

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 446**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01)
A61K 38/05	(2006.01)
A61K 38/07	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 31/454	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 31/69	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2011 PCT/EP2011/066648**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO2012041800**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2011 E 11761360 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2621531**

54 Título: **Anticuerpo anti-cd38 y lenalidomida o bortezomib para el tratamiento del mieloma múltiple y nhl**

30 Prioridad:

17.05.2011 US 201161486814 P
29.03.2011 US 201161468607 P
31.01.2011 US 201161437696 P
27.09.2010 US 386619 P
27.09.2010 EP 10180485

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2017

73 Titular/es:

MORPHOSYS AG (100.0%)
Semmelweisstrasse 7
82152 Planegg, DE

72 Inventor/es:

ROJKJAER, LISA;
BOXHAMMER, RAINER;
ENDELL, JAN;
WINDERLICH, MARK y
SAMUELSSON, CHRISTOFER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 617 446 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-cd38 y lenalidomida o bortezomib para el tratamiento del mieloma múltiple y nhl

5 **Antecedentes**

El mieloma múltiple es una malignidad de células B caracterizada por la acumulación latente en la médula ósea de células de plasma secretoras con un índice proliferativo bajo y una larga vida útil. La enfermedad en última instancia ataca a los huesos y la médula ósea, resultando en múltiples tumores y lesiones en todo el sistema esquelético.

10 Aproximadamente el 1% de todos los cánceres, y poco más del 10% de todas las malignidades hematológicas, pueden atribuirse al mieloma múltiple (MM). La incidencia del MM aumenta en la población de edad, siendo la edad media al momento del diagnóstico de 61 años. Las terapias que se encuentran disponibles en la actualidad para el mieloma múltiple incluyen quimioterapia, trasplante de células madre, Thalomid® (talidomida), Velcade® (bortezomib), Aredia® (pamidronato) y Zometa® (ácido zoledrónico). Los protocolos de tratamiento actuales, que
15 incluyen una combinación de agentes quimioterapéuticos como vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida, adriamicina y prednisona o dexametasona, proporcionan una tasa de remisión completa de solo aproximadamente el 5% y la supervivencia media es de aproximadamente 36-48 meses desde el momento del diagnóstico. Los avances recientes con el uso de una alta dosis de quimioterapia y posteriormente con el trasplante autólogo de células de la médula ósea o células mononucleares de sangre periférica han aumentado la tasa de remisión completa y la
20 duración de la remisión. Sin embargo, la supervivencia total solo ha registrado un leve incremento, y no se han obtenido pruebas de que exista una cura. A la larga, los pacientes con MM a menudo recaen, incluso bajo terapia de mantenimiento con interferón-alfa (IFN-α) solo o en combinación con esteroides.

25 El linfoma no Hodgkin es una amplia clasificación de linfomas, que son cánceres que se originan en el sistema linfático cuando los linfocitos (células B o células T) se vuelven malignos y se proliferan de forma incontrolable para formar una masa tumoral. En total el NHL abarca aproximadamente 30 subtipos diferentes de linfoma, incluido el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) y el linfoma folicular (FL). La incidencia de NHL alcanzará más de 140.000 en los mercados principales para 2019. Las opciones de tratamiento disponibles incluyen Rituxan/MabThera, combinaciones de los mismos, como, R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), R-CVP (Rituxan, ciclofosfamida, vincristina y prednisona) y quimioterapia. Además, después de remisión o recaída, puede considerarse el trasplante de células madre hematopoyéticas. A pesar de las
30 opciones de tratamiento actuales, sin embargo, las tasas de supervivencia en grupos de alto riesgo de NHL agresivo pueden ser del 30% en 5 años. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de tratamientos y combinación de tratamientos efectivos que aún no ha sido satisfecha.

35 El CD38 es un ejemplo de antígeno expresado en dichas células de plasma malignas y otros linfocitos. Las funciones adscritas al CD38 incluyen tanto en la mediación de receptor en adhesión y eventos de señalización y actividad (ecto-) enzimática. Como una ectoenzima, el CD38 utiliza NAD⁺ como sustrato para la formación de ADP-ribosa cíclica (ADPRc) y ADPR, pero también de nicotinamida y fosfato dinucleótido de ácido nicotínico-adenina (NAADP). Se ha demostrado que la ADPRc y NAADP actúan como segundos mensajeros de la movilización de Ca²⁺. Mediante la conversión de NAD⁺ en ADPRc, el CD38 regula la concentración extracelular de NAD⁺ y, por lo tanto, la supervivencia de las células mediante la modulación de la muerte celular inducida por NAD (NCID). Además de la señalización mediante Ca²⁺, la señalización del CD38 ocurre por medio de un cruce con complejos de antígeno-receptor en células T y B u otros tipos de complejos de receptor, por ejemplo moléculas MHC, y de esta
45 forma participa en varias respuestas celulares, pero también en el cambio y la secreción de IgG.

Los anticuerpos específicos para CD38 se describen en WO1999/62526 (Mayo Foundation); WO200206347 (Crucell Holland); US2002/164788 A1 (Jonathan Ellis); WO2005/103083 (MorphoSys AG), US 2010/0285004 A1, WO2006/125640 (MorphoSys AG), US 2009/0123950 A1, y WO2007/042309 (MorphoSys AG), US 8.088.896; 50 WO2006099875 (Genmab), US 7.829.673; y WO08/047242 (Sanofi-Aventis), US 2009/030471 A1.

Las combinaciones de anticuerpos específicas para CD38 y otros agentes se describen en los documentos WO200040265 (Research Development Foundation); WO2006099875 y WO2008037257 (Genmab); y 55 WO2010061360, WO2010061359, WO2010061358 y WO2010061357 (Sanofi Aventis).

Es claro que a pesar del avance reciente en el descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos, muchas formas de cáncer que implican tumores que expresan CD38 continúan teniendo un mal pronóstico. Por lo tanto, existe una necesidad de contar con mejores métodos para tratar dichas formas de cáncer.

60 **COMPENDIO**

La presente invención proporciona una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia SYYMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región

LCDR1 de la secuencia SGNLRRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5), y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y

- (a) talidomida, lenalidomida o pomalidomida; o
 (b) bortezomib,

5

para utilizar en un método de tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación sinérgica de dicho anticuerpo específico para CD38 y talidomida, lenalidomida o pomalidomida. En otro aspecto, la presente invención se refiere a una combinación sinérgica que comprende dicho anticuerpo específico para CD38 y bortezomib. Dichas combinaciones son útiles en el tratamiento de cánceres, como, mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

10

Los modelos in vitro e in vivo se consideran predicciones de cómo se comportaría determinado compuesto o combinación de compuestos en humanos. En este caso, las combinaciones de un anticuerpo específico para CD38 y lenalidomida se evaluaron en líneas celulares de mieloma múltiple humano y se identificó sinergia. Además, la combinación de un anticuerpo específico para CD38 y lenalidomida, y una combinación de un anticuerpo específico para CD38 y bortezomib, se evaluó en modelos de ratón contra células de mieloma múltiple y células de linfoma de Burkitt (una forma de NHL) y se identificó sinergia. Por lo tanto, las combinaciones seguirán siendo efectivas en el tratamiento de humanos en mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin. Además, el anticuerpo específico para CD38 ejemplificado en la presente memoria descriptiva se incorpora en ensayos clínicos, donde dichas combinaciones pueden confirmarse en seres humanos.

15

20

Cuando los compuestos se combinan ya sea in vitro o in vivo, se espera que la combinación tenga solo efectos aditivos. De manera inesperada, los inventores encontraron que la combinación de un anticuerpo anti-CD38 particular y lenalidomida medió un nivel sinérgico de Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en las líneas celulares de mieloma múltiple AMO-1 y NCI-H929. Además, y también de manera inesperada, un anticuerpo anti-CD38 particular, en combinación con lenalidomida o con bortezomib, medió un nivel sinérgico de reducción en lisis ósea en el modelo de ratones SCID de NCI-H929 y aumentó sinérgicamente los días de supervivencia media en el modelo de ratón SCID de RAMOS.

25

30

Por lo tanto, tanto la combinación del anticuerpo específico para CD38 ejemplificado y lenalidomida y el anticuerpo específico para CD38 ejemplificado y bortezomib se comportaron sinérgicamente en los modelos in vitro y/o in vivo correspondientes a mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

35

Una realización de la presente invención comprende una combinación en donde el anticuerpo específico para CD38 comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYYMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGNLRRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y el segundo agente es talidomida, lenalidomida, o pomalidomida. En aspectos preferidos, la combinación se utiliza para el tratamiento del mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

40

Otra realización de la presente invención comprende una combinación en donde el anticuerpo específico para CD38 comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYYMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGNLRRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y el segundo agente es el inhibidor de proteasoma bortezomib. En aspectos preferidos, la combinación se utiliza para el tratamiento del mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

45

50 Descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra los efectos de la lenalidomida sola en la expresión de CD38 en células AMO-1.

La **Figura 2** muestra los efectos de la lenalidomida sola en la proliferación celular en varias líneas celulares de mieloma múltiple. Esta medida representa la citotoxicidad relativa de lenalidomida en cada línea celular.

55

La **Figura 3** muestra la mediación de ADCC en células AMO-1 mediante la combinación de MOR03087 y lenalidomida. Las PBMC y células AMO-1 se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR03087. MOR03207 se une a lisozima y se utiliza como un control de isotipo, como lo es IgG1. LEN representa lenalidomida. "Teórico" representa la adición del valor de MOR03087 solo y el valor de LEN solo. Los datos muestran los promedios de la Tabla 3b.

60

La **Figura 4** muestra la mediación de ADCC en células AMO-1 mediante la combinación de MOR03087 y lenalidomida. Solo las PBMC fueron tratadas con lenalidomida antes del tratamiento con MOR03087. MOR03207 se une a lisozima y se utiliza como un control de isotipo, como lo es IgG1. LEN representa lenalidomida. "Teórico" representa la adición del valor de MOR03087 solo y el valor de LEN solo. Los datos muestran los promedios de la Tabla 4b.

La **Figura 5** muestra los efectos de la lenalidomida sola en la expresión de CD38 en células NCI-H929.

La **Figura 6** muestra la mediación de ADCC en células NCI-H929 mediante la combinación de MOR03087 y lenalidomida. Las PBMC y células NCI-H929 se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR03087. Teórico representa la combinación calculada usando el concepto de producto de fracciones de Chou et al. Los datos muestran los promedios de la Tabla 7b.

La **Figura 7** muestra la mediación de ADCC en células NCI-H929 mediante la combinación de MOR03087 y lenalidomida. Solo las PBMC fueron tratadas con lenalidomida antes del tratamiento con MOR03087. Teórico representa la combinación calculada usando el concepto de producto de fracción de Chou et al. Los datos muestran los promedios de la Tabla 8b.

La **Figura 8** muestra la inhibición de crecimiento de varias líneas celulares de mieloma múltiple causada por bortezomib solo. La CI50 en células AMO-1 fue 3.9nM. La CI50 en células LP-1 fue 6.1nM. La CI50 en células NCI-H929 fue 3.3nM. La CI50 en células RPMI-8226 fue 9.0nM.

La **Figura 9** muestra la mediación de ADCC en células NCI-H929 mediante la combinación de MOR03087 a 15µg/ml y Velcade® (bortezomib). Las dos gráficas representan dos donantes diferentes.

La **Figura 10** muestra la mediación de ADCC en células LP-1 mediante la combinación de MOR202 a 15µg/ml y Velcade® (bortezomib). Las dos gráficas representan dos donantes diferentes.

La **Figura 11** muestra la secuencia de aminoácidos de MOR202.

La **Figura 12** muestra la curva de mejor ajuste, tal como se describe en Chou et al., de la combinación de MOR202 y lenalidomida en la mediación de ADCC en células AMO-1 y también representa la curva de Mejor Ajuste generada para el análisis de la mediación de ADCC en células NCI-H929.

Las **Figuras 13-18** muestran el análisis de sinergia del factor de Chou para seis experimentos separados usando la combinación de MOR202 y lenalidomida en la mediación de ADCC en células AMO-1. La Figura 13 muestra el experimento 1. La Figura 14 muestra el experimento 2. La Figura 15 muestra el experimento 3. La Figura 16 muestra el experimento 4. La Figura 17 muestra el experimento 5. La Figura 18 muestra el experimento 6. Las Figuras 13-15 derivaron de los tres experimentos que se muestran en las Tablas 3a-c, y la Figura 3. Las Figuras 16-18 fueron derivadas de los tres experimentos que se muestran en las Tablas 4a-c, y la Figura 4.

La **Figura 19** muestra el volumen óseo total medio del Escaneo MicroCT de cada uno de los grupos de estudio descritos en el Ejemplo 7, donde los resultados se muestran en la Tabla 11.

Figura 20 muestra el volumen óseo total medio del Escaneo MicroCT de cada uno de los grupos de estudio descritos en el Ejemplo 11, donde los resultados se muestran en la Tabla 17.

Descripción detallada de la invención

"Sinergia", "sinérgica" o "sinérgico" significa más que el efecto aditivo esperado de una combinación. La "sinergia", el "sinergismo" o el efecto "sinérgico" de una combinación se determina en la presente mediante los métodos de Chou et al. y/o Clarke et al. Ver Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006). En Chou et al., se divulgan múltiples métodos para determinar la sinergia y al menos uno de estos métodos se utiliza en la presente. Ver también Clarke et al., Issues in experimental design and endpoint analysis in the study of experimental cytotoxic agents in vivo in breast cancer and other models, Breast Cancer Research and Treatment 46:255-278 (1997).

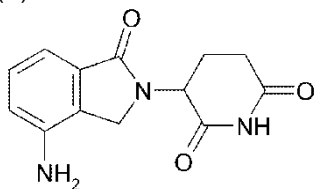
El término "anticuerpo" significa anticuerpos monoclonales, incluido cualquier isotipo, como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Un anticuerpo IgG comprende dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas que se unen mediante enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada y liviana contiene una región constante y una región variable. Cada región variable contiene tres segmentos denominados "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR") o "regiones hipervariables", que son responsables principalmente de la unión de un epítipo de un antígeno. Se hace referencia a los mismos como CDR1, CDR2 y CDR3, numerados secuencialmente a partir del extremo N.

Las porciones más altamente conservadas de las regiones variables fuera de las CDR se denominan "regiones marco". Un "fragmento de anticuerpo" significa un fragmento Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' F(ab')₂ u otro fragmento, que contiene al menos una cadena pesada o liviana variable, que contienen cada una CDR y regiones marco.

- 5 THALOMID® (talidomida) en combinación con dexametasona está indicada para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple recién diagnosticado, y es comercializada por Celgene.

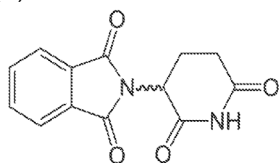
Un "análogo de talidomida" incluye, a modo no taxativo, la propia talidomida, lenalidomida (CC-5013, Revlimid™), Pomalidomida (CC4047, Actimid™) y los compuestos divulgados en los documentos WO2002068414 y WO2005016326. El término se refiere a un compuesto químico sintético que utiliza la estructura de talidomida como una estructura principal (por ejemplo, se han agregado grupos secundarios o dichos grupos se han eliminado de la estructura matriz). El análogo difiere en estructura de la talidomida y sus compuestos de metabolitos por ejemplo mediante una diferencia en el largo de una cadena de alquilo, un fragmento molecular, mediante uno o más grupos funcionales, o un cambio en la ionización. La expresión "análogo de talidomida" también incluye los metabolitos de talidomida. Los análogos de talidomida incluyen la mezcla racémica del enantiómero S y R de un compuesto respectivo y el enantiómero S o al enantiómero R individualmente. Se prefiere la mezcla racémica. Los análogos de talidomida incluyen compuestos de las siguientes estructuras:

(A) Lenalidomida



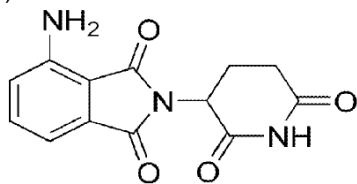
(Fórmula 1),

(B) Talidomida



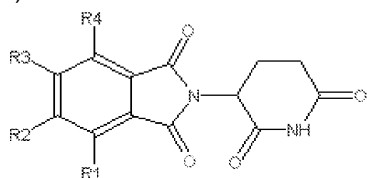
(Fórmula 2),

(C) Pomalidomida



(Fórmula 3),

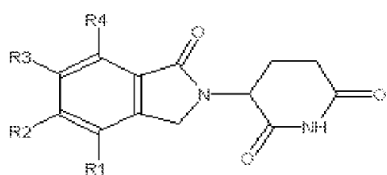
(D)



(Fórmula 4),

donde R21, R22, R23 y R24 son cada uno independientemente H, alcoxi, amino o alquilamina, y

- 40 (E)



(Fórmula 5).

5 donde R21, R22, R23 y R24 son cada uno independientemente H, alcoxi, amino o alquilamina.

La lenalidomida se comercializa actualmente como Revlimid® por Celgene para el tratamiento del mieloma múltiple. La lenalidomida se describe que tiene al menos las siguientes propiedades en relación al tratamiento de tumores, a) citotóxica a células tumorales, Gandhi et al., Lenalidomide inhibits proliferation of Namalwa CSN.70 cells and interferes with Gab1 phosphorylation and adaptor protein complex assembly, Leuk Res., 30(7):849-58 (2006); b) activa las células destructoras naturales (Nk), Gandhi et al., Dexamethasone synergizes with lenalidomide to inhibit multiple myeloma tumor growth, but reduces lenalidomide-induced immunomodulation of T and NK cell function, Curr Cancer Drug Targets, 1;10(2):155-67 (marzo 2010); y c) regula al alza la expresión de CD38 en células tumorales, ver Lapalombella et al., Lenalidomide down-regulates the CD20 antigen and antagonizes direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab on primary chronic lymphocytic leukemia cells, Blood, 112:13, 5180-5189 (15 de diciembre de 2008). "LEN" se utiliza para describir lenalidomida.

Tal como se describe, los análogos de talidomida regulan al alza la expresión de CD38 en células tumorales. Otros agentes que regulan al alza la expresión de CD38 en la superficie de células tumorales se describen en el documento WO00/40265, US 7.223.397 (Research Development Foundation).

Un "inhibidor de proteasoma" se refiere a un compuesto que bloquea la acción de las proteasomas, es decir, complejos celulares que descomponen proteínas, tal como por ejemplo, la proteína p53. Se conocen varias clases de inhibidores de proteasoma. La clase de los boronatos peptídicos incluye bortezomib (INN, PS-341; Velcade®), un compuesto que está aprobado en los Estados Unidos para el tratamiento de recaída de mieloma múltiple. Otro boronato peptídico es CEP-18770. Otras clases de inhibidores de proteasoma incluyen aldehídos peptídicos (por ejemplo, MG132), sulfonas de vinilo peptídicas, epoxicetonas peptídicas (por ejemplo, epoxomicina, carfilzomib), inhibidores de β lactona (por ejemplo, lactacistina, MLN 519, NPI-0052, Salinosporamida A), compuestos que crean complejos de ditiocarbamato con metales (por ejemplo, Disulfiram, un fármaco que también se utiliza para el tratamiento del alcoholismo crónico) y ciertos antioxidantes (por ejemplo, Epigallocatequina-3-galato) catequina-3-galato y Salinosporamida A.

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

El término "CD38" se refiere a la proteína conocida como CD38, que tiene los siguientes sinónimos: ADP-ribosilciclasa 1, cADPr hidrolasa 1, ADP-ribosa hidrolasa cíclica 1, T10.

40 El CD38 humano tiene la secuencia de aminoácidos de:

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRALCLGVSILVLLVAVVPRWRQQWSPGTTKRFPEVTLARCVKYTEIHPERM
RHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLAD
DLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQ
45 PEKVQTLAWVIHGGREDSRDLCDPTIKELESI ISKRNIQFSCKNIRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI (SEQ ID NO:
7).

"MOR202", un anticuerpo anti-CD38 cuya secuencia de aminoácidos se proporciona en la Figura 11. "MOR202" y "MOR03087" se utilizan como sinónimos para describir al anticuerpo que se muestra en la Figura 11.

50 La secuencia de ADN que codifica el Dominio Pesado Variable MOR202 es:
CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC
CTCCGGATTTACCTTTTCTTCTTATTATGAATTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGCTCGAGTGGGTGA
GCGGTATCTCTGGTGATCCTAGCAATACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTACCATTTACAGTGATA
55 ATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGT
GATCTTCTCTTGTGTTATACTGGTTTTGCTTATTGGGGCCAAGGCACCTGGTGACGGTTAGCTCA (SEQ ID NO:
12)

La secuencia de ADN que codifica el Dominio Liviano Variable MOR202 es:

GATATCGAACTGACCCAGCCGCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTCAGACCCGCGGTATCTCGTGTAGCGGCG
ATAATCTTCGTCATTATTATGTTTATTGGTACCAGCAGAAACCCGGGCAGGCGCCAGTTCTTGTGATTTATGGTG
ATTCTAAGCGTCCCTCAGGCATCCCGGAACGCTTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCCGCGACCCTGACCATT
AGCGGCACTCAGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATTGCCAGACTTATACTGGTGGTCTTCTCTTGTGTTTGG
5 CGGCGGCACGAAGTTAACCGTTCTTGCCAG (SEQ ID NO: 13)

El anticuerpo "Ref mAB5" es un anticuerpo anti-CD38 cuya secuencia de aminoácidos se proporciona a continuación (las CDR aparecen en negrita y subrayadas):

10 VH:
QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYFTFDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQKFQGGKATLTADKS
SKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 21)

VL:
15 DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPDRFTGSGAGTDFTFTISSV
QAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGTKLEIKRT (SEQ ID NO: 22)

Las CDR de Ref mAB5 son definidas por Kabat et al. y un anticuerpo que tiene las mismas CDR que Ref mAB5 se describe en el documento WO2008/047242, US 8.153.765.

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

25 "Mejora la actividad de ADCC" significa un aumento en la mediación de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Las modificaciones de aminoácidos dentro de la región Fc que resultan en una mejora de la actividad de ADCC se divulgan en los documentos WO200042072 Genentech, WO2004029207A2 Xencor y WO2004063351 A2 Macrogenics.

30 "MOR03207" es un anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos es:

VH:
35 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWSWIRQSPGRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDT
SKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARLDHRYHEDTVYPGMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 8)

VL:
40 DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLPAYTVTWYQQKPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPERFSGSNGNTATLTISGTQ
AEDEADYYCASWDPSSGVVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO: 9).

MOR03207 se une a lisozima, y se utiliza como un control de isotipo, como lo es IgG1.

Una "combinación" significa más de un artículo, por ejemplo, un compuesto tal como un anticuerpo y lenalidomida.

