



MD/EP 4051710 T2 2026.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 4051710 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 16/28 (2006.01.01)  
A61K 35/17 (2025.01.01)  
A61K 39/395 (2006.01.01)  
A61P 35/02 (2006.01.01)  
A61K 39/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2022 0968</p> <p>(22) Data de depozit: 2020.10.30</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 20800121.4, 2020.10.30</p> <p>(97) Numărul și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 4051710, 2022.09.07</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 19206479</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2019.10.31</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: EP</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 04/2026, 2026.04.30</p> <p>(80) Data publicării de către OEB a mențiunii acordării brevetului european: EPB nr. 48/2025, 2025.11.26</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2022, 2022.09.30</p>
<p>(71) Solicitant: INCYTE CORPORATION, US</p> <p>(72) Inventatori: ENDELL Jan, DE; BOXHAMMER Rainer, DE; PRETSCHER Dominik, DE</p> <p>(73) Titular: INCYTE CORPORATION, US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela</p>	

(54) **Terapie antitumorală combinată care cuprinde un anticorp anti-CD19 și celule T gamma-delta**

(57) **Rezumat:**

Prezenta dezvăluire se referă la o terapie combinată care cuprinde un anticorp anti-CD19 sau un fragment de anticorp al acestuia și celule T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizare în tratamentul leucemiei sau limfomului.

Revendicări: 9

Figuri: 4

MD/EP 4051710 T2 2026.04.30

**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)****Domeniul invenției**

5 Prezentă dezvoltare se referă la o terapie combinată care cuprinde un anticorp anti-CD19 sau un fragment de anticorp al acestuia și celule T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul leucemiei sau limfomului.

**Contextul invenției**

10 CD19 este o glicoproteină transmembranară de 95 kDa din superfamilia imunoglobulinelor, care conține două domenii extracelulare asemănătoare imunoglobulinei și o coadă citoplasmatică extinsă. Proteina este un receptor de suprafață de pan–limfocită B și este exprimată ubicuitar din primele stadii ale dezvoltării pre-celulei B mai departe până când este reglată în jos în timpul diferențierii terminale în celule plasmatică. Este specifică liniei limfocitelor B și nu este exprimată pe celulele stem hematopoietice și alte celule imune, cu excepția unor celule dendritice foliculare. CD19 funcționează ca un reglator pozitiv al semnalizării receptorului celulei B (BCR) și este important pentru activarea și proliferarea celulelor B și în dezvoltarea răspunsurilor imune umorale. Acționează ca o moleculă co-stimulatoare în conjuncție cu CD21 și CD81 și este esențială pentru răspunsurile celulelor B la antigenele dependente de celulele T. Coada citoplasmatică a CD19 este asociată fizic cu o familie de tirozin kinaze care declanșează căile de semnalizare din aval prin intermediul familiei src de protein tirozin kinaze. CD19 este o țintă atractivă pentru cancerul de origine limfoidă, deoarece este puternic exprimat în aproape toate leucemiile limfocitare cronice (CLL) și limfoamele non-Hodgkin (NHL), precum și în multe alte diferite tipuri de leucemii, inclusiv leucemia limfocitară acută (ALL) și leucemia cu celule păroase (HCL).

25 Tafasitamabul (denumiri anterioare: MOR00208 și XmAb)<sup>®</sup>5574 este un anticorp monoclonal umanizat care țintește antigenul CD19, o proteină transmembranară implicată în semnalizarea receptorului celulei B. Tafasitamabul a fost modificat prin inginerie în regiunea Fc a IgG pentru a spori citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorp (ADCC), îmbunătățind astfel un mecanism cheie pentru uciderea celulelor tumorale și oferind potențial pentru o eficacitate îmbunătățită în comparație cu anticorpii convenționali, adică anticorpii neîmbunătățiți. Tafasitamabul a fost sau este studiat curent în mai multe studii clinice, cum ar fi în CLL, ALL și NHL. În unele dintre aceste studii, Tafasitamabul este utilizat în combinație cu Idelalisib, Lenalidomide sau Venetoclax.

În pofida descoperirilor și dezvoltărilor recente ale mai multor agenți anticancerigeni, din cauza prognosticului slab pentru multe tipuri de cancer, inclusiv tumorile care exprimă CD19, este încă nevoie de o metodă sau un agent terapeutic îmbunătățite pentru tratarea acestor tipuri de cancer. În consecință, prezenții inventatori au confirmat că administrarea combinată a celulelor T  $\gamma\delta$  și a unui anticorp sau fragment de anticorp specific pentru CD19 are efecte superioare asupra tratamentului limfoamelor maligne având ca origine celulele B și au realizat prezenta invenție.

40 Xu și colab. descriu o nouă platformă de anticorpi-TCR (AbTCR) care combină recunoașterea antigenului bazată pe Fab cu semnalizarea gamma/delta-TCR pentru a facilita citotoxicitatea celulelor T cu o eliberare scăzută de citokine (Cell Discovery, vol. 4, nr. 1, 20 noiembrie 2018).

**Rezumatul invenției**

45 Prezentă invenție furnizează un anticorp anti-CD19 pentru utilizarea în tratamentul unui cancer hematologic, în care anticorpul anti-CD19 cuprinde un lanț greu cu

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYN  
 DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGT  
 LTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAV  
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  
 50 GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 FNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE  
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
 WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SECV. ID NR.: 11) și un lanț ușor cu  
 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNS  
 55 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFP  
 PSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTL  
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SECV. ID NR.: 12), și în care anticorpul anti-  
 CD19 menționat este administrat în combinație cu celule T  $\gamma\delta$ .

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea în tratamentul unui cancer hematologic, în care respectivele celule T  $\gamma\delta$  menționate sunt administrate în combinație cu un anticorp anti-CD19 și în care anticorpul anti-CD19 cuprinde un lanț greu cu

EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYN  
 5 DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGL  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  
 GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 10 FNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPVYTLPPSRE  
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSR  
 WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SECV ID NR: 11) și un lanț ușor cu

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNS  
 GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFP  
 PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL  
 15 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SECV ID NR:12)

În acest document, termenii "variantă de realizare" și "variante de realizare" trebuie interpretați ca variantă(e) de realizare a(ale) invenției numai în măsura în care se încadrează în domeniul de aplicare al revendicărilor anexate. Referințele la metode de tratament al corpului uman sau animal prin intervenție  
 20 chirurgicală sau terapie sau la metode de administrare din acest document trebuie interpretate ca referințe la un anticorp anti-CD19 și/sau celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea în aceste metode.

Prezenta dezvoltare oferă o nouă combinație pentru utilizarea în tratamentul cancerului, cuprinzând un anticorp sau un fragment de anticorp specific pentru CD19 și celulele T  $\gamma\delta$ .

De la momentul descoperirii lor în anii 1980, a fost recunoscut între timp că celulele T  $\gamma\delta$  sunt  
 25 actori importanți în infecții și, de asemenea, în afecțiuni maligne cum ar fi cancerul. Celulele T  $\gamma\delta$  activate au capacități citotoxice puternice și ample de recunoaștere a tumorii, independent de prezența moleculelor complexului major de histocompatibilitate (MHC) pe celulele lor țintă. În plus, s-a arătat că celulele T  $\gamma\delta$  sunt mediatori puternici ai citotoxicității mediate de celule dependente de anticorpi (ADCC). În prezent, s-a arătat că efectul antitumoral al celulelor T  $\gamma\delta$  poate fi întărit substanțial de anticorpii anti-CD20  
 30 (Tokuyama și colab. 2008; Hoeres și colab. 2018). Mai mult, anticorpul anti-CD20 amplificat cu Fc, Obinutuzumab, prezintă o capacitate crescută de ucidere a celulelor tumorale în comparație cu anticorpii non-amplificați cu Fc, cum ar fi Rituximab, atunci când este combinat cu celule T  $\gamma\delta$ .

Cu toate acestea, activitatea de distrugere a celulelor tumorale a anticorpilor specifici pentru alte antigene de suprafață decât CD20 în prezența celulelor T  $\gamma\delta$  nu a fost încă evaluată. Prin urmare, obiectul prezentei dezvoltări este acela de a oferi o terapie combinată alternativă care cuprinde un anticorp și  
 35 celule T  $\gamma\delta$ .

Pentru a realiza obiectul de mai sus, prezenta dezvoltare oferă o combinație pentru utilizarea în tratamentul cancerului, care cuprinde un anticorp sau fragment de anticorp specific pentru CD19 și  
 40 celulele T  $\gamma\delta$ .

În prezenta dezvoltare, inventatorii au combinat celulele T  $\gamma\delta$  cu anticorpii care vizează CD19, Tafasitamab (ameliorat cu Fc) și Xmab5603 (neameliorat cu Fc), și au evaluat activitatea lor antitumorală în probe de CLL, MCL și B-ALL derivate de la pacient, precum și în diverse linii celulare de limfom și leucemie în teste ADCC. În total, s-a observat o rată crescută de liză celulară atunci când celulele T  $\gamma\delta$  au  
 45 fost combinate cu anticorpul anti-CD19 ameliorat cu Fc, Tafasitamab, în comparație cu Xmab5603 neameliorat cu Fc sau cu un anticorp IgG1 ca martor negativ.

În rezumat, este arătat că, celulele T  $\gamma\delta$  reprezintă o populație de celule potențial efectoare în terapia tumorală bazată pe anticorpi, așa cum s-a demonstrat în acest studiu în cazul anticorpului Tafasitamab, care vizează CD19 ameliorat cu Fc. Tafasitamabul a prezentat o activitate antitumorală puternică mediată de celulele T  $\gamma\delta$  împotriva mai multor linii celulare de limfom și leucemie, precum și  
 50 împotriva celulelor CLL, MCL și BALL derivate de la pacienți primari și ar putea reprezenta o abordare promițătoare pentru terapia limfomului și leucemiei.

Celulele T  $\gamma\delta$  pot fi derivate de la orice celulă T  $\gamma\delta$  autologă sau alogenă adecvată sau din populația acestora. În unele variante de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  adecvate pentru utilizarea ca sursă pentru celulele T  $\gamma\delta$  descrise în prezent includ celule V $\delta$ 1, celule V $\delta$ 2, celule V $\delta$ 3, celule V $\delta$ 5 și celule V $\delta$ 8. De  
 55 exemplu, sunt furnizate aici metode pentru separarea și extinderea celulelor V $\delta$ 1 de la un țesut non-

hematopoietic, cum ar fi pielea sau intestinul. De exemplu, celulele V $\delta$ 1 pot fi izolate din biopsii de piele umană, așa cum este descris în US2018/0312808.

În alte variante de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  adecvate pot fi derivate din sânge (de exemplu, sânge periferic). Metodele de izolare și extindere a celulelor V $\delta$ 1 din sânge le includ pe cele descrise, de exemplu, în Brevetul U.S. Nr. 9.499.788 și Publicația Internațională de Brevet Nr. WO2016/198480. De asemenea, celulele T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pot fi izolate din sânge periferic și cultivate ulterior ex vivo. Cultivarea celulelor T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 poate fi optimizată în prezență de IL-2 și de acid zoledronic (ZOL). Metodele de izolare și extindere a celulelor T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 din sânge le includ cele descrise, de exemplu, în Hoeres și colab. 2018.

În unele variante de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  adecvate pot fi derivate din țesut tumoral (de exemplu, celule T  $\gamma\delta$  care se infiltrează în tumoră). Alternativ, celulele T  $\gamma\delta$  adecvate care pot fi modificate prin inginerie pentru a exprima un construct de țintire heterologă pot fi derivate din țesut non-hematopoietic conform metodelor descrise mai jos. Aceste celule pot fi cultivate în prezența unuia sau mai multor factori (de exemplu, agonști de TCR, agonști co-receptori și/sau citokine, de exemplu, IL-4, IL-15 și/sau IFN-g) în punji de bioreactor permeabile la gaz timp de până la 21 de zile sau mai mult. Variații ale acestei metode și alte metode de obținere a celulelor T V $\delta$ 1 sunt adecvate ca parte a prezentei invenții. De exemplu, celulele T V $\delta$ 1 derivate din sânge pot fi obținute alternativ folosind unele metode descrise, de exemplu, în Publicațiile Internaționale de Brevet WO2017/197347 și WO2016/081518 (Publ. US Nr. 2016/0175338).

Prezența dezvoltării oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp sau un fragment de anticorp specific pentru CD19 și celule T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului.

Într-un aspect, prezenta dezvoltării oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp sau fragment de anticorp specific pentru CD19 și celulele T și gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o regiune HCDR1 care cuprinde secvența SYVMH (SECV ID NR: 1), o regiune HCDR2 care cuprinde secvența NPYNDG (SECV ID NR: 2), și o regiune HCDR3 care cuprinde secvența GTYYYGTRVFDY (SECV ID NR: 3) și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde secvența LCDR1 care cuprinde secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SECV ID NR: 4), o regiune LCDR2 care cuprinde secvența RMSNLNS (SECV ID NR: 5), și o regiune LCDR3 care cuprinde secvența MQHLEYPIT (SECV ID NR: 6) pentru utilizarea în tratamentul cancerului.

Într-un aspect, prezenta dezvoltării oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp sau fragment de anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o regiune HCDR1 a SYVMH (SECV ID NR: 1), o regiune HCDR2 a NPYNDG (SECV ID NR: 2), și o regiune HCDR3 a GTYYYGTRVFDY (SECV ID NR: 3) și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o regiune LCDR1 a RSSKSLQNVNGNTYLY (SECV ID NR: 4), o regiune LCDR2 a RMSNLNS (SECV ID NR: 5), și o regiune LCDR3 a MQHLEYPIT (SECV ID NR: 6) pentru utilizarea în tratamentul cancerului.

Într-un alt aspect al prezentei dezvoltării, anticorpul sau fragmentul de anticorp specific pentru CD19 cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cu

EVQLVESGGGLV $\text{KPGGSLKLS}$ CAASGYTFTSYVMHWWRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY  
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGTLVTVSS  
(SECV ID NR: 7)

și o regiune variabilă a lanțului ușor cu

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNS  
GVPDRFSGSGSGTEFTLTSSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SECV ID NR:8).

