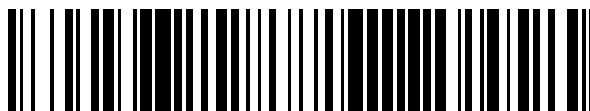


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 057**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2014 PCT/US2014/064153**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15069785**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2014 E 14803287 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3066128**

54 Título: **Combinación de anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 para tratar el mieloma múltiple**

30 Prioridad:

**06.11.2013 US 201361900775 P**

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

**02.04.2019**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (50.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543, US y  
INNATE PHARMA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ANDRE, PASCALE;  
BLERY, MATHIEU;  
BONNAFOUS, CECILE;  
GUPTA, ASHOK, K.;  
SALTER-CID, LUISA, M. y  
ROBBINS, MICHAEL DARRON**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 707 057 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

Combinación de anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 para tratar el mieloma múltiple

5 **Antecedentes**

Los linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés) constituyen el 15 % de los linfocitos de sangre periférica y desempeñan un papel importante en la capacidad del sistema inmunitario innato para combatir las infecciones víricas y también el cáncer (véase, por ejemplo, Purdy AK et al., *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 13-22) y Vivier et al., *Science*, 7 de enero de 2011; 331 (6013): 44-9). Los linfocitos NK se unen a las células diana a través de múltiples receptores, incluyendo los receptores de citotoxicidad natural (NCR, por sus siglas en inglés), el receptor de Fc CD16, NKG2D y otros. La unión del ligando al receptor inicia la fosforilación de la tirosina y el reclutamiento de moléculas de señalización accesorias. Esta cascada da como resultado la activación del linfocito NK, la liberación de gránulos preformados que contienen perforina y granzimas dentro de la célula diana y la apoptosis. La liberación simultánea de citocinas y quimiocinas da como resultado un medio microambiental que recluta otras células inmunitarias. Los linfocitos NK tienen la capacidad de unirse a todas las células del cuerpo (Murphy WJ, et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: S2-S7). Sin embargo, la unión de células normales no da como resultado actividad citotóxica debido a la capacidad de los linfocitos NK para utilizar simultáneamente un conjunto diferente de receptores para unirse a moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). La unión del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) E al receptor heterodimérico NKG2A/CD94, o de las moléculas HLA-A, B y C a los receptores similares a Ig citolíticos (KIR) inhibidores, da como resultado la fosforilación de la tirosina, el reclutamiento de los adaptadores de señalización SHP 1 o SHP-2 y la señalización descendente. El resultado final es una señal dominante que suprime las señales de activación normales. Por tanto, la interacción KIR/HLA puede repercutir en la capacidad de respuesta de los linfocitos NK y también en el desarrollo del número total de linfocitos NK sensibles maduros, conocido como licenciamiento.

Existen siete KIR inhibidores y siete KIR activadores, lo que es un factor que da como resultado la diversidad de la herencia y expresión de KIR. KIR también se expresa en linfocitos T citolíticos naturales (NKT, por sus siglas en inglés) y un pequeño subconjunto de linfocitos T (Uhrberg M, et al., 166: *J Immunol* 2001; 3923-3932). Por tanto, de forma mecanicista, el bloqueo de KIR inhibidor podría inducir efectos antitumorales permitiendo la activación de los linfocitos NK y posiblemente de también algunos linfocitos T.

CS1 (también conocido como SLAMF7, miembro 7 de la familia SLAM, subconjunto CD2, CRACC, células citotóxicas activadoras del receptor similar a CD2, proteína 19A24, 19A, células citotóxicas activadoras del receptor similar a CD2, CD319, proteína similar a Novel LY9 (antígeno linfocítico 9), proteína de membrana FOAP-12, antígeno CD319, proteína 19A, APEX-1, FOAP12 y Novel Ly93) es una glicoproteína de la superficie celular que se expresa en gran cantidad en células de mieloma múltiple (MM). CS1 se expresa en niveles altos en células plasmáticas normales y malignas, pero no en órganos normales, tumores sólidos o células madre CD34<sup>+</sup>. Solo un pequeño subconjunto de linfocitos en reposo, incluyendo los linfocitos NK y un subconjunto de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, expresan niveles detectables pero bajos de CS1 (Hsi ED, et al., *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 2775-2784 y Murphy JJ, et al., *Biochem J.* 2002; 361: 431-436). CS1 fue aislado y clonado por Boles et al. (*Immunogenetics.* 2001; 52 (3-4): 302-7).

El mieloma múltiple (también conocido como mieloma o mieloma de células plasmáticas) es un cáncer hemático formado por células plasmáticas malignas. Las células plasmáticas normales son un tipo de glóbulo blanco que se encuentra en la médula ósea y produce anticuerpos. El MM se caracteriza por un número excesivo de células plasmáticas anormales en la médula ósea y la sobreproducción de inmunoglobulina monoclonal intacta (IgG, IgA, IgD o IgE) o proteína de Bence-Jones (cadenas ligeras monoclonales libres). En el MM, las células plasmáticas neoplásicas se acumulan en la médula ósea y producen una proteína monoclonal que provoca la alteración de los órganos y/o tejidos (Smith D, Yong K, *BMJ.* 26 de junio de 2013; 346: f3863). Las manifestaciones clínicas comunes del MM incluyen hipercalcemia, anemia, daño renal, mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas, producción alterada de inmunoglobulina normal y osteoporosis difusa (por lo general en la pelvis, la columna vertebral, las costillas y el cráneo).

El MM es el segundo cáncer hemático más común (10-15 % de todos). Es responsable del 15-20 % de las muertes por cáncer hemático y de aproximadamente el 2 % de todas las muertes por cáncer (Smith D, Yong K, *BMJ.* 26 de junio de 2013; 346: f3863). A pesar de los avances en la terapia, el MM aún se considera una enfermedad incurable (Hsi E, et al., *Clin. Cancer Res.*, 1 de mayo de 2008, 14; 2775; Hari P, et al., *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 1-18; Greipp P., *Semin Hematol* 2005; 42: 816-21; Crane E, List A., *Cancer Invest* 2005; 23: 625-34; Gahrton G, et al. *Hematology* 2005; 10 Supl. 1: 127-8; Anderson KC., *Semin Hematol* 2005; 42: S3-8). En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos mejorados para tratar sujetos con MM.

Se describen fármacos y combinaciones de fármacos contra el mieloma múltiple, incluyendo el anticuerpo anti-KIR IPH2102, en Nijhof et al. (*Blood*, 2011, 118 (21): 1865), Godfrey et al. (*Leukemia & Lymphoma*, 2012, 53 (9): 1666-1676) y Benson et al. (*Blood*, 2011, 118 (24): 6387-6391).

65 **Sumario**

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo anti-KIR y un anticuerpo anti-CS1, kits para tratar el mieloma múltiple (MM) en un paciente humano que comprende una dosis del anticuerpo anti-KIR, una dosis del anticuerpo anti-CS1 e instrucciones para usar los anticuerpos en el tratamiento del mieloma múltiple en un paciente humano. También se proporcionan el anticuerpo anti-KIR y el anticuerpo anti-CS 1 para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple en un paciente humano. El anticuerpo anti-KIR utilizado de acuerdo con la invención comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (CDR, por sus siglas en inglés) 1, CDR2 y CDR3 que se exponen en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, y las secuencias de la región variable de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 que se exponen en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente. El anticuerpo anti-CS1 utilizado de acuerdo con la invención comprende las secuencias de la región variable de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 que se exponen en las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente, y el conjunto de secuencias de la región variable de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 que se exponen en las SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer, por ejemplo, un cáncer hemático, en particular el mieloma múltiple (MM), en un paciente humano, que comprenden administrar al paciente una combinación de un anticuerpo anti-KIR y un anticuerpo anti-CS1. En una realización, el MM es mieloma múltiple latente (por ejemplo, MM latente de alto riesgo).

Un anticuerpo anti-KIR de ejemplo es lirilumab (también denominado anteriormente BMS-986015 o IPH2102) que comprende las cadenas pesada y ligera que tienen las secuencias que se muestran en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes del mismo. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-KIR comprende las regiones variables (VR, por sus siglas en inglés) de la cadena pesada y ligera de lirilumab. En otra realización, el anticuerpo comprende regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácidos que se exponen en la SEQ ID NO: 3 y/o la SEQ ID NO: 5, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones VH y/o VL codificadas por las secuencias de ácido nucleico que se exponen en la SEQ ID NO: 4 y/o la SEQ ID NO: 6, respectivamente. Los anticuerpos adicionales que se describen en el presente documento incluyen anticuerpos que compiten por unirse y/o que se unen al mismo epítipo en KIR que los anticuerpos mencionados anteriormente; y anticuerpos que tienen al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad de la región variable con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO : 5).

Un anticuerpo anti-CS1 de ejemplo es elotuzumab (también denominado BMS-901608 o HuLuc63) que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH de elotuzumab que tienen la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 19 y los dominios CDR1, CDR2 CDR3 de la región VL de elotuzumab que tienen la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 21. En otra realización, el anticuerpo anti-CS1 comprende las regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácidos que se exponen en la SEQ ID NO: 19 y/o la SEQ ID NO: 21, respectivamente. Otros anticuerpos que se describen en el presente documento incluyen anticuerpos que compiten por unirse y/o que se unen al mismo epítipo en CS1 que los anticuerpos mencionados anteriormente; y anticuerpos que tienen al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad de la región variable con la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 21).

En el presente documento se describen métodos de tratamiento de MM en un paciente humano, comprendiendo los métodos administrar al paciente una cantidad eficaz de cada uno de un anticuerpo anti-KIR y uno anti-CS1.

Adicionalmente, en el presente documento se describen métodos de tratamiento de MM en un paciente humano, comprendiendo los métodos administrar al paciente una cantidad eficaz de cada uno de: (a) un anticuerpo que se une con alta afinidad y especificidad a, y bloquea la actividad inhibidora de, receptor KIR inhibidor en un linfocito NK y (b) un anticuerpo que se une con alta afinidad y especificidad a CS1 en la superficie de una célula de mieloma múltiple.

Adicionalmente, en el presente documento se describen métodos de tratamiento de MM en un paciente humano, comprendiendo los métodos administrar al paciente, una cantidad eficaz de cada uno de:

- (a) un anticuerpo anti-KIR que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 3 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 5, y
- (b) un anticuerpo anti-CS1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 19 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 21.

En una realización del uso médico de acuerdo con la invención, el tratamiento de MM en un paciente humano comprende:

5 (A) la administración del anticuerpo anti-CS1 semanalmente durante un total de 8 dosis a lo largo de 8 semanas y la administración del anticuerpo anti-KIR cada 4 semanas durante un total de 2 dosis a lo largo de 8 semanas durante una fase de inducción, seguida de (B) la administración del anticuerpo anti-CS 1 cada 2 semanas y la administración del anticuerpo anti-KIR cada 4 semanas durante una fase de mantenimiento,

10 en el que el anticuerpo anti-KIR se administra a una dosis de 0,1-20 mg/kg de peso corporal y el anticuerpo anti-CS1 se administra a una dosis de 0,1-20 mg/kg de peso corporal durante las fases de inducción y mantenimiento.

15 En determinadas realizaciones, cada dosis del anticuerpo anti-KIR se administra a 0,1, 0,3, 1, 3, 6, 10 o 20 mg/kg. En realizaciones preferidas, cada dosis del anticuerpo anti-KIR se administra a 0,3, 1 o 3 mg/kg. En otras realizaciones, cada dosis del anticuerpo anti-CS1 se administra a 0,1, 0,3, 1, 3, 6, 10 o 20 mg/kg de peso corporal. En una realización preferida, cada dosis del anticuerpo anti-CS1 se administra a 10 mg/kg.

En una realización, el anticuerpo anti-KIR y el anticuerpo anti-CS1 se administran a las siguientes dosis durante la fase de inducción o de mantenimiento:

20 (a) 0,3 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1;  
 (b) 1 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1; o  
 (c) 3 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1.

25 En consecuencia, en una realización, la dosis del anticuerpo anti-KIR y/o anti-CS1 se calcula por mg/kg de peso corporal. Sin embargo, en otra realización, la dosis del anticuerpo anti-KIR y/o anti-CS1 es una dosis fija constante que se fija independientemente del peso del paciente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-KIR y/o anti-CS1 puede administrarse a una dosis fija de 5, 20, 75, 200, 400, 750 o 1500 mg, sin tener en cuenta el peso del paciente. En determinadas realizaciones, las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta eficaz).

30 En una realización, el anticuerpo anti-CS1 se administra el (1) día 1, semana 1, (2) día 1, semana 2, (3), día 1, semana 3, (4), día 1, semana 4, (5) día 1, semana 5, (6) día 1, semana 6, (7) día 1, semana 7 y (8) día 1, semana 8, de la fase de inducción. En otra realización, el anticuerpo anti-KIR se administra el (1) día 1, semana 1 y (2) día 1, semana 5 de la fase de inducción. En una realización, el anticuerpo anti-CS1 se administra el (1) día 1, semana 10 y (2) día 1, semana 15 de la fase de mantenimiento. En una realización, el anticuerpo anti-KIR se administra el día 1, semana 10 de la fase de mantenimiento.

35 En otra realización, el anticuerpo anti-KIR se administra a una dosis y/o frecuencia para saturar completamente el KIR. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo anti-KIR se administra a una dosis y una frecuencia de dosificación para conseguir al menos aproximadamente el 90 %, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de la ocupación de KIR en los linfocitos NK en plasma durante al menos aproximadamente uno, dos, tres o seis meses, teniendo de este modo una saturación sostenida durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, al menos 3 meses, 6 meses). En otra realización, la dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/kg y de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg/kg. La frecuencia de dosificación puede estar en el intervalo de una vez al día a una vez cada 2 meses, de aproximadamente una vez por semana a aproximadamente una vez cada 2 meses; o aproximadamente una vez al mes. Como alternativa, la frecuencia de dosificación puede seleccionarse entre aproximadamente tres veces, aproximadamente dos veces y aproximadamente una vez por día; aproximadamente cinco veces, aproximadamente cuatro veces, aproximadamente tres veces y aproximadamente dos veces por semana; 40 y aproximadamente una vez cada dos, cuatro y seis semanas.

45 En otra, una dosis de anticuerpo anti-KIR que da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa (por ejemplo, al menos aproximadamente el 90 % o el 95 % de ocupación del receptor) se administra de aproximadamente 2 veces por semana a aproximadamente una vez por mes, de aproximadamente 2 veces por semana a aproximadamente una vez cada 2 meses o de aproximadamente una vez al mes a aproximadamente una vez cada 2 meses. La dosis puede administrarse, por ejemplo, al menos 3 veces, al menos 6 veces o más. Por ejemplo, el tratamiento puede comprender administrar un anticuerpo anti-KIR a una dosis y una frecuencia de dosificación que consiga al menos aproximadamente el 90 % o el 95 % de ocupación de KIR en los linfocitos NK durante al menos aproximadamente dos semanas, un mes, 6 meses, 9 meses o 12 meses.

50 En otra realización, una pauta da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa sostenida. Se administra una dosis de anticuerpo anti-KIR que da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa durante un período de al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas o 1 mes. Cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 % o un 95 % de ocupación del receptor) durante aproximadamente una semana, la dosis puede administrarse, por ejemplo, entre una vez por semana y una vez cada dos semanas; cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor 55

sustancialmente completa durante aproximadamente dos semanas, la dosis puede administrarse, por ejemplo, entre una vez cada dos semanas y una vez al mes. Cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa durante aproximadamente dos semanas a aproximadamente un mes, la dosis puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente una vez al mes. En cada pauta, la dosis puede administrarse, por ejemplo, al menos 3 veces, al menos 6 veces o más. Por ejemplo, el tratamiento puede comprender administrar un anticuerpo anti-KIR a una dosis y una frecuencia de dosificación que consiga al menos aproximadamente el 95 % de ocupación de KIR en linfocitos NK durante al menos aproximadamente 6 meses, 9 meses o 12 meses.

En una realización, el anticuerpo anti-CS1 y el anticuerpo anti-KIR se administran como una primera línea ("frontal") de tratamiento (por ejemplo, el tratamiento inicial o el primer tratamiento). En otra realización, el anticuerpo anti-CS1 y el anticuerpo anti-KIR se administran como una segunda línea de tratamiento (por ejemplo, después del tratamiento inicial con el mismo agente terapéutico o uno diferente, incluyendo después de la recaída y/o cuando el primer tratamiento ha fracasado).

Los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier medio adecuado. En una realización, los anticuerpos se formulan para la administración intravenosa. En otra realización, los anticuerpos se administran simultáneamente (por ejemplo, en una única formulación o simultáneamente como formulaciones separadas). Como alternativa, en otra realización, los anticuerpos se administran secuencialmente (por ejemplo, como formulaciones separadas).

La eficacia de los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento puede evaluarse usando cualquier medio adecuado. En una realización, el tratamiento produce al menos un efecto terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en respuesta completa, respuesta parcial muy buena, respuesta parcial y enfermedad estable. En otra realización, la administración de los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 tiene un efecto sinérgico sobre el tratamiento en comparación con la administración de cualquier anticuerpo solo. En otra realización, la terapia de combinación muestra una sinergia terapéutica en un paciente que tiene una alta carga tumoral o cáncer en etapa avanzada. En otra realización, la terapia de combinación presenta una sinergia terapéutica en un paciente que tiene uno o más tumores (por ejemplo, un tumor sólido) que se han infiltrado por linfocitos NK. En una realización adicional, la actividad antitumoral sinérgica está mediada por linfocitos NK. En otra realización más, la terapia de combinación muestra una sinergia terapéutica para prolongar la supervivencia del paciente.

También se proporcionan composiciones que comprenden:

- (a) un anticuerpo anti-KIR que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada que se exponen en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que se exponen en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, y
- (b) un anticuerpo anti-CS1 que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de la región variable que se exponen en las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que se exponen en las SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente.

La invención proporciona adicionalmente kits que incluyen una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo anti-KIR, tal como lirilumab y un anticuerpo anti-CS1, tal como elotuzumab, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad terapéuticamente eficaz adaptada para su uso en los métodos que se describen en el presente documento. Específicamente, el kit comprende:

- (a) una dosis de un anticuerpo anti-KIR que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada que se exponen en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que se exponen en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente;
- (b) una dosis de un anticuerpo anti-CS1 que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada que se exponen en las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que se exponen en las SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente; e
- (c) instrucciones para el uso del anticuerpo anti-KIR y el anticuerpo anti-CS1 en un tratamiento del MM en un paciente humano como se describe en el presente documento.

Adicionalmente, se describe en el presente documento un anticuerpo anti-KIR, comprendiendo el anticuerpo anti-KIR los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 3 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 5 para la administración conjunta con un anticuerpo anti-CS1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 19 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 21.

Adicionalmente, se describe en el presente documento un anticuerpo anti-KIR, comprendiendo el anticuerpo anti-KIR los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 3 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la

secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 5, para la administración conjunta con un anticuerpo anti-CS1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 19 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 21,

5 en el que (A) el anticuerpo anti-CS1 se administra semanalmente durante un total de 8 dosis a lo largo de 8 semanas y el anticuerpo anti-KIR se administra cada 4 semanas durante un total de 2 dosis a lo largo de 8 semanas durante una fase de inducción, seguido de (B) la administración del anticuerpo anti-CS1 cada 2 semanas y la administración del anticuerpo anti-KIR cada 4 semanas durante una fase de mantenimiento, y  
 10 en el que el antibiótico anti-KIR se administra a una dosis de 0,1-20 mg/kg de peso corporal y el anticuerpo anti-CS1 se administra a una dosis de 0,1-20 mg/kg de peso corporal durante ambas fases de inducción y mantenimiento.

**Breve descripción de los dibujos**

15 La **Figura 1** representa la expresión de CS-1 en PBMC (célula mononuclear de sangre periférica por sus siglas en inglés), según se evaluó mediante activación por citometría de flujo.

La **Figura 2** muestra la caracterización de los linfocitos NK dentro de PBMC, según se evaluó mediante activación por citometría de flujo.

La **Figura 3** proporciona un ejemplo de los resultados de la estrategia de activación (a partir de PBMC de un voluntario), según se evaluó mediante citometría de flujo.

20 La **Figura 4** es una tabla que resume las estirpes celulares diana y las características de las células efectoras en cada experimento.

La **Figura 5** es una lectura que muestra la movilización de CD107 en los linfocitos NK dentro de PBMC incubadas con U266B1 o con OPM-2.

25 La **Figura 6** es una lectura que muestra la producción de TNF- $\alpha$  intracelular en linfocitos NK dentro de PBMC incubadas con U266B1 o con OPM-2.

La **Figura 7** es una lectura que muestra la producción de IFN- $\gamma$  intracelular en linfocitos NK dentro de PBMC incubadas con U266B1 o con OPM-2.

La **Figura 8** es una lectura que muestra la movilización de CD107, la producción de TNF- $\alpha$  intracelular y la producción de IFN- $\gamma$  intracelular en linfocitos NK que expresan KIR2D en respuesta a U266B1.

30 La **Figura 9** es una lectura que muestra la movilización de CD107, la producción de TNF- $\alpha$  intracelular y la producción de IFN- $\gamma$  intracelular en linfocitos NK que expresan KIR2D en respuesta a OPM-2.

La **Figura 10** es una lectura que muestra la movilización de CD107 en linfocitos NK, en PBMC incubadas con U266B1 o con OPM-2 en voluntarios sanos por genotipo de CD16 (F/F, V/F o V/V).

35 La **Figura 11** es una lectura que muestra la producción intracelular de TNF- $\alpha$  en linfocitos NK dentro de PBMC incubadas con U266B1 o con OPM-2 en voluntarios sanos por genotipo de CD16 (F/F, V/F o V/V).

La **Figura 12** es una lectura que muestra la producción de IFN- $\gamma$  intracelular en los linfocitos NK dentro de PBMC incubadas con U266B1 o con OPM-2 en voluntarios sanos por genotipo de CD16 (F/F, V/F o V/V).

La **Figura 13** es una serie de gráficos que representan el crecimiento dependiente de células de OPM-2 SC injertado en ratones KIRtg-Rag (curvas individuales).

40 La **Figura 14** es una serie de gráficos que representan el efecto del agotamiento de linfocitos NK sobre el crecimiento de OPM-2 en ratones KIRtg-RAG (n = 10).

La **Figura 15** muestra los resultados de un experimento diseñado para evaluar la implicación de los linfocitos NK en el control del crecimiento de OPM-2. El panel derecho es un gráfico que muestra el tiempo de duplicación (TD) del grupo de control y del grupo agotado en linfocitos NK (n = 10) y el panel izquierdo es un gráfico que muestra el retraso del crecimiento tumoral (RCT) del grupo agotado en linfocitos NK en relación con el grupo de control calculado a 4 volúmenes tumorales diferentes.

45 Las **Figuras 16A-C** son una serie de gráficos que representan la actividad antitumoral de lirilumab (IPH2102) en ratones KIRtg-RAG injertadas con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC (n = 10).

La **Figura 17** es un gráfico que muestra la eficacia de lirilumab en la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC (n = 10).

50 Las **Figuras 18A-C** son una serie de gráficos que muestran el seguimiento hasta el día 137 de ratones KIRtg-RAG con regresión completa del tumor OPM-2.

La **Figura 19** muestra la estrategia de activación para OPM-2 y linfocitos NK infiltrantes de tumores.

55 La **Figura 20** son gráficos que muestran la correlación entre CS1 y la expresión de Clase I y el volumen tumoral (gráfico de la izquierda) y el tiempo posterior al injerto (gráfico de la derecha).

La **Figura 21** es un gráfico que muestra la correlación entre la infiltración de linfocitos NK del tumor y el volumen tumoral.

Las **Figuras 22A-C** son una serie de gráficos que muestran la actividad antitumoral de elotuzumab en ratones KIRtg-RAG injertados con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC.

60 La **Figura 23** es un gráfico que muestra la comparación de los grupos tratados con elotuzumab con el control el día 28 posterior al injerto.

La **Figura 24** es un gráfico que muestra la eficacia de elotuzumab en la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC.

65 La **Figura 25** es una serie de gráficos que muestran la actividad combinada de elotuzumab y lirilumab (IPH2102) en ratones KIRtg-RAG.

La **Figura 26** es un gráfico que muestra la comparación de los grupos tratados con elotuzumab, IPH2102 y

tratamientos combinados con el control el día 27 posterior al injerto.

La **Figura 27** es un gráfico que muestra la eficacia de elotuzumab, IPH2102 y tratamientos combinados en la supervivencia de ratones KIRtg-RAG.

5 Las **Figuras 28A-D** son una serie de gráficos que muestran la participación de los linfocitos NK en la actividad combinada de elotuzumab y lirilumab (IPH2102).

La **Figura 29** es un gráfico que muestra el retraso en el crecimiento tumoral de los diferentes grupos tratados con respecto al control (hulgI + diluyente) calculado en 4 volúmenes tumorales predeterminados. Para elotuzumab e IPH2102, el RCT se calculó con  $n = 8$  ratones.

La **Figura 30** es un gráfico que muestra el tiempo de duplicación de los diferentes grupos tratados.

10 La **Figura 31** es un gráfico que muestra la comparación de diferentes grupos tratados el día 27 posterior al injerto.

La **Figura 32** son gráficos que muestran la participación de los linfocitos NK en la actividad combinada de elotuzumab y lirilumab y el efecto del tratamiento de combinación sobre la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier ( $n = 10$ ).

15 La **Figura 33** es una serie de gráficos que muestran la actividad combinada de elotuzumab y lirilumab (IPH2102) en un volumen tumoral alto.

La **Figura 34** son gráficos que muestran el tiempo de duplicación y el retraso en el crecimiento tumoral de los diferentes grupos tratados con respecto al control (hulgI + diluyente) calculado en 4 volúmenes tumorales predeterminados. Para el grupo combinado se calculó el TD con  $n = 8$  ratones.

20 La **Figura 35** es un gráfico que muestra la comparación el día 27 posterior al injerto de los diferentes grupos tratados con un volumen tumoral alto.

La **Figura 36** es un gráfico que muestra la eficacia de elotuzumab, IPH2102 y tratamientos combinados, administrados a un volumen tumoral alto, en la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC.

25 La **Figura 37** es un esquema que representa el diseño experimental de un estudio *in vivo* para evaluar la eficacia terapéutica de lirilumab y elotuzumab *in vivo*, en ratones KIR-cw3-tgRAG.

La **Figura 38** son gráficos que representan la actividad antitumoral de ratones KIR-cw3-tgRAG individuales tratados con un control, elotuzumab, lirilumab o lirilumab en combinación con elotuzumab.

La **Figura 39** es una gráfica que compara la actividad antitumoral mediana de los ratones KIR-cw3-tgRAG tratados con un control, elotuzumab, lirilumab o lirilumab en combinación con elotuzumab.

30 La **Figura 40** es un esquema que representa el diseño del estudio para el ensayo de fase I.

## Descripción detallada

### I. Definiciones

35 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" es un paciente humano con cáncer (por ejemplo, un paciente que tiene una malignidad hemática, tal como MM).

40 Como se usa en el presente documento, "cáncer" es un término utilizado para enfermedades en las que las células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos. Los cánceres incluyen tumores sólidos y malignidades hemáticas.

45 Los tumores sólidos son neoplasias (nuevo crecimiento de células) o lesiones (daño de estructuras anatómicas o alteración de funciones fisiológicas) formadas por un crecimiento anormal de células de tejido corporal distintas de la sangre, la médula ósea o las células linfáticas. Un tumor sólido consiste en una masa anormal de células, que puede provenir de diferentes tipos de tejidos tales como hígado, colon, mama o pulmón y que, inicialmente, crece en el órgano de su origen celular. Sin embargo, los tumores sólidos pueden diseminarse a otros órganos a través del crecimiento de tumores metastásicos en estadios avanzados de la enfermedad.

50 Las malignidades hemáticas son tipos de cáncer que afectan a la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Las malignidades hemáticas pueden derivar de cualquiera de los dos linajes principales de células sanguíneas, es decir, estirpes celulares mieloides y linfoides. La estirpe celular mieloides normalmente produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos, mientras que la estirpe celular linfoides produce linfocitos B, T, NK y células plasmáticas. Los linfomas (por ejemplo, el linfoma de Hodgkin), las leucemias linfocíticas y el mieloma derivan de la estirpe linfoides, mientras que la leucemia mielógena aguda y la crónica (LMA, LMC), los síndromes mielodisplásicos y las enfermedades mieloproliferativas son de origen mieloides.

60 El mieloma múltiple (también conocido como mieloma o mieloma de células plasmáticas) es un cáncer hemático formado por células plasmáticas malignas. Las células plasmáticas normales (también denominadas células B plasmáticas, plasmocitos y células B efectoras) son un tipo de glóbulo blanco que se encuentra en la médula ósea y produce anticuerpos. El MM se caracteriza por un número excesivo de células plasmáticas anormales en la médula ósea y por la sobreproducción de inmunoglobulina monoclonal intacta (IgG, IgA, IgD o IgE) o proteína de Bence-Jones (cadenas ligeras monoclonales libres). El MM representa una proliferación maligna de células plasmáticas derivadas de un único clon. En el MM, las células plasmáticas neoplásicas se acumulan en la médula ósea y producen una proteína monoclonal que provoca el deterioro de órganos y/o tejidos (Smith D, Yong K, *BMJ*. 26 de junio de 2013; 346: f3863). Las manifestaciones clínicas habituales del MM incluyen hipercalcemia, anemia, daño renal, mayor

susceptibilidad a infecciones bacterianas, producción deficiente de inmunoglobulina normal y osteoporosis difusa (por lo general en la pelvis, la columna vertebral, las costillas y el cráneo). En una realización, el MM es MM latente (por ejemplo, MM latente de alto riesgo).

5 La respuesta o progresión de la enfermedad del MM normalmente se mide de acuerdo con el tamaño de la reducción (o aumento) en paraproteínas. Como se usa en el presente documento, el término "paraproteína" (también denominada "proteína M") se refiere a una inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina que se produce en exceso por la proliferación clonal de células plasmáticas. Un exceso de paraproteínas en la sangre se conoce como paraproteinemia. Las paraproteínas forman una banda estrecha o "pico" en la electroforesis de proteínas, ya que todas  
10 son exactamente la misma proteína.

Otro factor que puede tenerse en cuenta al controlar la respuesta o progresión de la enfermedad del MM es el grado de "plasmocitosis" en la médula ósea. La plasmocitosis es la presencia de un gran número de células plasmáticas en el hueso u otro tejido en el que normalmente no se espera encontrarlas. También se tiene en cuenta la existencia de  
15 plasmacitomas de tejidos blandos (un tumor maligno de células plasmáticas que crece dentro de tejidos blandos) (Smith D, Yong K, *BMJ*. 26 de junio de 2013; 346: f3863).

Como se usa en el presente documento, "tratamiento eficaz" se refiere al tratamiento que produce un efecto beneficioso, por ejemplo, la mejora de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno. Un efecto beneficioso  
20 puede tomar la forma de una mejora sobre el valor basal, es decir, una mejora sobre una medición u observación realizada antes del inicio de la terapia de acuerdo con el método. Un efecto beneficioso también puede tomar la forma de detener, ralentizar, retardar o estabilizar una progresión perjudicial de un marcador de cáncer. El tratamiento eficaz puede referirse al alivio de al menos un síntoma de un cáncer. Dicho tratamiento eficaz puede, por ejemplo, reducir el dolor del paciente, reducir el tamaño y/o el número de lesiones, puede reducir o prevenir la metástasis y/o puede  
25 retardar el crecimiento tumoral.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente que proporciona el resultado biológico, terapéutico y/o profiláctico deseado. Ese resultado puede ser la reducción, la mejoría, la paliación, la disminución, el retraso y/o el alivio de uno o más de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración  
30 deseada de un sistema biológico. En un ejemplo, una "cantidad eficaz" es la cantidad de anticuerpo anti-KIR y la cantidad de anticuerpo anti-CS1, en combinación, que se ha demostrado clínicamente que efectúa una disminución significativa en el cáncer o una disminución de la progresión del cáncer, por ejemplo, un cáncer hemático, tal como el MM.

35 Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. La cantidad eficaz del fármaco o la composición puede aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al cáncer.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "inducción" y "fase de inducción" se usan indistintamente y se refieren a la primera fase del tratamiento en el ensayo clínico. Por ejemplo, durante la inducción, los sujetos pueden recibir dosis intravenosas de un anticuerpo anti-KIR en combinación con un anticuerpo anti-CS1.  
40

Como se usan en el presente documento, las expresiones "mantenimiento" y "fase de mantenimiento" se usan indistintamente y se refieren a la segunda fase del tratamiento en el ensayo clínico. Por ejemplo, durante el mantenimiento, los sujetos pueden recibir un anticuerpo anti-KIR en combinación con un anticuerpo anti-CS1. En determinadas realizaciones, el tratamiento continúa siempre que se observe un beneficio clínico o hasta que se produzca una toxicidad o una progresión de la enfermedad inmanejables.  
45

Como se usan en el presente documento, las expresiones "dosis fija", "dosis constante" y "dosis fija constante" se usan indistintamente y se refieren a una dosis que se administra a un paciente sin tener en cuenta el peso o el área de superficie corporal (ASC) del paciente. Por tanto, la dosis fija o constante no se proporciona como una dosis en mg/kg, sino más bien como una cantidad absoluta del agente (por ejemplo, el anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1).  
50

Como se usa en el presente documento, una "dosis basada en el área de superficie corporal (ASC)" se refiere a una dosis (por ejemplo, del anticuerpo anti-KIR y/o del anticuerpo anti-CS1) que se ajusta al área de superficie corporal (ASC) del paciente individual. Una dosis basada en el ASC puede proporcionarse como mg/kg de peso corporal. Se han publicado diversos cálculos para llegar al ASC sin medición directa, el más utilizado es la fórmula de Du Bois (véase Du Bois D, Du Bois EF (junio de 1916) *Archives of Internal Medicine* 17 (6): 863-71 y Verbraecken, J. et al. (abril de 2006). *Metabolism-Clinical and Experimental* 55 (4): 515-24). Otras fórmulas de ASC de ejemplo incluyen la fórmula de Mosteller (Mosteller RD. *N Engl J Med.*, 1987; 317: 1098), la fórmula de Haycock (Haycock GB, et al., *JPediatr* 1978, 93: 62-66), la fórmula de Gehan y George (Gehan EA, George SL, *Cancer Chemother Rep* 1970, 54: 225-235), la fórmula de Boyd (Current, JD (1998), *The Internet Journal of Anesthesiology* 2 (2) y Boyd, Edith (1935), Universidad de Minnesota. El Instituto de Bienestar Infantil, Serie de monografías, No. x. Londres: Oxford University Press), la fórmula de Fujimoto (Fujimoto S, et al., *Nippon Eiseigaku Zasshi* 1968; 5: 443-50), la fórmula de Takahira (Fujimoto S, et al., *Nippon Eiseigaku Zasshi* 1968; 5: 443-50) y la fórmula de Schlich (Schlich E, et al., *Ernährungs Umschau* 2010; 57: 178-183).  
55  
60  
65



El término "anticuerpo" describe polipéptidos que comprenden al menos un sitio de unión a antígeno derivado de anticuerpo (por ejemplo, región VH/VL o Fv, o CDR). Los anticuerpos incluyen formas conocidas de anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo también puede ser un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, Affibody®, nanocuerpo o un anticuerpo de dominio. El anticuerpo también puede ser de cualquiera de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de origen natural o puede ser un anticuerpo que ha sido alterado (por ejemplo, mediante mutación, supresión, sustitución, conjugación con un resto o de anticuerpo). Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una o más variantes de aminoácidos (en comparación con un anticuerpo de origen natural) que cambia una propiedad (por ejemplo, una propiedad funcional) del anticuerpo. Por ejemplo, se conocen numerosas alteraciones de este tipo en la técnica que afectan, por ejemplo, a la vida media, a la función efectora y/o a respuestas inmunitarias contra el anticuerpo en un paciente. El término anticuerpo también incluye construcciones polipeptídicas artificiales que comprenden al menos un sitio de unión a antígeno derivado de anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, un "receptor similar a Ig citolítico", "receptor inhibidor citolítico" o "KIR", se refiere a una proteína o un polipéptido codificados por un gen que es miembro de la familia de genes KIR o por un ADNc preparado a partir de un gen de este tipo. Una revisión detallada de la familia de genes KIR, que incluye la nomenclatura de los genes KIR y los productos de los genes KIR, y los números de acceso de Genbank para los KIR de ejemplo, es "*The KIR Gene Cluster*" de M. Carrington y P. Norman, disponible en el sitio web del NCBI denominado "Bookshelf" (accesible a través de la dirección de la World Wide Web (WWW) [ncbi.nlm.nih.gov/books](http://ncbi.nlm.nih.gov/books); véase también Campbell et al., *Immunology*, 132 (3): 315-25; marzo de 2011). Las secuencias de los genes KIR y los ADNc humanos, así como sus productos proteicos, están disponibles en bases de datos públicas, incluyendo GenBank. Las entradas de GenBank de ejemplo no limitantes de KIR humanos tienen los siguientes números de acceso: KIR2DL1: número de acceso de Genbank U24076, NM\_014218, AAR16197 o L41267; KIR2DL2: número de acceso de Genbank U24075 o L76669; KIR2DL3: número de acceso de Genbank U24074 o L41268; KIR2DL4: número de acceso de Genbank X97229; KIR2DS1: número de acceso de Genbank X89892; KIR2DS2: número de acceso de Genbank L76667; KIR2DS3: número de acceso de Genbank NM\_012312 o L76670 (variante de corte y empalme); KIR3DL1: número de acceso de Genbank L41269; y KIR2DS4: número de acceso de Genbank AAR26325. Un KIR puede comprender de 1 a 3 dominios extracelulares y puede tener una cola citoplasmática larga (es decir, de más de 40 aminoácidos) o corta (es decir, de menos de 40 aminoácidos). Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, estas características determinan la nomenclatura de un KIR. Las moléculas KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 y KIR2DS4 de ejemplo comprenden polipéptidos que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos respectivas:

**Dominio extracelular KIR2DL1:**

HEGVHRKPSLLAHPGXLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLLHREGMFNDTLRLI  
 GEHHDGVSKANFSISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDIVIIGLY  
 EKPSLSAQXGPTVLAGENVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRLPAGPKVN  
 40 GTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFDHSPYEWSSDPLLVSVTGNPSNSWPSP TEPSSKTGNPRHLH (SEQ ID NO:13), donde "X" en la posición 16 es P o R y donde "X" en la posición 114 es P o L, que representa variantes alélicas.

**Dominio extracelular KIR2DL2:**

45 HEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFHFLLHREGKFKDTLHLIG  
 EHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYE  
 KPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGT  
 FQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSSDPLLVSIGNPSNSWPSPTEP  
 SSKTGNPRHLH (SEQ ID NO:14)

**Dominio extracelular KIR2DL3:**

HEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVRFQHFLFHREGKFKDTLHLIG  
 EHHDGVSKANFSIGPMMQDLGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYE  
 KPSLSAQPGPTVLAGE SVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRFSAGPKVNGT  
 FQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSSSDPLLVSVTGNPSNSWPSPTE  
 PSSETGNPRHLH (SEQ ID NO:15)

5 **Dominio extracelular KIR2DS4:**

QEGVHRKPSFLALPGHLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLLHREGKFNNTLHLIG  
 EHHDGVSKANFSIGPMMMPVLAGTYRCYGSVPHSPYQLSAPSDPLDMV (SEQ  
 ID NO:16)

10 El término "KIR2DL2/3" se refiere a cualquiera o ambos de los receptores KIR2DL2 y KIR2DL3. Estos dos receptores tienen una homología muy alta, están codificados por formas alélicas del mismo gen y se consideran en la técnica funcionalmente similares.

