencia es de por lo menos 100 células/ μ l, o los niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas son de por lo menos 60.000 (ABC), y en donde el anticuerpo anti-CD19 comprende una región HCDR1 que comprende la secuencia SYVMH (SEQ ID NO: 1), una región HCDR2 que comprende la secuencia NPYNDG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 que comprende la secuencia GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 que comprende la secuencia RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 que comprende la secuencia RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), y una región LCDR3 que comprende la secuencia MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

En realizaciones, el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:

a. recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/ μ l, y

b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el nivel de punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/ μ l, por lo menos 75 células/ μ l, por lo menos 100 células/ μ l, por lo menos 125 células/ μ l, por lo menos 150 células/ μ l, por lo menos 175 células/ μ l, por lo menos 200 células/ μ l, por lo menos 225 células/ μ l o por lo menos 250 células/ μ l. En realizaciones, el nivel de punto de corte predeterminado de dicho biomarcador son niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 45.000 ABC, por lo menos 60.000 ABC, por lo menos 75.000 ABC o por lo menos 90.000 ABC.

También se divulga un método para tratar a un paciente que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) con un anticuerpo anti-CD19, el método comprendiendo

a. obtener un recuento de células NK periféricas de referencia en el paciente, o un nivel de expresión de CD16 de referencia en las células NK periféricas del paciente, y

b. administrar una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD19 al paciente que tiene un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/ μ l, por lo menos 60 células/ μ l, por lo menos 70 células/ μ l, por lo menos 80 células/ μ l, por lo menos por lo menos 90 células/ μ l o por lo menos 100 células/ μ l o un nivel de expresión de CD16 de referencia en las células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

También se divulga un método para tratar a un paciente que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) con un anticuerpo anti-CD19, el método comprendiendo

a. obtener un recuento de células NK periféricas de referencia en el paciente, o un nivel de expresión de CD16 de referencia en las células NK periféricas del paciente, y

b. administrar una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD19 al paciente que tiene un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/ μ l o un nivel de expresión de CD16 de referencia en las células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

El método para tratar a un paciente con leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) con un anticuerpo anti-CD19, puede

comprender

- a. obtener un recuento de células NK periféricas de referencia en el paciente, y
- b. administrar una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD19 al paciente que tiene un recuento de células NK de por lo menos 50 células/μl, por lo menos 60 células/μl, por lo menos 70 células/μl, por lo menos 80 células/μl, por lo menos 90 células/μl o por lo menos 100 células/μl.

El método para tratar a un paciente con leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) con un anticuerpo anti-CD19, puede comprender

- a. obtener un recuento de células NK periféricas de referencia en el paciente, y
- b. administrar una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD19 al paciente que tiene un recuento de células NK de por lo menos 50 células/μl, por lo menos 60 células/μl, por lo menos 70 células/μl, por lo menos 80 células/μl, por lo menos 90 células/μl o por lo menos 100 células/μl.

El método para tratar a un paciente con leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) con un anticuerpo anti-CD19, puede comprender

- a. obtener un recuento de células NK periféricas de referencia en el paciente, y
- b. administrar una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD19 al paciente que tiene un recuento de células NK de por lo menos 100 células/μl.

El método para tratar a un paciente que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) con un anticuerpo anti-CD19, puede comprender

- a. obtener niveles de expresión de CD16 de referencia en las células NK periféricas del paciente, y
- b. administrar una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD19 al paciente que tiene niveles de CD16 en las células NK de por lo menos 60.000 (ABC).

Como se indica en otra parte en la presente, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD19 para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene linfoma no Hodgkin (NHL), en donde el paciente se identifica de acuerdo con el método de la invención.

En realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 se administra a pacientes que tienen un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/μl, por lo menos 60 células/μl, por lo menos 70 células/μl, por lo menos 80 células/μl, por lo menos 90 células/μl o por lo menos 100 células/μl, y un nivel de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 se administra a pacientes que tienen tanto un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/μl y un nivel de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

En realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 se administra a pacientes que tienen un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/μl, por lo menos 75 células/μl, por lo menos 100 células/μl, por lo menos 125 células/μl, por lo menos 150 células/μl, por lo menos 175 células/μl, por lo menos 200 células/μl, por lo menos 225 células/μl o por lo menos 250 células/μl. En realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 se administra a pacientes que tienen niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 45.000 ABC, por lo menos 60.000 ABC, por lo menos 75.000 ABC o por lo menos 90.000 ABC.

También se divulga un método para tratar a un paciente que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) con un anticuerpo anti-CD19, dicho método comprendiendo:

- a. proporcionar una muestra obtenida de dicho sujeto antes del tratamiento con dicho anticuerpo anti-CD19,
- b. determinar el nivel de por lo menos un biomarcador en dicha muestra seleccionada del grupo que consiste de:

- i. recuento de células NK periféricas, y
- ii. niveles de expresión de CD16 en células NK periféricas,

c. comparar el nivel de dicho por lo menos un biomarcador en dicha muestra con un nivel de punto de corte predeterminado,

d. administrar una cantidad eficaz de anticuerpo anti-CD19 al paciente que tiene un recuento de células NK

periféricas de por lo menos 100 células/μl o un nivel de expresión de CD16 en las células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

5 También se divulga un método para tratar a un paciente que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD19 al paciente si

- a. el recuento de células NK periféricas de referencia del paciente es de por lo menos 100 células/μl o
- b. los niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas son de por lo menos 60.000 (ABC).

10 También se divulga un método para tratar a un paciente que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) que comprende

- a. obtener el recuento de células NK periféricas del paciente,
- b. administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD19 a pacientes que tienen recuentos de células NK periféricas de por lo menos 100 células/μl.

20 También se divulga un método para tratar a un paciente que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL) que comprende

- a. obtener los niveles de expresión de CD16 en las células NK periféricas del paciente,
- b. administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD19 a pacientes que tienen niveles de expresión de CD16 en las células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC).

25 Como se indica en otra parte en la presente, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD19 para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene linfoma no Hodgkin (NHL), en donde el paciente se identifica de acuerdo con el método de la invención.

30 En realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 se administra a pacientes que tienen tanto un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/μl como un nivel de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 (ABC). En realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 se administra a pacientes que tienen un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 50 células/μl, por lo menos 75 células/μl, por lo menos 100 células/μl, por lo menos 125 células/μl, por lo menos 150 células/μl, por lo menos 175 células/μl, por lo menos 200 células/μl por lo menos 225 células/μl, o por lo menos 250 células/μl. En realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 se administra a pacientes que tienen niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 45.000 ABC, por lo menos 60.000 ABC, por lo menos 75.000 ABC o por lo menos 90.000 ABC.

40 En realizaciones, el recuento de células NK periféricas de referencia o los niveles de CD16 de referencia (ABC) en las células NK periféricas se obtienen de una muestra de sangre tomada del paciente. En realizaciones, el recuento de células NK periféricas y/o los niveles de expresión de CD16 se miden antes de la administración del anticuerpo anti-CD19.

45 En realizaciones, el anticuerpo específico para CD19 comprende una región HCDR1 que comprende la secuencia SYVMH (SEQ ID NO: 1), una región HCDR2 que comprende la secuencia NPYNDG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 que comprende la secuencia GTYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 que comprende la secuencia RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 que comprende la secuencia RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 que comprende la secuencia MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

50 En realizaciones, el recuento de células NK periféricas de referencia o los niveles de expresión de CD16 de referencia en las células NK periféricas se obtienen de una muestra de sangre tomada del paciente.

55 En la invención reivindicada, el paciente tiene linfoma no Hodgkin. En realizaciones, el linfoma no Hodgkin se selecciona del grupo que consiste de linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño, tejido linfoide asociado a mucosas, zona marginal, de células B grandes difuso, de Burkitt y células del manto. En una realización, el linfoma no Hodgkin es linfoma folicular. En una realización, el linfoma no Hodgkin es un linfoma no Hodgkin indolente. En una realización, el linfoma no Hodgkin es un linfoma linfocítico pequeño. En una realización, el linfoma no Hodgkin es tejido linfoide asociado a mucosas. En una realización, el linfoma no Hodgkin es un linfoma de zona marginal. En una realización, el linfoma no Hodgkin es un linfoma de células B grandes difuso. En una realización, el linfoma no Hodgkin es linfoma de Burkitt. En una realización, el linfoma no Hodgkin es linfoma de células del manto.

60 En realizaciones, el tratamiento da como resultado el efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste en tasa de control de la enfermedad (DCR) y mayor duración de supervivencia libre de progresión.

65 En realizaciones, el tratamiento comprende además la administración de una cantidad eficaz de mostaza

nitrogenada. En una realización, la mostaza nitrogenada es bendamustina. En realizaciones, el tratamiento comprende además la administración de una cantidad eficaz de un análogo de purina. En realizaciones, el análogo de purina es fludarabina. En realizaciones, el tratamiento comprende además la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK). En realizaciones, el inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) es ibrutinib. En realizaciones, el tratamiento comprende además la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de fosfoinositido 3-quinasa. En una realización, el inhibidor de fosfoinositido 3-quinasa es idelalisib. En realizaciones, el tratamiento comprende además la administración de una cantidad eficaz de un análogo de talidomida. En una realización, el análogo de talidomida es lenalidomida. En realizaciones, el tratamiento comprende además la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de BCL-2. En una realización, el inhibidor de BCL-2 es venetoclax.

Como el anticuerpo anti-CD19 ejemplificado y otros anticuerpos anti-CD19 se unen a CD19, se cree que pueden observarse resultados similares con otros anticuerpos anti-CD19. Otros anticuerpos anti-CD19 se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos Nº 12/377.251 (Xencor), WO2005012493, WO2010053716 (Immunomedics); WO2007002223 (Medarex); WO2008022152 (Xencor); WO2008031056 (Medimmune); WO 2007/076950 (Merck Patent GmbH); WO 2009/052431 (Seattle Genetics); y WO2010095031 (Glenmark Pharmaceuticals).