La presente divulgación también se refiere a combinaciones, productos farmacéuticos y composiciones farmacéuticas que contienen las combinaciones descritas. Los dos componentes de la combinación sinérgica de la
45 presente invención, por ejemplo, el anticuerpo específico para CD38 y lenalidomida, pueden administrarse juntos o por separado. Cuando se administran juntos, los dos componentes pueden formularse juntos en una composición farmacéutica, que puede incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Alternativamente los dos componentes también pueden formularse en diferentes composiciones farmacéuticas. En este caso, los dos componentes pueden administrarse simultáneamente o posteriormente. En una realización, la talidomida,
50 lenalidomida, o pomalidomida, se administra antes y/o por separado de la administración del anticuerpo específico para CD38, por ejemplo, MOR202. En una realización adicional, la lenalidomida se administra al menos 72 horas antes de la administración del anticuerpo específico para CD38, por ejemplo, MOR202. Este período de tiempo permite la regulación al alza mediada por lenalidomida de CD38 en las células objetivo.

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

"Administrado" o "administración" incluyen, a modo no taxativo, la administración mediante una forma inyectable, tal como, por ejemplo, vía intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea o vía mucosa, por ejemplo, como un
60 spray o aerosol nasal para inhalación o como una solución, cápsula o comprimido ingerible.

Una cantidad "terapéuticamente efectiva" de un compuesto o una combinación se refiere a una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad o trastorno dado y sus complicaciones. La cantidad que es efectiva para un fin terapéutico particular dependerá de la gravedad de la

enfermedad o lesión así como del peso y el estado general del sujeto. Se comprenderá que la determinación de una dosificación apropiada puede lograrse, usando experimentación de rutina, construyendo una matriz de valores y evaluando diferentes puntos en la matriz, lo cual se encuentra dentro de las habilidades comunes de un facultativo o científico clínico capacitado.

5 Sorpresivamente, se encontró que la combinación de un anticuerpo anti-CD38 particular y lenalidomida medió un nivel sinérgico de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en células de mieloma múltiple AMO-1 y NCI-H929. Además, y también de manera inesperada, un anticuerpo anti-CD38 particular cuando se combinó con lenalidomida medió un nivel sinérgico de reducción en lisis ósea en el modelo de ratones SCID de NCI-H929 y aumentó sinérgicamente los días de supervivencia media en el modelo de ratón SCID de RAMOS. Por lo tanto, la combinación del anticuerpo específico para CD38 ejemplificado y lenalidomida se comportó sinérgicamente en los modelos in vitro e in vivo relevantes a mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin. Por lo tanto, esta combinación proporciona resultados sinérgicos en el tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin en humanos.

15 La lenalidomida es un análogo de la talidomida, por lo tanto, se espera que otros análogos de talidomida, como pomalidomida o la propia talidomida provoquen también efectos sinérgicos cuando se utilizan en combinación con un anticuerpo anti-CD38. Además, una talidomida o un análogo de la misma regula al alza la expresión de CD38 en líneas celulares de mieloma múltiple, por lo tanto, se espera que la sinergia resulte cuando otros agentes que regulan al alza la expresión de CD38 en la superficie de células tumorales, por ejemplo, ácido trans-retinoico y anticuerpos anti-CD38 se utilizan en combinación.

25 Sorprendentemente, se encontró que la combinación de un anticuerpo anti-CD38 particular y bortezomib medió un nivel alto de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en líneas celulares de mieloma múltiple NCI-H929 y LP-1. Además, y también sorpresivamente se encontró que la combinación de un anticuerpo anti-CD38 particular y bortezomib medió un nivel sinérgico de reducción en lisis ósea en el modelo de ratones SCID de NCI-H929 y aumentó sinérgicamente los días de supervivencia media en el modelo de ratón SCID de RAMOS. Por lo tanto, la combinación del anticuerpo específico para CD38 ejemplificado y bortezomib se comportó sinérgicamente en los modelos in vivo relevantes a mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin. Por lo tanto, esta combinación proporciona resultados sinérgicos en el tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin en humanos.

35 Se espera que otros inhibidores de proteasoma, como, disulfiram, epigallocatequina-3-galato y salinosporamida A produzcan efectos similares cuando se utilizan en combinación con un anticuerpo anti-CD38.

Las "CDR" en la presente son definidas por Chothia et al., Kabat et al. o por una convención de numeración interna. Ver Chothia C, Lesk AM. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol., 196(4):901-17. Ver Kabat E.A, Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S. y Foeller C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5.^a edic., n.º de publicación NIH 91-3242, US Dept. of Health and Human Services, Washington, DC.

Descripción detallada

45 La presente invención se refiere a una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 y (a) talidomida, lenalidomida, o pomalidomida, o (b) un inhibidor de proteasoma bortezomib, para utilizar en el tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin, donde el anticuerpo específico para CD38 comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYYMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSTNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGTFAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGNLNRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6).

55 También se describe en la presente, el anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia DYWMQ (SEQ ID NO: 15), una región HCDR2 de la secuencia TIYPGDGDTGYAQKFQG (SEQ ID NO: 16), una región HCDR3 de la secuencia GDYYSNSLDY (SEQ ID NO: 17), una región LCDR1 de la secuencia KASQDVSTVVA (SEQ ID NO: 18), una región LCDR2 de la secuencia SASYRYI (SEQ ID NO: 19) y una región LCDR3 de la secuencia QQHYSPPYT (SEQ ID NO: 20).

60 En un aspecto, la combinación se utiliza para el tratamiento del mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin. En realizaciones específicas, la combinación comprende lenalidomida.

Un aspecto se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las combinaciones. Preferentemente, la composición comprende un portador aceptable. Preferentemente, la composición se administra en una cantidad efectiva.

Un aspecto de la presente divulgación comprende una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKVG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGNLNRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y lenalidomida para el tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

Una realización adicional comprende una combinación, donde el anticuerpo comprende una cadena variable de la secuencia

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRaedTAVYYCARDLPLVYTGfAYWGQGLTVTV SS (SEQ ID NO: 10) y una cadena liviana variable de la secuencia DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLNRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPERSGSNSGNTATLTISGTQA EDEADYYCQTYTGGASLVFGGGKTLTVLGG (SEQ ID NO: 11).

También se describe en la presente una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia DYWMQ (SEQ ID NO: 15), una región HCDR2 de la secuencia TIYPGDGDTGYAQKFQG (SEQ ID NO: 16), una región HCDR3 de la secuencia GDYGSNSLDY (SEQ ID NO: 17), una región LCDR1 de la secuencia KASQDVSTVVA (SEQ ID NO: 18), una región LCDR2 de la secuencia SASRYI (SEQ ID NO: 19) y una región LCDR3 de la secuencia QGHYSPPYT (SEQ ID NO: 20) y lenalidomida para el tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

También se describe en la presente una combinación, donde el anticuerpo comprende una cadena variable de la secuencia

QVQLVQSGAEVAKPGTsvKLSCKASGYFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQKFQGGKATLTADKS SKTVYMHLSLSEDSAVYYCARGDYGSNSLDYWGQGTsv TVSS (SEQ ID NO: 21) y una cadena liviana variable de la secuencia DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLLYSASRYIIGVPDRFTGSGAGTDFFTISSV QAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGKTLKIKRT (SEQ ID NO: 22).

Preferentemente, el anticuerpo tiene una región Fc de IgG1. Preferentemente, el anticuerpo comprende una región Fc modificada, donde dicha modificación mejora la actividad de ADCC.

En otro aspecto, los componentes de la combinación, el anticuerpo específico para CD38 y lenalidomida, se administran por separado. Preferentemente, la lenalidomida se administra antes de la administración del anticuerpo específico para CD38. En una realización adicional, la lenalidomida se administra al menos 72 horas antes de la administración del anticuerpo específico para CD38.

En otro aspecto, la combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKVG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGNLNRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y lenalidomida es capaz de mediar la destrucción de las células AMO-1 que expresan CD38 y/o células NCI-H929 mediante ADCC en presencia de PBMC humanas aisladas con al menos una eficacia dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces mejor que la lenalidomida sola.

En otro aspecto, la combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKVG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGNLNRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y lenalidomida es capaz de reducir la lisis ósea con una eficacia al menos dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces mejor que la lenalidomida sola.

Otro aspecto comprende un método de tratamiento del mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin en un individuo que lo necesita, cuyo método comprende la administración de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKVG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGNLNRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y lenalidomida a un individuo que tiene mieloma múltiple o linfoma no Hodgkin. En algunas realizaciones, la combinación se administra en una cantidad efectiva.

Otro aspecto comprende una combinación que comprende un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y lenalidomida. En una realización, la combinación se utiliza para el tratamiento de mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin.

Otro aspecto comprende una combinación de un anticuerpo específico para CD38 y un inhibidor de proteasoma bortezomib. En algunas realizaciones, la combinación es sinérgica. En algunas realizaciones, el anticuerpo específico para CD38 comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6).

En un aspecto, la combinación se utiliza para el tratamiento del mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin. En algunas realizaciones, la composición comprende un portador aceptable. En algunas realizaciones, la composición se administra en una cantidad efectiva.

Un aspecto de la presente divulgación comprende una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y bortezomib para el tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

Una realización adicional comprende una combinación, donde el anticuerpo comprende una cadena variable de la secuencia
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGfAYWGQGLTVTV SS (SEQ ID NO: 10) y una cadena liviana variable
 de la secuencia
 DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYWYQQKPGQAPVLVIYGDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ
 AEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO: 11).

En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región Fc de IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región Fc modificada, donde dicha modificación mejora la actividad de ADCC.

En una realización, la combinación se utiliza para el tratamiento de mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin.

En otro aspecto, los componentes de la combinación, el anticuerpo y el inhibidor de proteasoma bortezomib, se administran por separado.

En otro aspecto, la combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y bortezomib es capaz de mediar la destrucción de las células LP-1 que expresan CD38 y/o células NCI-H929 mediante ADCC en presencia de PBMC humanas aisladas con al menos una eficacia dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces mejor que el bortezomib solo.

En otro aspecto, la combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y bortezomib es capaz de reducir la lisis ósea con una eficacia al menos dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces mejor que el bortezomib solo.

En otro aspecto, la presente divulgación comprende un método de tratamiento del mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin en un individuo que lo necesita, cuyo método comprende la administración de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGDNLRHYYVY (SEQ

ID NO: 4), una región Lcdr2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región Lcdr3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y bortezomib a un individuo que tiene mieloma múltiple o linfoma no Hodgkin.

En algunas realizaciones, la combinación se administra en una cantidad efectiva.

Otro aspecto comprende una combinación que comprende un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región Hcdr1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYMYN (SEQ ID NO: 14), una región Hcdr2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región Hcdr3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región Lcdr1 de la secuencia SGDnlRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región Lcdr2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región Lcdr3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y bortezomib.

Un aspecto comprende una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región Hcdr1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYMYN (SEQ ID NO: 14), una región Hcdr2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una Hcdr3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región Lcdr1 de la secuencia SGDnlRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región Lcdr2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región Lcdr3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y

(a) talidomida, lenalidomida, o pomalidomida, o
(b) un inhibidor de proteasoma bortezomib,
para utilizar en el tratamiento del mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

Las realizaciones comprenden una combinación, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada variable de la secuencia
QVQLVESGGGLVQPggSLRLSCAASgFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDNs
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGfAYWGQGLTVTV SS (SEQ ID NO: 10) y una cadena liviana variable
de la secuencia
DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDnlRHYYVYWYQKPGQAPVLVIYGDskRPSGIPERfSGSNGNTATLTISGTQ
AEDEADYYCQTYTGGASLVFGGgTKLTVLgQ (SEQ ID NO: 11).

Las realizaciones comprenden una combinación, donde el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1. Las realizaciones comprenden una combinación, donde el anticuerpo comprende una región Fc modificada, donde dicha modificación mejora la actividad de ADCC.

Las realizaciones comprenden una combinación, donde dicho anticuerpo específico para CD38 y dicha talidomida, lenalidomida, o pomalidomida, o inhibidor de proteasoma bortezomib se administran por separado.

Las realizaciones comprenden una combinación, que es capaz de reducir la lisis ósea con una eficacia al menos dos veces mejor que la lenalidomida y/o bortezomib solos.

Las realizaciones comprenden una combinación, donde dicho anticuerpo específico para CD38 se combina con la talidomida, lenalidomida, o pomalidomida. Las realizaciones comprenden una combinación, donde el análogo de talidomida comprende lenalidomida. Las realizaciones comprenden una combinación, donde la lenalidomida se administra antes de la administración del anticuerpo específico para CD38. Las realizaciones comprenden una combinación, donde la lenalidomida se administra al menos 72 horas antes de la administración del anticuerpo específico para CD38.

Las realizaciones comprenden una combinación de un anticuerpo específico para CD38 y lenalidomida, que es capaz de mediar la destrucción de células AMO-1 y/o NCI-H929 que expresan CD38 mediante ADCC en presencia de PBMC aisladas humanas con una eficacia al menos dos veces mejor que la lenalidomida sola.

Las realizaciones comprenden una combinación, que comprende dicho anticuerpo específico para CD38 y un inhibidor de proteasoma bortezomib. Las realizaciones comprenden una combinación de un anticuerpo específico para CD38 y bortezomib, que es capaz de mediar la destrucción de células LP-1 y/o NCI-H929 que expresan CD38 mediante ADCC en presencia de PBMC aisladas humanas con una eficacia al menos dos veces mejor que el bortezomib solo.

Un aspecto comprende una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región Hcdr1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYMYN (SEQ ID NO: 14), una región Hcdr2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una región Hcdr3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región Lcdr1 de la secuencia SGDnlRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región Lcdr2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región Lcdr3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y lenalidomida o pomalidomida para utilizar en el tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

Un aspecto comprende una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1) o de la secuencia SYYMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKKG (SEQ ID NO: 2), una región HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y bortezomib para utilizar en el tratamiento de mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención que queda cubierta por las reivindicaciones.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión de CD38 en la superficie de varias líneas celulares

Las líneas celulares de la Tabla 1 se evaluaron para los niveles de expresión de CD38.

15 Tabla 1

<u>Línea celular</u>	<u>Suministrado por:</u>	<u>Cultivado en:</u>
AMO-1: Línea celular de mieloma múltiple	DSMZ NO. de ACC 538	RPMI1640, con L-Glutamina, (PAN Biotech GmbH, Cat No.: P04-16500 medio)
LP1: Línea celular de mieloma múltiple	DSMZ No. de ACC 41	Medio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) con GlutaMAX™ (Invitrogen, Cat No.: 31980-048)
NCI-H929: Línea celular de mieloma múltiple	DSMZ NO. DE ACC 163	RPMI1640 (igual que AMO-1), complementado con 1 mM de Na-Piruvato, 50µM de β-Mercaptoetanol
RPMI8226: Línea celular de mieloma múltiple	DSMZ NO. de ACC 402	RPMI1640 (igual que AMO-1)
OPM-2: Línea celular de mieloma múltiple	DSMZ NO. de ACC 50	RPMI1640 (igual que AMO-1)
Plasmacitoma, células de plasma malignas	Klinikum rechts der Isar	RPMI1640 (igual que AMO-1)

Se obtuvieron muestras de médula ósea (4-10 ml de aspirato) de pacientes con mieloma múltiple y muestras de plasmacitoma de tumor extramedular después de recibir autorización de Klinikum rechts der Isar ("Krdl") (Munich, Alemania). Las muestras se sometieron a centrifugación, y se logró más enriquecimiento celular por medio de una clasificación celular con activación magnética.

Las células se tiñeron con un anticuerpo CD38-PE directamente etiquetado como QuantiBRITETM (Becton Dickinson GmbH, Clon HB7, CAT No. 342371), que es específico para CD38. Los "anticuerpos unidos por célula" (ABC) se determinaron utilizando citometría de flujo en base al sistema QuantiBRITETM, que mide la media geométrica (GeoMedia) por célula. La conversión de la GeoMedia medida en una cantidad de ABC correlativa por célula se realizó con el software GraphPad PRISMTM. Se asumió que los valores de ABC se correlacionaron con el número de moléculas CD38 por célula, dado que QuantiBRITE™ CD38-PE transporta una molécula PE por anticuerpo. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 2: Evaluación del efecto de la Lenalidomida en la regulación al alza de CD38 en varias líneas celulares

Para determinar si la lenalidomida indujo la regulación al alza de CD8 en las células de mieloma múltiple y plasmacitoma de la Tabla 1, las líneas celulares se incubaron con 100µM de lenalidomida y, posteriormente, se analizó la expresión de superficie de CD38 mediante FACS.

Materiales y Métodos

Aproximadamente 2×10^5 células de cada una de las líneas celulares de la Tabla 1 se colocaron en placas de 48 pocillos en un medio de RPMI estándar. La lenalidomida, adquirida de Selleck Chemicals (LLC S1029, CAS No. 191732-6; Lote: S10290), se aplicó a pocillos respectivos hasta una concentración final de 100µM en un volumen de 750µl que contenía 20% de FCS y 0.1 % de DMSO. Como testigo negativo, se utilizó 0.1% de DMSO en un medio complementado con FCS y las placas se incubaron durante 24h, 48h y 72h a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.

Las células se resuspendieron colocándolas cuidadosamente en pipetas y 250µl de suspensión celular por período de incubación se transfirió a un pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se lavaron mediante centrifugación durante 1 min a 700 x g y se resuspendieron en 150µl de solución amortiguadora FACS fría

(1x PBS complementado con 3% de FCS). Las células se granularon nuevamente mediante centrifugación y se resuspendieron en 150µl de solución amortiguadora FACS que contenía 1µg/ml de anticuerpo anti -CD38 (MOR202, IgG1) o anticuerpo testigo MOR03207 y se incubaron durante 1 h sobre hielo. Luego se lavaron las células 3 veces mediante centrifugación y se resuspendieron en solución amortiguadora FACS complementada con el anticuerpo secundario etiquetado como PE (fragmento PE-Fab₂, anti-IgG humano de cabra, fragmento específico Fc; Jackson Immuno Research; CAT: 109-116-098; Lote: 80938). Las células se incubaron durante 45 minutos sobre hielo, luego se lavaron 3 veces mediante centrifugación y se resuspendieron en solución amortiguadora FACS. Las suspensiones celulares se sometieron luego a análisis FACS usando un dispositivo de arreglo FACS.

La expresión de CD38 basal de cada línea celular y el efecto de la lenalidomida en la expresión de CD38 se muestran en la Tabla 2. Adicionalmente, el efecto de la lenalidomida en la expresión de CD38 de células AMO-1 se muestra en la Figura 1, y el efecto de la lenalidomida en la expresión de CD38 de células NCI-H929 se muestra en la Figura 5.

Tabla 2

Línea celular	Número absoluto de ABC (expresión de CD38)		AUMENTO	Aumento en veces	Efecto
	Basal	LEN (extrapolado)			
AMO-1	25,000	115,000	90,000	4.6	Importante
LP-1	125,000	162,500	37,500	1.3	No
NCI-H929	195,000	390,000	195,000	2.0	Poco
RPMI-8226	670,000	871,000	199,000	1.3	Poco
OPM-2	38,000	98,800	60,800	2.6	Importante
Plasmacitoma	30,000	69,000	39,000	2.3	Importante

Ejemplo 3: Inhibición de proliferación de células AMO-1 utilizando lenalidomida sola

La citotoxicidad de la lenalidomida se evaluó en células AMO-1. Las células se recolectaron y distribuyeron en placas de 96 pocillos con 5000 células por pocillo. Se agregaron cantidades cada vez más altas de lenalidomida a los pocillos y se incubaron las placas durante 24h, 48h y 72h a 37°C en una incubadora humidificada (5% de CO₂).

Después de la incubación, se analizaron las placas en busca de proliferación celular en un ensayo en base a XTT colorimétrico cuantitativo utilizando el kit de proliferación celular II (ROCHE, Kit de proliferación celular II, Cat. No.: 11465015001). Para mediciones posteriores las placas se sometieron a una lectora Tecan Genios y se detectó absorbancia a 492nm.

Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 4: Combinación sinérgica de MOR0202 y lenalidomida en células AMO-1

Se seleccionaron células AMO-1 para evaluar con la combinación de MOR202 y lenalidomida. Las células AMO-1 son similares a las células de plasmacitoma en seres humanos porque tienen una expresión de CD38 basal baja y CD38 es significativamente regulado al alza luego del tratamiento con lenalidomida como se muestra en la Tabla 2.

Las PBMC se aislaron mediante centrifugación con gradiente de densidad de sangre humana recién aislada. La sangre aislada de diferentes donantes se recubrió en un volumen definido de Biocoll (Biochrome AG; CAT No.:L6115; LOTE No.:1050T) en un tubo Falcon y se centrifugaron a 380g. Las PBMC se aislaron y se complementaron con un medio de RPMI.

Después de 72h, las células se contaron y las PBMC se ajustaron hasta una concentración de 6.6 x 10⁶/ml mientras que las células AMO-1 se ajustaron hasta una concentración final de 2.5 x 10⁵/ml. Para identificación posterior en citometría de flujo, las células AMO-1 se tiñeron durante 3min con 0.1µg/ml de CalceinAM (Calceina: 1 mg/ml de solución concentrada, Invitrogen, Cat No.: C3099) y se lavaron tres veces mediante centrifugación suave. Se mezclaron 100µl de suspensión de células blanco con 100 de PBMC para alcanzar una relación de 1:30. El anticuerpo MOR202 o anticuerpo MOR03207 (testigo negativo) se agregó hasta una concentración final de 15µg/ml. Las suspensiones celulares se incubaron posteriormente durante 4h a 37 °C. Para detectar las células AMO-1

mueratas, las suspensiones celulares se desafiaron con yodo de propidio (PI) y posteriormente se analizaron en citometría de flujo. Las células blanco se separaron mediante una abertura de las poblaciones celulares de CalceinAM, y se cuantificaron las células destruidas mediante ADCC.

5 En total se realizaron seis experimentos con el fin de determinar la mediación de ADCC en células AMO-1 mediante la combinación de MOR202 y lenalidomida. En tres experimentos, los PBMC y células AMO-1 se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202, los resultados se muestran en las Tablas 3 a-c y la Figura 3. En tres experimentos adicionales, solo las PBMC se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202, los resultados se muestran en las Tablas 4 a-c y la Figura 4.

10 Tabla 3 Las células efectoras y AMO-1 se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202. Se utilizaron dosis únicas y de combinación de 10 µM de LEN y 15µg/ml de MOR03207 y MOR202.

15 Los datos se presentan en las siguientes tres formas, como a) datos sin procesar (% de células muertas), b) datos normalizados específicos de destrucción, donde el grupo de tratamiento con MOR202 se fija en 1 (100%), y c) datos normalizados específicos de destrucción, donde la combinación teórica se fija en 1 (100%). La Tabla 3a representa datos sin procesar.

Tabla 3a

AMO-1	LEN 10µM sola	MOR202 solo (15µg/ml)	Combinación de LEN (10µM) y MOR202 (15µg/ml)	DMSO	MOR03207 (15µg/ml)	MOR03207 (15µg/ml) + DMSO	LEN (0µM)	LEN (10 µM) sola sin PBMC	Testigo DMSO sin PBMC
Exp.1	12.89	23.69	35.98	13.10	14.15	15.12	15.45	15.41	11.07
Exp.2	10.13	22.53	29.09	7.94	10.52	6.99	13.22	8.44	8.45
Exp.3	22.80	49.56	80.39	19.93	24.04	22.24	22.63	22.38	26.43

20 Las unidades de los valores enumerados son % de células muertas. Los DMSO, MOR03207, MOR03207+DMSO, LEN0, LEN10 sin PBMC y DMSO sin grupos de PBMC son testigos.

