

Domeniul invenției

Prezenta divulgare este direcționată către identificarea caracteristicilor și biomarkerilor la pacienții care beneficiază de tratamentul cu anticorpi anti-CD19.

Fundal

CD19 este o glicoproteină transmembranară 95-kDa a superfamiliei de imunoglobuline care conține două domenii extracelulare de tip imunoglobulină și un terminal extensiv citoplasmatic. Proteina este un receptor de suprafață al limfocitei pan-B și este exprimată ubicuitar din stadiile cele mai timpurii de dezvoltare a celulei pre-B și în continuare până când este reglată negativ în timpul diferențierii terminale în celulele din plasmă. Ea este specifică descendenței B-limfocitare și nu este exprimată pe celulele stem hematopoietice și pe alte celule imune, cu excepția unor celule dendritice foliculare. CD19 funcționează ca regulator pozitiv al semnalizării receptorului celulei B (BCR) și este important pentru activarea și proliferarea celulelor B și în dezvoltarea răspunsurilor imune umorale. Acționează ca moleculă costimulatoare în conjuncție cu CD21 și CD81 și este critică pentru răspunsurile celulei B la antigenii dependenți de celula T. Terminalul citoplasmatic al CD19 este asociat fizic cu o familie de tirozin kinaze care declanșează căile de semnalizare în aval prin familia src de protein tirozin kinaze. CD19 este o țintă atractivă pentru cancerele de origine limfoidă deoarece este exprimată semnificativ în aproape toate leucemiile limfocitare cronice (CLL) și limfoamele non-Hodgkin (NHL), precum și în multe alte diferite tipuri de leucemii, incluzând leucemia limfocitară acută (ALL) și leucemia cu celule păroase (HCL).

Dezvoltarea clinică de anticorpi CD19 direcționați a fost limitată anterior de internalizarea antigenului CD19, totuși, tehnologia îmbunătățită de modificare a anticorpilor a restabilit această potențială țintă terapeutică. MOR00208 (denumit anterior XmAb5574) este un anticorp Fc monoclonal umanizat modificat genetic care se leagă la CD19. Creșterea în legarea MOR00208 Fc la FcγR, datorată mutațiilor modificate genetic ale XmAb, sporește semnificativ citotoxicitatea in-vitro mediată de celula dependentă de anticorp (ADCC), fagocitoza mediată de celula dependentă de anticorp (ADCP), și efectele citotoxice directe (apoptoză) pe tumoare față de anticorpus nemodificat. Nu s-a demonstrat că MOR00208 mediază citotoxicitatea dependentă de complement.

MOR00208 a fost sau este studiat în prezent în studii clinice în CLL, ALL și NHL. Specific, un studiu de fază I intitulat Siguranța și tolerabilitatea XmAb@5574 în leucemia limfocitară cronică, și un studiu de fază IIa intitulat Studiul anticorpului anti-CD19 optimizat Fc (MOR00208) pentru tratarea leucemiei limfoblastice acute cu celule B (B-ALL) sunt completate. Un studiu de fază I al anticorpului CD19 modificat genetic Fc XmAb5574 (MOR00208) a demonstrat siguranța și eficacitatea preliminară în CLL recidivat (Woyach și colab., Blood 124, nr. 24: 3553-60 (4 decembrie, 2014)). Un studiu de fază IIa intitulat Studiul anticorpului anti-CD19 optimizat Fc (MOR00208) pentru a trata limfomul non-Hodgkin (NHL) a completat recrutarea. Și următoarele studii sunt planificate/în curs de derulare: un studiu de fază II/III intitulat Un studiu pentru evaluarea eficacității și siguranței MOR00208 cu bendamustină (BEN) versus rituximab (RTX) cu BEN la pacienții adulți cu limfom difuz cu celule B mari recidivat sau refractar (DLBCL) (B-MIND), un studiu de fază II intitulat Studiu pentru evaluarea eficacității și siguranței MOR00208 cu idelalisib la pacienții cu R/R CLL/SLL pretratați cu BTKi, un studiu de fază II intitulat Un studiu pentru evaluarea siguranței și eficacității lenalidomidei cu MOR00208 la pacienții cu R-R DLBCL, și un studiu de fază II intitulat Faza II a MOR00208 în combinație cu lenalidomidă pentru pacienții cu CLL, SLL sau PLL recidivat sau refractar sau pentru pacienții mai vârstnici cu CLL, SLL sau PLL netratate. Într-un studiu curent de fază II suplimentar (COSMOS) este studiată eficacitatea și siguranța MOR00208 în combinație cu idelalisib sau venetoclax la pacienții cu CLL, SLL recidivat sau refractar.

Eficacitatea agentului singur MOR00208 a fost raportată în CLL, și NHL. Ratele generale de răspuns variabile ale pacienților la terapiile cu anticorpi monoclonali, au indicat totuși că, sunt necesare metode de predicție cu precizie care pacienți sunt de tipul care răspunde la o astfel de terapie cu anticorpi astfel încât tratamentul să poată fi administrat acelor pacienți care pot primi cel mai probabil beneficii. Pot fi găsite biomarkeri particulari sau caracteristici ale pacienților pentru o concentrație particulară sau interval pentru care fiecare biomarker se corelează cu responsivitatea unor astfel de terapii.

A fost evaluată influența numărului de celule ucigașe natural (NK) asupra supraviețuirii pacienților cu DLBCL tratați cu rituximab, ciclofosamidă, clorhidrat de doxorubicină (Hidroxiadunomicină), sulfat de vincristină (Oncovin) și prednison (R-CHOP). Kim și colab., Blood Research, 49:3, 162-169 (septembrie 2014). Anterior, s-a raportat că numărul periferic de celule NK a fost asociat cu rezultatul clinic la pacienții cu aalPI 2-3 DLBCL. Plonquet și colab., Ann Oncol 2007; 18:1209-15. US 2014/328842 A1 divulgă o metodă pentru identificarea unui subiect având limfom non-Hodgkin (NHL) care este responsabil la tratamentul cu un anticorp anti-CD20, în care răspunsul la tratament este pe baza polimorfismului CD16 (cunoscut de asemenea ca FcγRIIIA). US 2015/0239974 A1 divulgă că trogocitoza (raderea antigenului) indusă de un anticorp anti-CD22 umanizat (hRBF4) joacă un rol semnificativ în determinarea eficacității anticorpului și responsivității la boală pentru tratamentul bolilor de celulă B, cum ar fi cancerul hematopoietice, disfuncția sistemului imunitar și/sau bolile autoimune.

Este clar că este nevoie de eforturi semnificative și investiții pentru a descoperi și identifica astfel de predicții de eficacitate ale caracteristicilor și biomarkerilor pacientului.

Rezumatul invenției

MOR00208 a fost studiat la pacienții având CLL, ALL, NHL și SLL. Corespunzător, o analiză temeinică a datelor clinice a fost completată până în prezent pentru a identifica caracteristicile sau biomarkerii pacienților care sunt mai probabili să beneficieze de tratamentul cu MOR00208.

MOR00208 țintește specific antigenul de suprafață CD19 și mediază direct uciderea celulei tumorale prin funcția sa ADCC efectoare sporită. În studiile preclinice, MOR00208 a arătat că sporește semnificativ efectele citotoxice ADCC, ADCP in vitro, și directe (apoptoză) pe liniile celulare tumorale CD19⁺ care se întind pe un interval larg de limfoame și leucemii umane (limfom Burkitt, CLL, leucemie cu celule păroase (HCL), leucemie mieloidă cronică CD19⁺ (CML), limfom difuz cu celule B mari (DLBCL) și leucemie limfoblastică acută (ALL), care exprimă niveluri de antigen CD19 care variază de la 15.000 până la 105.000 molecule/celulă. Efecte similare au fost de asemenea observate în relație cu celulele CLL sau ALL proaspăt izolate ale pacienților și este de asemenea de așteptat să translateze la celulele de limfom non-Hodgkin primar (NHL) deoarece intervalul de expresie raportat pentru celulele B ALL și CLL acoperă intervalul observat pentru celulele B NHL B (Ginaldi și colab., 1998; Olejniczak și colab., 2006). Pe baza suprafeței de expresie largă și omogenă a CD19 pe diferite tipuri de neoplasme de celulă B, efectul MOR00208 în prezentul studiu poate fi transferat la un interval larg de limfoame și leucemii umane, cum ar fi CLL, ALL, NHL și SLL și subtipuri ale acestora.

Datele din studiul de fază IIa intitulat Studiul anticorpului anti-CD19 optimizat Fc (MOR00208) pentru a trata limfomul non-Hodgkin (NHL) au fost bine analizate. Ca rezultat al acestor eforturi, următoarea divulgare furnizează caracteristici și biomarkeri ale pacienților unde anticorpii anti-CD19 sunt eficienți.

Specific au fost evaluate cel puțin următoarele caracteristici ale pacienților: a) vârsta, b) sexul, c) dacă pacienți au primit o doză de rituximab în ultimele 6 luni, d) dacă pacienții au fost refractari la rituximab, e) dacă pacienții au FCgammaRIIIa ridicată sau alele cu afinitate scăzută,

f) dacă pacienții au FCgammaR11a ridicată sau alele cu afinitate scăzută, g) dacă pacienții au avut o durată de răspuns la tratamentul anterior mai mare de 12 luni, h) numărul de celule T periferice ale liniei de bază (celule/ μ l), i) numărul de celule NK periferice ale liniei de bază (celule/ μ l) și j) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice (anticorpi legați pe celule-ABC-uri).

Ambele 1) numărul de celule NK periferice ale liniei de bază și 2) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice au arătat o corelație clară cu răspunsurile pacientului la terapia cu MOR00208. Specific, pacienții având un număr mai ridicat de celule NK periferice ale liniei de bază pe μ l s-au corelat cu o rată mai ridicată de control a bolii (DCR). DCR include pacienții care au un răspuns complet (CR) + răspuns parțial (PR) + boală stabilă (SD). Suplimentar, astfel de pacienți au avut un progres semnificativ mai bun de supraviețuire liberă (PFS) în comparație cu pacienții care au un număr mai scăzut de celule NK. În plus, pacienții având o expresie CD16 a liniei de bază CD16 asupra celulelor NK de cel puțin 60.000 (ABC-uri) s-au corelat cu o rată mai ridicată de control a bolii (DCR).

Prin urmare, pacienții diagnosticați cu CLL, ALL, NHL și SLL și având fie a) un număr ridicat de celule NK periferice b) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 ABC-uri sunt mai probabili să beneficieze de tratamentul cu MOR00208.

Ambele 1) numărul de celule NK periferice ale liniei de bază și 2) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice au arătat o corelație clară cu răspunsurile pacientului la terapia cu MOR00208. Specific, pacienții având un număr de celule NK periferice ale liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l s-au corelat cu o rată mai ridicată de control a bolii (DCR). DCR include pacienții care au răspuns complet (CR) + răspuns parțial (PR) + boală stabilă (SD). Suplimentar, pacienții având un număr de celule NK ale liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l au avut un progres semnificativ mai bun de supraviețuire liberă (PFS) în comparație cu pacienții care au un număr mai scăzut de celule NK. În plus, pacienți având o expresie CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK de cel puțin 60.000 (ABC-uri) s-au corelat cu o rată mai ridicată de control a bolii (DCR).

Prin urmare, pacienții diagnosticați cu CLL, ALL, NHL și SLL și având fie a) numărul de celule NK periferice ale liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l sau b) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 ABC-uri sunt mai probabili să beneficieze de tratamentul cu MOR00208.

Ambele 1) numărul de celule NK periferice ale liniei de bază și 2) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice au prezentat o corelație clară cu răspunsurile pacientului la terapia cu MOR00208. Specific, pacienții având un număr de celule NK periferice ale liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l s-au corelat cu o rată mai ridicată de control a bolii (DCR). DCR include pacienții care au răspuns complet (CR) + răspuns parțial (PR) + boală stabilă (SD). Suplimentar, pacienții care au numărul de celule NK ale liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l au avut un progres semnificativ mai bun de supraviețuire liberă (PFS) în comparație cu pacienții care au un număr mai scăzut de celule NK. În plus, pacienți având o expresie CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK de cel puțin 60.000 (ABC-uri) s-au corelat cu o rată mai ridicată de control a bolii (DCR).