En realizaciones, el anticuerpo específico para CD19 comprende un anticuerpo que compite de manera cruzada con el anticuerpo que comprende una región HCDR1 que comprende la secuencia SYVMH (SEQ ID NO: 1), una región HCDR2 que comprende la secuencia NPYNDG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 que comprende la secuencia GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 que comprende la secuencia RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 que comprende la secuencia RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 que comprende la secuencia MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

En realizaciones, el anticuerpo específico para CD19 comprende un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una región HCDR1 que comprende la secuencia SYVMH (SEQ ID NO: 1), una región HCDR2 que comprende la secuencia NPYNDG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 que comprende la secuencia GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 que comprende la secuencia RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 que comprende la secuencia RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 que comprende la secuencia MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

En realizaciones, el anticuerpo específico para CD19 comprende una región HCDR1 de secuencia SYVMH (SEQ ID NO: 1), una región HCDR2 de secuencia NPYNDG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de secuencia GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de secuencia RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de secuencia RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de secuencia MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

En realizaciones, el anticuerpo específico para CD19 comprende una cadena pesada variable de la secuencia
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGYFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
NDGTYNEKFQGRVTISDDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWG QGTLTVSS (SEQ ID NO: 10) y una cadena ligera variable de la secuencia

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ
ID NO: 11).

En una realización, dicho anticuerpo comprende un dominio constante de cadena pesada de la secuencia
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12).

En una realización, el anticuerpo específico para CD19 comprende un dominio constante de cadena ligera

de la secuencia

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
5 KD STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC. (SEQ ID NO: 13).

En una realización, el anticuerpo específico para CD19 comprende una cadena pesada que tiene la secuencia

EVQLVESGGGLVHPGGSGLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
15 LYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAKEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
20 VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

En una realización, el anticuerpo específico para CD19 comprende una cadena ligera que tiene la secuencia

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLN
SGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF
30 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)

También se divulga en la presente una composición farmacéutica. La composición puede comprender un portador aceptable. La composición puede administrarse en una cantidad eficaz.

Ejemplos

Ejemplo 1: Recuento de células T y células NK

El alcance del estudio clínico de MOR00208C201 incluyó la evaluación de varios biomarcadores exploratorios. Como parte de esta iniciativa, se realizó el recuento de células T y NK periféricas de referencia en los
45 sitios clínicos.

Las células T son un tipo de linfocito (un subtipo de glóbulos blancos) que desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células. Pueden distinguirse de otros linfocitos, como las células B y las células NK, por la presencia de un receptor de células T en la superficie celular.

Las células asesinas naturales o células NK son un tipo de linfocito citotóxico fundamental para el sistema inmunológico innato. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las células infectadas por virus, actúan aproximadamente 3 días después de la infección, y responden a la formación de tumores. Típicamente, las células inmunitarias detectan el complejo de histocompatibilidad principal (MHC) presentado en las superficies de las células infectadas, desencadenando la liberación de citoquinas, provocando lisis o apoptosis. Sin embargo, las células NK son únicas, ya que tienen la capacidad de reconocer células estresadas en ausencia de anticuerpos y MHC, lo que permite una reacción inmunológica mucho más rápida.

Materiales y métodos

TriTest CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP (con tubos TruCOUNT), BD Biosciences, Cat: 340403 (US); 342442 (Europa). Pipetas y puntas de pipeta capaces de administrar 20 µl, 50 µl y 450 µl, Gilson Inc. FACS Lysing Solutions, BD Biosciences, Cat: 349202.

Instrumentos: Citómetro de flujo, Vortex

Antecedentes de la citometría de flujo:

La sangre completa se tiñe con anticuerpos marcados con fluorocromo (reactivos TriTEST) que se unen específicamente a los antígenos de la superficie de los leucocitos. Las células viajan más allá del haz de láser y dispersan la luz láser. Las células teñidas emiten fluorescencia. Estas señales de dispersión y fluorescencia, detectadas por el instrumento, proporcionan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos TriTEST emplean activación por fluorescencia, lo que permite la modulación directa de la fluorescencia de la población de linfocitos de células T y NK para reducir la contaminación de los glóbulos rojos nucleados o no lisados en la puerta.

Tinción

Para cada muestra de paciente, se etiquetó un tubo TruCOUNT con el número de identificación de la muestra. Se pipetearon 20 µl de reactivo TriTEST CD3/CD16+CD56/CD45 en el fondo del tubo. Se pipetearon 50 µl de sangre completa anticoagulada bien mezclada en el fondo del tubo. La sangre anticoagulada (EDTA) almacenada a temperatura ambiente (20-25° C) debe teñirse en el plazo de las 24 horas posteriores a la extracción y analizarse en el plazo de las 6 horas posteriores a la tinción (mantener a temperatura ambiente y protegida de la luz). El tubo se agitó en vórtice suavemente para mezclar. El tubo se incubó durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C). Se añadieron al tubo 450 µl de solución de lisis 1X FACS. El tubo se agitó con vórtex y se incubó de nuevo durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C).

Usando tubos TruCOUNT, se tiñe un volumen conocido de muestra directamente en un tubo TruCOUNT. El sedimento liofilizado en el tubo se disuelve, liberando un número conocido de perlas fluorescentes. Durante el análisis, el número absoluto (células/µl) de células positivas en la muestra puede determinarse comparando eventos celulares con eventos de perlas.

Citometría de flujo

Las células se agitaron en vórtice a fondo (a baja velocidad) para reducir la agregación antes de ejecutarlas en el citómetro de flujo.

Análisis de datos

Se inspeccionó visualmente el gráfico de puntos de CD45 frente a SSC. Los linfocitos aparecen como una población de células compactas brillantes con SSC de baja a moderada. Los monocitos (M) y los granulocitos (G) aparecen como poblaciones distintas. El análisis se completó cuando las poblaciones celulares de monocitos y linfocitos mostraron una separación clara.

Los linfocitos se modularon primero como población de células SSC baja, positivas para CD45. Se preseleccionaron CD16/CD56 frente a CD3. Las células T (T) deberían aparecer como un grupo positivo de CD3 brillante compacto. Las células NK (NK) deberían aparecer como un grupo positivo de CD16/CD56 compacto brillante. Se moduló el bloqueo y se contaron las células T y NK.

Los recuentos de eventos de perlas se realizaron usando un gráfico de CD16/CD56 frente a CD3 sin ninguna puerta preseleccionada. Las perlas deben aparecer como un grupo positivo doble PE/FITC.

Cálculo de recuentos absolutos

Se determinó el número absoluto (células/µl de sangre) de células T o células NK en la muestra comparando eventos celulares con eventos de perlas. Se realizó un análisis de datos con software MultiSET o manual (usando CellQuest u otro software). Para el recuento manual, el número (#) de eventos adquiridos celulares positivos se dividió por el número (#) de eventos de perlas adquiridas, luego se multiplicó por el (recuento total de perlas TruCOUNT (dependiente del lote) dividido por el volumen de muestra de sangre total de 50 µl). El resultado es el número absoluto de células por microlitro.

Ecuación:

$$\frac{\frac{\text{número de eventos en la puerta}}{\text{población que contiene células (T o NK)}}}{\text{población que contiene perlas}} \times \frac{\frac{\text{\# de perlas TruCOUNT totales}}{50 \text{ µl de sangre completa}}}{\text{número de eventos en la puerta 2}} = \text{\# células/µl sangre}$$

Ejemplo:

$$\frac{2709 \text{ células } T}{10\,000 \text{ perlas adquiridas}} \times \frac{51\,667 \text{ perlas}}{50 \mu\text{l}} = 280 \text{ células } T/\mu\text{l de sangre}$$

Ejemplo s: Cuantificación de CD16 en células NK

10 Como parte del estudio clínico de MOR00208C201, se cuantificó CD16 (un biomarcador exploratorio) en células NK periféricas centralmente por ICON Central Laboratories (Farmingdale, Nueva York).

Materiales y métodos

15 **Anticuerpos:** CD45 AmCyan (clon 2D1, BD Biosciences, N° de cat. 339192); CD3 FITC (clon UCHT1, BioLegend, N° de cat. 300406); FITC de IgG de ratón (clon MOPC-21, BioLegend, N° de cat. 400110); CD16 PE (clon 3G8, BioLegend, N° de catálogo 302008); MOR00208; IgG PE de ratón (clon MOPC-21, BioLegend, N° de cat. 400114); CD56 PerCP-Cy5.5 (clon HCD56, BioLegend, N° de cat. 318322); e IgG de ratón PerCP-Cy5.5 (clon MOPC-21, BioLegend, N° de cat. 400150).

20 **Material:** remitentes aislados PharmaTherm (Intelsius, N° de catálogo PHT014); Tubo de preparación de células mononucleares BD Vacutainer® CPT™ - heparina sódica (16 x 125 mm/8 ml) (BD, N° de catálogo 362753); tubos de fondo redondo BD Falcon™ de 12x75 mm (BD, N° de catálogo 352052); Perlas CS&T (BD Biosciences N° de Cat 642212); Suero bovino fetal (FBS), inactivado por calor (Sigma F4135 o equivalente); PBS de Dulbecco sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (Gibco, N° de Cat 14190 o equivalente); BD Falcon, colador celular, 100 µm, amarillo (BD Bioscience, N° de cat. 352360); Tampón FACS, 3% de FBS inactivado por calor en 1X DPBS; agua desionizada, stock de laboratorio; hielo triturado (húmedo); cubeta de hielo; papel de aluminio; tubos cónicos, 50 ml; tubos cónicos, 15 ml; puntas de pipeta con filtro estériles; Tampón de lisis BD Pharm Lyse (BD Biosciences, N° de cat. 555899); Kit de tinción violeta de células muertas fijable ViViD LIVE/DEAD®, para excitación de 405 nm (Life Technologies, N° de Cat L34955); perlas reactivas de amina ArC (Life Technologies, N° de Cat A10346); Perlas BD QuantiBRITE (BD Biosciences, N° de cat. 340495); y malla de nailon de 52 µm (Miami Aqua Culture, para Cat: nailon de 52 µm, 32% de área abierta tejida en el material).

35 **Equipo:** Centrífuga (capacidad refrigerada); Sismo de laboratorio (balancín de tubo); Mezclador Vortex; Campana de flujo laminar; Incubadora (Ajustada a 37° C, 5% de CO₂); Advia (contador celular); Citómetro de flujo BD FACSCANTO II; Recipiente Desi-Vac™, 1,5 litros (VWR, N° de Cat 62344-930); Indicador Humidity Sponge™ (VWR, N° de Cat 61161-319); y Humedad Trazable en una Tarjeta (VWR, N° de Cat 15551-012).