25 La Tabla 3b representa los datos de la Tabla 3a, pero normalizados, donde el grupo de tratamiento de MOR202 se fija en 1 (100%).

Tabla 3b

AMO-1	MOR03207 (15µg/ml)	MOR202 (15µg/ml)	LEN sola (10µM)	Combinación teórica	MOR202 (15µg/ml) y LEN (10µM)
Exp.1	-0.1	1.0	0.0	1.0	2.2
Exp.2	-0.2	1.0	0.2	1.2	1.8
Exp.3	0.1	1.0	0.1	1.1	2.3

30 Para las Tablas 3b-c, "Combinación teórica" representa la adición de los valores de MOR202 solo y los valores de LEN sola. Los datos normalizados de la Tabla 3b se calculan de la siguiente forma. La Tabla 3a representa el número de células muertas. Por lo tanto, los valores específicos de destrucción de la Tabla 3b se calculan restando los valores de los testigos. Luego, los valores específicos de destrucción se comparan con el testigo MOR202, que se fijan en 1. Los promedios de los resultados en la Tabla 3b se muestran en la Figura 3.

1. Determinación de sinergia

35 1.1 Chou et al.

Los métodos de Chou-Talalay se utilizaron para determinar la sinergia. Ver Chou TC, Talalay P, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 22: 27-55 (1984). El análisis de sinergia se lleva a cabo utilizando el método de CI-isobol.

40

Ecuación del efecto medio

Los modelos de ecuación del efecto medio del efecto de un inhibidor (tal como un fármaco) como

$$F_a/F_u = (D/D50)^m$$

5 donde D es la dosis, F_a y F_u es la fracción del sistema afectada y sin afectar por la dosis D ($F_a + F_u = 1$); D50 es la dosis que produce el efecto medio (por ejemplo, CI50, DE50, DL50). La constante m determina la forma de la curva de dosis-efecto.

10 Utilizamos el software Excel Fit para llevar a cabo un cálculo de regresión lineal para estimar los parámetros m y D50.

Los efectos de la combinación en células AMO-1 se miden en % de muerte celular como se describe anteriormente. Definimos la fracción F_u como la relación de % de muerte celular de la línea celular tratada expuesta a un testigo. Es decir:

$$15 F_u = \% \text{ de muerte celular (línea celular tratada)} / \% \text{ de muerte celular (línea celular sin tratar)}$$

Entonces el % de muerte celular de una línea celular es la constante D50 en la ecuación de efecto medio que puede estimarse mediante la regresión lineal descrita anteriormente.

20 Método IC-isobol

El método IC-isobol proporciona una evaluación cuantitativa de la sinergia entre fármacos. Un índice de combinación (IC) se estima a partir de los datos de efecto-dosis de tratamientos de fármacos simples y combinados. Un valor de IC menor que 1 indica sinergia; IC = 1 indica efecto aditivo; e IC > 1 indica antagonismo. Los rangos sinérgicos se definen mejor en Chou y Talalay para valores de IC < 0.1 como un sinergia muy fuerte, los valores de IC entre 0.1 y 0.3 como sinergia fuerte, los valores de IC de 0.3- 0.7 como sinergia, los valores de IC de 0.7-0.9 como sinergia moderada a leve. La interacción de fármacos (sinergia o antagonismo) es más pronunciada cuanto más lejano sea el valor IC de 1.

30 Formalmente, el índice de combinación (IC) de un tratamiento de fármacos combinado se define como

$$CL = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2}$$

35 Aquí, D1 y D2 son las dosis del fármaco 1 y el fármaco 2, respectivamente, en la combinación; cada uno de D_{x1} y D_{x2} es la dosis de un tratamiento con solo el fármaco 1 y el fármaco 2 que producirían el mismo efecto que el de la combinación, respectivamente. Las dosis D_{x1} y D_{x2} deben estimarse a partir de los datos del efecto de dosis de tratamientos de fármaco simples. Esencialmente, una ecuación de efecto medio se ajusta a los datos de cada fármaco. A partir de la ecuación de efecto medio de un fármaco, se puede estimar la dosis (es decir, D) necesaria para producir un efecto (es decir, F_a , F_u). Cuanto más alejado se encuentra un punto de la línea aditiva, más grande será la diferencia entre 1 e IC, y por lo tanto más fuerte será el efecto (sinérgico o antagonístico).

45 El método anterior se describe en Chou TC, Talalay P, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 22: 27-55 (1984). Una descripción adicional del método de Chou anterior también se proporciona en Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006).

50 Las curvas generadas para los cálculos de sinergia basados en Chou se muestran en las Figuras 12-18. En la Figura 12, la curva de mejor ajuste se determinó quitando los puntos de datos a) donde la concentración de MOR202 fue demasiado baja para tener algún efecto y b) donde la concentración estuvo cerca de la saturación. En el punto de datos apropiado, aproximadamente un 80% de destrucción celular, el valor de IC es menor que 1, confirmando una sinergia clara. Las Figs. 13-18 representan los seis experimentos de las Tablas 3 y 4, y en cada una de la D_{x1} (dosis de MOR202) necesaria para alcanzar un 100% de efecto de la combinación de MOR 202 y lenalidomida es infinito; por lo tanto, la D_i/D_{xi} es menor que 1 y dado que la lenalidomida no tiene efecto en las células AMO-1 con respecto a la destrucción celular, el valor de la D_{x2} también se aproxima a infinito, de modo que la D_2/D_{x2} se aproxima a 0, por lo tanto los valores de IC de cada uno de los seis experimentos es menor que 1, confirmando una sinergia clara.

55 La Tabla 3c representa la normalización de los datos, donde la combinación teórica se fija en 1 (100%) e incluye los cálculos de IC de Chou.

60

Tabla 3c:

Línea celular	Experimento	MOR202 (0.42µg/ml)	LEN (5µM)	Combinación teórica	MOR202 (0.42µg/ml) y LEN (5µM)	Índice de combinación (IC)	Conclusión
AMO-1	Experimento 1	0.6	0.4	1.0	1.0	« 0.1 *	sinergia
	Experimento 2	0.9	0.1	1.0	2.4	« 0.1 *	sinergia
	Experimento 3	0.9	0.1	1.0	1.8	« 0.1 *	sinergia
	PROMEDIO	0.8	0.2	1.0	1.7	-	-

Los datos que se muestran en la Tabla 3c difieren de las Tablas 3a y 3b. La Tabla 3c se basa en diferentes puntos de datos sin procesar que los que se muestran en la Tabla 3a, dado que las concentraciones seleccionadas en la Tabla 3c están más cerca que la CE₅₀ del anticuerpo (los datos sin procesar no se muestran). "Combinación teórica" representa la adición de los valores de MOR202 solo y los valores de LEN sola.

Tabla 4 Células efectoras tratadas solo con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202. Se utilizaron dosis únicas y de combinación de 10 µM de LEN y 15µg/ml de MOR03207 y MOR202.

Los datos se presentan en las siguientes tres formas, como a) datos sin procesar (% de células muertas), b) datos normalizados específicos de destrucción, donde el grupo de tratamiento de MOR202 se fija en 1 (100%), y c) datos normalizados específicos de destrucción, donde la combinación teórica se fija en 1 (100%). La Tabla 4a representa datos sin procesar.

Tabla 4a

AMO-1	LEN 10µM sola	MOR202 solo (15µg/ml)	Combinación de LEN (10µM) y MOR202 (15µg/ml)	DMSO	MOR03207 15µg/ml	MOR03207 15µg/ml + DMSO	LEN (0µM)
Exp.1	15.33	23.09	23.46	14.62	16.17	15.97	12.87
Exp.2	12.98	21.08	25.75	10.24	12.17	11.45	9.78
Exp.3	17.93	48.28	56.49	16.75	17.42	15.77	18.16

Las unidades de los valores enumerados son % de células muertas. Los DMSO, MOR03207, MOR03207+DMSO, LEN0, LEN10 sin PBMC y DMSO sin PBMC son testigos.

Tabla

AMO-1	MOR03207 (15µg/ml)	MOR202 (15µg/ml)	LEN sola (10µM)	Combinación teórica	MOR202 (15µg/ml) y LEN (10µM)
Exp.1	0.5	1.0	0.1	1.1	1.1
Exp.2	0.3	1.0	0.3	1.3	1.6
Exp.3	0.0	1.0	0.0	1.0	1.3

La Tabla 4b representa los datos de la Tabla 4a, pero normalizados, donde el grupo de tratamiento de MOR202 se fija en 1 (100%). Para las Tablas 4b-c, "Combinación teórica" representa los valores de MOR202 solo más los valores de LEN sola.

La normalización de los datos como se muestra en la Tabla 4b se calcula como se describe en la Tabla 3b, restando los testigos. Los promedios de los resultados en la Tabla 4b se muestran en la Figura 4.

Tabla 4c

Línea celular	Experimento	MOR202 (0.42µg/ml)	LEN (5µM)	Combinación teórica	MOR202 (0.42µg/ml) y LEN (5µM)	Índice de combinación (IC)	Conclusión
AMO-1	Experimento 1	1.2	-0.2	1.0	1.7	« 0.1*	sinergia
	Experimento 2	0.7	0.3	1.0	1.4	« 0.1*	sinergia
	Experimento 3	0.8	0.2	1.0	1.3	« 0.1**	sinergia
	PROMEDI O	0.9	0.1	1.0	1.5	-	-

La Tabla 4c representa la normalización de los datos, donde la combinación teórica se fija en 1 (100%) e incluye los cálculos de IC de Chou et al. usando la metodología descrita anteriormente en el Ejemplo 4.

La Tabla 4c difiere de las Tablas 4a y 4b. La Tabla 4c se basa en diferentes puntos de datos sin procesar que los que se muestran en la Tabla 4a, puesto que las concentraciones seleccionadas en la Tabla 4c están más cerca que la CE₅₀ del anticuerpo (los datos sin procesar no se muestran).

1. Determinación de sinergia

1.2 Sinergia según Clarke et al.

Cuando un fármaco tiene actividad baja, como en este caso cuando la Lenalidomida sola tiene baja citotoxicidad contra células AMO-1, la sinergia también puede determinarse mediante pruebas estadísticas de que la combinación es considerablemente diferente al fármaco inhibidor solo. Ver Clarke et al., Issues in experimental design and endpoint analysis in the study of experimental cytotoxic agents in vivo in breast cancer and other models, Breast Cancer Research and Treatment 46:255-278 (1997). Aquí, tanto Chou et al., como se muestra anteriormente, y los métodos de Clarke et al., se utilizaron para determinar la sinergia.

Los datos se analizan de la siguiente forma:

Antagonista (AB)/C < (A/C) x (B/C)

Aditivo (AB)/C = (A/C) x (B/C)

Sinérgico (AB)/C > (A/C) x (B/C)

donde A es el tratamiento con LEN sola; B es el tratamiento con MOR202 solo; C es la respuesta al vehículo de tratamiento; AB es la combinación de los tratamientos A y B.

Tabla 5: Los valores de datos sin procesar en esta tabla son los mismos que se muestran en la Tabla 3a, dado que provienen de los mismos tres experimentos, donde tanto las células efectoras y AMO-1 fueron tratadas con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202 y se utilizaron la dosis única y de combinación de 10µM de LEN y 15µg/ml de MOR03207 y MOR202. La única diferencia es que los datos se analizan usando Clarke et al. en vez de Chou et al.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
A: LEN sola	15.41	8.44	22.38
B: MOR202 solo	23.69	22.53	49.56
C: testigo	11.07	8.45	26.43
AB: combinación de LEN y MOR202	35.98	29.09	80.39
(AB)/C	3.25	3.44	3.04
(A/C) x (B/C)	2.98	2.66	1.59

A = respuesta al tratamiento solo con LEN

B = respuesta al tratamiento solo con MOR202

C = respuesta al tratamiento con testigo
 AB = combinación de tratamientos A y B

Los valores de A, B, C y AB representan el % de muerte celular.

En cada experimento (AB)/C es mayor que (A/C) X (B/C), lo que demuestra una sinergia clara.

Tabla 6: Los valores de datos sin procesar en esta tabla son los mismos que se muestran en la Tabla 4a, dado que provienen de los mismos tres experimentos, donde solo las células efectoras fueron tratadas con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202 y se utilizaron la dosis única y de combinación de 10µM de LEN y 15µg/ml de MOR03207 y MOR202. La única diferencia es que los datos se analizan usando Clarke et al. en vez de Chou et al.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
A: LEN sola	15.33	12.98	17.93
B: MOR202 solo	23.09	21.08	48.28
C: testigo	15.97	11.45	15.77
AB: combinación de LEN y MOR202	23.46	25.75	56.49
(AB)/C	1.47	2.25	3.58
(A/C) x (B/C)	1.39	2.09	3.48

A = respuesta al tratamiento solo con LEN
 B = respuesta al tratamiento solo con MOR202
 C = respuesta al tratamiento con testigo
 AB = combinación de tratamientos A y B

En cada experimento (AB)/C es mayor que (A/C) X (B/C), lo que demuestra una sinergia clara.

Resultados

Con la aplicación del análisis de Clarke et al., LEN mejoró sinérgicamente la actividad ADCC de MOR202 en células AMO-1 en los seis experimentos. Con la aplicación del análisis de Chou et al., LEN mejoró sinérgicamente la actividad ADCC de MOR202 en células AMO-1 en 6 de 6 experimentos. Esta mejora de la actividad se identificó mediante varios mecanismos incluida la citotoxicidad directa, activación de células efectoras y regulación al alza de los niveles de expresión de CD38 en células de MM.

Los experimentos de conformidad con el ejemplo 4 también se realizan con otros anticuerpos específicos para CD38, por ejemplo, el anticuerpo "Ref mAB5".

Ejemplo 5: Inhibición de la proliferación de células NCI-H929 usando lenalidomida sola

La citotoxicidad de la lenalidomida se evaluó en NCI-H929 usando los métodos descritos en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Figura 2. En resumen, la inoculación con lenalidomida solo inhibió considerablemente la proliferación celular en células NCI-H929.

Ejemplo 6: Combinación sinérgica de MOR202 y Lenalidomida en células NCI-H929

Se seleccionaron células NCI-H929 para evaluar con la combinación de MOR202 y lenalidomida. Las células NCI-H929 expresan niveles más altos de CD38 que las células AMO-1, por lo tanto, son representativas de ciertos tipos de células que se encuentran en pacientes humanos con mieloma múltiple o linfoma no Hodgkin.

En total se realizaron seis experimentos, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 4, con el fin de determinar la mediación de ADCC en células NCI-H929 mediante la combinación de MOR202 y lenalidomida. En tres experimentos, las PBMC y las células NCI-H929 se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202, los resultados se muestran en las Tablas 7a-b y la Figura 6. En tres experimentos adicionales, solo las PBMC se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202, los resultados se muestran en las Tablas 8a-b y la Figura 7.

Tabla 7

Tanto las células efectoras como NCI-H929 se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202. Se utilizaron dosis únicas y de combinación de 5 µM de LEN y 15µg/ml de MOR03207 y 0.2 o 0.07 µg/ml de MOR202

5 Los datos se presentan de la siguiente forma, como a) datos sin procesar (% de células muertas), y b) datos específicos de destrucción normalizados, donde la combinación del producto de la fracción se fija en 1 (100%). La Tabla 7a representa los datos sin procesar.

Tabla 7a

NCI-H929	LEN sola 5µM	MOR202 solo (0.2* o 0.07 µg/ml)	Combinación de LEN (5µM) y MOR202 (0.2* o 0.07 µg/ml)	DMSO	LEN (0µM)	MOR03207 (15µg/ml) + DMSO	MOR03207 (15µg/ml)
Exp.1	38.65	30.64*	60.20*	18.01	18.42	18.27	17.81
Exp.2	41.92	43.08	66.62	18.77	19.92	20.26	19.20
Exp.3	39.92	32.54	64.58	12.32	12.44	13.74	14.09

10 Las unidades de los valores enumerados son % de células muertas. DMSO, MOR03207, MOR03207+DMSO, LEN0, LEN10 sin PBMC y DMSO sin PBMC son testigos.

La Tabla 7b representa los datos normalizados, donde la combinación del producto de la fracción se fija en 1 (100%).

15

Tabla 7b

NCI-H929	MOR202 solo (0.2* o 0.07 µg/ml)	LEN sola 5µM	Combinación basada en el concepto de producto de la fracción	Combinación de LEN (5µM) y MOR202 (0.2* o 0.07 µg/ml)	Índice de combinación (IC)	Conclusión
Exp.1	0.42*	0.67	1.00	1.36*	«0.1	sinergia
Exp.2	0.58	0.56	1.00	1.12	«0.1	sinergia
Exp.3	0.45	0.67	1.00	1.24	«0.1	sinergia
PROMEDIO	0.48	0.63	1.00	1.24		

20 La combinación de producto de la fracción se calcula usando la siguiente fórmula $1 - [(1-A)^*(1-B)] = fpc(\%)$ tal como se describe en Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006). La Tabla 7b se basa en los datos sin procesar de la Tabla 7a. La normalización de los datos tal como se muestra en la Tabla 7b se calcula tal como se describe en la Tabla 3b, restando los testigos. En la Tabla 7b, donde la combinación de LEN y MOR202 es mayor que la combinación en base al concepto de producto de la fracción, entonces existe la sinergia clara. Además, los valores del Índice de Combinación se calcularon usando los métodos de Chou et al. tal como se describe en el

25 Ejemplo 4. Los promedios de los resultados de la Tabla 7b se muestran en la Figura 6.

Tabla 8 Células efectoras solo tratadas con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202. Se utilizaron dosis únicas y de combinación de 5 µM de LEN y 15µg/ml de MOR03207 y 0.2* o 0.07 µg/m de MOR202.

30 Los datos se presentan de la siguiente forma, como a) datos sin procesar (% de células muertas), y b) datos específicos de destrucción normalizados, donde la combinación del producto de la fracción se fija en 1 (100%). La Tabla 8a representa los datos sin procesar.

Tabla 8a

NCI-H929	LEN sola 5µM	MOR202 solo (0.2* o 0.07 µg/ml)	Combinación de LEN (5µM) y MOR202 (0.2* o 0.07 µg/ml)	DMSO	LEN (0µM)	MOR03207 (15µg/ml) + DMSO	MOR03207 (15µg/ml)
Exp.1	17.50	26.60*	29.11*	18.36	17.56	19.52	17.07
Exp.2	25.72	47.00	51.23	22.55	24.90	24.16	23.19
Exp.3	26.27	53.74	67.99	25.29	25.16	24.43	27.10

Las unidades de los valores enumerados son % de células muertas. DMSO, MOR03207, MOR03207+DMSO, LEN0, LEN10 sin PBMC y DMSO sin PBMC son testigos.

5 La Tabla 8b representa los datos normalizados, donde la combinación del producto de la fracción se fija en 1 (100%).

Tabla 8b

NCI-H929	MOR202 sola (0.2* o 0.07 µg/ml)	LEN sola 5µM	Combinación basada en el concepto de producto de la fracción	Combinación de LEN (5µM) y MOR202 (0.2* o 0.07 µg/ml)	Índice de combinación (IC)	Conclusión
Exp.1	1.09*	-0.10	1.00	1.10*	0.07	sinergia
Exp.2	0.91	0.12	1.00	1.03	0.81	sinergia
Exp.3	0.97	0.04	1.00	1.59	«0.1	sinergia
PROMEDIO	0.99	0.02	1.00	1.24		

10 La Tabla 8b se basa en los datos sin procesar de la Tabla 8a. La normalización de los datos tal como se muestra en la Tabla 8b se calcula tal como se describe en la Tabla 3b, restando los testigos. En la Tabla 8b, donde la combinación de LEN y MOR202 es mayor que la combinación en base al concepto de producto de la fracción, entonces existe la sinergia clara. Además, los valores del Índice de Combinación se calcularon usando los métodos de Chou et al. tal como se describe en el Ejemplo 4. Los promedios de los resultados de la Tabla 8b se muestran en la Figura 7.

Determinación de sinergia

1.3 Concepto de producto de la fracción

15 La evaluación de los datos en este ejemplo difiere de aquellos utilizados en el análisis del efecto de la combinación de MOR202 y LEN en células AMO-1 en el Ejemplo 4. Aquí se evalúan las células NCI-H929 y solo LEN tiene un efecto importante en la proliferación de las células NCI-H929 tal como se muestra en el Ejemplo 5, por lo tanto, se utiliza el concepto de producto de la fracción. El concepto de producto de la fracción se describió en Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006). Allí Chou et al. establece: Si A y B inhiben cada uno 60%, entonces es una sobresimplificación decir que el efecto aditivo consiste en 84% de inhibición. En base al razonamiento de Webb (1963), este tipo de problema puede resolverse mediante $(1-0.6)(1-0.6)=0.16$, $1-0.16=0.84$. Chou y Talalay (1984) lo denominaron el método del producto de la fracción. Este método nunca producirá un efecto de combinación que excede el 100% de inhibición. Chou y Talalay (1984), sin embargo, también han demostrado que este método tiene validez limitada porque toma en cuenta la potencia (por ejemplo, inhibición fraccional) pero ignora la forma de la curva de dosis-efecto (por ejemplo, hiperbólica o sigmoideal). La importancia de la "forma" en el

análisis de dosis-efecto se muestra en la Fig. 1. Chou y Talalay (1984) indicaron que el método de Webb es válido solo cuando ambos fármacos tienen curvas hiperbólicas (es decir, en la cinética simple Michaelis-Menten cuando las curvas de dosis-efecto son hiperbólicas, es decir, $m = 1$ en la gráfica de efecto medio) y no es válido cuando m no es igual a 1, como curvas sigmoidales ($m > 1$) o sigmoidales planas ($m < 1$). Asimismo, el método de Webb es válido cuando los efectos de dos fármacos son no exclusivos entre sí (por ejemplo, totalmente independientes) y no es válido para efectos mutuamente exclusivos (por ejemplo, mecanismos o modos de acción similares, tal como se asume para el isoblograma clásico, ver más adelante).

Clarke et al. no se utilizó dado que Clarke es más adecuado cuando una monoterapia tiene un efecto bajo.

Ver la Figura 12, la curva de mejor ajuste se determinó quitando los puntos de datos a) donde la concentración de MOR202 era demasiado baja para tener cualquier efecto y b) donde la concentración estuvo cerca de la saturación. En el punto de datos apropiado, aproximadamente 80% de destrucción celular, el valor IC es menor que 1, lo que confirma una sinergia clara.

15 Resultados

Con la aplicación del análisis del Concepto de Producto de la fracción, LEN mejoró sinérgicamente la actividad de MOR202 en células NCI-H929 en 6 de 6 experimentos. Con la aplicación del análisis de Chou et al., LEN mejoró sinérgicamente la actividad de MOR202 en células NCI-H929 en 6 de 6 experimentos. Ver las Tablas 7a-b y 8a-b.