Prin urmare, pacienți diagnosticați cu CLL, ALL, NHL și SLL și având fie a) numărul de celule NK periferice ale liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l sau 2) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 ABC-uri sunt mai probabili să beneficieze de tratamentul cu MOR00208.

Invenția furnizează o metodă de identificare a unui subiect având limfom non-Hodgkin (NHL) care răspunde la tratamentul cu un anticorp anti-CD19, respectiva metodă cuprinzând:

a. furnizarea unei mostre de sânge obținut de la respectivul subiect înainte de tratamentul cu respectivul anticorp anti-CD19,

b. determinarea nivelului a cel puțin unui biomarker din respectiva mostră selectat din grupul constând din:

i. număr de celule NK periferice, și

ii. nivelurile de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice,

c. compararea nivelului respectivului cel puțin un biomarker din respectiva mostră cu un nivel minim predeterminat,

în care nivelul respectivului cel puțin un biomarker la, sau peste nivelul minim predeterminat este indicatorul unui subiect care ar beneficia de tratamentul cu un anticorp anti-CD19.

Invenția furnizează de asemenea un anticorp anti-CD19 pentru utilizare în tratamentul unui pacient având limfom non-Hodgkin (NHL) identificat în conformitate cu metoda invenției.

Descrierea desenelor

Figura 1 prezintă secvențele de aminoacizi ale domeniilor variabile ale MOR00208 și regiunilor CDR.

Figura 2 prezintă secvențele de aminoacizi ale lanțurilor grele și ușoare complete ale MOR00208.

Figura 3 prezintă analiza caracteristicii de funcționare receptoare (ROC) a numărului de celule NK periferice ca predictor pentru DCR.

Figura 4 prezintă analiza ROC a nivelurilor de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice (ABC-uri) ca predictor pentru DCR.

Figura 5 prezintă analiza ROC a numărului de celule T periferice ca potențial predictor pentru DCR.

Figura 6 arată că numărul de celule NK periferice și nivelurile de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice sunt variabile independente și necorelate.

Figura 7 prezintă graficul Forest cu DCR-uri pe subgrupe de pacienți cu caracteristici și biomarkeri specifici liniei de bază.

Figura 8 prezintă diferența progresului de supraviețuire liberă între pacienții având un număr de celule NK periferice de cel puțin 100 celule/μl versus pacienții având un număr mai scăzut de celule NK.

Figura 9 prezintă diferența progresului de supraviețuire liberă între pacienții având cel puțin 60.000 ABC-uri în expresia CD16 asupra celulelor NK periferice versus pacienții având o expresie CD16 mai scăzută asupra celulelor NK.

Figura 10 prezintă diferența progresului de supraviețuire liberă între pacienții având un număr de celule T periferice de cel puțin 500 celule/μl versus pacienții având un număr mai scăzut de celule T.

Descriere detaliată

Termenul „anticorp” înseamnă anticorpi monoclonali, incluzând orice izotip, cum ar fi, IgG, IgM, IgA, IgD și IgE. Un anticorp IgG este compus din două lanțuri grele identice și două lanțuri ușoare identice care sunt îmbinate prin legături disulfură. Fiecare lanț greu și ușor conține o regiune constantă și o regiune variabilă. Fiecare regiune variabilă conține trei segmente denumite

„regiuni determinante de complementaritate“ („regiuni CDR“) sau „regiuni hipervariabile“, care sunt în primul rând responsabile pentru legarea unui epitop al unui antigen. Ele sunt referite ca CDR1, CDR2, și CDR3, numerotate secvențial de la N-terminal. Porțiunile cele mai puternic conservate ale regiunilor variabile din exteriorul regiunilor CDR sunt denumite „regiuni cadru“. Un „fragment de anticorp“ înseamnă un fragment Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' F(ab')₂, sau alt fragment, care conține cel puțin un lanț variabil greu sau variabil ușor, fiecare conținând regiuni CDR și regiuni cadru.

„VH“ se referă la regiunea variabilă a unui lanț greu de imunoglobulină al unui anticorp, sau fragment de anticorp. „VL“ se referă la regiunea variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină al unui anticorp, sau fragment de anticorp.

„Regiune Fc“ înseamnă regiunea constantă a unui anticorp, care la oameni poate fi de subclasă IgG1, 2, 3, 4 sau altele. Secvențele regiunilor Fc umane sunt disponibile la IMGT, Human IGH C-REGIONS, www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu_IGHCallgenes.html (recuperat pe 16 mai 2011).

Termenul pacient include un om.

NHL este o malignitate eterogenă având originea din limfocite. În Statele Unite (U.S.), incidența este estimată la 65.000/an cu o mortalitate de aproximativ 20.000 (American Cancer Society, 2006; și SEER Cancer Statistics Review). Boala poate avea loc la toate vârstele, debutul uzual începând la adulții de peste 40 ani, cu incidența crescând cu vârsta. NHL este caracterizat printr-o proliferare clonală de limfocite care se acumulează în nodulii limfatici, sânge, măduva osoasă și splină, deși orice organ major poate fi implicat. Sistemul curent de clasificare utilizat de patologi și clinicieni este Clasificarea Tumorală a Organizației Mondiale a Sănătății (WHO), care organizează NHL în neoplasme precursorale și mature ale celulei B sau celulei T. PDQ împarte în prezent NHL ca indolent sau agresiv pentru intrarea în studiile clinice. Grupul NHL indolent este alcătuit în primul rând din subtipuri foliculare, limfom limfocitar mic, MALT (țesut limfoid asociat cu mucoasa), și zona marginală; indolentul cuprinde aproximativ 50% din pacienții nou diagnosticați cu NHL a celulei B. NHL agresiv include pacienții cu diagnoze histologice de în primul rând, celule B mari difuze (DLBL, DLBCL, sau DLCL) (40% din toți pacienții nou diagnosticați au celule mari difuze), cu Burkitt, și celule manta. Cursul clinic al NHL este variabil semnificativ. Un determinant major al cursului clinic este subtipul histologic. Majoritatea tipurilor indolente de NHL sunt considerate a fi boli incurabile. Pacienții răspund inițial fie la chimioterapie sau terapia cu anticorpi și majoritatea va recidiva. Studiile până în prezent nu au demonstrat o îmbunătățire în supraviețuire cu o intervenție timpurie. La pacienții asimptomatici, este acceptabil să „să privești și să aștepți“ până când pacientul devine simptomatic sau ritmul bolii pare să se accelereze. În timp, boala se poate transforma într-o histologie mai agresivă. Supraviețuirea medie este de la 8 până la 10 ani, și pacienți indolenți primesc adesea 3 sau mai multe tratamente în timpul fazei de tratament a bolii lor. Tratamentul inițial al pacientului simptomatic NHL indolent istoric a fost chimioterapia combinată. Cei mai obișnuiți agenți utilizați includ: ciclofosamidă, vincristină și prednison (CVP); sau ciclofosamidă, adriamicină, vincristină, prednison (CHOP). Aproximativ 70% până la 80% din pacienți vor răspunde la chimioterapia lor inițială, durata de remisie durând de ordinul a 2-3 ani. În final majoritatea pacienților recidivează. Descoperirea și utilizarea clinică a anticorpului anti-CD20, rituximab, a furnizat îmbunătățiri semnificative în răspuns și rata de supraviețuire. Standardul curent de îngrijire pentru majoritatea pacienților este rituximab + CHOP (R-CHOP) sau rituximab + CVP (R-CVP). Interferonul este aprobat pentru tratamentul inițial de NHL în combinație cu agenți alchilanți, dar are o utilizare limitată în U.S. Terapia cu rituximab s-a arătat a fi eficace în câteva tipuri de NHL, și este în prezent aprobată ca un tratament de primă linie pentru ambele NHL indolent (limfom folicular) și agresiv (limfom difuz cu celule B mari). Totuși, există limitări semnificative ale anticorpului anti-CD20 monoclonal (mAb), incluzând rezistența primară (50% răspuns la pacienții indolenți recidivați), rezistența

dobândită (50% rată de răspuns după retratament), răspuns complet rar (2% rată de răspuns complet la populația recidivată), și un tipar continuat de recidivă. În final, multe celule B nu exprimă CD20, și astfel multe tulburări ale celulei B nu sunt tratabile utilizând terapia cu anticorp anti-CD20.

În plus față de NHL, există câteva tipuri de leucemii care rezultă din dereglarea celulelor B. Leucemia limfocitară cronică (cunoscută de asemenea ca „leucemie limfoidă cronică” sau „CLL”), este un tip de leucemie la adulți cauzată de acumularea anormală de limfocite B. În CLL, limfocitele maligne pot părea normale și mature, dar ele nu sunt capabile să facă față eficient infecției. CLL este cea mai comună formă de leucemie la adulți. Probabilitatea de a dezvolta CLL este de două ori mai mare la bărbați decât la femei. Totuși, factorul de risc cheie este vârsta. Peste 75% din noile cazuri sunt diagnosticate la pacienții cu vârste de peste 50 de ani. Mai mult de 10.000 cazuri sunt diagnosticate fiecare an și mortalitatea este aproape de 5.000 pe an (American Cancer Society, 2006; și SEER Cancer Statistics Review). CLL este o boală incurabilă dar progresează încet în cele mai multe cazuri. Mulți oameni cu CLL duc o viață normală și activă de mulți ani. Datorită debutului său lent, CLL în stadiu timpuriu este în general netratată deoarece se crede că acea intervenție CLL timpurie nu îmbunătățește timpul de supraviețuire sau calitatea vieții. În schimb, afecțiunea este monitorizată în timp. Tratamentele CLL inițiale variază depinzând de diagnosticul exact și progresul bolii. Există mii de agenți utilizați pentru terapia CLL. Regimurile chimioterapeutice combinate cum ar fi FCR (fludarabină, ciclofosamidă și rituximab), și BR (ibrutinib și rituximab) sunt eficiente în ambele CLL nou diagnosticată și recidivată. Transplantul de măduvă osoasă alogenică (celule stem) este rar utilizat ca tratament de primă linie pentru CLL din cauza riscului său.

Un alt tip de leucemie este limfomul limfocitar mic (SLL) care este considerat o variantă de CLL căreia îi lipsește limfocitoza clonală necesară pentru diagnosticul CLL, dar altfel partajează caracteristicile patologice și imunofenotipice (Campo și colab., 2011). Definiția SLL necesită prezența de limfadenopatie și/sau splenomegalie. Mai mult, numărul de limfocite B în sângele periferic ar trebui să nu depășească $5 \times 10^9/L$. În SLL, diagnosticul ar trebui să fie confirmat de evaluarea histopatologică a unei biopsii a nodulului limfatic ori de câte ori este posibil (Hallek și colab., 2008). Incidența SLL este de aproximativ 25% din CLL în US (Dores și colab., 2007).

Un alt tip de leucemie este leucemia limfoblastică acută (ALL), cunoscută de asemenea ca leucemie limfocitară acută. ALL este caracterizată prin supraproducția și multiplicarea continuă a celulelor sanguine albe maligne și imature (cunoscute de asemenea ca limfoblaste) în măduva osoasă. „Acut” se referă la starea nediferențiată, imature a limfocitelor în circulație („blaste”), și că boala progresează rapid cu o speranță de viață de săptămâni până la luni dacă este lăsată netratată. ALL este cea mai comună în copilărie cu un maxim de incidență la vârsta de 4-5 ani. Copiii cu vârsta de 12- 16 mor mai ușor din această cauză decât alții. În prezent, cel puțin 80% din ALL din copilărie sunt considerate tratabile. Sub 4.000 cazuri sunt diagnosticate fiecare an și mortalitatea este aproape de 1.500 pe an (American Cancer Society, 2006; și SEER Cancer Statistics Review).