Tabla 1. Panel de ensayo de cuantificación de CD16 para PBMC (Célula mononuclear de sangre periférica)

Descripción	Tubo N°	V450	AmCyan	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
Tubo de Control I	1	ViViD	CD45	Ms IgG	Ms IgG	Ms IgG	---
CD16 ABC	2	ViViD	CD45	CD3	CD16	CD56	---

Procedimientos de preparación y etiquetado de PBMC

Se recogió sangre periférica del paciente en tubos CPT y se envió durante la noche desde los sitios clínicos al laboratorio central en transportadores aislados. Los tubos de CPT se centrifugaron durante 25 min a 1800 x g a RT con el freno encendido. Después de la centrifugación, los tubos de CPT se invirtieron inmediatamente y se colocaron durante 10 minutos en el sismo de laboratorio para resuspender la capa de PBMC en plasma autólogo y resolver la mayoría de los agregados celulares formados. En condiciones estériles, la suspensión homogeneizada de PBMC/plasma se decantó lentamente en el centro de un colador de células de 100 µm que descansaba en la parte superior de un tubo cónico de 50 ml estéril. Se añadió un volumen igual de 1X DPBS a la suspensión de PBMC/plasma (aproximadamente 4 ml) en un tubo cónico de 15 ml. Los tubos se centrifugaron a 300 x g durante 10 min a 4° C y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se agitaron en vórtice para resuspender el sedimento celular. El sedimento celular se lavó con DBPS, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió mediante agitación con vórtice. La suspensión de PBMC lavada se añadió a un tubo Eppendorf que contenía 1 µl de solución madre de ViViD; se incubó durante 15 min en hielo y se mantuvo en la oscuridad (cubierto con papel de aluminio). Las PBMC ViViD teñidas se transfirieron a un nuevo tubo cónico etiquetado y luego se añadió tampón FACS enfriado con hielo. Las células se centrifugaron y se agitaron nuevamente con vórtice para la resuspensión. Se etiquetaron tubos de poliestireno Falcon para cada muestra (Tabla 1). Los anticuerpos o anticuerpos de control de isotipo se añadieron a los tubos apropiados. La alícuota de PBMC teñidas con ViViD se añadió a cada tubo (Tabla 1). Los tubos se agitaron con vórtice y se incubaron. Se añadió tampón FACS y las células se centrifugaron y volvieron a agitar con vórtice para resuspensión. Se añadió tampón de lisis BD Pharm Lyse y las células se agitaron en vórtice, se centrifugaron y

aspiraron para eliminar el sobrenadante y se volvieron a agitar con vórtice para resuspender. Se añadió de nuevo tampón FACS y las células se centrifugaron y se agitaron de nuevo con vórtice resuspensión. Luego, se adquirieron muestras en el citómetro FACSCanto II y se estimaron los ABC (anticuerpos unidos por célula) a partir de MFI estandarizado como se describe en Iyer S, et al., Expression of CD69 on activated T cells using Rphycoerythrin labeled beads, Cytometry, 1996; #AC78 (Suppl.8):113 y Iyer S., et al., QuantiBRITE: A New Standard for Fluorescence Quantitation, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA. 1997. White Paper

Ejemplo 3: Prueba de NHL

El estudio del anticuerpo anti-CD19 optimizado para Fc (MOR00208) para tratar el linfoma no Hodgkin (NHL) ClinicalTrials.gov Identificador: NCT01685008 ya no está reclutando.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

1. Pacientes masculinos o femeninos ≥ 18 años de edad.
2. Diagnóstico confirmado histológicamente de acuerdo con la clasificación REAL/OMS, de los siguientes linfomas de células B: a.FL, b.MCL, c.DLBCL, d.Otros NHL indolentes (por ejemplo, MZL/MALT).
3. El NHL de los pacientes debe haber progresado después de por lo menos 1 régimen previo que contenía rituximab.
4. Un sitio de enfermedad medible por resonancia magnética (MRI) o tomografía computarizada (CT) definida como por lo menos una lesión que mide por lo menos 1,5 x 1,5 cm, con la excepción: Para pacientes con MCL solamente, pacientes con enfermedad no medible pero se pueden inscribir sitios evaluables (médula ósea, bazo, sangre periférica, tracto gastrointestinal).
5. Los pacientes que hayan recibido previamente un autotrasplante de células madre deben estar por lo menos 4 semanas después del trasplante antes de la administración del fármaco del estudio y deben haber mostrado una recuperación hematológica completa.
6. Se interrumpió la terapia previa con anticuerpos monoclonales (excepto rituximab) o la administración de radioinmunoterapia durante por lo menos 60 días antes de la administración del fármaco del estudio.
7. Dejar de tomar rituximab durante por lo menos 14 días antes de la visita de selección y confirmar que no responde o tiene progresión de la enfermedad después del tratamiento con rituximab.
8. Los pacientes con LDCBG tenían una tomografía por emisión de positrones con [18F]fluorodesoxiglucosa (FDG-PET) positiva al inicio del estudio (criterios de respuesta de Cheson).
9. Esperanza de vida de >3 meses.
10. Estado funcional ECOG de <3 .
11. Criterios de laboratorio en la selección: a) Recuento absoluto de neutrófilos (ANC) $\geq 1,0$ (1000/mm³) b) Recuento de plaquetas $\geq 75 \times 10^9/l$ sin transfusión previa en el plazo de 10 días de la primera administración del fármaco del estudio. c) Hemoglobina $\geq 8,0$ g/dl (puede haber sido transfundido). d) Creatinina sérica $<2,0 \times$ límite superior del normal (ULN). e) Bilirrubina total $\leq 2,0 \times$ LSN. f) Alanina transaminasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) $\leq 2,5 \times$ LSN.
12. Si es una mujer en edad fértil, debe confirmarse una prueba de embarazo negativa antes de la inscripción y el uso de anticoncepción de doble barrera, anticonceptivo oral más anticonceptivo de barrera, o confirmación de haberse sometido a histerectomía total y/o ooforectomía, ligadura de trompas clínicamente documentadas.
13. Si es hombre, debe usarse un método anticonceptivo de barrera eficaz durante el estudio y durante 3 meses después de la última dosis si el paciente es sexualmente activo con una mujer en edad fértil.
14. Capaz de cumplir con todos los procedimientos, uso de medicamentos y evaluaciones relacionados con el estudio.
15. Ser capaz de comprender y dar su consentimiento informado por escrito y cumplir con el protocolo del estudio.

Los Criterios de exclusión fueron los siguientes:

1. Tratamiento previo con quimioterapia citotóxica, inmunoterapia, radioterapia u otra terapia específica de linfoma en el plazo de 14 días anteriores a la visita de selección o el paciente no se ha recuperado de los efectos secundarios de la terapia específica de linfoma anterior.
- 5 2. Tratamiento con un agente en investigación sistémico en el plazo de 28 días anteriores a la visita de selección.
3. Tratamiento previo con un anticuerpo o fragmentos anti-CD19.
- 10 4. Trasplante previo de células madre alogénicas.
5. Hipersensibilidad conocida o sospechada a los excipientes contenidos en la formulación del fármaco del estudio.
- 15 6. Enfermedad cardiovascular clínicamente significativa o insuficiencia cardíaca, miocardiopatía, arritmia clínicamente significativa preexistente, infarto agudo de miocardio en el plazo de 3 meses después de la inscripción, angina de pecho en el plazo de 3 meses después de la inscripción.
7. Evidencia clínica o de laboratorio de hepatitis B o hepatitis C activas.
- 20 8. Historial de infección por VIH.
9. Cualquier infección sistémica activa (viral, micótica o bacteriana) que requiera terapia antibiótica parenteral activa en el plazo de 4 semanas después de la administración del fármaco del estudio.
- 25 10. Tratamiento actual con agentes inmunosupresores distintos de los corticosteroides recetados (no más de 10 mg de equivalente de prednisona).
11. Cirugía mayor o radioterapia en el plazo de 4 semanas anteriores a la primera administración del fármaco del estudio.
- 30 12. Enfermedades sistémicas (cardiovasculares, renales, hepáticas, etc.) que impidan el tratamiento del estudio en opinión del investigador.
- 35 13. Historial o evidencia clínica de enfermedad del sistema nervioso central (SNC), meníngea o epidural, incluyendo metástasis cerebral.
14. Tratamiento activo/quimioterapia para otra enfermedad maligna primaria en los últimos 5 años.
- 40 15. Embarazo o lactancia en mujeres y mujeres en edad fértil que no utilizan un método anticonceptivo aceptable.
16. Historial de incumplimiento de los regímenes médicos o pacientes que se consideran potencialmente poco fiables y no cooperadores.
- 45 Los pacientes se trataron con MOR00208 de la siguiente manera. Los pacientes fueron tratados con dos ciclos de 28 días, donde MOR00208 se administró a una dosis de 12 mg/kg los días 1, 8, 15 y 22. Al final de los dos ciclos, los pacientes con enfermedad estable o mejor fueron tratados con un tercer ciclo de 28 días aplicando la misma dosis y programa que los dos primeros ciclos. Al final del tercer ciclo, los pacientes que tenían una respuesta parcial o mejor entraron en mantenimiento. En mantenimiento, se administró MOR00208 a una dosis de 12 mg/kg
- 50 cada 14 o 28 días hasta la progresión de la enfermedad.

Al final del estudio, las características de los pacientes fueron las siguientes:

Tabla 2:

Características de referencia					
Características		DLBCL n=35	iNHL n=45	MCL n=12	Total n=92
Edad, años	Mediana	71	66	64.5	66.5
Sexo	Hombre	24 (69)	21 (47)	11 (92)	56 (61)
ECOG PS	0	20 (57)	33 (73)	7 (58)	60 (65)
	1	12 (34)	11 (24)	4 (33)	27 (29)
	2	3(9)	1 (2)	1 (8)	5 (5)
Refractario a Rituximab	Yes	24 (69)	22 (49)	6 (50)	52 (57)
	No	11 (31)	23 (51)	6 (50)	40 (43)
Última dosis de rituximab	<6 mos	14 (40)	6 (13)	1 (8)	21 (23)
Trasplante de células madre anterior	Yes	2 (6)	7 (16)	1 (8)	10 (11)
DoR para última terapia previa	>12 meses	3 (9)	18 (40)	4 (33)	25 (27)
	≤ 12 meses	26 (74)	25 (56)	7 (58)	58 (63)
	Desconocido	6 (17)	2 (4)	1 (8)	9 (10)
Recuento de células NK de referencia	>100 células/ µl	19 (54)	23 (51)	8 (67)	51 (55)
	≤100 células/ µl	11 (31)	8 (18)	1 (8)	20 (22)
	Desconocido	5 (14)	14 (31)	3 (25)	21 (23)
Expresión de CD16 de referencia en células NK	> 60000 ABCs	15 (43)	33 (73)	5 (42)	53 (58)
	≤ 60000 ABCs	11 (31)	5 (11)	4 (33)	20 (22)
	Desconocido	9 (26)	7 (16)	3 (25)	19 (21)
Recuento de células T de referencia	> 500 células/µl	20 (57)	26 (58)	8 (67)	54 (59)
	≤ 500 células/ µl	10 (29)	6 (13)	1 (8)	17 (18)
	Desconocido	5 (14)	13 (29)	3 (25)	21 (23)
FcyRIIIa	Alta afinidad	5 (14)	4(9)	1 (8)	10 (11)
	Baja afinidad	27 (77)	28 (62)	9 (57)	64 (70)
	Desconocido	3 (9)	13 (29)	2 (17)	18 (20)
FcyRIIa	Alta afinidad	11 (31)	10 (22)	3 (25)	24 (26)
	Baja afinidad	21 (60)	22 (49)	7 (58)	50 (54)
	Desconocido	3 (9)	13 (29)	2 (17)	18 (18)

DLBCL, linfoma de células B grandes difuso; ECOG PS, estado de rendimiento de Eastern Cooperative Oncology Group; iNHL, linfoma no Hodgkin indolente (incluye linfoma folicular y otro iNHL); MCL, linfoma de células del manto; mos, meses. (%).