Într-un alt aspect, anticorpul sau fragmentul de anticorp specific pentru CD19 are funcție efectorie. Într-un alt aspect, anticorpul sau fragmentul de anticorp specific pentru CD19 are o funcție efectorie îmbunătățită. Într-o variantă de realizare, funcția efectorie este ADCC. Într-o variantă de realizare, anticorpul specific pentru CD19 are o activitate ADCC îmbunătățită. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde un domeniu Fc care cuprinde o substituție de aminoacid la poziția S239 și/sau I332, în care numerotarea este conform indexului EU, ca în Kabat.

Într-un alt aspect al prezentei dezvoltării, anticorpii sau fragmentul de anticorp specific pentru CD19 cuprinde o regiune constantă a lanțului greu cu

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSG  
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPDV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR  
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK (SECV ID NR: 9).

5

Într-un alt aspect al prezentei dezvoltării, anticorpii specific pentru CD19 cuprinde o regiune constantă a lanțului ușor cu

RTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SECV ID NR: 10).

10

Într-un alt aspect al prezentei dezvoltării, anticorpii specific pentru CD19 cuprinde o regiune constantă a lanțului greu cu

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS  
G LYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPDV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR  
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK (SECV ID NR: 9) și o regiune constantă a lanțului ușor cu

15

RTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SECV ID NR: 10).

20

Conform invenției, anticorpii specific pentru CD19 cuprinde o regiune a lanțului greu cu

EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGT  
KY NEKFQGRVTISDKSISTAYMELSSLRSEDTAMY YCARGTYYYGTRVFDYWGQGLTIVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSG  
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPDV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR  
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK (SECV ID NR: 11) și o regiune constantă a lanțului ușor cu

25

30

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNS  
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVEFIFP  
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTL  
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SECV ID NR: 12).

35

Într-un aspect, prezenta dezvoltare oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care celulele T  $\gamma\delta$  cuprind o populație îmbogățită de celule T  $\gamma\delta$ . Într-o variantă de realizare, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită cuprinde celule T  $\gamma\delta$  nemodificate prin inginerie sau modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora. Într-o altă variantă de realizare, prezenta dezvoltare oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită pentru utilizarea în tratamentul cancerului.

40

Într-un alt aspect, prezenta dezvoltare oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care celulele T  $\gamma\delta$  cuprind celule T  $\gamma\delta$  nemodificate prin inginerie sau modificate prin inginerie și/sau

amestecuri ale acestora. Într-o altă variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T  $\gamma\delta$  nemodificate prin inginerie. Într-o altă variantă realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T  $\gamma\delta$  modificate prin inginerie.

5 Într-un aspect, prezenta dezvoltare oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care celulele T  $\gamma\delta$  sunt izolate din sângele periferic, țesutul tumoral sau țesutul non-hematopoietic. Într-o variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt izolate din sânge periferic. Într-o altă variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T  $\gamma\delta$  izolate din sânge periferic. Într-o altă variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 izolate din sânge periferic. Într-o altă variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 izolate din sânge periferic, în care celulele T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 au fost cultivate ex vivo în prezență de IL-1 și de acid zoledronic (ZOL).

10 Într-un aspect, prezenta dezvoltare oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului în care cancerul este un cancer hematologic. Într-o variantă realizare, cancerul hematologic este leucemia limfocitară cronică (CLL), limfomul non-Hodgkin (NHL), limfomul limfocitar mic (SLL) sau leucemia limfoblastică acută (ALL). Într-o altă variantă de realizare, cancerul hematologic este limfomul non-Hodgkin (NHL). Într-o altă variantă de realizare, limfomul non-Hodgkin este selectat din grupul constând din limfom folicular, limfom limfocitar mic, țesut limfoid asociat mucoasei, limfom de zonă marginală, limfom difuz cu celule B mari, limfom Burkitt și limfom cu celule manta.

20 Într-un aspect, prezenta dezvoltare oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celule T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpul specific pentru CD19 și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate într-un mod separat.

25 Într-un aspect, prezenta dezvoltare oferă o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpul specific pentru CD19 și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate într-un mod simultan.

Într-un aspect, prezenta dezvoltare oferă un kit pentru utilizarea în tratamentul cancerului, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ).

### Scurtă descriere a desenelor

30 Figura 1: Teste ADCC reprezentative pentru MOR00208 la creșterea rapoartelor celulă efector-țintă (E:T). Rezultatele pentru uciderea specifică a celulelor, exprimate ca % de celule țintă moarte mediată de MOR00208 (negru) sau de martorul negativ IgG1 (alb) și de celulele T  $\gamma\delta$  de la donatori sănătoși, sunt prezentate pentru trei linii de celule țintă, Mino, Daudi și Jeko. Au fost testate patru rapoarte E:T diferite între 0,7:1 și 20:1.

35 Figura 2: Teste ADCC reprezentative pentru MOR00208 la creșterea rapoartelor celulă efector-țintă (E:T). Rezultatele pentru uciderea celulelor specifice, exprimate ca % de celule țintă moarte mediată de MOR00208 (negru) sau de martorul de IgG1 (alb) și de celulele T  $\gamma\delta$  de la donatori sănătoși, sunt prezentate pentru trei linii de celule țintă U2932 și REH. Au fost testate patru rapoarte E:T diferite între 0,7:1 și 20:1.

45 **Figura 3: Teste ADCC reprezentative ale MOR00208 la creșterea rapoartelor de celule efector-țintă (E:T) utilizând celule tumorale primare de la doi pacienți cu CLL și un pacient cu B-ALL ca celule țintă.** Rezultatele pentru uciderea celulelor specifice, exprimate ca % de celule țintă moarte mediate de MOR00208 (negru) sau de martorul de IgG1 (alb) și de celulele T  $\gamma\delta$  de la donatori sănătoși, sunt prezentate pentru trei experimente utilizând celule tumorale primare ca celule țintă. Au fost testate patru rapoarte diferite de E:T între 0,7:1 și 20:1.

50 **Figura 4: Teste ADCC reprezentative ale MOR00208 la creșterea rapoartelor de celule efector-țintă (E:T) utilizând celule tumorale primare de la doi pacienți cu MCL drept celule țintă.** Rezultatele pentru uciderea specifică a celulelor, exprimate ca % de celule țintă moarte mediate de MOR00208 (negru) sau de martorul de IgG1 (alb) și de celulele T  $\gamma\delta$  de la donatori sănătoși, sunt prezentate pentru trei experimente utilizând celule tumorale primare drept celule țintă. Au fost testate patru rapoarte diferite de E:T între 0,7:1 și 20:1.

55

### Definiții

Termenul "CD19" se referă la proteina cunoscută ca CD19, având următoarele sinonime: B4, antigenul CD19 al limfocitelor B, antigenul de suprafață B4 al limfocitelor B, CVID3, antigenul de diferențiere CD19, MGC12802 și antigenul de suprafață Leu-12al celulelor T.

CD19 uman are secvența de aminoacizi:

MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPF  
 LKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELF  
 RWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL  
 QSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMW  
 VMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLI  
 FCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLG  
 RAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPPEEEEEGEGYEEPDSSEEDSEFY  
 ENDSNLGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVRTMDFLSP  
 HGSAWDPREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGP  
 DPAWGGGGRMGTWSTR (SECV ID NR: 13).

5           **"MOR00208"** și **"XmAb 5574"** și **" tafasitamab"** sunt utilizate ca sinonime pentru anticorpul anti-CD19 conform Tabelului 1. Tabelul 1 furnizează secvențele de aminoacizi ale MOR00208/ tafasitamab. Anticorpul MOR00208 este descris în publicația de brevet US nr. 2010-027272). publicația de brevet US nr. 2010-027272) descrie anticorpul denumit 4G7 H1.52 Hybrid S239D/I332E/4G7 L1.155 (denumit ulterior MOR00208 și tafasitamab).

10           Termenul **"anticorp"** cum se utilizează aici, se referă la o proteină care cuprinde cel puțin două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături de disulfură, care interacționează cu un antigen. Fiecare lanț greu este format dintr-o regiune variabilă a lanțului greu (abreviată aici VH) și o regiune constantă a lanțului greu. Regiunea constantă a lanțului greu este formată din trei domenii, CH1, CH2 și CH3. Fiecare lanț ușor este format dintr-o regiune variabilă a lanțului ușor (abreviată aici VL) și o regiune constantă a lanțului ușor. Regiunea constantă a lanțului ușor este formată dintr-un domeniu, CL. Regiunile VH și VL pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, denumite regiuni de determinare a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni mai conservate, denumite regiuni cadru (FR). Fiecare VH și VL este compus din trei CDR-uri și patru FR-uri aranjate de la capătul amino terminal la capătul carboxi terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, 15 FR3, CDR3, și FR4. Regiunile variabile ale lanțurilor greu și ușor conțin un domeniu de legare care interacționează cu un antigen. Termenul "anticorp" include, de exemplu, anticorpi monoclonali, anticorpi umani, anticorpi umanizați, anticorpi camelizați și anticorpi himerici. Anticorpii pot fi de orice izotip (de exemplu, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA și IgY), clasă (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 și IgA2) sau subclasă. Atât lanțurile ușor, cât și cel greu sunt împărțite în regiuni de omologie structurală și 25 funcțională.

          Expresia **"fragment de anticorp"**, Așa cum se utilizează aici, se referă la una sau mai multe porțiuni ale unui anticorp care își păstrează capacitatea de a interacționa specific (de exemplu, prin legare, împiedicare sterică, stabilizare a distribuției spațiale) cu un antigen. Exemple de fragmente de legare 30 includ, dar nu se limitează la, un fragment Fab, un fragment monovalent care constă din domeniile VL, VH, CL și CH1; un fragment F(ab)<sub>2</sub>, un fragment bivalent care constă din două fragmente Fab legate printr-o punte de disulfură la regiunea balama; un fragment Fd care constă din domeniile VH și CH1; un fragment Fv care constă din domeniile VL și VH ale unui singur braț al unui anticorp; un fragment dAb (Ward și colab., (1989) Nature 341:544-546), care constă dintr-un domeniu VH; și o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR). În plus, deși cele două domenii ale fragmentului Fv, VL și VH, 35 sunt codificate de gene separate, acestea pot fi unite, folosind metode recombinante, printr-un linker sintetic care permite ca acestea să fie făcute ca un singur lanț proteic în care regiunile VL și VH se împerechează pentru a forma molecule monovalente (cunoscute sub numele de Fv cu un singur lanț (scFv); vezi de exemplu, Bird și colab., (1988) Science 242:423-426; și Huston și colab., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Astfel de anticorpi cu un singur lanț sunt, de asemenea, destinați să fie 40 incluși în termenul "fragment de anticorp". Aceste fragmente de anticorpi sunt obținute folosind tehnici convenționale cunoscute de cei de specialitate în domeniu, și fragmentele sunt supuse unui screening în ceea ce privește utilitatea în același mod ca și anticorpii intacti. Fragmentele de anticorpi pot fi, de asemenea, încorporate în anticorpi cu un singur domeniu, maxicorpi, minicorpi, intracorpi, diacorpi, triacorpi, tetracorpi, v-NAR și bis-scFv (vezi, de exemplu, Hollinger and Hudson, (2005) Nature 45 Biotechnology 23:1126-1136). Fragmentele de anticorpi pot fi grefate în schele bazate pe polipeptide

precum Fibronectina de tip III (Fn3) (vezi U.S. Pat. No. 6,703,199, care descrie monocorpi polipeptidici de fibronectină). Fragmentele de anticorpi pot fi încorporate în molecule cu un singur lanț care cuprind o pereche de segmente Fv în tandem (VH-CH1-VH-CH1) care, împreună cu polipeptidele complementare ale lanțului ușor, formează o pereche de situsuri de legare a antigenului (Zapata și colab., (1995) Protein Eng. 8:1057-1062; și Brev U.S. Nr. 5.641.870).

"Administrat" sau "administrare" include, dar nu se limitează la, livrarea unui medicament printr-o formă injectabilă, cum ar fi, de exemplu, o cale intravenoasă, intramusculară, intradermică sau subcutanată sau o cale mucoasă, de exemplu, sub formă de spray nazal sau aerosol pentru inhalare sau sub formă de soluție, capsulă sau tabletă ingerabile. De preferință, administrarea este printr-o formă injectabilă.

Termenul "funcție efectoră" se referă la acele activități biologice atribuibile regiunii Fc a unui anticorp, care variază în funcție de izotipul anticorpului. Exemple nelimitative de funcții efectoră ale anticorpilor includ legarea C1q și citotoxicitatea dependentă de complement (CDC); legarea receptorului Fc și citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorp (ADCC) și/sau fagocitoza celulară dependentă de anticorp (ADCP); reglarea în jos a receptorilor de suprafață celulară (de exemplu, receptorul celei B); și activarea celei B.

"Citotoxicitate mediată de celule dependentă de anticorp" sau "ADCC" se referă la o formă de citotoxicitate în care anticorpii legați la receptorii Fc (FcR-uri) prezenți pe anumite celule citotoxice (de exemplu, celule NK, neutrofile și macrofage) le permit acestor celule efectoră citotoxice să se lege specific de o celulă țintă purtătoare de antigen și ulterior să omoare celula țintă cu citotoxine. Celulele primare pentru medierea ADCC, celulele NK, exprimă numai FcγRIII, în timp ce monocitele exprimă FcγRI, FcγRII, și FcγRIII.

"Citotoxicitate dependentă de complement" sau "CDC" se referă la liza unei celule țintă în prezența complementului. Activarea căii clasice a complementului este inițiată prin legarea primei componente a sistemului complementului (C1q) la anticorpii (din subclasa corespunzătoare) din prezenta dezvoltare, care sunt legați de antigenul lor înrudit.

"Fagocitoză celulară dependentă de anticorp" sau "ADCP" se referă la un mecanism de eliminare a celulelor țintă acoperite cu anticorpi prin internalizarea de către celulele fagocitare, cum ar fi macrofagele sau celulele dendritice.

Termenul "cancer hematologic" include tumori transmise prin sânge și boli sau tulburări care implică creșterea și/sau proliferarea anormală a celulelor în țesuturile de origine hematopoietică, cum ar fi limfoame, leucemii și mieloame.