Utilizarea unui anticorp CD19 în limfoamele nespecifice celulei B este discutată în WO2007076950 (US2007154473). Utilizarea unui anticorp CD19 în CLL, NHL și ALL este descris în Scheuermann și colab., CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy, Leukemia and Lymphoma, Vol. 18, 385-397 (1995).

Anticorpi specifici suplimentari pentru CD19 sunt descriși în WO2005012493 (US7109304), WO2010053716 (US12/266.999)(Immunomedics); WO200702223 (US US8097703) (Medarex); WO2008022152 (12/377.251) și WO2008150494 (Xencor), WO2008031056 (US11/852,106) (Medimmune); WO

2007076950 (US 11/648.505) (Merck Patent GmbH); WO 2009/052431 (US12/253.895) (Seattle Genetics); și WO2010095031 (12/710.442) (Glenmark Pharmaceuticals), WO2012010562 și WO2012010561 (International Drug Development), WO2011147834 (Roche Glycart), și WO 2012/156455 (Sanofi).

Termenul „**CD19**” se referă la proteina cunoscută ca CD19, având următoarele sinonime: B4, antigen de limfocite B CD19, antigen de suprafață al limfocitelor B B4, CVID3, antigen de diferențiere CD19, MGC12802, și antigen de suprafață al celulei T Leu-12.

CD19 uman are secvența de aminoacizi de:

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPF
LKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELF
RWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL
NQLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMW
VMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLI
FCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSLGL
RAQRWAAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEEGEGYEEPDSSEEDSEFY
ENDSNLGQDQLSQDGSQYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSP
HGSADWPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGP
DPAWGGGGGRMGWTR. (SEQ ID NO: 7)

„**MOR00208**” este un anticorp anti-CD19. Secvența de aminoacizi a domeniilor variabile este prevăzută în Figura 1. Secvența de aminoacizi a regiunii Fc a lanțurilor grele și ușoare ale MOR00208 este furnizată în Figura 2. „MOR00208” și „XmAb 5574” sunt utilizate ca sinonime pentru a descrie anticorpul prezentat în Figurile 1 și 2. Anticorpul MOR00208 este descris în cererea de brevet US cu numărul serial 12/377.251.

Cererea de brevet US cu numărul serial 12/377.251 descrie anticorpul denumit 4G7 H1.52 Hibrid S239D/I332E/4G7 L1.155 (denumit mai târziu MOR00208) după cum urmează:

>4G7 H1.52 Hibrid S239D/I332E

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYN
DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGT
LVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTFRVSVLTIVHVDWLNQKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

> 4G7 L1.155

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLN
SGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)

O compoziție farmaceutică include un agent activ, de exemplu un anticorp pentru utilizare

terapeutică la oameni. O compoziție farmaceutică poate include suplimentar purtători acceptabili farmaceutic sau excipienți.

„Administrat“ sau „administrare“ se referă la livrarea unei compoziții farmaceutice printr-o formă injectabilă, cum ar fi, de exemplu, pe cale intravenoasă, intramusculară, intradermală sau subcutanată sau pe cale mucozală, de exemplu, ca pulverizator nazal sau aerosol pentru inhalare sau ca o soluție ingerabilă, capsule sau tablete.

Anticorpus care este administrat în conformitate cu prezenta divulgare este administrat pacientului într-o cantitate eficientă terapeutică. O „cantitate eficientă terapeutică“ se referă la o cantitate suficientă pentru a furniza unele îmbunătățiri ale manifestărilor clinice ale unei boli sau tulburări date. Ca un exemplu, pacienții din studiul exemplificat au primit dozarea de MOR00208 la 12mg/kg o dată săptămânal, și în întreținere o dată la fiecare două săptămâni sau lunar.

Cantitatea care este eficientă pentru un anumit scop terapeutic va depinde de severitatea bolii sau leziunii precum și de greutatea și starea generală a subiectului. Se va înțelege că determinarea unui dozaj adecvat poate fi obținută, utilizând experimentarea de rutină, prin construcția unei matrice de valori și testarea diferitelor puncte din matrice, care toate sunt în abilitățile obișnuite ale unui medic instruit sau specialist clinician.

Linia de bază înseamnă înainte de administrarea terapiei dorite. De exemplu, înainte de administrarea anticorpusului anti-CD19 dorit.

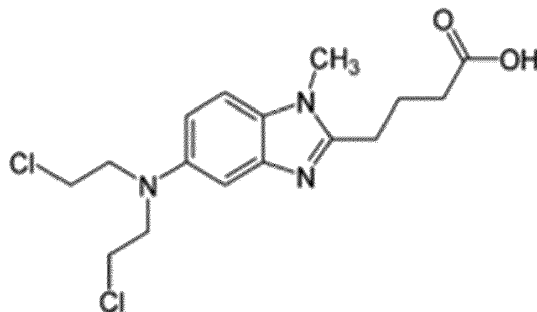
Un receptor care efectuează analiza caracteristică (ROC) a fost utilizat pentru a analiza predictivitatea, sensibilitatea, specificitatea și pentru a determina minimele pentru potențiali biomarkeri, cum ar fi numărul de celule NK, nivelurile de expresie CD16 asupra celulelor NK, și numărul de celule T. Există următoarele metode suplimentare pentru estimarea unui minim optim: „Max.Precizie“ - minimul care maximizează precizia; b) „Max.DOR“ - minimul care maximizează raportul șanselor de diagnostic; c) „Eroare.rată“ - minimul care minimizează rata de eroare; d) „Max.Precizie.area“ - minimul care maximizează aria de precizie; e) „Max.Sens+Spec“ - minimul care maximizează suma dintre sensibilitate și specificitate; f) „Max.Youden“ - minimul care maximizează indicele Youden; g) „Se=Sp“ - minimul la care sensibilitatea este egală cu specificitatea; h) „Min.ROC.Dist“ - minimul care minimizează distanța între curbă și colțul din stânga sus al graficului; i) „Max.Eficiență“ - minimul care maximizează eficiența; și j) „Min.MCT“ - minimul care minimizează eroarea de clasificare în termeni de cost. Vezi Lopez-Raton, M., Rodriguez-Alvarez, M.X, Cadarso-Suarez, C. și Gude-Sampedro, F. (2014). Optimal Cutpoints: An R Package for Selecting Optimal Cutpoints in Diagnosis Tests. Journal of Statistical Software 61(8), 1-36.

Anticorpii specifici la CD19 au fost de asemenea testați preclinic în combinație cu alte medicamente. De exemplu, MOR00208 a fost testat în combinație cu ivermectină de azot, analogi purini, analogi de talidomidă, inhibitori de fosfoinozitolidă 3-kinază, inhibitori BCL-2 și inhibitori de tirozin kinază bruton (BTK).

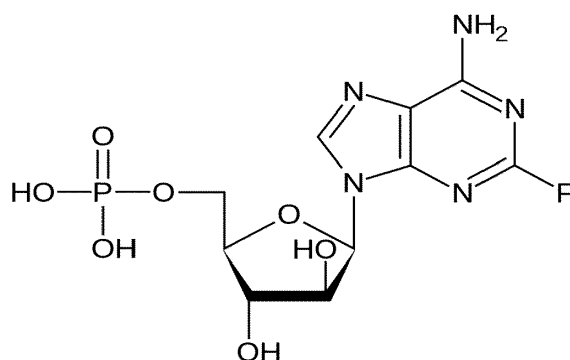
O „ivermectină de azot“ este un agent nespecific de alchilare ADN utilizat ca chimioterapie. Agenții alchilanți se adaugă o grupare alchil (C_nH_{2n+1}) la baze de acid nucleic, de exemplu, adăugând o grupare alchil la o bază guanină de ADN la atomul de azot cu numărul 7 al inelului imidazol. Etapele de alchilare conduc la formarea de reticulări intercatenare (ICL-uri). Aceste ICL-uri sunt puternic citotoxice, deoarece ele blochează procesele metabolice fundamentale cum ar fi replicarea și transcripția. Ivermectinele de azot includ ciclofosamidă, clorambucil, uramustină, ifosfamidă, melfalan și bendamustină.

Bendamustina este comercializată sub numele Ribomustin®, și Treanda®, și este de asemenea cunoscută ca SDX-105, de Mundipharma International Corporation Limited (Licensee of Astellas Pharma GmbH) și Cephalon pentru tratamentul leucemiilor limfocitare cronice (CLL),

limfomului non-Hodgkin indolent cu celule B (NHL), și altor limfoame. Bendamustina are următoarea structură:



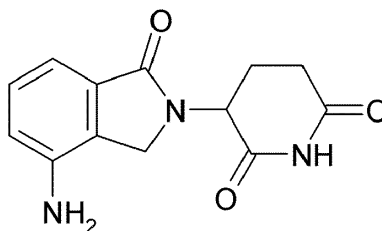
Un analog purin este un antimetabolit, care imită structura metabolică a purinei, interferând prin urmare cu sinteza de acizi nucleici. Fludarabina, de exemplu, poate fi încorporată în ARN și ADN prin substituirea nucleotidelor de purină, adenină și guanină. Analogii purinei inhibă creșterea celulelor care proliferază rapid ale unui individ, de exemplu celulele canceroase, celulele de măduvă osoasă sau celulele prezente în tractul gastrointestinal. Analogii purinei includ mercaptopurină, azatioprină, tioguanină și fludarabină. Fludarabina sau fosfatul de fludarabină (Fludara®) este un medicament chimioterapeutic utilizat în tratamentul leucemiei limfocitare cronice și limfoamelor indolente non-Hodgkin. Fludarabina este un analog de purină. Fludarabina inhibă sinteza ADN prin interferarea cu reductaza ribonucleotidelor și polimeraza ADN și este specific fazei S (deoarece aceste enzime sunt puternic active în timpul replicării ADN). Fludarabina are următoarea structură:



Un „analog de talidomidă” include, dar nu este limitat la, talidomida însuși, lenalidomidă (CC-5013, Revlimid™), pomalidomidă (CC4047, Actimid™) și compușii divulgați în WO2002068414 și WO2005016326. Termenul se referă la un compus chimic sintetic utilizând structura talidomidei ca eşafodaj (de exemplu, grupările laterale au fost adăugate sau astfel de grupări au fost șterse din structura părinte). Aanaloguele diferă în structură de talidomidă și compușii săi metaboliți cum ar fi printr-o diferență în lungimea unei catene alchil, a unui fragment molecular, prin una sau mai multe grupări funcționale, sau o modificare în ionizare. Termenul „analog de talidomidă” include de asemenea metaboliți de talidomidă. Analogii de talidomidă includ amestecul racemic de enantiomeri S și R al unui respectiv compus și enantiomerul S sau enantiomerul R individual. Amestecul racemic este preferat.

Analogii de talidomidă includ compușii cu următoarele structuri:

(A) Lenalidomidă

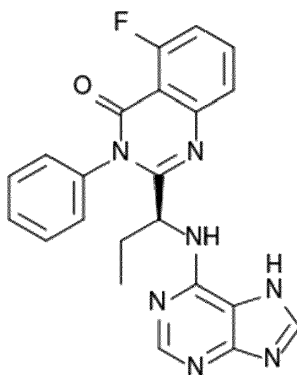


Un „**inhibitor de fosfoinozitădă 3-kinază**“ este o clasă de medicamente medicale care funcționează prin inhibarea uneia sau mai multora dintre enzimele de fosfoinozitădă 3-kinază, care sunt o parte din calea PI3K/AKT/mTOR, o cale de semnalizare importantă pentru multe funcții celulare cum ar fi controlul creșterii, metabolismul și începerea translației.

Există un număr de diferite clase și izoforme de PI3K. Clasa 1 de PI3K-uri are o subunitate catalitică cunoscută ca p110, cu patru tipuri (izoforme) - p110 alfa, p110 beta, p110 gama și p110 delta. Inhibitorii curenți studiați inhibă una sau mai multe izoforme de clasă I de PI3K-uri.

