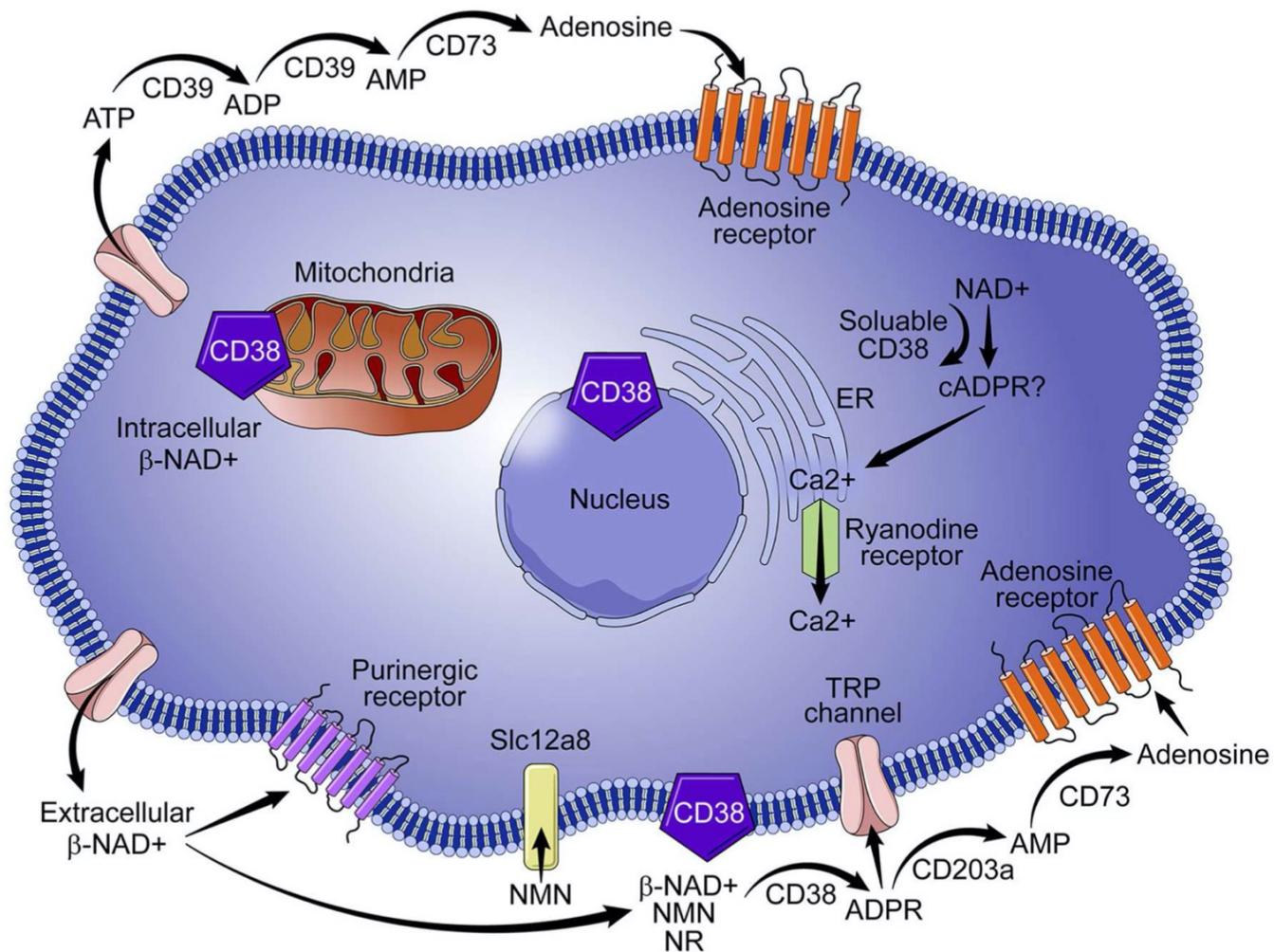




Nanoanticuerpo CD38 en CMF

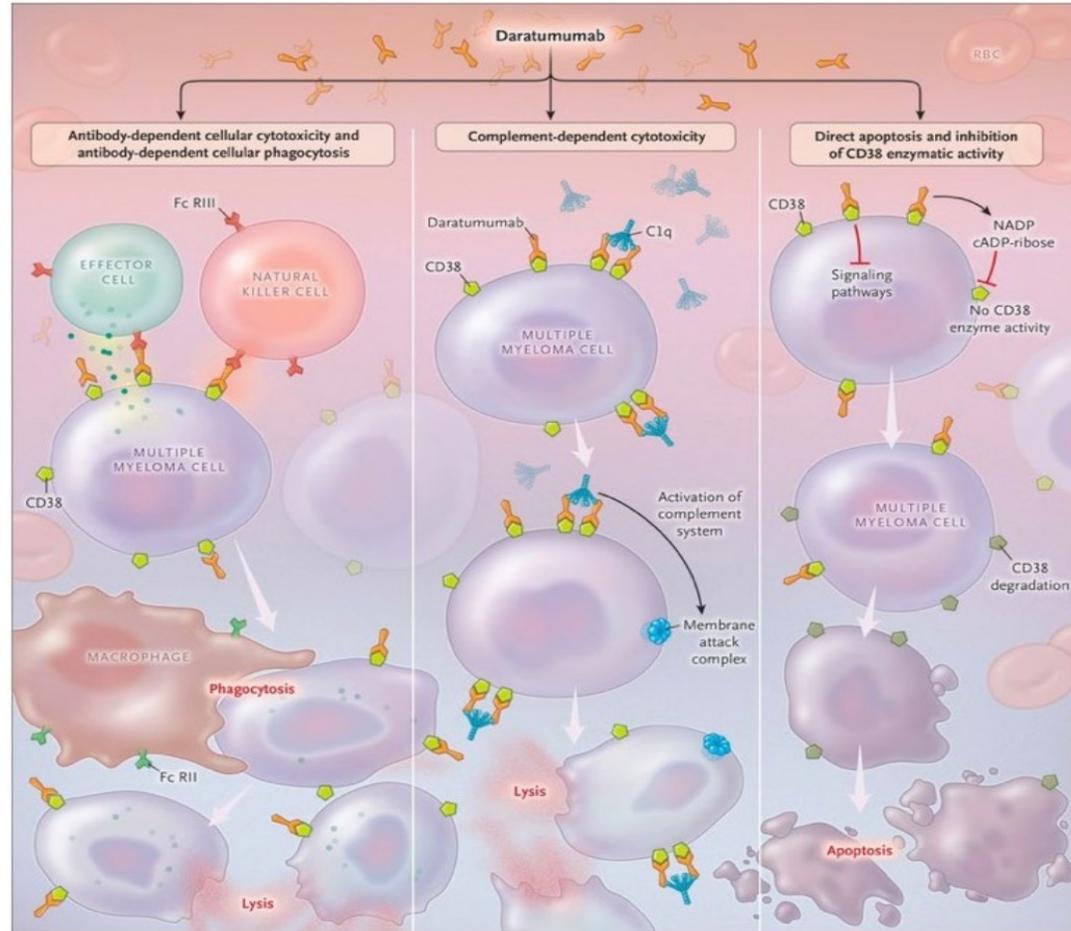
J.Marco

Hospital Universitario Dr. Peset

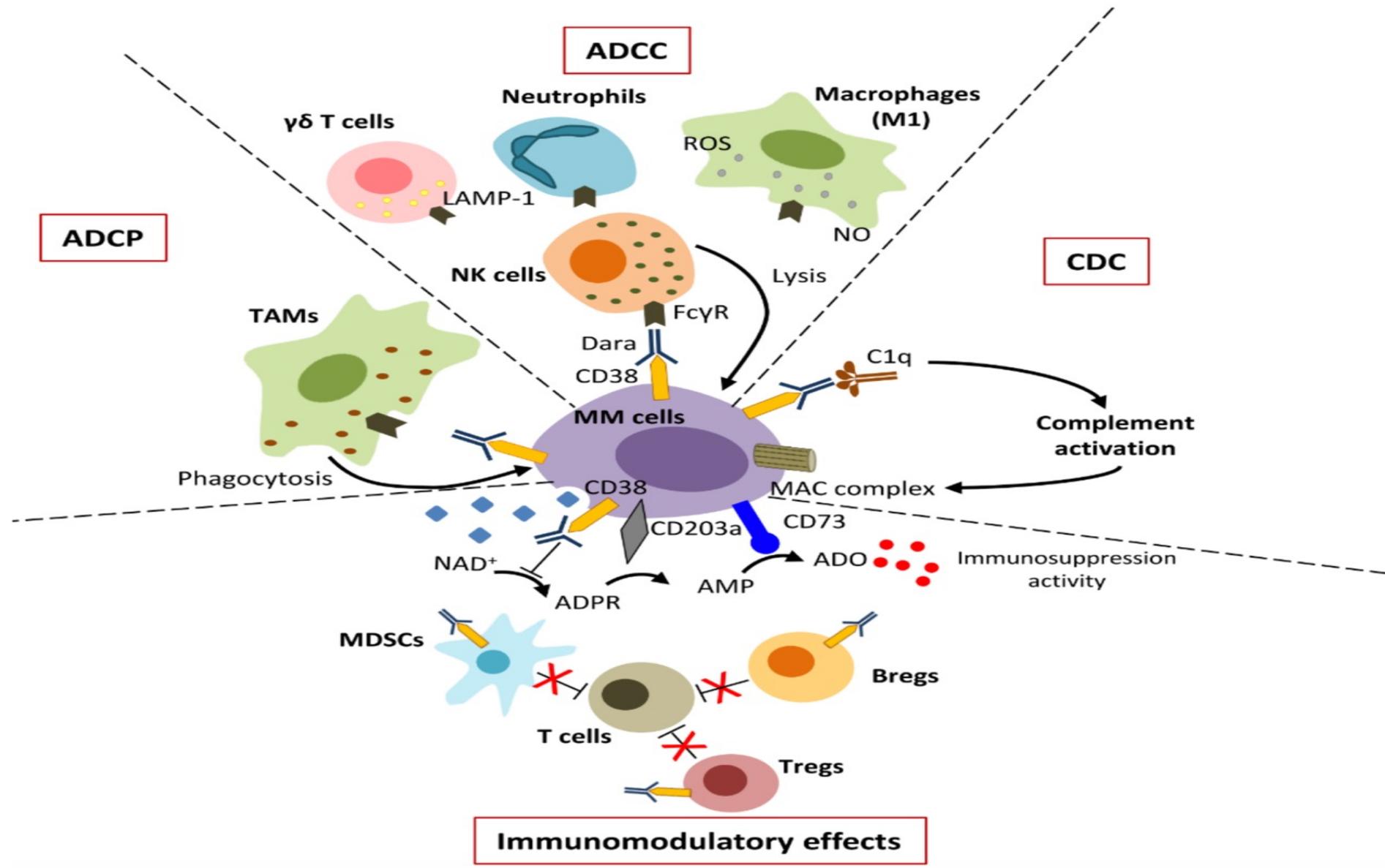


- Glipoproteina transmembrana tipo II
- Regulador activación/proliferación celular
- Adhesión entre linfocitos y células endoteliales
- Ectoenzima: actividad ADP ribosil ciclasa
- Expresión variable en las cels hematopoyéticas
- Expresión muy abundante en las CPs
- CF: Identificación de la población de CP en el Dx y monitorización (CD38/CD138)
- Diana terapéutica