20 Ejemplo 7: MOR202 y LEN solos y en combinación en modelo MM de ratones SCID con lisis ósea de NCI-H929

Materiales

Lenalidomida (SYNthesis med chem; Shanghai, China; Lote no: ZHM-066-051). MOR202 (MorphoSys AG, Lote 100706-5KLE18). Testigo de vehículo: Ora-Plus: Ora-Sweet SF (Paddock Laboratories, Minneapolis, MN, USA, Lote no. 9499528). Ratones SCID (University of Adelaide, Waite Campus, Urrbarraie, SA, Australia, Cepa C.B.-17-Igh-1^b-Prkdc^{scid}). Células de mieloma múltiple humanas NCI-H929 (ver la Tabla 1). Medio de cultivo celular RPMI 1640, Suero Bovino Fetal (FBS), Mercaptoetanol, Solución Salina Balanceada de Hank (HBSS) y penicilina-estreptomina de Invitrogen Australia (Mt Waverley, VIC, Australia); y azul de tripano y glucosa de Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia).

Métodos

63 ratones SCID fueron inoculados el Día (-7) ortotópicamente en la tibia derecha con 2.5×10^6 células NCI-H929 de MM (en 5 μ L) con el fin de inducir lisis ósea. Tres días post inoculación (Día -4), 60 de los ratones SCID fueron aleatorizados por peso corporal en los grupos que se muestran en la Tabla 13, 10 ratones por grupo. El régimen de dosificación se proporciona en la Tabla 9. Los tratamientos con lenalidomida (Grupos A y D) y Testigo de vehículo (Grupo C) comenzaron el Día (-1). Los tratamientos con MOR202 (Grupos B y D) comenzaron el Día 0. El tratamiento continuó durante 6 semanas.

Tabla 9: Régimen de dosificación y Grupos

Grupo	Compuesto	Tratamiento	Régimen
A	Lenalidomida	50 mg/kg, vía oral en 10 mL/kg	una vez al día durante 6 semanas
B	MOR202	3 mg/kg, i.p., en 10 mL/kg	3 veces a la semana durante 6 semanas
C	Testigo de vehículo (Ora-Plus:Ora-Sweet SF (1:1, p/p))	10 mL/kg vía oral	una vez al día durante 6 semanas
D	Combinación de Lenalidomida /MOR202	50 mg/kg, v. oral, en 10 mL/kg 3 mg/kg, i.p., en 10 mL/kg	una vez al día durante 6 semanas 3 veces por semana durante 6 semanas

Se utilizó un Escaneo MicroCT para evaluar la lisis ósea y se incluyó un análisis 3-dimensional que comprendió el Volumen Óseo Total (TBV), Volumen Óseo Trabecular (Tb.BV), Factor de Patrón Trabecular (Tb.Pf) e Índice del Modelo Estructural (SMI). La Tabla 10 define cada uno de estos parámetros. Los resultados de cada uno de los parámetros del Escaneo MicroCT se muestran en la Tabla 11. Los resultados del Volumen Óseo Total (TBV) se muestran en la Figura 19.

Tabla 10: Parámetros del escaneo MicroCT

Parámetros:	Definiciones:
Volumen óseo total (mm ³)	Volumen óseo cortical y trabecular total dentro del volumen de interés (sección transversal).
Volumen trabecular óseo	Volumen óseo trabecular dentro del volumen de interés (sección transversal).
^Factor de patrón trabecular (Tb.Pf)	Índice de fragmentación; Un índice inverso de conectividad con aplicación específica al hueso trabecular. Un Tb.Pf inferior significa redes trabeculares mejor conectadas mientras que un Tb.Pf más alto significa una estructura trabecular más desconectada (es decir, más lisis ósea).
** Índice de modelo estructural (SMI)	Un indicador de la prevalencia relativa de varillas y placas en una estructura 3D tal como el hueso trabecular. Este parámetro es importante en la osteolisis de los huesos que se caracteriza por una transición de estructuras similares a placa (normal) a similares a varillas (degradación). Una placa, cilindro y esfera ideales tienen valores de SMI de 0, 3 y 4, respectivamente. Cuanto más alto sea el valor, más daño existe.

Tabla 11: Resultados del Escaneo MicroCT: Volumen Óseo Total (TBV), Volumen Óseo Trabecular (Tb.BV), Factor de Patrón Trabecular (Tb.Pf) e Índice de Modelo de Estructura (SMI).

Grupo	Tratamiento	ID de ratón	Volumen óseo total (TBV) mm ⁻³	Volumen óseo trabecular (Tb.BV) mm ⁻²	Factor de patrón trabecular (Tb.Pf) mm ⁻¹	Índice de modelo estructural (SMI)
Control	Tibia de referencia no inoculada*	38045	2.748	0.244	15.354	1.756
		38596	2.839	0.295	12.373	1.542
		39565	2.930	0.314	14.703	1.847
		38325	2.964	0.309	13.538	1.653
		33746	2.751	0.293	13.270	1.624
		38770	2.567	0.307	13.025	1.645
		37966	2.967	0.410	12.125	1.557
		38604	3.087	0.327	11.902	1.658
		38023	2.775	0.270	18.005	1.889
		38594	2.830	0.311	13.293	1.589
				Media	2.846	0.308
		EEM	0.047	0.014	0.583	0.037
		33150	1.604	0.107	24.329	2.679
		38027	1.742	0.100	23.561	2.667

ES 2 617 446 T3

		38314	2.506	0.256	22.893	2.335
		38446	2.466	0.213	28.280	2.560
		38562	2.688	0.385	22.213	2.086
	Lenalidomida	38626	2.869	0.293	30.739	2.619
A	50 mg/kg	38748	1.786	0.114	24.016	2.562
		39192	1.988	0.081	29.454	2.592
		39364	1.741	0.155	24.205	2.547
		39512	2.007	0.219	38.360	3.125
		Media	2.140	0.192	26.805	2.577
		EEM	0.143	0.031	1.584	0.083
		32094	2.233	0.190	27.049	2.386
		32548	2.893	0.310	15.631	1.818
		33564	2.760	0.356	27.631	2.423
		38016	1.635	0.118	27.523	2.450
		38023	2.681	0.248	17.887	1.860
	B MOR03087, 3 mg/kg	38510	1.838	0.260	21.405	2.461
		38599	2.884	0.482	26.345	2.558
		39086	3.068	0.566	20.327	2.247
		39666	2.547	0.416	25.843	2.318
		39715	2.135	0.284	22.402	2.275
		Media	2.467	0.323	23.204	2.280
		EEM	0.153	0.043	1.365	0.079
		33090	1.821	0.159	26.537	2.714
		33131	1.863	0.132	28.429	2.681
		33746	1.577	0.130	29.171	2.652
	C Testigo de Vehículo	37966	1.865	0.234	18.276	2.327
	(Ora Plus:Ora Sweet SF (1:1) p/p)	38325	2.030	0.096	30.839	2.591
		38596	1.870	0.154	33.079	2.783
		38604	1.904	0.232	23.234	2.607
		38770	2.461	0.210	19.149	2.137
		39426	1.556	0.184	21.846	2.348
		39565	2.235	0.256	24.545	2.365
		Media	1.918	0.179	25.510	2.521
		EEM	0.087	0.017	1.567	0.067
		32695	2.471	0.168	21.323	2.028
		37854	2.527	0.265	15.938	1.758
		38276	3.212	0.220	20.046	2.197
		38550	2.833	0.186	17.907	1.892
	Lenalidomida, AB 50 mg/kg / MOR03087, 3 mg/kg	38594	3.044	0.268	16.530	1.787
		38994	2.896	0.408	14.633	1.683
		39256	2.308	0.304	24.513	2.280
		39555	3.227	0.215	19.753	2.497
		39677	3.205	0.548	12.313	1.799
		39750	2.961	0.281	14.981	1.752
		Media	2.868	0.286	17.794	1.967
		EEM	0.105	0.036	1.152	0.086

El análisis de cada parámetro para actividad sinérgica se realizó de conformidad con el teorema de Clarke et al. La Tabla 12 muestra los cálculos realizados para determinar la sinergia de la combinación de MOR202 y lenalidomida.

Tabla 12

Cuando el EFECTO POSITIVO tiene un valor ALTO:		Cuando el EFECTO POSITIVO tiene un valor BAJO:		
Antagonista = $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$		Antagonista $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$		
Aditivo = $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$		Aditivo = $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$		
Sinérgico = $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$		Sinérgico = $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$		
A = respuesta al tratamiento de LEN 50 mg/kg				
B = respuesta al tratamiento de MOR202 3 mg/kg				
C = respuesta al tratamiento con vehículo				
AB = combinación de los tratamientos 1 y 2				
	BV Total	BV Trabecular	Factor de patrón trabecular	Índice de modelo estructural
A	2,14	0,192	26,805	2,577
B	2,467	0,323	23,204	2,28
C	1,918	0,179	25,51	2,521
AB	2,868	0,286	17,794	1,967
(AB)/C	1,495307612	1,597765363	0,69753038	0,780245934
	es mayor que	es menor que	es menor que	es menor que
(NC) x (B/C)	1,44	1,94	0,96	0,92

5 Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 12 se toman directamente de los promedios que se muestran en la Tabla 11 para cada uno de los parámetros en cada uno de los Grupos. Los Grupos descritos como A, B, C y AB son los mismos grupos de tratamiento en las Tablas 9, 11 y 12.

10 En total, el Volumen Óseo (AB)/C es mayor que (A/C) X (B/C) lo que muestra una clara sinergia. En el factor de patrón Trabecular e Índice de Modelo Estructural, tal como se describe en la Tabla 10, un valor inferior representa menos lisis ósea (eficacia de tratamiento), por lo tanto, (AB)/C menor que (A/C) X (B/C), muestra una clara sinergia en ambos parámetros.

15 Resultados

La inoculación de células de mieloma múltiple NCI-H929 indujo una lisis ósea importante en la tibia de ratones hembra SCID en este estudio, tal como se indica mediante la medición de la lisis ósea a través de un escaneo microCT. El grado de lisis ósea se redujo considerablemente en la tibia de ratones tratados con la combinación de MOR202 y lenalidomida, tal como se muestra mediante escaneo microCT. En cada uno de los parámetros de Escaneo MicroCT: Volumen Óseo Total (TBV), Volumen Óseo Trabecular (Tb. BV), Factor de Patrón Trabecular (Tb. Pf) e Índice de Modelo estructural (SMI), la combinación de MOR2002 y lenalidomida (Grupo AB) mostró una clara sinergia en la reducción de la lisis ósea causada por células de mieloma múltiple NCI-H929.

25 Cuando los valores en la Tabla 11 se ajustan, de forma que el Grupo Testigo (Tibia contralateral no inoculada sin tumor) se considera con 0% de lisis ósea, y el Grupo C (Testigo de vehículo (0.9% de inyección de cloruro de sodio) se considera con 100% de lisis ósea, entonces MOR202 solo redujo la lisis ósea de manera dependiente de dosis hasta 55% a 12 mg/kg en comparación con el Testigo de vehículo. LEN solo a 50 mg/kg inhibió la lisis ósea en un 20%. La combinación de 3 mg/kg de MOR202 y 50 mg/kg de LEN suprimió por completo la lisis ósea. Estos hallazgos confirman un efecto sinérgico de la terapia de combinación. Además, hubo una reducción (>90%) de los niveles de suero de proteína M en el grupo de combinación, lo que indica una reducción importante de la carga de tumor.

Ejemplo 8 MOR202 y lenalidomida solos y en combinación contra tumor RAMOS de no Hodgkin humano en modelo de supervivencia de ratones SCID hembras

Materiales

5 Ciclofosfamida (Fluka, Buchs Suiza, Lote No. 07551661). Lenalidomida (SYNthesis Med Chem; Shanghai, China; Lote No. ZHM-066-051). MOR202 (MorphoSys AG, Lote 100706-5KLE18). Testigo de vehículo: Ora-Plus:Ora-Sweet SF, 1:1, v/v (SYNthesis Med Chem, Shanghai, China). Ratones SCID (University of Adelaide, Waite Campus, Urrbarraie, SA, Australia, Cepa C.B.-17-Igh-1^b-Prkdc^{scid}).

10 Se cultivaron células RAMOS (Oncodesign, Dijon Cedex, Francia) en RPMI1640 + 20% de una fuente alterna inactivada de calor FBS + 1 % de Glutamax (Medio No. 2). Los reactivos para cultivo de células RAMOS de linfoma no Hodgkin se obtuvieron de los siguientes proveedores: Medio de cultivo celular RPMI 1640, FBS, Glutamax, HEPES, piruvato de sodio, HBSS y penicilina-estreptomina de Invitrogen Australia (Mt Waverley, VIC, Australia); y azul de tripano y glucosa de Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia).

15 **Métodos**

Sesenta y ocho ratones SCID hembras fueron pre-tratados con Ciclofosfamida (75 mg/kg, i.p., dos veces al día) durante dos días antes de la inoculación de células RAMOS (Día -5 y -4). El día de la inoculación (Día -3), todos los ratones fueron inoculados con 1×10^6 células RAMOS cada una por vía intravenosa en la vena de la cola. Sesenta y cuatro de los ratones fueron aleatorizados por peso corporal en ocho grupos de ocho. El régimen de dosificación para cada grupo se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13: Régimen de dosificación

Grupo	Compuesto	Tratamiento	Régimen pretendido	Régimen real
A	Lenalidomida	50 mg/kg, vía oral, en 10 mL/kg	Una vez al día (Día 0-20)	Día 0-20
B	MOR03087	1 mg/kg, i.v., en 10 mL/kg	Dos veces a la semana (Día 0, 4, 7, 11, 14 y 18)	Dos veces a la semana (Día 0, 4, 7, 11, 14 y 18)
C	Vehículo testigo (Ora-Plus: Ora-Sweet, 1:1, v/v)	vía oral, 10 mL/kg	Una vez al día (Día 0-20)	Día 0-18
AB	Lenalidomida /MOR03087	100/1 mg/kg, vía oral/i.v., en 10 mL/kg	Una vez al día/dos veces a la semana (como anteriormente)	Día 0-13 y 16-20/ Día 0, 4, 7, 11, 14 y 18

25 El estudio continuó durante 98 días y el punto final medido fue la supervivencia. Los resultados de cada Grupo se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Número de Supervivencia y período de tiempo para cada grupo

	Día de muerte (post-inoculación)				%ILS (en base al día de muerte medio)	Número de ratones vivos al final del estudio (día 98)
	Mediana	Rango	Media	95% de IC		
A: LEN 100 mg/kg	22	18-23	21.4	19.8-23.0	10	0/7
B: MOR202 1 mg/kg	51	35-65	49.6	41.9-57.3	155	0/8
C: Testigo de vehículo	20	18-21	19.8	18.7-20.8	X	0/8
AB: Combo LEN/MOR	65	32-98	66.5	41.9-91.2	225	3/8

Los análisis para actividad sinérgica se realizaron de conformidad con el teorema de Clarke et al., tal como se describe en el Ejemplo 4. La Tabla 15 muestra los cálculos realizados para determinar la sinergia de la combinación de MOR202 y lenalidomida.

5 Tabla 15

Quando el EFECTO POSITIVO tiene un valor ALTO:	Quando el EFECTO POSITIVO tiene un valor BAJO:
Antagonista = $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$	Antagonista = $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$
Aditivo = $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$	Aditivo = $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$
Sinérgico = $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$	Sinérgico = $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$
A = respuesta al tratamiento con LEN 100 mg/kg	
B = respuesta al tratamiento con MOR202 1 mg/kg	
C = respuesta al tratamiento con vehículo	
AB = combinación de los tratamientos A y B	
Supervivencia media	
A	22
B	51
C	20
AB	65
(AB)/C	3,25
es mayor que	
(A/C) x (B/C)	2,805

Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 15 se toman directamente de los días de supervivencia media que se muestran en la Tabla 14 para cada uno de los Grupos. Los Grupos descritos como A, B, C y AB son los mismos grupos de tratamiento en las Tablas 13-15.

10 La inoculación con células RAMOS fue letal dentro de un tiempo medio de 20 días en el grupo testigo. La combinación de MOR202 y lenalidomida, sin embargo, mostró una clara sinergia en el aumento de los días de supervivencia media.

15 Ejemplo 9: Bortezomib solo inhibió la proliferación de varias líneas células de mieloma múltiple.

20 El efecto inhibitorio de Bortezomib en la proliferación de células de mieloma múltiple se analizó para múltiples líneas celulares. Se aplicaron cantidades cada vez más altas de Bortezomib (Velcade®, Lote: No.: 9AZSY00) a células AMO-1, LP-1, NCI-H929 y RPMI-8226 y se incubaron durante 24h, 48h y 72h. Después de la incubación, se analizaron las placas de los períodos en busca de proliferación celular en un ensayo en base a XTT colorimétrico cuantitativo utilizando el kit de proliferación celular II (ROCHE, Kit de proliferación celular II, Cat. No.: 11465015001). Para mediciones posteriores, las placas se sometieron a una lectora Tecan Genios y se detectó absorbancia a 492nm.

25 La proliferación celular de todas las líneas celulares evaluadas se inhibió mediante Bortezomib con una concentración CI50 de 3.9 nM para células AMO-1, 6.1 nM para células LP-1, 3.3 nM para células NCI-H929 y 9.0 nM para células RPMI-8226, respectivamente, tal como se muestra en la Figura 8.

30 Ejemplo 10: ADCC utilizando la combinación de MOR202 y Bortezomib
Usando los métodos descritos en el Ejemplo 4, se analizó el efecto ADCC de combinar bortezomib y MOR202. Aquí, las células blanco se trataron con bortezomib antes del tratamiento con MOR202. Ambas células blanco, NCI-H929 y LP-1 fueron evaluadas. Los resultados se muestran en las Figuras 9 y 10. La mejora de la actividad de MOR202 mediante bortezomib fue mediada a través del efecto citotóxico directo en células de MM.

Ejemplo 11: MOR202 y BOR solos y en combinación en modelo de ratón SCID de lisis ósea de NCI-H929 de mieloma múltiple humano

Materiales

5 Bortezomib (SYNthesis med chem., Shanghai, China, Lote No. ZHM-066-054). Bortezomib se formuló en solución de Cloruro de Sodio al 0.9% estéril para dosificación. MOR202 (MorphoSys AG, Lote 100706-5KLE18). Testigo de vehículo: 0.9% de inyección de cloruro de sodio. Ratones SCID (University of Adelaide, Waite Campus, Urrbariae, SA, Australia, Cepa C.B.-17-Igh-1^b-Prkdc^{scid}).

Métodos

10 63 ratones SCID fueron inoculados el Día (-7) por vía intratibial con 2.5×10^6 células NCI-H929 de MM con el fin de inducir la lisis ósea. Tres días post inoculación (Día-4), 60 de los ratones SCID fueron aleatorizados por peso corporal en los grupos que se muestran en la Tabla 16, 10 ratones por grupo. El régimen de dosificación se proporciona en la Tabla 16. Los tratamientos con Bortezomib (Grupos A y AB) y Testigo de vehículo (Grupo C) comenzaron el Día (-1). Los tratamientos con MOR202 (Grupos B y AB) comenzaron el Día 0. El tratamiento continuó durante 6 semanas.

Tabla 16: Régimen de dosificación y Grupos

Grupo	Compuesto	Tratamiento	Régimen
A	Bortezomib	0.6 mg/kg, i.p., en 10 mL/kg	dos veces por semana
B	MOR202	3 mg/kg, i.p., in 10 mL/kg	tres veces por semana
C	Testigo de vehículo (0.9% de inyección de cloruro de sodio)	i.p., 10 mL/kg	dos veces por semana
AB	Bortezomib/MOR202	0.6/3 mg/kg, i.p., en 10 mL/kg	dos veces/tres veces por semana, en días alternados

20 Se utilizó un Escaneo MicroCT para evaluar la lisis ósea y se incluyó un análisis 3-dimensional que comprendió el Volumen Óseo Total (TBV), Volumen Óseo Trabecular (Tb.BV), Factor de Patrón Trabecular (Tb.Pf) e Índice del Modelo estructural (SMI). La Tabla 10 anterior define cada uno de estos parámetros. Los resultados de cada uno de los parámetros del Escaneo MicroCT se muestran en la Tabla 17. Los resultados del Volumen Óseo Total (TBV) se muestran en la Figura 20.

25 **Tabla 17:** Resultados del Escaneo MicroCT: Volumen Óseo Total (TBV), Volumen Óseo Trabecular (Tb.BV), Factor de Patrón Trabecular (Tb.Pf) e Índice de Modelo estructural (SMI).

Grupo	Tratamiento	ID de ratón	Volumen óseo total (TBV) mm ⁻³ mm	Volumen óseo trabecular (Tb.BV) mm ⁻² mm	Factor de patrón trabecular (Tb.Pf) mm ¹ mm	Índice de modelo estructural (SMI)
Testigo:		115898	2.771	0.400	12.097	1.525
Tibia contralateral 1 no inoculada sin tumor		116259	3.255	0.598	7.999	1.264
	Tibia de referencia, un ratón de los Grupos A, B, C Y AB)	109482	3.194	0.566	5.596	1.025
		107508	2.945	0.346	16.910	1.860
	Promedio		3.041	0.477	10.650	1.419
	EEM		0.112	0.062	2.481	0.179

ES 2 617 446 T3

		101426	2.351	0.307	25.893	2.443
		105949	2.025	0.191	26.044	2.374
		107598	3.109	0.557	16.877	2.156
		109560	3.146	0.588	23.179	2.262
		113302	1.790	0.067	32.463	2.700
	Bortezomib,	115836	1.893	0.076	33.152	2.981
A	0.6 mg/kg, dos veces por semana, i.p.	116981	2.201	0.100	34.609	3.007
		117585	1.617	0.093	31.813	2.553
		117750	2.300	0.284	27.147	2.337
		117793	2.448	0.329	23.582	2.273
		Promedio	2.288	0.259	27.476	2.509
		EEM	0.162	0.061	1.756	0.094
		106446	1.924	0.082	27.363	2.546
		109482	1.987	0.388	19.479	2.079
		112220	2.155	0.394	21.858	2.296
		113668	1.958	0.276	23.814	2.429
	MOR202,	115187	2.080	0.440	16.347	1.871
B	3 mg/kg, tres veces por semana, i.p.	115956	2.207	0.460	19.748	2.193
		116312	1.885	0.234	25.212	2.368
		116798	1.882	0.254	21.276	2.436
		116944	1.937	0.276	24.031	2.368
		117773	1.862	0.160	25.056	2.511
		Promedio	1.988	0.296	22.418	2.310
		EEM	0.038	0.039	1.044	0.066
		107097	1.619	0.248	22.779	2.246
		112122	1.608	0.178	26.514	2.505
		115971	1.637	0.241	24.603	2.485
	Testigo de vehículo: (0.9% de inyección de cloruro de sodio: dos veces por semana, i.p.	116259	1.880	0.369	19.334	2.176
		116585	2.060	0.179	24.120	2.369
		116779	1.624	0.190	23.909	2.417
		117054	1.782	0.131	23.000	2.541
		117110	1.838	0.281	22.602	2.312
		117242	1.919	0.281	21.162	2.193
		117375	1.899	0.283	23.455	2.338
		Promedio	1.786	0.238	23.148	2.358
		EEM	0.050	0.022	0.615	0.041
		107508	3.303	0.927	16.902	2.158
		112625	4.254	1.661	3.000	0.772
		113322	3.684	1.332	3.888	0.884
		116030	2.422	0.192	30.272	2.542

AB	Bortezomib/MOR 202, 0.6/3 mg/kg, dos/tres veces por semana, i.p	116198	3.537	1.037	8.023	1.217
		116376	1.933	0.255	22.059	2.321
		116520	2.793	0.654	22.439	2.336
		117077	3.402	0.658	7.207	1.241
		117093	2.436	0.643	17.454	1.927
		117135	3.026	0.627	13.699	1.775
	Promedio		3.079	0.799	14.494	1.717
	EEM		0.220	0.144	2.836	0.204

El análisis de cada parámetro para actividad sinérgica se realizó de conformidad con el teorema de Clarke et al., tal como se describe en el Ejemplo 4. La Tabla 18 muestra los cálculos realizados para determinar la sinergia de la combinación de MOR202 y bortezomib.