Inhibitorii de fosfoinozitădă 3-kinază includ cel puțin idelalisib, duvelisib și copanlisib. Idelalisib este comercializat de Gilead Sciences, Inc. (nume comercial Zydeler, denumit de asemenea GS-1101 sau CAL-101). Idelalisib este în prezent etichetat pentru tratamentul leucemiei limfocitare cronice recidivate (CLL), în combinație cu rituximab, la pacienții pentru care rituximab singur ar fi considerat o terapie adecvată din cauza altor comorbidități; limfomului folicular cu celule B non-Hodgkin (FL) recidivat la pacienții care au primit cel puțin două terapii sistemice anterioare; limfomului limfocitar mic recidivat (SLL) la pacienții care au primit cel puțin două terapii sistemice anterioare. Substanța acționează ca inhibitor de fosfoinozitădă 3-kinază; mai specific, ea blochează P110δ, izoforma delta a enzimei de fosfoinozitădă 3-kinază.

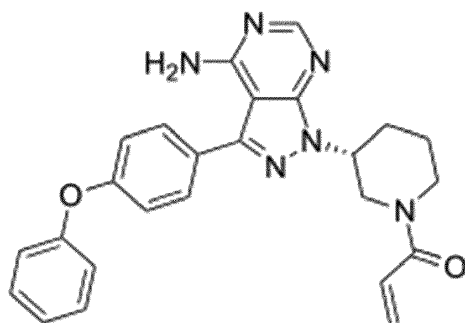
Formula idelalisib este:



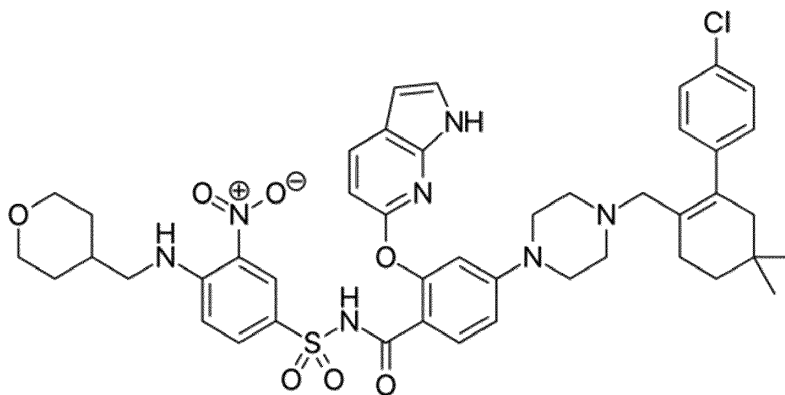
Un „**inhibitor de tirozin kinază Bruton (BTK)**“ este o clasă de medicamente care funcționează prin inhibarea enzimei tirozină-protein kinază BTK, care joacă un rol important în dezvoltarea celulei B. Specific, BTK conține un domeniu PH care leagă fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfat (PIP3). Legarea PIP3 induce Btk la fosforilat fosfolipază C, care în schimb hidrolizează PIP2, un fosfatidilinozitol, în doi mesageri secundari, trifosfat de inozitol (IP3) și diacilglicerol (DAG), care apoi modulează activitatea proteinelor în aval în timpul semnalizării celulei B.

Inhibitorii de tirozin kinază Bruton (BTK) includ ibrutinib. Ibrutinib este comercializat de Pharmacyclics, Inc și Johnson & Johnson's Janssen Pharmaceutical (nume comercial Imbruvica, denumit de asemenea PCI-32765). Ibrutinib este în prezent etichetat pentru tratamentul pacienților cu limfom cu celule de manta (MCL) care au primit cel puțin o terapie anterioară, leucemie limfocitară cronică (CLL) care au primit cel puțin o terapie anterioară, leucemie

limfocitară cronică cu deleție 17p, și macroglobulinemie Waldenström. Formula ibrutinib este 1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-piperidinil]-2-propen-1-onă și are următoarea structură:



Un „**inhibitor BCL-2**” este o clasă de medicamente care funcționează prin inhibarea proteinei limfomului-2 al celulei B anti-apoptotice (Bcl-2), conducând la moartea celulară programată a celulelor. Inhibitorul BCL-2 include venetoclax. Venetoclax este comercializat de Abbvie și Genentech (nume comercial VENCLEXTA™, cunoscut de asemenea ca GDC-0199, ABT-199, și RG7601). Venetoclax este în prezent etichetat pentru tratamentul pacienților cu leucemie limfocitară cronică (CLL) cu deleție 17p, cum s-a detectat prin testul aprobat de FDA, care au primit cel puțin o terapie anterioară. Formula venetoclax este 4-(4-{[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-1-ciclohexen-1-il]metil}-1-piperazinil)-N-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirol[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamidă și are următoarea structură:



„**Venetoclax**“, „**ABT**“, și „**ABT-199**“ sunt utilizate aici ca sinonime.

Realizări

Un aspect este o metodă de identificarea a unui subiect având limfom non-Hodgkin (NHL) care este responsiv la tratamentul cu un anticorp anti-CD19, respectiva metodă cuprinzând:

- a. furnizarea unei mostre obținute de la respectivul subiect înainte de tratamentul cu respectivul anticorp anti-CD19,
- b. determinarea nivelului a cel puțin unui biomarker în respectiva mostră selectat din grupul constând din:
 - i. numărul de celule NK periferice, și
 - ii. nivelurile de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice,

c. compararea nivelului respectivului cel puțin un biomarker din respectiva mostră cu un nivel minim predeterminat,

în care nivelurile respectivului cel puțin un biomarker la, sau peste nivelul minim predeterminat este indicator al unui subiect care ar beneficia de tratamentul cu un anticorp anti-CD19.

În realizări, mostra este o mostră de sânge. În realizări, respectiva mostră cuprinde celule NK periferice.

În realizări, nivelul minim predeterminat al respectivului biomarker este numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l, cel puțin 75 celule/ μ l, cel puțin 100 celule/ μ l, cel puțin 125 celule/ μ l, cel puțin 150 celule/ μ l, cel puțin 175 celule/ μ l, cel puțin 200 celule/ μ l, cel puțin 225 celule/ μ l, sau cel puțin 250 celule/ μ l. În realizări, nivelul minim predeterminat al respectivului biomarker este nivelul de exprimare CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 45.000 ABC-uri, cel puțin 60.000 ABC-uri, cel puțin 75.000 ABC-uri, sau cel puțin 90.000 ABC-uri.

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, nivelul minim predeterminat al numărului de celule NK periferice al liniei de bază este de cel puțin 50 celule/ μ l. În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este nivelul de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 70 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 70 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, nivelul minim predeterminat al numărului de celule NK periferice al liniei de bază este de cel puțin 70 celule/ μ l. În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este nivelul de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 80 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 80 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, nivelul minim predeterminat al numărului de celule NK periferice al liniei de bază este de cel puțin 80 celule/ μ l. În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este nivelul de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 90 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 90 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, nivelul minim predeterminat al numărului de celule NK periferice al liniei de bază este de cel puțin 90 celule/ μ l. În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este nivelul de expresie CD16 al liniei de bază CD16 asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l, sau
- b. nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, nivelul minim predeterminat al numărului de celule NK periferice al liniei de bază este de cel puțin 100 celule/ μ l. În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este nivelul de expresie CD16 al liniei de bază CD16 asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

Un aspect este o metodă de identificare a unui subiect având limfom non-Hodgkin (NHL) care este responsiv la tratamentul cu un anticorp anti-CD19, respectiva metodă cuprinzând:

- a. furnizarea unei mostre de sânge obținute de la respectivul subiect înainte de tratamentul cu respectivul anticorp anti-CD19,
- b. determinarea nivelului a cel puțin unui biomarker din mostra menționată selectat din grupul constând din:

- i. numărul de celule NK periferice, și

- ii. nivelurile de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice,

- c. compararea nivelului respectivului cel puțin un biomarker din respectiva mostră cu un nivel minim predeterminat,

în care numărul de celule NK periferice al liniei de bază este cel puțin 50 celule/ μ l, cel puțin 60 celule/ μ l, cel puțin 70 celule/ μ l cel puțin 80 celule/ μ l, cel puțin 90 celule/ μ l sau cel puțin 100 celule/ μ l și nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice este cel puțin 60.000 (ABC-uri), și în care anticorpul anti-CD19 cuprinde o regiune HCDR1 cuprinzând secvența SYVMH (SEQ ID NO: 1), o regiune HCDR2 cuprinzând secvența NPYNDG (SEQ ID NO: 2), o regiune HCDR3 cuprinzând secvența GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), o regiune LCDR1 cuprinzând secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), o regiune LCDR2 cuprinzând secvența RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), și o regiune LCDR3 cuprinzând secvența MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

Un aspect este o metodă de identificare a unui subiect având limfom non-Hodgkin (NHL) care este responsabil la tratamentul cu un anticorp anti-CD19, respectiva metodă cuprinzând:

- a. furnizarea unei mostre de sânge obținute de la respectivul subiect înainte de tratamentul cu respectivul anticorp anti-CD19,
- b. determinarea nivelului a cel puțin unui biomarker din respectiva mostră selectat din grupul constând din:
 - i. numărul de celule NK periferice, și
 - ii. nivelurile de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice,
- c. compararea nivelului respectivului cel puțin un biomarker din respectiva mostră cu un nivel minim predeterminat,

în care numărul de celule NK periferice al liniei de bază este cel puțin 100 celule/ μ l, sau nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice este cel puțin 60.000 (ABC-uri), și în care anticorpul anti-CD19 cuprinde o regiune HCDR1 cuprinzând secvența SYVMH (SEQ ID NO: 1), o regiune HCDR2 cuprinzând secvența NPYNDG (SEQ ID NO: 2), o regiune HCDR3 cuprinzând secvența GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), o regiune LCDR1 cuprinzând secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), o regiune LCDR2 cuprinzând secvența RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), și o regiune LCDR3 cuprinzând secvența MQHLEYIPIT (SEQ ID NO: 6).

În realizări, minimul predeterminat al respectivului biomarker este:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l, și
- b. nivelurile de exprimare CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, nivelul minim predeterminat al respectivului biomarker este numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l cel puțin 75 celule/ μ l cel puțin 100 celule/ μ l cel puțin 125 celule/ μ l, cel puțin 150 celule/ μ l, cel puțin 175 celule/ μ l cel puțin 200 celule/ μ l, cel puțin 225 celule/ μ l, sau cel puțin 250 celule/ μ l. În realizări, nivelul minim predeterminat al respectivului biomarker este nivelul de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 45.000 ABC-uri, cel puțin 60.000 ABC-uri, cel puțin 75.000 ABC-uri, sau cel puțin 90.000 ABC-uri.

Este de asemenea divulgată o metodă de tratare a unui pacient având leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cu un anticorp anti-CD19, metoda cuprinzând:

- a. obținerea numărului de celule NK periferice al liniei de bază al pacientului, sau nivelul de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice al pacientului, și
- b. administrarea unei cantități eficiente de anticorp anti-CD19 pacientului având numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l, cel puțin 60 celule/ μ l, cel puțin 70 celule/ μ l, cel puțin 80 celule/ μ l, cel puțin 90 celule/ μ l sau cel puțin 100 celule/ μ l sau nivelul de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

Este de asemenea divulgată o metodă de tratare a unui pacient având leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cu un anticorp anti-CD19, metoda cuprinzând:

- a. obținerea numărului de celule NK periferice al liniei de bază al pacientului, sau nivelul de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice al pacientului, și
- b. administrarea unei cantități eficiente de anticorp anti-CD19 pacientului având numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l sau nivelul de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

Metoda de tratare a unui pacient cu leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cu un anticorp anti-CD19, poate cuprinde:

- a. obținerea numărului de celule NK periferice al liniei de bază al pacientului, și
- b. administrarea unei cantități eficiente de anticorp anti-CD19 la pacientul având un număr de celule NK de cel puțin 50 celule/ μ l, cel puțin 60 celule/ μ l, cel puțin 70 celule/ μ l, cel puțin 80 celule/ μ l, cel puțin 90 celule/ μ l sau cel puțin 100 celule/ μ l.