15 Como se usan en el presente documento, los términos CS1, SLAMF7, miembro 7 de la familia SLAM, subconjunto CD2, CRACC, células citotóxicas activadoras del receptor similar a CD2, Proteína 19A24, 19A, células citotóxicas activadoras del receptor similar a CD2, CD319, proteína similar a Novel LY9 (antígeno linfocítico 9), proteína de membrana FOAP-12, antígeno CD319, proteína 19A, APEX-1, FOAP12 y Novel Ly93 se usan indistintamente, e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de CS1 humano y análogos que tienen al menos un epítipo común con CS1.

20 CS1 es una glicoproteína de la superficie celular que se expresa en gran medida en las células de MM. CS1 se caracteriza por dos dominios similares a inmunoglobulina (Ig) extracelulares y un dominio de señalización intracelular con receptores inmunitarios a base de tirosina (Yu-Tzu Tai, et al., *Blood*. 30 de abril de 2009; 113 (18): 4309-4318; Bhat R, et al., *J Leukoc Biol*. 2006; 79: 417-424; Fischer A, et al., *Curr Opin Immunol*. 2007; 19: 348-353; Boles KS, et al., *Immunogenetics*. 2001; 52: 302-307; Lee JK, et al., *J Immunol*. 2007; 179: 4672-4678; y Veillette A., *Immunol Rev*.  
 25 2006; 214: 22-34). CS1 se expresa en niveles altos en células plasmáticas normales y malignas, pero no en órganos normales, tumores sólidos o células madre CD34<sup>+</sup>. Solo un pequeño subconjunto de linfocitos en reposo, incluyendo los linfocitos NK y un subconjunto de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, expresan niveles detectables pero bajos de CS1 (Hsi ED, et al., *Clin. Cancer Res*. 2008; 14: 2775-2784 y Murphy JJ, et al., *Biochem J*. 2002; 361: 431-436).

30 CS1 fue aislado y clonado por Boles et al. (*Immunogenetics*. 2001; 52 (3-4): 302-7). La secuencia de CS1 completa puede encontrarse en el n.º de acceso de GenBank.: NM\_021181.3 y es como se indica a continuación:

MAGSPTCLTLIYLWQLTGSAASGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIV  
 WTFNTTPLVTIQPEGGTIIVTQNRNRERVDFFPDGGYSLKLSKLNDSGIYYV  
 GIYSSSLQQPSTQEYVLHVYEHLSKPKVMTMGLQSNKNGTCVTNLTCCMEHGE  
 EDVIYTWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESDMTFICVARNPVSARNFSSPIL  
 ARKLCEGAADDPDSSMVLCLLLVPLLLSLFVLGLFLWFLKRERQEEYIEEKK  
 35 RVDICRETPNICPHSGENTEYDTIPHNTNRTILKEDPANTVYSTVEIPKKMENPHS  
 LLTMPDTPRLFA YENV (SEQ ID NO:29)

**Ila. Anticuerpos anti-KIR**

40 Pueden generarse anticuerpos anti-KIR-humano (o dominios VH/VL derivados de los mismos) adecuados para su uso en la invención usando métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos anti-KIR reconocidos en la técnica. En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-KIR tiene reactividad cruzada con múltiples receptores KIR inhibidores y potencia la citotoxicidad de los linfocitos NK que llevan uno o más de estos receptores. Por ejemplo, el anticuerpo anti-KIR puede unirse a cada uno de KIR2D2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3 y puede potenciar la actividad de los linfocitos NK reduciendo, neutralizando y/o revirtiendo la inhibición de la citotoxicidad de los linfocitos  
 45 NK mediada por cualquiera o todos estos KIR. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-KIR no se une a KIR2DS4 y/o KIR2DS3. Por ejemplo, puede usarse el anticuerpo monoclonal 1-7F9 (también conocido como

IPH2101), descrito en el documento WO 2006/003179. Anticuerpos anti-KIR adicionales que se describen en el presente documento incluyen 14F1, 1-6F1 y 1-6F5, descritos en el documento WO 2006/003179, anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos reconocidos en la técnica por unirse al KIR; y también aquellos desvelados en los documentos WO 2005/003168, WO 2005/009465, WO 2006/072625, WO 2006/072626, WO 2007/042573, WO 2008/084106, WO 2010/065939, WO 2012/071411 y WO/2012/160448.

Un anticuerpo anti-KIR de ejemplo es lirilumab que comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias que se muestran en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes del mismo. Lirilumab también se denomina BMS-986015, IPH2102 o, en el documento WO 2008/084106, 1-7F9 (S241P), y los términos "lirilumab", "IPH2102" y "BMS-986015" se usan indistintamente en el presente documento. Lirilumab es un anticuerpo anti-KIR completamente humano que comprende las mismas regiones variables de la cadena pesada y ligera que 1-7F9 (descrito en el documento WO 2006/003179; también conocido como IPH2101) y, por tanto, se une al mismo epítipo que 1-7F9, pero difiere de 1-7F9 en que (1) se prepara en células de ovario de hámster chino (CHO), mientras que 1-7F9 se prepara a partir de células del hibridoma, y (2) se ha introducido una mutación de bisagra estabilizante (S23 IP) en lirilumab (documento WO 2008/084106).

En otras realizaciones, el anticuerpo comprende las regiones variables de la cadena pesada y ligera de lirilumab. El anticuerpo anti-KIR utilizado de acuerdo con la invención comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias que se exponen en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias que se exponen en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácidos que se exponen en la SEQ ID NO: 3 y/o la SEQ ID NO: 5, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende las regiones variables de la cadena pesada (VH) y/o variables de la cadena ligera (VL) codificadas por las secuencias de ácido nucleico que se exponen en la SEQ ID NO: 4 y/o la SEQ ID NO: 6, respectivamente. Anticuerpos adicionales anti-KIR que se describen en el presente documento incluyen anticuerpos que compiten por la unión con, y/o se unen al mismo epítipo en KIR que, los anticuerpos mencionados anteriormente; y anticuerpos que tienen al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad de la región variable con la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 5).

### 30 IIb. Anticuerpos anti-CS1

Pueden generarse anticuerpos anti-CS1-humano (o dominios VH y/o VL derivados de los mismos) adecuados para su uso en la invención usando métodos bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos anti-CS1 conocidos incluyen el anticuerpo monoclonal mAb 162 descrito en Bouchon et al., *J. Immunol*, 167: 5517-5521 (2001), el anticuerpo anti-CS1 descrito en Matthew et al., (Patente de los EE.UU. N.º 7.041.499), el anticuerpo anti-CS1, Luc 63 y otros anticuerpos que comparten el mismo epítipo, incluyendo Luc 4, Luc 12, Luc 23, Luc 29, Luc 32 y Luc 37, el anticuerpo anti-CS1 Luc 90 y otros anticuerpos que comparten el mismo epítipo, incluyendo Luc 34, Luc 69 y Luc X y los anticuerpos anti-CS1 Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc35, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, LucX.1, LucX.2 y PDL-241, descritos en Williams et al., (Patente de los EE.UU. N.º 7.709.610). Anticuerpos adicionales anti-CS1 que se describen en el presente documento incluyen anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos reconocidos en la técnica para unirse a CS1.

Un anticuerpo anti-CS1 de ejemplo es elotuzumab (también denominado BMS-901608 o HuLuc63) que comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias que se muestran en las SEQ ID NO: 17 y 18, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos. Elotuzumab es un anticuerpo monoclonal anti-CS-1 de IgG1 humanizado descrito en los documentos W02004/100898, W02005/10238, W02008/019376, W02008/019378, W02008/019379, W02010/051391, W02011/053321 y W02011/053322. Se sabe que el elotuzumab media la CCDA a través de los linfocitos NK (Van Rhee, F., et al., 2009; *Cáncer Mol Ther*, 8 (9): 2616-24).

En otras realizaciones, el anticuerpo comprende las regiones variables de la cadena pesada y ligera de elotuzumab. El anticuerpo anti-CS1 utilizado de acuerdo con la invención comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias que se exponen en las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias que se exponen en las SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo comprende regiones VH y/o VL que tienen las secuencias de aminoácidos que se exponen en la SEQ ID NO: 19 y/o la SEQ ID NO: 21, respectivamente. Anticuerpos anti-KIR adicionales que se describen en el presente documento incluyen anticuerpos que compiten por unirse y/o que se unen al mismo epítipo en CS1 que los anticuerpos mencionados anteriormente; y los anticuerpos que tienen al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable con los anticuerpos mencionados anteriormente (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad de la región variable con la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 21).

### III. Composiciones

65 En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo anti-KIR y un anticuerpo anti-CS1, el anticuerpo anti-KIR que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la

cadena pesada que se exponen en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que se exponen en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, y el anticuerpo anti-CS1 que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada que se exponen en las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que se exponen en las SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente.

Las composiciones adecuadas para la administración a pacientes humanos se formulan normalmente para la administración parenteral, por ejemplo, en un vehículo líquido o adecuadas para la reconstitución en solución líquida o suspensión para la administración intravenosa.

En general, dichas composiciones comprenden normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora gubernamental o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, en particular en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, ricinoleato de glicerol polietilenglicol y similares. Pueden emplearse soluciones salinas en agua o solución acuosa y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, en particular para soluciones inyectables (por ejemplo, que comprenden un anticuerpo anti-KIR o anti-CS1). Las composiciones líquidas para la administración parenteral pueden formularse para la administración por inyección o infusión continua. Las vías de administración por inyección o infusión incluyen la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal y subcutánea. En una realización, los anticuerpos anti-KIR y/o anti-CS1 se administran por vía intravenosa (por ejemplo, por separado o juntos, cada uno, por ejemplo, en el transcurso de una hora, 90 minutos o dos horas).

#### IV. Poblaciones de pacientes

En el presente documento se proporcionan métodos eficaces para tratar el cáncer (por ejemplo, un cáncer hemático) en un paciente humano usando una combinación de un anticuerpo anti-KIR y un anticuerpo anti-CS1. De acuerdo con la invención, el paciente humano padece mieloma múltiple.

#### V. Terapia de combinación

Las terapias de combinación que se proporcionan en el presente documento implican la administración de un anticuerpo anti-KIR y un anticuerpo anti-CS1, para tratar a sujetos con cáncer (por ejemplo, un cáncer hemático). En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-KIR y un anticuerpo anti-CS1 como se definen en las reivindicaciones en combinación para su uso en el tratamiento de sujetos humanos que tienen MM. En una realización particular, el anticuerpo anti-KIR es liriumab. En otra realización, el anticuerpo anti-CS1 es elotuzumab.

Como se usa en el presente documento, la administración complementaria o combinada (coadministración) incluye la administración simultánea de los compuestos en la misma o diferente forma de dosificación, o la administración separada de los compuestos (por ejemplo, administración secuencial). Por tanto, los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 pueden administrarse simultáneamente en una única formulación. Como alternativa, los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 pueden formularse para la administración separada y se administran de forma simultánea o secuencial.

Por ejemplo, el anticuerpo anti-CS1 puede administrarse en primer lugar seguido de (por ejemplo, seguido inmediatamente de) la administración del anticuerpo anti-KIR o viceversa. Dicha administración concurrente o secuencial produce preferentemente que ambos anticuerpos estén presentes simultáneamente en pacientes tratados.

#### VI. Protocolos de tratamiento

Se describen métodos de tratamiento de MM en un paciente humano en el presente documento, comprendiendo los métodos administrar al paciente una cantidad eficaz de cada uno de un anticuerpo anti-KIR y uno anti-CS1.

Adicionalmente, en el presente documento se describen métodos de tratamiento de MM en un paciente humano, comprendiendo los métodos administrar al paciente una cantidad eficaz de cada uno de: (a) un anticuerpo que se une con alta afinidad y especificidad a, y bloquea la actividad inhibidora de, un receptor KIR inhibidor en un linfocito NK y (b) un anticuerpo que se une con alta afinidad y especificidad a CS1 en la superficie de una célula de mieloma múltiple.

Los protocolos de tratamiento adecuados para tratar a un paciente humano con MM incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad eficaz de cada uno de los siguientes:

- (a) un anticuerpo anti-KIR que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 3 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 5, y
- (b) un anticuerpo anti-CS1 que comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena

pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 19 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 21.

5 En una realización del uso médico de acuerdo con la invención, el tratamiento de MM en un paciente humano comprende:

10 (A) la administración del anticuerpo anti-CS1 semanalmente durante un total de 8 dosis a lo largo de 8 semanas y la administración del anticuerpo anti-KIR cada 4 semanas durante un total de 2 dosis a lo largo de 8 semanas durante una fase de inducción, seguida de (B) la administración del anticuerpo anti-CS 1 cada 2 semanas y la administración del anticuerpo anti-KIR cada 4 semanas durante una fase de mantenimiento,

en el que el anticuerpo anti-KIR se administra a una dosis de 0,1-20 mg/kg de peso corporal y el anticuerpo anti-CS1 se administra a una dosis de 0,1-20 mg/kg de peso corporal durante las fases de inducción y mantenimiento.

15 En determinadas realizaciones, cada dosis del anticuerpo anti-KIR se administra a 0,1, 0,3, 1, 3, 6, 10 o 20 mg/kg. En realizaciones preferidas, cada dosis del anticuerpo anti-KIR se administra a 0,3, 1 o 3 mg/kg.

20 En otras realizaciones, cada dosis del anticuerpo anti-CS1 se administra a 0,1, 0,3, 1, 3, 6, 10 o 20 mg/kg de peso corporal. En una realización preferida, cada dosis del anticuerpo anti-CS1 se administra a 10 mg/kg.

En una realización, el anticuerpo anti-KIR y el anticuerpo anti-CS1 se administran a las siguientes dosis durante la fase de inducción o de mantenimiento:

- 25 (a) 0,3 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1;  
 (b) 1 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1; o  
 (c) 3 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1.

30 En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-KIR y/o anti-CS1 varía a lo largo del tiempo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 pueden administrarse inicialmente a una dosis alta y pueden disminuirse a lo largo del tiempo. En otra realización, el anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 se administran inicialmente a una dosis baja y aumentan a lo largo del tiempo.

35 En otra realización, la cantidad de anticuerpos anti-KIR y/o anti-CS1 administrados es constante para cada dosis. En otra realización, la cantidad de anticuerpo administrado varía con cada dosis. Por ejemplo, la dosis de mantenimiento (o de seguimiento) del anticuerpo puede ser mayor o igual a la dosis de carga que se administra en primer lugar. En otra realización, la dosis de mantenimiento del anticuerpo puede ser menor o igual a la dosis de carga.

40 En una realización, el anticuerpo anti-CS1 se administra el (1) día 1, semana 1, (2) día 1, semana 2, (3), día 1, semana 3, (4), día 1, semana 4, (5) día 1, semana 5, (6) día 1, semana 6, (7) día 1, semana 7 y (8) día 1, semana 8, de la fase de inducción. En otra realización, el anticuerpo anti-KIR se administra en (1) día 1, semana 1 y (2) día 1, semana 5 de la fase de inducción. En otra realización, el anticuerpo anti-CS1 se administra en (1) día 1, semana 10 y (2) día 1, semana 15 de la fase de mantenimiento. En otra realización, el anticuerpo anti-KIR se administra el día 1, semana 10 de la fase de mantenimiento.

45 En otra realización, se administran 8 dosis del anticuerpo anti-CS1 por ciclo de ocho semanas durante la fase de inducción. En otra realización, se administran 2 dosis del anticuerpo anti-KIR por ciclo de ocho semanas durante la fase de inducción.

50 En otras realizaciones, los anticuerpos anti-KIR y/o anti-CS1 se administran una vez por semana, una vez cada dos o tres semanas, una vez por mes durante el tiempo durante el cual se observe un beneficio clínico o hasta que haya una respuesta completa, enfermedad progresiva confirmada o toxicidad inmanejable.

55 En otra realización, el anticuerpo anti-CS1 y el anticuerpo anti-KIR se administran como una primera línea de tratamiento (por ejemplo, el tratamiento inicial o el primer tratamiento). En otra realización, el anticuerpo anti-CS1 y el anticuerpo anti-KIR se administran como una segunda línea de tratamiento (por ejemplo, después del tratamiento inicial o el primer tratamiento, incluso después de la recaída y/o cuando el primer tratamiento ha fracasado).

60 En otra realización, la dosis del anticuerpo anti-KIR se selecciona para proporcionar una saturación sustancialmente completa en pacientes humanos. Como se usa en el presente documento, la expresión "saturación sustancialmente completa" o "saturación completa" se refiere a al menos un 90 % de ocupación del KIR objetivo y, preferentemente, al menos un 95 % de ocupación del receptor. El tratamiento incluye opcionalmente evaluar al paciente para la potenciación de los linfocitos NK y/o la actividad antitumoral (que puede realizarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada, varias de las cuales se conocen en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el nivel de ocupación de KIR, el marcador CD107a, etc., como se describe en el presente documento).

65

Por ejemplo, se administra un anticuerpo anti-KIR a una dosis y una frecuencia de dosificación que consigue al menos aproximadamente el 90 %, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de ocupación de KIR en linfocitos NK en plasma durante al menos aproximadamente uno, dos, tres o seis meses, teniendo, por tanto, una saturación sostenida durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, al menos 3 meses, 6 meses). En otra realización, la dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/kg y de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg/kg. La frecuencia de dosificación está en el intervalo de una vez al día a una vez cada 2 meses, de aproximadamente una vez por semana a aproximadamente una vez cada 2 meses; o aproximadamente una vez al mes. Como alternativa, la frecuencia de dosificación se selecciona entre aproximadamente tres veces, aproximadamente dos veces y aproximadamente una vez por día; aproximadamente cinco veces, aproximadamente cuatro veces, aproximadamente tres veces y aproximadamente dos veces por semana; y aproximadamente una vez cada dos, cuatro y seis semanas.

En una realización preferida, una dosis de anticuerpo anti-KIR que da como resultado la saturación del receptor sustancialmente completa (por ejemplo, una ocupación del receptor de al menos aproximadamente el 90 % o el 95 %) se administra de aproximadamente 2 veces por semana a aproximadamente una vez por mes, de aproximadamente 2 veces por semana a aproximadamente una vez cada 2 meses, o de aproximadamente una vez por mes a aproximadamente una vez cada 2 meses. La dosis puede administrarse, por ejemplo, al menos 3 veces, al menos 6 veces o más. Por ejemplo, el tratamiento puede comprender administrar un anticuerpo anti-KIR a una dosis y una frecuencia de dosificación que consiga al menos aproximadamente un 90 % o un 95 % de ocupación de KIR en los linfocitos NK durante al menos aproximadamente dos semanas, un mes, 6 meses, 9 meses o 12 meses.

En otra realización, una pauta da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa sostenida. Se administra una dosis de anticuerpo anti-KIR que da como resultado la saturación del receptor sustancialmente completa durante un período de al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas o 1 mes. Cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa (por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 % o un 95 % de ocupación del receptor) durante aproximadamente una semana, la dosis puede administrarse, por ejemplo, entre una vez por semana y una vez cada dos semanas; cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa durante aproximadamente dos semanas, la dosis puede administrarse, por ejemplo, entre una vez cada dos semanas y una vez al mes. Cuando la dosis da como resultado una saturación del receptor sustancialmente completa durante aproximadamente dos semanas a aproximadamente un mes, la dosis puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente una vez al mes. En cada pauta, la dosis puede administrarse, por ejemplo, al menos 3 veces, al menos 6 veces o más. Por ejemplo, el tratamiento puede comprender administrar un anticuerpo anti-KIR a una dosis y una frecuencia de dosificación que consiga al menos aproximadamente el 95 % de ocupación de KIR en linfocitos NK durante al menos aproximadamente 6 meses, 9 meses o 12 meses.

## VII. Resultados

En el presente documento se describen métodos para tratar el MM en un paciente, que comprenden administrar al paciente un anticuerpo anti-CS1 y un anticuerpo anti-KIR. Preferentemente, la terapia de combinación presenta sinergia terapéutica. "Sinergia terapéutica" se refiere a un fenómeno en el que el tratamiento de pacientes con una combinación de agentes terapéuticos manifiesta un resultado terapéuticamente superior al resultado conseguido por cada constituyente individual de la combinación utilizado en su dosis óptima (T. H. Corbett et al., 1982, *Cancer Treatment Reports*, 66, 1187). Por ejemplo, un resultado terapéuticamente superior es uno en el que los pacientes a) presentan menos incidencias de acontecimientos adversos mientras reciben un beneficio terapéutico que es igual o superior a aquel en el que cada componente de la combinación se administra como monoterapia a la misma dosis que en la combinación, o b) no presentan toxicidades limitantes de la dosis mientras reciben un beneficio terapéutico que es mayor que el del tratamiento con cada constituyente individual de la combinación cuando cada constituyente se administra a las mismas dosis en la combinación o combinaciones que se administran como componentes individuales.

En consecuencia, en una realización, la administración de los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 tiene un efecto sinérgico en el tratamiento en comparación con la administración de cualquier anticuerpo solo. En una realización, la terapia de combinación muestra una sinergia terapéutica en un paciente que tiene una alta carga tumoral o cáncer en estadio avanzado. En otra realización, la terapia de combinación muestra una sinergia terapéutica en un paciente que tiene uno o más tumores (por ejemplo, un tumor sólido) que han sido infiltrados por linfocitos NK. En una realización adicional, la terapia de combinación presenta una actividad antitumoral sinérgica que está mediada por linfocitos NK. En otra realización más, la terapia de combinación presenta una sinergia terapéutica en la prolongación de la supervivencia del paciente.

Como alternativa, la terapia de combinación de un anticuerpo anti-CS1 y un anticuerpo anti-KIR puede tener un efecto aditivo o superaditivo sobre la supresión de MM, en comparación con la monoterapia con cualquier anticuerpo solo. Por "aditivo" se entiende un resultado que es mayor en grado que el mejor resultado por separado conseguido mediante monoterapia con cada componente individual, mientras que "superaditivo" se usa para indicar un resultado que excede en grado la suma de dichos resultados separados. Un efecto aditivo puede medirse como, por ejemplo, la reducción de las paraproteínas, la reducción de la plasmocitosis, la reducción de las lesiones óseas a lo largo del tiempo, el aumento de la tasa de respuesta general o el aumento de la supervivencia media o general.

- 5 La respuesta o progresión de la enfermedad del MM, en particular, generalmente se mide de acuerdo con el tamaño de reducción (o aumento) en paraproteínas. Sin embargo, también se tiene en cuenta el grado de plasmocitosis en la médula ósea (aumento en el porcentaje de células plasmáticas en la médula ósea), la progresión de las lesiones óseas y la existencia de plasmacitomas de tejidos blandos (tumores de células plasmáticas malignas que crecen dentro de tejidos blandos) (Smith D, 15 Yong K, *BMJ*, 2013, 26 de junio; 346: f3863). Las respuestas a la terapia pueden incluir:

<p><b>Respuesta completa</b> Sin paraproteína detectable y desaparición de cualquier plasmacitoma de tejido blando y &lt;5 % de células plasmáticas en la médula ósea.</p>
<p><b>Respuesta parcial muy buena</b> Reducción de más del 90 % en paraproteínas o paraproteínas detectables, pero demasiado baja para medir.</p>
<p><b>Respuesta parcial</b> Superior al 50 % de reducción en paraproteínas.</p>
<p><b>Sin cambios o enfermedad estable</b> No cumple los criterios de respuesta o progresión de la enfermedad.</p>
<p><b>Enfermedad progresiva</b> Al menos un aumento del 25 % en paraproteínas (aumento de al menos 5 g/l), desarrollo de nuevas lesiones óseas o plasmacitomas o hipercalcemia. (calcio sérico corregido &gt;2,65 mmol/l)</p>

- 10 Los pacientes tratados de acuerdo con los métodos que se desvelan en el presente documento experimentan preferentemente una mejoría en al menos un signo del MM. En una realización, el paciente tratado muestra una respuesta completa (RC), una respuesta parcial muy buena (RPMB), una respuesta parcial (RP) o una enfermedad estable (EE).
- 15 En una realización, la mejora se mide mediante una reducción en paraproteína y/o disminución o desaparición de plasmacitomas de tejidos blandos. En otra realización, las lesiones pueden medirse por radiografía. En otra realización, pueden usarse citología o histología para evaluar la capacidad de respuesta a una terapia.
- 20 En otras realizaciones, la administración de cantidades eficaces del anticuerpo anti-KIR y del anticuerpo anti-CS1 de acuerdo con cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento produce al menos un efecto terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en la reducción en paraproteína, la disminución o desaparición de los plasmacitomas de tejidos blandos, RC, RPMB, RP o EE. En otras realizaciones más, el tratamiento produce una tasa de beneficio clínico comparable (TBC = RC + RP + EE > 6 meses) mejor que la conseguida por un anticuerpo anti-KIR o un anticuerpo anti-CS1 solo. En otras realizaciones, la mejora de la tasa de beneficio clínico es
- 25 aproximadamente del 20 %, del 30 %, del 40 %, del 50 %, del 60 %, del 70 %, del 80 % o más en comparación con un anticuerpo anti-KIR o un anticuerpo anti-CS1 solo.

#### VIII. Kits y formas de dosificación unitaria

- 30 En el presente documento también se proporcionan kits que incluyen una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo anti-KIR, tal como lirilumab, y un anticuerpo anti-CS1, tal como elotuzumab, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad terapéuticamente eficaz adaptada para su uso en los métodos anteriores. Opcionalmente, los kits también pueden incluir instrucciones, por ejemplo, que comprendan programas de administración, para permitir que un profesional (por ejemplo, un médico, enfermera o paciente) administre la
- 35 composición contenida en los mismos para administrar la composición a un paciente que tenga MM. El kit también puede incluir una jeringuilla.
- Opcionalmente, los kits incluyen múltiples envases de las composiciones farmacéuticas de dosis única, conteniendo cada una de las cuales una cantidad eficaz del anticuerpo anti-KIR o anti-CS1 para una administración única de
- 40 acuerdo con los métodos proporcionados anteriormente. Los instrumentos o dispositivos necesarios para administrar las composiciones farmacéuticas también pueden incluirse en los kits. Por ejemplo, un kit puede proporcionar una o más jeringuillas precargadas que contengan una cantidad del anticuerpo anti-KIR o anti-CS1.
- mm

La presente invención proporciona un kit para tratar el MM en un paciente humano, comprendiendo el kit:

- 5 (a) una dosis de un anticuerpo anti-KIR que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada que se exponen en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que se exponen en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente;
- 10 (b) una dosis de un anticuerpo anti-CS1 que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada que se exponen en las SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera que se exponen en las SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente; e
- (c) instrucciones para el uso del anticuerpo anti-KIR y anti-CS1 anticuerpo en los métodos que se describen en el presente documento.

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1: Estudios *in vitro* - Combinación de Elotuzumab y Lirilumab

20 Se realizaron estudios *in vitro* para determinar el efecto de una combinación de diversas dosis de elotuzumab y lirilumab sobre la activación de linfocitos NK primarios por estirpes celulares de MM. También se realizaron estudios para evaluar si el genotipo de CD16 o el genotipo de HLA-C de un individuo es predictivo de las respuestas de los linfocitos NK. A continuación, se presenta un sumario de los materiales y métodos utilizados en estos experimentos.

### 25 Materiales y Métodos

#### Productos

Especificidad	Conjugado	Clon	Proveedor	Volumen (FACS)
CD107a	APC	H4A3	Becton Dickinson N.º de catálogo 641581	5 µl/ensayo
CD107b	Alexa647	H4B4	ebioscience N.º de catálogo 51-1078-42	5 µl/ensayo
IFN-γ	PerCp-Cy5 .5	4S.B3	ebioscience N.º de catálogo 45-7319	5 µl/ensayo
TNF-α	PE	Mab11	Becton Dickinson N.º de catálogo 554513	10 µl/ensayo
elotuzumab (25 mg/ml)	No aplicable	No aplicable	BMS N.º de lote 1B68974 expired on05/2012	No aplicable
IPH2102 (10 mg/ml)	No aplicable	No aplicable	Innate pharma N.º de lote IPH2102-01C-01 LIRILUMAB	No aplicable
anti-CS-1	PE	No aplicable	ebioscience N.º de catálogo 12-2229	5 µl/ensayo
CD3	Pacific Blue	SP34-2	Becton Dickinson N.º de catálogo. 558124	3 µl/ensayo
CD56	PE-Cy7	HCD56	Biologend N.º de catálogo BLE318318	5 µl/ensayo
IgG4 humana	FITC	HP6025	Southern Biotech N.º de catálogo 9200-09	1,66 µl/ensayo
HLA-ABC	FITC	B9.12.1	Beckman Coulter N.º de catálogo IM1838U	5 µl/ensayo
CD14	APC	RMO52	Beckman Coulter N.º de catálogo IM2580	5 µl/ensayo
CD19	FITC	J4.119	Beckman Coulter N.º de catálogo AO7768	5 µl/ensayo
CD16	PE	3G8	Beckman Coulter N.º de catálogo AO7766	10 µl/ensayo
CD16	PE	MEM 154	Santa Cruz N.º de catálogo 51525	20 µl/ensayo
CD158b1/b2/j(2DL3/2DL2/2DS2)	PE	GL183	Beckman Coulter N.º de catálogo IM2278U	5 µl/ensayo
CD158a (2DL1)	PE	143211	RD Systems N.º de catálogo FAB1844P	5 µl/ensayo



Medio de acuerdo con MOT-0246

- RPMI 1640 (Gibco n.º 31870)
- Piruvato de sodio (Gibco n.º 11360) 1 mM
- 5 • MEM Aminoácidos No Esenciales (Gibco n.º 11140) al 1 %
- L-Glutamina (Gibco n.º 25030) 2 mM
- Penicilina Estreptomina (Gibco n.º 15070) al 1 %
- Suero Bovino Fetal (PAN n.º 3302 - lote P231002) al 10 %
- 10 *Tampón de tinción de FACS (PBS 1X, BSA al 0,2 %, NaN<sub>3</sub> al 0,02 %, EDTA 2 mM)*
- Solución salina de tampón fosfato (PBS) 10 X (Gibco Invitrogen, ref: 14200-067).
- Agua "MilliQ"
- Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, ref: A-9418).
- 15 • Solución madre de azida de sodio NaN<sub>3</sub> al 20 % (p/v) en PBS (NaN<sub>3</sub> Prolabo, ref. 27967.150)
- EDTA (Invitrogen 0,5 M ref: 155775038).

Genotipado de CD16 por PCR

20 Los dos alotipos FcγRIIIA (V158 o F158) son resultado de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) del gen FCGR3A. El polimorfismo FcγRIIIA-158 V/F se asocia a una eficacia de los tratamientos con anticuerpos monoclonales que implican CCDA. El genotipado de CD 16 por PCR se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Leppers-van de Straat, FG, et al. (*J. Immunol Methods*, 2000. 242 (1-2): p. 127-32).

25 *Genotipado de HLA-C por qPCR*

El genotipado de HLA-C se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Schellekens, J., et al. (*Tissue Antigens*, 2007. 69 (4): p. 334-7). Se preparó una mezcla para cada grupo de alelos C o C2 en un volumen final de 25 µl con los siguientes reactivos: 12,5 µl de SYBR® verde (kit Biorad), 250 pmol de cebadores Reverse C1 o C2, 250 pmol de cebador directo y 0,5 µg de ADN. Las muestras se amplificaron y cuantificaron de acuerdo con el siguiente programa: 10 min a 95 °C después de 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1min a 60 °C. Se usaron los siguientes cebadores:

Cebador directo genérico	5'-TATTGGGACCGGGAGACACA-3'
Cebador inverso del grupo 1 de HLA-C	5'-CGCAGGTTCCGCAGGCC-3'
Cebador inverso del grupo 2 de HLA-C	5'-GCGCAGTTTCCGCAGGT-3'

35 *Estirpes celulares (Células diana)*

Se usaron dos estirpes celulares de MM que expresaban CS-1 y MHC de clase I (OPM-2 y U266B1) para la estimulación de linfocitos NK. Las células U266 B1 se obtuvieron de ATCC (n.º de ref TIB-196). Las células OPM-2 se obtuvieron de DSMZ (n.º de ref ACC50). El tipado de HLA-C se realizó en estas dos estirpes celulares:

	Tipado de HLA-C
OPM2	C1/C2
U266B1	C1/C1

40 Se contaron las células y se hicieron pases cada dos días en medio completo. Se midió la viabilidad y tenía que ser superior al 80 %. Las células se mantuvieron en cultivo hasta 10 pases (P10). El día del experimento, las células se contaron y se ajustaron a 100.000 células/pocillos. La expresión de CS-1 y HLA-ABC se analizó en estirpes celulares diana en cada experimento.

45 *PBMC (células efectoras)*

Se usaron PBMC aisladas de sangre sana de voluntarios sanos (origen: Etablissement Frangais du Sang, (EFS), Marsella) como células efectoras. Se analizaron PBMC congeladas (disponibles en Innate Pharma) mediante PCR para determinar su genotipo de CD16 (es decir, heterocigotos F/V, homocigotos F/F o homocigotos V/V). Durante el curso del presente estudio, se evaluaron 21 donantes adicionales para encontrar suficientes voluntarios sanos con genotipo V/V. En paralelo, la expresión de CD16 en PBMC se evaluó mediante citometría de flujo para confirmar los resultados de la PCR. Se seleccionaron cuatro muestras de PBMC de cada genotipo de CD16 descrito anteriormente. El día del experimento, las PBMC se descongelaron y se incubaron durante una hora a 37 °C para desechar las células apoptóticas. Se midió la viabilidad (con Malassez en azul de tripano) y tenía que ser superior al 80 % (es decir, los experimentos no se realizaron si la viabilidad era inferior al 80 %). Las células se contaron y se ajustaron a 250.000

células/pocillos. La expresión de CS-1 se midió en líneas efectoras, células CD14<sup>+</sup>, células CD19<sup>+</sup> y linfocitos NK (activación CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) (Figura 1). Se midió la expresión de KIR (CD158b1/b2f; CD158a) en los linfocitos NK (Figura 2)

##### 5 *Ensayo funcional in vitro*

Se evaluó la función de los linfocitos NK usando un ensayo de movilización de CD107 junto con tinción intracitoplásmica para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . La relación de células efectoras a células diana fue de 2,5/1. Las concentraciones se determinaron usando intervalos de dosis de elotuzumab y lirilumab. Se usaron concentraciones crecientes de elotuzumab y lirilumab (0  $\mu$ g/ml, 0,025  $\mu$ g/ml, 0,5  $\mu$ g/ml y 10  $\mu$ g/ml) en combinación para detectar el efecto combinado de ambos anticuerpos.

##### *Estrategia de activación en el Ensayo funcional*

15 En cada experimento, se analizaron los datos de FACS como se indica a continuación. En primer lugar, se hizo un canal en los linfocitos (Figura 3, línea superior del cuadrante izquierdo). Después, se identificaron los linfocitos NK como linfocitos CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> (Figura 3, línea superior del cuadrante medio) y los linfocitos NK se dividieron entre los linfocitos NK que se tiñeron positivamente con lirilumab (Anti-KIR<sup>+</sup> en NK, Figura 3, línea superior del cuadrante derecho) y los linfocitos NK que no se tiñeron con lirilumab (Anti-KIR<sup>-</sup> en NK, Figura 3, línea superior del cuadrante derecho). Las células que se tiñeron positivamente para CD107, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en NK total, se identificaron los linfocitos NK positivos para lirilumab y los linfocitos NK negativos para lirilumab (Figura 3).

##### *Estadística*

25 Para detectar valores atípicos en un conjunto de valores, se realizó un ensayo de Grubb usando <http://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>. Se realizó ANOVA de una vía cuando se indicó usando el software Graphpad Prism. Debido al bajo número de muestras (n = 12), se asumió una distribución gaussiana. La igualdad de varianza se sometió a ensayo con un ensayo de Bartlett como condición para el uso del ANOVA. Se aplicó un ensayo de comparación múltiple de Bonferroni después del ANOVA con el fin de comparar cada grupo. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001

## **Resultados**

### *Expresión de HLA de Clase I y CS-1*

35 En cada experimento, se midió la expresión de HLA de clase I (HLA-C es el ligando para KIR2D diana del lirilumab) y CS-1 (diana del elotuzumab) en las estirpes celulares diana de MM, U266B1 y OPM-2. Para ambos marcadores en cada experimento, se calculó una relación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) entre la tinción específica y la tinción de fondo (Figura 3). Este control se realizó para detectar cambios importantes en el fenotipo de las estirpes celulares diana durante el transcurso del estudio. Se detectó una variación de 2-3 veces en estas relaciones de experimento a experimento, lo que refleja la variación biológica esperada debido al cultivo celular. Para detectar variaciones inesperadas, se realizó un ensayo de Grubb para detectar valores atípicos. En las estirpes celulares diana, solo un valor fue inesperadamente alto: la relación de CS-1 en U266B1 en el experimento 15 en el donante "DSV217" (valor esbozado en 2). En este experimento, CS-1 se expresa a una mayor densidad en U266B1 que en los otros experimentos. En general, OPM-2 expresa más CS-1 y menos HLA de clase I que U266B1 (Figura 4). Paralelamente, se midieron los porcentajes de linfocitos NK presentes en las PBMC de cada donante, así como el porcentaje de linfocitos NK que expresan moléculas KIR2D (dianas de lirilumab) (Figura 4). En cuanto a las células diana, se realizó un ensayo de Grubb para detectar valores atípicos. No se detectaron valores atípicos y las variaciones observadas reflejan variaciones interindividuales en la población humana.

50 La expresión superficial de CD16 también se midió mediante citometría de flujo con el anticuerpo anti-CD16 clon 3G8. Este clon reconoce las isoformas V158 y F158 de CD16. En cuanto a la expresión de CS-1, se calculó una relación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) entre la tinción específica y la tinción de fondo (Figura 4) y no se detectaron valores atípicos usando el ensayo de Grubb.

### *Activación de linfocitos NK por combinación de Elotuzumab y Lirilumab*

60 Se midieron tres lecturas en linfocitos NK al final de una incubación de 4 horas de las PBMC de 12 voluntarios sanos, con o sin estirpes celulares de MM (U266B1 u OPM-2). Estas tres lecturas representan la movilización de CD107 en la superficie celular de los linfocitos NK y la producción intracelular de citocinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . En general, los resultados fueron similares con las tres lecturas (Figuras 5-7).

65 Las cajas abiertas (blancas) en las Figuras 5-7 representan la respuesta de los linfocitos NK en presencia de dosis crecientes de elotuzumab con la estimulación indicada. Hay un aumento en las respuestas (ya sea CD107, IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ ), que es dependiente de la dosis. La respuesta funcional inducida por elotuzumab siempre aumentó con dosis crecientes de lirilumab añadido a linfocitos NK que expresan moléculas KIR2D ("linfocitos NK KIR2D<sup>+</sup>" en las Figuras

5-7). Este aumento en la respuesta de los linfocitos NK inducida por lirilumab se observa incluso a una alta concentración de elotuzumab (hasta 10 µg/ml). El efecto beneficioso del lirilumab se observa a partir de la primera concentración utilizada en el ensayo (0,025 µg/ml) con un efecto de dosis-respuesta moderado, lo que indica que es probable que el lirilumab ya esté saturando parcialmente el KIR a 0,025 µg/ml.

5 Por el contrario, en los linfocitos NK que no expresan moléculas KIR2D (que no son diana del lirilumab), el efecto del elotuzumab no aumenta, lo que demuestra la especificidad del lirilumab ("linfocitos NK KIR2D" en las Figuras 5-7).