Linfomul non-Hodgkin ("NHL") este o malignitate eterogenă care își are originea în limfocite. În Statele Unite (SUA), 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 apărea la toate vârstele, debutul uzual începe la adulții peste 40 de ani, incidența crescând odată cu vârsta. NHL se caracterizează printr-o proliferare clonală a limfocitelor care se acumulează în ganglionii limfatici, sânge, măduvă osoasă și splină, deși orice organ major poate fi implicat. Sistemul de clasificare curent utilizat de patologi și clinicieni este cel al World Health Organization (WHO) Classification of Tumours, care organizează NHL în neoplasme cu celule B sau T precursorare și mature. PDQ împarte curent NHL-ul în indolent sau agresiv pentru includerea în studii clinice. Grupul NHL indolent este compus în principal din subtipuri foliculare, limfom limfocitar mic, MALT (țesut limfoid asociat mucoasei) și zonă marginală; Indolentul cuprinde aproximativ 50% dintre pacienții cu NHL cu celule B nou diagnosticați. NHL-ul agresiv include pacienți cu diagnostice histologice de limfom cu celule B mari difuz în principal (DLBL, "DLBCL", sau DLCL) (40% dintre toți pacienții nou diagnosticați au cancer difuz cu celule mari), boală Burkitt și boală cu celule de mantă ("MCL"). Evoluția clinică a NHL are o variabilitate ridicată. Un factor determinant major al evoluției clinice este subtipul histologic. Majoritatea tipurilor de NHL indolent sunt considerate a fi boli incurabile. Pacienții răspund inițial fie la chimioterapie, fie la terapia cu anticorpi, și majoritatea vor recidiva. Studiile de până acum nu au demonstrat o îmbunătățire a supraviețuirii odată cu o intervenție timpurie. La pacienții asimptomatici, este acceptabil să "observăm și să așteptăm" până când pacientul devine simptomatic sau ritmul bolii pare să se accelereze. În timp, boala se poate transforma într-o histologie mai agresivă. Supraviețuirea mediană este de 8 la 10 ani, și pacienții indolenți primesc adesea 3 sau mai multe tratamente în timpul fazei de tratament a bolii lor. Tratamentul inițial al pacientului cu NHL indolent simptomatic a fost, istoric, chimioterapia combinată. Agenții cei mai frecvent utilizați includ: ciclofosamidă, vincristină și prednisonă (CVP); sau ciclofosamidă, adriamicină, vincristină, prednisonă (CHOP). Aproximativ 70% la 80% dintre pacienți vor răspunde la chimioterapia inițială, durata remisiunilor fiind de ordinul a 2-3 ani. În cele din urmă, majoritatea pacienților recidivează. Descoperirea și utilizarea clinică a anticorpului anti-CD20, rituximab, au adus îmbunătățiri semnificative în ceea ce privește răspunsul și rata de supraviețuire. Standardul curent de

îngrijire pentru majoritatea pacienților este rituximab + CHOP (R-CHOP) sau rituximab + CVP (R-CVP). Terapia cu rituximab s-a dovedit a fi eficientă în mai multe tipuri de NHL și este în prezent aprobată ca tratament de primă linie atât pentru NHL indolent (limfom folicular), cât și pentru NHL agresiv (limfom difuz cu celule B mari). Cu toate acestea, există limitări semnificative ale anticorpului monoclonal (mAb) anti-CD20, inclusiv rezistența primară (răspuns de 50% la pacienții indolenți recidivați), rezistența dobândită (rata de răspuns de 50% la re-tratament), răspunsul complet rar (rata de răspuns complet de 2% la populația recidivată) și un model continuu de recidivă. În cele din urmă, multe celule B nu exprimă CD20 și, prin urmare, multe tulburări ale celulelor B nu pot fi tratate folosind terapia cu anticorp anti-CD20.

În plus față de NHL, există mai multe tipuri de leucemii care rezultă din disreglarea celulelor B. Leucemia limfocitară cronică (cunoscută și sub numele de "leucemie limfoidă cronică" sau "**CLL**"), este un tip de leucemie la adulți cauzată de o acumulare anormală de limfocite B. În CLL, limfocitele maligne pot părea normale și mature, dar nu sunt capabile să facă față eficient infecției. CLL este cea mai frecventă formă de leucemie la adulți. Bărbații au o probabilitate de două ori mai mare de a dezvolta CLL decât femeile. Cu toate acestea, factorul cheie de risc este vârsta. Peste 75% din cazurile noi sunt diagnosticate la pacienții cu vârsta peste 50 de ani. Peste 10.000 de cazuri sunt diagnosticate în fiecare an, și mortalitatea este de aproape 5.000 pe an (American Cancer Society, 2006; și SEER Cancer Statistics Review). CLL este o boală incurabilă, dar progresează lent în majoritatea cazurilor. Multe persoane cu CLL duc o viață normală și activă timp de mulți ani. Din cauza debutului său lent, CLL în stadiu incipient nu este, în general, tratată, deoarece se crede că intervenția timpurie pentru CLL nu îmbunătățește timpul de supraviețuire sau calitatea vieții. În schimb, afecțiunea este monitorizată în timp. Tratamentele inițiale pentru CLL variază în funcție de diagnosticul exact și de progresia bolii. Există zeci de agenți utilizați pentru terapia CLL. Regimurile de chimioterapie combinată, cum ar fi FCR (fludarabină, ciclofosfamidă și rituximab) și BR (ibrutinib și rituximab) sunt eficiente atât în cazul CLL nou diagnosticată, cât și în cazul celor recidivate. Transplantul alogen de măduvă osoasă (celule stem) este rareori utilizat ca tratament de primă linie pentru CLL din cauza riscului acestuia.

Un alt tip de leucemie este limfomul limfocitar mic ("**SLL**") care este considerată o variantă de CLL căreia îi lipsește limfocitoza clonală necesară pentru diagnosticul de CLL, dar care în rest prezintă caracteristici patologice și imunofenotipice comune (Campo și colab., 2011). Definiția SLL necesită prezența limfadenopatiei și/sau a splenomegaliei. Mai mult, numărul de limfocite B din sângele periferic nu trebuie să depășească  $5 \times 10^9/L$ . În SLL, diagnosticul trebuie confirmat prin evaluarea histopatologică a unei biopsii ganglionare limfatice ori de câte ori este posibil (Hallek și colab., 2008). Incidența SLL este de aproximativ 25% din cazurile de CLL în SUA (Dores și colab., 2007).

Un alt tip de leucemie este leucemia limfoblastică acută (**ALL**), cunoscută și sub numele de leucemie limfocitară acută. ALL se caracterizează prin supraproducția și multiplicarea continuă a celulelor albe maligne și imature (cunoscute și sub numele de limfoblaste) în măduva osoasă. "Acută" se referă la starea nediferențiată, imatură a limfocitelor circulante ("blaste") și la faptul că boala progresează rapid, cu o speranță de viață de săptămâni până la luni dacă nu este tratată. ALL este cel mai frecvent în copilărie, cu o incidență maximă la vârsta de 4-5 ani. Copiii cu vârste cuprinse între 12-16 ani mor mai ușor din cauza acesteia decât alții. În prezent, cel puțin 80% din cazurile de ALL din copilărie sunt considerate vindecabile. Sub 4.000 de cazuri sunt diagnosticate în fiecare an, și mortalitatea este de aproape 1.500 pe an (American Cancer Society, 2006; și SEER Cancer Statistics Review).

"**Subiect**" sau "**pacient**" așa cum este utilizat în acest context se referă la orice mamifer, inclusiv rozătoare, cum ar fi șoarece sau șobolan, și primate, cum ar fi maimuța cynomolgus (*Macaca fascicularis*), maimuță rhesus (*Macaca mulatta*) sau oameni (*Homo sapiens*). De preferință, subiectul sau pacientul este o primată, cel mai preferabil un pacient uman, chiar mai preferabil un pacient uman adult.

Termenii "**modificat prin inginerie**" sau "**modificat**" așa cum se utilizează aici, includ manipularea acizilor nucleici sau a polipeptidelor prin mijloace sintetice (de exemplu, prin tehnici recombinante, sinteza in vitro a peptidelor, prin cuplarea enzimatică sau chimică a peptidelor sau o anumită combinație a acestor tehnici). De preferință, anticorpii sau fragmentele de anticorpi conform prezentei dezvoltării sunt modificate prin inginerie sau modificate pentru a îmbunătăți una sau mai multe proprietăți, cum ar fi legarea antigenului, stabilitatea, timpul de înjumătățire, funcția efectoare, imunogenitatea, siguranța și altele asemenea. De preferință, anticorpii sau fragmentele de anticorpi conform prezentei dezvoltării sunt modificate prin inginerie sau modificate pentru a îmbunătăți funcția efectoare, cum ar fi ADCC.

"**Regiune Fc**" se utilizează pentru a defini regiunea C-terminală a unui lanț greu de imunoglobulină. Regiunea Fc a unei imunoglobuline cuprinde în general două domenii constante, un domeniu CH2 și un domeniu CH3. Cu excepția cazului în care este specificat altfel în acest document, numerotarea resturilor de aminoacizi din regiunea Fc se face conform sistemului de numerotare EU,

denumit și index EU, așa cum este descris în Kabat și colab., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Anticorpul care este administrat conform prezentei dezvoltări îi este administrat pacientului într-o cantitate eficientă terapeutic. O "**cantitate eficientă terapeutic**" se referă la o cantitate suficientă pentru a oferi o oarecare ameliorare a manifestărilor clinice ale unei boli sau tulburări date. Cantitatea care este eficientă pentru un anumit scop terapeutic va depinde de severitatea bolii sau a leziunii, precum și de greutatea și starea generală a subiectului. Se va înțelege că determinarea unei dozări adecvate poate fi realizată, folosind experimente de rutină, prin construirea unei matrice de valori și testarea diferitelor puncte din matrice, toate acestea fiind în sfera de competență obișnuită a unui cercetător medic sau clinician instruit.

Termenii "**combinație**" sau "**combinație farmaceutică**" se referă la administrarea unei terapii în plus față de o altă terapie. Ca atare, "**în combinație cu**" include administrarea simultană (de exemplu, concurrentă) și consecutivă în orice ordine. Cu titlu de exemplu nelimitativ, o primă terapie (de exemplu, un agent, cum ar fi un anticorp anti-CD19) poate fi administrată înainte (de exemplu, 1 minut, 15 minute, 30 minute, 45 minute, 1 oră, 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore, 6 ore, 7 ore, 8 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 96 ore, 1 săptămână, 2 săptămâni, 3 săptămâni, 4 săptămâni, 5 săptămâni, 6 săptămâni, 8 săptămâni, 8 săptămâni, 9 săptămâni, 10 săptămâni, 11 săptămâni, sau 12 săptămâni), concomitent sau după (de exemplu, 1 minut, 15 minute, 30 minute, 45 minute, 1 oră, 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore, 6 ore, 7 ore, 8 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 96 ore, 1 săptămână, 2 săptămâni, 3 săptămâni, 4 săptămâni, 5 săptămâni, 6 săptămâni, 7 săptămâni, 8 săptămâni, 9 săptămâni, 10 săptămâni, 11 săptămâni, or 12 săptămâni sau mai mult) administrarea unei a doua terapii (de exemplu, un agent farmaceutic, cum ar fi **celule T  $\gamma\delta$** ) unui pacient.

Termenul "**celule T  $\gamma\delta$  (celule T gamma delta)**" așa cum se utilizează aici, se referă la un subset de celule T care exprimă un receptor distinct al celulelor T (TCR),  $\gamma\delta$ TCR, pe suprafața lor, compus dintr-un lanț  $\gamma$  și un lanț  $\delta$ . Termenul "**celule T  $\gamma\delta$** " include în mod specific toate subseturile de celule T  $\gamma\delta$ , inclusiv, fără limitare, celulele T  $\nu\delta 1$ ,  $\nu\delta 2$ ,  $\nu\delta 3$  și  $V\gamma 9V\delta 2$ , precum și celulele T  $\gamma\delta$  naive, cu memorie efectorie, cu memorie centrală și diferențiate terminal. Ca un alt exemplu, termenul "**celule T  $\gamma\delta$** " include celulele T  $\nu\delta 4$ ,  $\nu\delta 5$ ,  $\nu\delta 7$ , și  $\nu\delta 8$ .

Așa cum se utilizează aici, termenul "**limfocită T**" sau "**celula T**" se referă la o celulă imună care exprimă CD3 (CD3+) și un receptor al celulelor T (TCR+). Celulele T joacă un rol central în imunitatea mediată celular.

Așa cum se utilizează aici, termenul "**TCR**" sau "**receptor al celulelor T**" se referă la o proteină de semnalizare heterologă dimerică de pe suprafața celulară, care formează un receptor alfa-beta sau gamma-delta.  $\alpha\beta$ TCR recunosc un antigen prezentat de o moleculă MHC, în timp ce  $\gamma\delta$ TCR recunosc un antigen independent de prezentarea MHC.

Așa cum se utilizează aici, termenul "**populație de celule**" se referă la un număr de celule. O populație de celule poate fi, de exemplu, o populație de celule mixtă derivată dintr-o probă de sânge periferic, o probă de sânge din cordonul ombilical, o tumoră, un precursor de celulă stem, o biopsie tumorală, un țesut, o limfă sau din situsuri epiteliale ale unui subiect care intră în contact direct cu mediul extern sau derivată din celule stem precursoare. Alternativ, populația de celule mixtă poate fi derivată din culturi in vitro de celule de mamifere, stabilite dintr-o probă de sânge periferic, o probă de sânge din cordonul ombilical, o tumoră, un precursor de celule stem, o biopsie tumorală, un țesut, o limfă sau din situsuri epiteliale ale unui subiect care intră în contact direct cu mediul extern sau derivată din celule precursoare stem.

O populație sau preparat de celule "**îmbogățit**" se referă la o populație de celule derivată de la o populație de celule mixtă inițială care conține un procent mai mare dintr-un anumit tip de celulă decât procentul aceluși tip de celulă din populația inițială. De exemplu, o populație de celule mixtă inițială poate fi îmbogățită în ceea ce privește o populație specifică de celule T  $\gamma\delta$ . În toate variantele de realizare, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită conține un procent mai mic de populații de celule T  $\alpha\beta$ .

Prin "**extins**" așa cum se utilizează aici se înțelege că numărul de celule dorite sau țintă (de exemplu, celule T  $\delta 1$ ,  $\delta 2$  și/sau celule T  $V\gamma 9V\delta 2$ ) din preparatul îmbogățit este mai mare decât numărul din populația de celule inițială sau de pornire.