Metoda de tratare a unui pacient cu leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cu un anticorp anti-CD19, poate cuprinde:

- a. obținerea unui număr de celule NK periferice al liniei de bază al pacientului, și
- b. administrarea unei cantități eficiente de anticorp anti-CD19 pacientului având un număr de celule NK de cel puțin 50 celule/ μ l, cel puțin 60 celule/ μ l, cel puțin 70 celule/ μ l, cel puțin 80 celule/ μ l, cel puțin 90 celule/ μ l sau cel puțin 100 celule/ μ l.

Metoda de tratare a unui pacient cu leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cu un anticorp anti-CD19, poate cuprinde:

- a. obținerea unui număr de celule NK periferice al liniei de bază al pacientului, și
- b. administrarea unei cantități eficiente de anticorp anti-CD19 pacientului având un număr de celule NK de cel puțin 100 celule/ μ l.

Metoda de tratare a unui pacient cu leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cu un anticorp anti-CD19, poate cuprinde:

- a. obținerea nivelurilor de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice ale pacientului, și
- b. administrarea unei cantități eficiente de anticorp anti-CD19 pacientului având nivelurile CD16 asupra celulelor NK de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

Cum s-a notat în altă parte aici, invenția furnizează un anticorp anti-CD19 pentru utilizare în tratamentul unui pacient având limfom non-Hodgkin (NHL), în care pacientul este identificat în conformitate cu metoda invenției.

În realizări, anticorpul anti-CD19 este administrat pacienților având atât un număr de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l, cel puțin 60 celule/ μ l, cel puțin 70 celule/ μ l, cel puțin 80 celule/ μ l, cel puțin 90 celule/ μ l sau cel puțin 100 celule/ μ l, cât și un nivel de expresie CD16 al liniei de bază CD16 asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, anticorpul anti-CD19 este administrat pacienților având atât un număr de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l, cât și un nivel de exprimare CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

În realizări, anticorpul anti-CD19 este administrat pacienților având un număr de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 50 celule/ μ l, cel puțin 75 celule/ μ l, cel puțin 100 celule/ μ l, cel puțin 125 celule/ μ l, cel puțin 150 celule/ μ l, cel puțin 175 celule/ μ l, cel puțin 200 celule/ μ l, cel puțin 225 celule/ μ l, sau cel puțin 250 celule/ μ l. În realizări, anticorpul anti-CD19 este administrat pacienților având niveluri de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 45.000 ABC-uri, cel puțin 60.000 ABC-uri, cel puțin 75.000 ABC-uri, sau cel puțin 90.000 ABC-uri.

Este de asemenea divulgată o metodă de tratare a unui pacient având leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cu un anticorp anti-CD19, respectiva metodă cuprinzând:

- a. furnizarea unei mostre obținute de la respectivul subiect înainte de tratamentul cu respectivul anticorp anti-CD19,
- b. determinarea nivelului a cel puțin unui biomarker din respectiva mostră selectat din grupul constând din:
 - i. numărul de celule NK periferice, și
 - ii. nivelurile de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice,
- c. compararea nivelului respectivului cel puțin un biomarker din respectiva mostră cu un nivel minim predeterminat,
- d. administrarea unei cantități eficiente de anticorp anti-CD19 pacientului având un număr de celule NK periferice de cel puțin 100 celule/μl sau nivelul de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice de puțin 60.000 (ABC-uri).

Este de asemenea divulgată o metodă de tratare a unui pacient având leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cuprinzând administrarea unei cantități eficiente a unui anticorp anti-CD19 pacientului dacă:

- a. numărul de celule NK periferice al liniei de bază al pacientului este cel puțin 100 celule/μl sau
- b. nivelurile de exprimare CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice este cel puțin 60.000 (ABC-uri).

Este de asemenea divulgată o metodă de tratare a unui pacient având leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cuprinzând:

- a. obținerea numărului de celule NK periferice al pacientului,
- b. administrarea unei cantități eficiente a unui anticorp anti-CD19 pacienților având numărul de celule NK periferice de cel puțin 100 celule/μl.

Este de asemenea divulgată o metodă de tratare a unui pacient având leucemie limfocitară cronică (CLL), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie limfoblastică acută (ALL) sau limfom limfocitar mic (SLL) cuprinzând:

- a. obținerea nivelurilor de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice ale pacientului,
- b. administrarea unei cantități eficiente a unui anticorp anti-CD19 pacienților având niveluri de expresie CD16 asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri).

Cum s-a notat în altă parte aici, invenția furnizează un anticorp anti-CD19 pentru utilizare în tratamentul unui pacient având limfom non-Hodgkin (NHL), în care pacientul este identificat în conformitate cu metoda invenției.

În realizări, anticorpul anti-CD19 este administrat pacienților având atât numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/μl, cât și un nivel de expresie CD16 al liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 (ABC-uri). În realizări, anticorpul anti-CD19 este administrat pacienților având un număr de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 50 celule/μl, cel puțin 75 celule/μl, cel puțin 100 celule/μl, cel puțin 125 celule/μl, cel puțin 150 celule/μl, cel puțin 175 celule/μl, cel puțin 200 celule/μl, cel puțin 225 celule/μl, sau cel puțin 250 celule/μl. În realizări, anticorpul anti-CD19 este administrat pacienților având niveluri de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 45.000 ABC-uri, cel puțin 60.000 ABC-uri, cel puțin 75.000 ABC-uri, sau cel puțin 90.000 ABC-uri.

În realizări, numărul de celule NK periferice al liniei de bază sau nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază (ABC-uri) asupra celulelor NK periferice sunt obținute dintr-o mostră de

sânge luată de la pacientul uman. În realizări numărul de celule NK periferice și/sau nivelurile de expresie CD16 sunt măsurat înainte de administrarea anticorpului anti-CD19.

În realizări, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde o regiune HCDR1 cuprinzând secvența SYVMH (SEQ ID NO: 1), o regiune HCDR2 cuprinzând secvența NPYNDG (SEQ ID NO: 2), o regiune HCDR3 cuprinzând secvența GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), o regiune LCDR1 cuprinzând secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), o regiune LCDR2 cuprinzând secvența RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), și o regiune LCDR3 cuprinzând secvența MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

În realizări, numărul de celule Nk periferice al liniei de bază sau nivelurile de expresie CD16 ale liniei de bază asupra celulelor NK periferice sunt obținute dintr-o mostră de sânge luată de la pacientul uman.

În invenția revendicată, pacientul are limfom non-Hodgkin. În realizări, limfomul non-Hodgkin este selectat din grupul constând din limfom folicular, limfom limfocitar mic, limfom de țesut limfoid asociat cu mucoasa, limfom de zonă marginală, limfom difuz cu celule B mari, limfom Burkitt, și limfom cu celule de manta. Într-o realizare, limfomul non-Hodgkin este limfom folicular. Într-o realizare, limfomul non-Hodgkin este limfom non-Hodgkin indolent. Într-o realizare, limfomul non-Hodgkin este limfom limfocitar mic. Într-o realizare, limfomul non-Hodgkin este limfom al țesutului limfoid asociat cu mucoasa. Într-o realizare, limfomul non-Hodgkin este limfom al zonei marginale. Într-o realizare, limfomul non-Hodgkin este limfom difuz cu celule B mari. Într-o realizare, limfomul non-Hodgkin este limfom Burkitt. Într-o realizare, limfomul non-Hodgkin este limfom cu celule de manta.

În realizări, tratamentul conduce la efectul terapeutic selectat din grupul constând din rata de control a bolii (DCR) și durata mai lungă de progres de supraviețuire liberă.

În realizări, tratamentul cuprinde în plus administrarea unei cantități eficiente a unei iperite de azot. Într-o realizare acea iperită de azot este bendamustina. În realizări, tratamentul cuprinde în plus administrarea unei cantități eficiente a unui analog de purină. În realizări, analogul de purină este fludarabina. În realizări, tratamentul cuprinde în plus administrarea unei cantități eficiente a unui inhibitor de tirozin kinază Bruton (BTK). În realizări, inhibitorul de tirozin kinază Bruton (BTK) este ibrutinib. În realizări, tratamentul cuprinde în plus administrarea unei cantități eficiente a unui inhibitor de fosfoinozolidă 3-kinază. Într-o realizare, inhibitorul de fosfoinozolidă 3-kinază este idelalisib. În realizări, tratamentul cuprinde în plus administrarea unei cantități eficiente a unui analog de talidomidă. Într-o realizare, analogul de talidomidă este lenalidomida. În realizări, tratamentul cuprinde în plus administrarea unei cantități eficiente a unui inhibitor BCL-2. Într-o realizare, inhibitorul BCL-2 este venetoclax.

Deoarece anticorpul anti-CD19 exemplificat și alți anticorpi anti-CD19 se leagă la CD19, se crede că rezultate similare pot fi văzute cu alți anticorpi anti-CD19. Alți anticorpi anti-CD19 sunt descriși în cererile de brevet US cu numerele seriale 12/377.251 (Xencor), WO2005012493, WO2010053716 (Immunomedics); WO2007002223 (Medarex); WO2008022152 (Xencor); WO2008031056 (Medimmune); WO 2007/076950 (Merck Patent GmbH); WO 2009/052431 (Seattle Genetics); și WO2010095031 (Glenmark Pharmaceuticals).

În realizări, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde un anticorp care concurează încrucișat cu anticorpul cuprinzând o regiune HCDR1 cuprinzând secvența SYVMH (SEQ ID NO: 1), o regiune HCDR2 cuprinzând secvența NPYNDG (SEQ ID NO: 2), o regiune HCDR3 cuprinzând secvența GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), o regiune LCDR1 cuprinzând secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), o regiune LCDR2 cuprinzând secvența RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), și o regiune LCDR3 cuprinzând secvența MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

În realizări, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde un anticorp care se leagă la același epitop ca un anticorp cuprinzând o regiune HCDR1 cuprinzând secvența SYVMH (SEQ ID NO: 1), o regiune HCDR2 cuprinzând secvența NPYNDG (SEQ ID NO: 2), o regiune HCDR3 cuprinzând secvența GTYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), o regiune LCDR1 cuprinzând secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), o regiune LCDR2 cuprinzând secvența RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), și o regiune LCDR3 cuprinzând secvența MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

În realizări, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde o regiune HCDR1 de secvență SYVMH (SEQ ID NO: 1), o regiune HCDR2 de secvență NPYNDG (SEQ ID NO: 2), o regiune HCDR3 de secvență GTYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), o regiune LCDR1 de secvență RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), o regiune LCDR2 de secvență RMSNLNS (SEQ ID NO: 5), și o regiune LCDR3 de secvență MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

În realizări, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde un lanț greu variabil de secvență
EVQLVESGGGLVLPKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY
NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYGTRVFDYWG
QGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 10) și un lanț ușor variabil de secvență
DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQKPGQSPQLLIYR
MSNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTSSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ
ID NO: 11).

Într-o realizare anticorpul menționat cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de secvență

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPDV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12).

Într-o realizare, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde un domeniu constant al lanțului ușor de secvență

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC. (SEQ ID NO: 13).

Într-o realizare, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde un lanț greu având secvența
EVQLVESGGGLVLPKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYGTRVFDYWGQGTLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPDV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

Într-o realizare, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde un lanț ușor având secvența

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLN
 SGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9)

De asemenea este divulgată aici o compoziție farmaceutică. Compoziția poate cuprinde un purtător acceptabil. Compoziția poate fi administrată într-o cantitate eficientă.

Exemple

Exemplul 1: numărarea celulelor T și celulelor NK

Domeniul studiului clinic al MOR00208C201 a inclus evaluarea câtorva biomarkeri exploratori. Ca parte a acestei inițiative, numărarea celulelor periferice ale liniei de bază T și NK a fost efectuată la situsurile clinice.