10 El mejor efecto combinatorio del elotuzumab y el lirilumab se observó en U266B1 con las lecturas de TNF-α y IFN-γ de CD107 en linfocitos NK que expresaban KIR2D (Figura 7). En células U266B1, el efecto significativo de la adición del lirilumab se observó en la producción de TNF-α en todas las dosis de elotuzumab (Figura 8). Sin embargo, el efecto significativo del lirilumab estaba enmascarado en parte por las concentraciones superiores a 0,5 µg/ml del elotuzumab para la producción de IFN-γ. Además, por encima de 0,025 µg/ml de elotuzumab, el efecto significativo del lirilumab sobre la movilización de CD107 estaba enmascarado (Figura 8). En las células OPM-2, hay una tendencia a no significativa hacia el beneficio de añadir lirilumab a elotuzumab (Figura 9). Las células U266B1 expresan niveles moderados de CS-1 en comparación a las células OPM-2, lo que indica que en pacientes con expresión baja de CS-1, el tratamiento con lirilumab podría aumentar considerablemente el efecto terapéutico del elotuzumab.

20 Cuando las PBMC se incuban sin estirpes celulares de MM, se detecta una activación basal de linfocitos NK con dosis crecientes de elotuzumab (Figuras 5-7). Esto probablemente refleja el reconocimiento de CS-1 endógeno (expresado en niveles bajos en linfocitos NK autólogos, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, monocitos activados y CD presentes en las PBMC) por los linfocitos NK (Hsi, E.D., et al., 2009, *Clin. Cancer Res.*, 14 (9): p. 2775-84). En las configuraciones experimentales utilizadas, el lirilumab también indujo cierta activación de los linfocitos NK que expresan KIR. En un estudio más amplio que incluyó a 40 voluntarios sanos que utilizaron un ensayo *in vitro* similar, se demostró que esta activación basal inducida por lirilumab es una combinación de receptores activadores de KIR2DS de entrecruzamiento y de reconocimiento de células autólogas sometidas a estrés (datos no mostrados). Este nivel de activación *in vitro* se induce mediante el protocolo experimental utilizado en las PBMC y no tiene consecuencias en condiciones fisiológicas, como se demuestra por la seguridad observada en ensayos clínicos que utilizan lirilumab o IPH2101.

30 No se pudo demostrar ningún efecto claro del genotipo de CD16 en este estudio. Los resultados se presentan en las figuras 10-12. Esto se debe probablemente a la heterogeneidad de la expresión superficial de CD16 entre voluntarios sanos y al bajo número de voluntarios incluidos. Además, los ensayos *in vitro* pueden no ser adecuados para demostrar un efecto del genotipo de CD16 observado en ensayos clínicos (Cartron, G., et al., 2002, *Blood*, 99 (3): p. 754-8). De hecho, se demostró que a dosis óptimas de rituximab, la lisis *in vitro* de células diana CD20<sup>+</sup> no se ve afectada por el genotipo de CD16 y el efecto del genotipo es moderado en dosis de saturación de rituximab (Congy-Jolivet, N., et al., 2008, *Cancer Res.*, 68 (4): p. 976-80 y Dall'Ozzo, S., et al., *Cancer Res.*, 2004. 64 (13): p. 4664-9).

### Conclusión

40 La activación de linfocitos NK por estirpes celulares de MM positivas para CS-1 y HLA-C (OPM-2 y U266B1) en presencia de dosis crecientes de elotuzumab y/o lirilumab se evaluó mediante tres lecturas (movilización de CD107 en la superficie de los linfocitos NK y producción intracelular de las citocinas IFN-γ y TNF-α) como se ha analizado anteriormente. Basándose en estos estudios, se determinó que las respuestas de los linfocitos NK a las estirpes celulares de MM en presencia de elotuzumab o lirilumab dependen de la dosis.

45 Adicionalmente, la respuesta funcional inducida por elotuzumab se potenció uniformemente mediante la adición de dosis crecientes de lirilumab en linfocitos NK que expresaban moléculas KIR2D (dianas de lirilumab). Como se esperaba, el efecto del elotuzumab no se modificó en los linfocitos NK que no expresaban moléculas KIR2D. El efecto significativo del lirilumab fue más pronunciado con la estirpe celular U266B1 en comparación con OPM-2 y algunas lecturas, tales como la movilización de CD107 y la producción de IFN-γ fueron enmascarados por una alta dosis de elotuzumab (> 0,5 µg/ml).

50 El mejor efecto combinatorio se observó en respuesta a células tumorales (U266B1) que expresaban una baja densidad de CS-1 y en NK que expresaban KIR2D, lo que sugiere que en pacientes con baja expresión de CS-1, el tratamiento con lirilumab podría aumentar considerablemente el efecto terapéutico del elotuzumab. No se detectó ningún efecto claro del genotipo de CD16 o del genotipo de HLA-C en las respuestas de los linfocitos NK.

### Ejemplo 2: Estudios *in vivo* - Combinación de Elotuzumab y Lirilumab

60 Se realizaron estudios *in vivo* para evaluar si el lirilumab podría aumentar la actividad de CCDA del elotuzumab en un modelo de xenoinjerto de MM en ratones KIRtg-RAG.

**Materiales y métodos***Ratones*

- 5 Se criaron ratones transgénicos CD158b x RAG-1KO (también conocidos como KIR2DL3tg RAG<sup>-/-</sup> o KIRtg-RAG; Cambiaggi et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 8088-8092) en las instalaciones para animales Innate Pharma o en las instalaciones Charles River (L'Arbresle, Francia). Se alimentaron y se alojaron en condiciones esterilizadas y tenían un estado de salud sin patógenos específicos ni oportunistas. Después de un período de aclimatación de dos semanas, los animales se identificaron mediante tatuajes con tinta en el dedo del pie antes de ingresar a la experimentación.
- 10 Para los experimentos, los animales se asignaron al azar de acuerdo a su sexo y edad.

*Compuestos*

Se suspendió polvo de elotuzumab (anticuerpo monoclonal anti-CS1 IgG <sub>1</sub> humanizado), lote 1B68974 (Fecha de caducidad: mayo de 2012) a 25 mg/ml en agua desionizada estéril y la mezcla se congeló en alícuotas de 200 µl a -15-25 °C. El día de la inyección, la solución madre se descongeló y se volvió a suspender en una solución de NaCl al 0,9 % a la concentración deseada.
---

Solución de NaCl al 0,9 %, Versol.
------------------------------------

Control de isotipo IgG <sub>1</sub> humano. Un anticuerpo monoclonal IgG <sub>1</sub> humano anti-toxina diftérica (clon 1D12-g1f), lote PC-DT- de BMS, a una concentración de 5,3 mg/ml. Almacenado a una temperatura de +2 a + 8 °C. El día de la inyección, se diluyó en PBS IX a la concentración deseada.
--

IgG4 humano anti-KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 humano, lirilumab (IPH2102), lote IPH2102-01b-01 (Fecha de caducidad: 22 de abril de 2012) a la concentración inicial de 10 mg/ml. Almacenado a 4 °C.
--

Diluyente IPH2102 (IPH2102-DIL001): dihidrato de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,17 mg/ml, dihidrato de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,22 mg/ml, Sacarosa 75,31 mg/ml, Tween 80 0,01 mg/ml. Almacenado a una temperatura de +2 a + 8 °C.
---

Solución salina IX tamponada con fosfato, Gibco. Referencia: 14190.
---

Anti-NK1.1 (clon PK136, IgG 2 <sub>a</sub> de ratón) Lote 3 C = 4,52 mg/ml (producción de Innate Pharma). Almacenado a 4 °C.
--

15

*Administración*

- Se inyectaron Elotuzumab y su control de isotipos por vía intraperitoneal (IP) usando una jeringuilla de 1 ml conectada a una aguja 30 G1/2. Lirilumab y su diluyente se inyectaron por vía intravenosa en la vena caudal (IV) (aguja 30 G1/2 conectada a una jeringuilla de 1 ml). Los volúmenes inyectados de las soluciones enumeradas anteriormente se ajustaron al peso corporal de cada animal. Las soluciones se prepararon para inyectar 10 ml/kg, es decir, un ratón de 20 g recibió 200 µl de solución. La administración de anti-NK1.1 (100 µg/100 µl/ratón, independientemente de su peso corporal) se realizó por vía intravenosa en la vena caudal con una jeringuilla de 1 ml conectada a una aguja 30 G1/2.

25 *Células*

OPM-2 (de DSMZ, n.º de ref ACC50) y U266-B1 (de ATCC, n.º de ref TIB-196) son estirpes celulares de MM humano positivas para CS1 y Clase I. Estas células se caracterizaron en el Ejemplo 1 y sus tipados de HLA-C son C1/C2 y C1/C1 respectivamente, para OPM2 y U266-B1.

30

*Condiciones de cultivo celular*

- Las células se cultivaron en medio RPMI (Gibco) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS) en descomposición, IX de aminoácidos no esenciales (Gibco, referencia 11140-035), L-glutamina 2 mM (Gibco, referencia 25030-024), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 1136-039). Cuando las células se descongelaron, se resuspendieron en medio completo a 3x10<sup>5</sup> células/ml. Las células se cultivaron al máximo durante tres semanas después de la descongelación y se sembraron tres veces por semanas a 3x10<sup>5</sup> células/ml los lunes y los miércoles, y a 2x10<sup>5</sup> células/ml los viernes.

40 *Injerto celular*

Se realizó la preparación de la suspensión celular en matrigel. Brevemente, la suspensión celular se inyectó SC en la piel de los ratones. Matriz de membrana de base BD Matrigel™, 5 ml sin \*LDEV n.º 356234 (BD Biosciences). Matriz de membrana de base BD Matrigel™, 10 ml \* sin \*LDEV n.º 354234 (BD Biosciences).

45

El día del injerto celular, el nivel de expresión de HLA de clase I y CS-1 en la superficie de OPM-2 (2x10<sup>5</sup> células/punto) se determinó por citometría de flujo con HLA-ABC antihumano y anti-CS-1, respectivamente.

*Análisis de citometría tumoral*

La expresión de los marcadores de superficie en la superficie de las células tumorales y los linfocitos NK infiltrantes de tumores se caracterizaron (en varios puntos temporales después del injerto de células) de acuerdo con el siguiente procedimiento. Brevemente, se extrajeron tumores y se disociaron mecánicamente en medio RPMI. Las suspensiones de células se centrifugaron (2 min a 400 g a temperatura ambiente) y los sedimentos se resuspendieron en tampón de tinción (PBS1X + EDTA 1 mM + albúmina sérica bovina al 0,2 % + azida de sodio al 0,02 %). Estas suspensiones celulares se tiñeron mediante citometría de flujo para determinar si (1) los linfocitos NK KIR+ infiltraron tumores y (2) para verificar que las células tumorales aún expresaban CS-1 y HLA ABC (moléculas implicadas en la eficiencia del elotuzumab y el reconocimiento de NK, respectivamente).

En los días 14, 21, 33 y 42, las células tumorales se separaron basándose en los parámetros FSC/SSC y después de la exclusión de los linfocitos murinos con mAb anti-CD45 de ratón. La expresión de HLA-ABC y CS1 en la superficie de las células tumorales se analizó después mediante citometría de flujo usando respectivamente, mAb anti-HLA ABC humano y mAb anti-CS-1 humano.

En los días 14 y 21, se identificaron los linfocitos NK infiltrantes de tumores (NK1.1 + CD45+) mediante la tinción con mAb anti-NK-1.1 de ratón y mAb anti-CD45 de ratón.

En los días 33 y 42, también se analizó la expresión de receptores KIR2DL3 en linfocitos NK infiltrantes de tumores (NK1.1 + CD45+) usando mAb PE de IPH21-02.

La obtención por citometría de flujo se realizó en FACS CANTO II y se analizó con FACS DIVA.

Tabla 1: Lista de reactivos unidos a fluorocromos para el análisis por citometría de flujo

Especificidad	Conjugado	isotipo	Proveedor	Volumen (FACS)
Anti-hHLA-ABC	APC	mIgG1	Becton Dickinson, ref: 555555	20 µl/punto
Anti-CS-1	PE	mIgG2a	Ebioscience, ref: 12-2229 -73	20 µl/punto
Anti-CD45 de ratón	APC-eFluor 780	RlgG2b	Ebioscience, Ref: 47-0451-82	1 µg/ml
Anti-NK-1.1 de ratón	APC	mIgG2a	BD Pharmingen 550627	0,5 µg/ml
IPH2102	PE	hIgG4	Innate-Pharma Peak2	1 µg/ml
7-AAD	PerCpCyn5,5		Pharmingen, ref. 559925	1/100 final

*Parámetros*

Se registraron los pesos corporales cada semana y se midieron los volúmenes tumorales. Brevemente, la longitud (A) y el ancho (B) se midieron usando un calibrador digital dos veces por semana. El volumen tumoral se calculó como se indica a continuación:  $(Ax(B)^2)/2$ . Cuando los volúmenes del tumor alcanzaron los 2000 mm<sup>3</sup>, los ratones se sacrificaron y se consideraron muertos el día del sacrificio con el fin de preparar una curva de supervivencia.

La actividad antitumoral de los diferentes tratamientos se evaluó usando un cálculo de parámetros antitumorales. Brevemente, el ajuste de crecimiento exponencial se extrapoló a partir de curvas de crecimiento tumoral individuales usando el software GraphPad Prism V5 y permitió el cálculo de la inhibición del crecimiento tumoral (ICT), el retraso del crecimiento tumoral (RCT) y el tiempo de duplicación (TD).

El retraso del crecimiento tumoral (RCT) es el retraso de un grupo tratado para alcanzar un volumen seleccionado en comparación con el control:  $RCT = T - C$ . T = tiempo medio (días) necesario para que los tumores del grupo de tratamiento alcancen un tamaño predeterminado. C = tiempo medio (días) necesario para que los tumores del grupo de control alcancen el mismo tamaño.

La inhibición del crecimiento tumoral (ICT) es el porcentaje de inhibición del crecimiento en comparación con el control:  $ICT = (1-T/C) \times 100$ . T = mediana del tamaño (volumen tumoral) para los tumores del grupo de tratamiento alcanzado en un día predeterminado. C = mediana del tamaño (volumen tumoral) para los tumores del grupo de tratamiento que alcanzaron los tumores el mismo día.

El tiempo de duplicación (Td, TD) es el tiempo necesario para duplicar el volumen tumoral.

Cuando un tratamiento tenía una fuerte actividad antitumoral, el ajuste de crecimiento exponencial no podía extrapolarse, evitando el cálculo de los parámetros antitumorales. Los criterios de corte son para R<sup>2</sup> de ajuste <0,7 para al menos 2 ratones de 10 animales/grupo, los parámetros antitumorales no se calcularon. En este caso, la actividad antitumoral se evaluó principalmente usando el perfil de curvas de crecimiento tumoral.

Para cada grupo, se evaluó el número de regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT). Un ratón libre de tumor es un ratón en el que un tumor no ha crecido.

RP se define por dos reducciones consecutivas del volumen tumoral de un volumen seleccionado. Para ser significativo y diferente de las variaciones de medidas intraindividuales, cada reducción debe ser de más del 17 % de la medida anterior.

5 La RC se define por un volumen tumoral que llega a 0 y se mantiene a 0 hasta el final del estudio. La RCT se define por un volumen tumoral que llega a 0 al menos una vez y comienza a crecer nuevamente.

10 Las curvas de supervivencia de Kaplan Meier se evaluaron basándose en el primer día en que se registraron los volúmenes tumorales superiores a 2000 mm<sup>3</sup>. Las medianas de supervivencia se calcularon con el software GraphPad Prism. El % de AEV (aumento de esperanza de vida) se calculó de acuerdo con la fórmula: % de AEV = 100 x (T-C)/C, en la que T es la mediana de la supervivencia del grupo tratado y C es la mediana de la supervivencia del grupo de control.

15 Las curvas de supervivencia se compararon usando el ensayo de rango logarítmico (Mantel-Cox) con el software GraphPad Prism. Los datos se consideraron significativamente diferentes y se indicaron con \* cuando p <0,05 o \*\* cuando p <0,01. Una comparación de diferentes grupos en un día determinado se realizó como se indica a continuación:

- Análisis de la distribución gaussiana mediante un ensayo de normalidad.
- 20 • Si se pasaba el ensayo de normalidad, se realizaba un análisis de varianza ANOVA de una vía seguido de un ensayo posterior.
- Si no se pasaba el ensayo de normalidad, se aplicaba un ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de una comparación múltiple de Dunn.

25 **Resultados**

*Detección de estirpes celulares de MM para el modelo tumoral*

30 Este primer experimento se diseñó para determinar el mejor modelo tumoral *in vivo* para evaluar el efecto combinado del anticuerpo monoclonal anti-CS1, elotuzumab y el anticuerpo monoclonal anti-KIR, lirilumab. Para esto, se seleccionaron dos estirpes celulares de MM, OPM-2 y U266B1, ambas expresan HLA-cw3 y CS1. En este estudio, se demostró que OPM-2 expresaba un nivel más alto de CS-1 que U266-B1 y menos Clase I que U266B1. En resumen, OPM-2 y U266B1 se injertaron por vía subcutánea con matrigel o por vía intravenosa con una alta concentración de células de acuerdo con el diseño experimental que se muestra en la Tabla 2.

35

Tabla 2: Diseño experimental

Exp. N.	Grupos	Tratamiento	n =	Aleatorización	
				Volumen medio	Día
1	20.10 <sup>6</sup> células OPM-2/ratón IV	NA	6	NA	NA
	20.10 <sup>6</sup> células OPM-2/ratón SC matrigel	NA	6		
	20.10 <sup>6</sup> células U266B1/ratón SC matrigel	NA	5		
n = número de ratones; NA = No aplicable					

40 20 x 10<sup>6</sup> de las células U266B1 no indujeron tumores subcutáneos, mientras que la misma concentración de células OPM-2 sí lo hicieron. El hecho de que las células U266-B1 expresaran niveles más altos de células de Clase I que las células OPM-2 podría explicar por qué se rechazaron más en ratones KIRtg-RAG que en células OPM-2. Cuando las células OPM-2 se injertaron en la misma concentración, no indujeron mortalidad, incluso hasta 45 días. En vista de estos resultados, la OPM-2 incorporada por vía subcutánea en ratones KIRtg-RAG se seleccionó para los siguientes estudios.

45 *Determinación del número óptimo de células OPM-2*

Este experimento se diseñó para determinar el número óptimo de células para injertar por vía subcutánea, para obtener un crecimiento tumoral más homogéneo. Se injertaron números crecientes de células OPM-2 en matrigel en ratones KIRtg-RAG como se muestra en la Tabla 3.

50

Tabla 3: Diseño experimental

Exp. N.	Grupos	Tratamiento	n =	Aleatorización	
				Volumen medio	Día
2	5.10 <sup>6</sup> células OFM-2/ratón SC matrigel	NA	8	NA	NA
	10.10 <sup>6</sup> células OFM-2/ratón SC matrigel	NA	8		
	15.10 <sup>6</sup> células OFM-2/ratón SC matrigel	NA	8		
n = número de ratones; NA = No aplicable					

El crecimiento tumoral no se relacionó con el número de células injertadas. De hecho, si bien la curva media de crecimiento para cada cantidad de células tumorales fue similar, la única diferencia fue en la variabilidad del crecimiento. Específicamente, cuanto mayor sea el número de células, mayor será la variabilidad del crecimiento tumoral (Figura 13). La homogeneidad del crecimiento fue mejor cuando se usaron  $5 \times 10^6$  células OPM-2. En consecuencia, este número de células OPM-2 se seleccionó para todos los experimentos siguientes.

*Evaluación de la implicación de NK en el control de crecimiento de OPM-2*

Con el fin de caracterizar el modelo de tumor de OPM-2, fue importante determinar cómo los linfocitos NK modulan el crecimiento de OPM-2. Las células OPM-2 se injertaron 24 horas después de la inyección de mAb anti-NK1.1, un mAb conocido por agotar los linfocitos NK en la sangre y el bazo. Los animales de control recibieron solución salina tamponada con fosfato (PBS) en lugar de mAb anti-NK1.1 y se injertaron como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Diseño experimental

Exp. N.	Grupos	Tratamiento	n =	Aleatorización	
				Volumen medio	Día
8	PBS anti-NK1.1 100 $\mu$ g IV + PBS	D-1, D13, D27	10	No aleatorio	
		D-1, D13, D27	10		
n = número de ratones					

Una comparación de los dos grupos en diferentes puntos temporales no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 14). Sin embargo, incluso si no es estadísticamente diferente, el grupo con NK agotado tuvo un tiempo de duplicación del tumor inferior al del control (respectivamente,  $3,6 \pm 0,9$  frente a  $4,1 \pm 0,7$  días), lo que indica que el tumor creció más rápidamente en el grupo con linfocitos NK agotados. De la misma manera, en los diferentes volúmenes registrados, los animales agotados en linfocitos NK presentaron un retraso del crecimiento tumoral (RCT) negativo en comparación con el control, lo que indica nuevamente que los tumores en los animales agotados en linfocitos NK crecieron un poco más rápido (Figura 15). Este estudio demostró una tendencia (no significativa) del control del crecimiento de OPM-2 por los linfocitos NK.

*Respuesta de saturación del lirilumab (IPH2102)*

Con el fin de evaluar los efectos del lirilumab y elotuzumab en combinación, fue necesario (1) determinar si el lirilumab tiene actividad antitumoral solo y (2) determinar la dosis óptima de lirilumab para combinar con elotuzumab. Un estudio de farmacodinamia anterior evaluó la larga duración de la saturación de KIR relacionada con la dosis de lirilumab en ratones KIRtg-RAG sin tumores. Una dosis de 15 mg/kg IV saturó el KIR (> 95 % de ocupación de KIR) durante 18 días (432 horas) (datos no mostrados). El primer experimento para someter a ensayo el lirilumab consistió en inyectarlo a una dosis de 15 mg/kg cada dos semanas tres veces con el fin de saturar completamente el KIR durante más de 50 días (condición indicada como "saturación completa" o "sat. completa"). Anteriormente se demostró que el anti-KIR tenía una mayor eficacia antitumoral cuando la concentración del lirilumab está por encima de la concentración que los receptores KIR saturados (véase Sola C, et al., *PNAS*. 2009; 106: 12879-12884). Como consecuencia, en el segundo experimento, se inyectó lirilumab cada semana durante 5 semanas, aún en la dosis de 15 mg/kg IV, para alcanzar una concentración superior a la concentración que satura los receptores KIR (condición indicada "sobresaturación" o "sobresat.").

Tabla 5: Diseño experimental

Exp. N.	Grupos	Tratamiento	n =	Aleatorización	
				Volumen medio	Día
3	PBS	D13, 20, 27, 34, 41	10	61,7 $\pm$ 24,3	13
	IPH2102 (sat. completa) 15 mg/kg IV cada dos semanas	D13, 27, 41	10	60,5 $\pm$ 23,7	
	IPH2102 (sobresat.) 15 mg/kg IV una vez por semana	D13, 20, 27, 34, 41	10	60,3 $\pm$ 23,7	
n = número de ratones					

El lirilumab tuvo una actividad antitumoral significativa cuando se inyectó en cualesquiera condiciones de saturación de KIR completa o en condiciones de "sobresaturación". Más de dos ratones en cada grupo tratado presentaron una regresión completa del tumor, evitando el cálculo de los parámetros antitumorales (es decir, RCT, TD). El análisis del perfil de la curva no demostró una diferencia significativa entre los dos grupos de tratamiento. En ambos grupos, 3 animales tuvieron una regresión tumoral completa. En el grupo de saturación completa también hubo una regresión completa temporal y en el grupo de "sobresaturación" también hubo una regresión parcial (Figuras 16A-C).

De la misma manera, el análisis de la curva de supervivencia no mostró una gran diferencia entre los tratamientos. Sin embargo, en el grupo de saturación total, el lirilumab indujo un mayor aumento de la esperanza de vida del 29 % en comparación con el 18 % para el grupo de sobresaturación (Figura 17). Esta diferencia debe tomarse con precaución, ya que un análisis de las curvas de perfil destaca una diferencia entre las dos curvas solo al 50 % de la

supervivencia (el punto utilizado como referencia para el cálculo de la mediana de la supervivencia).

En el día 63, cuando casi todos los tumores alcanzaron el volumen de corte de 2000 mm<sup>3</sup> (excepto uno en el grupo de saturación total), se controlaron los animales cuyo tumor había retrocedido completamente (3 en cada grupo tratado). En el grupo tratado con lirilumab en condiciones de saturación completa del KIR, todos los tumores que habían retrocedido completamente reaparecieron después de un retraso de 43 a 73 días. Por otro lado, en el grupo tratado en condiciones de sobresaturación, solo un tumor de cada tres reapareció, lo que indica que la "sobresaturación" del receptor KIR podría tener un mayor beneficio para controlar las células tumorales (Figuras 18A-C).

En vista de estos datos, se seleccionaron las condiciones experimentales con las que el lirilumab indujo la saturación total del KIR (15 mg/kg cada dos semanas) para combinarlo con elotuzumab. Sin embargo, antes de continuar, era importante evaluar si la expresión de CS1 y HLA-cw3 se mantenía en la superficie de las células tumorales una vez injertadas en ratones. Además, se realizó un análisis del tumor por citometría de flujo para asegurar que los linfocitos NK se infiltraran en el tumor y pudieran mediar en la CCDA cuando fueran la diana de con elotuzumab y lirilumab.

Los tumores con diferentes volúmenes de 8 animales, no incluidos en la aleatorización, se retiraron en 4 puntos temporales diferentes y se analizaron por citometría de flujo.

La Figura 19 ilustra la activación realizada para analizar el nivel de expresión de CS1 y HLA-ABC en la superficie de OPM-2 y para evidenciar NK infiltrados en el tumor. En 4 de 8 tumores, también se evaluó la expresión de KIR2DL3 en NK infiltrados.

Tabla 6: Sumario de datos de la expresión de CS1 y HLA-ABC, NK infiltrados

Día	Ratón	Volumen tumoral	IMF de CS1	IMF de HLA-ABC	% de NK entre linfo	IMF de IPH2102-PE en NK
D14	26	114,3	12240	53688	65,3	
	28	136,6	10471	87808	61,3	
D21	36	500,6	14711	95025	41,2	
	40	27,2	8884	202474	14,9	
D33	30	2261	13761	18131	48,3	9246
	45	1106	17305	23834	46,8	14019
D42	33	972	17890	19957	42,2	12408
	35	3325	21900	7157	40,5	11080

Los niveles de expresión tanto de CS1 como de HLA-ABC se mantuvieron en la superficie celular de OPM-2 cuando se injertaron en ratones (Tabla 6). Para CS1, hubo una tendencia al aumento de la expresión relacionada con el crecimiento del volumen tumoral y el tiempo posterior al injerto. Para la expresión de MHC de Clase I (al contrario que con CS1), se observó una tendencia a la disminución de la expresión (a excepción del ratón N.º 40 que tenía un tumor muy pequeño) (Figura 20).

Entre el 40 y el 60 % de los linfocitos descubiertos en los tumores eran linfocitos NK (excepto de nuevo para el ratón N.º 40) que expresaban KIR2DL3 (Tabla 6). Este porcentaje no se relacionó con el tamaño del tumor (Figura 21).

En conclusión, se expresaron *in vivo* CS1 (diana del elotuzumab) y MHC Clase I (ligando de la molécula KIR diana de lirilumab). Además, los linfocitos NK que expresaban KIR2DL3 pudieron infiltrarse en el tumor.

*Respuesta a la dosis para elotuzumab*

La actividad antitumoral del elotuzumab contra los tumores OPM-2 se ha caracterizado en ratones SCID en dosis de 0,1, 0,5, 1 y 10 mg/kg (Tai Y, et al., *Blood*. 2008; 112: 1329-1337). Para determinar la dosis óptima de elotuzumab que se ha de combinar con lirilumab, se seleccionaron dos dosis intermedias, es decir, 0,5 y 2 mg/kg (Tabla 7).

Tabla 7: Diseño experimental

Exp. N.º	Grupos	Tratamiento	n	Aleatorización	
				Volumen medio	Día
5	IC (hlgG1) 2 mg/kg IP	dos veces/s para 7 inyecciones	10	47,9 ± 12,9	10
	elotuzumab 0,5 mg/kg IP	dos veces/s para 7 inyecciones	10	47,6 ± 12,6	
	elotuzumab 2 mg/kg IP	dos veces/s para 7 inyecciones	10	48,1 ± 16,8	
n = número de ratones					

El elotuzumab demostró una gran actividad antitumoral dependiente de la dosis. Más de dos ratones en cada grupo



tratado presentaron una regresión completa del tumor, evitando el cálculo de los parámetros antitumorales (es decir, RCT, TD). El análisis de los perfiles de curvas mostró un número mayor de regresiones completas y temporales a la dosis de 2 mg/kg que a la dosis de 0,5 mg/kg (Figuras 22A-C).

- 5 La comparación de los dos grupos tratados con elotuzumab con el control demostró que la dosis de 2 mg/kg tenía una actividad antitumoral significativamente más fuerte en comparación con la dosis de 0,5 mg/kg (Figura 23). De forma similar, las curvas de supervivencia resaltaron una mayor actividad para la dosis de 2 mg/kg. La mediana de la supervivencia no se pudo determinar para ninguna de las dosis porque más del 50 % de los animales todavía estaban vivos al final del experimento, lo que demuestra aún más la actividad antitumoral (Figura 24). En vista de estos resultados, se seleccionó la dosis subóptima de elotuzumab, es decir, 0,5 mg/kg, para combinar con lirilumab en los siguientes experimentos.

*Efecto combinado de Elotuzumab y Lirilumab (IPH2102)*

- 15 La actividad combinada de elotuzumab y lirilumab se evaluó de acuerdo con el diseño experimental que se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Diseño experimental

Exp. N.º	Grupos	Tratamiento	n =	Aleatorización Volumen promedio	Día
6	hlgG1 0,5 mg/kg IP + Diluyente IPH2102 IV	dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D24	10	49,4 ± 15,4	11
	elotuzumab 0,5 mg/kg IP + Diluyente IPH2102 IV	dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D24	10	49,3 ± 14,8	
	hlgG1 0,5 mg/kg IP + IPH2102 15 mg/kg IV	dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D24	10	48,7 ± 13,4	
	elotuzumab 0,5 mg/kg IP + IPH2102 15 mg/kg IV	dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D24	10	49,4 ± 13,6	
n = número de ratones					

- 20 Para el grupo del elotuzumab, el análisis de los perfiles de curvas mostró una regresión parcial, una regresión completa y una regresión completa temporal. El lirilumab combinado con elotuzumab potencia su efecto. De hecho, la regresión parcial y la regresión temporal se transformaron en regresión completa. Como consecuencia, el número de regresión completa aumentó de 2 a 6 (Figura 25).

- 25 La comparación de los diferentes grupos el día 27 demostró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de tratamiento combinado y el control. El hecho de que el grupo de elotuzumab no fuera estadísticamente diferente del control (como en la Figura 23) probablemente se deba a la heterogeneidad del grupo control (Figura 26). Las curvas de supervivencia apoyaron las mismas conclusiones. La mediana de la supervivencia del grupo del lirilumab fue similar a la del control (38 días), la mediana de la supervivencia del grupo del elotuzumab fue de 45 días, aumentando la esperanza de vida en un 18 % y solo un ratón del grupo combinado alcanzó el volumen tumoral de 2000 mm<sup>3</sup> durante el experimento (Figura 27).

*Confirmación del efecto combinado de Elotuzumab y Lirilumab (IPH2102)*

- 35 Los siguientes estudios se realizaron (1) para confirmar la actividad antitumoral combinada de lirilumab y elotuzumab y (2) para evaluar la participación de los linfocitos NK en la actividad antitumoral de ambos lirilumab y elotuzumab o su combinación. Para esto, se añadieron los grupos de animales con NK agotados en el momento de la aleatorización, como se muestra en la Tabla 9.

40 Tabla 9: Diseño experimental

Exp. N	Grupos	Tratamiento	n =	Aleatorización Volumen medio	Día
7	hlgG1 0,5 mg/kg IP + Diluyente IPH2102 IV	dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D25	10	66,0 ± 26,7	10
	elotuzumab 0,5 mg/kg IP + Diluyente IPH2102 IV	dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D25	10	66,4 ± 26,9	
	hlgG1 0,5 mg/kg IP + IPH2102 15 mg/kg IV	dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D25	10	66,7 ± 28, 0	
	elotuzumab 0,5 mg/kg IP + IPH2102 15 mg/kg IV	dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D25	10	66,6 ± 28,7	

anti-NK1.1 100 µg IV + elotuzumab 0,5 mg/kg IP + Diluyente IPH2102	D10, D24 + dos veces/s para 7 inyecciones ° + D11, D25	10	66,7 ± 30,5
anti-NK1.1 100 µg IV + elotuzumab 0,5 mg/kg IP + Diluyente IPH2102	D10, D24 + para 7 inyecciones ° + D11, D25	10	66,3 ± 30,7
anti-NK1.1 100µg IV + elotuzumab 0,5 mg/kg IP + Diluyente IPH2102	D10, D24 + para 7 inyecciones ° + D11, D25	10	68,3 ± 36,5

n = número de ratones

5 Para los animales tratados con elotuzumab, el análisis de los perfiles de curvas mostró 2 regresiones parciales, 1 regresión completa y 2 regresiones completas temporales (una actividad antitumoral similar a la observada en las figuras 28A-D). La regresión completa se anuló cuando los linfocitos NK se agotaron en estos animales. Además, el retraso del crecimiento tumoral (Figura 29) y el tiempo de duplicación (Figura 30) se redujeron cuando los linfocitos NK se agotaron, lo que indica que la actividad del elotuzumab estaba mediada en parte por los linfocitos NK.

10 En este experimento, el lirilumab confirmó su ligera actividad antitumoral con 1 regresión completa y una regresión completa temporal (Figuras 28A-D). Incluso cuando no se sostuvo la eficacia del lirilumab, se observó una reducción e incluso la anulación de su actividad cuando se agotaron los linfocitos NK. Esto se dedujo por la anulación de la regresión completa o completa temporal, por la reducción del tiempo de duplicación para alcanzar el del control (Figura 30) y por la anulación del retraso del crecimiento tumoral (Figura 29). Esta conclusión también se confirmó cuando el grupo del lirilumab se comparó con el grupo de lirilumab agotado de linfocitos NK el día 27 (Figura 31). Estos datos indican que la actividad antitumoral del lirilumab estaba mediada por linfocitos NK. Para los grupos del elotuzumab y 15 lirilumab, se calcularon RCT y TD respectivamente, de 8 de 10 y 9 de 10 ratones porque los ratones excluidos alcanzaron los criterios de corte para el ajuste de crecimiento exponencial.

20 El efecto sinérgico observado con la combinación de elotuzumab y lirilumab se confirmó por segunda vez con 6 regresiones completas (Figuras 28A-D) y una fuerte diferencia estadística en comparación con el control el día 27 (Figura 31). Como se esperaba, el agotamiento de los linfocitos NK redujo fuertemente este efecto combinado, ya que las regresiones completas disminuyeron de 6 a 2 (Figuras 28A-D) y no hubo diferencias estadísticamente significativas con el grupo de control (Figura 31).

25 Todos los parámetros analizados convergieron a la misma conclusión. De hecho, el análisis de supervivencia demostró claramente la fuerte eficacia combinada de ambos compuestos. Además, el análisis de la mediana de la supervivencia confirmó la participación parcial de los linfocitos NK en el efecto del elotuzumab y la participación total en la actividad del lirilumab (Figura 32). En conclusión, la combinación de elotuzumab y lirilumab indujo una actividad antitumoral sinérgica, fuertemente mediada por los linfocitos NK.

30 *Confirmación del efecto de Elotuzumab y Lirilumab en un volumen tumoral alto*

En vista de la fuerte actividad antitumoral de la combinación de elotuzumab y lirilumab, la actividad antitumoral en tumores de volumen alto (aproximadamente 140 mm<sup>3</sup>) también se evaluó basándose el diseño experimental que se muestra en la Tabla 10.

35

Tabla 10 : Diseño experimental

Exp. N	Grupos		Tratamiento				n =	Aleatorización	
								Volumen medio	Día
9	hlgG1 0,5 mg/kg IP	+	Diluyente IPH2102 IV	dos veces/s para 7 inyecciones °	+	D18, D32	10	133,68 ± 78,03	17
	elotuzumab 0,5 mg/kg IP	+	Diluyente IPH2102 IV	dos veces/s para 7 inyecciones °	+	D18, D32	10	139,32 ± 79,28	
	hlgG1 0,5 mg/kg IP	+	IPH2102 15 mg/kg IV	dos veces/s para 7 inyecciones °	+	D18, D32	10	140,23 ± 79,33	
	elotuzumab 0,5 mg/kg IP	+	IPH2102 15 mg/kg IV	dos veces/s para 7 inyecciones °	+	D18, D32	10	142,76 ± 83,73	

n = número de ratones

40 Cuando se administró a un alto volumen tumoral, el elotuzumab no indujo regresión parcial o completa (Figura 33), pero aumentó el tiempo de duplicación del tumor e indujo un retraso en el crecimiento tumoral (Figura 34). El lirilumab no tuvo actividad antitumoral en este contexto, pero potenció la actividad antitumoral del elotuzumab cuando se combinaron, es decir, aumentaron la TD y la RCT (Figura 34).

Para el grupo combinado, se calculó el TD para 8 de cada 10 ratones (porque los dos ratones excluidos alcanzaron los criterios de corte para el ajuste de crecimiento exponencial).

El análisis detallado realizado el día 27 muestra que la actividad sinérgica de la combinación del elotuzumab y el lirilumab se mantuvo en los tumores con alto volumen (Figura 35).

El análisis de supervivencia confirmó las conclusiones. Elotuzumab tuvo una mediana de la supervivencia prolongada de 43 días frente a 35 para el control, lo que aumentó la esperanza de vida en un 23 %. Los ratones tratados con lirilumab tuvieron la misma mediana de supervivencia que el control, pero la mediana de supervivencia aumentó considerablemente cuando se combinó lirilumab con elotuzumab para alcanzar los 60 días, un aumento en la esperanza de vida del 71 % (Figura 36). En consecuencia, incluso cuando se administró a un volumen tumoral alto, la combinación del elotuzumab y lirilumab fue altamente eficaz y mostró un efecto sinérgico para prolongar la supervivencia.

### **Conclusión**

CS1 (diana del elotuzumab) y MHC Clase I (ligando de la molécula KIR diana del lirilumab) se expresaron en la superficie de las células OPM-2 *in vivo*. Además, los linfocitos NK que expresaban KIR2DL3 pudieron infiltrarse en el tumor.

Se demostró que el lirilumab tiene una ligera actividad antitumoral contra los tumores sólidos OPM-2 en ratones KIRtg-RAG. Esta actividad está relacionada con el nivel de saturación de KIR2DL3, con un efecto más pronunciado cuando los receptores están sobresaturados. La actividad del lirilumab está mediada por los linfocitos NK, puesto que el efecto antitumoral del lirilumab se anula cuando los linfocitos NK se agotan.

El elotuzumab demuestra un fuerte efecto antitumoral relacionado con la dosis en los tumores OPM-2. Esta actividad está mediada en parte por los linfocitos NK.

La combinación de lirilumab y elotuzumab demostró una actividad antitumoral sinérgica mediada por linfocitos NK. Este efecto también se observa cuando la terapia combinada se administra en animales con altos volúmenes tumorales.