## Descrierea detaliată a invenției

55

### Anticorpi anti-CD19

Utilizarea unui anticorp CD19 în limfoamele cu celule B nespecifice este discutată în WO2007076950 (US2007154473). Utilizarea unui anticorp CD19 în CLL, NHL și ALL este descrisă în

Scheuermann și colab., CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy, Leukemia and Lymphoma, Vol. 18, 385-397 (1995).

Anticorpi suplimentari specifici pentru CD19 sunt descriși în WO2005012493 (US7109304), WO2010053716 (US12/266.999) (Immunomedics); WO2007002223 (US US8097703) (Medarex);  
5 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 WO2012156455 (Sanofi).

10 O compoziție farmaceutică include un agent activ, de exemplu un anticorp pentru utilizarea terapeutică la oameni. O compoziție farmaceutică poate include în plus purtători sau excipienți acceptabili farmaceutic.

Doza de anticorp sau fragment de anticorp conținută într-o compoziție farmaceutică conform prezentei dezvoltării, administrată unui pacient, poate varia în funcție de vârsta și mărimea pacientului, simptome, afecțiuni, cale de administrare și altele asemenea. Doza este calculată tipic în funcție de greutatea corporală sau suprafața corporală, vârsta sau per individ. În funcție de severitatea afecțiunii, frecvența și durata tratamentului pot fi ajustate. Dozele eficiente și schemele de administrare a compozițiilor farmaceutice care cuprind anticorpi sau fragmente de anticorpi specifice pentru CD19 pot fi determinate empiric; de exemplu, progresul pacientului poate fi monitorizat prin evaluare periodică, și  
15 doza poate fi ajustată în consecință. Mai mult, scalarea interspecifică a dozelor poate fi efectuată prin folosirea unor metode bine cunoscute în domeniu (de exemplu, Mordenti și colab., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Compoziția farmaceutică poate include forme de dozare pentru injecții intravenoase, subcutanate, intracutanate și intramusculare etc. Aceste preparate injectabile pot fi preparate prin metode cunoscute. De exemplu, preparatele injectabile pot fi preparate, de exemplu, prin dizolvarea, suspendarea sau emulsionarea anticorpului sau a sării acestuia descrise mai sus într-un mediu apos steril sau un mediu uleios utilizat în mod convențional pentru injecții. Compoziții farmaceutice exemplare care cuprind un anticorp sau un fragment de anticorp specific pentru CD19 și care pot fi utilizate în contextul prezentei dezvoltării, sunt dezvoltate, de exemplu, în WO2008/022152 sau WO2018/002031.

În anumite căi de administrare, de exemplu, administrarea intravenoasă, se preferă administrarea medicamentului în funcție de greutatea corporală a pacientului. În alte căi de administrare, de exemplu, administrarea subcutanată, se preferă administrarea medicamentului într-o doză fixă, stabilită. Persoana de specialitate este conștientă de acea doză pentru o cale de administrare care este echivalentă cu o altă doză pentru o altă cale de administrare. Farmacodinamica unui medicament specific este luată în  
25 considerare, tipic, într-o decizie justificată de a administra un medicament într-o formă cerută și într-o doză eficientă cerută.

Anticorpul care este administrat conform prezentei dezvoltării este administrat unui pacient într-o cantitate eficientă terapeutică. O "cantitate eficientă terapeutică" se referă la o cantitate suficientă pentru a vindeca, ameliora sau opri parțial manifestările clinice ale unei anumite boli sau tulburări, adică NHL, și complicațiile acesteia. În anumite variante de realizare, anticorpii conform prezentei dezvoltării sunt administrați la 9 mg/kg. În variante de realizare alternative, anticorpii conform prezentei dezvoltării sunt administrați la 12 mg/kg. În alte variante de realizare, anticorpii conform prezentei dezvoltării sunt administrați la 15 mg/kg sau mai mult.

Anticorpul conform prezentei dezvoltării poate fi administrat în momente diferite de timp, și  
45 ciclul de tratament poate avea o lungime diferită. Anticorpii pot fi administrați zilnic, o dată la două zile, de trei ori pe săptămână, săptămânal sau la două săptămâni. Anticorpii pot fi, de asemenea, administrați timp de cel puțin patru săptămâni, timp de cel puțin cinci săptămâni, timp de cel puțin șase săptămâni, timp de cel puțin șapte săptămâni, timp de cel puțin opt săptămâni, timp de cel puțin nouă săptămâni, timp de cel puțin zece săptămâni, timp de cel puțin unsprezece săptămâni sau timp de cel puțin douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare ale prezentei dezvoltării, anticorpul este administrat cel puțin o dată pe săptămână, timp de cel puțin opt săptămâni.

## 55 Izolarea și expansiunea celulelor T $\gamma\delta$ din sânge

În unele variante de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  din prezenta dezvoltării sunt derivate din sângele unui subiect (de exemplu, sângele periferic). De exemplu, celulele T  $\gamma\delta$  pot fi derivate din celule V $\delta$ 2 derivate din sânge sau celule V $\delta$ 1 derivate din sânge. Într-un alt exemplu, celulele T  $\gamma\delta$  pot fi derivate din celule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 derivate din sânge. Celulele T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pot fi izolate din sângele periferic și cultivate în

continuare ex vivo. Cultivarea celulelor T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 poate fi optimizată în prezență de IL-2 și de acid zoledronic (ZOL). Metodele de izolare și expansiune a celulelor T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 din sânge le includ pe cele descrise, de exemplu, în Hoeres și colab. 2018 sau următoarea procedură:

Expansiunea ex vivo a celulelor T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 derivate din sânge periferic:

5 Sângele periferic este recoltat de la donatori. Celulele mononucleare din sângele periferale (PBMC) sunt izolate imediat prin centrifugare în gradient de densitate folosind Lymphoprep™ (Axis Shield, Norvegia) conform instrucțiunilor producătorului. PBMC-urile trebuie resuspendate la  $1 \times 10^6$ /mL în CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion SFM (Life Technologies, Australia) suplimentat cu OpTmizer™  
10 Supliment de expansiune a celulelor T (diluție 1:38) (Life Technologies, Australia), FBS inactivat termic 10% (HI-FBS), penicilină 100 UI/mL, streptomycină 100  $\mu$ g/mL, L-glutamină 2 mmol (Life Technologies, Australia), HEPES 25 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% (Sigma-Aldrich, SUA), interleukină 2 umană recombinantă (rhIL-2) 100 UI/mL (BD Pharmingen, SUA) și activate cu 5  $\mu$ M ZOL și înșămânțate în plăci cu 6 godeuri. Densitatea culturilor de celule trebuie menținută la  $1-2 \times 10^6$  celule/mL și completate cu mediu proaspăt conținând numai 100 IU/mL rhIL-2 (fără ZOL) la fiecare 2-3 zile. După  
15 7-8 zile de cultură, celulele au fost colectate și îmbogățite așa cum este descris mai jos.

Îmbogățirea celulelor T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2:

20 Celulele T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 cu expansiune ex vivo sunt îmbogățite folosind MACS cu selecție negativă cu kitul de izolare a celulelor T TCR  $\gamma/\delta$ + (uman) (Miltenyi Biotec, Germania). Viabilitatea celulelor și numărul total de celule după îmbogățire sunt evaluate folosind excluderea cu albastru de tripan. Procentul de celule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 este determinat prin citometrie în flux folosind anti-CD3 conjugat cu PeCy5 (clonă UCHT1) (eBioscience, San Diego, CA, SUA) și anti-V $\gamma$ 9 TCR conjugat cu FITC de la BD Biosciences (San Jose, CA, SUA). Procentul de celule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 este identificat prin activarea populației de limfocite folosind împrăștiere înainte/împrăștierea laterală, apoi pe celulele V $\gamma$ 9+ CD3+ dublu pozitive.

25 În unele variante de realizare, celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC-uri) pot fi obținute de la un subiect conform oricărei metode adecvate cunoscute în domeniu. PBMC-urile pot fi cultivate în prezența aminobisfosfonaților (de exemplu, acid zoledronic), a fosfoantigenelor sintetice (de exemplu, pirofosfat de bromhidrină; BrHPP), 2M3B1PP sau 2-metil-3-butenil-1-pirofosfat în prezență de IL-2 timp de una până la două săptămâni pentru a genera o populație îmbogățită de celule V $\delta$ 2. Alternativ, anti-TCR  $\gamma/\delta$  imobilizat (de exemplu, pan TCR  $\gamma/\delta$ ) poate induce expansiunea preferențială a celulelor V $\delta$ 2 dintr-o populație de PBMC-uri în prezență de IL-2, de exemplu, timp de aproximativ 14 zile. În unele variante de realizare, expansiunea preferențială a celulelor V $\delta$ 2 din PBMC-uri poate fi realizată prin cultivarea anticorpilor anti-CD3 imobilizați (de exemplu, OKT3) în prezență de IL-2 și IL-4. În unele variante de realizare, cultura menționată anterior este menținută timp de aproximativ șapte zile înainte de subcultura în anti-CD3, IL-2 și IL-4 solubile. Alternativ, se pot utiliza celule prezentatoare de  
35 antigen artificiale pentru a promova expansiunea preferențială a celulelor T  $\gamma/\delta$ , cum ar fi celulele V $\delta$ 2. De exemplu, celulele T  $\gamma/\delta$  derivate din PBMC, cultivate în prezență de aAPC, IL-2 și/sau IL-21 iradiate, se pot extinde pentru a genera o populație de celule T  $\gamma/\delta$ , inclusiv o proporție mare de celule V $\delta$ 2, o proporție moderată de celule V $\delta$ 1 și unele celule dublu negative. În unele variante de realizare ale metodelor menționate anterior, PBMC-urile pot fi pre-îmbogățite sau post-îmbogățite (de exemplu, prin selecție pozitivă cu agenți specifici de TCR $\gamma$  sau selecție negativă a agenților specifici de TCRA). Astfel de metode și alte metode adecvate pentru expansiunea celulelor T  $\gamma/\delta$ , cum ar fi celulele V $\delta$ 2, sunt descrise în detaliu de Deniger și colab., *Frontiers in Immunology* 2014, 5, 636: 1 -10. Moreover, Almeida și colab. ( *Clinical Cancer Research* 2016, 22, 23; 5795-5805), care oferă metode adecvate de obținere a unei populații de celule T V $\delta$ 1 care pot fi modificate prin inginerie pentru a exprima un construct de  
45 direcționare heterologă descris aici. De exemplu, în unele variante de realizare, PBMC-urile sunt pre-îmbogățite folosind sortarea cu mărele magnetice, ceea ce poate produce peste 90% celule T  $\gamma/\delta$ .

#### **Separarea și expansiunea celulelor T $\gamma/\delta$ rezidente în țesutul non-hematopoietic din țesutul non-hematopoietic**

50 Celulele T  $\gamma/\delta$  rezidente în țesutul non-hematopoietic obținute așa cum este descris aici prezintă capacități bune de penetrare și retenție tumorală. Metode mai detaliate pentru izolarea și expansiunea celulelor T  $\gamma/\delta$  rezidente în țesutul non-hematopoietic pot fi găsite, de exemplu, în Cererea GB Nr. 1707048.3 (WO2018/202808) și în Publicația Internațională de Brevet nr. WO 2017/072367 (Publ. US Nr. 2018/0312808).

55 Celulele T  $\gamma/\delta$  rezidente în țesutul non-hematopoietic (de exemplu, celulele T  $\gamma/\delta$  derivate din piele și/sau celulele T non-V $\delta$ 2, de exemplu, celulele T V $\delta$ 1 și/sau celulele T DN) pot fi izolate din orice țesut non-hematopoietic uman sau de animal non-uman care poate fi prelevat de la un pacient pentru a obține celule adecvate pentru conceperea prin inginerie conform metodelor prezentei invenții. În unele variante de realizare, țesutul non-hematopoietic din care sunt derivate și expandate celulele T  $\gamma/\delta$  este

pielea (de exemplu, pielea umană), care poate fi obținută prin metode cunoscute în domeniu. În unele variante de realizare, pielea este obținută prin biopsie cu punch. Alternativ, metodele de izolare și expansiune a celulelor T  $\gamma\delta$  furnizate aici pot fi aplicate tractului gastrointestinal (de exemplu, colonului), glandei mamare, plămânului, prostatei, ficatului, splinei și pancreasului. Celulele T  $\gamma\delta$  pot fi, de asemenea, rezidente în țesuturile canceroase umane, de exemplu, tumori ale sânului sau prostatei. În unele variante de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  pot proveni din țesuturi canceroase umane (de exemplu, țesuturi tumorale solide). În alte variante de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  pot proveni din țesut non-hematopoietic, altul decât țesutul canceros uman (de exemplu, un țesut fără un număr substanțial de celule tumorale). De exemplu, celulele T  $\gamma\delta$  pot proveni dintr-o regiune a pielii (de exemplu, piele sănătoasă) separată de un țesut canceros din apropiere sau adiacent.

Celulele T  $\gamma\delta$  care sunt dominante în sânge sunt în principal celule T V $\delta$ 2, în timp ce celulele T  $\gamma\delta$  care sunt dominante în țesuturile non-hematopoietice sunt în principal celule T V $\delta$ 1, astfel încât celulele T V $\delta$ 1 includ aproximativ 70-80% din populația de celule T  $\gamma\delta$  rezidente în țesutul non-hematopoietic. Cu toate acestea, unele celule T V $\delta$ 2 se găsesc și în țesuturile non-hematopoietice, de exemplu în intestin, unde pot include aproximativ 10-20% din celulele T  $\gamma\delta$ . Unele celule T  $\gamma\delta$  rezidente în țesuturile non-hematopoietice nu exprimă nici TCR V $\delta$ 1, nici V $\delta$ 2 și le-am denumit celule T  $\gamma\delta$  dublu negative (DN). Este probabil ca aceste celule T  $\gamma\delta$  DN să exprime în cea mai mare parte V $\delta$ 3, cu o minoritate de celule T exprimând V $\delta$ 5. Prin urmare, celulele T  $\gamma\delta$  care se sunt rezidente în mod obișnuit în țesuturile non-hematopoietice și care sunt extinse prin metoda conform invenției sunt de preferință celule T non-V $\delta$ 2, de exemplu celule T V $\delta$ 1, cu includerea unei cantități mai mici de celule T  $\gamma\delta$  DN.