Otro iNHL significa un grupo heterogéneo de tipos de NHL indolentes, no agresivos, no especificados adicionales, por ejemplo, linfoma de células marginales, linfoma de zona marginal y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).

Los criterios de valoración principales y secundarios fueron los siguientes:

- Primario: Tasa de respuesta global (ORR) = CR + PR
- Secundario:
 - Tasa de control de enfermedades (DCR) = CR+PR+SD

- Supervivencia libre de progresión (PFS)

Tabla 3:

Respuesta				
Mejor respuesta general,* n (%)	DLBCL n=35	iNHL† n=45	MCL n=12	Total n=92
Respuesta completa, CR	2 (6)	5 (11)	0	7(8)
Respuesta parcial, PR	7 (20)	8 (18)	0	15 (16)
Enfermedad estable, SD	5 (14)	20 (44)	6 (50)	31 (34)
Enfermedad progresiva	11 (31)	7 (16)	5 (42)	23 (25)
No evaluable‡	10 (29)	5 (11)	1 (8)	16 (17)
DCR (CR+PR+SD)	14 (40)	33 (73)	6 (50)	53 (58)
ORR (CR+PR/todos los pacientes)	9 (26)	13 (29)	0	22 (24)
ORR (CR+PR/pacientes evaluables§)	9 (36)	13 (33)	0	22 (29)
Los datos son n (%). *Investigador evaluado. †Incluye linfoma folicular y otros NHL indolentes. ‡ No se realizó la evaluación de la respuesta después del valor de referencia/no hay datos disponibles. §n=25, 40, 11 y 76, respectivamente. DCR, tasa de control de enfermedades; DLBCL, linfoma difuso de células B grandes; iNHL, linfoma no Hodgkin indolente; MCL, linfoma de células del manto ORR, tasa de respuesta global.				

Los criterios de respuesta en este estudio son los definidos en la Tabla 4. Todos ellos se basan en los Criterios de Respuesta del Grupo de Trabajo Internacional (2007).

Tabla 4: Criterios de respuesta

Respuesta	Definición	Masas nodales	Bazo, hígado	Médula ósea
CR	Desaparición de toda la evidencia de enfermedad	a) FDG-avid o PET positivo antes de terapia; masa de cualquier tamaño permitida si PET negativo b) FDG-avid variable o PET negativo; regresión a tamaño normal en CT	No palpable, nódulos desaparecidos	Infiltrado depurado en biopsia de repetición; si es indeterminado por morfología, la inmunohistoquímica debe ser negativa
PR	Regresión de enfermedad medible y sin nuevos sitios	≥50% de disminución en SPD de hasta 6 masas dominantes más grandes; sin aumento en tamaño en CT a) FDG-avid o PET positivo antes de terapia; uno o más PET positivo en sitios anteriormente implicados b) FDG-avid variable o PET negativo; regresión en CT	≥50% de disminución en SPD de nódulos (para nódulo individual en diámetro transversal más grande); sin aumento en el tamaño del hígado o el bazo	Irrelevante si positivo antes de terapia; debe especificarse el tipo celular
SD	Fallo de lograr CR/PR o PD	a) FDG-avid o PET positivo antes de terapia; PET positivo en sitios anteriores de enfermedad y sin nuevos sitios en CT o PET b) FDG-avid variable o PET negativo; sin cambio en tamaño de lesiones anteriores en CT		

(continuación)

Respuesta	Definición	Masas nodales	Bazo, hígado	Médula ósea
Enfermedad recidivante o PD	Cualquier nueva lesión o aumento del $\geq 50\%$ de sitios anteriormente implicados de nadir	Aparición de una nueva lesión(s) > 1.5 cm in cualquier eje, $\geq 50\%$ de aumento en SPD de más de un nódulo, o $\geq 50\%$ de aumento en diámetro más grande de un nódulo identificado anteriormente > 1 cm in eje corto Lesiones PET positivase si linfoma FDG- avid o PET positivo antes de terapia	$> 50\%$ de aumento desde el nadir en la SPD de cualquier lesión previa	Implicación nueva o recurrente
Abreviaturas: CR, remisión completa; FDG, [^{18}F]fluorodesoxiglucosa; PET, tomografía por emisión de positrones; CT, tomografía computarizada; PR, remisión parcial; SPD, suma del producto de los diámetros; SD: enfermedad estable; PD, enfermedad progresiva				

20 La DCR (CR+PR+SD) se consideró el criterio de valoración de eficacia más relevante en el análisis de las características y los biomarcadores del paciente en este ensayo, ya que la mayoría de los pacientes con SD tenían una marcada reducción de la lesión objetivo pero, según el diseño del estudio, no se trataron más allá del ciclo 3. Por consiguiente, pacientes con MS se incluyeron en el análisis.

25 Se evaluaron por lo menos las siguientes características de los pacientes para determinar si existía una correlación entre la característica y la DCR observada de los pacientes tratados con el anticuerpo anti-CD19: a) edad, b) género, c) si los pacientes habían recibido una dosis de Rituximab en los últimos 6 meses, d) si los pacientes eran refractarios a rituximab, e) si los pacientes tenían el alelo de afinidad alta o baja FCgammaRIIIa, f) si los pacientes tenían el alelo de afinidad alta o baja FCgammaRIIIa, g) si los pacientes tenían una duración de
30 respuesta al tratamiento anterior de más de 12 meses, h) recuentos de células T periféricas basales (células/ μl), i) recuento de células NK periféricas de referencia (células/ μl) y j) expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas (anticuerpos unidos por células - ABC).

35 El Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 anteriores se usaron para evaluar los recuentos de células NK periféricas de referencia, los recuentos de células T y la expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas. Los datos se muestran en la Tabla 2.

40 Se usó un análisis de la característica operativa del receptor (ROC) para analizar la predictividad, la especificidad y la sensibilidad y para determinar los puntos de corte de los potenciales biomarcadores de recuento de células NK, recuento de células T y expresión de CD16 (ABC) en células NK periféricas. Un gráfico ROC muestra el rendimiento de un método de clasificación binaria con salida ordinal continua o discreta. Muestra la sensibilidad (la proporción de observaciones positivas clasificadas correctamente) y la especificidad (la proporción de observaciones negativas clasificadas correctamente) a medida que el umbral de salida se mueve sobre el intervalo de todos los valores posibles. Ver Swets JA: The Relative Operating Characteristic in Psychology. Science 1973, 182: 990-1000, y Pepe MS: The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. Oxford: Oxford University Press; 2003. En el contexto de ROC, el área bajo la curva (AUC) mide el rendimiento de un clasificador y se aplica con frecuencia para la comparación de métodos. Una AUC más alta significa una mejor clasificación. La AUC para los recuentos de células NK/T periféricas y para la expresión de CD16 en células NK es 0,66, 0,53 y 0,61 respectivamente (Figuras 3, 4 y 5).

50 En general, la determinación del punto de corte depende del objetivo al que se dirige el método respectivo. Varios criterios, como la precisión máxima, la razón máxima de posibilidades de diagnóstico, la tasa de error mínima, la sensibilidad máxima y/o la especificidad máxima, llevarían a una determinación diferente del punto de corte. Además, un equilibrio entre más de esos criterios, por ejemplo, la sensibilidad y la especificidad, también llevaría a
55 una determinación específica del punto de corte.

60 Por lo tanto, existen varios métodos o criterios para seleccionar los puntos de corte óptimos, incluyendo métodos que maximizan la precisión, la sensibilidad + especificidad, los valores predictivos, las razones de probabilidad de diagnóstico o la prevalencia. Debido a la asimetría de la curva de expresión de CD16-ROC (Ver Figura 4) la mayoría de los métodos dan como resultado un punto de corte de 60.000 ABC (los puntos con la mayor distancia entre la curva ROC y la línea bisectriz) mientras que la simetría de la curva ROC del recuento de células NK (ver Figura 3) explica por qué pueden obtenerse diferentes valores para el mejor punto de corte al aplicar diferentes métodos. En este estudio particular, para ambos biomarcadores se asignó más peso a la sensibilidad y, por lo tanto, se eligieron 100 células NK/ μl y un nivel de expresión de CD16 de 60.000 ABC, respectivamente, como
65 puntos de corte para analizar la DCR y la PFS dentro de los subgrupos. Para los recuentos de células T periféricas,

la AUC es de 0,53 y la curva ROC está cerca de la bisectriz en cualquier valor de especificidad y sensibilidad, por lo que incluso la selección de un punto de corte diferente de 500 células/μl no tuvo ningún impacto sobre los resultados negativos del análisis de subgrupos de DCR y SLP.

La determinación del punto de corte puede equilibrarse a favor de la sensibilidad o la especificidad. Si se asigna aún más peso a la sensibilidad para la identificación del punto de corte óptimo, el método sería diferente y se contempla un punto de corte más bajo para el recuento de células NK. En tal caso, se determina un punto de corte de por lo menos 50 células NK/μl. Alternativamente, se determina un punto de corte de por lo menos 60 células NK/μl, por lo menos 70 células NK/μl, por lo menos 80 células NK/μl, por lo menos 90 células NK/μl o por lo menos 100 células NK/μl.