Celulele T sunt un tip de limfocite (un subtip de celule albe din sânge) care joacă un rol central în imunitatea mediată de celule. Ele pot fi distinse de alte limfocite, cum ar fi celulele B și celulele NK, prin prezența unui receptor de celulă T pe suprafața celulei.

Celule ucigașe natural sau celulele NK sunt un tip de limfocite citotoxice critice pentru sistemul imunitar nativ. Celulele NK furnizează răspunsuri rapide la celulele infectate viral, acționând în jurul a 3 zile după infecție, și răspund de formarea tumorii. De obicei, celulele imune detectează complexul de histocompatibilitate majoră (MHC) prezentat pe suprafețele celulelor infectate, declanșând eliberarea citokinelor, determinând lizarea sau apoptoza. Celulele NK sunt unice, totuși, deoarece ele au abilitatea de a recunoaște celulele stresate în absența anticorpilor și MHC, permițând o reacție imunitară mult mai rapidă.

Materiale și Metode

TriTest CD3 FITC/CD16+CD56 PE/CD45 PerCP (cu tuburi TruCOUNT), BD Științe biologice, Cat: 340403 (US); 342442 (Europa). Pipete și vârfuri de pipete capabile să livreze 20μL, 50μL și 450μL, Gilson Inc. FACS Lysing Solutions, BD Biosciences, Cat: 349202.

Instrumente: citometru de flux, Vortex

Fundal de citometrie de flux:

Sânge integral este colorat cu anticorpi marcați cu fluorocrom (reactivi TriTEST) care se leagă specific la antigenii de suprafață ai leucocitelor. Celulele traversează raza laser și dispersează lumina laser. Celulele colorate devin fluorescente. Aceste dispersii și semnale de fluorescență, detectate de instrument, furnizează informația despre dimensiunea celulei, complexitatea internă, și intensitatea fluorescență relativă. Reactivii TriTEST utilizează fluorescența declanșând, permițând consemnarea filtrării directe a fluorescenței populației de limfocite de celule NK și T pentru a reduce contaminarea celulelor roșii din sânge nelizate sau nucleate din grup.

Colorare

Pentru fiecare mostră a pacientului, un tub TruCOUNT a fost etichetat cu un număr de identificare al mostrei. 20μL de reactiv TriTEST CD3/CD16+CD56/CD45 a fost pipetat pe fundul tubului. 50μL de sânge integral anticoagulat bine amestecat, a fost pipetat pe fundul tubului. Sângele anticoagulat (EDTA) depozitat la temperatura camerei (20-25°C) trebuie să fie colorat în 24 ore de la prelevare și analizat în 6 ore de la colorare (păstrat la temperatura camerei și protejat de lumină). Tubul a fost vortexat ușor la un maestec. Tubul a fost incubat timp de 15 minute în întuneric la temperatura camerei (20-25°C). S-au adăugat 450μL de soluție de lizare 1X FACS la

tub. Tubul a fost vortexat și incubat din nou timp de 15 minute în întuneric la temperatura camerei (20-25°C).

Utilizând tuburi TruCOUNT, un volum cunoscut de mostră este colorat direct într-un tub TruCOUNT. Peletul liofilizat în tub se dizolvă, eliberând un număr cunoscut de perle fluorescente. În timpul analizei, numărul absolut (celule/μL) de celule pozitive din mostră poate fi determinat prin compararea evenimentelor celulare cu evenimentele perlelor.

Citometrie de flux

Celulele au fost vortexate bine (la viteză mică) pentru a reduce agregarea înainte de rularea lor pe citometrul de flux.

Analizele datelor

Graficul punctual CD45 vs SSC a fost inspectat vizual. Limfocitele apar ca populație celulară stralucitoare, compactă, cu SSC mic până la moderat. Monocitele (M) și granulocitele (G) apar ca populații distincte. Analiza a fost completată când populațiile celulare de monocite și limfocite au prezentat o separare clară.

Limfocitele au fost mai întâi consemnate ca populație celulară pozitivă la CD45, cu SSC mic. CD16/CD56 vs CD3 au fost preselecate. Celulele T (T) ar trebui să apară ca clusteri pozitiv CD3 compacti stralucitori. Celulele NK (NK) ar trebui să apară ca clusteri pozitivi CD16/CD56 compacti strălucitori. Gruparea a fost completată și celulele T, și NK au fost numărate.

Numerele evenimentelor de perle au fost făcute utilizând un grafic CD16/CD56 vs CD3 fără nici un grup preselectat. Perlele ar trebui să apară ca cluster dublu pozitiv PE/FITC.

Calcularea numerelor absolute

Numărul absolut (celule/μL de sânge) de celule T sau celule NK în mostră a fost determinat prin compararea evenimentelor celulare cu evenimentele cu perle. A fost făcută analiza datelor fie cu software-ul MultiSET sau fie manual (utilizând CellQuest sau alt software). Pentru numărarea manuală, numărul (#) de evenimente pozitive obținute celular a fost divizat cu numărul (#) de evenimente obținute cu perle, apoi multiplicat cu (numărul de perle total TruCOUNT (dependent de lot) divizat cu volumul mostrei de sânge integral de 50 μL). Rezultatul este numărul absolut de celule pe microlitru.

Ecuatie:

$$\frac{\begin{array}{c} \text{număr de evenimente în grup} \\ \text{conținând populația celulară} \\ \text{(T sau NK)} \end{array}}{\begin{array}{c} \text{număr de evenimente grup 2} \\ \text{conținând populație de perle} \end{array}} \times \frac{\begin{array}{c} \text{\# de perle TruCOUNT total} \\ 50\mu\text{l sange integral} \end{array}}{1} = \text{\# celule /}\mu\text{l sange}$$

Exemplu:

$$\frac{\begin{array}{c} 2709 \text{ celule T} \\ \text{obținute} \end{array}}{10\,000 \text{ perle obținute}} \times \frac{\begin{array}{c} 51\,667 \text{ total} \\ \text{perle în tub} \end{array}}{50\mu\text{l}} = 280 \text{ celule T /}\mu\text{l sange}$$

Exemplul 2: Cuantificare CD16 pe celule NK

Ca o parte din studiul clinic al MOR00208C201, CD16 (un biomarker explorator) a fost cuantificat pe celulele NK periferice centralizat de către ICON Central Laboratories (Farmingdale, New York).

Materiale și Metode

Anticorpi: CD45 AmCyan (Clonă 2D1, BD Biosciences, Cat# 339192); CD3 FITC (Clonă UCHT1, BioLegend, Cat#300406); IgG FITC de șoarece (Clonă MOPC-21, BioLegend, Cat#400110); CD16 PE (Clonă 3G8, BioLegend, Cat#302008); MOR00208; IgG PE de șoarece (Clonă MOPC-21, BioLegend, Cat#400114); CD56 PerCP-Cy5,5 (Clonă HCD56, BioLegend, Cat#318322); și IgG PerCP-Cy5,5 de șoarece (Clonă MOPC-21, BioLegend, Cat#400150).

Material: expediat izolat PharmaTherm (Intelsius, Catalog # PHT014); tun de preparare celulară mononuclear BD Vacutainer® CPT™ - Heparină sodică (16x125 mm / 8mL) (BD, Catalog # 362753); tuburi cu fund rotund BD Falcon™ de 12x75 mm (BD, Catalog # 352052); perle CS&T (BD Biosciences Cat # 642212); Ser fetal bovin (FBS), inactivat termic (Sigma F4135, sau echivalent); Dulbecco's PBS fără Ca⁺⁺ și Mg⁺⁺ (Gibco, Cat #14190, sau echivalent); BD Falcon, filtru celular, 100 μm, galben (BD Biosciences, Cat#352360); tampon FACS, 3% FBS inactivat termic în 1X DPBS; Apă deionizată, stoc de laborator; gheață zdrobită (umedă); găleată cu gheață; folie de aluminiu; tuburi conice, 50 mL; tuburi conice, 15 mL; vârfuri de pipete sterile, de filtrare; tampon de lizare BD Pharm Lyse (BD Biosciences, Cat#555899); trusă de colorare cu violet a celulelor moarte fixabilă ViViD LIVE/DEAD®, pentru excitație la 405 nm (Life Technologies, Cat# L34955); perle reactive ArC Amină (Life Technologies, Cat# A10346); perle BD QuantiBRITE (BD Biosciences, Cat# 340495); și rețea de nailon de 52 μm (Miami Aqua Culture, pentru Cat: Nylon 52 μm, 32% suprafață deschisă țesută în material).

Echipament: Centrifugă (capacitate de înghețare); agitator de laborator (Tube rocker); amestecător Vortex; hotă cu curgere laminară; incubator (setat la 37°C, 5% CO₂); Advia (contor celular); citometru de flux BD FACSCANTO II; recipient Desi-Vac™, 1,5 litri (VWR, Cat#62344-930); indicator de umiditate Sponge™ (VWR, Cat# 61161-319); și următor de umiditate pe un card (VWR, Cat#15551-012).

Tabelul 1. Panoul de testare al cuantificării CD16 pentru PBMC (celule mononucleare din sângele periferic)

Descrierea ionului	# tub	V450	AmCyan	FITC	PE	PerCP-Cy5,5	APC
Tub de control I	1	ViViD	CD45	Ms IgG	Ms IgG	Ms IgG	---
CD16 ABC	2	ViViD	CD45	CD3	CD16	CD56	---

PBMC Proceduri de preparare și marcarea

Sângele periferic al pacientului a fost colectat în tuburi CPT și transportat peste noapte din situsurile clinice la laboratorul central în transporataoare izolate. Tuburile CPT au fost centrifugate timp de 25 min la 1800 x g la temperatura camerei cu frână la ON. După centrifugare, tuburile CPT au fost imediat inversate și plasate timp de 10 min pe agitatorul de laborator la un strat de PBMC resuspendat în plasmă autologă și au rezolvat majoritatea agregatelor celulare formate. În condiții sterile, suspensia omogenizată de PBMC/plasmă a fost decantată încet în centrul unui filtru celular de 100 μm așezat pe partea superioară a unui tub conic steril de 50 mL. Un volum egal de 1X DPBS a fost adăugat la suspensia de PBMC/plasmă (aproximativ 4 mL) într-un tub conic de 15 mL. Tuburile au fost centrifugate la 300 x g timp de 10 min la 4°C și supernatantul a fost îndepărtat. Tuburile au fost vortexate pentru a resuspenda peletul celular. Peletul celular a fost spălat cu DBPS, centrifugat, supernatantul a fost îndepărtat și resuspendat prin vortexare. Suspensia spălată de PBMC a fost adăugată într-o eprubetă Eppendorf conținând 1 μL de stoc de soluție ViViD; s-a incubat timp de 15 min pe gheață și s-a ținut la întuneric

(acoperit cu folie de aluminiu). PBMC-urile colorate ViViD au fost transferate într-un tub conic nou etichetat și apoi s-a adăugat tampon FACS rece cu gheață. Celulele au fost centrifugate și vortexate din nou pentru resuspendare. Tuburile Falcon de polistiren au fost etichetate pentru fiecare mostră (Tabelul 1). Anticorpii sau anticorpii de control ai izotipului au fost adăugați la tuburile adecvate. Alocota PBMC-urilor colorate ViViD a fost adăugată la fiecare tub (Tabelul 1). Tuburile au fost vortexate și incubate. S-a adăugat tamponul FACS și celulele au fost centrifugate și vortexate din nou pentru resuspendare. S-a adăugat tampon de lizare BD Pharm Lyse, și celulele au fost vortexate, centrifugate și aspirate pentru a îndepărta supernatantul și vortexate din nou pentru resuspendare. Tamponul FACS a fost adăugat din nou și celulele au fost centrifugat și vortexate din nou pentru resuspendare. Mostrele au fost apoi obținute pe citometrul FACSCanto II și ABC-urile (anticorpi legați pe celulă) au fost estimate din MFI standardizat cum s-a descris în Lier S, și colab., Expression of CD69 on activated T cells using R-phycoerythrin labeled beads, Citometry, 1996; #AC78 (Suppl,8):113 și Lier S., și colab., QuantiBRITE: A New Standard for Fluorescence Quantification, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA. 1997. White Paper.