5 Tabla 18

Cuando el EFECTO POSITIVO tiene un valor MÁS ALTO:			Cuando el EFECTO POSITIVO tiene un valor MÁS BAJO:	
Antagonista = $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$			Antagonista = $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$	
Aditivo = $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$			Aditivo = $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$	
Sinérgico = $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$			Sinérgico = $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$	
A = respuesta al tratamiento con BOR a 0.6 mg/kg				
B = respuesta al tratamiento con MOR202 a 3 mg/kg				
C = respuesta al tratamiento con vehículo de 0.9% de Cloruro de Sodio				
AB = combinación de los tratamientos A y B				
Grupo	BV Total	BV Trabecular	Factor de patrón trabecular	Índice de modelo estructural
A	2,298	0,259	27,476	2,509
B	1,988	0,296	22,418	2,31
C	1,786	0,238	23,148	2,358
AB	3,079	0,799	14,494	1,717
(AB)/C		3,357142857	0,626144807	0,728159457
	es mayor que	es mayor que	es menor que	es menor que
(A/C) x		1,353435492	1,149538246	1,042377527

Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 18 se toman directamente de los promedios que se muestran en la Tabla 17 para cada uno de los parámetros en cada uno de los Grupos. Los Grupos descritos como A, B, C y AB son los mismos grupos de tratamiento en las Tablas 16-18.

10 En total, el Volumen Óseo Total y Volumen Óseo Trabecular, (AB)/C es mayor que (A/C) X (B/C), lo que muestra una clara sinergia. En el factor de patrón Trabecular e Índice de Modelo Estructural, tal como se describe en la Tabla 10, un valor inferior representa menos lisis ósea (eficacia de tratamiento), por lo tanto, (AB)/C menor que (A/C) X (B/C), confirma una clara sinergia en ambos parámetros.

15 Resultados

La inoculación de células de mieloma múltiple NCI-H929 indujo una lisis ósea importante en la tibia de ratones hembra SCID en este estudio, tal como se indica mediante la medición de la lisis ósea a través de un escaneo

microCT. El grado de lisis ósea se redujo considerablemente en la tibia de ratones tratados con la combinación de MOR202 y bortezomib, tal como se muestra mediante escaneo microCT. En cada uno de los parámetros de Escaneo MicroCT: Volumen Óseo Total (TBV), Volumen Óseo Trabecular (Tb. BV), Factor de Patrón Trabecular (Tb. Pf) e Índice de Modelo estructural (SMI), la combinación de MOR2002 y bortezomib (Grupo AB) mostró una clara sinergia en la reducción de la lisis ósea causada por células de mieloma múltiple NCI-H929.

Cuando los valores en la Tabla 17 se ajustan, de forma que el Grupo Testigo (Tibia contralateral no inoculada sin tumor) se considera con 0% de lisis ósea, y el Grupo C (Testigo de vehículo (0.9% de inyección de cloruro de sodio) se considera con 100% de lisis ósea, entonces MOR202 solo redujo la lisis ósea de manera dependiente de dosis hasta 55% a 12 mg/kg en comparación con el Testigo de vehículo, BOR solo a 0.6mg/kg inhibió la lisis ósea en un 40% y la combinación de una dosis inferior de 3mg/kg MOR202 y 0.6mg/kg de BOR suprimió completamente la lisis ósea. Estos hallazgos respaldan un efecto sinérgico de la terapia de combinación. Además, hubo una reducción (>90%) de los niveles de suero de proteína M en el grupo de combinación, lo que indica una reducción importante de la carga de tumor.

Ejemplo 12 MOR202 y bortezomib solos y en combinación contra tumor RAMOS de no Hodgkin humano en modelo de supervivencia de ratones SCID hembras

Materiales

Ciclofosfamida (Fluka, Buchs Suiza, WB10468). Bortezomib (SYNthesis med chem., Shanghai, China, Lote No. ZHM-066-054). Bortezomib se formuló en solución de cloruro de sodio al 0.9% estéril para dosificación. MOR202 (MorphoSys AG, Lote 100706-5KLE18). Testigo de vehículo: 0.9% de inyección de cloruro de sodio. Ratones SCID (University of Adelaide, Waite Campus, Urrbarai, SA, Australia, Cepa C.B.-17-Igh-1^b-Prkdc^{scid}).

Se cultivaron células RAMOS (Oncodesign, Dijon Cedex, Francia) en RPMI1640 + 20% de una fuente alterna inactivada de calor FBS + 1 % de Glutamax (Medio No. 2). Los reactivos para cultivo de células RAMOS de linfoma no Hodgkin se obtuvieron de los siguientes proveedores: Medio de cultivo celular RPMI 1640, FBS, Glutamax, HEPES, piruvato de sodio, HBSS y penicilina-estreptomina de Invitrogen Australia (Mt Waverley, VIC, Australia); y azul de tripano y glucosa de Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia).

Métodos

Cincuenta y cinco ratones SCID hembras fueron pre-tratados con ciclofosfamida (75 mg/kg, i.p., dos veces al día) durante dos días antes de la inoculación de células RAMOS (Día -5 y -4). El día de la inoculación (Día -3), los cincuenta y cinco los ratones fueron inoculados con 1×10^6 células RAMOS cada una (en 100 μ l) por vía intravenosa en la vena de la cola. Cuarenta y ocho de los ratones fueron aleatorizados por peso corporal en seis grupos de ocho. El régimen de dosificación para cada grupo se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19: Régimen de dosificación

Grupo	Compuesto	Tratamiento	Régimen pretendido	Régimen real
A	Bortezomib	0.6 mg/kg, i.p., en 10 mL/kg	Día -1, 3, 6, 10, 13 y 17	Día -1, 3, 6 y 13
B	MOR202	1 mg/kg, i.v., en 10 mL/kg	Día 0, 4, 7, 11, 14 y 18	Día 0, 4, 7, 11, 14 y 18
C	Testigo de vehículo (0.9% de solución salina para inyección)	i.p., 10 mL/kg	Día -1, 3, 6, 10, 13 y 17	Día -1, 3, 6, 13 y 17
AB	Bortezomib/MOR202	0.6/1 mg/kg, i.p./i.v., en 10 mL/kg	Día -1, 3, 6, 10, 13 y 17/ Día 0, 4, 7, 11, 14 y 18	Día -1, 3, 6, 13, 17 y 20/ Día 0, 4, 7, 11, 14 y 18

El estudio continuó durante 98 días y el punto final medido fue la supervivencia. Los resultados de cada Grupo se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Número de Supervivencia y período de tiempo para cada grupo

	Días de muerte (post-inoculación)				% de ILS (en base al día de muerte medio)	Número de ratones vivos al final del estudio (día 98)
	Mediana	Rango	Media	95% de IC		
A: BOR 0.6 mg/kg	19	18-20	19.1	18.4-19.8	-7	0/8
B: MOR202 1 mg/kg	43.5	38-52	43.6	39.0-48.3	112	0/8
C: Testigo de vehículo	20.5	20-22	20.8	20.0-21.5	x	0/8
AB: Combo BOR/MOR	45	29-98	61.6	19.7-103.5	120	2/5

El análisis de actividad sinérgica se realizó de conformidad con el teorema de Clarke et al. La Tabla 21 muestra los cálculos realizados para determinar la sinergia de la combinación de MOR202 y bortezomib.

5

Tabla 21

Cuando el EFECTO POSITIVO tiene un valor MÁS ALTO:	
Antagonista = $(AB)/C < (A/C) \times (B/C)$	
Aditivo = $(AB)/C = (A/C) \times (B/C)$	
Sinérgico = $(AB)/C > (A/C) \times (B/C)$	
A = respuesta al tratamiento con BOR 0.6 mg/kg	
B = respuesta al tratamiento con MOR202 1 mg/kg	
C = respuesta al tratamiento con vehículo de 0.9% de Cloruro de Sodio	
AB = combinación de los tratamientos A y B	
Supervivencia media	
A	19
B	43,5
C	20,5
AB	45
(AB)/C	2,195121951
	es mayor que
(A/C) x (B/C)	1,966686496

Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 21 se toman directamente de los días de supervivencia media que se muestran en la Tabla 20 para cada uno de los Grupos. Los Grupos descritos como A, B, C y AB son los mismos grupos de tratamiento en las Tablas 19-21.

10

La inoculación con células RAMOS fue letal dentro de un tiempo medio de 20.5 días en el grupo testigo. La combinación de MOR202 y bortezomib, sin embargo, mostró una clara sinergia en el aumento de los días de supervivencia media. Es importante señalar que con la combinación de MOR202 y bortezomib (Grupo AB), 2 de 5 ratones sobrevivieron durante todo el estudio. Esto confirma un hallazgo sinérgico de la combinación de MOR202 y bortezomib.

15

REIVINDICACIONES

1. Una combinación sinérgica de un anticuerpo específico para CD38 que comprende una región de HCDR1 de la secuencia SYVMN (SEQ ID NO: 14), una región HCDR2 de la secuencia GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2), una HCDR3 de la secuencia DLPLVYTGfAY (SEQ ID NO: 3), una región LCDR1 de la secuencia SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4), una región LCDR2 de la secuencia GDSKRPS (SEQ ID NO: 5) y una región LCDR3 de la secuencia QTYTGGASL (SEQ ID NO: 6) y
- (a) talidomida, lenalidomida, o pomalidomida, o
 (b) bortezomid,
 para utilizar en un método para el tratamiento del mieloma múltiple y/o linfoma no Hodgkin.
2. La combinación para utilizar de conformidad con la reivindicación 1, que comprende una región HCDR1 de la secuencia GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1).
3. La combinación para utilizar de conformidad con la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada variable de la secuencia
- QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDPSNTYYADSVKGRFTISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDLPLVYTGfAYWGQGLTVTV SS (SEQ ID NO: 10)
 y una cadena liviana variable de la secuencia
 DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYVYQKPGQAPVLVIYGDskRPSGIPERFSGSNGNTATLTISGTQ
 AEDEADYYCQTYTGGASLVFGGgTKLTVLgQ (SEQ ID NO: 11).
4. La combinación para utilizar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho anticuerpo es una IgG.
5. La combinación para utilizar de conformidad con la reivindicación 4, donde dicho anticuerpo comprende una región Fc de IgG1.
6. La combinación para utilizar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho anticuerpo comprende una región Fc modificada, donde dicha modificación mejora la actividad de ADCC.
7. La combinación para utilizar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho anticuerpo y dicha talidomida, lenalidomida, pomalidomida, o bortezomib se administran por separado.
8. La combinación para utilizar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es capaz de reducir la lisis ósea con una eficacia al menos dos veces mejor que la lenalidomida y/o bortezomib solos.
9. La combinación para utilizar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho anticuerpo se combina con dicha talidomida, lenalidomida, o pomalidomida.
10. La combinación para utilizar de conformidad con la reivindicación 9, que comprende:
- (a) dicho anticuerpo y dicha lenalidomida;
 (b) dicho anticuerpo y dicha talidomida; o
 (c) dicho anticuerpo y dicha pomalidomida.
11. La combinación para utilizar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho anticuerpo y dicha lenalidomida, talidomida, pomalidomida, o bortezomib se administran de forma subsecuente.
12. La combinación para utilizar de conformidad con la reivindicación 10 u 11, donde dicha lenalidomida, talidomida, o pomalidomida se administran antes de la administración de dicho anticuerpo.
13. La combinación para utilizar de conformidad con la reivindicación 12, donde dicha lenalidomida, talidomida, o pomalidomida se administra al menos 72 horas antes de la administración de dicho anticuerpo.
14. La combinación para utilizar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9-13, que es capaz de mediar la destrucción de células AMO-1 y/o NCI-H929 que expresan CD38 mediante ADCC en presencia de PBMC aisladas humanas con una eficacia al menos dos veces mejor que la lenalidomida sola.
15. La combinación para utilizar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende dicho anticuerpo y dicho bortezomib.

16. La combinación para utilizar de conformidad con la reivindicación 15, que es capaz de mediar la destrucción de células LP-1 y/o NCI-H929 que expresan CD38 mediante ADCC en presencia de PBMC aisladas humanas con una eficacia al menos dos veces mejor que el bortezomib solo.

Figura 1

Regulación al alza de CD38 en células AMO-1 mediante Lenalidomida

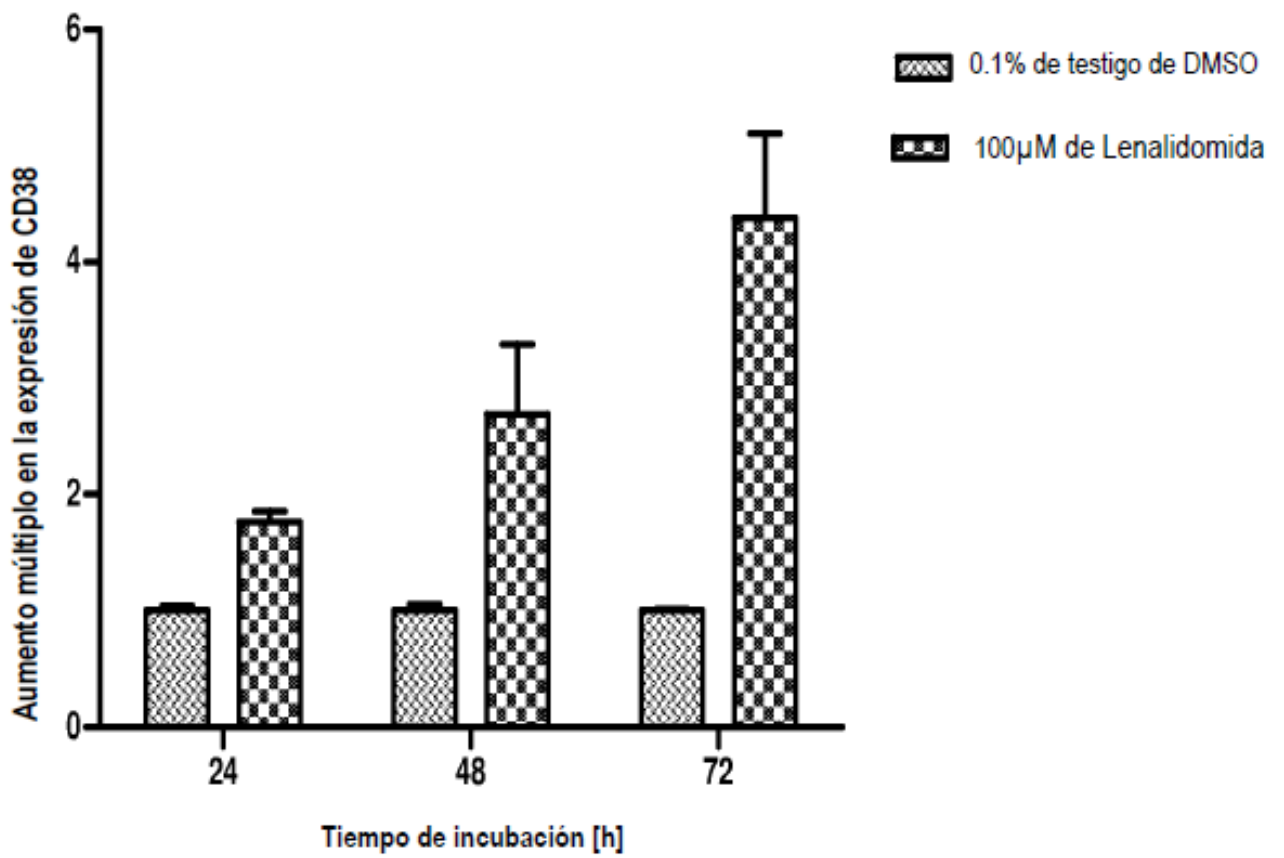


Figura 2

Influencia de Lenalidomida sola en la proliferación celular

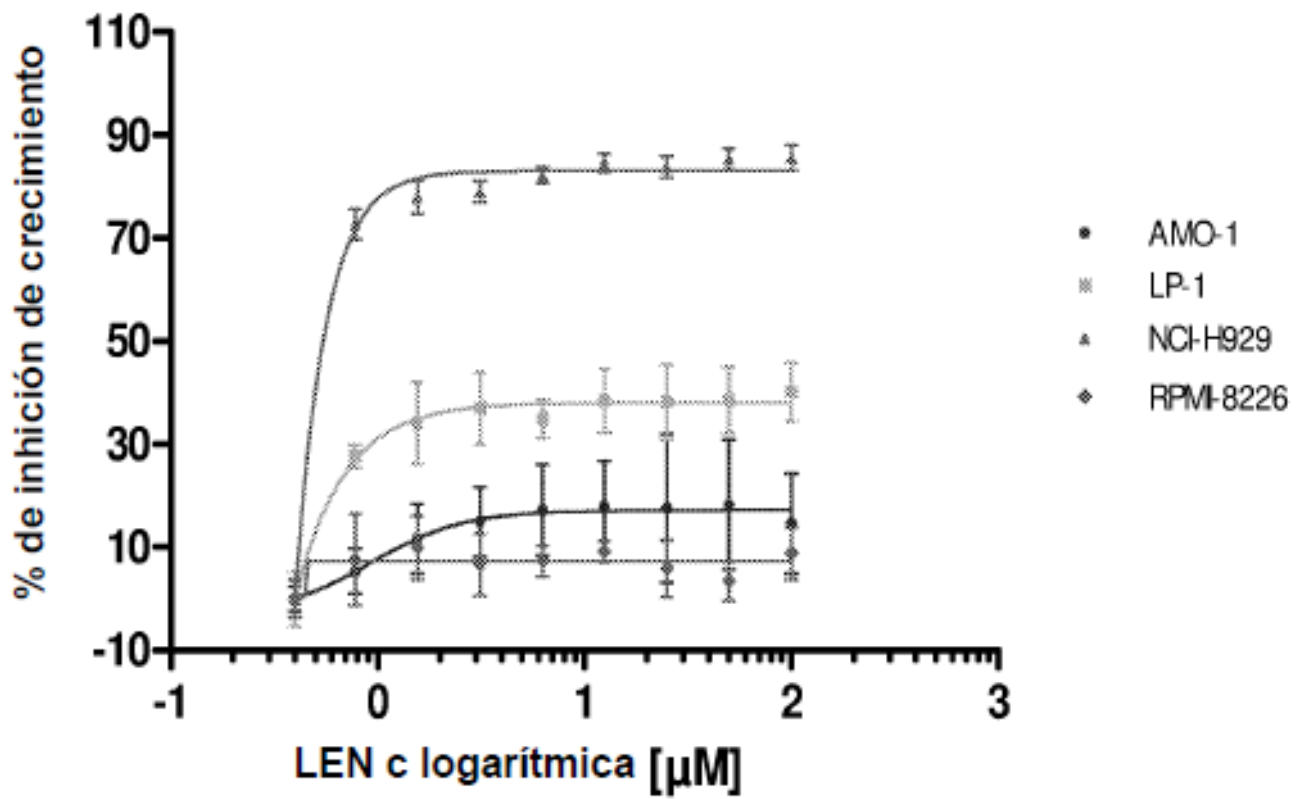
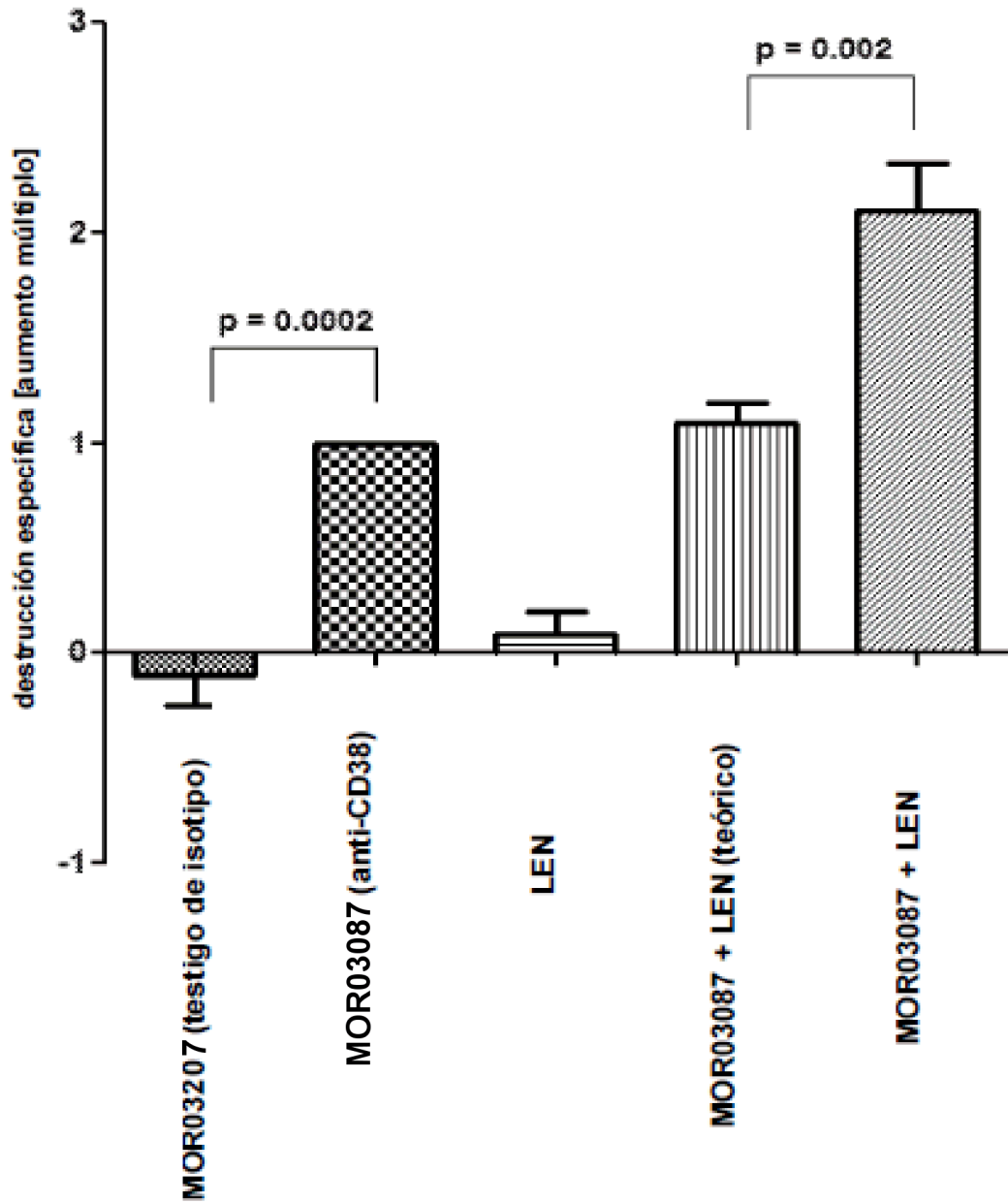