Para maximizar la especificidad del método divulgado, se aumenta el punto de corte para el recuento de células NK y se determina entre por lo menos 100 células NK/μl hasta por lo menos 150 células NK/μl. Por lo tanto, para maximizar la especificidad, se selecciona un punto de corte de por lo menos 100 células NK/μl, por lo menos 110 células NK/μl, por lo menos 120 células NK/μl, por lo menos 130 células NK/μl, por lo menos 140 células NK/μl o por lo menos 150 células NK/μl.

Se usaron los valores de punto de corte determinados en este estudio en particular (100 células NK/μl y un nivel de expresión de CD16 de 60.000 ABC) para el siguiente análisis estadístico.

Se usaron diagramas de bosque para analizar todas las características y biomarcadores de los pacientes para determinar la correlación de la característica individual con la DCR. Los resultados se muestran en la Figura 7. En base al análisis del diagrama de bosque de las diferentes características de los pacientes y su correlación con la DCR, en los pacientes con DLBCL y iNHL las siguientes características mostraron diferencias estadísticamente significativas: 1) recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/μl y expresión de referencia de CD16 en células NK periféricas de por lo menos 60.000 ABC (χ^2 valor de p no ajustado = 0,029/0,003) (Figura 7).

Para asegurar que la expresión de CD16 y el recuento de células NK fueran características independientes, que no influyeran en la otra, se realizó un análisis de correlación paramétrico y no paramétrico. Los datos sobre la expresión de CD16 y el recuento de células NK estaban disponibles para 51 pacientes. La r de Pearson fue de 0,019 con un valor de p de dos colas = 0,9 y la r de Spearman fue de 0,036 con un valor de p de dos colas = 0,8. Los resultados se presentan gráficamente en la Figura 6. En conclusión, la expresión de CD16 y el recuento de células NK en los umbrales determinados no están correlacionados, por lo que se consideran predictores totalmente independientes de la probabilidad de que un paciente se beneficie del tratamiento con MOR00208.

No se descubrió que las siguientes características fueran predictivas de DCR: a) edad, b) género, c) si los pacientes habían recibido una dosis de Rituximab en los últimos 6 meses, d) si los pacientes eran refractarios a Rituximab, e) si los pacientes tenían el alelo de alta o baja afinidad FCgammaRIIIa, f) si los pacientes tienen el alelo de alta o baja afinidad FCgammaRIIa, g) si los pacientes tuvieron una duración de la respuesta al tratamiento de más de 12 meses, o h) recuentos de células T periféricas de referencia. Ver Figura 7.

Tanto 1) el recuento de células NK periféricas de referencia como 2) la expresión de CD16 referencia en células NK periféricas mostraron claras correlaciones con la respuesta del paciente con la terapia de MOR00208. Específicamente, los pacientes que tienen un recuento de células NK de referencia de por lo menos 100 células/μl se correlacionan con una tasa de control de enfermedades (DCR) más alta. La DCR incluye pacientes que tienen respuesta completa (CR) + respuesta parcial (PR) + enfermedad estable (SD). Además, los pacientes que tenían una expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 ABC se correlacionaron con una tasa de control de enfermedad (DCR) más alta.

La supervivencia libre de progresión (PFS) es el período de tiempo durante y después del tratamiento de una enfermedad que un paciente vive con la enfermedad, pero que no empeora. Este es un criterio de valoración adicional importante de un ensayo clínico y un indicador de eficacia en los pacientes. La PFS se comparó dentro de las siguientes características de los pacientes: a) recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/μl o menos, b) expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 ABC o menos, y c) recuento de células T periféricas de referencia de por lo menos 500 células/μl o menos. Los resultados se muestran en las Figuras 8-10. La PFS que comparó pacientes que tenían recuentos de células NK que tenían por lo menos 100 células/μl en comparación con pacientes que tenían recuentos de células NK más bajos mostró una diferencia estadísticamente significativa con un HR de 0,1561 (valor de p de intervalo logarítmico no ajustado = 0,0003). Esto confirma aún más la capacidad de predicción de los recuentos de células NK en la respuesta de los pacientes tratados con MOR00208 de aquellos pacientes que tienen CLL, NHL, ALL o SLL.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MorphoSys AG

<120> Métodos para seleccionar pacientes para terapia anti-CD19

<130> MS252

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 1

Ser Tyr Val Met His

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 2

Asn Pro Tyr Asn Asp Gly

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 3

Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Arg	Val	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 4

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	Asn	Val	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 5
Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> constructo sintético

<400> 6
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Ile Thr
1 5

<210> 7
<211> 556
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD19

<400> 7

Met 1	Pro	Pro	Pro	Arg 5	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu 10	Leu	Phe	Leu	Thr	Pro 15	Met
Glu	Val	Arg	Pro 20	Glu	Glu	Pro	Leu	Val 25	Val	Lys	Val	Glu	Glu 30	Gly	Asp
Asn	Ala	Val 35	Leu	Gln	Cys	Leu	Lys 40	Gly	Thr	Ser	Asp	Gly 45	Pro	Thr	Gln
Gln	Leu 50	Thr	Trp	Ser	Arg	Glu 55	Ser	Pro	Leu	Lys	Pro 60	Phe	Leu	Lys	Leu
Ser 65	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly 70	Leu	Gly	Ile	His	Met 75	Arg	Pro	Leu	Ala	Ile
Trp	Leu	Phe	Ile 85	Phe	Asn	Val	Ser	Gln 90	Gln	Met	Gly	Gly	Phe	Tyr 95	Leu
Cys	Gln	Pro	Gly 100	Pro	Pro	Ser	Glu	Lys 105	Ala	Trp	Gln	Pro	Gly 110	Trp	Thr
Val	Asn 115	Val	Glu	Gly	Ser	Gly	Glu 120	Leu	Phe	Arg	Trp	Asn 125	Val	Ser	Asp
Leu	Gly 130	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly 135	Leu	Lys	Asn	Arg	Ser 140	Ser	Glu	Gly	Pro
Ser 145	Ser	Pro	Ser	Gly 150	Lys	Leu	Met	Ser	Pro	Lys 155	Leu	Tyr	Val	Trp	Ala
Lys	Asp	Arg	Pro 165	Glu	Ile	Trp	Glu	Gly 170	Glu	Pro	Pro	Cys 175	Leu	Pro	Pro
Arg	Asp 180	Ser	Leu	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser 185	Gln	Asp	Leu	Thr 190	Met	Ala	Pro
Gly	Ser 195	Thr	Leu	Trp	Leu	Ser	Cys 200	Gly	Val	Pro	Pro	Asp 205	Ser	Val	Ser
Arg	Gly 210	Pro	Leu	Ser	Trp	Thr 215	His	Val	His	Pro	Lys 220	Gly	Pro	Lys	Ser
Leu 225	Leu	Ser	Leu	Glu 230	Leu	Lys	Asp	Asp	Arg	Pro 235	Ala	Arg	Asp	Met	Trp
Val	Met	Glu	Thr 245	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro 250	Arg	Ala	Thr	Ala 255	Gln	Asp	Ala
Gly	Lys	Tyr	Tyr 260	Cys	His	Arg	Gly 265	Asn	Leu	Thr	Met	Ser 270	Phe	His	Leu

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
 275 280 285
 Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
 290 295 300
 Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320
 Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
 325 330 335
 Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
 340 345 350
 Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
 355 360 365
 Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
 370 375 380
 Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
 385 390 395 400
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
 405 410 415
 Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
 420 425 430
 Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
 435 440 445
 Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
 450 455 460
 Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
 485 490 495
 Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln
 500 505 510
 Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala
 515 520 525
 Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp
 530 535 540
 Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
 545 550 555

<210> 8
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo sintético

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

ES 2 878 156 T3

<211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo sintético

<400> 9

```

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

      85      90      95
Leu Glu Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100      105      110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115      120      125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130      135      140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145      150      155      160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165      170      175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180      185      190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195      200      205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210      215

```

<210> 10
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo sintético

<400> 10

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Val	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Arg	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 11
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo sintético

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo sintético

ES 2 878 156 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn

ES 2 878 156 T3

195					200					205					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
210						215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290						295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 13

ES 2 878 156 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar un sujeto que tiene linfoma no Hodgkin (NHL) que responde al tratamiento con un anticuerpo anti-CD19, dicho método comprendiendo:
- 10 a. proporcionar una muestra de sangre obtenida de dicho sujeto antes del tratamiento con dicho anticuerpo anti-CD19,
b. determinar el nivel de por lo menos un biomarcador en dicha muestra seleccionada del grupo que consiste de:
- 15 i. recuento de células NK periféricas, y
ii. niveles de expresión de CD16 en células NK periféricas,
- c. comparar el nivel de dicho por lo menos un biomarcador en dicha muestra con un nivel de punto de corte predeterminado,
15 en donde los niveles de dicho por lo menos un biomarcador en o por encima del nivel de punto de corte predeterminado es indicativo de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo anti-CD19.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:
- a. un recuento de células NK de referencia dentro de por lo menos 50 células/ μ l, o
b. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 ABC.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:
- a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 60 células/ μ l.
- 30 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:
- a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 70 células/ μ l.
- 35 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:
- a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 80 células/ μ l.
- 40 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:
- a. un recuento de células NK periféricas de referencia de por lo menos 100 células/ μ l.
- 45 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el punto de corte predeterminado de dicho biomarcador es:
- a. niveles de expresión de CD16 de referencia en células NK periféricas de por lo menos 60.000 ABC.
- 50 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-CD19 comprende una región HCDR1 que comprende la secuencia SYVMH (SEQ ID NO: 1), una región HCDR2 que comprende la secuencia NPYNDG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 que comprende la secuencia GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 que comprende la secuencia RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 que comprende la secuencia RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 que comprende la secuencia MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).
- 55 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-CD19 comprende una cadena pesada variable de la secuencia
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYIN
PYNDGTYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGT RVFDYWGGQTLVTVSS (SEQ
60 ID NO: 10) y una cadena ligera variable de la secuencia

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLI
 YRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAG
 5 TKLEIK (SEQ ID NO: 11).

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-CD19 comprende una cadena pesada que tiene la secuencia

10 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYIN
 PYNDGTYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGT
 RVFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
 15 SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD
 15 WLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 8) y una cadena ligera que tiene la secuencia

20 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLI
 YRMSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAG
 TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
 25 SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC (SEQ ID NO: 9).