În general, celulele T  $\gamma\delta$  rezidente în țesutul non-hematopoietic sunt capabile să se extindă spontan la îndepărtarea contactului fizic cu celulele stromale (de exemplu, fibroblaste cutanate). Astfel, metodele de cultură bazate pe schele descrise mai sus pot fi utilizate pentru a induce o astfel de separare, rezultând o derepresie a celulelor T  $\gamma\delta$  pentru a declanșa expansiunea. În consecință, în unele variante de realizare, nu este prezentă nicio activare substanțială a căii TCR în timpul etapei de expansiune (de exemplu, nu sunt incluși în cultură activatori exogeni ai căii TCR). În plus, invenția oferă metode de extindere a celulelor T  $\gamma\delta$  rezidente în țesutul non-hematopoietic, în care metodele nu implică contactul cu celule hrănitore, celule tumorale și/sau celule prezentatoare de antigen.

### Metode de tratament

Compozițiile farmaceutice care conțin o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, nemodificate prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, așa cum sunt descrise aici, pot fi administrate pentru tratamente profilactice și/sau terapeutice. În aplicațiile terapeutice, compozițiile pot fi administrate unui subiect care suferă deja de o boală sau afecțiune, într-o cantitate suficientă pentru a vindeca sau cel puțin a opri parțial simptomele bolii sau afecțiunii. O populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, care nu sunt modificate prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora pot fi, de asemenea, administrate pentru a reduce probabilitatea de a dezvolta, contracta sau agrava o afecțiune. Cantitățile eficiente dintr-o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, care nu sunt modificate prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, pentru utilizarea terapeutică, pot varia în funcție de severitatea și evoluția bolii sau afecțiunii, terapia anterioară, starea de sănătate a subiectului, greutatea și/sau răspunsul la medicamente și/sau de raționamentul medicului curant.

O populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, nemodificate prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, conform dezvoltării, poate fi utilizată pentru a trata un subiect care necesită tratament pentru o afecțiune.

O metodă de tratare a unei afecțiuni la un subiect cu o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită și un anticorp sau fragment de anticorp specific pentru CD19 conform prezentei dezvoltării poate cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente terapeutic dintr-o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, care nu sunt modificate prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora. O populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită și/sau amestecuri ale acestora, conform dezvoltării, poate fi administrată în diferite regimuri (de exemplu, în funcție de moment, concentrație, dozaj, intervalul dintre tratamente și/sau formulare). Un subiect poate fi, de asemenea, preconditionat, de exemplu, cu chimioterapie, radiații sau o combinație a ambelor, înainte de a primi o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită și/sau amestecuri ale acestora, conform dezvoltării. Ca parte a unui tratament, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, care nu sunt modificate prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora pot fi administrate unui subiect ca un prim regim, și subiectul poate fi monitorizat pentru a se determina dacă tratamentul conform primului regim atinge un anumit nivel de eficacitate terapeutică.

O populație îmbogățită cu celule T  $\gamma\delta$ , adică care nu sunt modificate prin inginerie sau sunt modificate prin inginerie, și/sau amestecuri ale acestora, conform dezvoltării, pot fi utilizate pentru a trata diverse afecțiuni. În unele cazuri, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, nemodificată prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificată prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, conform dezvoltării, pot fi utilizate pentru a trata un cancer, inclusiv tumori solide și cancer hematologic.

#### Metode de administrare

Una sau mai multe populații de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, nemodificate prin inginerie, populații de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, conform invenției, pot fi administrate unui subiect în orice ordine sau simultan. Dacă sunt simultane, populația multiplă de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, nemodificată prin inginerie, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificată prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, conform invenției, pot fi furnizate într-o singură formă unificată, cum ar fi o injecție intravenoasă, sau în multiple forme, de exemplu, ca perfuzii intravenoase multiple, s.c., injecții sau pilule. Populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, nemodificată prin inginerie, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificată prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, conform invenției, pot fi împachetate împreună sau separat, într-un singur pachet sau într-o pluralitate de pachete. Una sau toate populațiile de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, nemodificată prin inginerie, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, modificată prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, conform invenției, pot fi date în doze multiple. Dacă nu este simultan, intervalul de timp dintre dozele multiple poate varia până la aproximativ o săptămână, o lună, două luni, trei luni, patru luni, cinci luni, șase luni sau aproximativ un an. În unele cazuri, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, nemodificată prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificată prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, conform invenției, se pot extinde în corpul unui subiect, in vivo, după administrarea la un subiect. Populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, nemodificată prin inginerie, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, modificată prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora pot fi congelate pentru a furniza celule pentru tratamente multiple cu același preparat de celule. Populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, nemodificată prin inginerie, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, modificată prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, conform dezvoltării, și compozițiile farmaceutice care le cuprind, pot fi împachetate ca un kit. Un kit poate include instrucțiuni (de exemplu, instrucțiuni scrise) privind utilizarea populației de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, nemodificată prin inginerie, a populației de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, modificată prin inginerie și/sau a amestecurilor acestora, precum și a compozițiilor care le cuprind.

În unele cazuri, o metodă de tratare a unui cancer cuprinde administrarea la un subiect a unei cantități eficiente terapeutic dintr-o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, care nu sunt modificate prin inginerie, o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora, în care administrarea tratează cancerul. În unele variante de realizare, cantitatea eficientă terapeutic din populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, care nu sunt modificate prin inginerie, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora este administrată timp de cel puțin aproximativ 10 secunde, 30 de secunde, 1 minut, 10 minute, 30 de minute, 1 oră, 2 ore, 3 ore, 4 ore, 5 ore, 8 ore, 12 ore, 24 de ore, 2 zile, 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile, 1 săptămână, 2 săptămâni, 3 săptămâni, 1 lună, 2 luni, 3 luni, 4 luni, 5 luni, 6 luni sau 1 an. În unele variante de realizare, cantitatea eficientă terapeutic din populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, care nu sunt modificate prin inginerie, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora este administrată timp de cel puțin o săptămână. În unele variante de realizare, cantitatea eficientă terapeutic din populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, care nu sunt modificate prin inginerie, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățite, modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora este administrată timp de cel puțin două săptămâni.

#### Variante de realizare

Prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp sau un fragment de anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului.

Într-un aspect, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care celulele T  $\gamma\delta$  cuprind o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită. Într-o variantă de realizare, populația de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită cuprinde celule T  $\gamma\delta$  care nu sunt modificate prin inginerie sau modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora. Într-o altă variantă de realizare, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită pentru utilizarea în tratamentul cancerului.

Într-un alt aspect, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul

cancerului, în care celulele T  $\gamma\delta$  cuprind celule T  $\gamma\delta$  care nu sunt modificate prin inginerie sau modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora. Într-o altă variantă realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T  $\gamma\delta$  care nu sunt modificate prin inginerie. Într-o altă variantă realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T  $\gamma\delta$  modificate prin inginerie.

5 Într-un aspect, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care celulele T  $\gamma\delta$  sunt izolate din sângele periferic, țesutul tumoral sau țesutul non-hematopoietic. Într-o variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt izolate din sânge periferic. Într-o altă variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T  $\gamma\delta$  izolate din sânge periferic.

10 Într-un aspect, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celule T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului în care cancerul este un cancer hematologic. Într-o variantă realizare, cancerul hematologic este leucemia limfocitară cronică (CLL), limfomul non-Hodgkin (NHL), limfomul limfocitar mic (SLL) sau leucemia limfoblastică acută (ALL). Într-o altă variantă realizare, cancerul hematologic este limfomul non-Hodgkin (NHL). Într-o altă variantă realizare, limfomul non-Hodgkin este selectat din grupul care constă din limfom folicular, limfom limfocitar mic, țesut limfoid asociat mucoasei, limfom de zonă marginală, limfom difuz cu celule B mari, limfom Burkitt și limfom cu celule de manta.

15 În anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celule T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpul specific pentru CD19 menționat este administrat la 9 mg/kg. În variante de realizare alternative, anticorpul specific pentru CD19 este administrat la 12 mg/kg. În alte variante de realizare, la 15 mg/kg sau mai mult.

20 În anumite variante de realizare, anticorpul specific pentru CD19 are o activitate citotoxică. În unele variante de realizare, anticorpul specific pentru CD19 cuprinde o regiune constantă având activitate de inducere a ADCC. În unele variante de realizare, anticorpul specific pentru CD19 induce ADCC.

25 În anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celule T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care componentele combinației, anticorpul sau fragmentul de anticorp specific pentru CD19 și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate separat. Într-o variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate înainte de administrarea anticorpului specific pentru CD19. Într-o variantă de realizare, anticorpul specific pentru CD19 este administrat înainte de administrarea celulelor T  $\gamma\delta$ . În unele variante de realizare, componentele combinației sunt administrate într-un moment în care ambele componente (medicamente) sunt active la pacient în același timp. "Sinergism" implică faptul că ambele medicamente sunt active la pacient în același timp. În unele variante de realizare, componentele combinației sunt administrate împreună, simultan, separat sau ulterior, fie fizic, fie în timp. În unele variantele de realizare, componentele combinației sunt administrate simultan.

30 În anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T și  $\gamma\delta$  pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpul anti-CD19 este administrat săptămânal, la două săptămâni sau lunar.

35 În anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpul specific pentru CD19 menționat este administrat într-o concentrație de 12 mg/kg.

40 În anumite variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp specific pentru CD19 și celulele T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpul specific pentru CD19 menționat este administrat săptămânal, la două săptămâni sau lunar după o primă administrare în Ziua 1 și în care inhibitorul de BCL-2 este administrat pentru prima dată în Ziua 8. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul anti-CD19 sau fragmentul de anticorp al acestuia, după o primă administrare în Ziua 1, este administrat săptămânal timp de primele 3 luni și la două săptămâni timp de cel puțin următoarele 3 luni.

45 Într-un aspect, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp anti-CD19 sau un fragment de anticorp al acestuia pentru utilizarea în tratamentul pacienților cu cancer hematologic, în care pacientul cu cancer hematologic menționat are limfom non-Hodgkin și în care anticorpul anti-CD19 sau fragmentul de anticorp al acestuia menționat este administrat în combinație cu celule T  $\gamma\delta$ .

50 Într-un aspect, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp anti-CD19 sau un fragment de anticorp al acestuia pentru utilizarea în tratamentul pacienților cu cancer hematologic, în care pacientul cu cancer hematologic menționat are limfom non-Hodgkin și în care anticorpul anti-CD19 sau fragmentul de anticorp al acestuia menționat este administrat în combinație cu celule T  $\gamma\delta$ . Într-o variantă de realizare, pacientul cu cancer hematologic are limfom non-Hodgkin, în care limfomul non-Hodgkin este selectat din

grupul care constă din limfom folicular, limfom limfocitar mic, țesut limfoid asociat mucoasei, limfom de zonă marginală, limfom difuz cu celule B mari, limfom Burkitt și limfom cu celule de manta.

5 Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-CD19 al acesteia, destinat utilizării în tratamentul pacienților cu cancer hematologic în combinație cu celule T  $\gamma\delta$ , cuprinde o regiune HCDR1 regiune care cuprinde secvența SYVMH (SECV ID NR: 1), o regiune HCDR2 care cuprinde secvența NPYNDG (SECV ID NR: 2), o regiune HCDR3 care cuprinde secvența GTYYYGTRVFDY (SECV ID NR: 3), o regiune LCDR1 care cuprinde secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SECV ID NR: 4), o regiune LCDR2 care cuprinde secvența RMSNLNS (SECV ID NR: 5), și o regiune LCDR3 care cuprinde secvența MQHLEYPIT (SECV ID NR: 6).

10 Într-o altă variantă de realizare, anticorpus anti-CD19 al acesteia, destinat utilizării în tratamentul pacienților cu cancer hematologic în combinație cu celule T  $\gamma\delta$ , cuprinde un lanț greu variabil cu secvența

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWWRQAPGKGLEWIGYINPYN  
DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW  
GQGLTVTVSS (SECV ID NR: 7).

15 și un lanț ușor variabil cu secvența

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM  
SNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK  
(SECV ID NR: 8).

20 În unele cazuri, anticorpus anti-CD19 sau fragmentul de anticorpus al acestuia este un anticorpus sau fragment de anticorpus uman, umanizat sau himeric. În unele cazuri, anticorpus anti-CD19 sau fragmentul de anticorpus al acestuia este de izotip IgG. În unele cazuri, anticorpus sau fragmentul de anticorpus este IgG1, IgG2 sau IgG1/IgG2 himeric. Într-o altă variantă de realizare a prezentei dezvoltării, izotipul anticorpusului anti-CD19 este modificat prin inginerie pentru a spori citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorpus. Într-o altă variantă realizare, regiunea constantă a lanțului greu a anticorpusului anti-CD19 cuprinde aminoacizii 239D și 332E, în care numerotarea Fc este conform indicelui EU, ca în Kabat. În unele cazuri, anticorpus este IgG1, IgG2 sau IgG1/IgG2, și regiunea constantă a lanțului greu himerică a anticorpusului anti-CD19 cuprinde aminoacizii 239D și 332E, în care numerotarea Fc este conform indicelui EU, ca în Kabat.

30 Într-o altă variantă de realizare, anticorpus anti-CD19 pentru utilizare în tratamentul pacienților cu cancer hematologic în combinație cu celule T  $\gamma\delta$  cuprinde un lanț greu având secvența

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWWRQAPGKGLEWIGYINPYN  
DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW  
GQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC  
DKTHTCPPCPAPPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVELTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP  
EEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLS  
LSPGK (SECV ID NR: 11).

35 și un lanț ușor având secvența

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM  
SNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
(SECV ID NR: 12).

5 În unele cazuri, anticorpul anti-CD19 sau fragmentul de anticorp al acestuia pentru utilizarea în  
tratamentul pacienților cu cancer hematologic în combinație cu celule T  $\gamma\delta$  cuprinde un lanț greu variabil  
cu secvența

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYN  
DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW  
QGGLTLTVSS (SECV ID NR: 7)

și un lanț ușor variabil cu secvența

10

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM  
SNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK  
(SECV ID NR: 8)

sau un lanț greu variabil și un lanț ușor variabil care are cel puțin 80%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel  
puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate cu lanțul greu variabil cu SECV ID  
NR: 7 și cu lanțul ușor variabil cu SECV ID NR: 8.