Exemplul 3: studiu NHL

Studiul anticorpului anti-CD19 optimizat Fc (MOR00208) pentru a trata limfomul non-Hodgkin (NHL) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01685008 nu mai recrutează.

Criteriile de includere au fost după cum urmează:

1. Pacienți bărbați sau femei cu vârsta ≥ 18 ani.
2. Diagnostic confirmat histologic în conformitate cu clasificarea REAL/WHO, a următoarelor limfoame ale celulei B: a.FL, b.MCL, c.DLBCL, d.alte NHL indolente (de ex., MZL/MALT).
3. NHL-ul pacientului trebuie să fi progresat după cel puțin 1 regim anterior conținând rituximab.
4. Un situs al bolii măsurabil prin imagistică prin rezonanță magnetică (MRI) sau scanare prin tomografie computerizată (CT) definit ca cel puțin o leziune care măsoară cel puțin 1,5 x 1,5 cm, cu excepția: doar pentru pacienții cu MCL, pot fi înscrși pacienții cu boală nemăsurabilă dar cu situsuri evaluabile (măduvă osoasă, splină, sânge periferic, tract gastrointestinal).
5. Pacienții care anterior au primit un transplant autolog de celulă stem trebuie să aibă cel puțin 4 săptămâni după transplant înainte de studiul de administrare a medicamentului și trebuie să nu fi prezentat o recuperare hematologică totală.
6. Întreruperea tratamentului anterior cu anticorp monoclonal (cu excepția rituximab) sau a administrării de radioimunoterapie cu cel puțin 60 zile înainte de administrarea medicamentului de studiu.
7. Oprirea administrării de rituximab cu cel puțin 14 zile înainte de vizita de analiză și confirmarea că nu a avut nici un răspuns sau progres al bolii după tratamentul cu rituximab.
8. Pacienți cu DLBCL care au avut o scanare tomografică cu emisie de pozitroni [^{18}F]fluorodeoxiglucosă (FDG-PET) la linia de bază (criteriu de răspuns Cheson).
9. Speranța de viață > 3 luni.
10. Starea de performanță ECOG < 3 .
11. Criteriile de laborator la analiză: a) numărul absolut de neutrofile (ANC) $\geq 1,0$ ($1000/\text{mm}^3$) b) numărul de trombocite $\geq 75 \times 10^9/\text{L}$ fără transfuzii anterioare în 10 zile ale primului studiu de administrare a medicamentului. c) hemoglobina $\geq 8,0$ g/dL (poate a fost transfuzată). d) creatinina

serică < 2,0 x limita superioară de normal (ULN). e) bilirubină totală $\leq 2,0 \times \text{ULN}$. f) transaminaza de alanină (ALT) și aminotransferaza de aspartat (AST) $\leq 2,5 \times \text{ULN}$.

12. Dacă o femeie se află la vârsta fertilă, trebuie confirmat un test negativ de sarcină înainte de înscriere și utilizarea unei contracepții cu barieră dublă, a contraceptivelor orale plus contraceptivele cu barieră, sau trebuie confirmat că nu suferă de histerectomie și/sau ooforectomie, ligare tubulară supuse total documentate clinic.

13. Dacă este bărbat, o metodă de contracepție de barieră efectivă trebuie să fie utilizată în timpul studiului și timp de 3 luni după ultima doză dacă pacientul este activ sexual cu o femeie aflată la vârsat fertilă.

14. Capabil să fie conform cu toate procedurile înrudite cu studiul, să utilizeze medicația, și evaluările.

15. Capabil să înțeleagă și să dea consimțământul informat scris și să fie conform cu protocolul de studiu.

Criteriile de excludere au fost după cum urmează:

1. Tratament anterior cu chimioterapie citotoxică, imunoterapie, radioterapie sau altă terapie specifică limfomului în termen de 14 zile înainte de vizita de analiză sau pacientul nu s-a recuperat din efectele secundare ale terapiei anterioare specifice limfomului.

2. Tratament cu un agent investigațional sistemic în termen de 28 zile înainte de vizita de analiză.

3. Tratamentul anterior cu un anticorp anti-CD19 sau fragmente.

4. Transplant anterior de celulă stem alogenică.

5. Hipersensibilitate cunoscută sau suspectată la conținutul excipienților din formularea medicamentoasă a studiului.

6. Boală cardiovasculară semnificativă clinic sau insuficiență cardiacă, cardiomiopatie, aritmie preexistentă semnificativă clinic, infarct miocardic acut în 3 luni de la înscriere, angină pectorală în 3 luni de la înscriere.

7. Dovadă clinică sau de laborator de hepatită B sau hepatită C active.

8. Istoric de infecție HIV.

9. Orice infecție sistemică activă (virală, fungală, sau bacteriană) necesitând terapie activă cu antibiotic parenteral în decurs de 4 săptămâni de administrare a medicamentului de studiu.

10. Tratamentul curent cu agenți imunosupresivi alții decât corticosteroizii prescriși (nu mai mult de 10-mg echivalent de prednison).

11. Intervenție chirurgicală majoră sau terapie cu radiație în decurs de 4 săptămâni înainte de prima administrare a medicamentului de studiu.

12. Boli sistemice (cardiovasculare, renale, hepatice, etc) care ar împiedica tratamentul studiului în opinia investigatorului.

13. Istoricul sau dovada clinică a unei boli a sistemului nervos central (CNS), meningeal, sau epidural, incluzând metastaza creierului.

14. Tratament activ/chimioterapie pentru o altă malignitate primară în decursul ultimilor 5 ani.

15. Sarcină sau alăptare la femei și femei la vârstă fertilă care nu folosesc o metodă acceptabilă de control al nașterii.

16. Istoric de neconformitate la regimurile medicale sau pacienți care sunt considerați potențial nedemni de încredere și necooperanți.

Pacienții au fost tratați cu MOR00208 după cum urmează. Pacienții au fost tratați cu două cicluri de 28 zile, unde MOR00208 a fost dat la o doză de 12 mg/kg în zilele 1, 8, 15, și 22. La sfârșitul celor două cicluri, pacienți având boală stabilă sau mai bună au fost tratați cu un al treilea ciclu de 28 zile aplicând același regim de dozare și program ca în primele două cicluri. La sfârșitul celui de al treilea ciclu, pacienții având răspuns parțial sau mai bun au trecut la întreținere. La întreținere, MOR00208 a fost dat la o doză de 12 mg/kg la fiecare 14 sau 28 zile până la progresul bolii.

La finalul studiului, caracteristicile pacientului au fost după cum urmează:

Tabelul 2:

Caracteristici ale liniei de bază					
Caracteristică		DLBCL n=35	iNHL n=45	MCL n=12	Total n=92
Vârsta, ani	Medie	71	66	64,5	66,5
Sex	Masculin	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)
Refractar la rituximab	Da	24 (69)	22 (49)	6 (50)	52 (57)
	Nu	11 (31)	23 (51)	6 (50)	40 (43)
Ultima doză de rituximab	<6 mos	14 (40)	6 (13)	1 (8)	21 (23)
Transplant anterior de celulă stem	Da	2 (6)	7 (16)	1 (8)	10 (11)
DoR la ultima terapie anterioară	>12 luni	3 (9)	18 (40)	4 (33)	25 (27)
	≤ 12 luni	26 (74)	25 (56)	7 (58)	58 (63)
	Necunoscut	6 (17)	2 (4)	1 (8)	9 (10)
Număr de celule NK al liniei de bază	>100 celule/μl	19 (54)	23 (51)	8 (67)	51 (55)
	≤100 celule/μl	11 (31)	8 (18)	1 (8)	20 (22)
	Necunoscut	5 (14)	14 (31)	3 (25)	21 (23)
Expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK	> 60000 ABC-uri	15 (43)	33 (73)	5 (42)	53 (58)
	≤ 60000 ABC-uri	11 (31)	5 (11)	4 (33)	20 (22)
	Necunoscut	9 (26)	7 (16)	3 (25)	19 (21)
Nuumărul de celule T al liniei de bază	> 500 celule/μl	20 (57)	26 (58)	8 (67)	54 (59)
	≤ 500 celule/μl	10 (29)	6 (13)	1 (8)	17 (18)
	Necunoscut	5 (14)	13 (29)	3 (25)	21 (23)
FcyRIIIa	Afinitate ridicată	5 (14)	4(9)	1 (8)	10 (11)
	Afinitate scăzută	27 (77)	28 (62)	9 (57)	64 (70)
	Necunoscut	3 (9)	13 (29)	2 (17)	18 (20)
FcyRIIa	Afinitate ridicată	11 (31)	10 (22)	3 (25)	24 (26)
	Afinitate scăzută	21 (60)	22 (49)	7 (58)	50 (54)

Caracteristici ale liniei de bază					
Caracteristică		DLBCL n=35	iNHL n=45	MCL n=12	Total n=92
	Necunoscut	3 (9)	13 (29)	2 (17)	18 (18)

DLBCL, limfom difuz cu celule B mari; ECOG PS, stare de performanță conform Eastern Cooperative Oncology Group; iNHL, limfom non-Hodgkin indolent (include limfom folicular și alte iNHL); MCL, limfom cu celule de manta; mos, luni. (%)

Alte iNHL înseamnă un grup eterogen de tipuri de NHL nespecificate suplimentar indolente, neagresive, de exemplu limfom al celulei marginale, limfom al zonei marginale, și limfom al țesutului limfoid asociat cu mucoasa (MALT).

Obiectivele finale cheie primare și secundare au fost după cum urmează:

- Primar: rata globală de răspuns (ORR) = CR+PR
- Secundar:
 - rata de control a bolii (DCR) = CR+PR+SD
 - progresul de supraviețuire liberă (PFS)

Tabelul 3:

Răspuns				
Cel mai bun răspuns global,* n (%)	DLBCL n=35	iNHL† n=45	MCL n=12	Total n=92
Răspuns complet, CR	2 (6)	5 (11)	0	7(8)
Răspuns parțial, PR	7 (20)	8 (18)	0	15 (16)
Boală stabilă, SD	5 (14)	20 (44)	6 (50)	31 (34)
Boală progresivă	11 (31)	7 (16)	5 (42)	23 (25)
Neevaluabil‡	10 (29)	5 (11)	1 (8)	16 (17)
DCR (CR+PR+SD)	14 (40)	33 (73)	6 (50)	53 (58)
ORR (CR+PR/toți pacienții)	9 (26)	13 (29)	0	22 (24)
ORR (CR+PR/pacienții evaluabili§)	9 (36)	13 (33)	0	22 (29)

Datele sunt n (%). *Evaluat de investigator. †Include limfom folicular și alte NHL-uri indolente. ‡Evaluarea răspunsului post-linia de bază neefectuată/date indisponibile. §n=25, 40, 11 și respectiv 76. DCR, rata de control a bolii; DLBCL, limfom difuz cu celule B mari; iNHL, limfom non-Hodgkin indolent; MCL, limfom cu celule de manta, ORR, rata globală de răspuns.

Criteriile de răspuns în acest studiu sunt cele cum s-au definit în Tabelul 4. Toate din acestea sunt pe baza criteriilor de răspuns ale International Working Grup (2007).