30 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el linfoma no de Hodgkin se selecciona del grupo que consiste de linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas, linfoma de zona marginal, linfoma de células B grandes difusas, linfoma de células marginales, linfoma de Burkitt y linfoma de células del manto.

35 12. Un anticuerpo anti-CD19 para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene linfoma no Hodgkin (NHL), en donde el paciente se identifica de acuerdo con un método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

40 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el anticuerpo anti-CD19 para el uso de la reivindicación 12, en donde el linfoma no de Hodgkin es linfoma de células B grandes difusas.

40 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el anticuerpo anti-CD19 para el uso de la reivindicación 12, en donde el linfoma no de Hodgkin es linfoma folicular.

45 15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el anticuerpo anti-CD19 para el uso de la reivindicación 12, en donde el linfoma no de Hodgkin es linfoma de células marginales.

Figura 1

La secuencia de aminoácidos del Dominio pesado variable de MOR00208 es (Las CDR están en negritas y subrayadas):

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFT**SYVMHW**VVRQAPGKGLEWIGYI
NPYNDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARG**GTYYY**
GTRVFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

La secuencia de aminoácidos del Dominio ligero variable de MOR00208 es (Las CDR están en negrita y subrayadas):

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSC**RSSKSLQNVNGNTYLY**WFQQKPGQSPQL
 LIY**RMSNLNS**GVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYC**MQHLEYPIT**FG
 AGTKLEIK (SEQ ID NO: 11)

La secuencia de aminoácidos de la HCDR1 de MOR00208 es: SYVMH (SEQ ID NO: 1)

La secuencia de aminoácidos de la HCDR2 de MOR00208 es: NPYNDG (SEQ ID NO: 2)

La secuencia de aminoácidos de la HCDR3 de MOR00208 es: GTYYYGTRVFDY
 (SEQ ID NO: 3)

La secuencia de aminoácidos de la LCDR1 de MOR00208 es: RSSKSLQNVNGNTYLY
 (SEQ ID NO: 4)

La secuencia de aminoácidos de la LCDR2 de MOR00208 es: RMSNLNS (SEQ ID NO: 5)

La secuencia de aminoácidos de la LCDR3 de MOR00208 es: MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6)

Figura 2

La secuencia de aminoácidos de la Cadena Pesada de MOR00208 es:

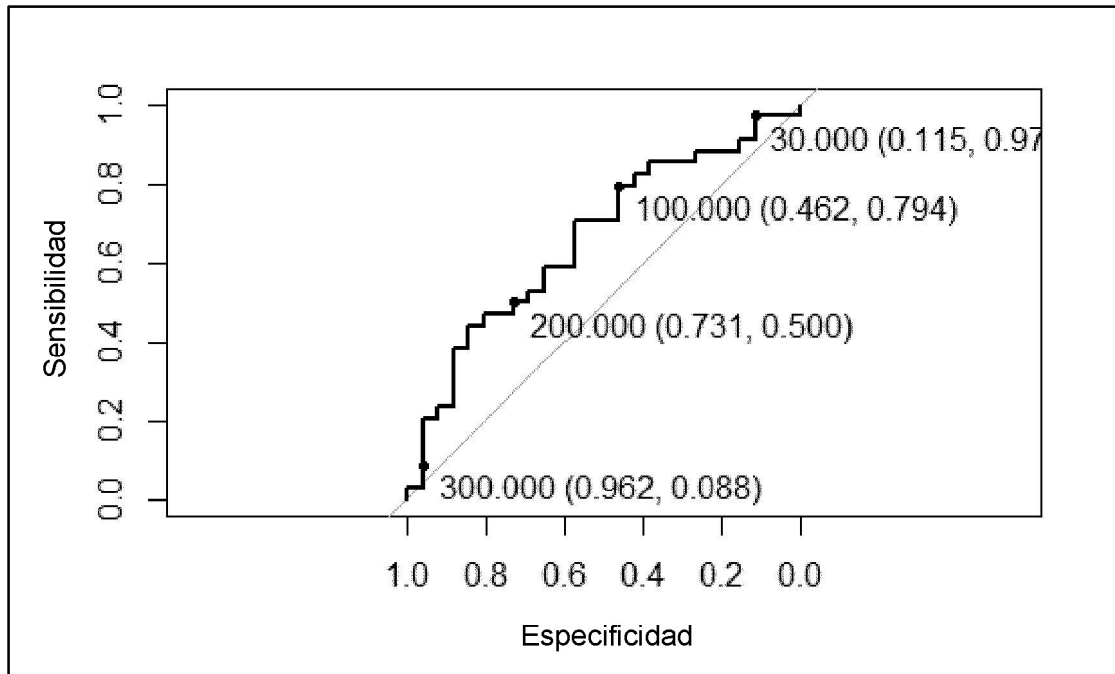
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYN
DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWQQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

La secuencia de aminoácidos de la Cadena Ligera de MOR00208 es:

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLN
SGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST
LTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)

Figura 3

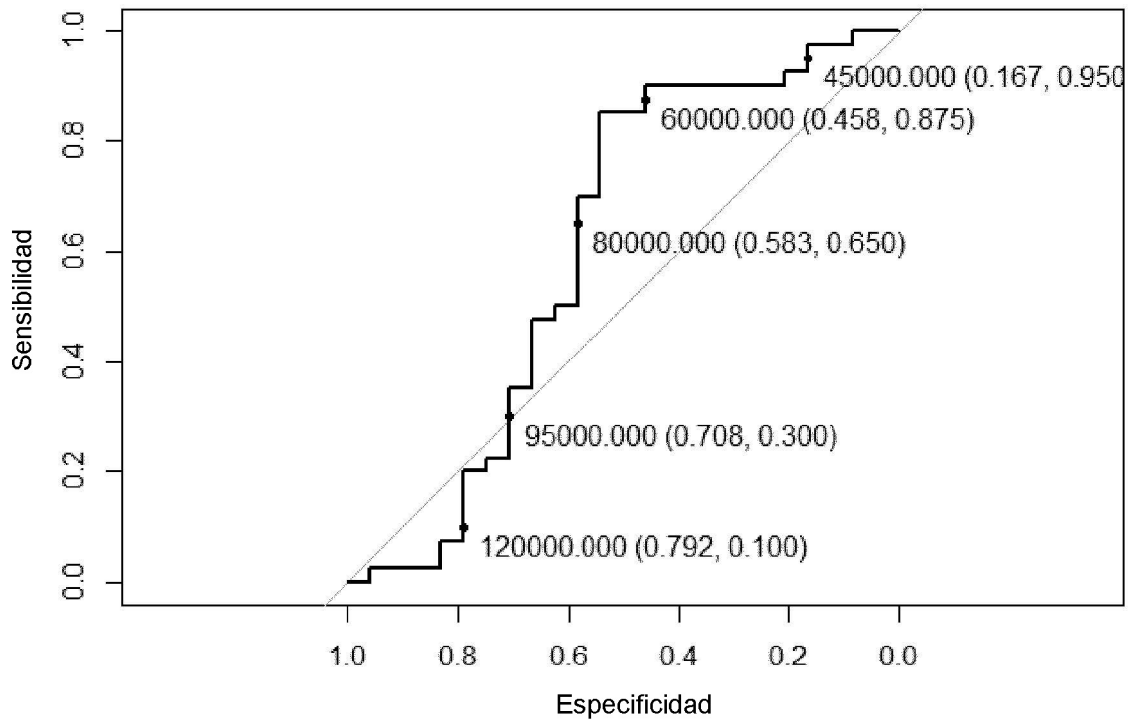
Determinación de los puntos de corte para recuentos de células NK periféricas mediante análisis ROC



Análisis de característica operativa de receptor (ROC) de recuento de células NK periféricas (células/μl) como un predictor de la tasa de control de enfermedad (CR, PR, DS frente a PD, ET) en pacientes con DLBCL e iNHL. Se muestran varios puntos de corte con valores de especificidad y sensibilidad. AUC = 0.66. CR-Remisión completa, PR-Remisión parcial, SD-Enfermedad estable, PD- enfermedad progresiva, ET-Finalización temprana, ABC-antígenos unidos por célula.

Figura 4

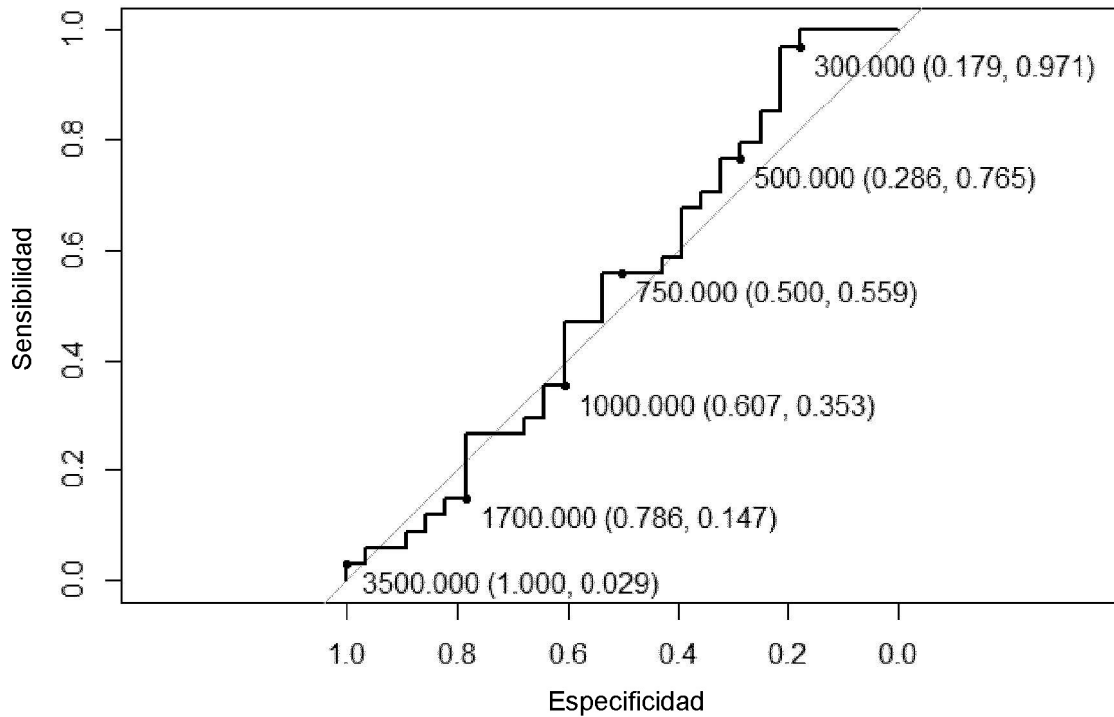
Determinación de los puntos de corte para la expresión de CD16 (ABC) mediante análisis ROC