Este estudio destaca la eficacia terapéutica sinérgica de la terapia de combinación con un anticuerpo que bloquea la inhibición de los linfocitos NK mediada por la interacción de KIR2DL3 y HLA-cw3 y un anticuerpo citotóxico, elotuzumab, que se dirige a CS1, un antígeno tumoral localizado en las células de MM, mediante CCDA.

### **Ejemplo 3 – Estudios *in vivo* adicionales - Combinación de elotuzumab y lirilumab**

Se realizaron estudios adicional *in vivo* adicionales para evaluar la eficacia terapéutica del lirilumab (IPH2102) y el elotuzumab *in vivo*, en una nueva cepa de ratones doblemente transgénicos que expresa KIR2DL3 humano, así como su ligando, HLA-cw3, sobre un fondo Rag1<sup>-/-</sup> (ratones KIR-cw3-tgRAG), para permitir el injerto de células tumorales de MM humano que expresan SLAMF7.

En resumen, se cruzaron ratones Rag<sup>-/-</sup> y KIR2DL3 transgénicos (tg) para obtener ratones KIR2DL3tg, Rag<sup>-/-</sup>. Se cruzaron ratones transgénicos HLA-Cw3 con ratones KbDb<sup>-/-</sup>, dando como resultado ratones Cw3tg, KbDb<sup>-/-</sup>. Los ratones se describen en Romagne et al., (2009) *Blood* 114: 2667-2677, así como en Sola et al. (2009) *P.N.A.S.*, EE.UU. 106 (31): 12879-12884.

La estirpe celular de MM OPM-2 se injertó subcutáneamente en estos ratones y cuando se alcanzaron volúmenes tumorales altos (140 mm), los ratones se trataron con lirilumab una vez por semana (junto con el control del isotipo hlgG1 para elotuzumab), elotuzumab dos veces por semana (junto con control del isotipo hlgG4 para lirilumab) o una combinación de ambos. La figura 37 representa el diseño experimental.

Como se muestra en los resultados que se exponen en las Figuras 38 y 39, cada anticuerpo monoclonal tuvo algún efecto terapéutico como monoterapia, mientras que la combinación de ambos anticuerpos dio como resultado un efecto antitumoral significativamente más fuerte y una mayor supervivencia. Específicamente, la mediana de la supervivencia de los ratones tratados con control de hulgG fue de 38 días, 41 días con lirilumab, 42 días con elotuzumab y 51 días con ambos anticuerpos en combinación.

En resumen, los resultados muestran que el bloqueo de los receptores de punto de control KIR con lirilumab aumentó la CCDA mediada por elotuzumab *in vitro* y fue sinérgico con elotuzumab para mediar la potente actividad anti-MM *in vivo*.

### **Ejemplo 4 - Farmacocinética en pacientes**

Las concentraciones plasmáticas de anticuerpos anti-KIR se determinan mediante ELISA como se describe brevemente a continuación.

Las placas se recubren con solución de recubrimiento de KIR2DL3 (100µl/pocillo) y se incuban durante la noche a

aproximadamente 4 °C. Después, las placas se lavan 3 veces con tampón de lavado usando una lavadora de placas automatizada (400 µl/pocillo). Se añade tampón de bloqueo (200 µl por pocillo) y las placas se incuban durante aproximadamente 2 horas en un agitador de placas a temperatura ambiente. Después de esto, las placas se lavan una vez más 3 veces con tampón de lavado (400 µl/pocillo).

5 Se añaden patrones, controles de calidad y muestras a las placas (100 µl/pocillo) antes de la incubación durante aproximadamente 2 horas en el agitador de placas a temperatura ambiente. Antes de añadir solución de trabajo de anticuerpo anti-IgG4 humana de ratón:peroxidasa (100 µl/pocillo), las placas se lavan otras 3 veces (como anteriormente). Las placas se incuban nuevamente durante aproximadamente 2 horas en un agitador de placas a temperatura ambiente, después de lo cual se lavan una vez más.

15 Se añade TMB a las placas (100 µl/pocillo), que después se incuban durante aproximadamente 30 minutos en un agitador de placas a temperatura ambiente. La reacción enzimática se termina con la adición de una solución de parada (50 µl/pocillo). Las absorbancias se leen a 450 nm (filtro de referencia 650 nm). El límite inferior de cuantificación para este estudio es de 5,000 ng/ml y el límite superior de cuantificación para este estudio es de 110,0 ng/ml.

#### Ejemplo 5 - Ensayo de ocupación de KIR

20 La ocupación del receptor se evalúa en muestras de sangre total humana mediante análisis de fluorescencia de cuatro colores. Brevemente, los niveles de receptores KIR2D libres y unidos se evalúan en los linfocitos T y NK en sangre periférica anticoagulada con EDTA. El ensayo de sitio libre evalúa el KIR2D no unido mediante tinción con anticuerpo anti-KIR conjugado con PE, que se une a la molécula KIR2D. El ensayo de sitio unido evalúa los receptores KIR2D ocupados por el anticuerpo anti-KIR mediante tinción con un anticuerpo monoclonal anti-IgG4 de ratón conjugado con PE que reconoce el anticuerpo anti-KIR unido a los receptores KIR2D. Los ensayos libres y unidos permiten evaluar tanto el porcentaje de tinción positiva como la intensidad de fluorescencia [MFSE] para el anticuerpo anti-KIR conjugado con PE o anti-hlgG4-PE. Las siguientes combinaciones de anticuerpos conjugados se utilizan en los siguientes dos ensayos:

30        Ensayo de sitio libre: CD3/anticuerpo anti-KIR/CD45/CD56  
           Ensayo unido: CD3/hlgG4/CD45/CD56

35 Las muestras se analizan en un Becton Dickinson FACScalibur usando el software Becton Dickinson Cellquest. Los linfocitos T se definen como linfocitos CD45+CD3+ y los linfocitos NK se definen como células CD45+CD3-CD56+.

#### Ejemplo 6: Ensayo de fase I en pacientes con mieloma múltiple

40 Se realiza un ensayo de fase 1 de un anticuerpo anti-KIR (lirilumab) y un anticuerpo anti-CS1 (elotuzumab) en pacientes con MM para demostrar la eficacia de administrar estos dos agentes terapéuticos como tratamiento combinado.

45 El ensayo consiste en dos segmentos. El segmento 1 incluye el aumento de la dosis del lirilumab en combinación con elotuzumab en sujetos con MM. El segmento 2 le sigue al segmento 1 e incluye la expansión de la dosis del lirilumab en combinación con elotuzumab en sujetos con MM en recaída/refractario y en sujetos con trasplante autólogo posterior. En ambos segmentos, los sujetos reciben elotuzumab y lirilumab en dos etapas (Inducción y Mantenimiento). Durante la inducción, a los sujetos se les administran dosis intravenosas (IV) de elotuzumab semanalmente durante 8 dosis y dosis intravenosas de lirilumab cada 4 semanas durante 2 dosis. Durante el mantenimiento, a los sujetos se les administran dosis intravenosas de elotuzumab cada 2 semanas y lirilumab cada 4 semanas, hasta durante dos años de tratamiento en el estudio.

##### 50 1. Objetivos

55 El objetivo principal de este estudio es evaluar la seguridad y la tolerabilidad del elotuzumab administrado en combinación con lirilumab e identificar las toxicidades limitantes de la dosis (TLD) y la dosis máxima tolerada (DMT) de la combinación, en sujetos con MM.

60 Los objetivos secundarios incluyen evaluar la actividad antitumoral preliminar de la combinación, caracterizar la farmacocinética (FC) de la combinación, controlar la inmunogenicidad de la combinación y evaluar los efectos farmacodinámicos de la combinación sobre el número de células y la función de las células plasmáticas de la médula ósea y los linfocitos citolíticos naturales.

65 Los objetivos exploratorios incluyen evaluar los efectos farmacodinámicos de la combinación en la función de los linfocitos T citolíticos naturales periféricos, explorar la relación entre la seguridad y la eficacia con los cambios en las células plasmáticas y la función de los linfocitos T y los linfocitos citolíticos naturales, y evaluar la supervivencia general histórica a los tres años posteriores a la Inicio de la terapia con la combinación.

2. Descripción general del estudio

Este es un estudio aleatorizado de fase I, abierto, que incluye los siguientes sujetos seleccionados con MM: sujetos con enfermedad en recaída y/o refractaria o sujetos que han recibido un trasplante autólogo y que han conseguido una respuesta parcial muy buena (RPMB) o mejor respuesta. Este estudio se realiza en dos segmentos: aumento de la dosis y expansión de la cohorte. El aumento progresivo de la dosis se realiza para caracterizar la seguridad y la tolerabilidad del elotuzumab administrado en combinación con lirilumab en sujetos con MM y va seguido de una expansión de cohorte. Los grupos de expansión de cohortes establecen una experiencia de seguridad ampliada con la combinación y permiten la caracterización de la actividad inmunorreguladora (biomarcador) y la eficacia antitumoral preliminar de elotuzumab con lirilumab. El tratamiento de estudio en ambos segmentos se divide en dos partes distintas: Inducción y Mantenimiento.

En ambos segmentos, los sujetos completan hasta cuatro periodos del estudio: detección (hasta 28 días), tratamiento (inducción y mantenimiento, hasta un máximo de dos años de terapia de estudio), seguimiento clínico (100 días) y seguimiento de la supervivencia (hasta 3 años después de la primera dosis del fármaco del estudio).

*Estudio del tratamiento - Fase de inducción:* los sujetos reciben dosis intravenosas (IV) de elotuzumab semanalmente durante 8 dosis y lirilumab cada 4 semanas durante 2 dosis.

*Tratamiento del estudio - Fase de mantenimiento:* los sujetos reciben dosis intravenosas de elotuzumab cada 2 semanas y lirilumab cada 4 semanas, hasta durante dos años de terapia de estudio.

Los sujetos en el segmento de expansión de cohorte se tratan con la dosis máxima tolerada (DMT), la dosis máxima administrada (DMA) o con una dosis alternativa.

La decisión de tratar a un sujeto con ciclos adicionales de terapia de estudio se basa en la evaluación de la enfermedad. Los sujetos con una respuesta general de RC no confirmada, RP, EE o EP-sin confirmar continúan la terapia hasta que desarrollan EP confirmada, RC confirmada, experimentan deterioro clínico, desarrollan acontecimientos adversos que requieren suspender el tratamiento, retiran el consentimiento o completan tanto la Inducción como el Mantenimiento.

Los sujetos que: (1) completan la Inducción y el Mantenimiento o (2) desarrollan una toxicidad que requiere la interrupción de las terapias del estudio ingresan al periodo de seguimiento clínico hasta que tienen la EP confirmada, inician un nuevo tratamiento o completan todo el seguimiento clínico (la visita 1 del seguimiento (50 días después del último tratamiento) y la visita 2 del seguimiento (100 días después del último tratamiento). Los sujetos que tienen EP confirmada en la terapia de estudio ingresan en el seguimiento clínico para continuar con el seguimiento de los acontecimientos adversos. En cada visita del seguimiento clínico, las evaluaciones incluyen exámenes físicos, evaluación de acontecimientos adversos, ensayos de laboratorio de seguridad y evaluación de la enfermedad. Si un acontecimiento adverso no se resuelve al final del periodo de seguimiento clínico, el sujeto continúa el seguimiento hasta que el acontecimiento adverso se haya resuelto a grado <1 o valor basal o se considera irreversible. Después de completar el periodo de seguimiento clínico, los sujetos ingresan al periodo de seguimiento de supervivencia. Durante este periodo, se realizan visitas clínicas o contacto telefónico cada 3 meses para evaluar el estado de supervivencia. La duración de este periodo es de hasta 3 años después de la primera dosis del fármaco del estudio. Los sujetos en el seguimiento de supervivencia que tienen progresión de la enfermedad son elegibles para recibir terapia anticancerosa según corresponda. En la Figura 40 se presenta un esquema del estudio.

3. Aumento progresivo de la dosis

De tres a nueve sujetos con MM se inscribieron en cohortes sucesivas que evalúan dosis crecientes de lirilumab administradas en combinación con elotuzumab. Se usa un diseño 3 + 3 + 3 para evaluar la seguridad del elotuzumab administrado en combinación con lirilumab. La selección de la dosis se proporciona en la Tabla 11.

Tabla: 11 Programa de aumento progresivo de la dosis planificado

Cohorte de dosis	Lirilumab mg/kg	Elotuzumab mg/kg	Número de Sujetos
1	0,3	10	aproximadamente 3-9
2	1	10	aproximadamente 3-9
3	3	10	aproximadamente 3-9

El periodo de observación de la toxicidad limitante de la dosis (TLD) dura 4 semanas desde el inicio de la terapia de estudio. Se tratan inicialmente tres sujetos a cada nivel de dosis. Si se producen 0 TLD en una cohorte de 3 sujetos, se trata una nueva cohorte de 3 sujetos en el siguiente nivel de dosis más alto. Si 1 de 3 sujetos experimenta una TLD, esa cohorte se amplía a 6 sujetos. Si 1 de 6 sujetos experimenta una TLD, se trata una nueva cohorte de 3 sujetos en el siguiente nivel de dosis más alto. Si 2 de 6 sujetos experimentan una TLD, esa cohorte se amplía a 9 sujetos. Si 2 de 9 sujetos experimentan una TLD, se trata una nueva cohorte de 3 sujetos en el siguiente nivel de dosis más alto. Si 2 de 3, 3 de 6 o 3 de 9 sujetos experimentan TLD dentro de una cohorte, entonces se determina que el

nivel de dosis ha excedido la dosis máxima tolerada (DMT). La exploración de los intervalos de dosis intermedias se añade para ampliar los datos de seguridad a diversos niveles de dosis de lirilumab administrado en combinación con elotuzumab. Se usa un modelado estadístico para ayudar a respaldar la decisión de avanzar con una dosis en o por debajo de la DMT. Después de determinar la DMT, DMA o completar el aumento de la dosis sin identificar la DMT y explorar adicionalmente objetivos farmacodinámicos/biomarcadores, se inscriben 3-9 sujetos adicionales en cada nivel de dosis para un total de hasta 12 sujetos en cualquier nivel de dosis (3-9 sujetos originales de aumento progresivo de la dosis más sujetos adicionales requeridos para tener un tamaño total de cohorte de 12).

No se permite el aumento o la reducción progresivos de la dosis intra-sujeto. Los sujetos que se retiran del estudio durante el período de TLD por razones distintas a la toxicidad se reemplazan dentro de la misma cohorte de dosis. Los sujetos en el aumento progresivo de la dosis de la dosis también se controlan continuamente más allá del período de TLD, para evaluar la seguridad más allá del período de TLD.

Se revisan todos los datos clínicos y de laboratorio disponibles y la naturaleza, el tiempo de inicio y el tiempo hasta la resolución de las TLD observadas durante el aumento de la dosis para determinar si debe examinarse un programa de dosis alternativo. Si se excede la DMT en la primera cohorte, se investiga la evaluación de dosis y programas alternativos de lirilumab.

#### 4. Expansión de la cohorte

La expansión de la cohorte se inicia en la DMT, la dosis máxima administrada (DMA) o una dosis alternativa, si se recomienda. Los sujetos se aleatorizan para recibir elotuzumab con lirilumab. La inscripción se limita a una de las dos poblaciones de pacientes especificadas con MM; Grupo de tratamiento A) sujetos con enfermedad recidivante y/o refractaria y sujetos del grupo de tratamiento B) que se sometieron a un trasplante autólogo y obtuvieron una RPMB o una respuesta mejor. Aproximadamente 16 sujetos se inscriben en cada uno de los grupos de tratamiento.

El aumento progresivo de la dosis tiene hasta 9 sujetos en cada cohorte de dosis. Todos los sujetos excedentes de cohortes de dosis que no usan 9 sujetos se añaden a cohortes de expansión de dosis. Por ejemplo, si no se observa ninguna TLD y cada cohorte se eleva a la siguiente cohorte usando solo 3 sujetos, se añade un excedente de 30 sujetos no utilizados a la expansión de la dosis.

*Grupos de tratamiento A y B:* se someten aproximadamente 16 sujetos a un tratamiento de estudio en los segmentos de Inducción y Mantenimiento, como se describe en la Figura 40. Los sujetos adicionales, que no se utilizan en la fase de aumento de la dosis, pueden añadirse uniformemente en los grupos de tratamiento A y B.

El control de seguridad clínica de los sujetos inscritos durante el segmento de expansión de cohorte del estudio es idéntico al realizado durante el segmento de aumento de dosis del estudio. A medida que avanza la inscripción durante la expansión de la cohorte, si la incidencia combinada de las TLD relacionadas con el fármaco del estudio que requieren modificación de la dosis supera el 33 % de los sujetos tratados, se interrumpe la inscripción adicional en esa cohorte y se analizan los resultados. Se llega a un acuerdo acerca de si se examina una dosis más baja o una dosis alternativa o un esquema de dosis de la combinación o si deben implementarse pautas de tratamiento adicionales antes de la inscripción de sujetos adicionales.

#### 5. Toxicidad limitante de la dosis

Con el fin de guiar la toma de decisiones del aumento progresivo de la dosis, las TLD se determinan en función de la incidencia y la gravedad de los acontecimientos adversos relacionados con el fármaco del estudio que se producen dentro de las 4 semanas (28 días) posteriores al inicio de la terapia de estudio. Los acontecimientos adversos se califican de acuerdo con los Criterios de Terminología Común para Acontecimientos Adversos del Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU. (NCI, por sus siglas en inglés) versión 4.0 (CTCAEv4). Para los fines de la gestión de sujetos, las TLD generalmente conducen a interrupciones de la dosis independientemente del ciclo en el que se produzca una TLD.

#### 6. Duración del estudio

El período de detección dura hasta 28 días. El período de tratamiento (inducción y mantenimiento) dura hasta 2 años. El período de seguimiento clínico dura 100 días. El período de seguimiento de supervivencia dura hasta 3 años después de la primera dosis de la terapia de estudio (semana 1). El tiempo total en estudio para cualquier sujeto individual no supera los 3 años. Se espera que la duración total del estudio sea de 4,5 años desde el momento de la primera visita del primer sujeto hasta el seguimiento de supervivencia requerido del último sujeto inscrito.

7. Población del estudio

Son elegibles sujetos masculinos y femeninos, según lo determinado por el historial médico, el examen físico, el electrocardiograma de 12 derivaciones (ECG) y las evaluaciones de laboratorio clínico, para participar en el estudio.  
 5 Los sujetos deben tener confirmación histológica de MM con enfermedad medible y cumplir con todos los criterios de elegibilidad.

Las mujeres en edad fértil (MEEF) no deben estar amamantando o embarazadas y deben usar un método anticonceptivo aceptable durante al menos 4 semanas antes de la administración. Las MEEF debe tener un ensayo de embarazo negativo 24 horas antes de la administración de la medicación del estudio.  
 10

8. Evaluaciones del estudio

Medidas de resultados de seguridad: Los acontecimientos adversos se evalúan continuamente durante el estudio y durante los 100 días posteriores al último tratamiento. Los acontecimientos adversos se codifican usando la versión más reciente de MedDRA y se revisan para determinar su posible significancia e importancia. Los sujetos se vigilan hasta que todos los acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento se hayan recuperado hasta el grado  $\leq 1$  o valor basal, o se consideren irreversibles.  
 15

Las evaluaciones de seguridad se basan en la revisión médica de los informes de acontecimientos adversos y los resultados de las mediciones de los signos vitales, ECG, exámenes físicos y ensayos de laboratorio clínico. La incidencia de los acontecimientos adversos observados se tabula y se revisa por su posible importancia e importancia clínica.  
 20

Evaluaciones de eficacia: La evaluación de la enfermedad con ensayos de laboratorio de mieloma en suero y orina, evaluación de médula ósea y tomografía computarizada (TC) y/o formación de imágenes por resonancia magnética (RM), según corresponda, se realiza al inicio del estudio. Desde la inducción hasta el inicio del mantenimiento, la evaluación de la enfermedad se realiza cada 4 semanas (semanas 5 y 10 antes del inicio del mantenimiento). Desde el inicio del mantenimiento, la evaluación de la enfermedad se realiza cada 12 semanas antes de la administración de la dosis. Las evaluaciones de la enfermedad continúan hasta que se confirme la progresión de la enfermedad, al finalizar el seguimiento o hasta que los sujetos se retiren del estudio. En ausencia de deterioro clínico, cualquier evaluación inicial de enfermedad progresiva (EP) o remisión completa (RC) se confirma mediante una evaluación de repetición en el siguiente punto temporal de evaluación tumoral, pero no antes de 4 semanas más tarde. Medidas farmacocinéticas: Los parámetros farmacocinéticos ( $C_{m\acute{a}x}$ ,  $C_{m\acute{i}n}$ ,  $T_{m\acute{a}x}$ , ABC(INF), AUC(TAU), SEMIVIDA, % de RU, CLT/F, CLR, Vee y IA) derivan de datos de concentración plasmática frente al tiempo y excreción urinaria.  
 25  
 30  
 35

A todos los sujetos en expansión de cohorte se les ofrece la oportunidad de someterse a biopsias. Todos los sujetos que se someten a biopsias deben someterse a extracción de sangre periférica en paralelo para comparar los efectos en la médula ósea y en las células inmunitarias periféricas y tumorales.  
 40

9. Consideraciones estadísticas

Aumento progresivo de la dosis: El mismo tamaño en cada dosis depende de la toxicidad observada y no puede determinarse con precisión. Hay 3-9 sujetos en cada cohorte.  
 45

Expansión de cohortes: Un tamaño de muestra de aproximadamente 16 sujetos permite una mejor estimación de la tasa de toxicidad y proporciona una mayor precisión en torno a las estimaciones en torno a la eficacia preliminar.

10. Criterios de valoración

El criterio de valoración principal de este estudio de fase 1 es la seguridad medida mediante la tasa de acontecimientos adversos (AA), los acontecimientos adversos graves (AAG), las muertes y las anomalías de laboratorio clínicamente significativas de grado 3/4. La seguridad se evalúa en el tratamiento y hasta 100 días después de recibir la última dosis del fármaco del estudio. Todos los sujetos que reciben lirilumab o elotuzumab se incluyen en los análisis de seguridad.  
 50  
 55

Los criterios de valoración de eficacia secundarios varían según la enfermedad. Entre todos los sujetos, se resume la tasa de supervivencia sin progresión (tSSP) en puntos temporales previamente especificados. Adicionalmente, se determina la tasa de respuesta objetivo (por ejemplo, tasa de respuestas de RP o RC).

Los criterios de valoración secundarios también incluyen un resumen de los parámetros FC seleccionados, tales como la  $C_{m\acute{a}x}$ , el ABC (TAU) y el CLT en función de los datos de tiempo de concentración obtenidos del lirilumab durante la fase de inducción del tratamiento. Además, la  $C_{m\acute{a}x}$  y la  $C_{m\acute{i}n}$  se capturan en estado estacionario para lirilumab y elotuzumab en función de los datos del tiempo de concentración en la fase de mantenimiento.  
 60

Los datos de concentración obtenidos en este estudio pueden combinarse con datos de otros estudios en el programa de desarrollo clínico para desarrollar o perfeccionar un modo de FC poblacional. Este modelo puede usarse para  
 65

evaluar los efectos de las covariables intrínsecas y extrínsecas sobre la FC del lirilumab y el elotuzumab para determinar las medidas de exposición individual. Además, pueden usarse exposiciones determinadas mediante el modelo para los análisis de exposición-respuesta.

5 La inmunogenicidad del lirilumab y del elotuzumab se notifica para un estado ADA positivo (tal como positivo persistente, positivo transitorio, solo la última muestra positiva, positivo basal) y un estado ADA negativo, con respecto al valor basal. Además, se notifica la presencia de anticuerpos neutralizantes, si corresponde. El efecto de la inmunogenicidad en la seguridad se explora si hay un número suficiente de sujetos con ADA positiva persistente.

10 Biomarcadores: las medidas del número de NK, T y células plasmáticas y del fenotipo se determinan mediante citometría de flujo en muestras de aspirado de médula ósea y muestras de sangre periférica en serie de todos los pacientes y medidas de factores solubles.

11. Análisis:

15 A menos que se especifique lo contrario, los datos de seguridad se resumen: 1) en general, a través del aumento progresivo de la dosis y la expansión de la cohorte por nivel de dosis y 2) en general y por grupo de tratamiento (A, B o C) en la expansión de cohortes. Los datos de eficacia se resumen para cada grupo por grupo de tratamiento en la expansión de cohortes.

20 Todos los sujetos que reciben tratamiento farmacológico en estudio se incluyen en el análisis de los criterios de valoración de seguridad. Todos los AA registrados se enumeran y tabulan por clase de órgano del sistema, término preferido, relación con el fármaco del estudio y tratamiento. La codificación se realiza de acuerdo con la versión más reciente de MedDRA. Los resultados de los signos vitales y los ensayos de laboratorio clínico seleccionados se enumeran y se resumen por tratamiento. Se enumeran todos los hallazgos importantes de los exámenes físicos y los resultados de los ensayos de laboratorio clínico. Se enumeran todas las anomalías en el electrocardiograma (ECG) identificadas.

30 La eficacia se enumera para los sujetos en el aumento progresivo de la dosis y se resume por grupo de tratamiento en la expansión de cohortes. La decisión de hacer esto se toma porque no todos los criterios de valoración de eficacia son pertinentes para todos los grupos de tratamiento. El nivel de dosis y el grupo de tratamiento proporcionan un resumen de los datos de aumento progresivo de la dosis para los sujetos en aumento progresivo de la dosis que cumplen con los criterios para uno de los grupos de tratamiento en la expansión de cohortes. Los criterios de valoración pertinentes varían según el grupo de tratamiento en la expansión de cohortes.

35 La tasa de supervivencia sin progresión de referencia y los intervalos de confianza del 95 % correspondientes se estiman en puntos temporales preseleccionados usando la metodología Kaplan-Meier. Además, las representaciones de Kaplan-Meier son generadas por el grupo de tratamiento en la expansión de cohortes. La tasa de respuesta objetiva (por ejemplo, RC + RP), la tasa de conversión de enfermedad residual mínima positiva en enfermedad residual mínima negativa y la tasa de respuestas de RC se tabulan; se proporcionan intervalos de confianza binomiales exactos del 40 95 % usando el método de Clopper-Pearson. La distribución de los valores sin procesar y el cambio desde el valor basal en los niveles de proteína m se resumen en cada punto temporal usando estadística descriptiva. Se pueden generar representaciones Spider que muestren los cambios en la carga tumoral a lo largo del tiempo para pacientes con enfermedad medible. Además, pueden producirse representaciones que muestren los niveles de proteína m en 45 función del tiempo. Dependiendo de la finalidad del análisis, la respuesta puede notificarse para todos los sujetos tratados o para los sujetos evaluables por la respuesta. Las tasas de supervivencia general de 1 y 2 años se evaluaron de nuevo usando la metodología de Kaplan-Meier en sujetos en el grupo de expansión de tratamiento latente.

50 El efecto farmacodinámico sobre el número y la función de las células inmunitarias se evalúa mediante estadística y representaciones de resumen. Además, la correlación del número de células inmunitarias de la médula ósea y la función con las medidas de los marcadores de sangre periférica se explora gráficamente o mediante métodos estadísticos apropiados basados en la disponibilidad de datos, para evaluar las asociaciones. El efecto farmacodinámico del tratamiento sobre marcadores en sangre periférica y proteínas séricas se evalúa mediante estadística de resumen y se investiga gráficamente para explorar patrones de cambio a lo largo del tiempo y cómo los 55 patrones difieren entre los niveles de dosis y la exposición. Si hay una indicación significativa en el patrón a lo largo del tiempo, puede realizarse un análisis adicional (por ejemplo, mediante un modelo mixto lineal) para caracterizar la relación. Se exploran gráficamente asociaciones entre las mediciones de biomarcadores de sangre periférica o aspirado de médula ósea y los resultados clínicos y se evalúan según sea necesario mediante métodos tales como, pero no limitados a, la regresión logística, y se caracterizan mediante la estadística adecuada.

60



Sumario de secuencias

SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	<p>Secuencia de aminoácidos de cadena pesada mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) (CDR subrayadas; además, la P que está sustituida por S en la región bisagra del lirilumab está subrayada.)</p> <p>QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKAS<u>GGTFS</u> <u>FYA</u>ISWVRQA PGQGLEWMGG</p> <p><u>FIPIFGAANY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSDD TAVYYCAR<u>IP</u></p> <p><u>SGSYYYDYDM</u> <u>DV</u>WGQTTVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC</p> <p>LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG</p> <p>TKTYTCNVDH KPSNTKVKDR VESKYGPFCP <u>P</u>CPAPEFLGG PSVFLFPPKP</p> <p>KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN</p> <p>STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ</p> <p>VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV</p> <p>LDS DGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK</p>
2	<p>Secuencia de aminoácidos de cadena ligera mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) (CDR subrayadas)</p> <p>EIVLTQSPVT LSLSPGERAT LSCRAS<u>QSVS</u> <u>SY</u>LAWYQQKP GQAPRLLIY<u>D</u></p> <p><u>ASN</u>RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYC<u>QQ</u> <u>RSN</u>WMTFG<u>Q</u></p> <p>GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV</p> <p>DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG</p> <p>LSSPVTKSFN RGEC</p>
3	<p>Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (SEQ ID NO: 17 del documento WO 2006/003179)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQTTVTVSS</p>
4	<p>Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (VH) mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (SEQ ID NO: 18 del documento WO 2006/003179)</p> <p>caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc tcttgcaagg cttctggagg caccttcagt ttctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg ttcatcccta tctttggtgc agcaaacctac gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac atggaactga gcagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaatcct agtgggagct actactacga ctacgatatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca</p>
5	<p>Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (SEQ ID NO: 15 del documento WO 2006/003179)</p> <p>EIVLTQSPVTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWMYTFGQ GTKLEIKRT</p>

ES 2 707 057 T3

6	<p>Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera (VL)  mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (SEQ ID NO: 16 del documento WO 2006/003179)</p> <p>gaaattgtgt tgacacagtc tccagtcacc ctgtctttgt ctccagggga  aagagccacc ctctcctgca gggccagtc gagtggttagc agctacttag  cctggtacca acagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatgat  gcatccaaca gggccactgg catcccagcc aggttcagtg gcagtgggtc  tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct gaagattttg  cagtttatta ttgtcagcag cgtagcaact ggatgtacac ttttggccag  gggaccaagc tggagatcaa acgaact</p>
7	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada  mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (de la Figura 15 del documento WO 2006/003179) (corresponde a los restos de aminoácidos 31-35 de la SEQ ID NO: 1)  FYAIS</p>
8	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada  mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (de la Figura 15 del documento WO 2006/003179) (corresponde a los restos de aminoácidos 50-65 de la SEQ ID NO: 1)  GFIPIFGAANYAQKFQ</p>
9	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada  mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (de la Figura 15 del documento WO 2006/003179) (corresponde a los restos de aminoácidos 99-112 de la SEQ ID NO: 1)  IPSGSYYYDYDMDV</p>
10	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera  mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (de la Figura 15 del documento WO 2006/003179) (corresponde a los restos de aminoácidos 24-34 de la SEQ ID NO: 3)  RASQSVSSYLA</p>
11	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera  mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (de la Figura 15 del documento WO 2006/003179) (corresponde a los restos de aminoácidos 50-56 de la SEQ ID NO: 3)  DASNRAT</p>
12	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera  mAb anti-KIR (IPH2102/lirilumab) - (de la Figura 15 del documento WO 2006/003179) (corresponde a los restos de aminoácidos 89-97 de la SEQ ID NO: 3)  QQRSNWMYT</p>
13	<p>Dominio extracelular KIR2DL1  (SEQ ID NO: 23 del documento WO 2006/003179)</p> <p>HEGVHRKPSLLAHPGXLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLHREGMFNDT  LRLIGEHDGVSKANF SISRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLD  IVIIGLYEKPSLSAQXGPTVLAGENVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHER  RLPAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFHDSPEYWSKSSDPLLVS  VTGNPSNSWPSPTEPSSKTGNPRHLH</p>
14	<p>Dominio extracelular KIR2DL2  (SEQ ID NO: 24 del documento WO 2006/003179)</p> <p>HEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFHFLHREGKFKDTLH  LIGEHDGVSKANF SIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIV  ITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGE SVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRF  SAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSDPLLVSVI  GNPSNSWPSPTEPSSKTGNPRHLH</p>

15	<p>Dominio extracelular KIR2DL3 (SEQ ID NO: 25 del documento WO 2006/003179) HEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVRFQHFLLHREGKFKDTLH LIGEHHDGVSKANF SIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIV ITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGE SVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRF SAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSVT GNPSNSWSPTEPSSETGNPRHLH</p>
16	<p>Dominio extracelular KIR2DS4 (SEQ ID NO: 38 del documento WO 2006/003179) QEGVHRKPSFLALPGHLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLLHREGKFNNTLH LIGEHHDGVSKANF SIGPMPVLAGTYRCYGSVPHSPYQLSAPSDPLDMV</p>
17	<p>Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab)</p>
18	<p>Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab)</p>
19	<p>Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFD F S <b><u>RYWMS</u></b>WVRQAPGKGLEWIG<b><u>E</u></b> <b><u>INPDSSTINYAPSLKD</u></b>KF I I SRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR<b><u>PD</u></b> <b><u>GNYWYFDV</u></b>WGQGLVTVSS</p>
20	<p>Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (VH) mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab)</p>
21	<p>Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab) DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC<b><u>KASQDVGIAVA</u></b>WYQQKPGKVPKLLIY<b><u>WA</u></b> <b><u>STRHT</u></b>GVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDVATYYC<b><u>QQYSSYPYT</u></b>FGQGT KVEIK</p>
22	<p>Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera (VL) mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab)</p>
23	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab) RYWMS</p>
24	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab) EINPDSSTINYAPSLKD</p>
25	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab) PDGNYWYFDV</p>
26	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab) KASQDVGIAVA</p>
27	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab) WASTRHT</p>
28	<p>Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera mAb anti-CS1 (HuLuc63; elotuzumab) QQYSSYPYT</p>

29	<p>Secuencia CS1 completa (N.º de acceso de GenBank: NM_021181.3)</p> <p>MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAASGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWT  FNTTPLVTIQPEGGTIIIVTQNRNRERVDFPDGGYSLKLSKLNDSGIYYVGIY  SSSLQQPSTQEYVLHVYEHLSKPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCCMEHGEEVDIY  TWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESDMTFICVARNPVSRNFSSPILARKLCE  GAADDPDSSMVLCLLLVPLLLSLFVLGLFLWFLKRERQEEYIEEKRVVICRET  PNICPHSGENTEYDTIPHTNRTILKEDPANTVYSTVEIPKKMENPHSLLTMPDTP  RLFAYENV</p>
----	--

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 (a) un anticuerpo anti-KIR que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 7, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 12, y
- 10 (b) un anticuerpo anti-CS1 que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 28.
- 15

20 2. Un kit para tratar el mieloma múltiple en un paciente humano, comprendiendo el kit:

- (a) una dosis de un anticuerpo anti-KIR que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 7, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 12;
- 25 (b) una dosis de un anticuerpo anti-CS1 que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 28; y
- 30 (c) instrucciones para usar el anticuerpo anti-KIR y el anticuerpo anti-CS1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-16.
- 35

40 3. La composición de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple en un paciente humano.

4. Un anticuerpo anti-KIR y un anticuerpo anti-CS1 para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple en un paciente humano, en donde

- 45 (a) el anticuerpo anti-KIR comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 7, una CDR2 de la región variable de la cadena que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 12, y
- 50 (b) el anticuerpo anti-CS1 comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 del la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 28.
- 55

60 5. Un anticuerpo anti-KIR para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple en un paciente humano, en donde:

- (a) el anticuerpo anti-KIR comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 7, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que
- 65

se expone en la SEQ ID NO: 12, y

(b) el tratamiento comprende adicionalmente la administración de un anticuerpo anti-CS1 que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 28.

6. Un anticuerpo anti-CS1 para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple en un paciente humano, en donde:

(a) el anticuerpo anti-CS1 comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 28, y

(b) el tratamiento comprende adicionalmente la administración de un anticuerpo anti-KIR que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 7, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 12.

7. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-6,

en donde el tratamiento comprende (A) la administración del anticuerpo anti-CS1 semanalmente durante un total de 8 dosis a lo largo de 8 semanas y la administración del anticuerpo anti-KIR cada 4 semanas durante un total de 2 dosis a lo largo de 8 semanas durante una fase de inducción, seguida de (B) la administración del anticuerpo anti-CS1 cada 2 semanas y la administración del anticuerpo anti-KIR cada 4 semanas durante una fase de mantenimiento, en donde el anticuerpo anti-KIR se administra a una dosis de 0,1-20 mg/kg de peso corporal y el anticuerpo anti-CS1 se administra a una dosis de 0,1-20 mg/kg de peso corporal durante las fases tanto de inducción como de mantenimiento.

8. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el tratamiento comprende la administración del anticuerpo anti-KIR y el anticuerpo anti-CS1 en las siguientes dosis durante la fase de inducción o la de mantenimiento:

- (a) 0,3 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1;
- (b) 1 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1; o
- (c) 3 mg/kg de anticuerpo anti-KIR y 10 mg/kg de anticuerpo anti-CS1.

9. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 están formulados para administración intravenosa.

10. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en donde los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 se administran simultáneamente.

11. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en donde los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 son para administrarse por separado.

12. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en donde la administración de los anticuerpos anti-KIR y anti-CS1 tiene un efecto sinérgico sobre el tratamiento en comparación con la administración de cualquiera de los anticuerpos solo.

13. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-12, en donde el tratamiento produce al menos un efecto terapéutico elegido entre la respuesta completa, una respuesta parcial muy buena, una respuesta parcial y la enfermedad estable.

14. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-13, en donde el anticuerpo anti-KIR comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera que tienen las secuencias que se exponen en las SEQ ID NO: 3 y 5, respectivamente.