15

În unele cazuri, anticorpul anti-CD19 sau fragmentul de anticorp al acestuia pentru utilizarea în  
tratamentul pacienților cu cancer hematologic în combinație cu celule T  $\gamma\delta$  cuprinde un lanț greu variabil  
cu secvența

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYN  
DGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYW  
QGGLTLTVSS (SECV ID NR: 7)

20

și un lanț ușor variabil cu secvența

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM  
SNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK  
(SECV ID NR: 8)

25

sau un lanț greu variabil și un lanț ușor variabil care are cel puțin 80%, cel puțin 90%, cel puțin  
95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate cu lanțul greu variabil cu  
SECV ID NR: 7 și cu lanțul ușor variabil cu SECV ID NR: 8, în care anticorpul anti-CD19 cuprinde o  
regiune HCDR1 care cuprinde secvența SYVMH (SECV ID NR: 1), o regiune HCDR2 care cuprinde  
secvența NPYNDG (SECV ID NR: 2), o regiune HCDR3 care cuprinde secvența GTYYYGTRVFDY  
(SECV ID NR: 3), o regiune LCDR1 care cuprinde secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SECV ID NR:  
30 4), o regiune LCDR2 care cuprinde secvența RMSNLNS (SECV ID NR: 5), și o regiune LCDR3 care  
cuprinde secvența MQHLEYPIT (SECV ID NR: 6). Într-o altă variantă de realizare, regiunea lanțului  
greu al anticorpului anti-CD19 cuprinde aminoacizii 239D și 332E, în care numerotarea Fc este conform  
indicelui EU, ca în Kabat.

35

În unele cazuri, anticorpul anti-CD19 sau fragmentul de anticorp al acestuia pentru utilizarea în  
tratamentul pacienților cu cancer hematologic în combinație cu celule T  $\gamma\delta$  cuprinde un lanț greu având  
secvența

EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLKLS<sup>CA</sup>ASGYTFTSYVMHW<sup>R</sup>QAPGKGLEWIGYIN<sup>P</sup>YN  
DGTKYNEKFQGRVTIS<sup>SD</sup>KSISTAYMELSSLRSEDTAMY<sup>Y</sup>CARGT<sup>Y</sup>YYGTRVFD<sup>Y</sup>W  
GQGT<sup>L</sup>TVSSASTK<sup>G</sup>PSV<sup>F</sup>PLAPSSKSTSGGTAALGCLV<sup>K</sup>DYFPEPVT<sup>S</sup>WNSGAL  
TSGVHT<sup>F</sup>PAVLQSSGLY<sup>S</sup>LSSV<sup>V</sup>TPSSSLGTQTYICNV<sup>N</sup>HKPSNTK<sup>V</sup>DKKVEPKSC  
DKTHTCPPCPAPELLGGPDV<sup>F</sup>LP<sup>F</sup>PKPKDTLMISRTPEV<sup>T</sup>CVVVDVSHEDPEV<sup>Q</sup>FN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV<sup>S</sup>VLTVVH<sup>Q</sup>DWLN<sup>G</sup>KEYKCKV<sup>S</sup>NKALPAP  
EEKTISKTKGQPREPQVY<sup>T</sup>LPPSREEMTKN<sup>Q</sup>VSLTCLV<sup>K</sup>GFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYK<sup>T</sup>TPMLDSDGSFFLYSKLTV<sup>D</sup>KSRWQ<sup>Q</sup>GNV<sup>F</sup>SCSVMHEALHNHYTQ<sup>K</sup>SLS  
LSPGK (SECV ID NR: 11)

și un lanț ușor având secvența

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM  
SNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<sup>V</sup>CLLN<sup>F</sup>YPREAKV<sup>Q</sup>WKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSK<sup>D</sup>STYLSSTLTLSKADY<sup>E</sup>KHKV<sup>Y</sup>ACEV<sup>T</sup>HQGLSSPVT<sup>K</sup>SFNRGEC  
(SECV ID NR: 12)

5

sau un lanț greu și un lanț ușor care are cel puțin 80%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate cu lanțul greu cu SECV ID NR: 7 și cu lanțul ușor cu SECV ID NR: 8.

10

În unele cazuri, anticorpus anti-CD19 sau fragmentul de anticorpus al acestuia pentru utilizarea în tratamentul pacienților cu cancer hematologic în combinație cu celule T  $\gamma\delta$  cuprinde un lanț greu având secvența

EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLKLS<sup>CA</sup>ASGYTFTSYVMHW<sup>R</sup>QAPGKGLEWIGYIN<sup>P</sup>YN  
DGTKYNEKFQGRVTIS<sup>SD</sup>KSISTAYMELSSLRSEDTAMY<sup>Y</sup>CARGT<sup>Y</sup>YYGTRVFD<sup>Y</sup>W  
GQGT<sup>L</sup>TVSSASTK<sup>G</sup>PSV<sup>F</sup>PLAPSSKSTSGGTAALGCLV<sup>K</sup>DYFPEPVT<sup>S</sup>WNSGAL  
TSGVHT<sup>F</sup>PAVLQSSGLY<sup>S</sup>LSSV<sup>V</sup>TPSSSLGTQTYICNV<sup>N</sup>HKPSNTK<sup>V</sup>DKKVEPKSC  
DKTHTCPPCPAPELLGGPDV<sup>F</sup>LP<sup>F</sup>PKPKDTLMISRTPEV<sup>T</sup>CVVVDVSHEDPEV<sup>Q</sup>FN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV<sup>S</sup>VLTVVH<sup>Q</sup>DWLN<sup>G</sup>KEYKCKV<sup>S</sup>NKALPAP  
EEKTISKTKGQPREPQVY<sup>T</sup>LPPSREEMTKN<sup>Q</sup>VSLTCLV<sup>K</sup>GFYPSDIAVEWESNGQP  
ENNYK<sup>T</sup>TPMLDSDGSFFLYSKLTV<sup>D</sup>KSRWQ<sup>Q</sup>GNV<sup>F</sup>SCSVMHEALHNHYTQ<sup>K</sup>SLS  
LSPGK (SECV ID NR: 11)

15

și un lanț ușor având secvența

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM  
SNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<sup>V</sup>CLLN<sup>F</sup>YPREAKV<sup>Q</sup>WKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSK<sup>D</sup>STYLSSTLTLSKADY<sup>E</sup>KHKV<sup>Y</sup>ACEV<sup>T</sup>HQGLSSPVT<sup>K</sup>SFNRGEC  
(SECV ID NR: 12)

20

sau un lanț greu și un lanț ușor care are cel puțin 80%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identitate cu lanțul greu cu SECV ID NR: 7 și cu lanțul ușor

cu SECV ID NR: 8 și în care anticorpii anti-CD19 cuprind o regiune HCDR1 care cuprinde secvența SYVMH (SECV ID NR: 1), o regiune HCDR2 care cuprinde secvența NPYNDG (SECV ID NR: 2), o regiune HCDR3 care cuprinde secvența GTYYYYGTRVFDY (SECV ID NR: 3), o regiune LCDR1 care cuprinde secvența RSSKSLQNVNGNTYLY (SECV ID NR: 4), o regiune LCDR2 care cuprinde secvența RMSNLNS (SECV ID NR: 5), și o regiune LCDR3 care cuprinde secvența MQHLEYIPIT (SECV ID NR: 6). Într-o altă variantă de realizare, regiunea lanțului greu al anticorpului anti-CD19 cuprinde aminoacizii 239D și 332E, în care numerotarea Fc este conform indicelui EU, ca în Kabat.

Într-o variantă de realizare, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp anti-CD19 în care anticorpii anti-CD19 menționați sunt administrați într-o concentrație de 12 mg/kg.

Într-o altă variantă de realizare, anticorpii anti-CD19 sunt administrați săptămânal, la fiecare două săptămâni sau lunar. Într-o altă variantă de realizare, anticorpii anti-CD19 sunt administrați săptămânal pentru primele 3 luni și la fiecare două săptămâni cel puțin pentru următoarele 3 luni. Într-o altă variantă de realizare, anticorpii anti-CD19 sunt administrați săptămânal pentru primele 3 luni. Într-o altă variantă de realizare, anticorpii anti-CD19 sunt administrați săptămânal pentru primele 3 luni și la fiecare două săptămâni cel puțin pentru următoarele 3 luni. Încă într-o altă variantă de realizare, anticorpii anti-CD19 sunt administrați săptămânal pentru primele 3 luni, la fiecare două săptămâni pentru următoarele 3 luni și lunar ulterior. Într-o altă variantă de realizare, anticorpii anti-CD19 sunt administrați săptămânal timp de primele 3 luni, la fiecare două săptămâni pentru următoarele 3 luni și lunar după aceea.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment de anticorp specific pentru CD19 pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpii sau fragmentul de anticorp specific pentru CD19 menționați sunt administrați în combinație cu celule T  $\gamma\delta$ . Într-o variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt izolate din sânge periferic, țesutul tumoral sau țesutul non-hematopoietic. Într-o variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt izolate din sânge periferic. Într-o altă variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T  $\gamma\delta$  izolate din sânge periferic. Într-o altă variantă de realizare, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T  $\gamma\delta$  izolate din sânge periferic și cultivate în prezența IL-2 și ZOL. Într-un alt exemplu, celulele T  $\gamma\delta$  sunt o populație de celule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 derivate din sânge.

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp sau fragment de anticorp specific pentru CD19 pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care anticorpii sau fragmentul de anticorp specific pentru CD19 menționați sunt administrați în combinație cu celule T  $\gamma\delta$ , etapa de administrare fiind efectuată prin administrarea anticorpului specific pentru CD19 și a celulelor T  $\gamma\delta$  în combinație, într-un mod simultan, în ordine sau în ordine inversă.

Prezenta dezvoltare furnizează o combinație farmaceutică, care cuprinde un anticorp sau un fragment de anticorp specific pentru CD19 și celulele T gamma delta (celule T  $\gamma\delta$ ) pentru utilizarea în tratamentul cancerului, în care celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate într-o cantitate eficientă terapeutică. În unele variante de realizare, o cantitate eficientă terapeutică de limfocite (de exemplu, celule T  $\gamma\delta$ ) obținută prin oricare dintre metodele descrise mai sus poate fi administrată într-o cantitate eficientă terapeutică la un subiect (de exemplu, pentru tratamentul cancerului, cum ar fi cancerul hematologic). În unele cazuri, cantitatea eficientă terapeutică de limfocite (de exemplu, celule T  $\gamma\delta$ ) este mai puțin de  $10 \times 10^{12}$  celule per doză (de exemplu, mai puțin de  $9 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $8 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $7 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $6 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $5 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $4 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $3 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $2 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $1 \times 10^{12}$  celule per doză, mai puțin de  $9 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $8 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $7 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $6 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $5 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $4 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $3 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $2 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $1 \times 10^{11}$  celule per doză, mai puțin de  $9 \times 10^{10}$  celule per doză, mai puțin de  $7,5 \times 10^{10}$  celule per doză, mai puțin de  $5 \times 10^{10}$  celule per doză, mai puțin de  $2,5 \times 10^{10}$  celule per doză, mai puțin de  $1 \times 10^{10}$  celule per doză, mai puțin de  $7,5 \times 10^9$  celule per doză, mai puțin de  $5 \times 10^9$  celule per doză, mai puțin de  $2,5 \times 10^9$  celule per doză, mai puțin de  $1 \times 10^9$  celule per doză, mai puțin de  $7,5 \times 10^8$  celule per doză, mai puțin de  $5 \times 10^8$  celule per doză, mai puțin de  $2,5 \times 10^8$  celule per doză, mai puțin de  $1 \times 10^8$  celule per doză, mai puțin de  $7,5 \times 10^7$  celule per doză, mai puțin de  $5 \times 10^7$  celule per doză, mai puțin de  $2,5 \times 10^7$  celule per doză, mai puțin de  $1 \times 10^7$  celule per doză, mai puțin de  $7,5 \times 10^6$  celule per doză, mai puțin de  $5 \times 10^6$  celule per doză, mai puțin de  $2,5 \times 10^6$  celule per doză, mai puțin de  $1 \times 10^6$  celule per doză, mai puțin de  $7,5 \times 10^5$  celule per doză, mai puțin de  $5 \times 10^5$  celule per doză, mai puțin de  $2,5 \times 10^5$  celule per doză, or mai puțin de  $1 \times 10^5$  celule per doză).

În unele variante de realizare, cantitatea eficientă terapeutică de celule T  $\gamma\delta$  (de exemplu, celule T  $\gamma\delta$  derivate din piele, celule T  $\gamma\delta$  derivate din sânge) este mai puțin de  $10 \times 10^{12}$  celule pe parcursul tratamentului (de exemplu, mai puțin de  $9 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $8 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $7 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $6 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $4 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $3 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $2 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $1 \times 10^{12}$  celule, mai puțin de  $9 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $8 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $7 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $6 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $4 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $3 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $2 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $1 \times 10^{11}$  celule).

puțin de  $8 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $7 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $6 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $4 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $3 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $2 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $1 \times 10^{11}$  celule, mai puțin de  $9 \times 10^{10}$  celule, mai puțin de  $7,5 \times 10^{10}$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^{10}$  celule, mai puțin de  $2,5 \times 10^{10}$  celule, mai puțin de  $1 \times 10^{10}$  celule, mai puțin de  $7,5 \times 10^9$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^9$  celule, mai puțin de  $2,5 \times 10^9$  celule, mai puțin de  $1 \times 10^9$  celule, mai puțin de  $7,5 \times 10^8$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^8$  celule, mai puțin de  $2,5 \times 10^8$  celule, mai puțin de  $1 \times 10^8$  celule, mai puțin de  $7,5 \times 10^7$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^7$  celule, mai puțin de  $2,5 \times 10^7$  celule, mai puțin de  $1 \times 10^7$  celule, mai puțin de  $7,5 \times 10^6$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^6$  celule, mai puțin de  $2,5 \times 10^6$  celule, mai puțin de  $1 \times 10^6$  celule, mai puțin de  $7,5 \times 10^5$  celule, mai puțin de  $5 \times 10^5$  celule, mai puțin de  $2,5 \times 10^5$  celule, sau mai puțin de  $1 \times 10^5$  celule pe parcursul tratamentului).