Figura 3

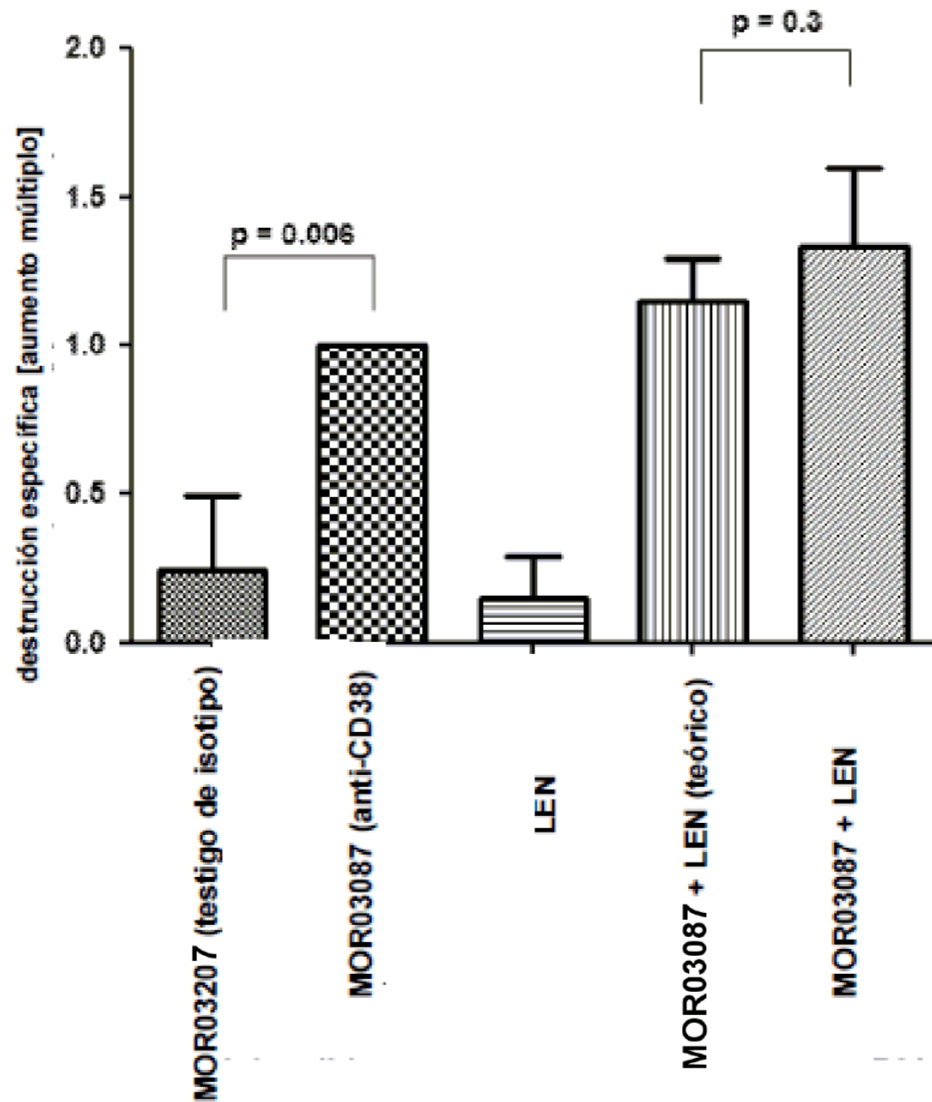
ADCC con PBMC y AMO-1, 10 μ M de lenalidomida (LEN) y 15 μ g/ml de anticuerpo, n = 3



PBMC y células AMO-1 tratadas con lenalidomida antes del tratamiento con MOR;

Figura 4

ADCC con PBMC y AMO-1, 10 μ M de lenalidomida (LEN) y 15 μ g/ml de anticuerpo, n = 3



Las PBMC solas se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202.

Figura 5

Regulación al alza de CD38 en células NCI-H929 con Lenalidomida

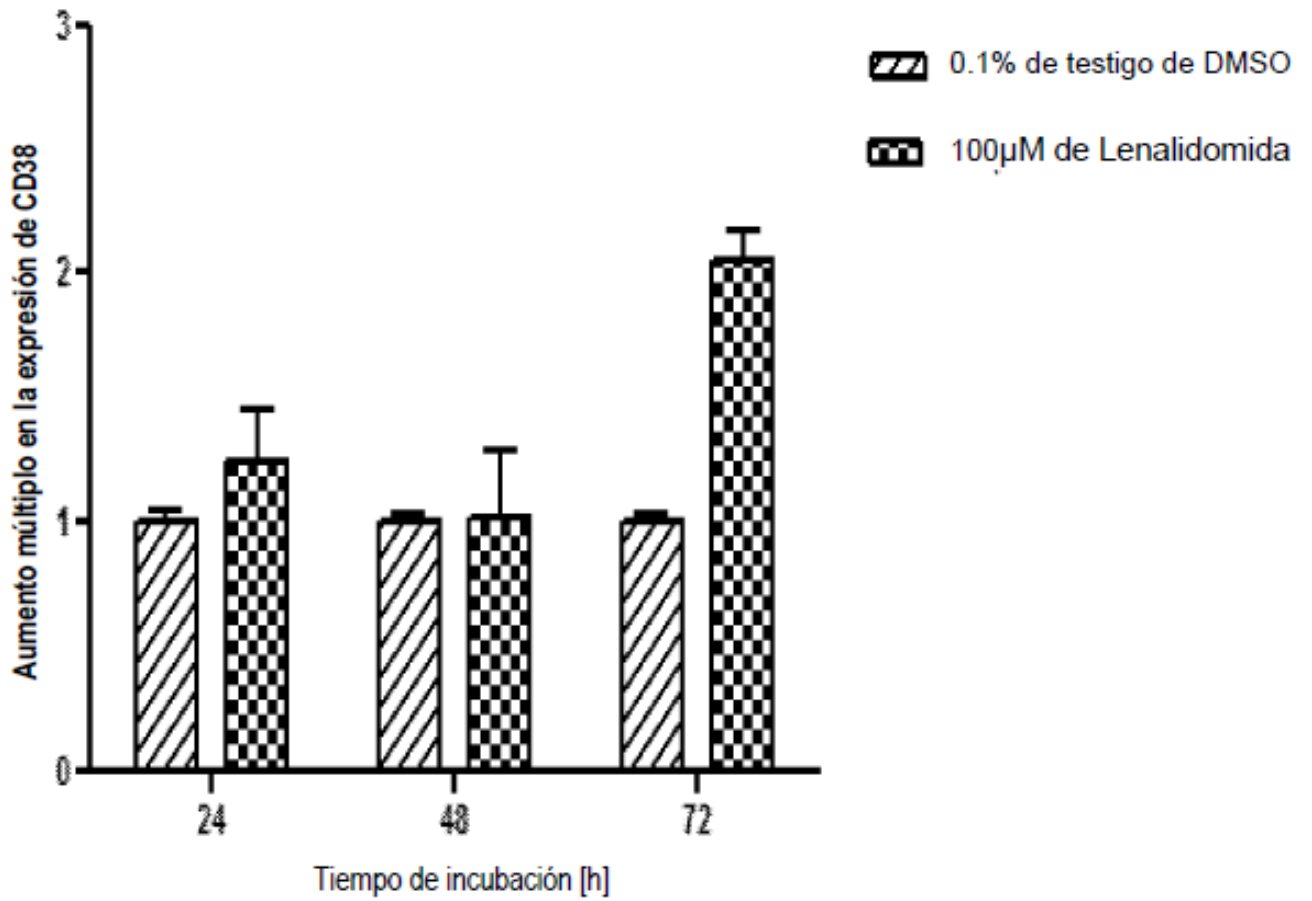
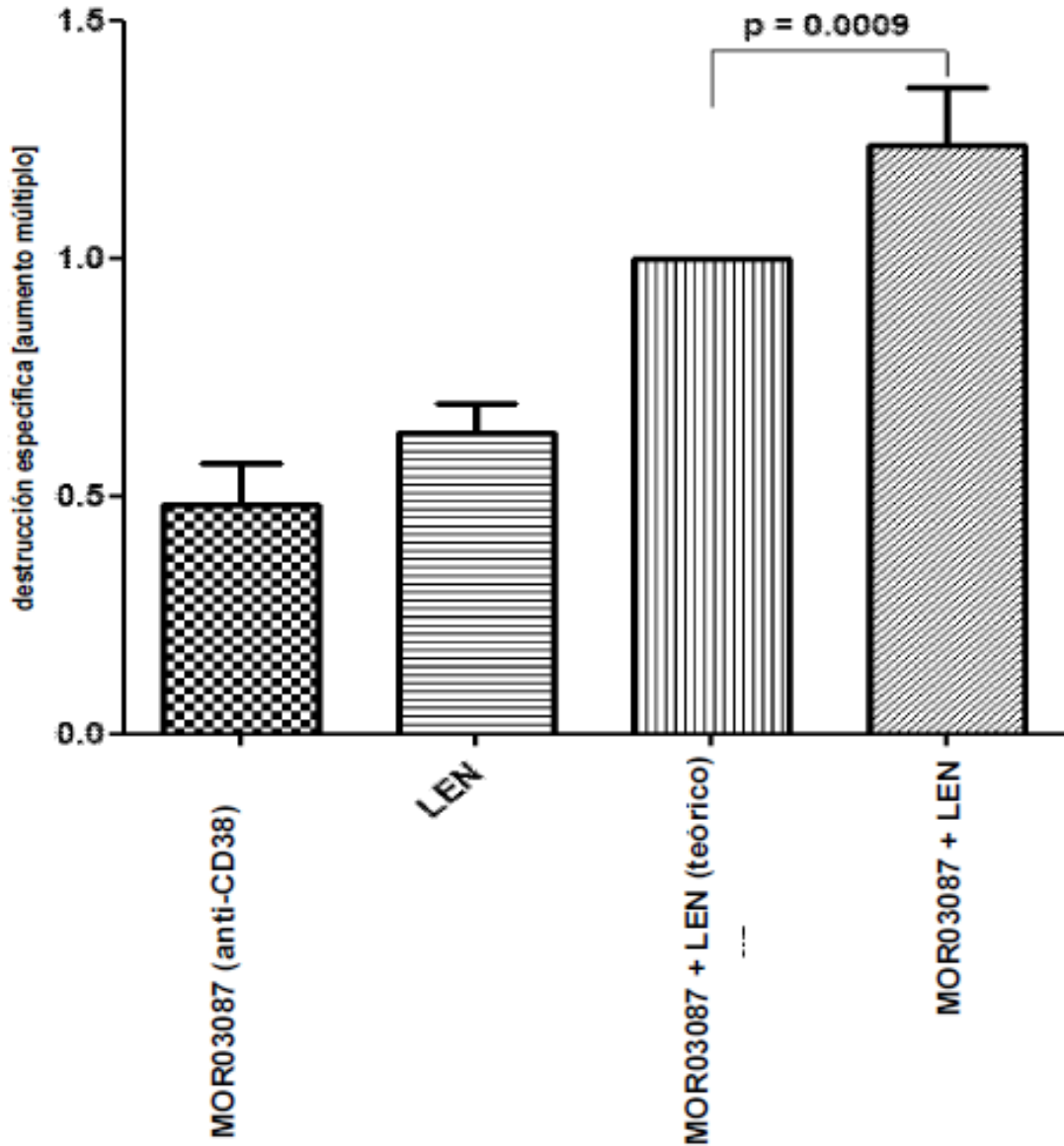


Figura 6

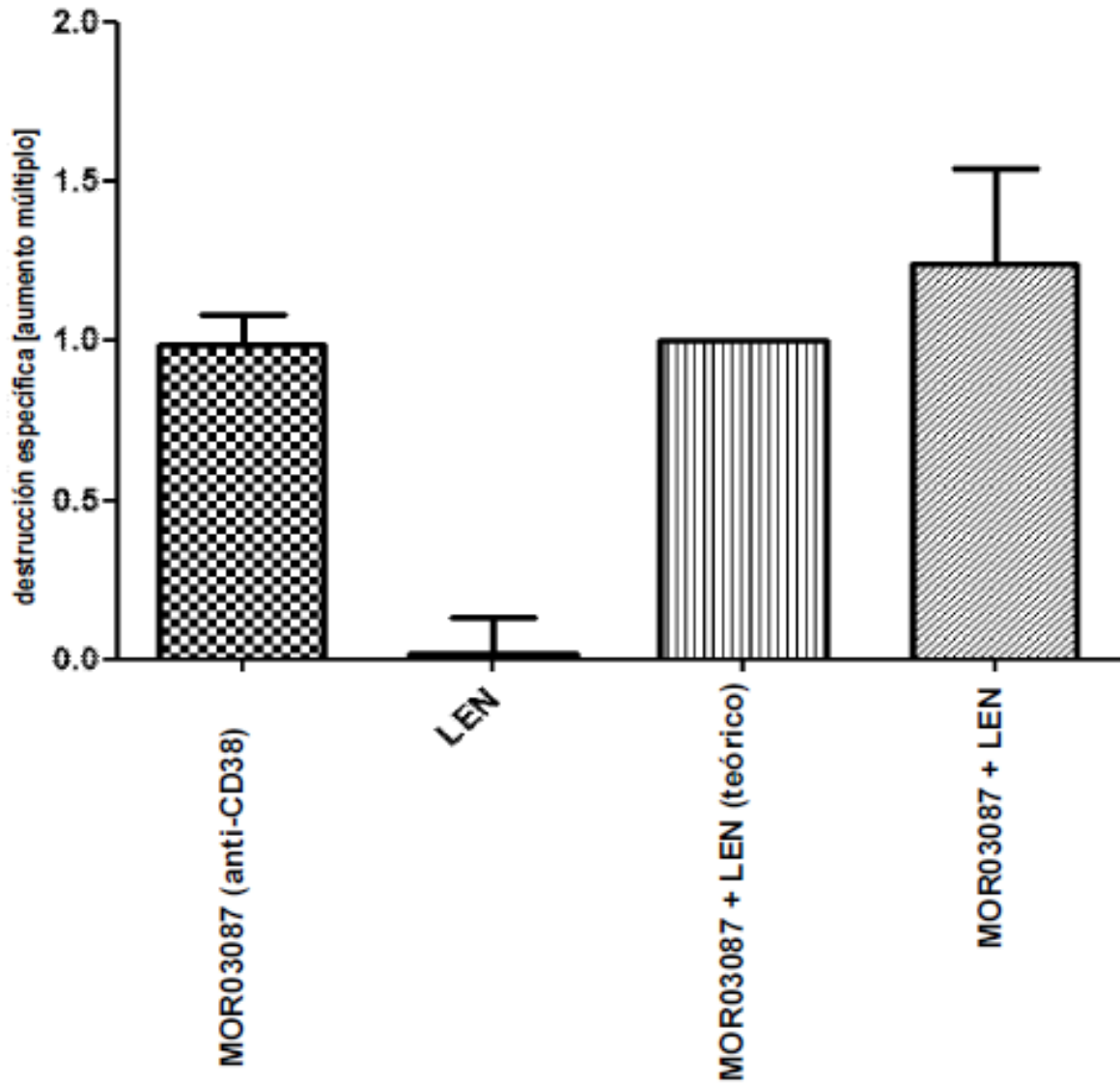
ADCC con PBMC y NCI-H929, 5µm de LEN y 0.2 o 0.07µg/ml de MO03087, n = 3



Las PBMC y células NCI-H929 se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202.

Figura 7

ADCC con PBMC y NCI-H929, 5 μ m de LEN y 0.2 o 0.07 μ g/ml de MO3087, n = 3



Las PBMC solas se trataron con lenalidomida antes del tratamiento con MOR202.