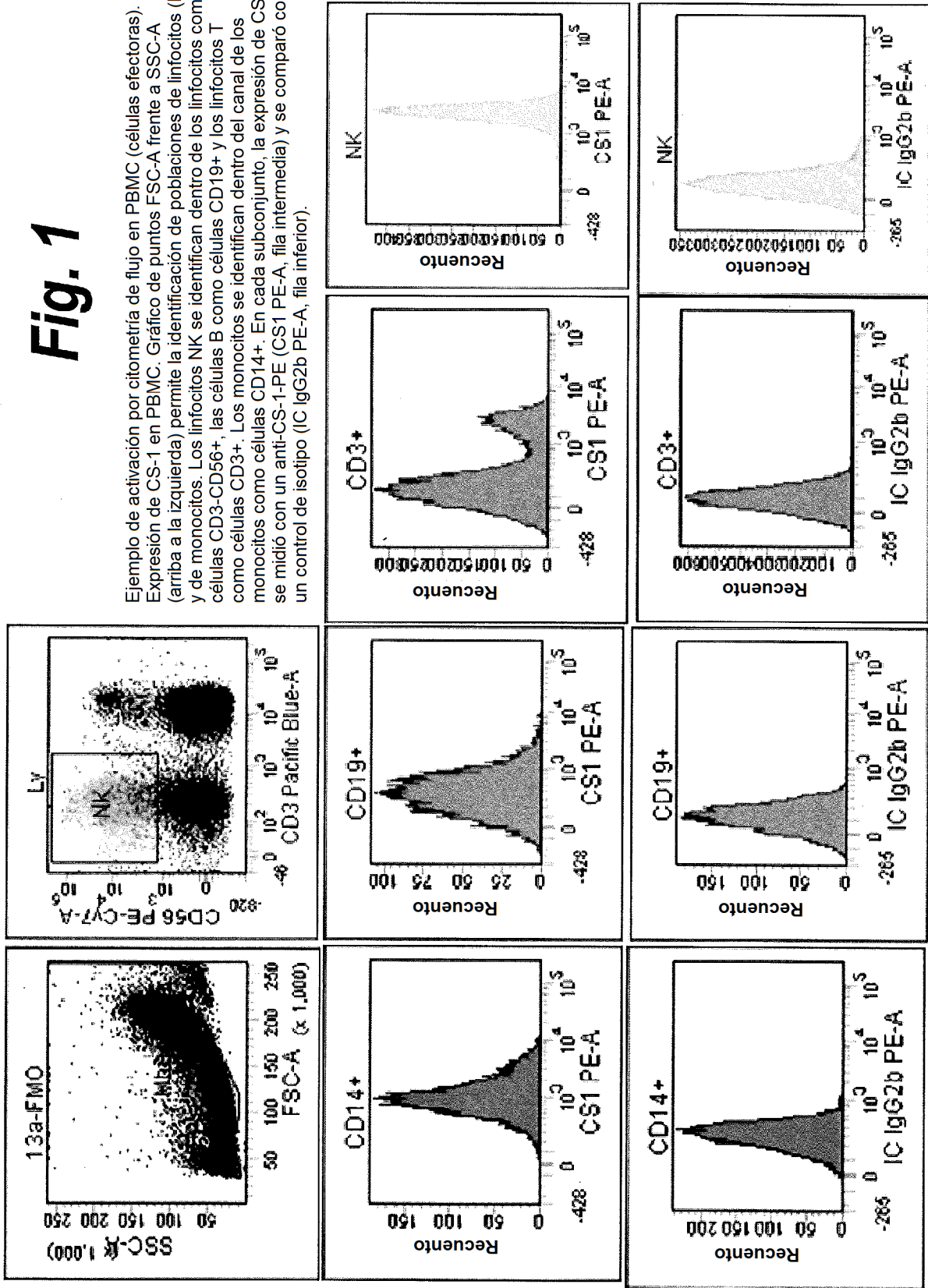
15. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones

4-13, en donde el anticuerpo anti-KIR comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias que se exponen en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente.

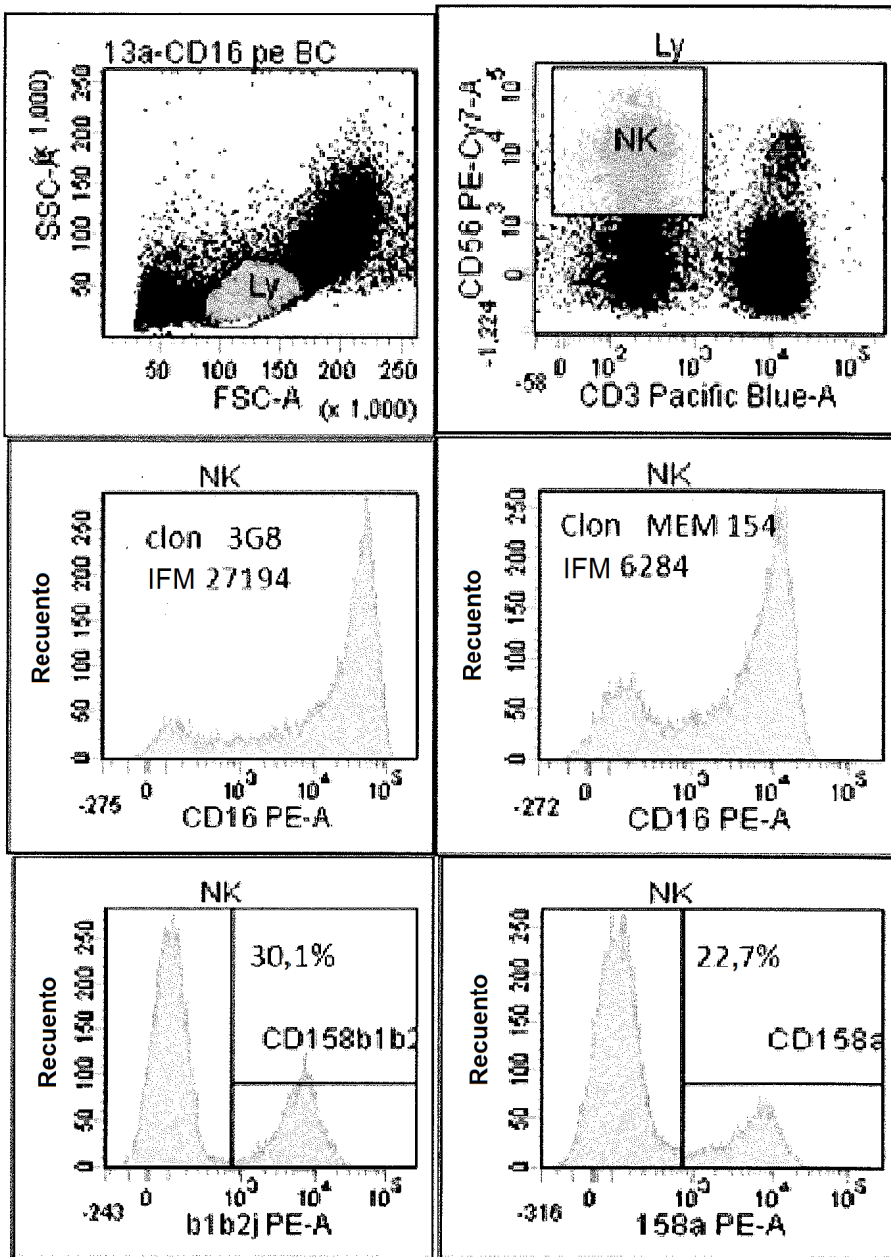
5 16. El anticuerpo anti-KIR y/o el anticuerpo anti-CS1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-15, en donde el anticuerpo anti-CS1 comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera que tienen las secuencias que se exponen en las SEQ ID NO: 19 y 21, respectivamente.

**Fig. 1**

Ejemplo de activación por citometría de flujo en PBMC (células efectoras). Expresión de CS-1 en PBMC. Gráfico de puntos FSC-A frente a SSC-A (arriba a la izquierda) permite la identificación de poblaciones de linfocitos (Ly) y de monocitos. Los linfocitos NK se identifican dentro de los linfocitos como células CD3-CD56+, las células B como células CD19+ y los linfocitos T como células CD3+. Los monocitos se identifican dentro del canal de los monocitos como células CD14+. En cada subconjunto, la expresión de CS-1 se midió con un anti-CS-1-PE (CS1 PE-A, fila intermedia) y se comparó con un control de isotipo (IC IgG2b PE-A, fila inferior).

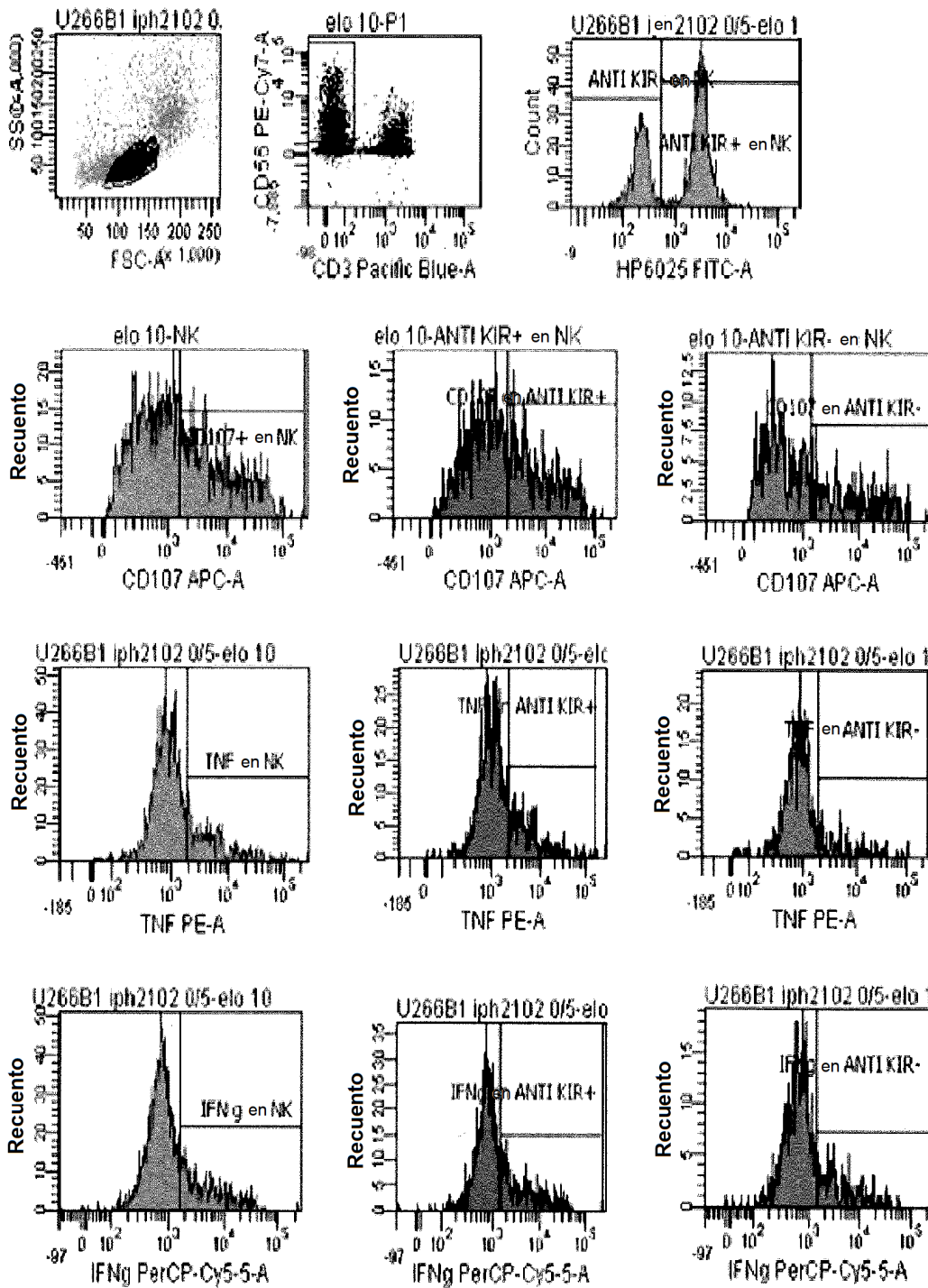






**Fig. 2**

Caracterización de linfocitos NK dentro de las PBMC. Los linfocitos NK se identifican como linfocitos CD3-CD56+ (fila superior). La expresión de CD16 se midió con diferentes mAb anti-CD16 (3G8 o MEM154) para confirmar los resultados de la tipificación por PCR de CD16 (fila central). La expresión de KIR2DL2, -2DL3, -2DS2 se midió con mAb GL183 (CD158b1b2, panel inferior izquierdo). KIR2DL1 se midió con mAb 143211 (CD158a, panel inferior derecho).



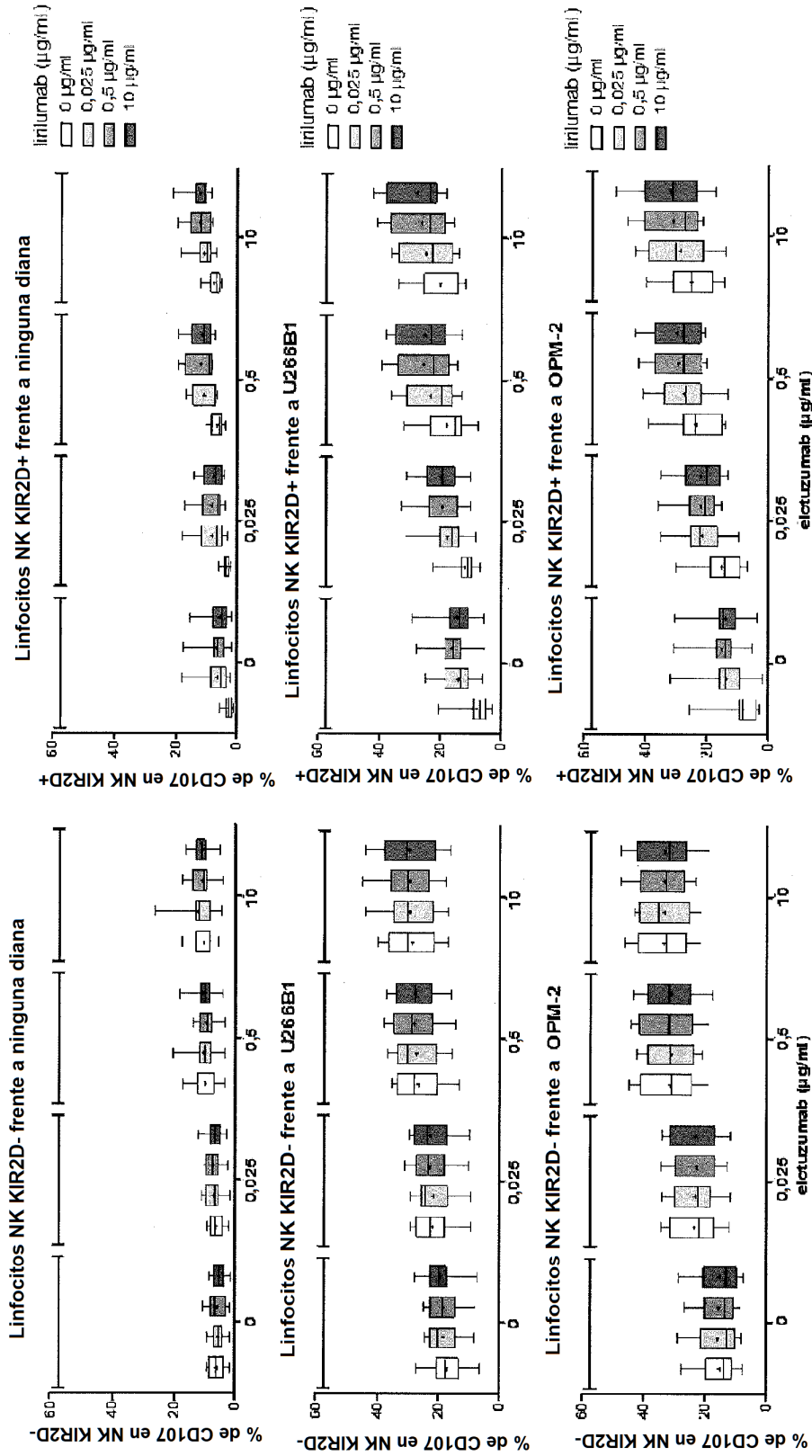
**Fig. 3**

Estrategia de activación. Ejemplo de PBMC del voluntario 20060411b frente a U266B1 en presencia de 10 µg/ml de elotuzumab y 0,5 µg/ml de lirilumab. La fila superior indica la activación de los linfocitos NK con PBMC identificadas como linfocitos CD3-CD56+. El panel superior derecho indica la identificación de linfocitos NK positivos para lirilumab (anti-KIR+ en NK) y negativo (anti-KIR- en NK). La movilización de CD107, el TNF-α intracelular y el IFN-γ intracelular se indican en segunda, tercera y cuarta filas, respectivamente. Estas tinciones se muestran en linfocitos NK totales (columna izquierda), linfocitos NK positivos para lirilumab (columna central) y linfocitos NK negativas para lirilumab (columna derecha).

ID del donante	Nombre/fecha del experimento	PBMC					U266B1		OPM-2	
		Tipado de CD16	Relación de IMF de CD16	Tipado de HLA-C	% de NK en PBMC	% de linf. NK positivos para lirilumab	Relación de HLA-ABC de IMF	Relación de IFM de CS-1	Relación de HLA-ABC de IMF	Relación de IFM de CS-1
20060428b	120808EB Exp6	F/V	ND	C1/C2	18%	76%	400	9	217	35
20060512b	120813EB Exp7	F/F	122	C1/C1	7%	37%	344	7	147	27
20060512a	120925EB Exp9	F/F	303	C1/C2	7%	52%	244	7	182	29
20060419a	120925EB Exp9	F/V	504	C1/C2	10%	42%				
20060426b'	120928EB Exp10	F/V	1061	C2/C2	10%	33%	466	14	256	53
2000414a	121002EB Exp11	F/F	266	C1/C1	19%	52%	184	5	144	22
20060420	121002EB Exp11	F/V	587	C1/C2	28%	59%				
20060411b	121004EB Exp12	F/F	239	C1/C2	14%	68%	254	5	192	25
DVS217	130404EB Exp15	V/V	550	ND	8%	38%	380	<b>30</b>	136	78
DS21-S2109	130409EB Exp16	V/V	633	C1/C1	4%	39%	251	15	216	68
DVS647	130412EB Exp17	V/V	457	ND	10%	51%	220	12	220	59
20060413a	130421EB Exp17	V/V	320	C1/C2	22%	43%				
		<b>Media</b>	<b>458</b>		<b>13%</b>	<b>49%</b>	<b>305</b>	<b>12</b>	<b>190</b>	<b>44</b>
		<b>DT</b>	<b>257</b>		<b>7%</b>	<b>13%</b>	<b>96</b>	<b>8</b>	<b>41</b>	<b>21</b>

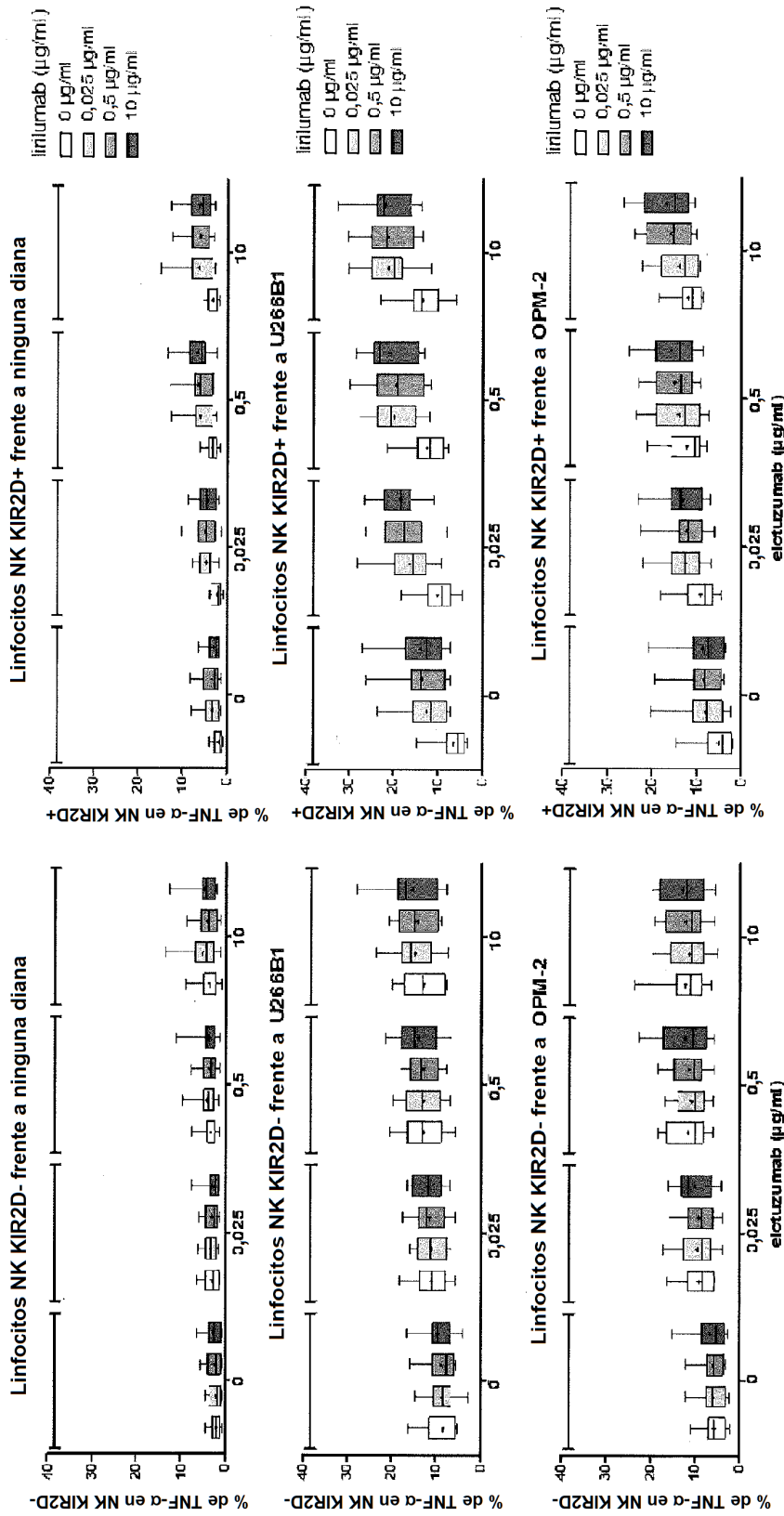
**Fig. 4**

Figura 4: Resumen de características de las estirpes celulares diana y las células efectoras en cada experimento. El valor destacado es un valor atípico de acuerdo con un ensayo de Grubb para valores atípicos.



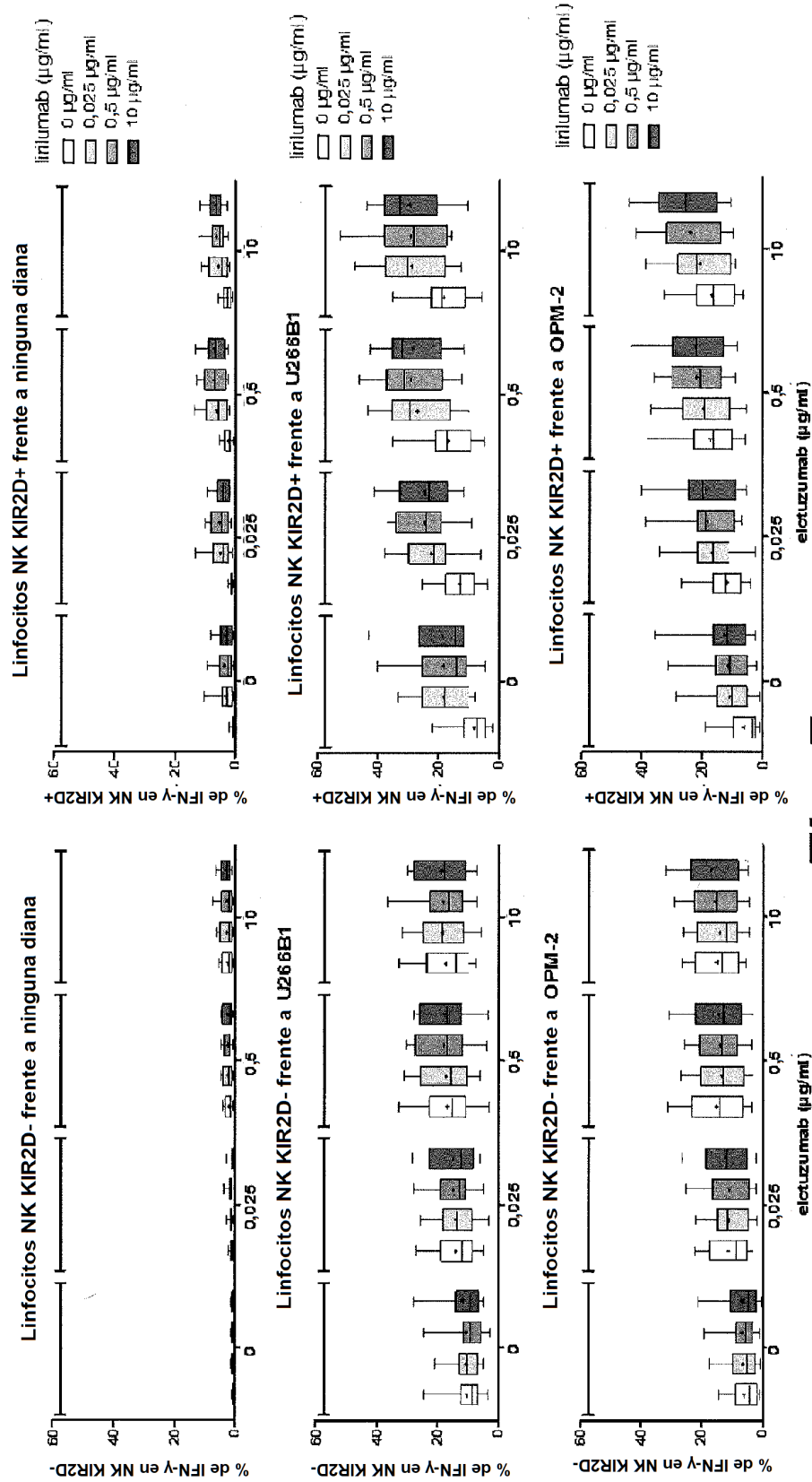
**Fig. 5**

Movilización de CD107 en linfocitos NK que expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D+, columna derecha) dirigidas por lirilumab o en linfocitos NK que no expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D-, columna izquierda). La movilización de CD107 se mide en linfocitos NK indicados dentro de PBMC solo en medio (panel superior), dentro de PBMC incubadas con U266B1 (panel central) o con OPM-2 (panel inferior). Los diagramas de caja indican la mediana con el segundo y tercer cuartiles. Las líneas indican los valores mín. y máx. + indica la media. N = 12 voluntarios sanos.



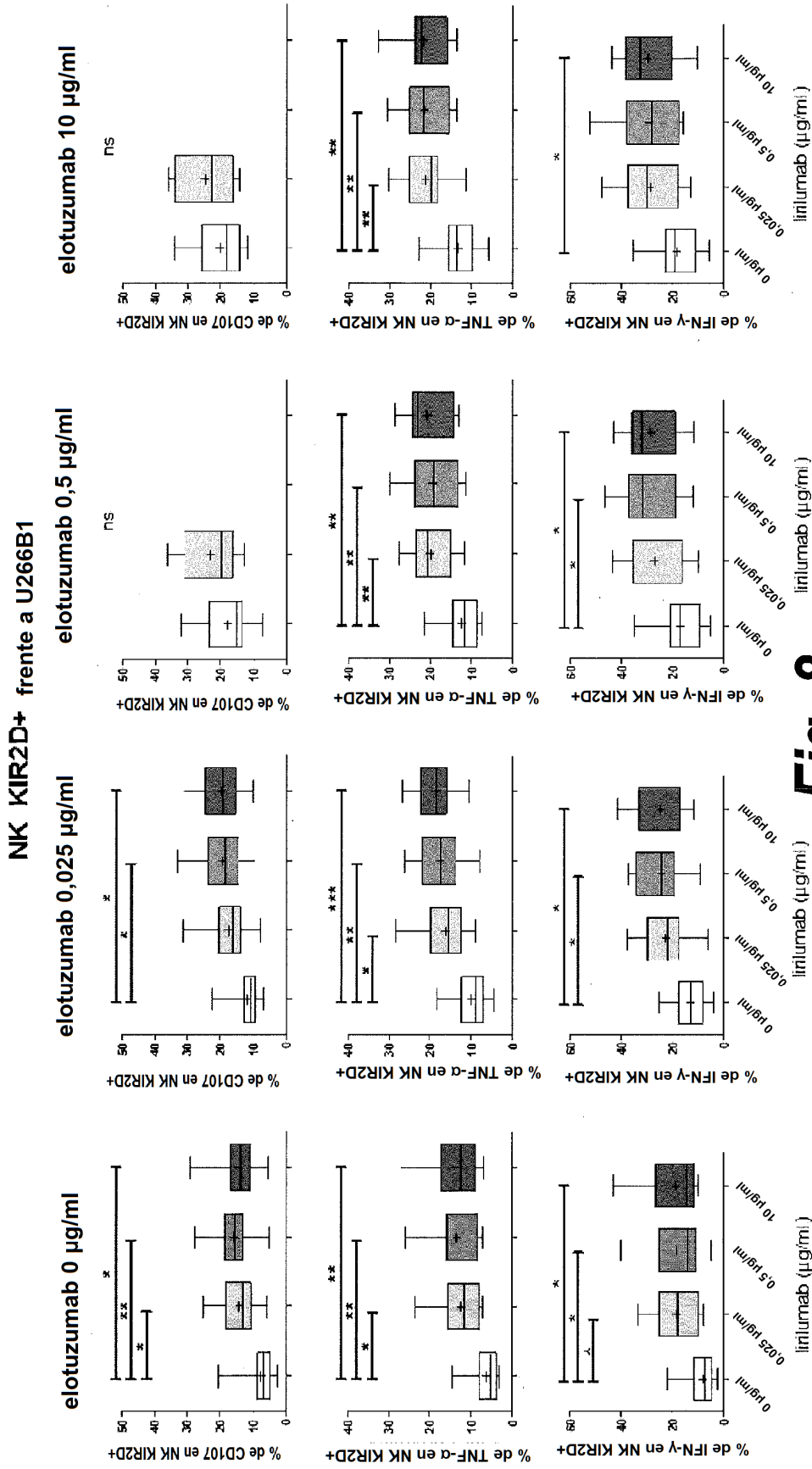
**Fig. 6**

Producción intracelular de TNF- $\alpha$  en linfocitos NK que expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D+, columna derecha) dirigidos por irilumab o en linfocitos NK que no expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D-, columna izquierda). La producción intracelular de TNF- $\alpha$  se mide en linfocitos NK indicados dentro de PBMC en medio solo (panel superior), dentro de PBMC incubadas con U266B1 (panel central) o con OPM-2 (panel inferior). Los diagramas de caja indican la mediana con el segundo y tercer cuartiles. Las líneas indican los valores mín. y máx. + indica la media. N = 12 voluntarios sanos.



**Fig. 7**

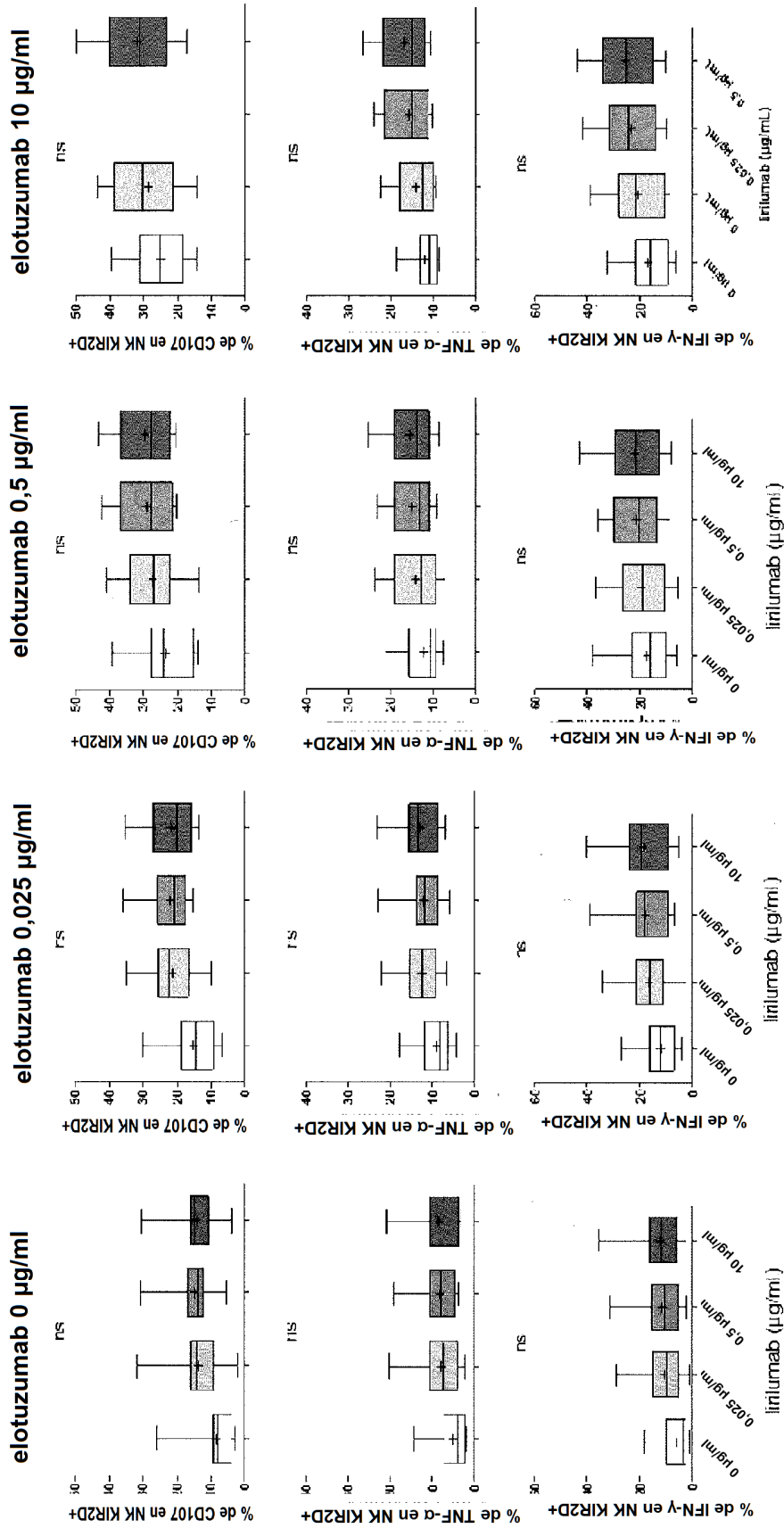
Producción intracelular de IFN- $\gamma$  en linfocitos NK que expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D+, columna derecha) dirigidos por irilumab o en linfocitos NK que no expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D-, columna izquierda). La producción intracelular de IFN- $\gamma$  se mide en linfocitos NK indicados dentro de PBMC en medio solo (panel superior), dentro de PBMC incubadas con U266B1 (panel central) o con OPM-2 (panel inferior). Los diagramas de caja indican la mediana con el segundo y tercer cuartiles. Las líneas indican los valores mín. y máx. + indica la media. N = 12 voluntarios sanos.



**Fig. 8**

Movilización de CD107 (arriba), producción de TNF-α intracelular (medio) y producción de intracelular IFN-γ y la producción (abajo) en linfocitos NK que expresan KIR2D en respuesta a U266B1 con dosis indicadas de lirinumab y elotuzumab. Los diagramas de caja indican la mediana con el segundo y tercer cuartiles. Las líneas indican los valores mín. y máx. + indica la media. N = 12 voluntarios sanos. Los grupos se compararon usando un ANOVA de una vía y un ensayo de comparación múltiple de Bonferroni.

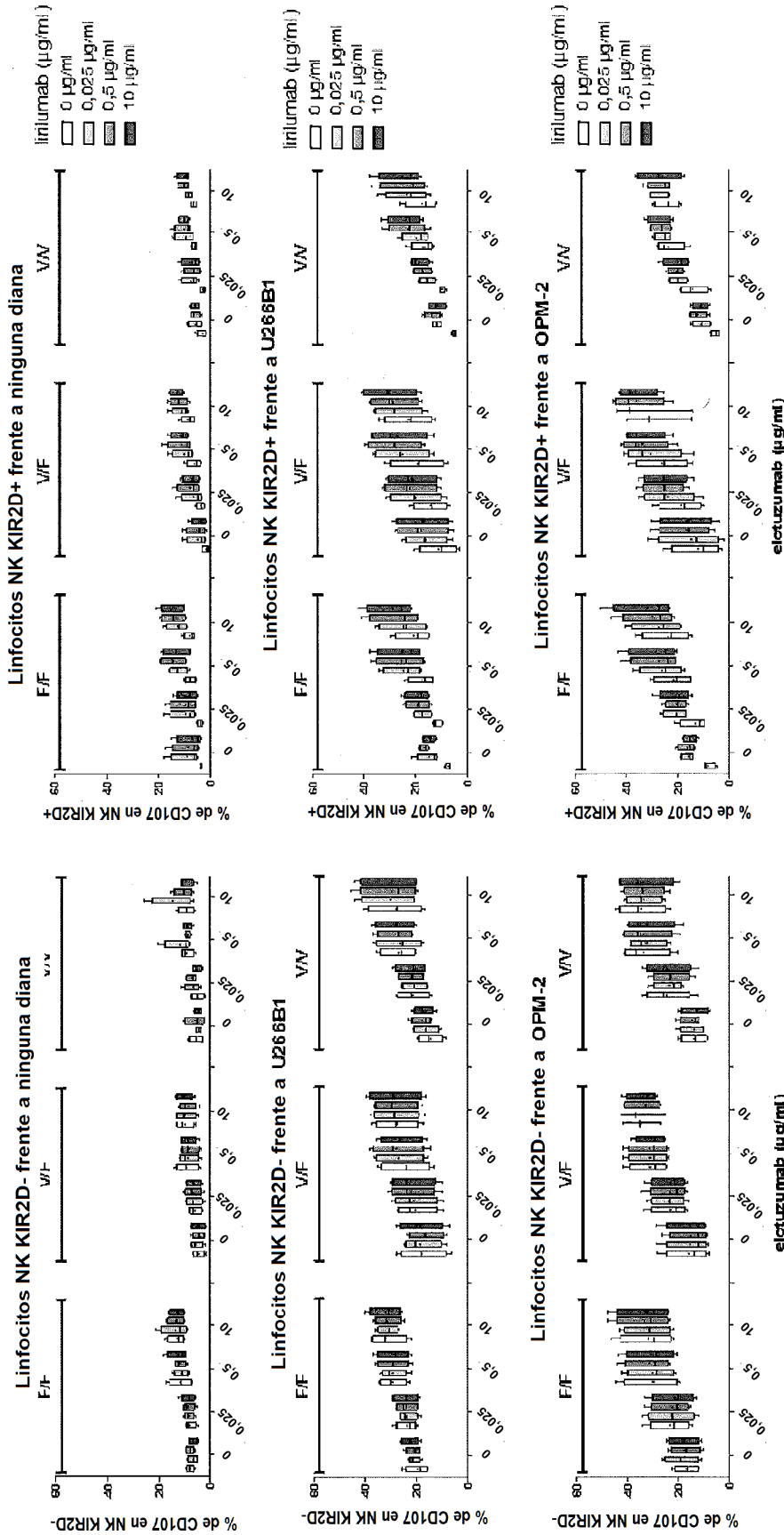
**NK KIR2D+ frente a OPM-2**



**Fig. 9**

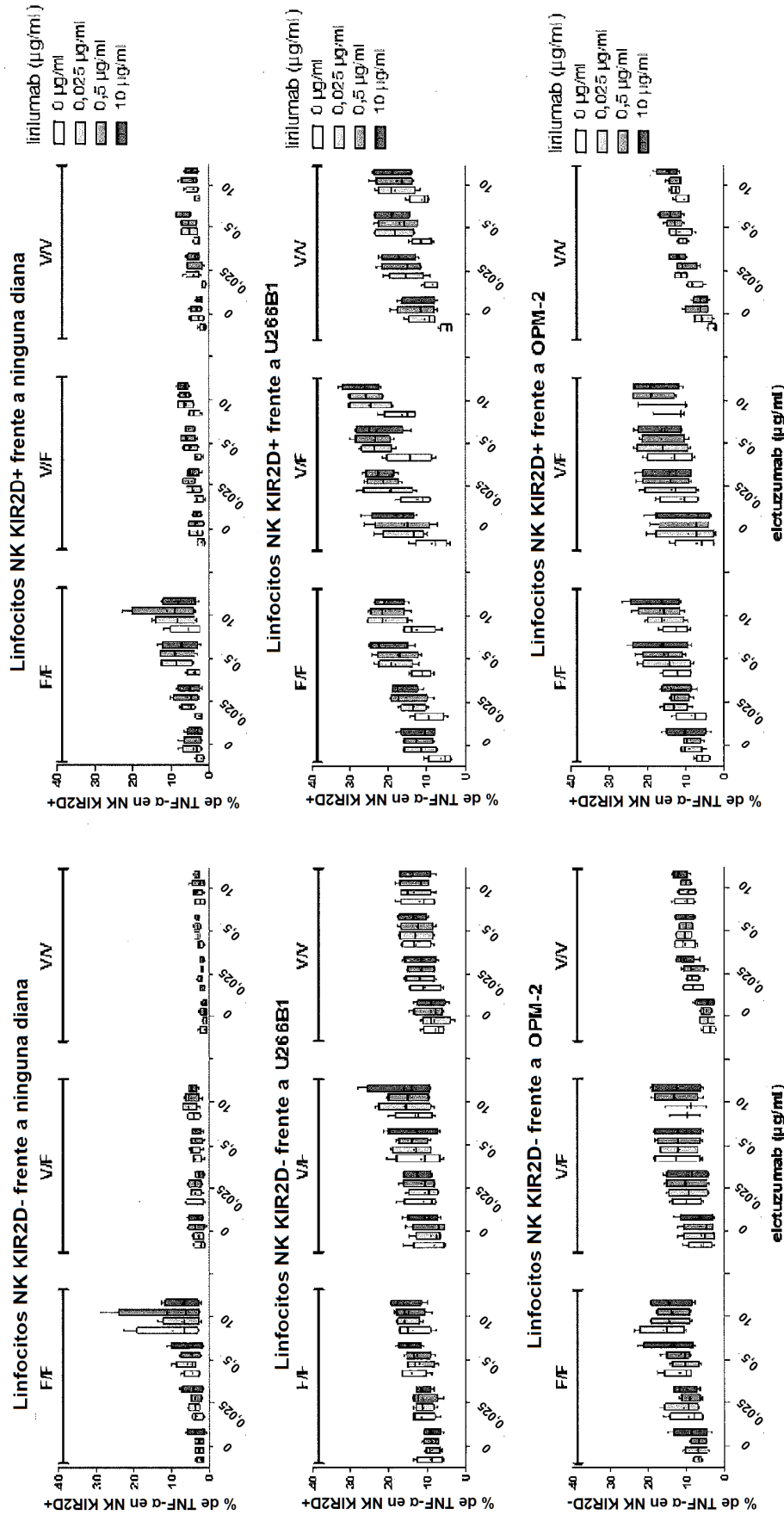
Movilización de CD107 (arriba), producción de TNF- $\alpha$  intracelular (medio) y producción de intracelular IFN- $\gamma$  y la producción (abajo) en linfocitos NK que expresan KIR2D en respuesta a OPM-2 con dosis indicadas de lirilumab y elotuzumab. Los diagramas de caja indican la mediana con el segundo y tercer cuartiles. Las líneas indican los valores mín. y máx. + indica la media. N = 12 voluntarios sanos. Los grupos se compararon usando un ANOVA de una vía y un ensayo de comparación múltiple de Bonferroni.