În unele variante de realizare, o doză de celule T  $\gamma\delta$  așa cum este descrisă aici include aproximativ  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , sau  $5 \times 10^8$  celule/kg. În unele variante de realizare, o doză de celule T  $\gamma\delta$  așa cum este descrisă aici include cel puțin  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , sau  $5 \times 10^8$  celule/kg. În unele variante de realizare, o doză de celule T  $\gamma\delta$  așa cum este descrisă aici include până la  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , sau  $5 \times 10^8$  celule/kg.

### Combinatii

Prezenta dezvoltare furnizează un anticorp anti-CD19 sau un fragment de anticorp al acestuia în combinație cu celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea în tratamentul cancerului hematologic, în care anticorpul anti-CD19 sau fragmentul de anticorp al acestuia menționat și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate în combinație cu unul sau mai mulți agenți farmaceutici. Într-o variantă de realizare a prezentei dezvoltări, anticorpul anti-CD19 și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate în combinație cu un agent farmaceutic. Într-o altă variantă de realizare a prezentei dezvoltări, anticorpul anti-CD19 și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate în combinație cu unul sau mai mulți agenți farmaceutici suplimentari sau cu un agent farmaceutic suplimentar. Într-un aspect, agentul farmaceutic menționat este un agent farmaceutic suplimentar. Într-o variantă de realizare a prezentei dezvoltări, agentul farmaceutic menționat este un agent biologic sau chimioterapeutic. Într-o altă variantă de realizare a prezentei dezvoltări, agentul farmaceutic menționat este un anticorp sau un fragment de anticorp terapeutic, un muștar de azot, un analog de purină, un analog de talidomidă, un inhibitor de fosfoinozimid 3-kinază, un inhibitor de BCL-2 sau un inhibitor de tirozin kinază Bruton (BTK). Într-o altă variantă de realizare, agentul farmaceutic menționat este rituximab, R-CHOP, ciclofosfamidă, clorambucil, uramustină, ifosfamidă, melfalan, bendamustină, mercaptopurină, azatioprină, tioguanină, fludarabină, talidomidă, lenalidomidă, pomalidomidă, idelalisib, duvelisib, copanlisib, ibrutinib sau venetoclax.

Într-o altă variantă de realizare, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp anti-CD19 și celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea în tratamentul cancerului hematologic, în care anticorpul anti-CD19 sau fragmentul de anticorp al acestuia menționat și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate în combinație cu rituximab, R-CHOP, ciclofosfamidă, clorambucil, uramustină, ifosfamidă, melfalan, bendamustină, mercaptopurină, azatioprină, tioguanină, fludarabină, talidomidă, lenalidomidă, pomalidomidă, idelalisib, duvelisib, copanlisib, ibrutinib sau venetoclax.

### Secvențe de anticorpi

45 Tabelul 1:

	SECV ID NR:	Aminoacizi
HCDR1	SECV ID NR: 1	SYVMH
HCDR2	SECV ID NR: 2	NPYNDG
HCDR3	SECV ID NR: 3	GTYYYYGTRVFDY
LCDR1	SECV ID NR: 4	RSSKSLQNVNGNTYLY
LCDR2	SECV ID NR: 5	RMSNLNS
LCDR3	SECV ID NR: 6	MQHLEYPIT
VH	SECV ID NR: 7	

	SECV ID NR:	Aminoacizi
		EVQLVESGGGLVHPGGSGLKLSCAASGYFTFSY VMHWRQAPGKLEWIGYINPYNDGTYNEK FQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYC ARGTYYYGTRVFDYWG QGTLTVSS
VL	SECV ID NR: 8	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNV NGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGV PDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQ HLEYPITFGAGTKLEIK
Domeniu constant al lanțului greu	SECV ID NR: 9	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK
Domeniu constant al lanțului ușor	SECV ID NR: 10	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
Lanț greu întreg	SECV ID NR: 11	EVQLVESGGGLVHPGGSGLKLSCAASGYFTFSY VMHWRQAPGKLEWIGYINPYNDGTYNEK FQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYC ARGTYYYGTRVFDYWGQGTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS CDKHTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNHYTQK SLSLSPGK
Lanț ușor întreg	SECV ID NR: 12	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNV NGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNSGV PDRFSGSGSGTEFTLTISLEPEDFAVYYCMQ HLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

### Exemple de lucru

#### Exemplul 1: Caracterizarea exprimării CD19 și CD20 pe liniile de celule testate

5

Acest studiu a fost efectuat pentru a se evalua activitatea citotoxică a anticorpului anti-CD19 ameliorat cu Fc tafasitamab (MOR00208), mediată de celulele T  $\gamma\delta$  de la diferiți donatori pe linii celulare

de limfom și leucemie, precum și pe un material tumoral primar derivat de la pacienți cu CLL (leucemie limfocitară cronică), MCL (limfom cu celule manta) și B-ALL (leucemie limfoblastică acută). În plus, a fost evaluată activitatea citotoxică mediată de celule dependentă de anticorpi a Tafasitamabului în prezența celulelor T  $\gamma\delta$ .

5 Diferite linii de celule de limfom și leucemie, precum și celule tumorale primare derivate de la pacienți cu limfom și leucemie, au fost evaluate într-un test de citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorpi (ADCC) cu diferite concentrații de tafasitamab și un anticorp martor negativ IgG1. Celulele T  $\gamma\delta$  au fost izolate de la șapte donatori diferiți și au fost utilizate drept celule efectoare la diferite rapoarte între celulele efectoare și cele țintă (rapoarte E:T 0,7:1, 2,2:1, 6,7:1 și 20:1).

#### 10 **Analiza materialelor, metodelor și datelor**

##### **Celule T $\gamma\delta$ :**

15 Celulele T  $\gamma\delta$  exprimă lanțurile variabile V $\gamma$  și V $\delta$  ca parte a unui complex de receptori ai celulelor T (TCR) care este structural și funcțional distinct de TCR-ul de legare a complexului major de histocompatibilitate (MHC) al celulelor T  $\alpha\beta$ . În pofida diversității combinatorii nerestricționate și ridicate, lanțul V $\delta$ 2 este preferențial împerecheat cu lanțul V $\gamma$ 9. Celulele T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 reprezintă aproximativ 5% din celulele T din sângele periferic, reprezentând subpopulația dominantă de celule T  $\gamma\delta$  din acest compartiment. Celulele T  $\gamma\delta$  de la 7 donatori diferiți au fost izolate, stimulate și aplicate așa cum este listat în continuare:

Donator	Caracteristici	Test
1	d10 după stimularea cu Zoledronat/IL2, <b>TCR<math>\gamma\delta</math>pos/CD3+:36,5%</b> , TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+: 57,0%, CD56+/CD3-: 0,5%	Titrarea dozei cu celule Jeko
2	d10 după stimularea cu Zoledronat/IL2: <b>TCR<math>\gamma\delta</math>pos/CD3+: 84,8%</b> , TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+: 11,7%, CD56+/CD3-: 1,2%	Titrarea dozei cu celule U2932
3	d9 după stimularea cu Zoledronat/IL2, <b>TCR<math>\gamma\delta</math>pos/CD3+: 46,0%</b> , TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+: 47,0%, CD56+/CD3-: 1,75%	Titrarea dozei cu celule Jeko
4	d9 după stimularea cu Zoledronat/IL2, <b>TCR<math>\gamma\delta</math>pos/CD3+: 60,8%</b> , TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+:12,6%, CD56+/CD3-: 1,4%	Linii de celule de citotoxicitate
5	d9 după stimularea cu Zoledronat/IL2, <b>TCR<math>\gamma\delta</math>pos/CD3+: 69,5%</b> , TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+:23,2%, CD56+/CD3-: 2,6%	Linii de celule de citotoxicitate
6	d9 după stimularea cu Zoledronat/IL2, <b>TCR<math>\gamma\delta</math>pos/CD3+:84,8%</b> , TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+: 11,7%, CD56+/CD3-: 1,2%,	Linii de celule de citotoxicitate
7	d9 după stimularea cu Zoledronat/IL2, <b>TCR<math>\gamma\delta</math>pos/CD3+:67,3%</b> , TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+: 24,4%, CD56+/CD3-: 3,6%	Citotoxicitatea celulelor pacientului

20 Așa cum este listat în tabel, populația de celule stimulate utilizată pentru experimentele descrise a constat din trei populații principale. Numai o porțiune foarte mică de celule efectoare CD56+/CD3- NK a fost prezentă (<5%), în timp ce, celulele TCR $\gamma\delta$ neg/CD3+ au reprezentat o populație mai mare în unele cazuri, însă aceste celule nu declanșează liza celulelor țintă. Prin urmare, în principal celulele T  $\gamma\delta$  au fost responsabile pentruuciderea celulelor mediată de anticorpi.

25

#### **Linii de celule și probe de la pacienți**

30 Linii de celule (obținute de la DSMZ): Mino (limfom cu celule de manta), Daudi (limfom Burkitt), Jeko-1 (limfom cu celule de manta), U2932 (DLBCL), REH (B-ALL)

Probe de la pacient (sânge periferic): 2x CLL (leucemie limfocitară cronică), 2x MCL (limfom cu celule de manta), 1x B-ALL (leucemie limfoblastică acută)

#### **REZULTATE**

35

##### **Titrarea dozei cu linii de celule de limfom**

40 Experimentele inițiale de titrare a dozei pentru obținerea unei configurații de testare valide au fost efectuate cu MOR00208 la concentrații cuprinse între 0,001 și 10  $\mu$ g/ml în prezența a patru rapoarte E:T ale celulelor T  $\gamma\delta$  (0,7:1, 2,2:1, 6,7:1 și 20:1) și s-a observat o creștere dependentă de doză a procentului de celule țintă Jeko și U2932 lizate. Așa cum era de așteptat, activitatea de ucidere a

anticorpilor testați a crescut odată cu rapoarte E:T mai ridicate, și cele mai distincte efecte au fost observate la cele mai ridicate rapoarte E:T testate de 6,7:1 și 20:1. Eficacitatea maximă a lizei celulelor a fost atinsă la concentrații de 0,1 μg/ml, 1 μg/ml și 10 μg/ml MOR00208 în cele două linii de celule testate. Liza celulelor a arătat variații ale celulelor T γδ dependente de donator, cu o liză maximă cuprinsă între 34,0% și 49,3% pentru celulele Jeko și respectiv 22,5% pentru U2392. O concentrație de 1 μg/ml de MOR00208 (ameliorate cu Fc) a fost selectată drept concentrație optimă pentru analize ulterioare complete ale efectului dependent de Fc al uciderii celulelor mediată de anticorpi de către celulele T γδ asupra liniilor de celule de leucemie și limfom și asupra celulelor tumorale derivate de la pacient.

#### 10 **Teste de citotoxicitate cu linii de celule de limfom/leucemie**

Pentru a se determina potențialul de ucidere a celulelor tumorale al celulelor T γδ în combinație cu anticorpi CD19, a fost testat Tafasitamabul la o concentrație de 1 μg/ml cu celule Mino, Daudi, Jeko, U2932 și REH drept celule țintă (**Figura 1** și **Figura 2**). Ca și înainte, au fost testate patru rapoarte E:T diferite între 0,7:1 și 20:1. Și pentru toate liniile de celule, efectele MOR00208 în combinație cu celule T γδ au fost superioare matorului de IgG1 (MOR00208>mator de IgG1) în combinație cu celule T γδ. Așa cum s-a observat în timpul experimentelor de titrare a dozei, activitatea de ucidere a anticorpului testat a crescut, și cele mai distincte efecte au fost găsite la cele mai ridicate rapoarte E:T testate de 6,7:1 și 20:1. În special în cele două linii de celule cu cea mai scăzută ucidere nespecifică (Mino și Jeko), s-a observat cea mai mare contribuție specifică a anticorpului la activitatea de ucidere a celulelor. În ambele linii de celule, activitatea MOR00208 a fost semnificativ diferită statistic de matorul de IgG1 (**Figura 1**). În cele trei linii de celule cu o ucidere nespecifică mai ridicată, profilul de activitate a fost similar (MOR00208>mator IgG1), dar efectele specifice au fost limitate (**Figura 2**).

#### 25 **Teste de citotoxicitate cu celule primare de la pacient**

Așa cum s-a efectuat cu liniile de celule, celule tumorale primare de la doi pacienți cu CLL, doi pacienți cu MCL și un pacient cu B-ALL au fost izolate și incubate cu diferite rapoarte E:T de celule T γδ (0,7:1 la 20:1) de la un singur donator, precum și cu anticorpi care țintesc CD19 la o concentrație de 1 μg/ml (**Figura 3** și **Figura 4**). În conformitate cu observațiile pentru liniile de celule MOR00208, s-a arătat o contribuție specifică distinctă la activitatea de ucidere a celulelor T γδ. Această contribuție a crescut odată cu rapoartele E:T pe toate celulele primare și a fost cea mai pronunțată la cel mai ridicat raport E:T testat, de 20:1. Celulele primare ale pacienților au fost testate numai într-un singur experiment.

#### 35 **CONCLUZIE**

În concluzie, celulele T γδ s-au dovedit a fi o potențială populație de celule efectoare în terapia tumorală bazată pe anticorpi, așa cum s-a demonstrat în acest studiu pentru anticorpul CD19 ameliorat cu Fc, care țintește MOR00208. MOR00208 a prezentat o activitate antitumorală puternică, mediată de prezența celulelor T γδ, împotriva mai multor linii de celule de limfom și leucemie, precum și împotriva celulelor primare de CLL, MCL și B-ALL derivate de la pacienți, și oferă o justificare rațională pentru combinarea MOR00208 și a celulelor T γδ ca o abordare promițătoare pentru terapia limfomului și leucemiei.