Figura 8

Proliferación celular a 72 horas, Bortezomib solo

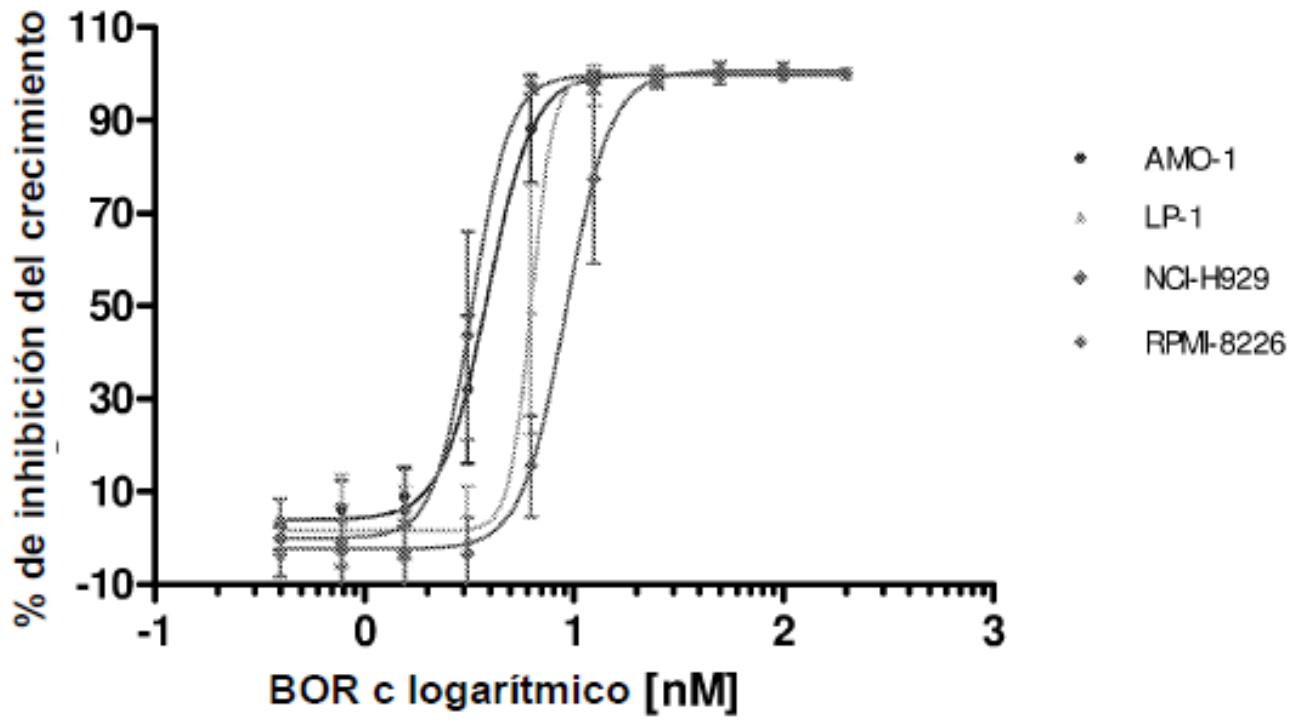


Figura 9

Efecto de MOR202 y velcade en ADCC en células NCI-H929

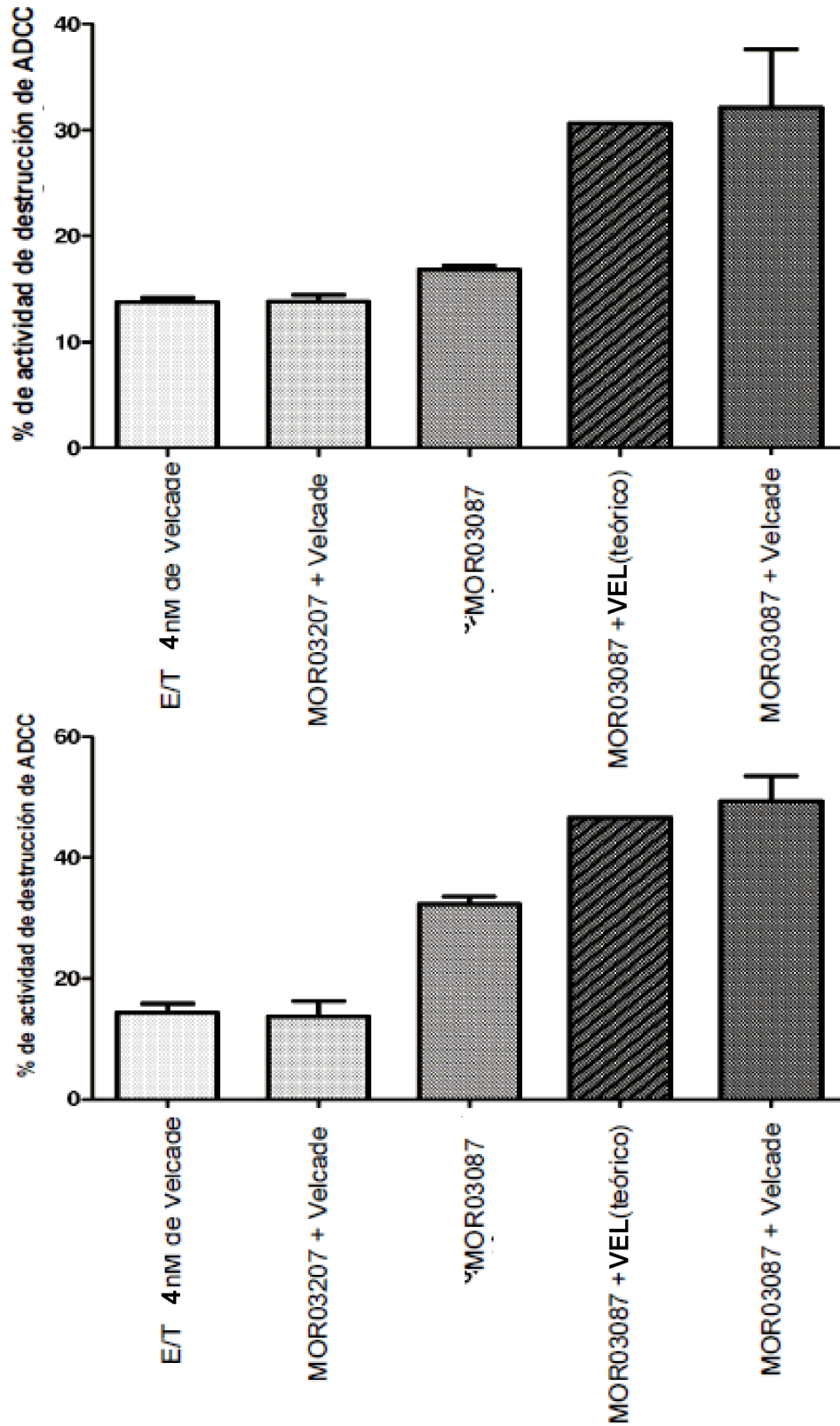


Figura 10

Efecto de MOR202 y Velcade en ADCC en células LP-1

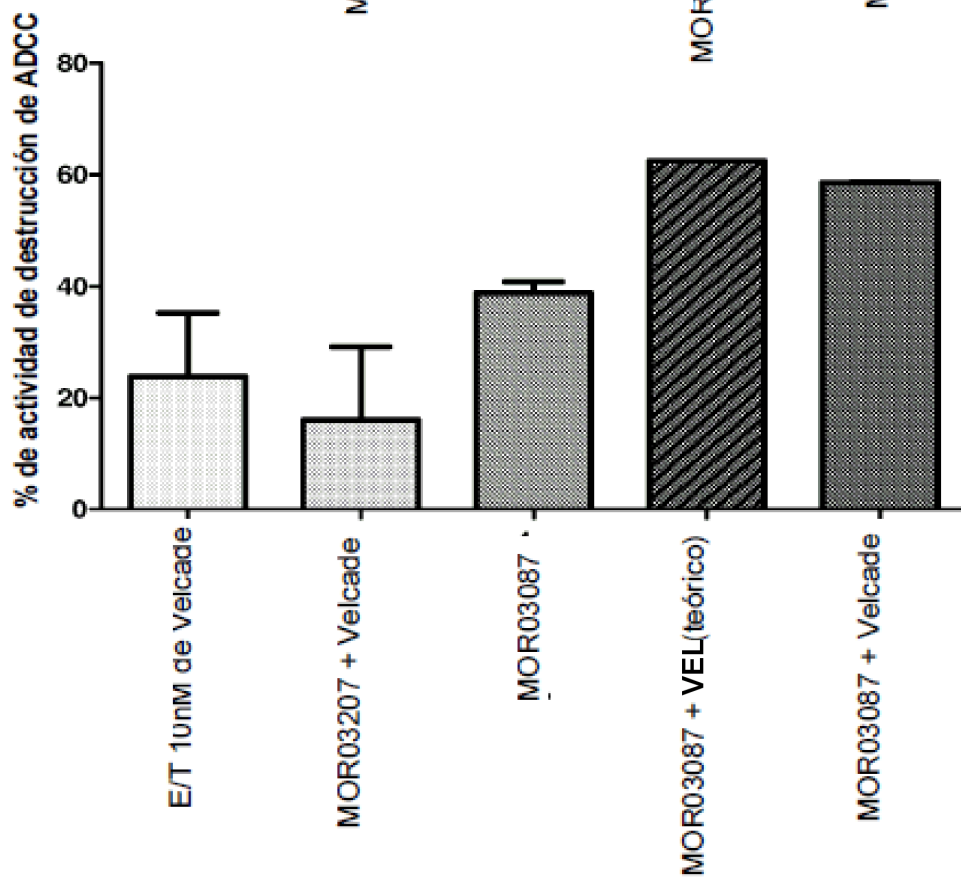
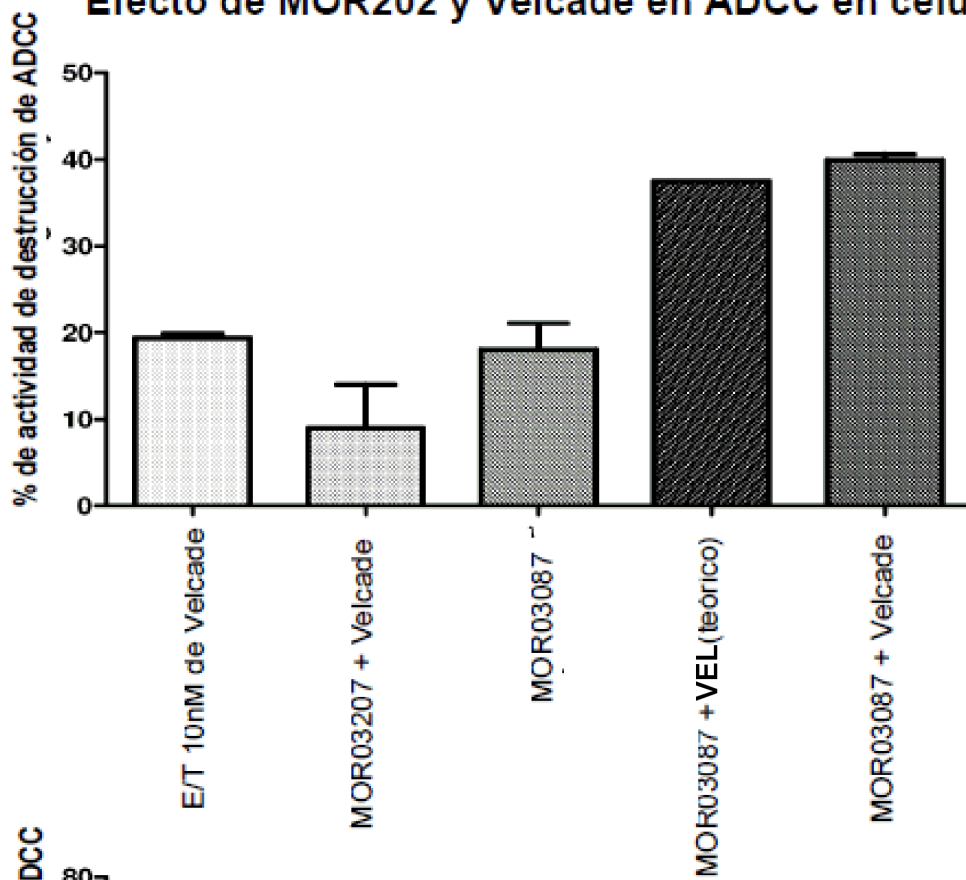


Figura 11

La secuencia de aminoácidos del dominio pesado variable MOR202 es:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGDP
SNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFA YWGQGL
VTVSS (SEQ ID NO: 10)

La secuencia de aminoácidos del dominio liviana variable MOR202 es:

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLRHYYVYQKPGQAPVLVIYGD SKRPSGI
P ERFGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQTYTGGASLVFGGGTKLTVLGQ (SEQ ID NO:
11)

La secuencia de aminoácidos de HCDR1 de MOR202 como se define en una nomenclatura interna es: GFTFSSYYMN (SEQ ID NO: 1)

La secuencia de aminoácidos de HCDR1 de MOR202 como la define Kabat es: SYYMN (SEQ ID NO: 14)

La secuencia de aminoácidos de HCDR2 de MOR202 como la define Kabat es: GISGDPSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2)

La secuencia de aminoácidos de HCDR3 de MOR202 como la define Kabat es: DLPLVYTGFA Y (SEQ ID NO: 3)

La secuencia de aminoácidos de LCDR1 de MOR202 como la define Kabat es: SGDNLRHYYVY (SEQ ID NO: 4)

La secuencia de aminoácidos de LCDR2 de MOR202 como la define Kabat es: GDSKRPS (SEQ ID NO: 5)

La secuencia de aminoácidos de LCDR3 de MOR202 como la define Kabat es: QTYTGGAS (SEQ ID NO:6)

Figura 12

Curva de "mejor ajuste" para la combinación de MOR202 y lenalidomida en la mediación de ADCC en células AMO-1.

MOR202 $\mu\text{g/ml}$	Efecto (%muertas)
0.011574	46.000000
0.069444	65.000000
0.416667	77.000000
2.500000	94.000000

$$Y=100/(1+10^{((Dm-X)^*m)})$$

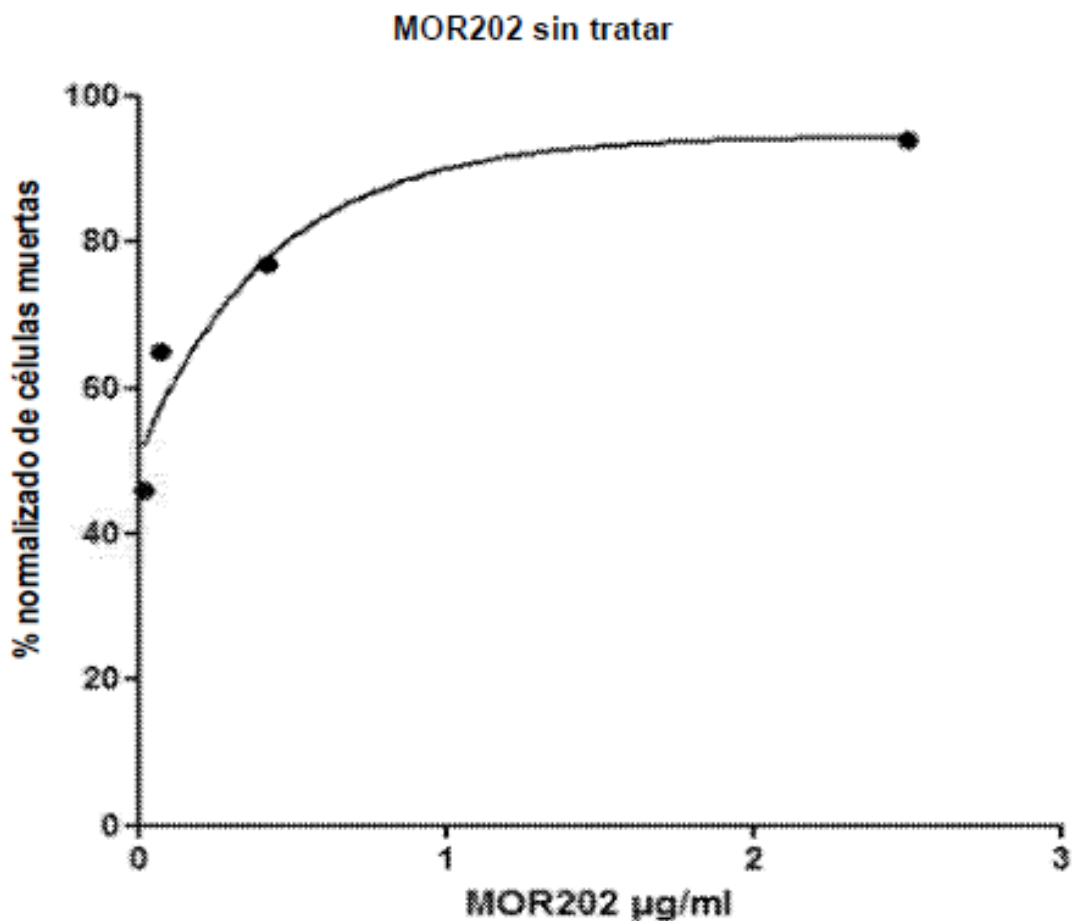
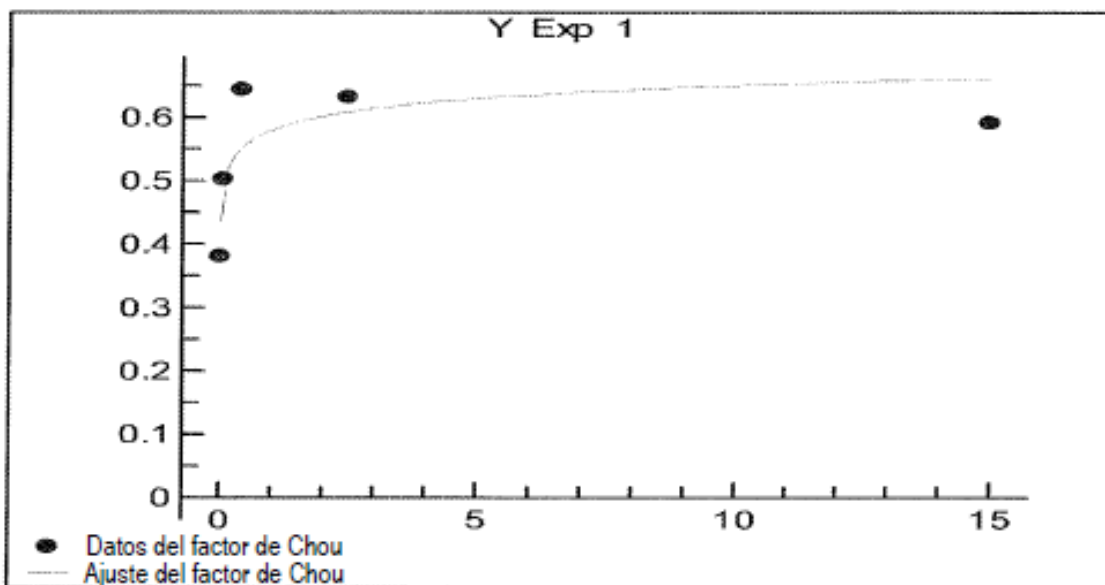


Figura 13

Y Exp 1		Cálculos de ajuste XL	
<u>Datos sin procesar</u>		tabla	#Ok
X	Y	ajuste	#Ok
0.012	0.37997	Dm	0.083866
0.07	0.501679	m	0.129731
0.42	0.643211	r ²	0.644434
2.5	0.631401	(coeficiente de correlación lin.)	
15	0.59145		

datos ajustados a $y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))$



Ampliación de gráfica de datos y ajuste

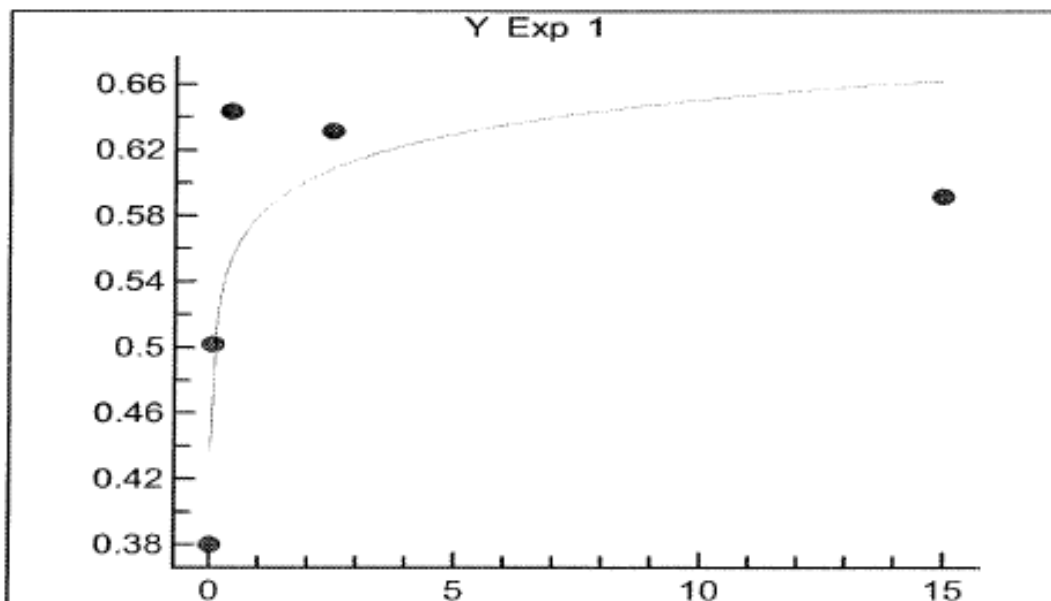
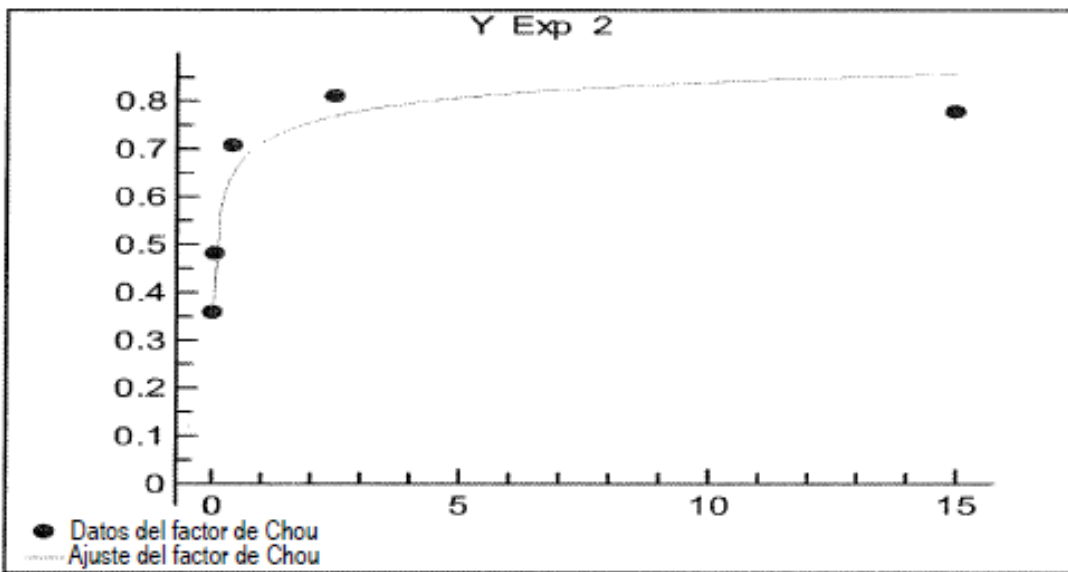


Figura 14

Y Exp 2		Cálculos de ajuste XL	
<u>Datos sin procesar</u>		tabla	#Ok
X	Y	ajuste	#Ok
0.012	0.357662	Dm	0.062255
0.07	0.480497	m	0.32594
0.42	0.706076	r ²	0.924687
2.5	0.809306	(coeficiente de correlación lin.)	
15	0.7768		

Datos ajustados a $y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))$



Ampliación de gráfica de datos y ajuste

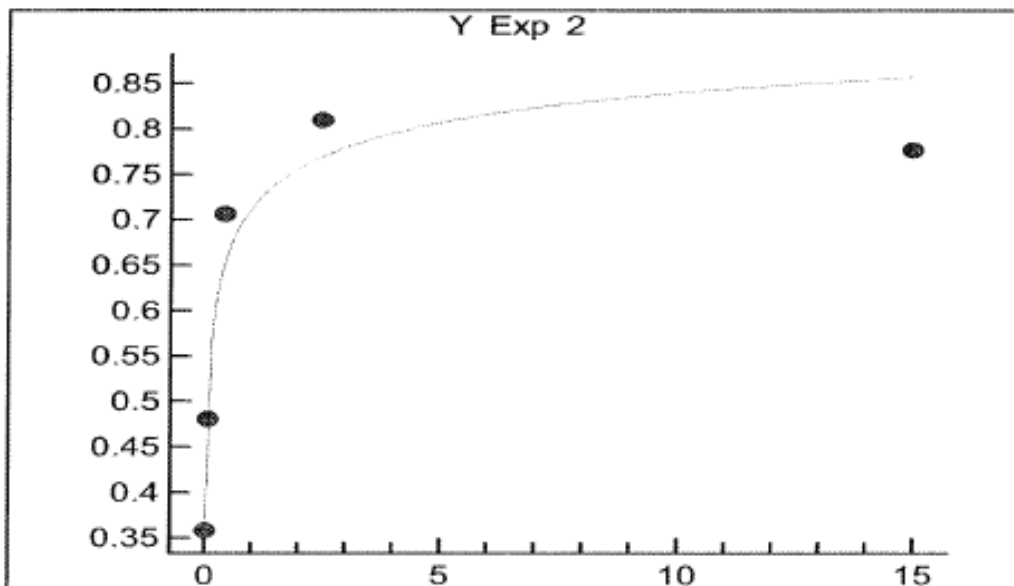
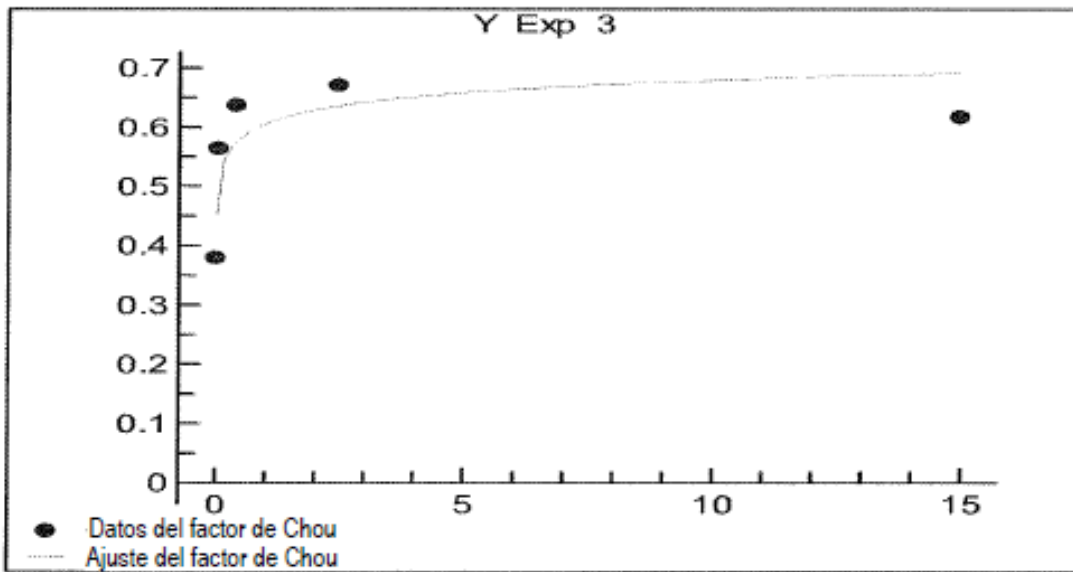


Figura 15

Y Exp 3		Cálculos de ajuste XL	
<u>Datos sin procesar</u>		tabla	#Ok
X	Y	ajuste	#Ok
0.012	0.378846		
0.07	0.562988		
0.42	0.635872	Dm	0.04629
2.5	0.669822	m	0.139915
15	0.61643	r^2	0.657161
		(coeficiente de correlación lin.)	