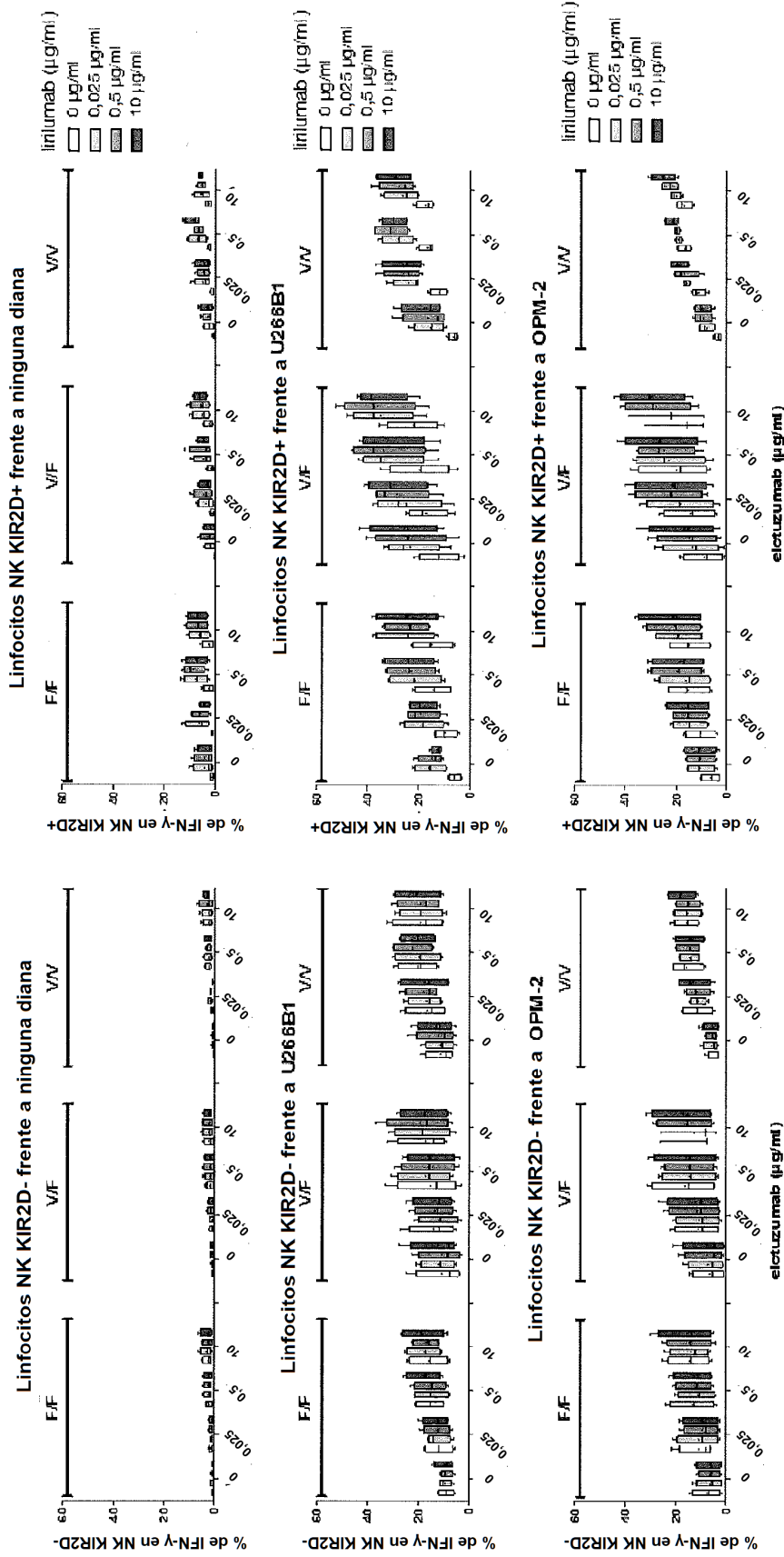
**Fig. 10**

Mobilización de CD107 en linfocitos NK que expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D+, columna derecha) dirigidos por irilumab o en linfocitos NK que no expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D-, columna izquierda). La movilización de CD107 se mide en linfocitos NK indicados dentro de PBMC en medio solo (panel superior), dentro de PBMC incubadas con U266B1 (panel central) o con OPM-2 (panel inferior). Los diagramas de caja indican la mediana con el segundo y tercer cuartiles. Las líneas indican los valores mín. y máx. + indica la media. N = 4 voluntarios sanos por genotipo de CD16 (F/F, V/V o V/V).



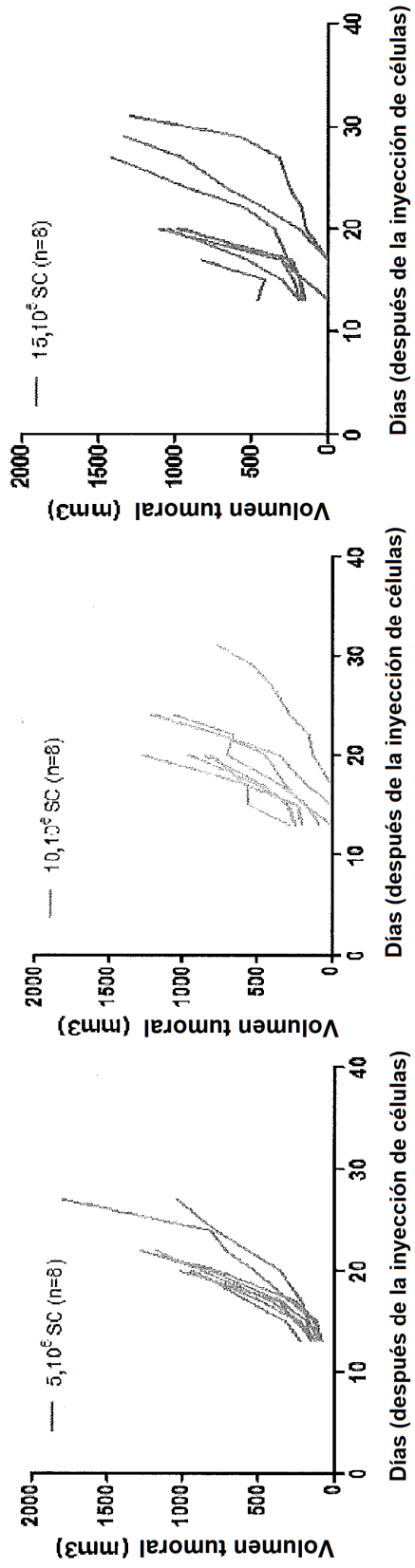
**Fig. 11**

Producción intracelular de TNF-α en linfocitos NK que expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D+, columna derecha) dirigidos por lirilumab o en linfocitos NK que no expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D-, columna izquierda). La Producción intracelular de TNF-α se mide en linfocitos NK indicados dentro de PBMC en medio solo (panel superior), dentro de PBMC incubadas con U266B1 (panel central) o con OPM-2 (panel inferior). Los diagramas de caja indican la mediana con el segundo y tercer cuartiles. Las líneas indican los valores mín. y máx. + indica la media. N = 4 voluntarios sanos por genotipo de CD16 (F/F, V/F o V/V).



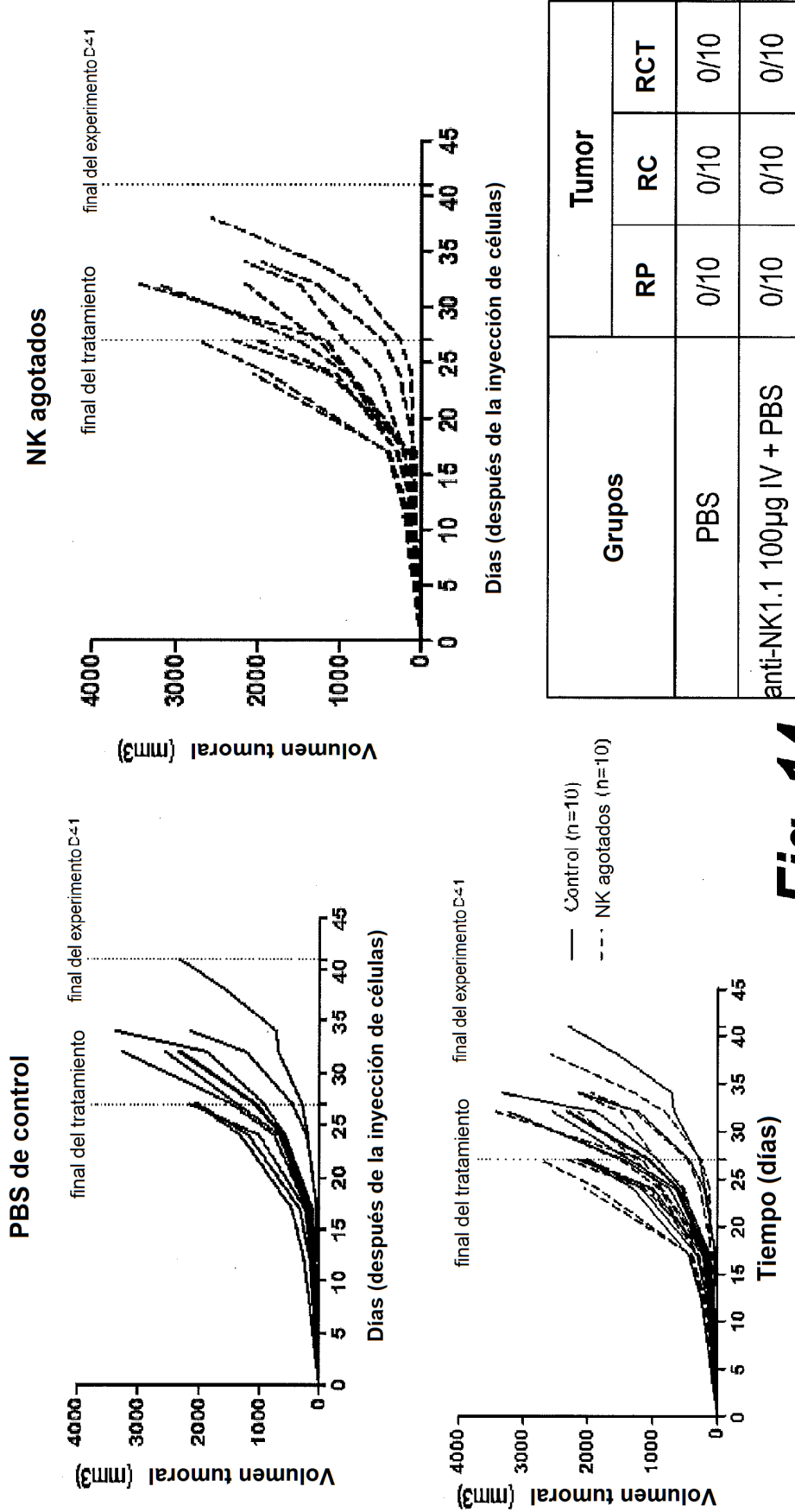
**Fig. 12**

Producción intracelular de IFN- $\gamma$  en linfocitos NK que expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D+, columna derecha) dirigidos por irilumab o en linfocitos NK que no expresan KIR2D (linfocitos NK KIR2D-, columna izquierda). La Producción intracelular de IFN- $\gamma$  se mide en linfocitos NK indicados dentro de PBMC en medio solo (panel superior), dentro de PBMC incubadas con U266B1 (panel central) o con OPM-2 (panel inferior). Los diagramas de caja indican la mediana con el segundo y tercer cuartiles. Las líneas indican los valores mín. y máx. + indica la media. N = 4 voluntarios sanos por genotipo de CD16 (F/F, V/F o V/V).



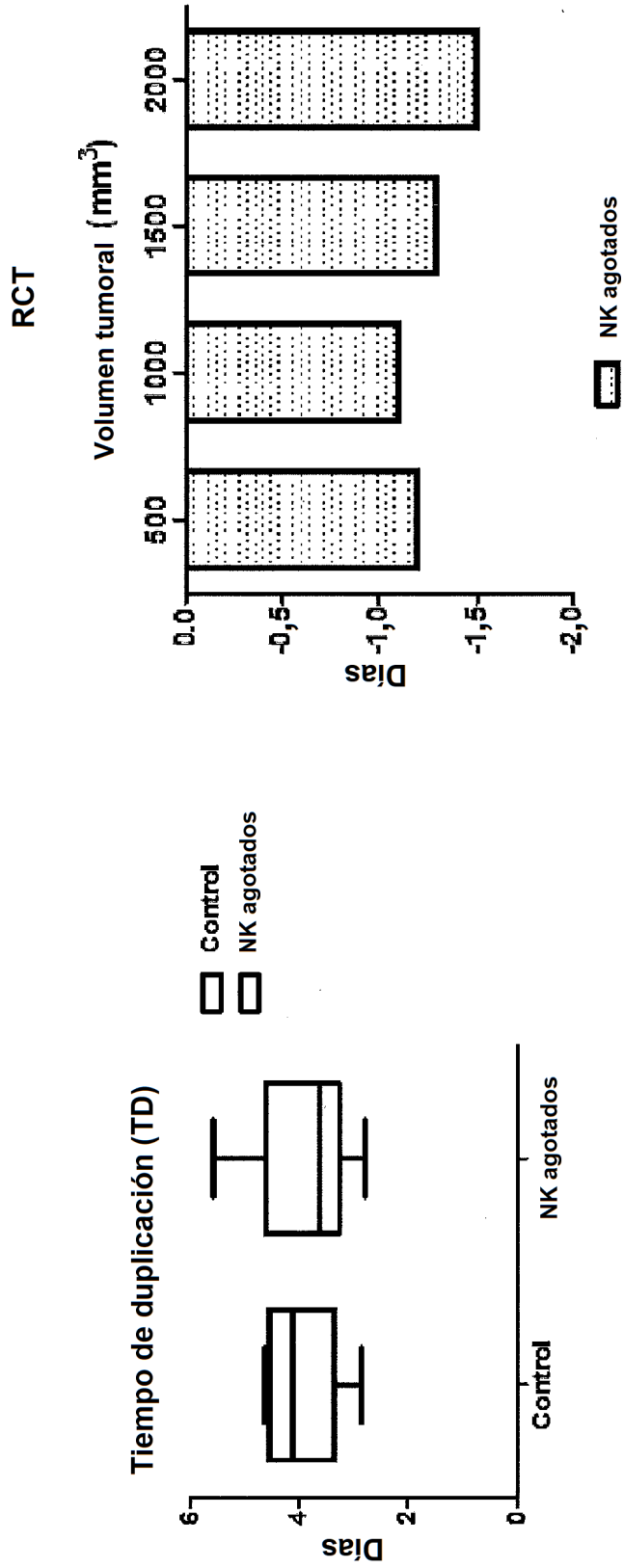
**Fig. 13**

Crecimiento dependiente de células de OPM-2 SC injertado en ratones KIRtg-Rag (curvas individuales). Se injertaron 5, 10 y 15x10<sup>6</sup> células OPM-2 SC en n = 8 ratones.



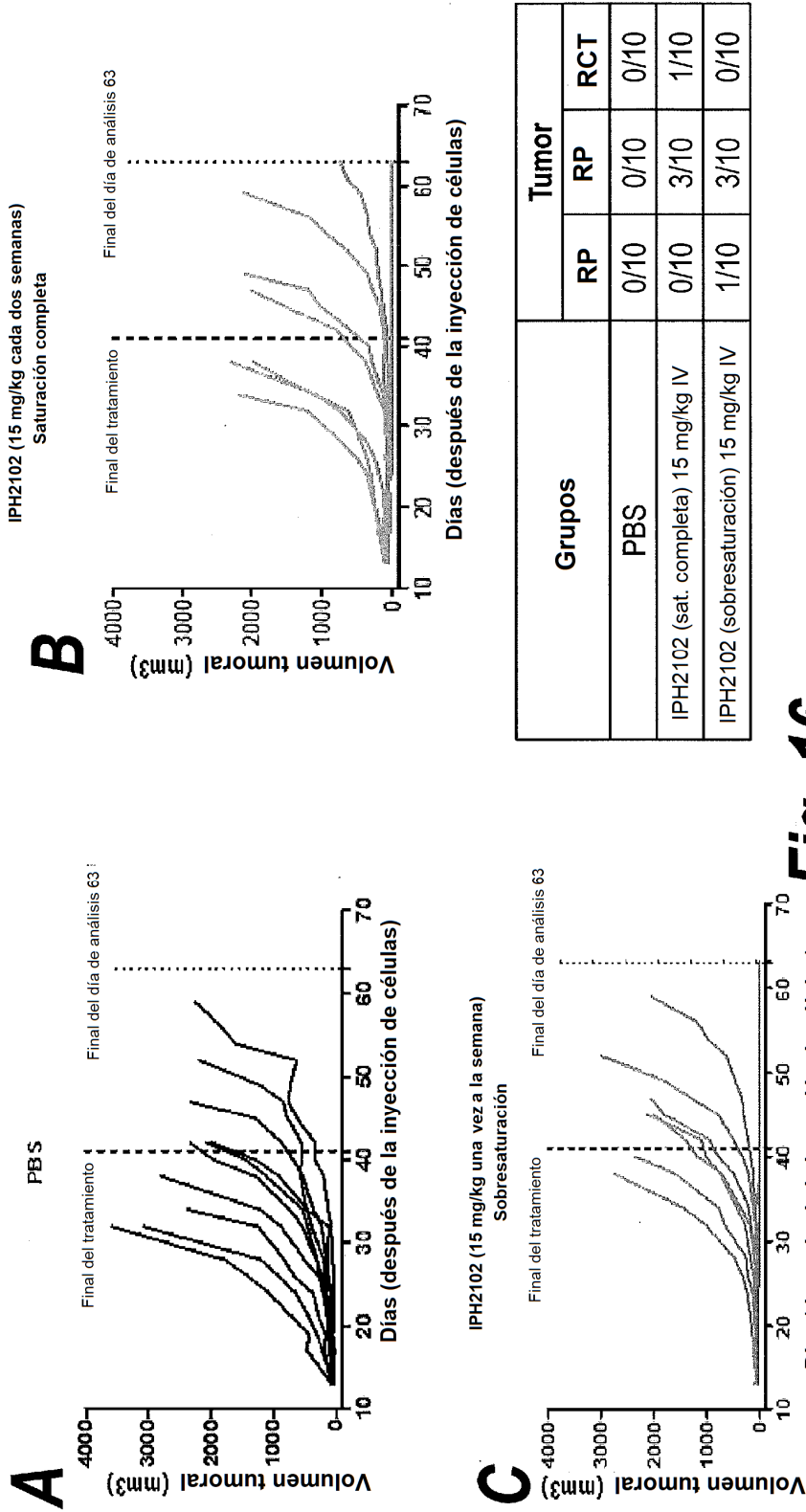
**Fig. 14**

Efecto del agotamiento de NK sobre el crecimiento de OPM-2 SC en ratones KIRtg-RAG (n = 10). Dos gráficos superiores: curvas individuales de ratones injertados SC con 5x10<sup>6</sup> OPM-2 sin (gráfico de la izquierda) o con (gráfico de la derecha) tratamiento anti-NK1.1. Gráfico inferior: superposición de curvas individuales de ambos grupos. La tabla representa los perfiles de la curva de crecimiento tumoral en cada grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).



**Fig. 15**

Panel derecho: Tiempo de duplicación (TD) del control y del grupo de NK agotados (n = 10).  
 Panel izquierdo: retraso del crecimiento tumoral (RCT) del grupo de NK agotados con respecto al grupo de control calculado en 4 volúmenes tumorales diferentes.



**Fig. 16**

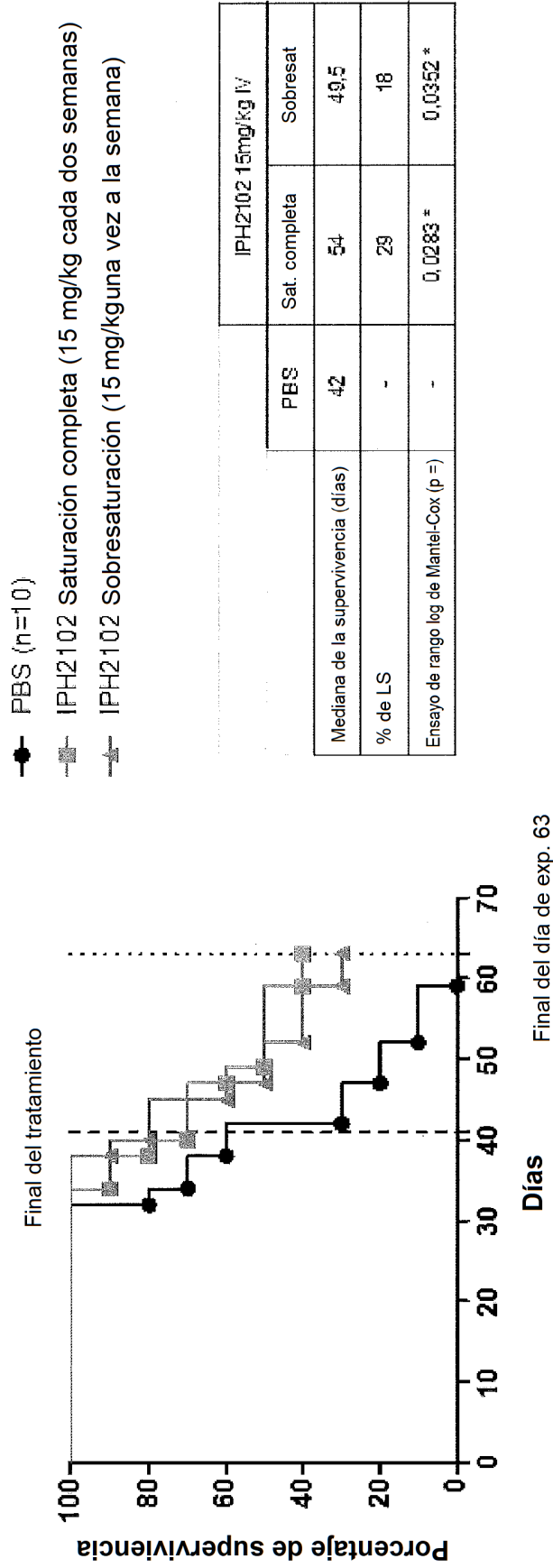
Actividad antitumoral de lirilumab (IPH2102) en ratones KIRtg-RAG injertados con 5x10<sup>6</sup> OPM-2 SC (n = 10).

A) Curvas individuales de animales tratados con PBS.

B) Curvas individuales de animales tratados con IPH2102 a una concentración que satura los receptores KIR.

C) Gráfico inferior derecho: curvas individuales de animales tratados con IPH2102 a una concentración superior a la concentración que satura los receptores KIR.

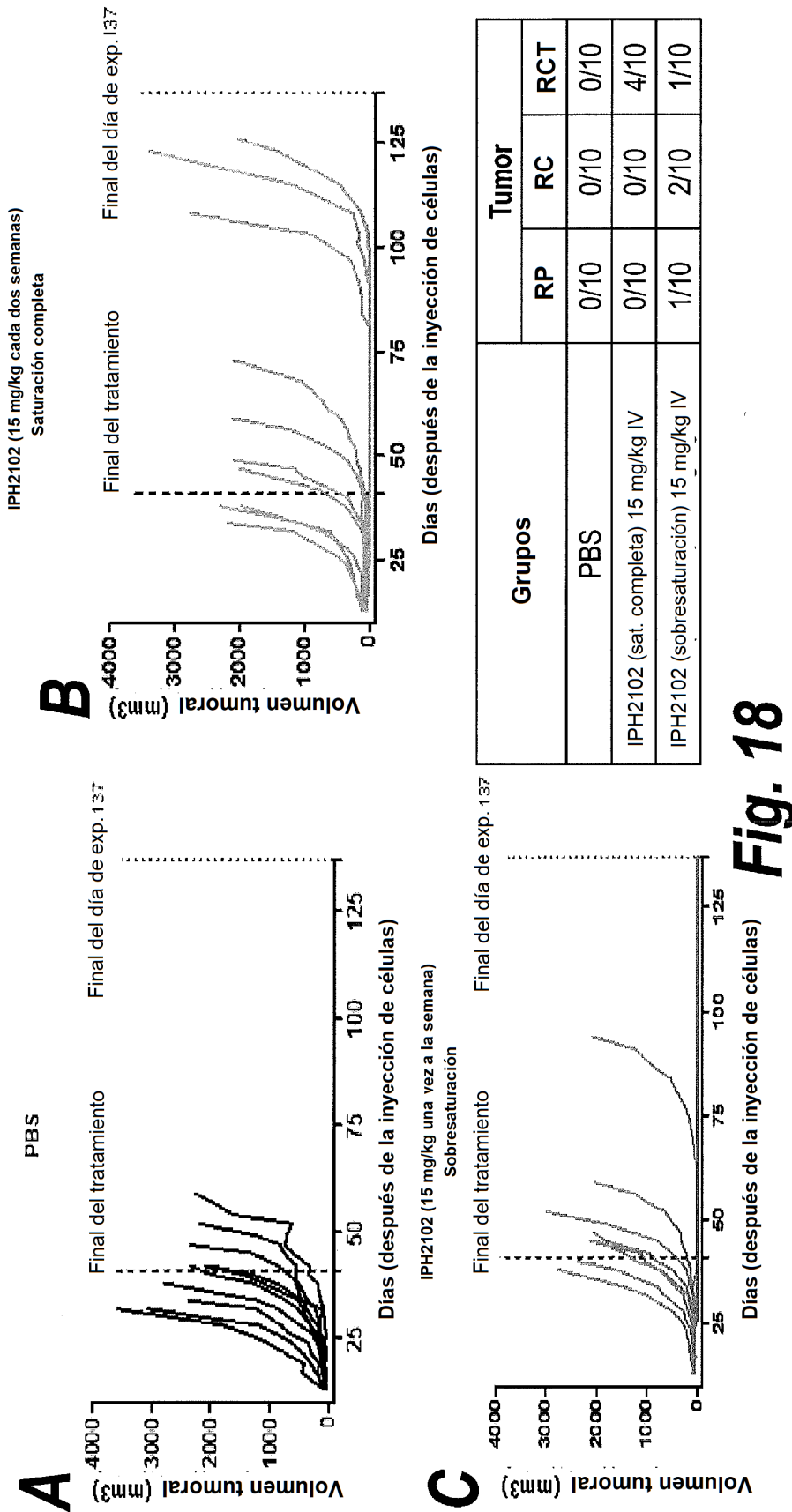
La tabla representa los perfiles de la curva de crecimiento tumoral en cada grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).



**Fig. 17**

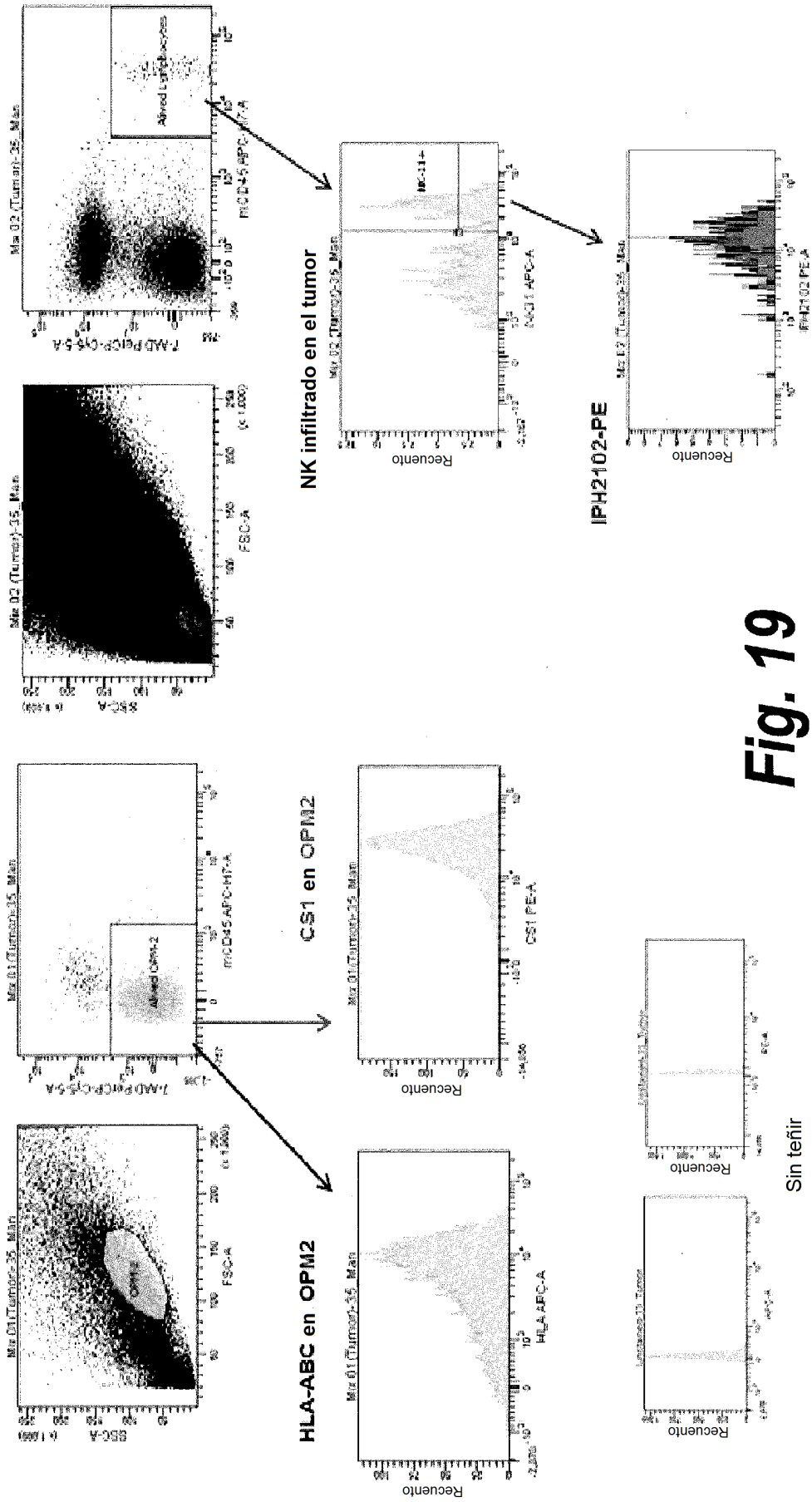
Eficacia de lirilumab sobre la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con 5x106 OPM-2 SC (n = 10).  
 Curvas de supervivencia de Kaplan Meier y análisis estadístico de Mantel-Cox





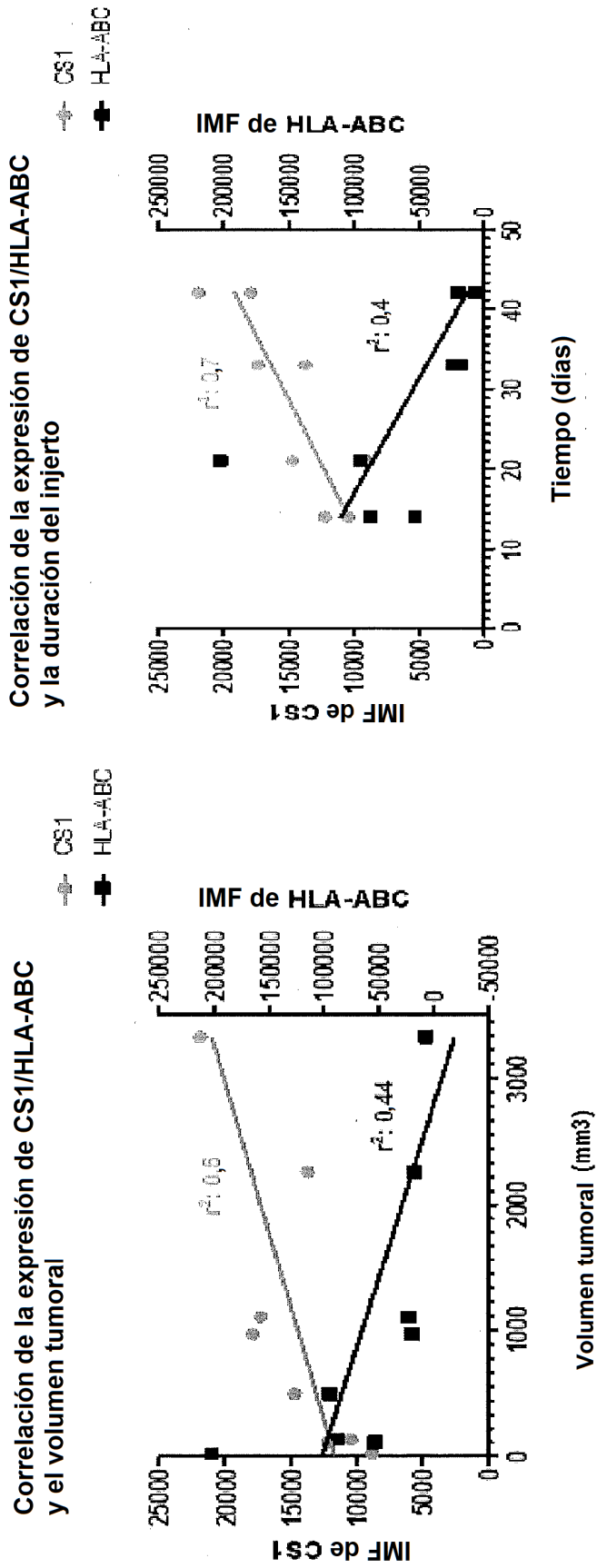
**Fig. 18**

Seguimiento hasta el día 137 de ratones KIRtg-RAG con regresión completa del tumor OPM-2 después del tratamiento con lirilumab (n = 10).  
 A) Curvas individuales de animales tratados con PBS.  
 B) Curvas individuales de animales tratados con IPH2102 a una concentración que satura los receptores KIR  
 C) Curvas individuales de animales tratados con IPH2102 a una concentración por encima de la concentración que satura los receptores KIR.  
 La tabla representa los perfiles de la curva de crecimiento del tumor hasta el día 137 en cada grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).