Análisis de características operativas del receptor (ROC) de la expresión de CD16 (ABC) como un predictor para la Tasa de control de enfermedad (CR, PR, DS frente a PD, ET) en pacientes con DLBCL e iNHL. Se muestran varios puntos de corte con valores de especificidad y sensibilidad. AUC = 0.61. CR-Remisión completa, PR-Remisión parcial, SD-Enfermedad estable, PD-Enfermedad progresiva, ET-Finalización temprana, ABC-Antígenos unidos por célula

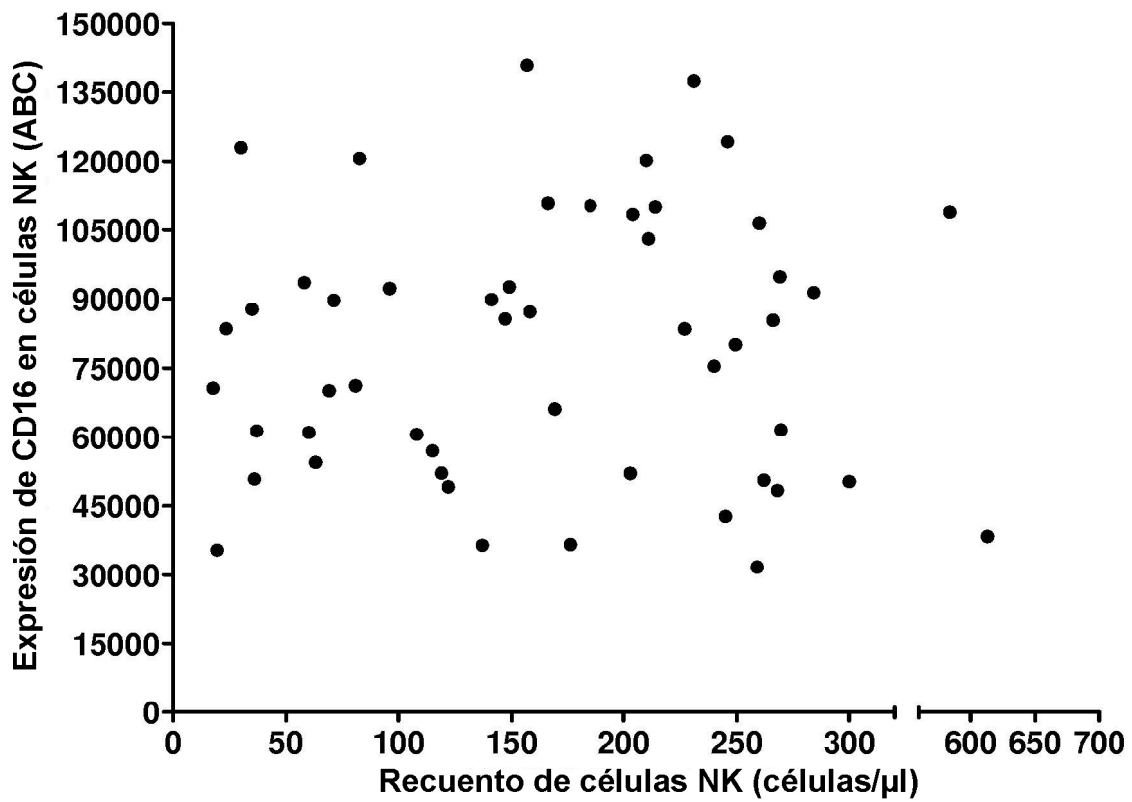
Figura 5

Determinación de los puntos de corte para recuento de células T periféricas mediante análisis ROC

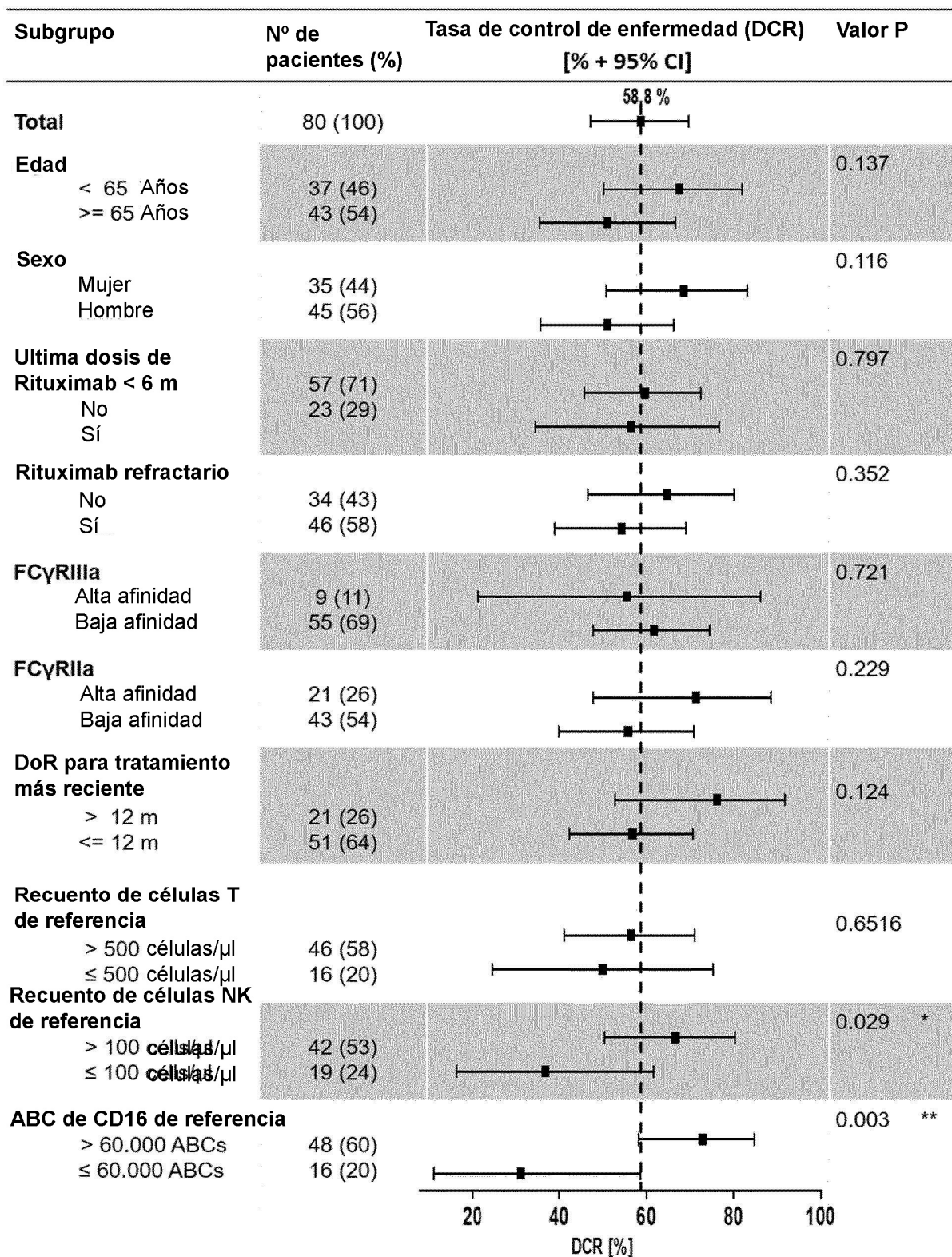


Análisis de características operativas del receptor (ROC) de recuento de células T periféricas (células/ μ l) como un predictor potencial para la Tasa de Control de Enfermedad (CR, PR, DS frente a PD, ET) en pacientes con DLBCL e iNHL. Se muestran varios puntos de corte con valores de especificidad y sensibilidad. AUC = 0.53. CR-Remisión completa, PR-Remisión parcial, SD-Enfermedad estable, PD-Enfermedad progresiva, ET-Finalización temprana, ABC-Antígenos unidos por célula

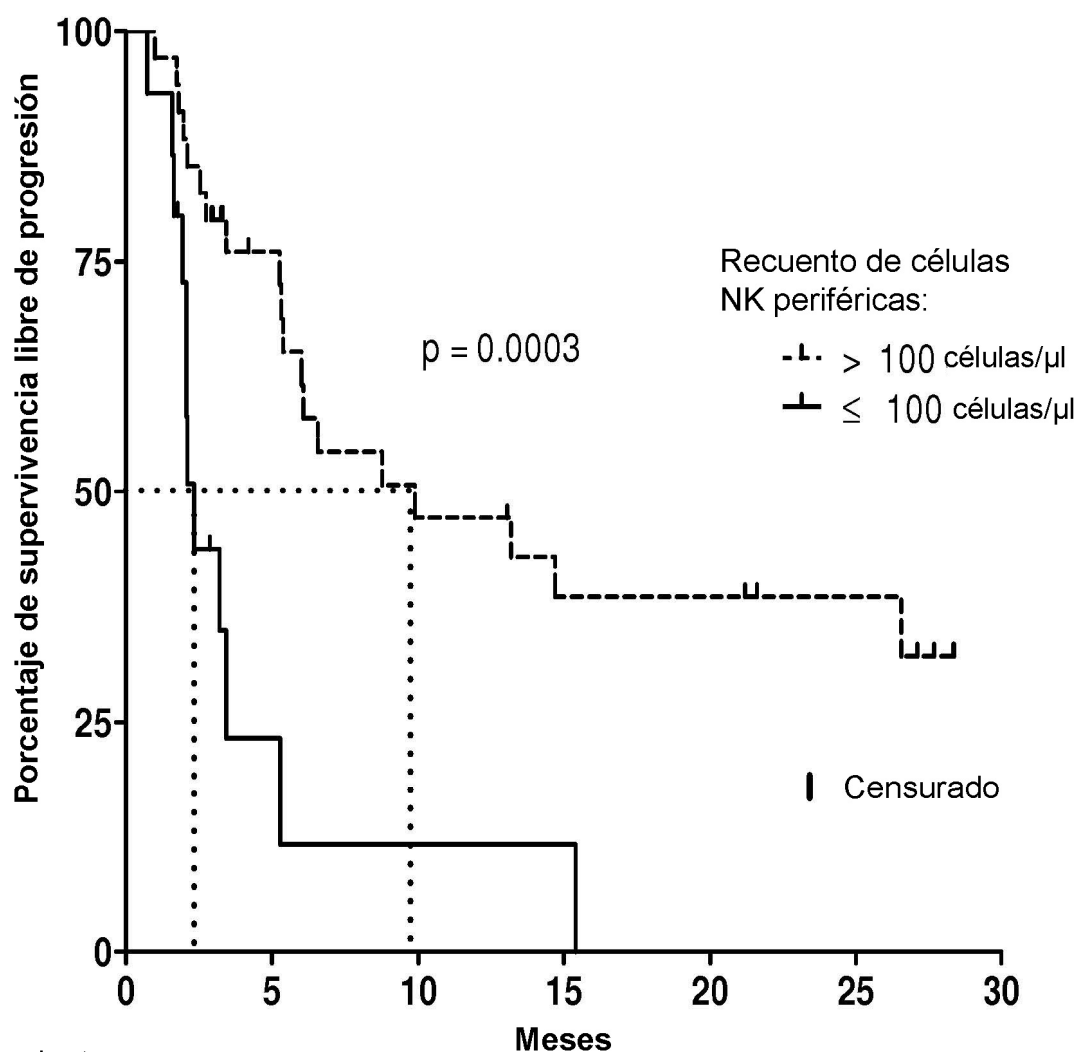
Figura 6



ABC-Antígenos unidos por célula. Análisis de correlación: r de Pearson=0,019 con valor p de dos colas=0.9; r de Spearman no paramétrica $r=0,036$ con valor p de dos colas = 0.8; $n = 51$.