Datos ajustados a $y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))$



Ampliación de gráfica de datos y ajuste

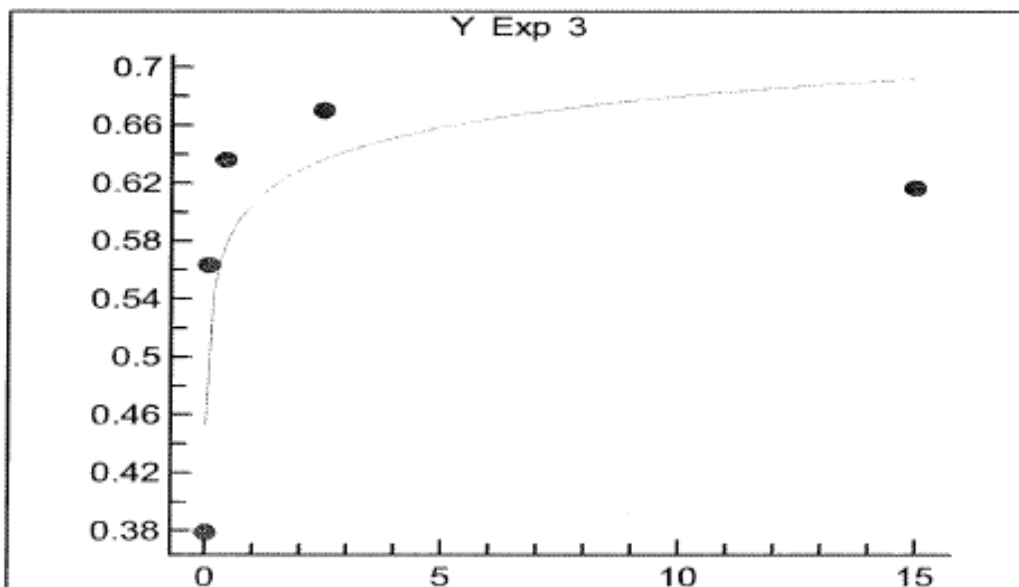


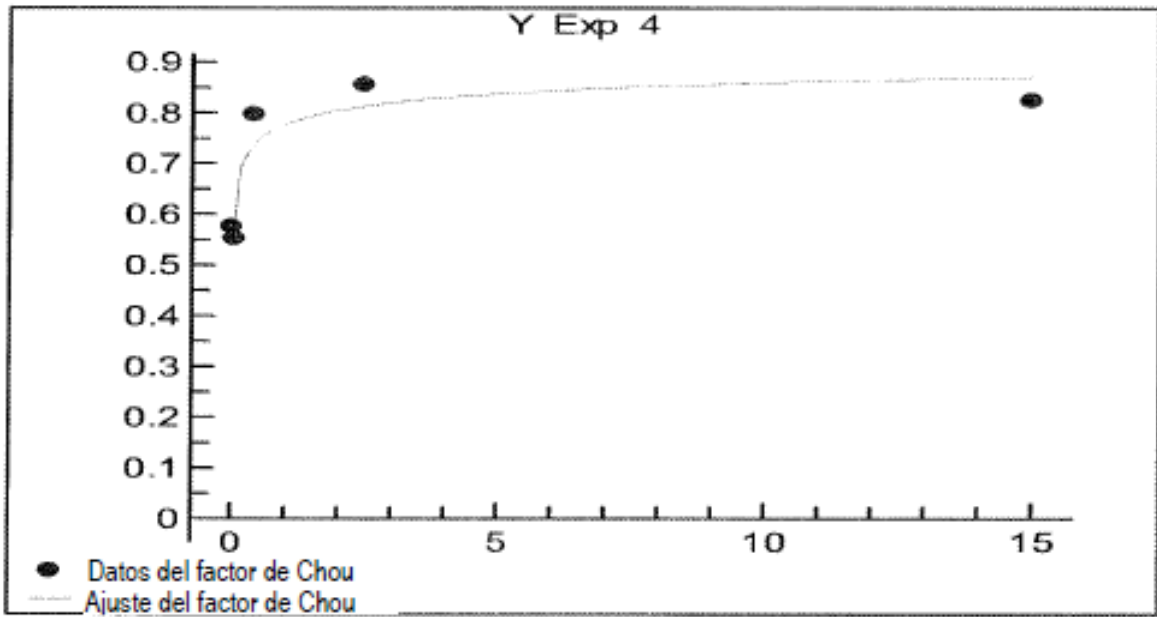
Figura 16

Y Exp 4

Datos sin procesar	
X	Y
0.012	0.575381
0.07	0.551706
0.42	0.797069
2.5	0.855131
15	0.824584

Cálculos de ajuste XL	
tabla	#Ok
ajuste	#Ok
Dm	0.006182
m	0.245157
r^2	0.795756
(coeficiente de correlación lin.)	

Datos ajustados a $y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))$



Ampliación de gráfica de datos y ajuste

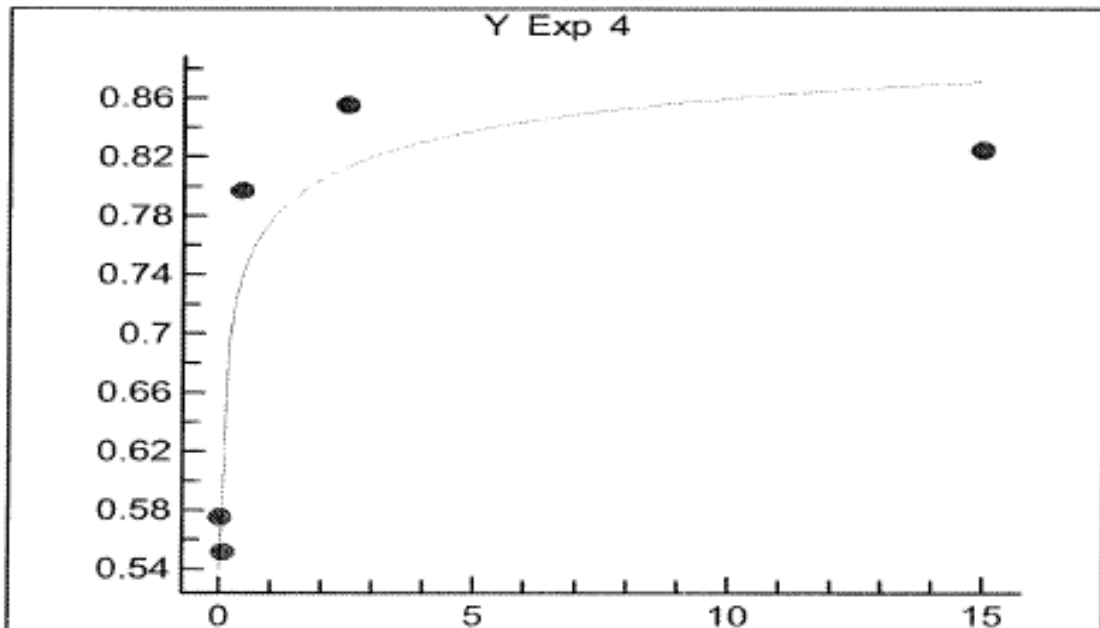
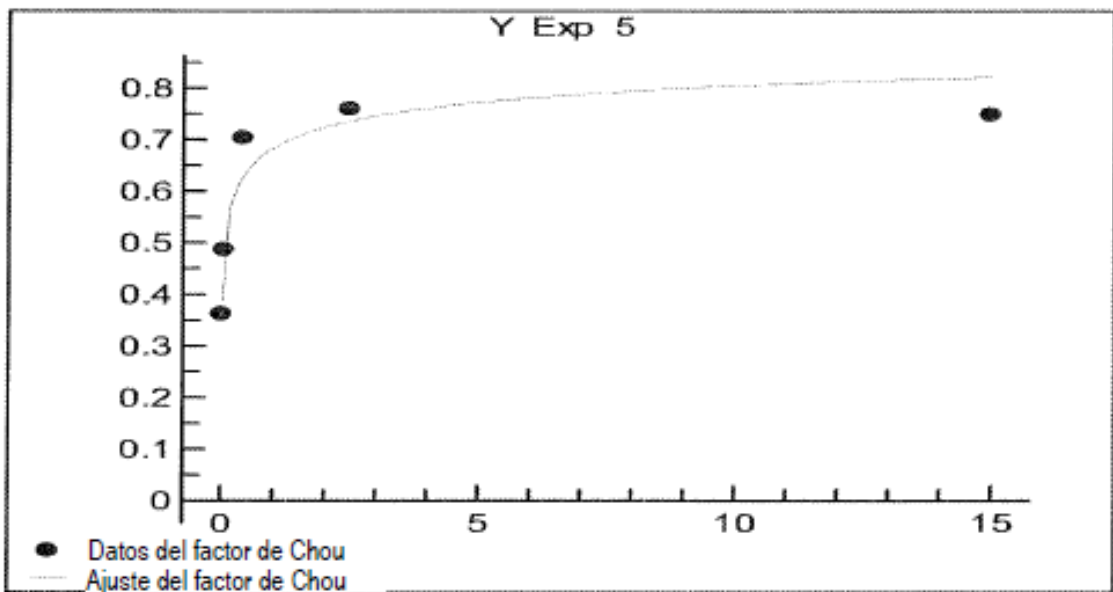


Figura 17

Y Exp 5		Cálculos de ajuste XL	
<u>Datos sin procesar</u>		tabla	#Ok
X	Y	ajuste	#Ok
0.012	0.361208		
0.07	0.486295		
0.42	0.703533	Dm	0.063193
2.5	0.759272	m	0.278814
15	0.747995	r ²	0.90303
		(coeficiente de correlación lin.)	

Datos ajustados a $y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))$



Ampliación de gráfica de datos y ajuste

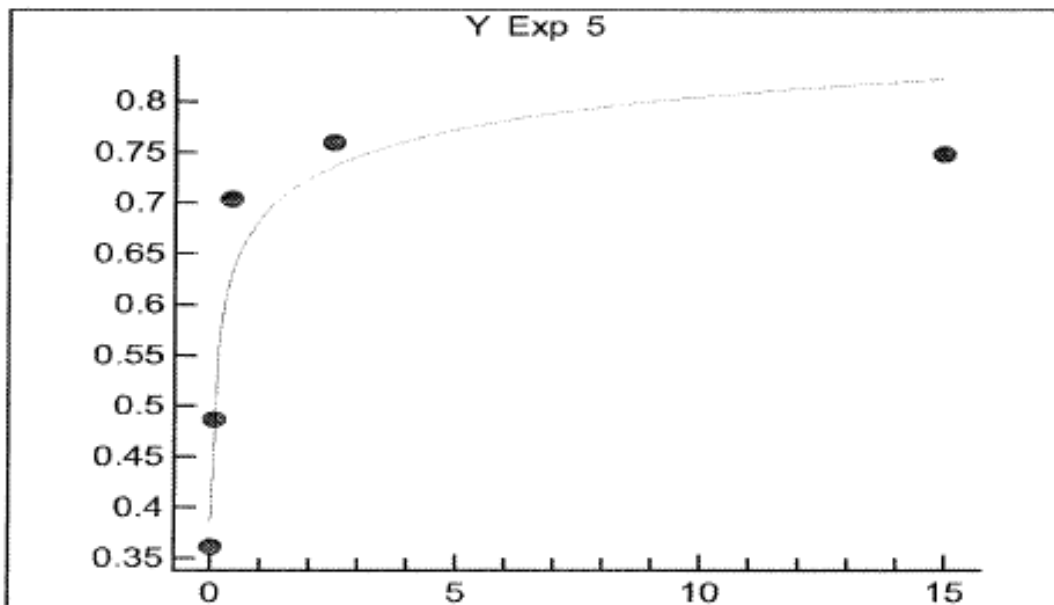
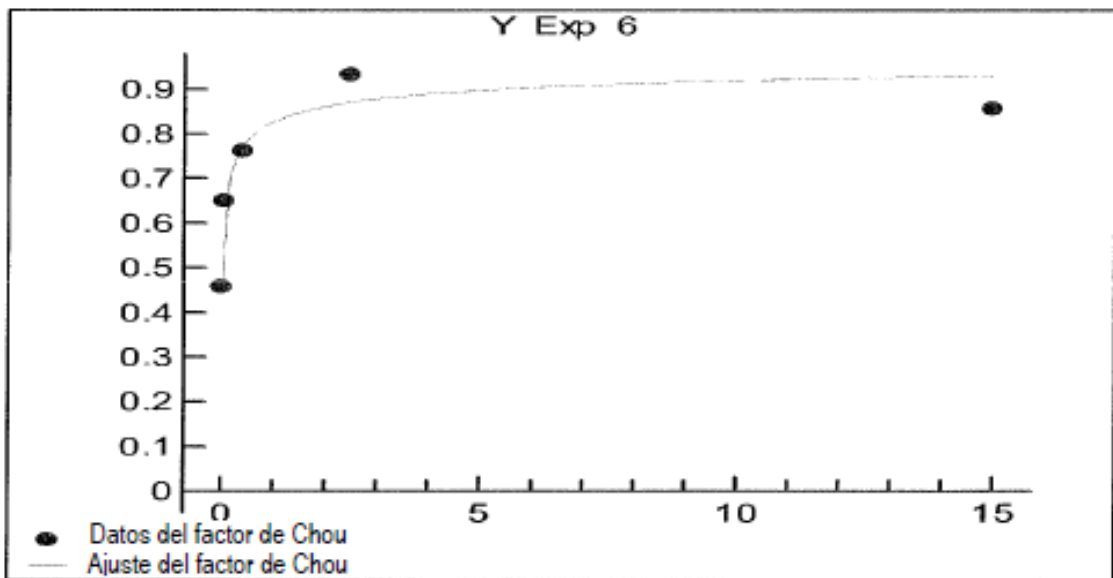


Figura 18

Y Exp 6		Cálculos de ajuste XL	
<u>Datos sin procesar</u>		tabla	#Ok
X	Y	ajuste	#Ok
0.012	0.456555		
0.07	0.649115	Dm	0.016501
0.42	0.761269	m	0.379718
2.5	0.93137	r ²	0.930189
15	0.85444	(coeficiente de correlación lin.)	

Datos ajustados a $y=f(x)=1/(1+((Dm/x)^m))$



Ampliación de gráfica de datos y ajuste

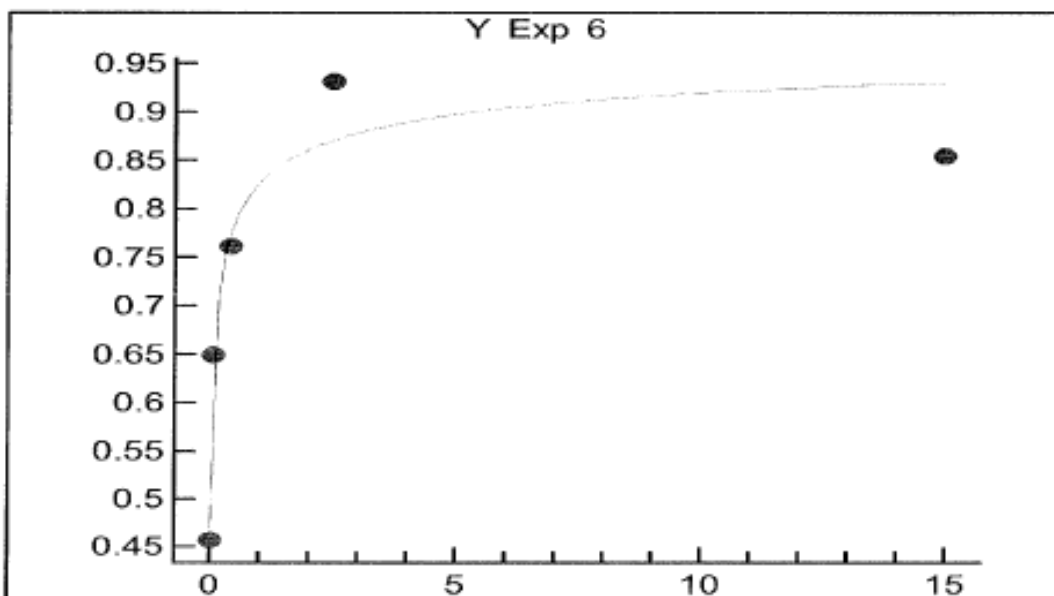
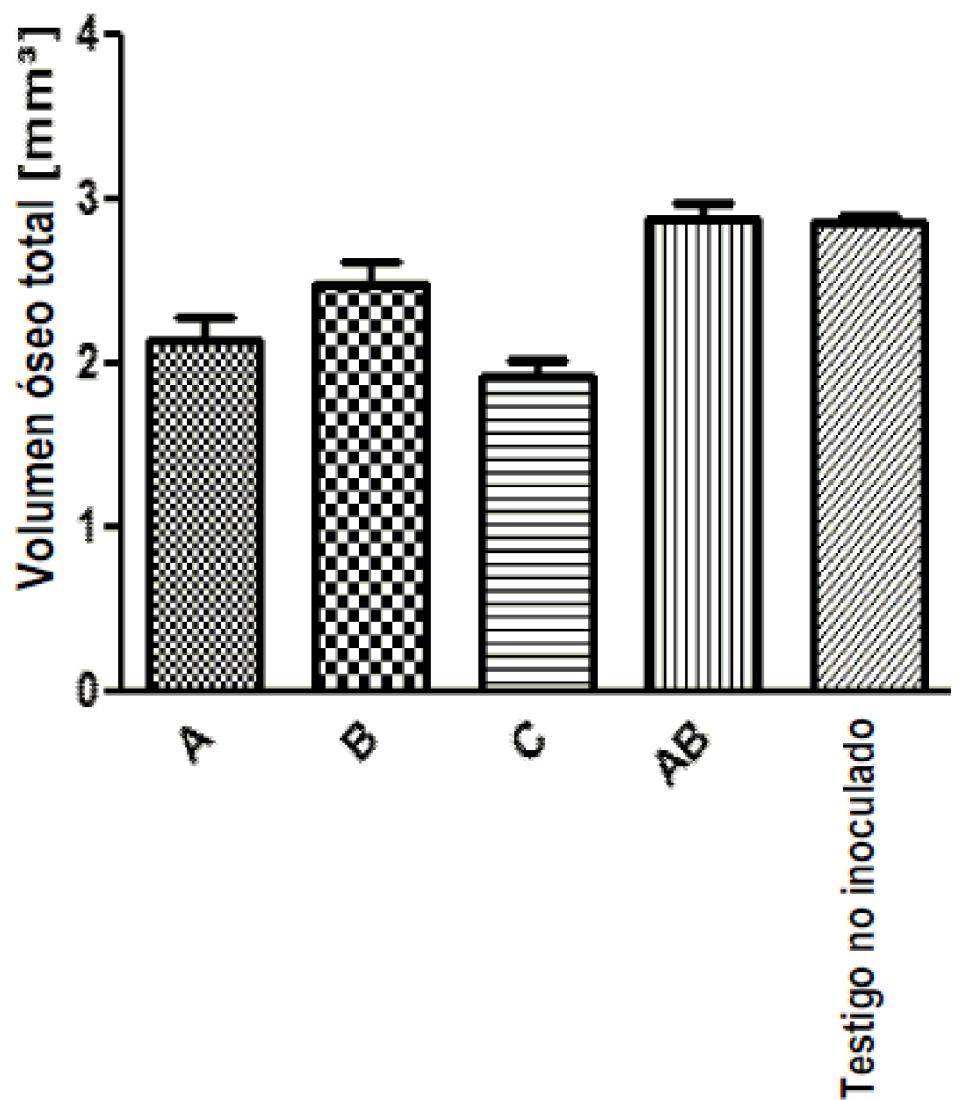


Figura 19

Volumen óseo total medio \pm SEM para cada grupo de estudio



A: LEN 50 mg/kg, vía oral en 10mL/kg

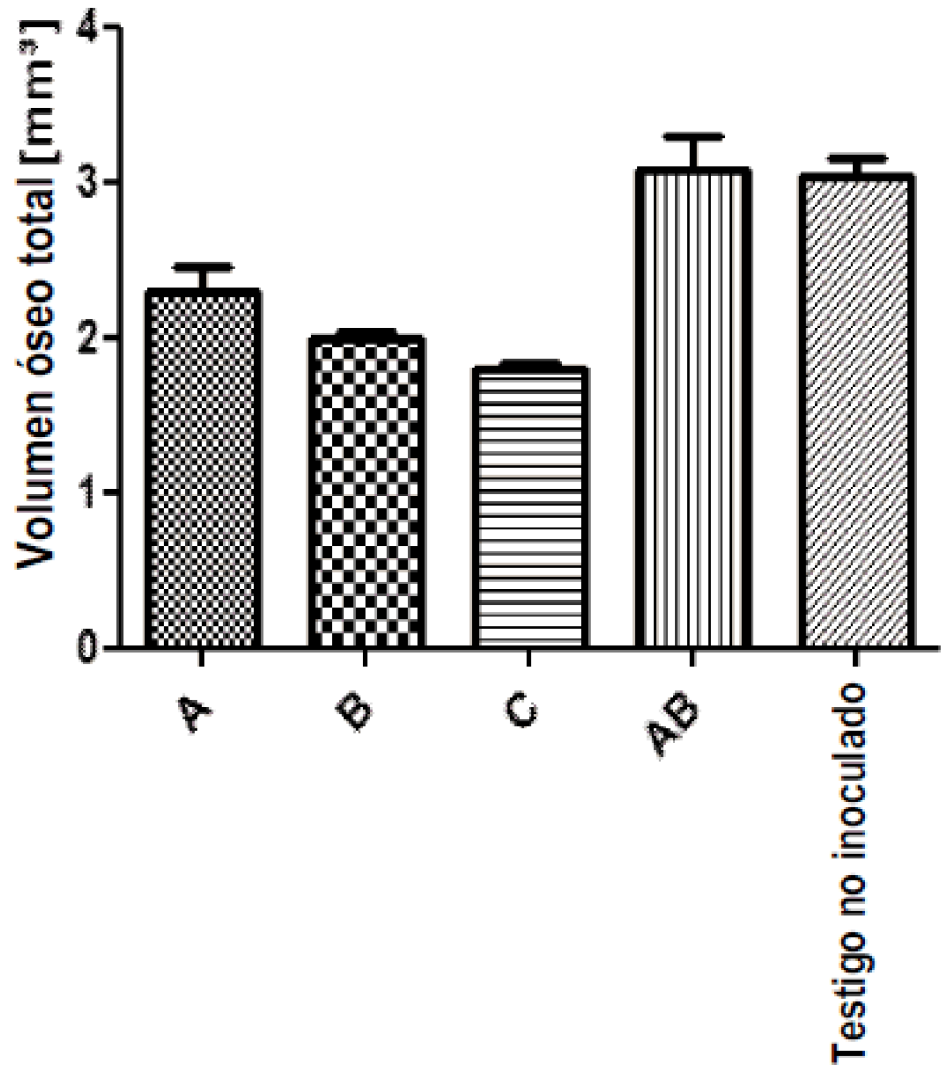
B: MOR202 3mg/kg, i.p., en 10 mL/kg

C: Testigo vehículo (Ora Plus: Ora Sweet) 10 mL/kg, vía oral

AB: LEN 50mg/kg vía oral en 10 mL/kg + MOR202 3mg/kg i.p., en 10 mL/kg

Figura 20

Volumen óseo total medio +/- SEM para cada grupo de estudio



- Grupo A Bortezomib 0.6 mg/kg, i.p., en 10 mL/kg
- Grupo B MOR202 1 mg/kg, i.v., en 10 mL/kg
- Grupo C Testigo vehículo (0.9% de Solución salina para inyección, i.p., 10 mL/kg
- Grupo AB Bortezomib/MOR202 0.6/1 mg/kg, i.p./i.v., en 10 mL/kg