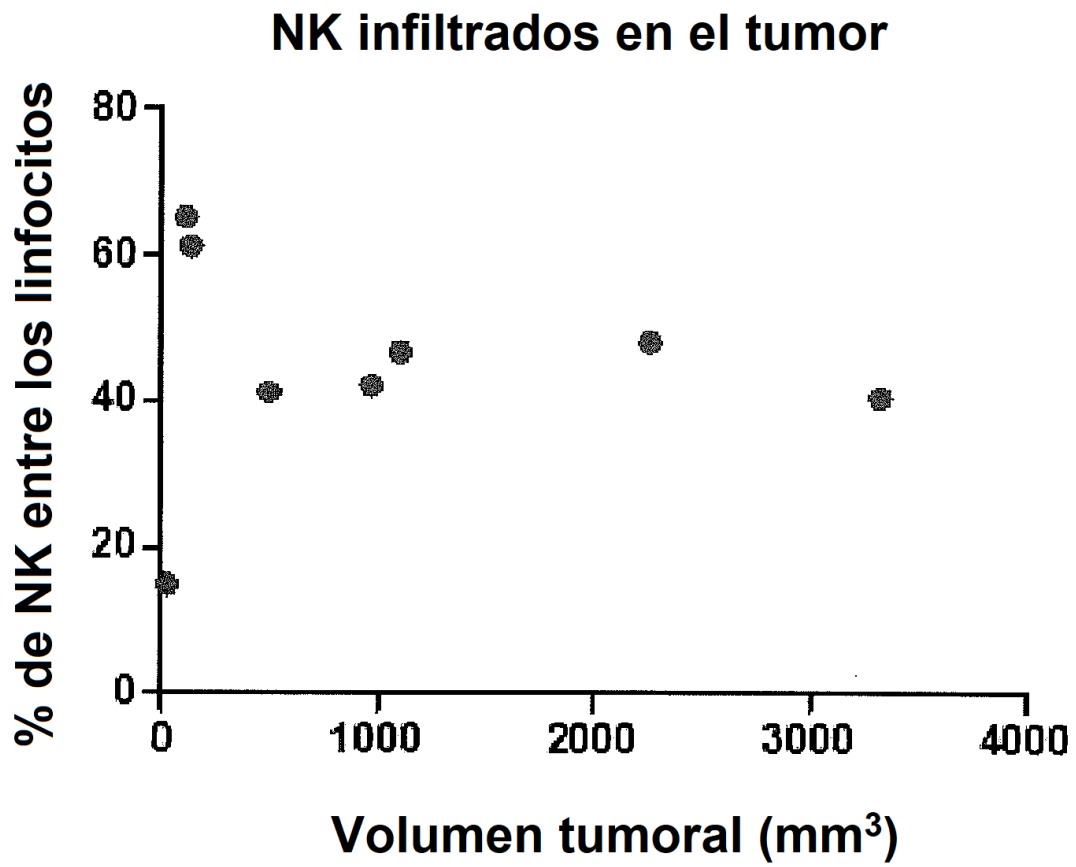
**Fig. 19**

: Estrategia de activación para OPM-2 y NK infiltrante de tumores. En ratones KIRtg-RAG, los linfocitos T y B están presentes pero no son funcionales debido a la falta de la enzima RAG. Los linfocitos se activan sobre la base de los parámetros FSC (dispersión lateral directa, por sus siglas en inglés) SSC (dispersión lateral, por sus siglas en inglés) y después se discriminan en su expresión de mCD45



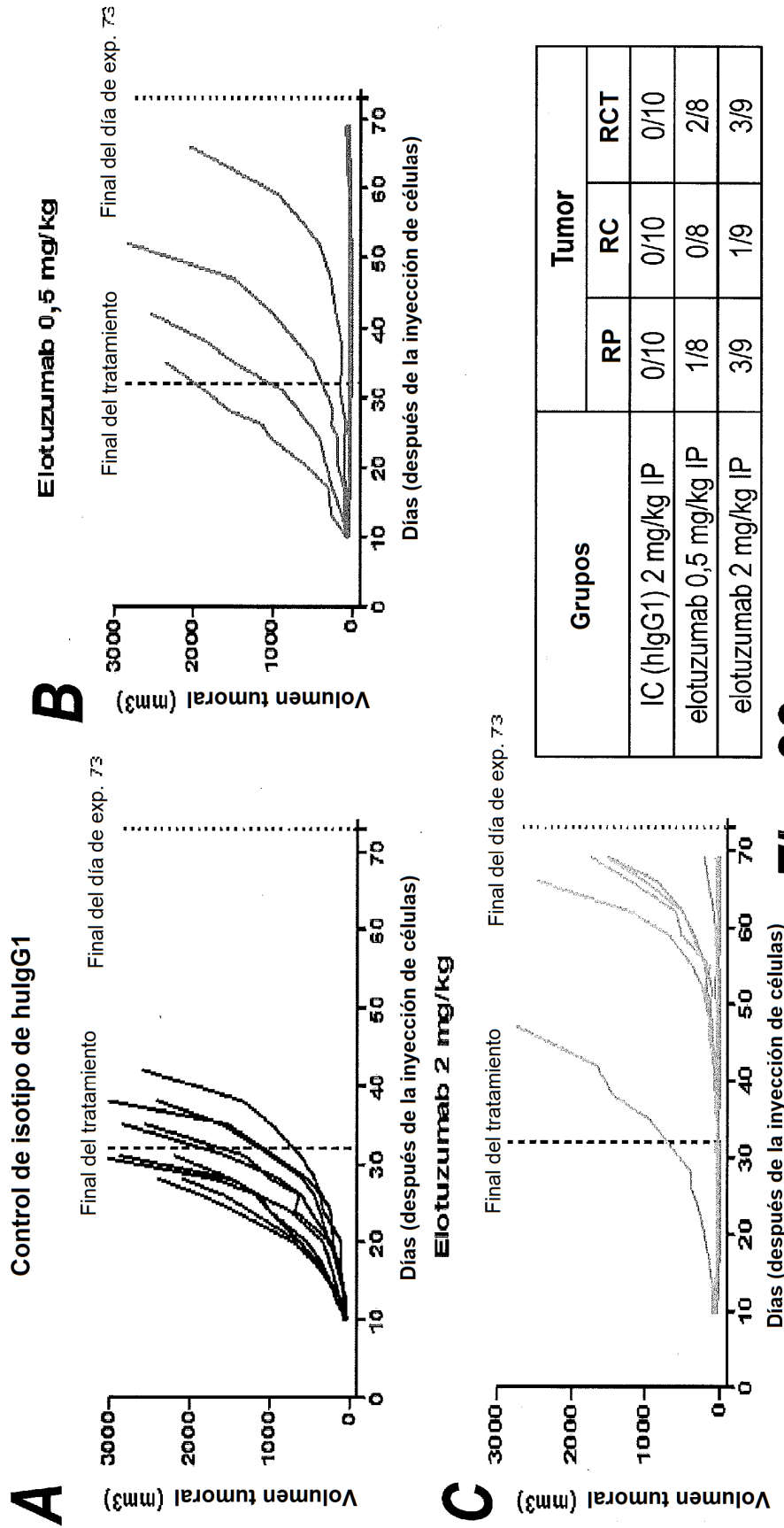
**Fig. 20**

Correlación entre la expresión de CS1 y Clase I y el volumen tumoral (gráfico de la izquierda) o el tiempo posterior al injerto ( gráfico de la derecha).



***Fig. 21***

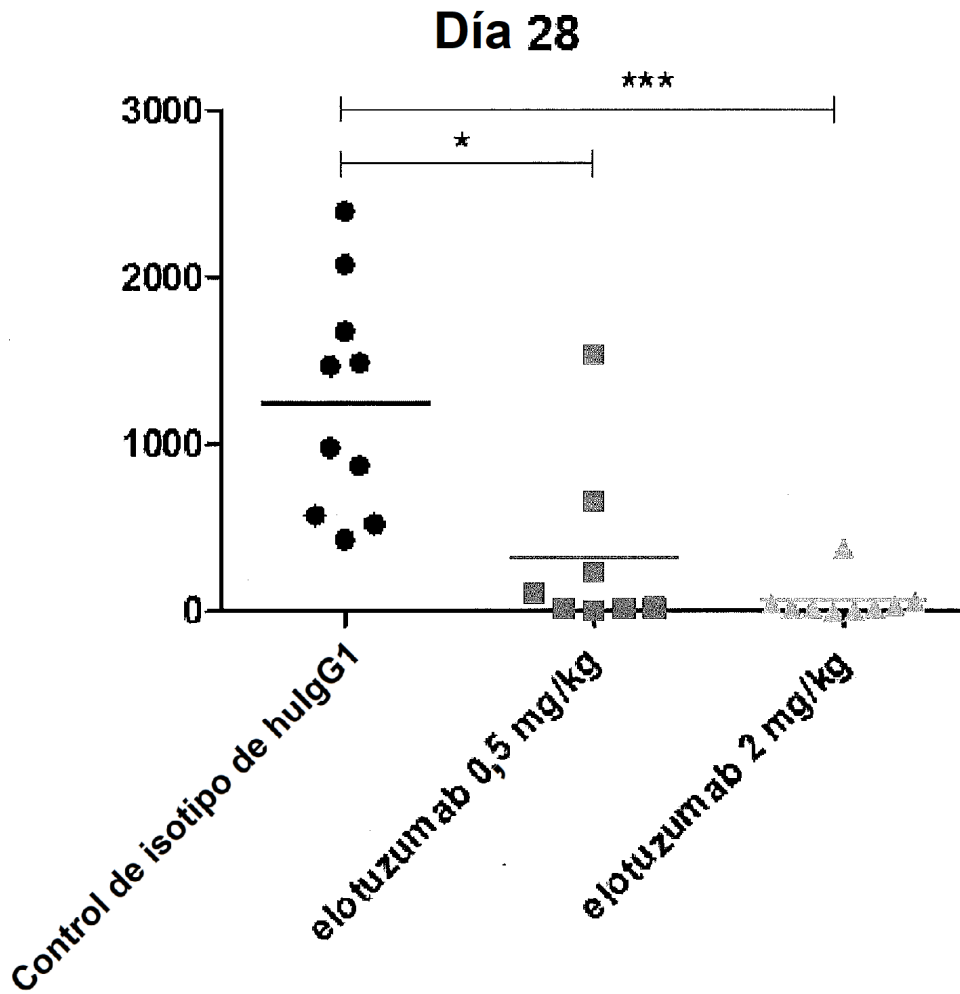
Correlación entre los NK Infiltrados en el tumor y el volumen tumoral.



**Fig. 22**

Actividad antitumoral de elotuzumab en ratones KIRtg-RAG injertados con 5x10<sup>6</sup> OPM-2 SC.

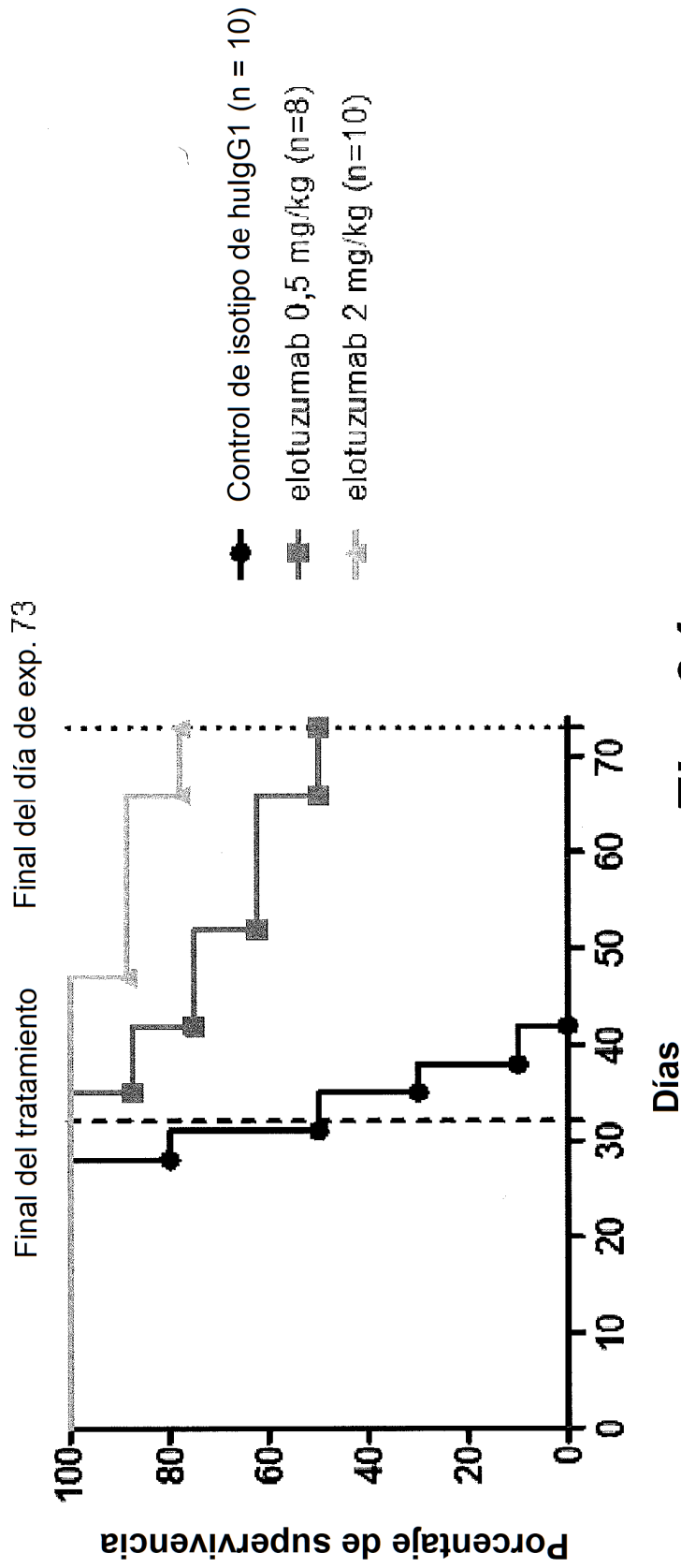
- A) Curvas individuales de animales tratados con hulgG1 IP (n = 10)
  - B) Curvas individuales de animales tratados con elotuzumab a una dosis de 0,5 mg/kg IP (n = 8)
  - C) Curvas individuales de animales tratados con elotuzumab a una dosis de 2 mg/kg de IP (n = 9)
- La tabla representa los perfiles de la curva de crecimiento tumoral en cada grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).



**Fig. 23**

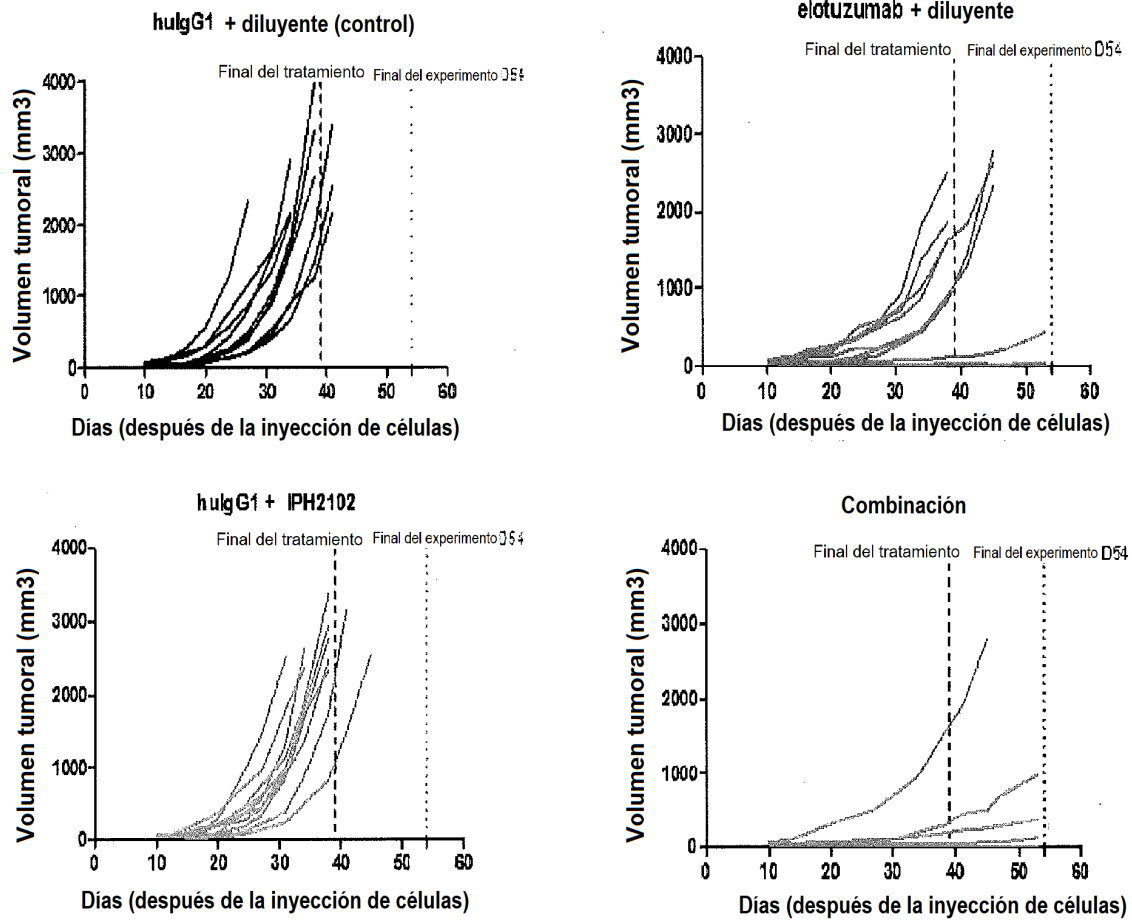
Comparación de los grupos tratados con elotuzumab con el control en el día 28 después del injerto.

Los datos se expresan como volumen tumoral individual y mediana. hulgG1 IP n = 10; elotuzumab 0,5 mg/kg IP n = 8; elotuzumab 2 mg/kg IP n = 9. Análisis estadístico: ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un ensayo de comparación múltiple de Dunn. \* para p <0,05; \*\* para p <0,01



**Fig. 24**

: Eficacia de elotuzumab en la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con 5x10<sup>6</sup> OPM-2 SC. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier, no puede determinarse la mediana de la supervivencia. hulG1 IP n = 10; elotuzumab 0,5 mg/kg IP n = 8; elotuzumab 2 mg/kg IP n = 9



Grupos	Tumor		
	RP	RC	RCT
hlgG1 0,5mg/kg IP + Diluyente IPH2102 IV	0/10	0/10	0/10
elotuzumab 0,5mg/kg IP + Diluyente IPH2102 IV	1/10	1/10	1/10
hlgG1 0,5mg/kg IP + IPH2102 15mg/kg IV	0/10	0/10	0/10
elotuzumab 0,5mg/kg IP + IPH2102 15mg/kg IV	1/10	6/10	0/10

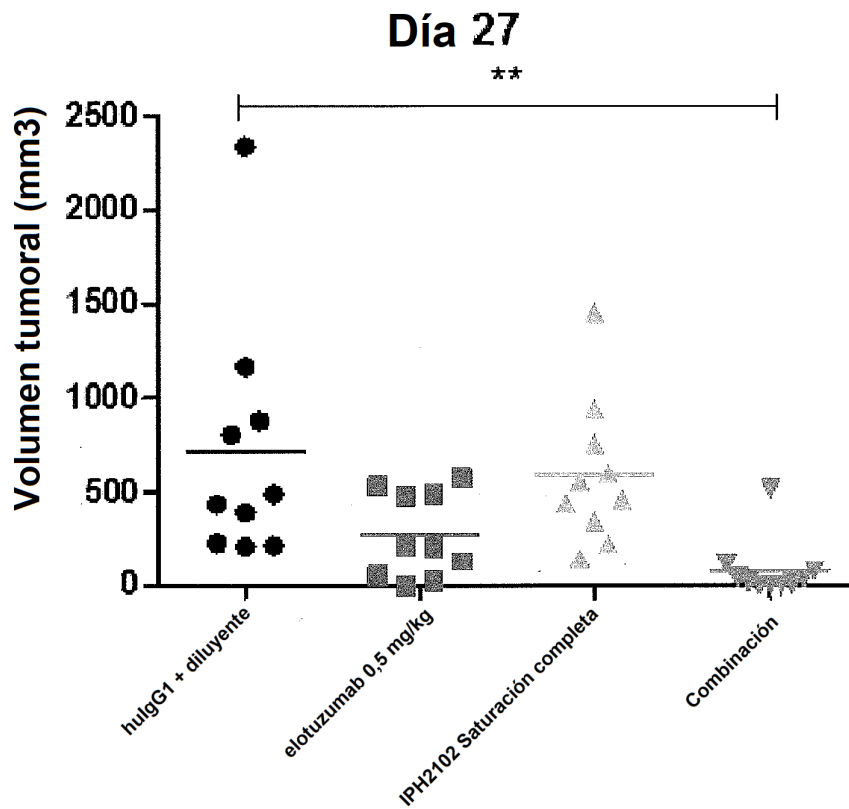
**Fig. 25**

Actividad combinada de elotuzumab y lirlumab (IPH2102) en ratones KIRtg-RAG injertados con 5x10<sup>6</sup> OPM-2 SC (n = 10).

Gráfico superior izquierdo: curvas individuales de animales tratados con hulgG1 IP + diluyente IV. Gráfico superior derecho: curvas individuales de animales tratados con elotuzumab 0,5 mg/kg IP + diluyente IV. Gráfico inferior izquierdo: curvas individuales de animales tratados con hulgG1 IP + IPH2102 "sat. completa" 15mg/kg IV. Gráfico inferior derecho: curvas individuales de animales tratados con elotuzumab 0,5 mg/kg IP + IPH2102 "sat. completa" 15mg/kg IV.

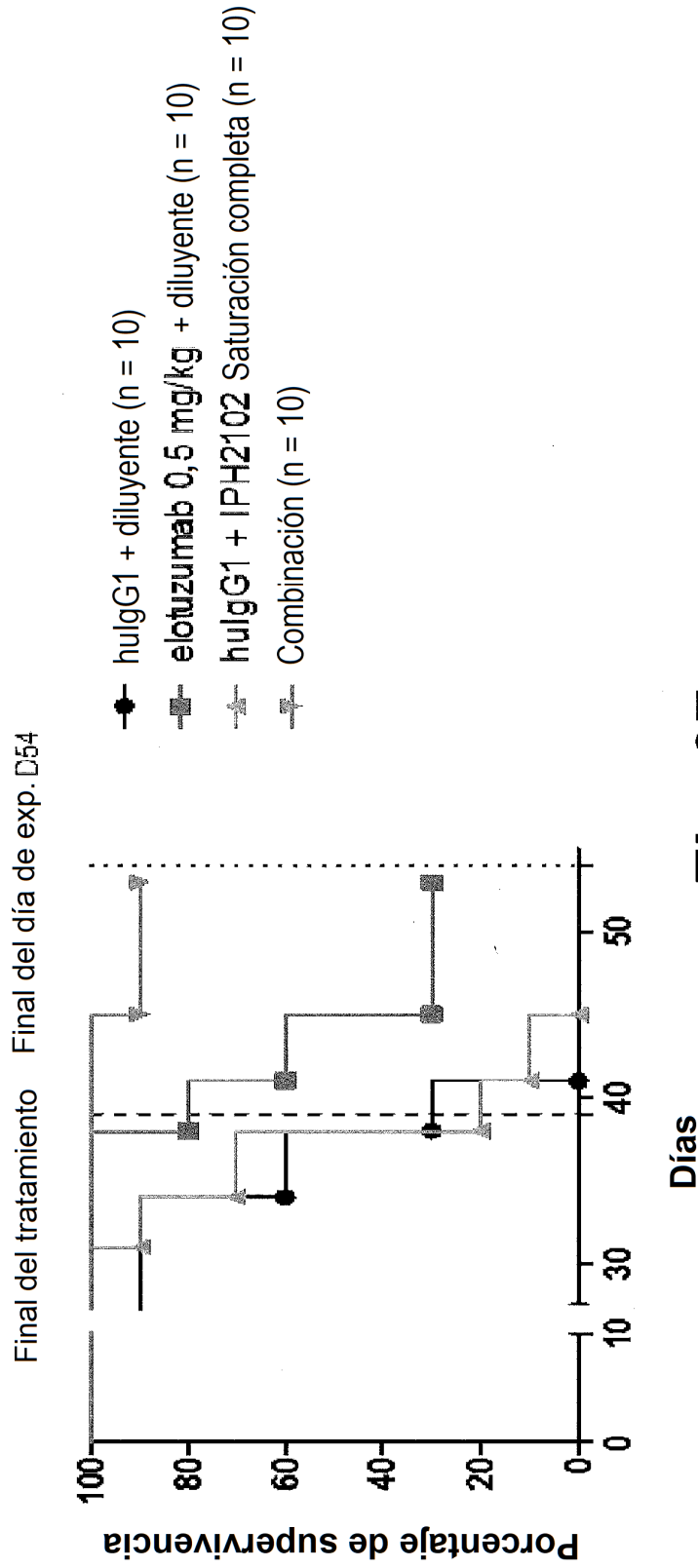
La tabla representa los perfiles de la curva de crecimiento tumoral en cada grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).





**Fig. 26**

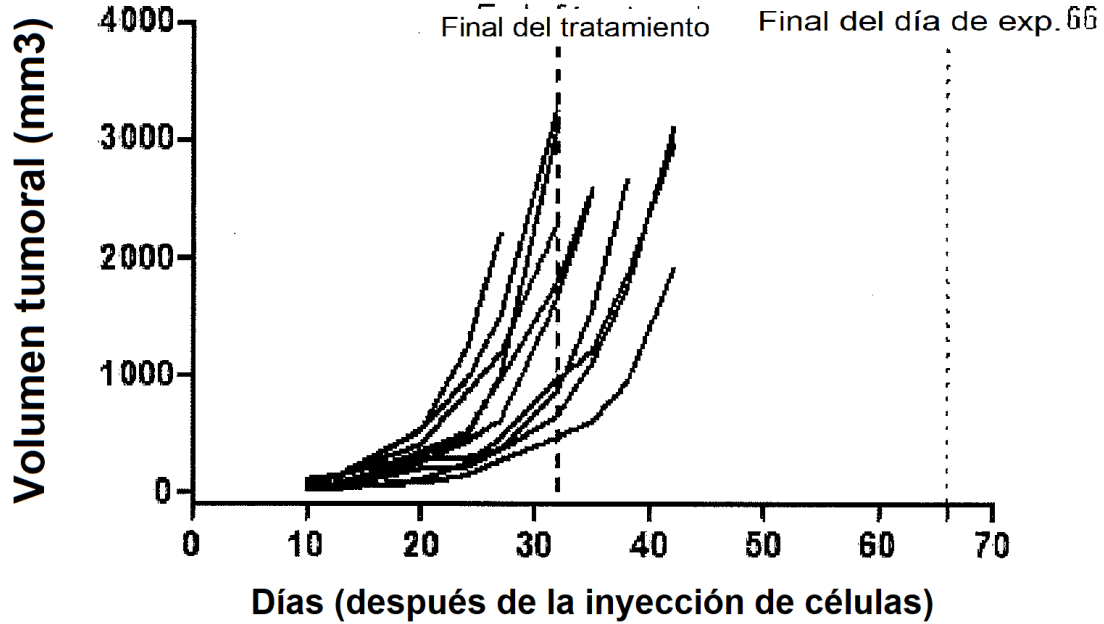
Comparación de elotuzumab, IPH2102 y los grupos tratados combinados con el control el día 27 después del injerto. Los datos se expresan como volumen tumoral individual y mediana. Análisis estadístico: ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un ensayo de comparación múltiple de Dunn. \*\* para  $p < 0,01$



**Fig. 27**

Eficacia de elotuzumab, IPH2102 y tratamientos combinados en la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con 5x106 OPM-2. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier.

**hulgG1 + diluyente (control)**



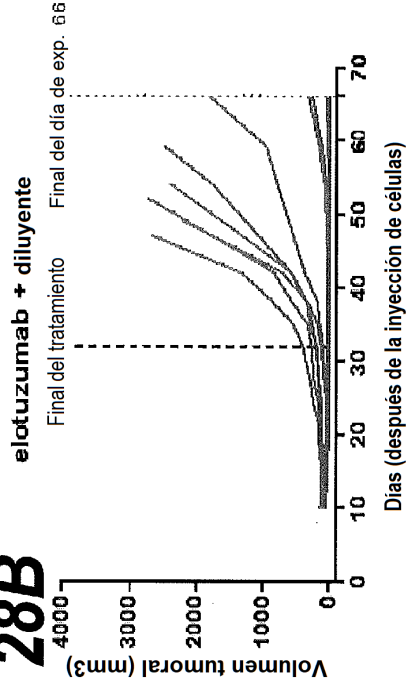
**Fig. 28A**

Implicación de NK en la actividad combinada de elotuzumab y lirilumab (IPH2102) en ratones KIRtg-RAG injertados con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC (n = 10)

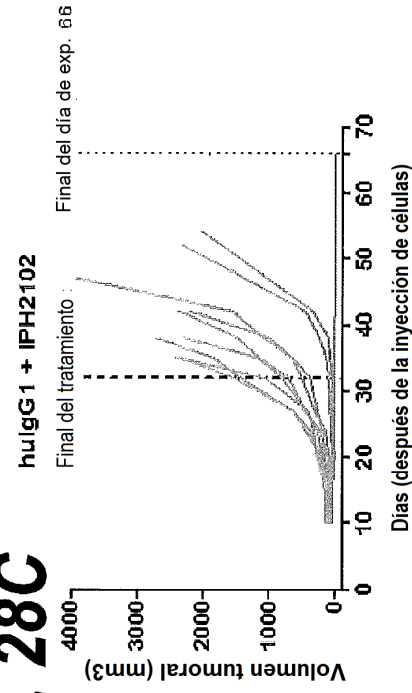
**A:** curvas de animales tratados con hulgG1 IP + diluyente IV

La tabla representa los perfiles de curva de crecimiento tumoral en cada grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).

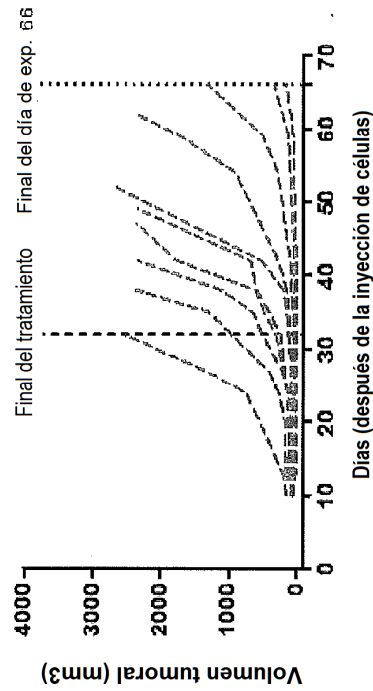
**FIG. 28B**



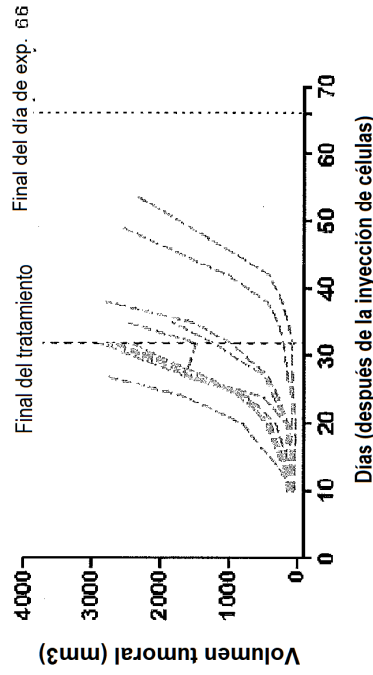
**FIG. 28C**



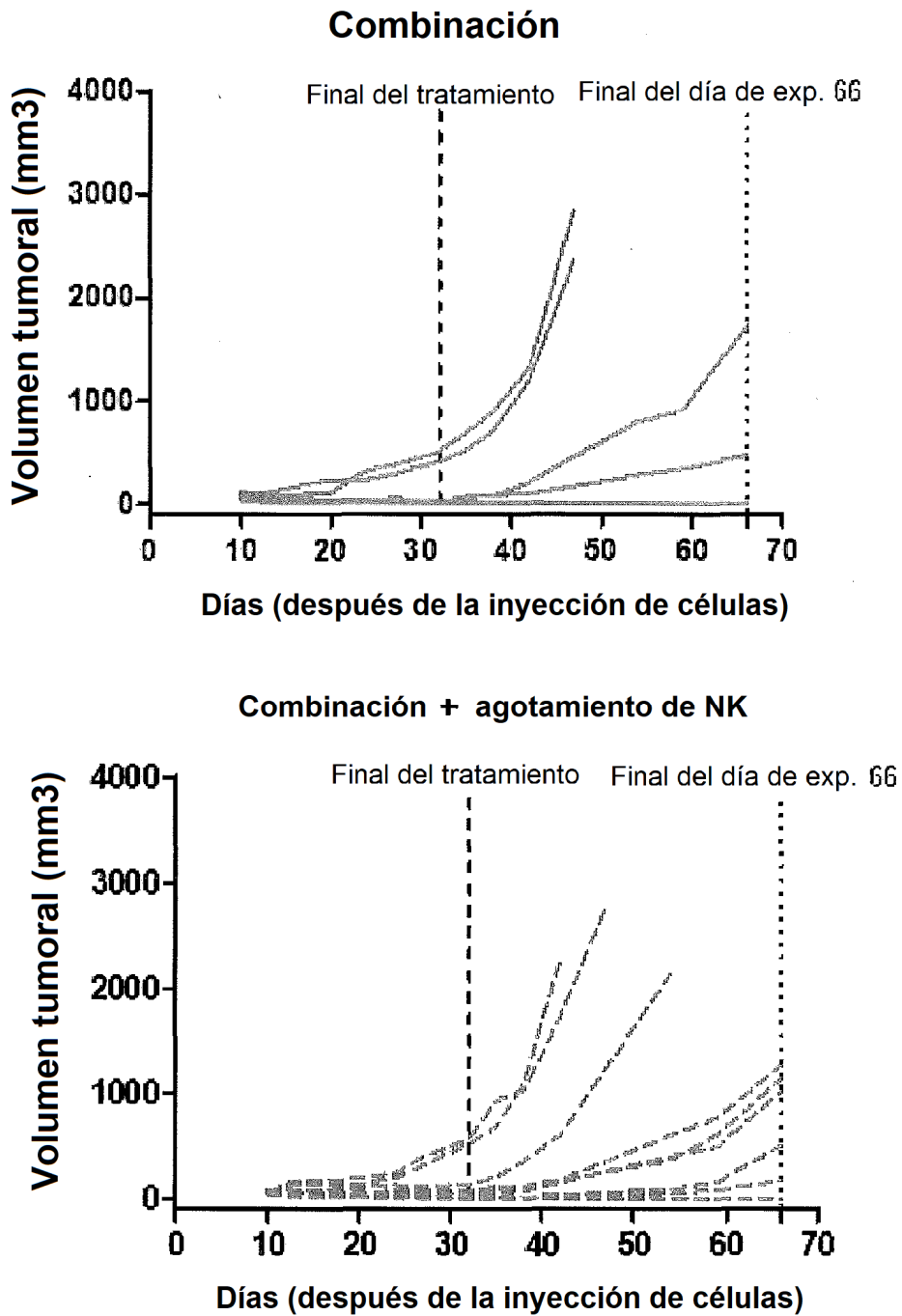
**Elotuzumab + diluyente + agotamiento de NK**



**hulG1 + IPH2102 + agotamiento de NK**



Implicación de NK en la actividad combinada de elotuzumab y lirilumab (IPH2102) en ratones KIRtg-RAG injertados con 5x10<sup>6</sup> OPM-2 SC (n = 10).  
**B:** Curvas individuales de animales tratados con elotuzumab IP 0,5 mg/kg + diluyente IV sin (gráfico superior) o con (gráfico inferior) tratamiento anti-NK1.1.  
**C:** curvas individuales de animales tratados con hulG1 IP + IPH2102 15mg/kg "sat. completa" IV sin (gráfico superior) o con (gráfico inferior) tratamiento anti-NK1.1.  
 La tabla representa los perfiles de la curva de crecimiento tumoral en cada grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).

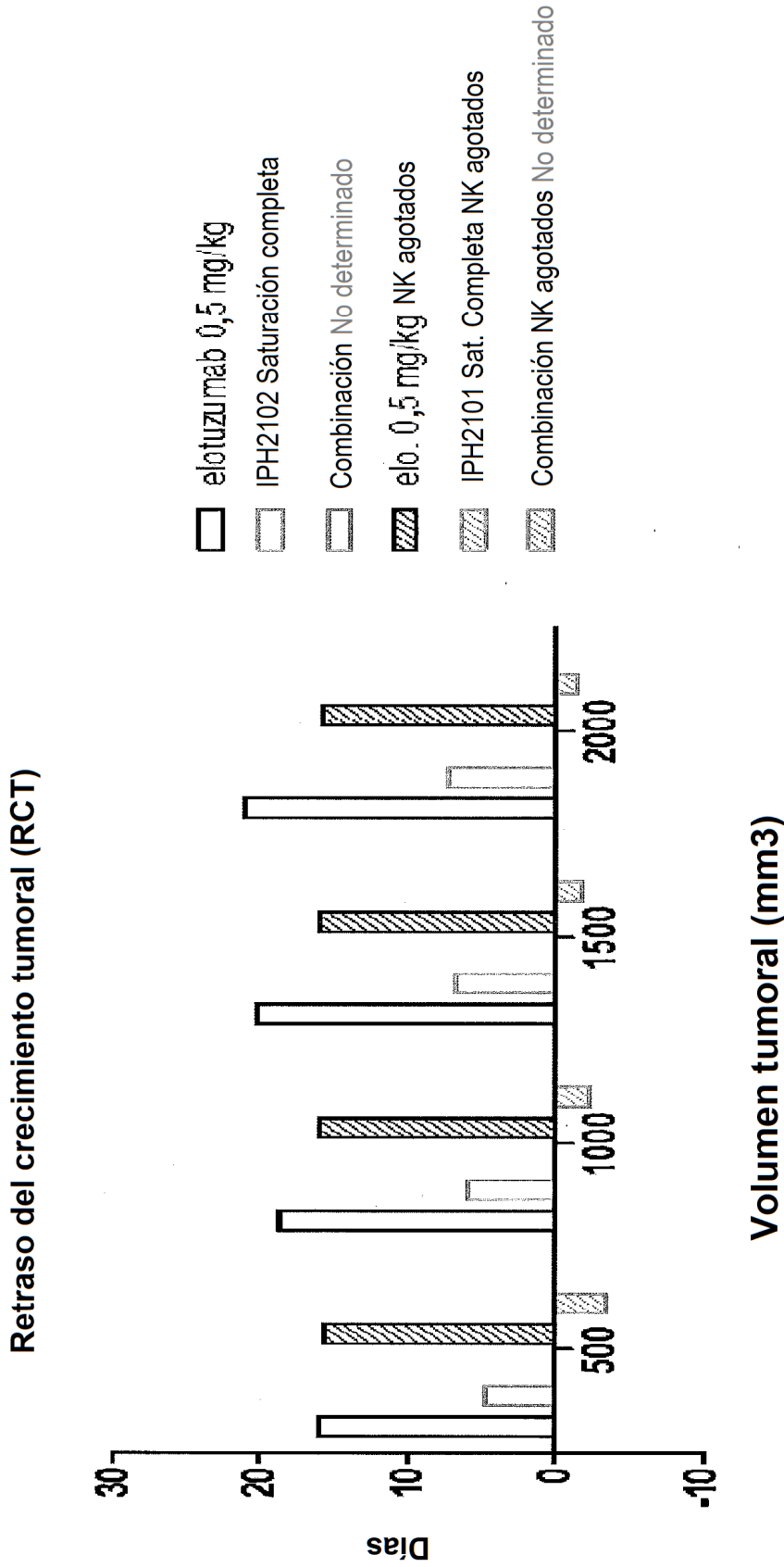


**Fig. 28D**

Implicación de NK en la actividad combinada de elotuzumab y lirilumab (IPH2102) en ratones KIRtg-RAG injertados con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC (n = 10).

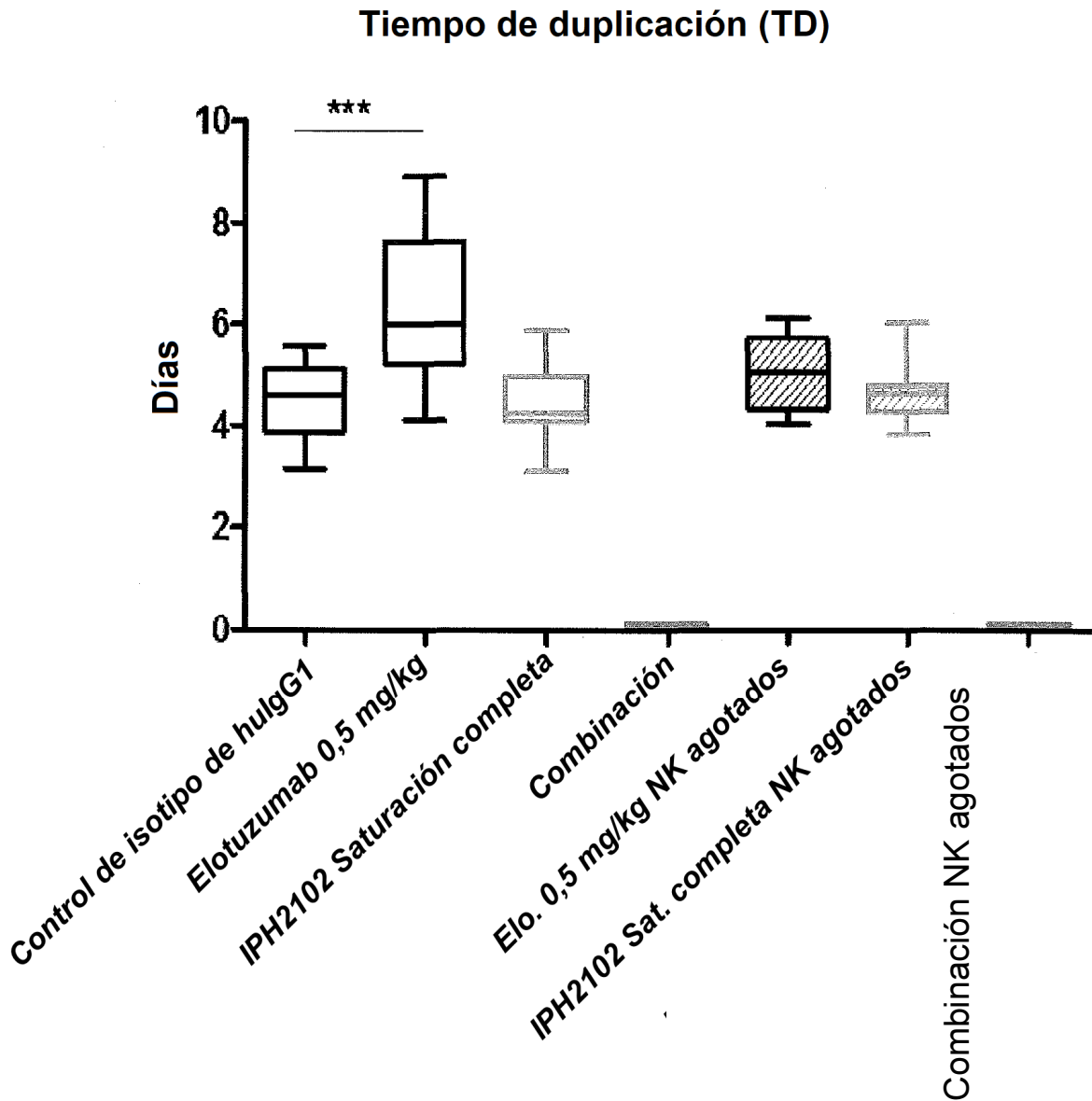
**D:** curvas individuales de animales tratados con elotuzumab 0,5 mg/kg IP + IPH2102 "sat. completa" 15 mg/kg IV sin (gráfico superior) o con (gráfico inferior) tratamiento anti-NK1.1.