#### (56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- JONATHAN FISHER ET AL: "Engineering Approaches in Human Gamma Delta T Cells for Cancer Immunotherapy", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 9, 26 June 2018 (2018-06-26), XP055564688, DOI: 10.3389/fimmu.2018.01409
- MARKUS RISCHER ET AL: "Human gammadelta T cells as mediators of chimaeric-receptor redirected anti-tumour immunity", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 126, no. 4, 1 August 2004 (2004-08-01), GB, pages 583 - 592, XP055278529, ISSN: 0007-1048, DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05077.x
- ANNA CAPSOMIDIS ET AL: "Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 26, no. 2, 1 February 2018 (2018-02-01), US, pages 354 - 365, XP055590617, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.12.001
- YIYANG XU ET AL: "A novel antibody-TCR (AbTCR) platform combines Fab-based antigen recognition with gamma/delta-TCR signaling to facilitate T-cell cytotoxicity with low cytokine

release", CELL DISCOVERY, vol. 4, no. 1, 20 November 2018 (2018-11-20), XP055583500, DOI: 10.1038/s41421-018-0066-6

- HOERES T ET AL: "Improving the efficiency of V[gamma]9V[delta]2 T-cell immunotherapy in cancer", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, FRONTIERS RESEARCH FOUNDATION, CH, vol. 9, no. APR, 19 April 2018 (2018-04-19), pages 1 - 18, XP002797164, ISSN: 1664-3224
- JUNG HYUN HER, 9 December 2019 (2019-12-09), XP055688839, Retrieved from the Internet  
<URL:https://www.morphosys.de/sites/default/files/downloads/functional\_characterization\_of\_gamma\_delta\_t\_cells\_and\_allogeneic\_activated\_nk\_cells\_as\_effector\_cells\_for\_tafasitamab\_mor208.pdf> [retrieved on 20200423]

**(57) Revendicări:**

1. Anticorp anti-CD19 pentru utilizarea în tratamentul unui cancer hematologic, în care anticorpul anti-CD19 cuprinde un lanț greu cu

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYND  
GTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQ  
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SECV ID NR: 11)

și un lanț ușor cu

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSN  
LNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYQFVSRVNSGTDYLTDIHWLQSPKDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SECV ID NR: 12),

și în care anticorpul anti-CD19 menționat este administrat în combinație cu celule T γδ.

2. Celule T γδ pentru utilizarea în tratamentul unui cancer hematologic, în care respectivele celule T γδ menționate sunt administrate în combinație cu un anticorp anti-CD19 și în care anticorpul anti-CD19 cuprinde un lanț greu cu

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYND  
G TKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQ  
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SECV ID NR: 11)

și un lanț ușor cu

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSN  
LNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYQFVSRVNSGTDYLTDIHWLQSPKDSK  
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SECV ID NR: 12).

**3.** Anticorp anti-CD19 pentru utilizarea conform revendicării 1, sau celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea conform revendicării 2, în care respectivele celule T  $\gamma\delta$  menționate:

- (a) cuprind o populație de celule T  $\gamma\delta$  îmbogățită;
- (b) cuprind celule T  $\gamma\delta$  nemodificate prin inginerie sau modificate prin inginerie și/sau amestecuri ale acestora;
- (c) sunt izolate din sânge periferic, țesut tumoral sau țesut non-hematopoietic pentru utilizarea în tratamentul cancerului;
- (d) sunt izolate din sânge periferic și au fost cultivate în prezență de IL-2 și ZOL; și/sau
- (e) sunt celule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 derivate din sânge.

**4.** Anticorp anti-CD19 pentru utilizarea conform revendicării 1 sau 3, sau celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea conform revendicării 2 sau 3, în care anticorpul anti-CD19 menționat și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate într-un mod separat.

**5.** Anticorp anti-CD19 pentru utilizarea conform revendicării 1 sau 3, sau celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea conform revendicării 2 sau 3, în care anticorpul anti-CD19 menționat și celulele T  $\gamma\delta$  sunt administrate într-un mod simultan.

**6.** Anticorp anti-CD19 pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 1 sau 3-5, sau celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 2-5, în care cancerul hematologic este limfomul non-Hodgkin.

**7.** Anticorp anti-CD19 pentru utilizarea conform revendicării 6, sau celulele T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea conform revendicării 6, în care limfomul non-Hodgkin este selectat din grupul care constă din limfom folicular, limfom limfocitar mic, țesut limfoid asociat mucoasei, limfom de zonă marginală, limfom difuz cu celule B mari, limfom Burkitt și limfom cu celule de manta.

**8.** Anticorp anti-CD19 pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 1 sau 3-5, sau celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 2-5, în care cancerul hematologic este leucemia limfocitară cronică.

**9.** Anticorp anti-CD19 pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 1 sau 3-5, sau celule T  $\gamma\delta$  pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 2-5, în care cancerul hematologic este leucemia limfoblastică acută.

Figura 1

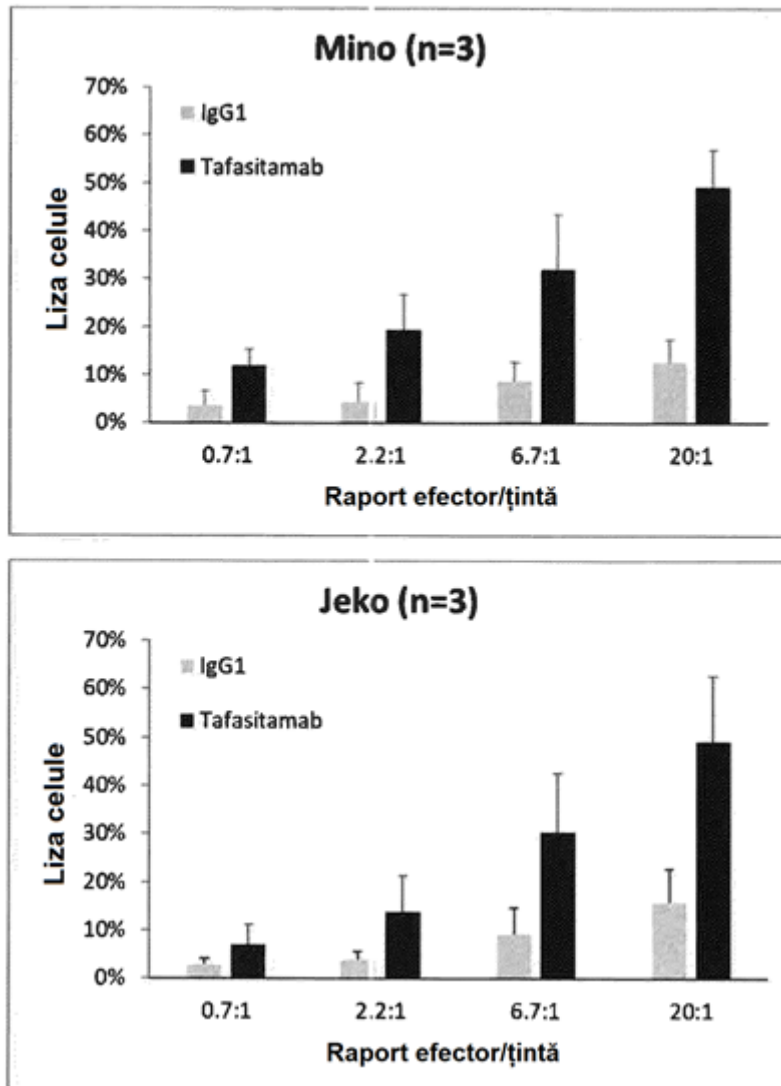


Figura 2

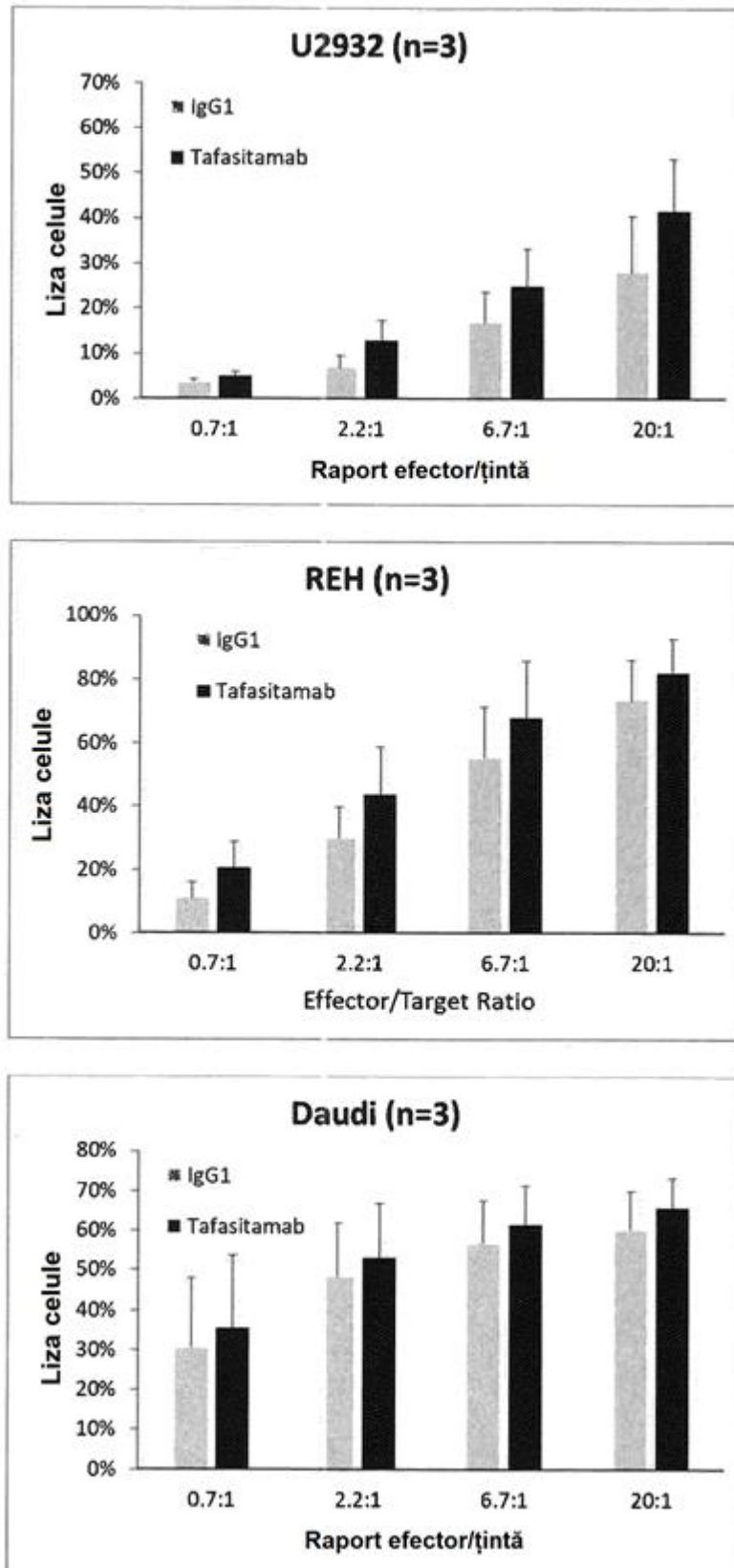


Figura 3

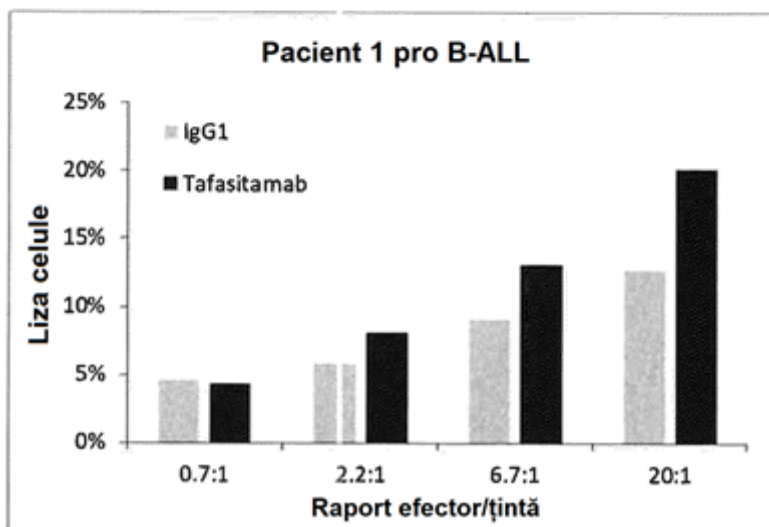
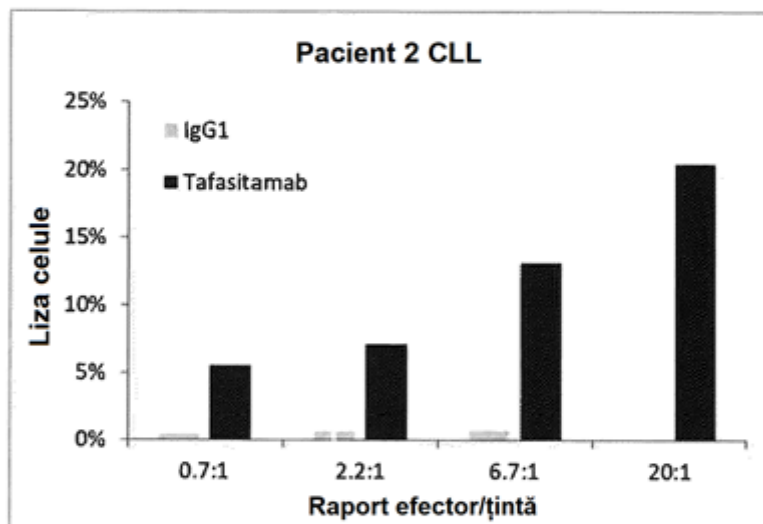
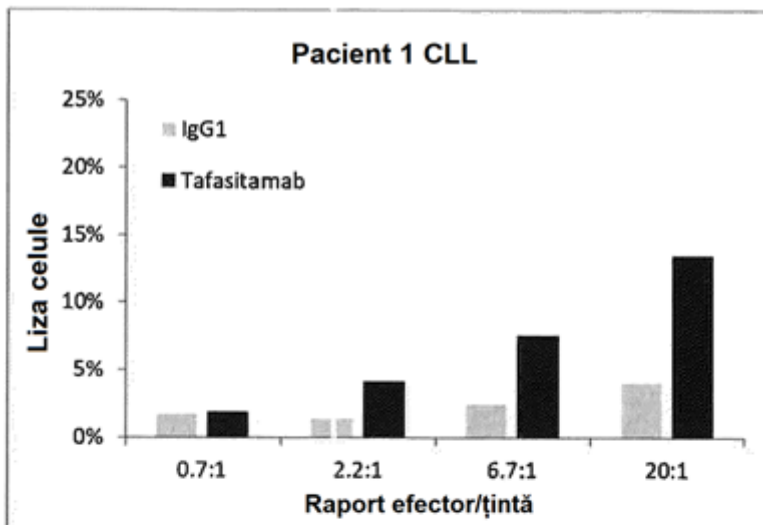


Figura 4