Tabelul 4: Criterii de răspuns

Răspuns	Definiție	Mase nodale	Splină, ficat	Măduvă osoasă
CR	Dispariția tuturor dovezilor de boală	a) avid FDG sau PET pozitiv înainte de terapie; a fost permisă masa de orice dimensiune dacă PET a fost negativ	Nepalpabil, nodulii au dispărut	Infiltratul eliminat la repetarea biopsiei; dacă a fost nedeterminat de morfologie, imunohisto-chimia

Răspuns	Definiție	Mase nodale	Splină, ficat	Măduvă osoasă
		b) Avid variabil FDG sau PET negativ; regresie la dimensiune normală pe CT		ar trebui să fie negativă
PR	Regresie a bolii măsurabilă și nici un nou situs	≥ 50% scădere în SPD de până la 6 cea mai mare masă dominantă; nici o creștere în dimensiune pe CT	≥ 50% scădere în SPD a nodulilor (pentru nodulul singur cu cel mai mare diametru transversal); nici o creștere în dimensiunea ficatului sau splinei	Irelevantă dacă a fost pozitivă înainte de terapie; tipul de celulă ar trebui să fie specificat
		a) avid FDG sau PET pozitiv înainte de terapie; unul sau mai multe PET pozitive la situsurile implicate anterior		
		b) Avid variabil FDG sau PET negativ; regresia pe CT		
SD	Eșuat în obținerea de CR/PR sau PD	a) avid FDG sau PET pozitiv înainte de terapie; PET pozitiv la situsurile anterioare ale bolii și nici un nou situs pe CT sau PET		
		b) Avid variabil FDG sau PET negativ; nici o modificare în dimensiunea leziunii anterioare pe CT		
Boală recidivată sau PD	Orice nouă leziune sau creștere cu ≥ 50% a situsurilor implicate anterior față de limita inferioară	Apariția unei noi leziuni > 1,5 cm pe orice axă, sau ≥ 50% creștere în SPD de mai mult de un nodul, sau ≥ 50% creștere în diametrul cel mai lung al unui nodul identificat anterior > 1cm pe axa scurtă	> 50% creștere față de limita inferioară în SPD-ul oricărei leziuni anterioare	Implicare nouă sau recurentă
		Leziuni PET pozitive dacă limfomul este avid FDG sau PET pozitiv înainte de terapie		
Abrevieri: CR, remisie completă; FDG, [¹⁸ F]fluorodeoxiglucoză; PET, tomografie cu emisie de pozitroni; CT, tomografie computerizată; PR, remisie parțială; SPD, suma produsului diametrelor; SD, boală stabilă; PD, boală progresivă				

DCR (CR+PR+SD) a fost considerat cel mai relevant obiectiv de eficacitate al analizei caracteristicilor pacientului și biomarkerilor din acest studiu deoarece majoritatea pacienților cu

SD au avut o reducere a leziunii țintă marcate dar conform proiectării studiului nu au fost tratați după ciclul 3. Corespunzător, pacienții având SD au fost incluși în analiză.

Cel puțin următoarele caracteristici ale pacienților au fost evaluate pentru a determina dacă a existat o corelație între caracteristică și DCR observat al pacienților tratați cu anticorp anti-CD19: a) vârsta, b) sexul, c) dacă pacienți au primit o doză de rituximab în ultimele 6 luni, d) dacă pacienții au fost refractari la rituximab, e) dacă pacienții au FCgammaR11a ridicată sau alele de afinitate scăzută, f) dacă pacienții au FCgammaR11a ridicată sau alele de afinitate scăzută, g) dacă pacienții au avut o durată a răspunsului la tratamentul anterior mai mare de 12 luni, h) numărul de celule T periferice al liniei de bază (celule/ μ l), i) numărul de celule NK periferice al liniei de bază (celule / μ l) și j) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice (anticorpi legație pe celule-ABC-uri).

Exemplul 1 și Exemplul 2 de mai sus au fost utilizate pentru a evalua numărul de celule NK periferice al liniei de bază, numărul de celule T și expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice. Datele sunt prezentate în Tabelul 2.

O analiză a caracteristicilor de funcționare ale receptorului (ROC) a fost utilizată pentru a analiza predictivitatea, specificitatea și sensibilitatea și pentru a determina minimele pentru potențialii biomarkeri ai numărului de celule NK, numărului de celule T și expresiei CD16 (ABC-uri) pe celulele NK periferice. Un grafic ROC afișează performanța unei metode de clasificare binară cu ieșire ordinală continuă sau discretă. Prezintă sensibilitatea (proportia de observații pozitive clasificate corect) și specificitatea (proportia de observații negative clasificate corect) deoarece pragul de ieșire este deplasat de-a lungul intervalului de toate valorile posibile. Vezi Swets JA: The Relative Operating Characteristics in Psychology. Science 1973, 182: 990-1000, și Pepe MS: The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. Oxford: Oxford University Press; 2003. În contextul ROC, aria de sub curba (AUC) măsoară performanța unui clasificator și este aplicată frecvent pentru comparația metodelor. O AUC mai ridicată înseamnă o clasificare mai bună. AUC pentru numărul de celule NK/T periferice și pentru expresia CD16 asupra celulelor NK este 0,66, 0,53 și respectiv 0,61 (Figurile 3, 4 și 5).

În general determinarea minimului depinde de obiectivul către care este direcționată respectiva metodă. Diferite criterii cum ar fi precizia maximă, raportul șanselor de diagnostic maxim, rata de eroare minimă, sensibilitatea maximă și/sau specificitatea maximă ar conduce la a diferite determinări ale minimului. În plus, un echilibru între mai multe astfel de criterii, de exemplu sensibilitate și specificitate ar conduce de asemenea la o determinare specifică a minimului.

Prin urmare există câteva metode sau criterii pentru selectarea minimului optim, incluzând metode de maximizarea preciziei, sensibilității+specificității, a valorilor predictibile, a rapoartelor de probabilitate a diagnosticului sau prevalenței. Din cauza asimetriei curbei expresie CD16-ROC (vezi Figura 4) majoritatea metodelor conduc la un minim de 60.000 ABC (punctele cu distanța cea mai mare între curba ROC și linia bisectoare) în timp ce, simetria curbei ROC a numărului de celule NK (vezi Figura 3) explică de ce diferite valori pentru cel mai bun minim ar putea fi obținute când se aplică diferite metode. În acest studiu particular, pentru ambii biomarkeri o pondere mai mare a fost asignată sensibilității și, prin urmare, 100 celule NK/ μ l și un nivel de expresie CD16 de 60.000 ABC-uri, respectiv, au fost alese ca minime pentru a analiza DCR și PFS în subgrupuri. Pentru numărul de celule T periferice, AUC este 0,53 și curba ROC este aproape de bisectoare la orice valoare de specificitate și sensibilitate, prin urmare chiar selectarea a diferite minime de 500 celule/ μ l nu a avut impact asupra rezultatelor negative ale analizei subgrupurilor DCR și PFS.

Determinarea minimului poate fi echilibrată fie în favoarea sensibilității sau fie a specificității. Dacă chiar o pondere mai mare este asignată sensibilității pentru identificarea minimului optim, metoda ar fi diferită și se va avea în vedere un minim mai scăzut pentru numărul

de celule NK. Într-astfel de caz este determinat un minim de cel puțin 50 celule NK/ μ l. Alternativ, este determinat un minim de cel puțin 60 celule NK/ μ l, cel puțin 70 celule NK/ μ l, cel puțin 80 celule NK/ μ l, cel puțin 90 celule NK/ μ l sau cel puțin 100 celule NK/ μ l.

Pentru maximizarea specificității metodei divulgate, minimul pentru numărul de celule NK este crescut și este determinate între cel puțin 100 celule NK/ μ l până la cel puțin 150 celule NK/ μ l. Prin urmare pentru maximizarea specificității, este selectat un minim de cel puțin 100 celule NK/ μ l, cel puțin 110 celule NK/ μ l, cel puțin 120 celule NK/ μ l, cel puțin 130 celule NK/ μ l, cel puțin 140 celule NK/ μ l sau cel puțin 150 celule NK/ μ l.

Valorile minime determinate în acest studiu particular (100 celule NK/ μ l și un nivel de expresie CD16 de 60.000 ABC-uri) au fost utilizate pentru următoarele analize statistică.

Graficele Forest au fost utilizate pentru a analiza toate caracteristicile și biomarkerii pacientului pentru a determina corelația caracteristicii individuale cu DCR. Rezultatele sunt prezentate în Figura 7. Pe baza analizei graficului Forest a diferitelor caracteristici ale pacientului și corelația acestora cu DCR, la pacienții cu DLBCL și iNHL următoarele caracteristici au prezentat diferențe semnificative statistic: 1) numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l și expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 ABC-uri (χ^2 valoare p neajustată = 0,029/0,003) (Figura 7).

Pentru a asigura că expresia CD16 și numărul de celule NK au fost caracteristici independente, care nu s-au influențat una pe cealaltă, a fost făcută o analiză de corelație parametrică și neparametrică. Datele de expresie CD16 și număr de celule NK au fost disponibile pentru 51 pacienți. R Pearson a fost 0,019 cu o valoare p bidirecțională = 0,9 și r Spearman a fost 0,036 cu o valoare p bidirecțională = 0,8. Rezultatele sunt reprezentate grafic în Figura 6. În concluzie, expresia CD16 și numărul de celule NK la pragurile determinate nu sunt corelate, prin urmare, ele sunt considerate predictorii complet independenți de probabilitate a unui pacient de a beneficia de tratamentul cu MOR00208.

Următoarele caracteristici nu au fost găsite ca fiind predictive de DCR: a) vârsta, b) sexul, c) dacă pacienți au primit o doză de rituximab în ultimele 6 luni, d) dacă pacienții au fost refractari la rituximab, e) dacă pacienți au FCgammaRIIIa ridicată sau alele de afinitate scăzută, f) dacă pacienți au FCgammaRIIIa ridicată sau alele de afinitate scăzută, g) dacă pacienți au avut o durată a răspunsului la tratament mai mare de 12 luni, sau h) numărul de celule T periferice al liniei de bază. Vezi Figura 7.

Ambele 1) numărul de celule NK periferice al liniei de bază și 2) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice au prezentat o corelație clară cu răspunsul pacientului la terapia cu MOR00208. Specific, pacienții având un număr de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l s-au corelat cu o rată mai ridicată de control a bolii (DCR). DCR include pacienții cu răspuns complet (CR) + răspuns parțial (PR) + boală stabilă (SD). În plus, pacienții având o expresie CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 ABC-uri s-au corelat cu rată mai ridicată de control a bolii (DCR).

Progresul de supraviețuire liberă (PFS) este lungimea în timp din timpul și de după tratamentul unei boli, în care un pacient trăiește cu boala dar nu se înrăutățește. Acesta este un obiectiv important suplimentar al unui studiu clinic, și un indicator al eficacității la pacienți. PFS a fost comparat în următoarele caracteristici ale pacientului: a) numărul de celule NK periferice al liniei de bază de cel puțin 100 celule/ μ l sau mai mic, b) expresia CD16 a liniei de bază asupra celulelor NK periferice de cel puțin 60.000 ABC-uri sau mai mic, și c) numărul de celule T periferice al liniei de bază de cel puțin 500 celule/ μ l sau mai mic. Rezultatele sunt prezentate în Figurile 8-10. The PFS comparând pacienții având numărul de celule NK de cel puțin 100 celule/ μ l în comparație cu pacienți având numere de celule NK mai scăzute a prezentat o diferență

semnificativă statistic cu o ORE de 0,1561 (valoare p de rang log neajustată = 0,0003). Acest lucru confirmă în plus predictivitatea numărului de celule NK în răspunsul pacienților tratați cu MOR00208 al acelor pacienți având CLL, NHL, ALL sau SLL.

LISTĂ DE SECVENȚE

<110> MorfoSys AG

<120> Metode pentru selectarea pacienților pentru terapia cu anti-CD19

<130> MS252

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<400> 1

Ser Tyr Val Met His

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<400> 2

Asn Pro Tyr Asn Asp Gly

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<400> 3

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Arg Val Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<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> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<400> 5

Arg Met Ser Asn Leu Asn Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<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 Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
1      5      10      15
Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
20      25      30
Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
35      40      45
Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
50      55      60
Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
65      70      75      80
Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
85      90      95
Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
100      105      110
Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
115      120      125
Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
130      135      140
Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
145      150      155      160
Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
165      170      175
Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
180      185      190
Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
195      200      205
Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
210      215      220
Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
225      230      235      240
Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
245      250      255
Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260      265      270

```

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> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<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

<210> 9

<211> 219

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<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> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<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> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<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> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

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

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> Secvență artificială

<220>

<223> construcție sintetică

<400>13

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