La tabla representa los perfiles de curva de crecimiento tumoral en cada uno grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).



**Fig. 29**

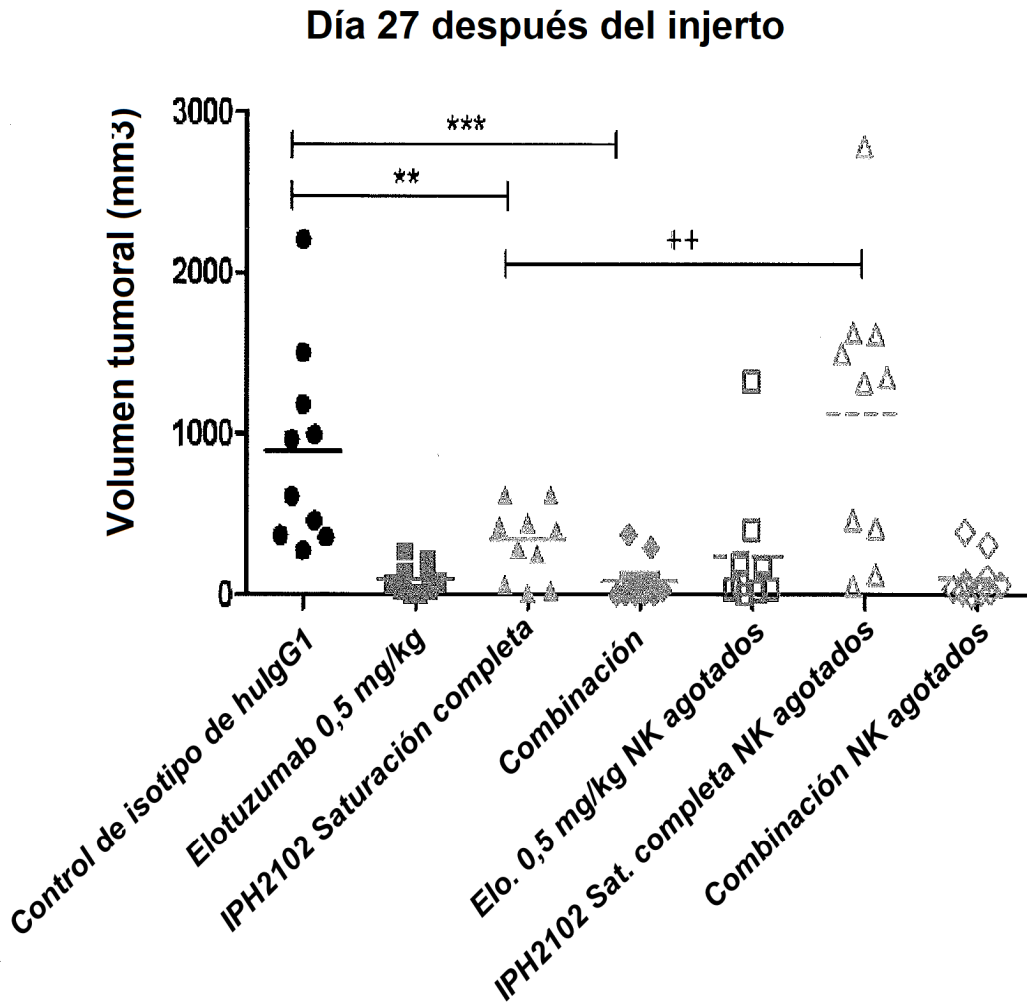
Retraso del crecimiento tumoral de los diferentes grupos tratados con respecto al control (hulgG1 + diluyente) calculado en 4 volúmenes tumorales predeterminados. Para elotuzumab y IPH2102, RCT se calculó con n = 8 ratones



**Fig. 30**

Tiempo de duplicación de los diferentes grupos tratados.

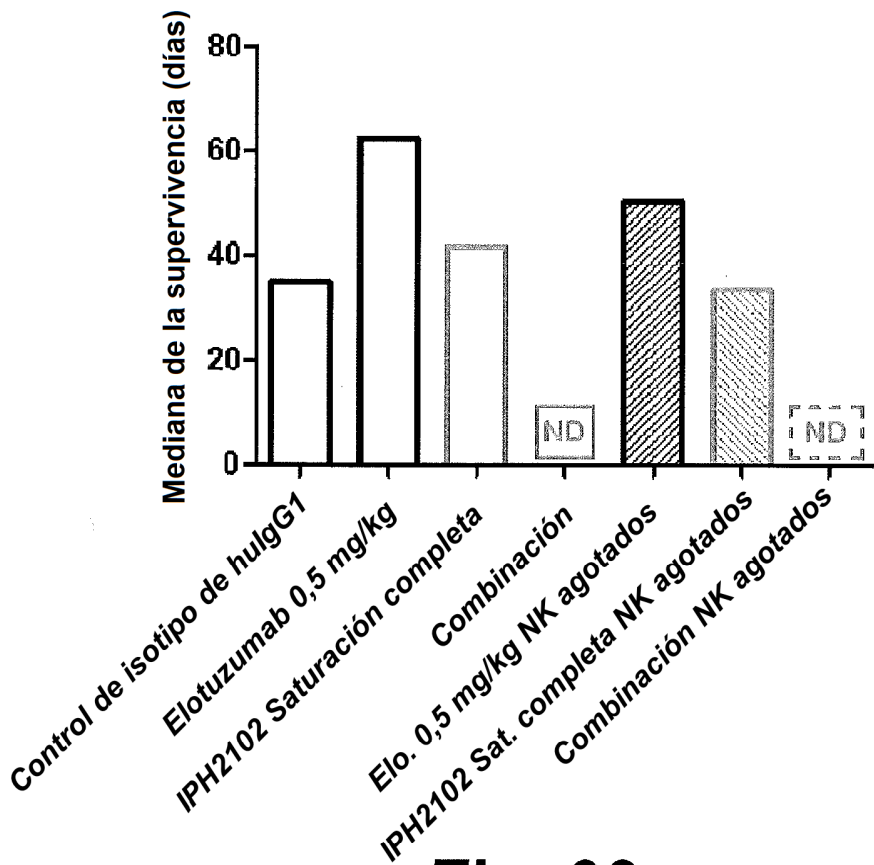
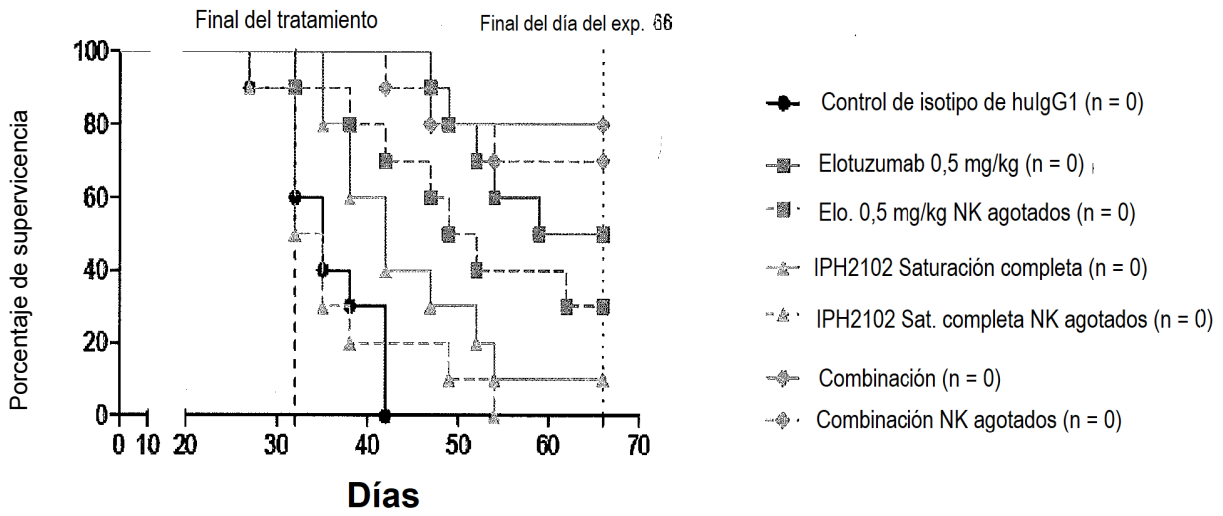
Los diagramas de caja indican la mediana con los cuartiles segundo y tercero. Las líneas indican valores mínimos y máximos. El TD para la combinación no pudo determinarse, Análisis estadístico: ANOVA de una vía +ensayo de comparación múltiple de Dunnett.



**Fig. 31**

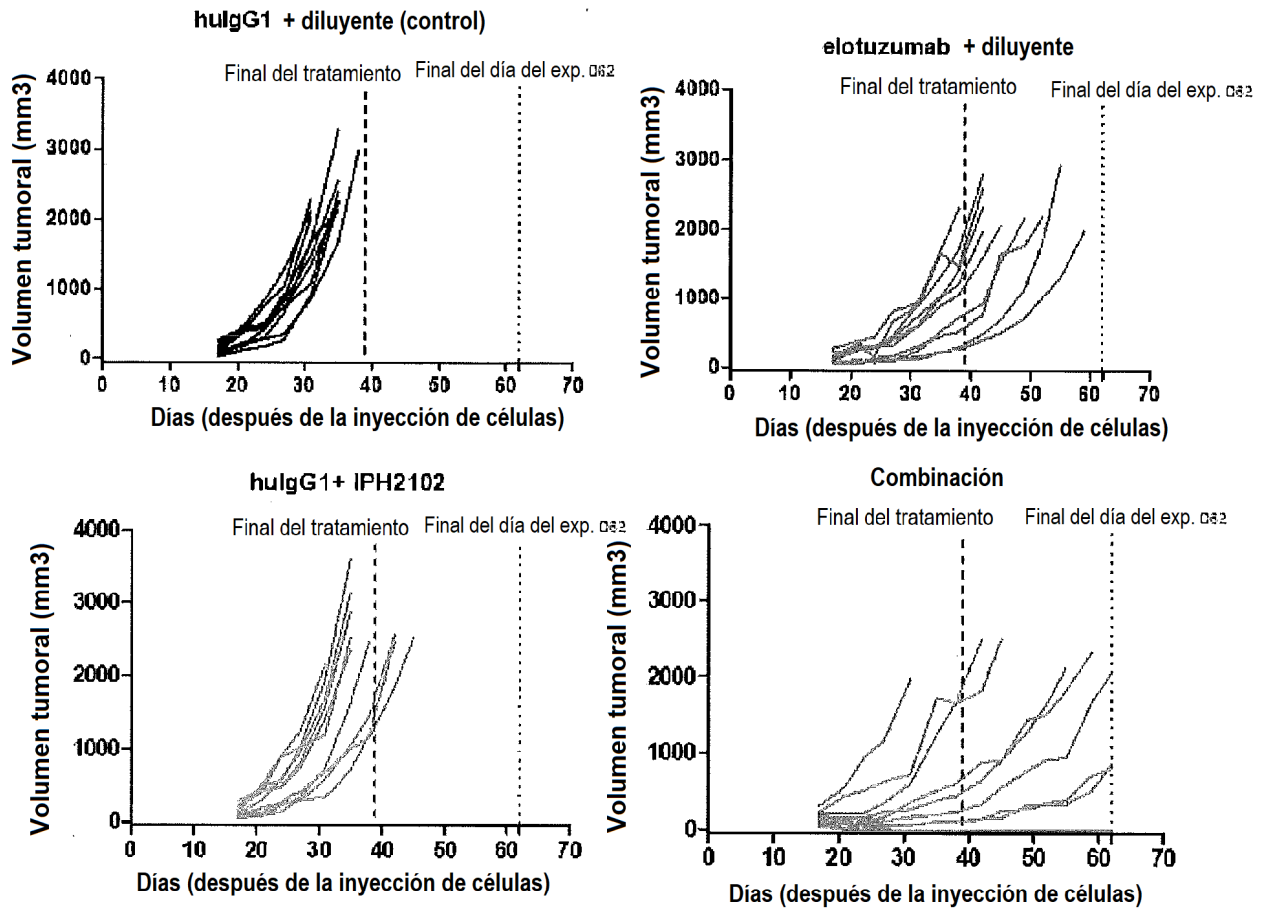
Comparación de los diferentes grupos tratados el día 27 después del injerto. Los datos se expresan como volumen y mediana del tumor individual. Análisis estadístico: todos los grupos se compararon con el control con un ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un ensayo de comparación múltiple de Dunn. \*\* para  $p < 0,01$ . Los grupos de NK agotados se compararon con sus grupos no agotados correspondientes con ensayos para muestras independientes ++  $< 0,05$





**Fig. 32**

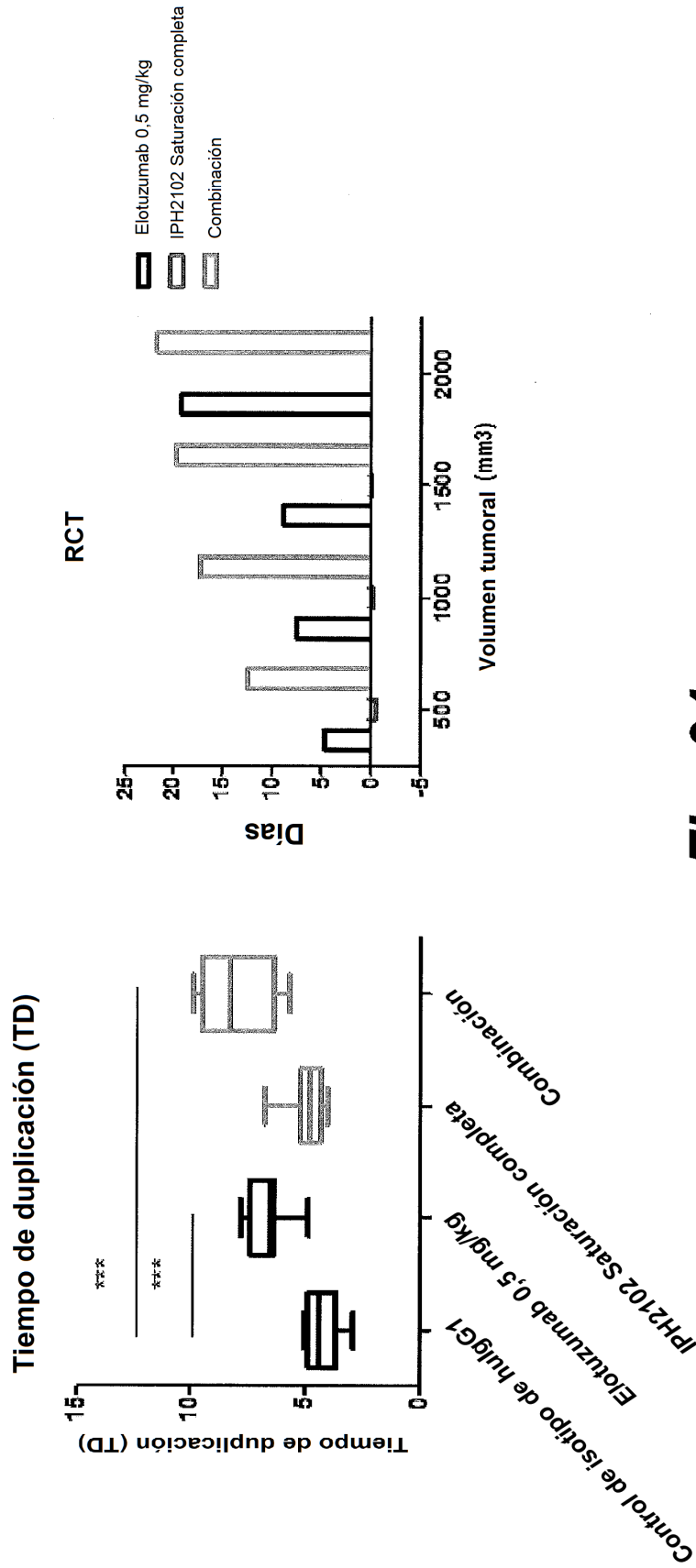
Implicación de NK en la actividad combinada de elotuzumab, IPH2102 y tratamiento combinado en la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con  $5 \times 10^6$  OPM-2 SC. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier (n = 10). Análisis de las curvas de supervivencia de Kaplan Meier y de la mediana de la supervivencia.



Grupos	Tumor		
	RP	RC	RCT
hlgG1 0,5mg/kg IP + Diluyente IPH2102 IV	0/10	0/10	0/10
Elotuzumab 0,5mg/kg IP + Diluyente IPH2102 IV	0/10	0/10	0/10
hlgG1 0,5mg/kg IP + IPH2102 15mg/kg IV	0/10	0/10	0/10
Elotuzumab 0,5mg/kg IP + IPH2102 15mg/kg IV	0/10	2/10	0/10

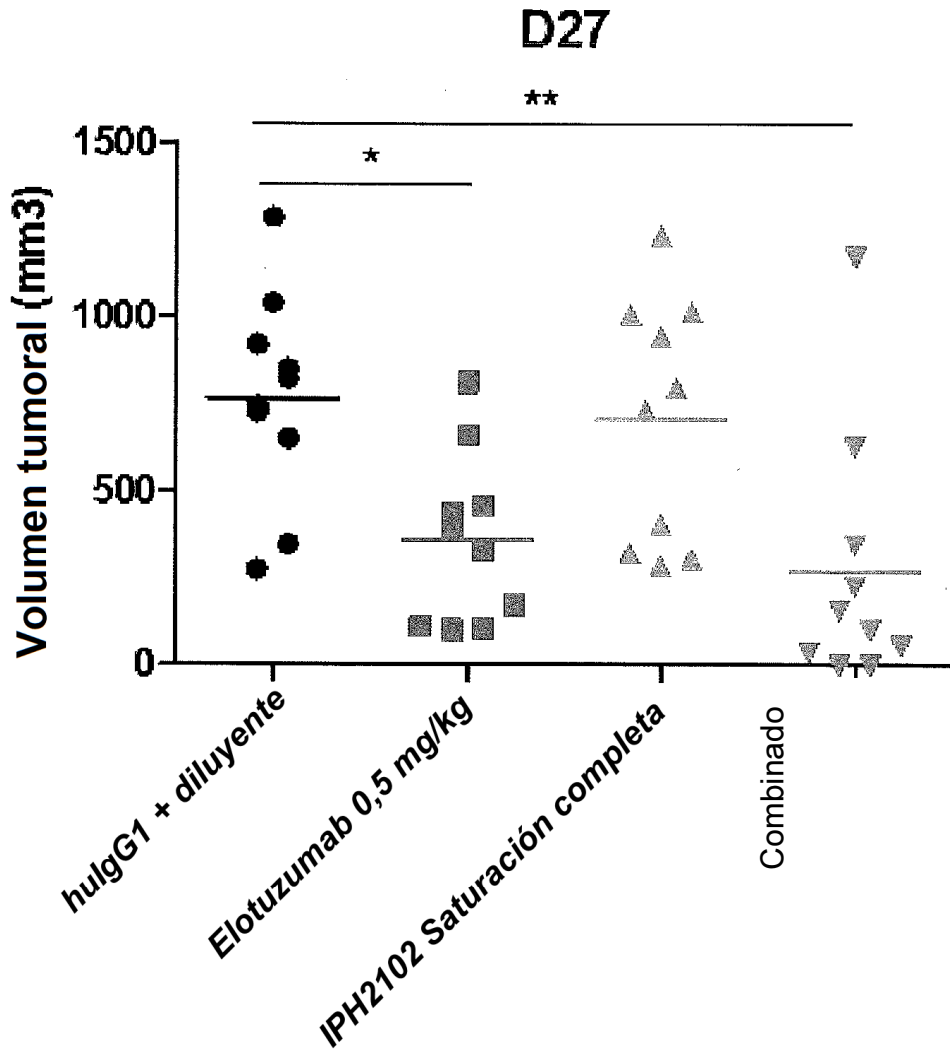
**Fig. 33**

Actividad combinada de elotuzumab y lirilumab (IPH2102) en volumen tumoral alto en ratones KIRtg-RAG injertados con 5x10<sup>6</sup> OPM-2 SC (n = 10). Gráfico izquierdo superior: curvas individuales de los animales tratados con hulgG1 IP + diluyente. Gráfico superior derecho: curvas individuales de animales tratados con elotuzumab 0,5 mg/kg IP + diluyente IV. Gráfico inferior izquierdo: curvas individuales de animales tratados con hulgG1 IP + IPH2102 "sat. completa" 15mg/kg IV. Gráfico inferior derecho: curvas individuales de animales tratados con elotuzumab 0,5 mg/kg IP + IPH2102 15 mg/kg IV. La tabla representa los perfiles de la curva de crecimiento tumoral en cada grupo: regresión parcial (RP), regresión completa (RC) y regresión completa temporal (RCT).



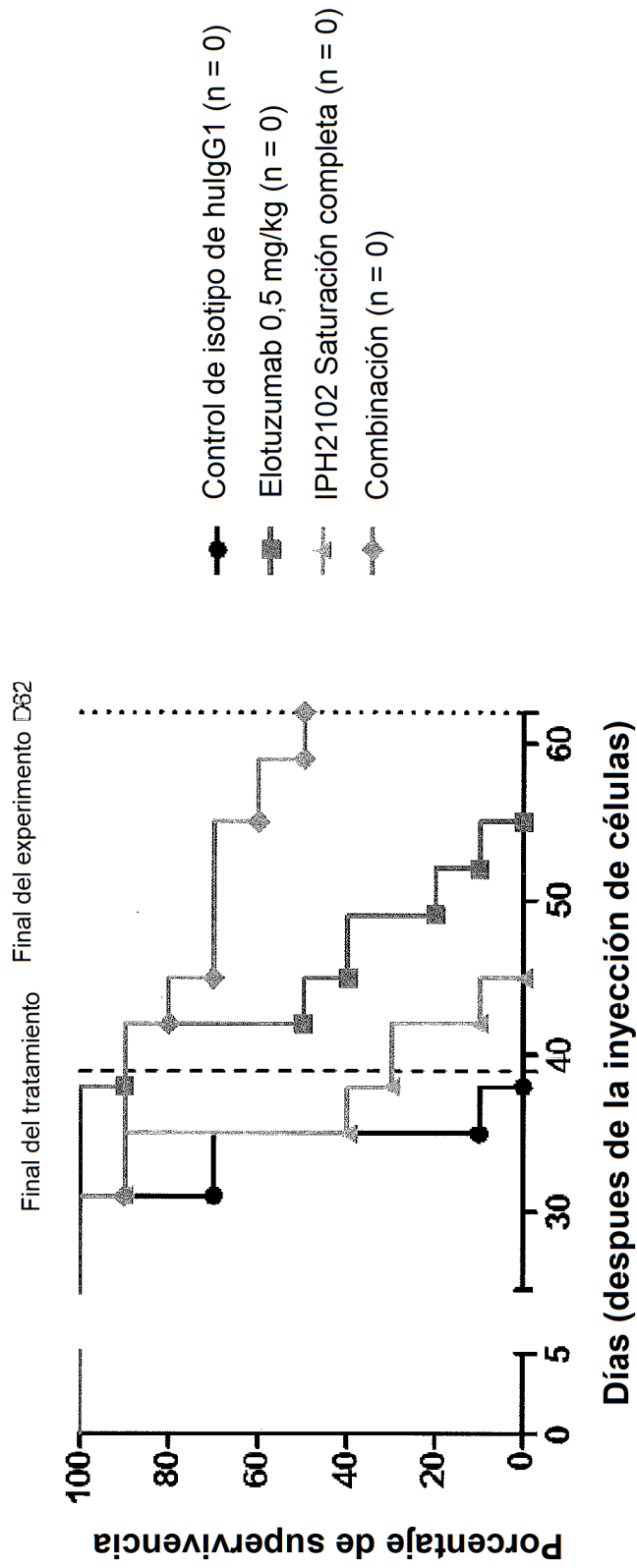
**Fig. 34**

Tiempo de duplicación y retraso en el crecimiento tumoral de los diferentes grupos tratados con respecto al control (hu1g1 + diluyente) calculados en 4 volúmenes de tumor predeterminados. Para el grupo combinado el TD se calculó con n = 8 ratones. Los diagramas de caja indican la mediana con los cuartiles segundo y tercero. Las líneas indican los valores mín. y máx. Análisis estadístico: ANOVA de una sola vía + ensayo de comparación múltiple de Dunnett.



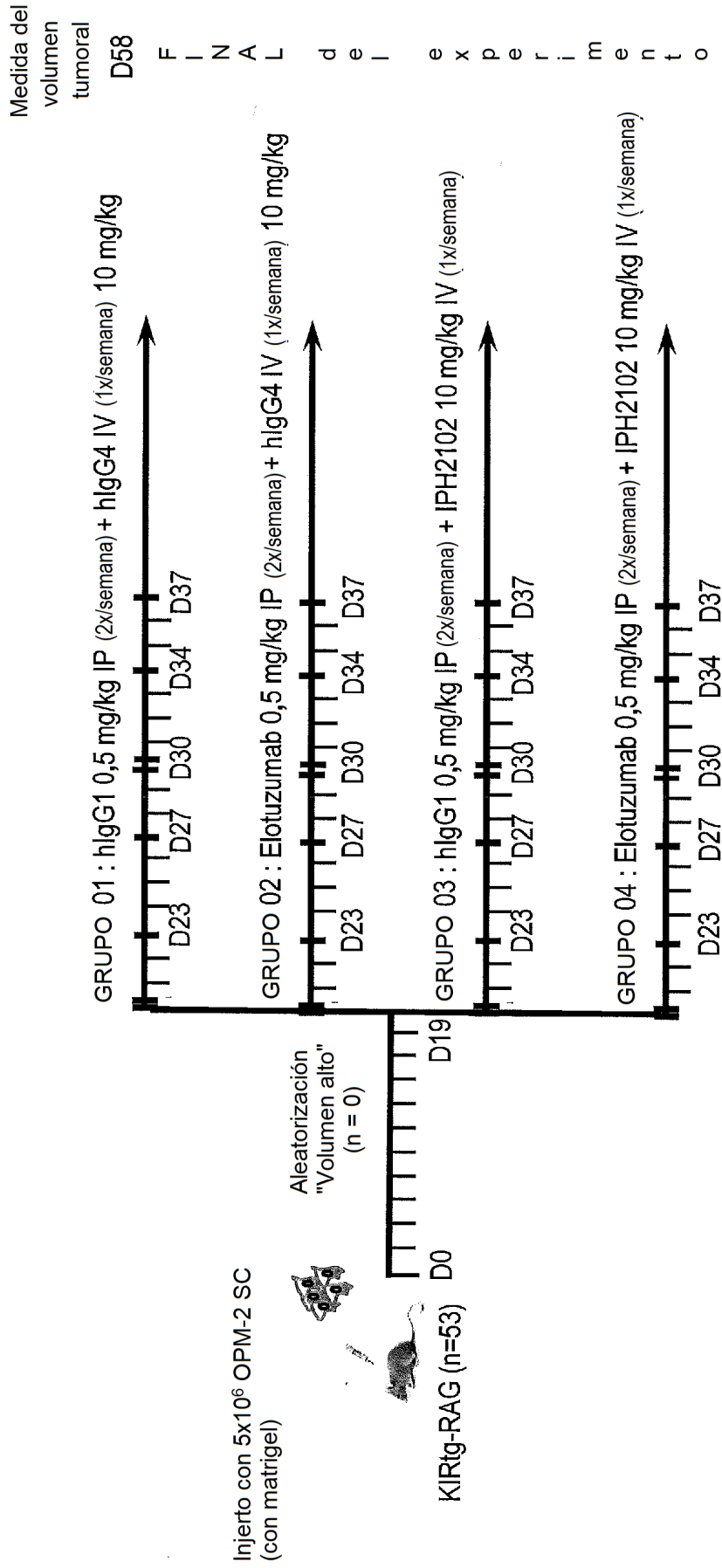
**Fig. 35**

Comparación en el día 27 después del injerto de los diferentes grupos tratados con alto volumen tumoral. Los datos se expresan como volumen tumoral individual y mediana. Análisis estadístico: ANOVA de una sola vía + ensayo de comparación múltiple de Dunnett. \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$ .

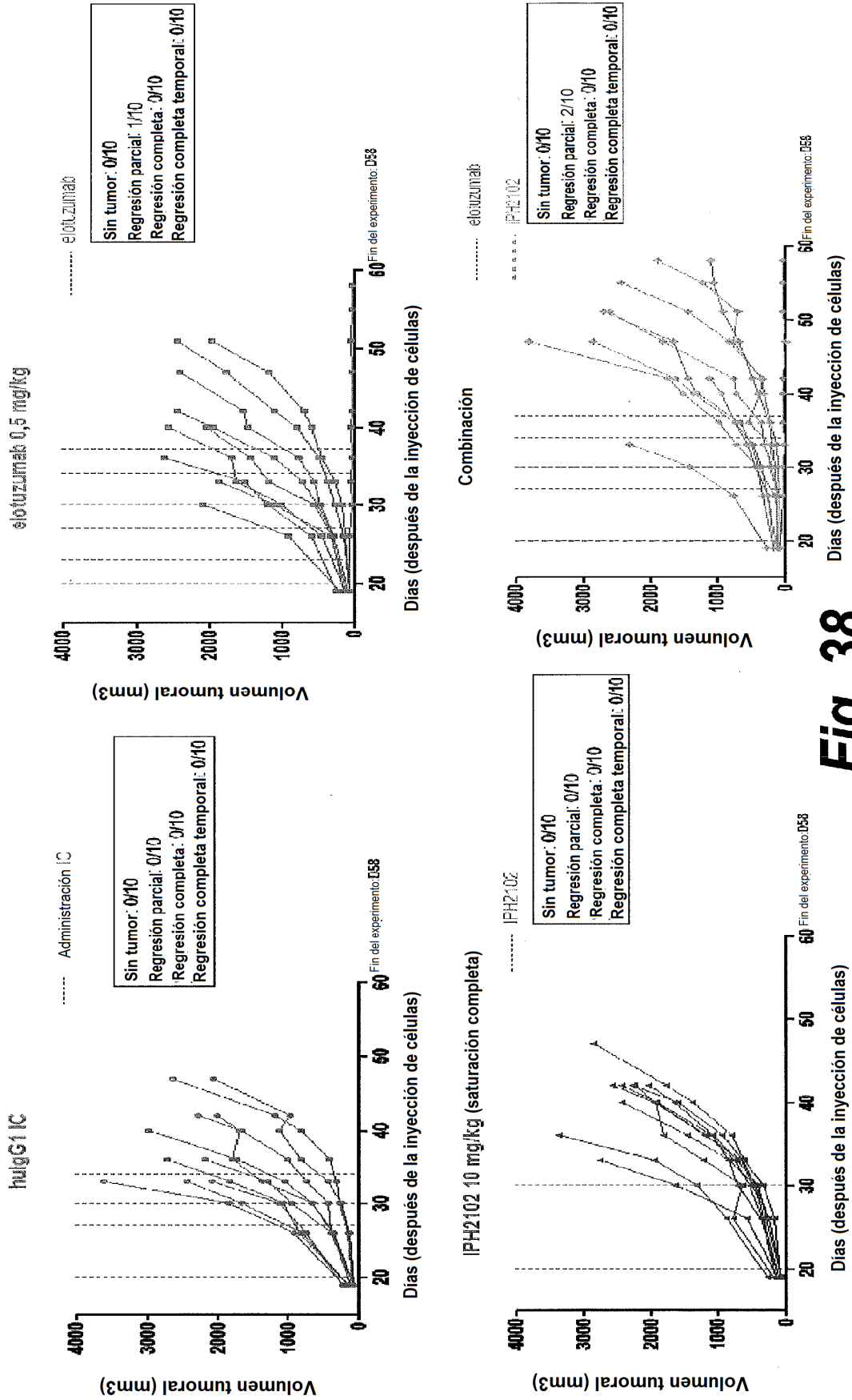


**Fig. 36**

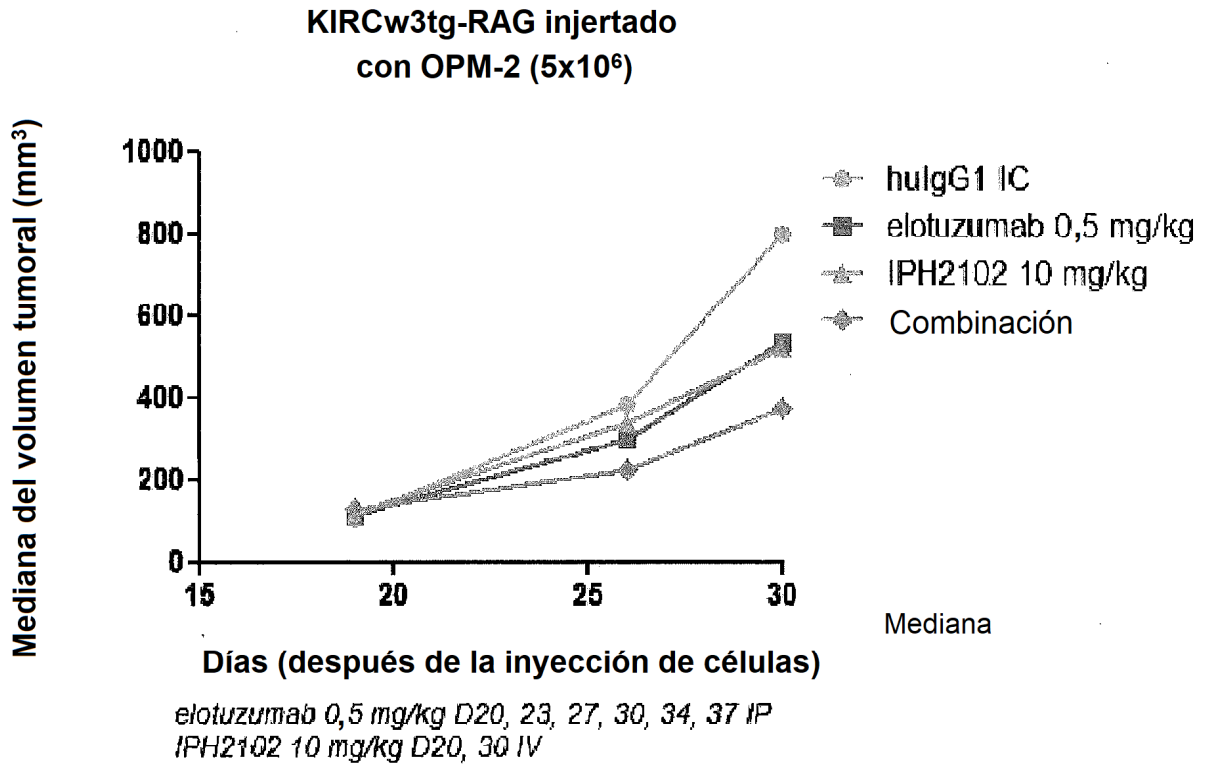
Eficacia de elotuzumab, IPH2102 y tratamientos combinados, administrados a un volumen tumoral alto, en la supervivencia de ratones KIRtg-RAG injertados con 5x10<sup>6</sup> OPM-2 SC. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier.



**Fig. 37**



**Fig. 38**





**Fig. 39**




# Esquema del diseño del estudio: Aumento progresivo de la dosis

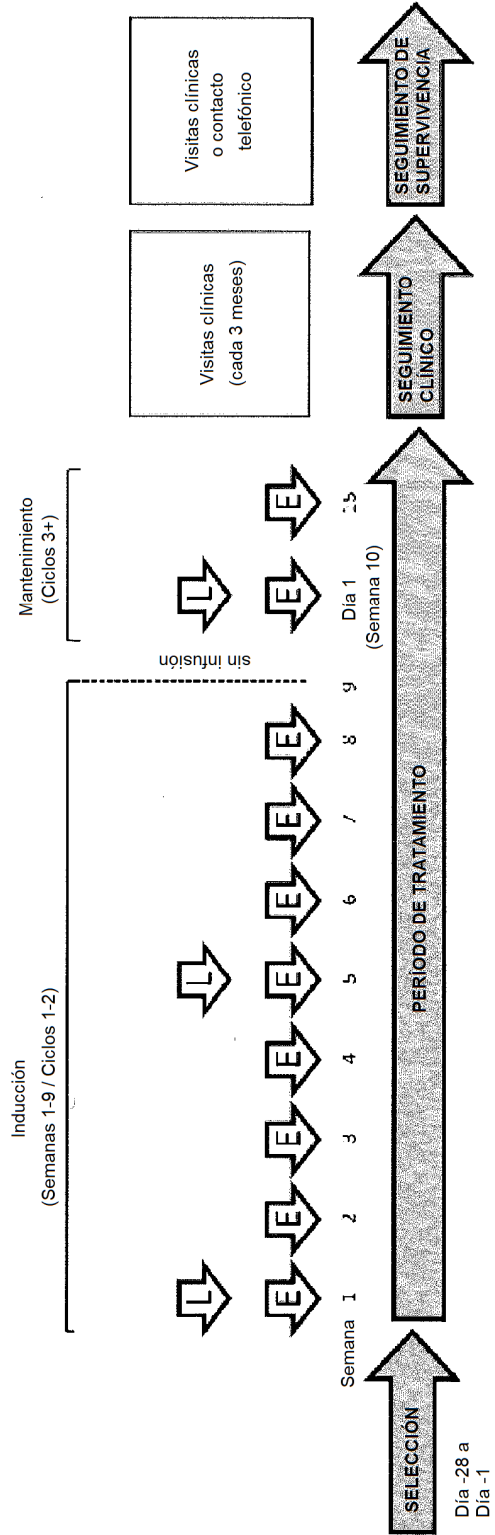
**CLAVE DE LA FIGURA:**

Elotuzumab + Lirilumab

Elotuzumab =  

Lirilumab = 

NOTA: Se dosifica el elotuzumab en primer lugar



**Fig.40**