Figura 7 Diagrama de bosque con análisis de subgrupos de tasa de control de enfermedad

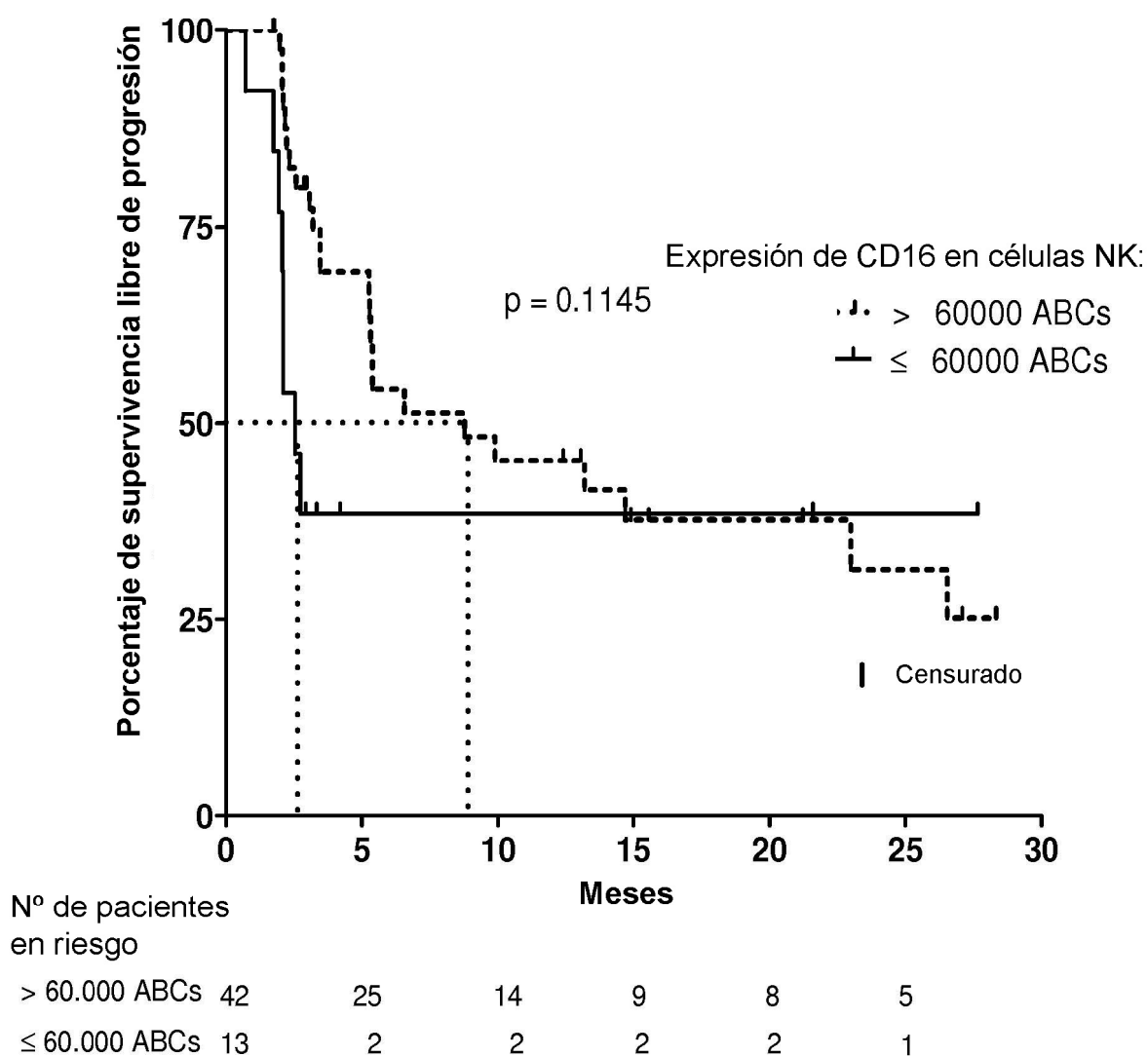
†Intervalos de confianza de Clopper Pearson ‡prueba χ^2 no ajustada (dos lados) de tasas DCR.
 DoR, duración de respuesta; IPI, Índice pronóstico internacional. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 8 Análisis de subgrupos de supervivencia libre de progresión (PFS)

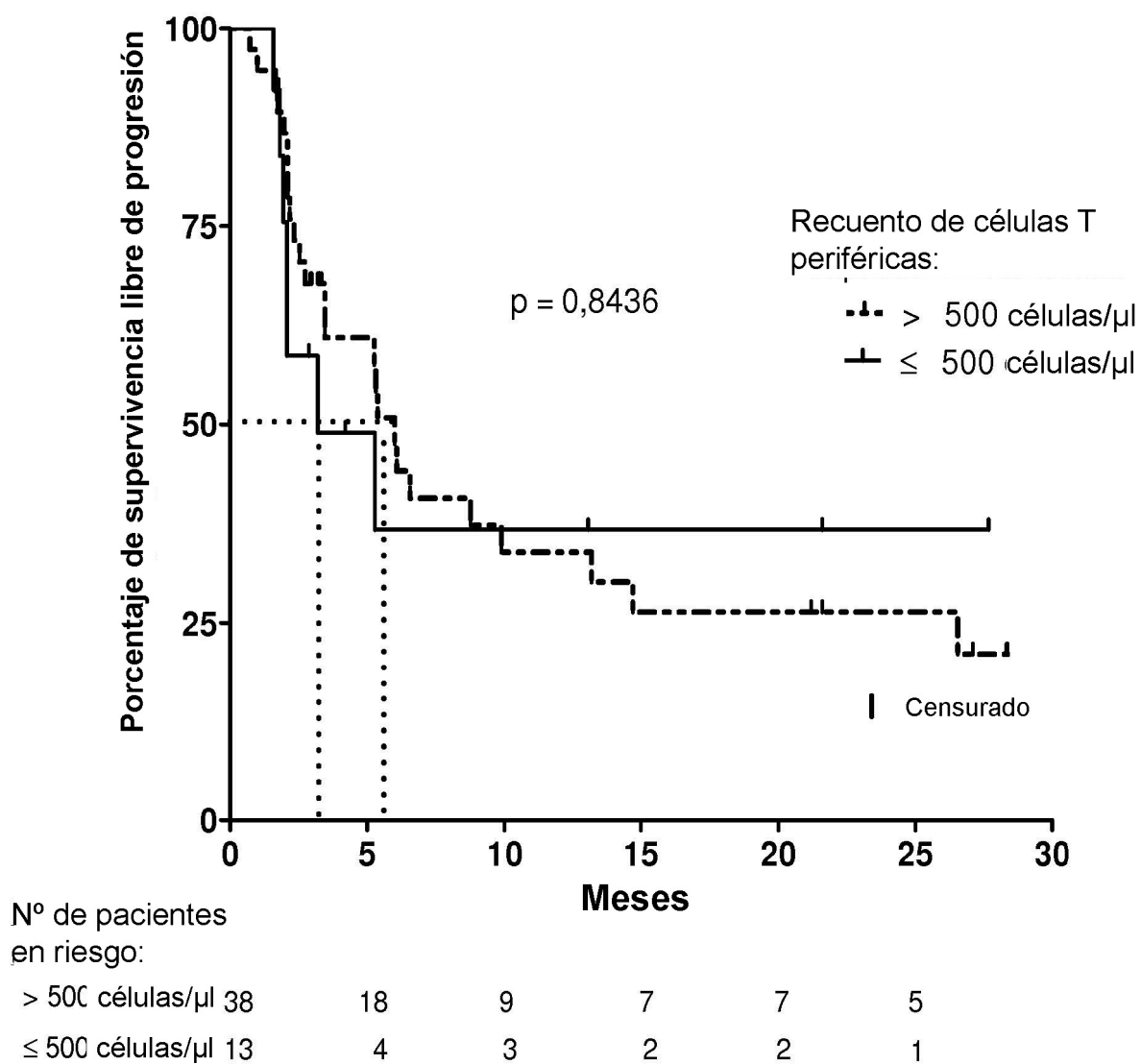
Nº de pacientes
con riesgo:

>100 células/ μ l	35	21	12	9	9	6
≤100 células/ μ l	15	2	1	1	0	0

Los pacientes sin evaluación tumoral radiológica de referencia posterior se censuraron en el valor de referencia. PFS, supervivencia libre de progresión. valor p de rango log. no ajustado = 0.0003.

Figura 9 Análisis de subgrupos de supervivencia libre de progresión (PFS)

Los pacientes sin evaluación tumoral radiológica después de la referencia se censuraron en el valor de referencia PFS, supervivencia libre de progresión. valor p de rango log. no ajustado = 0.1145

Figura 10 Análisis de subgrupos de supervivencia libre de progresión (PFS)

Los pacientes sin evaluación tumoral radiológica después de la referencia se censuraron en el valor de referencia. PFS, supervivencia libre de progresión. Valor p de rango log. no ajustado = 0.8436