Daratumumab en el tratamiento del MM

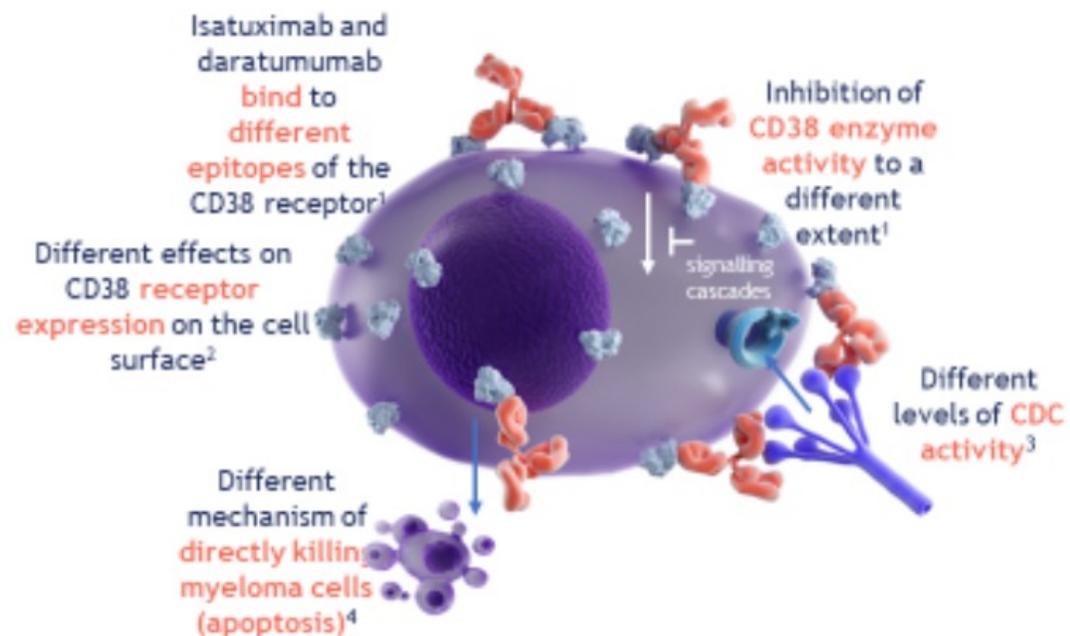


Raje N and Longo DL. NEJM 2015; 373: 1264-1266



Isatuximab y Daratumumab

Both Dara and Isa induce cell death via ADCC, ADCP and CDC



Daratumumab¹⁻⁴

Dara has a distinct binding site on CD38 to Isa

Dara inhibits the ADP ribosyl-cyclase activity of CD38

Dara induces apoptosis after Fc mediated cross-linking

Dara causes CD38 aggregation and release of microvesicles

Isatuximab⁵⁻⁹

Isa has a distinct binding site on CD38 to Dara

Isa inhibits both the ADP ribosyl-cyclase AND the hydrolase activity of CD38

Isa induces direct apoptosis in the absence of cross-linking agents

Isa induces internalization of CD38 but not significant release from myeloma cells

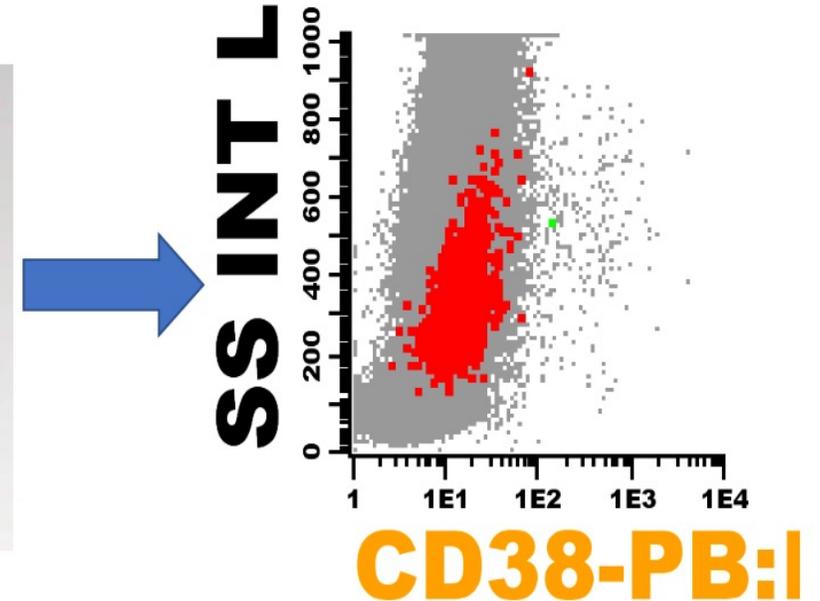
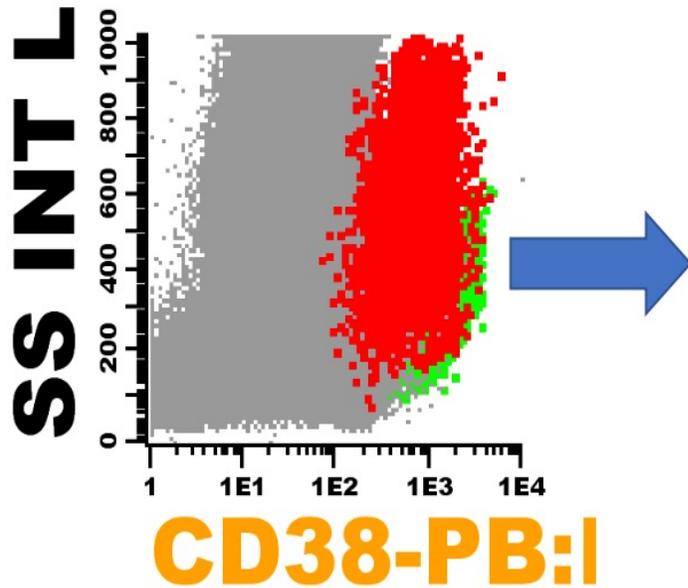
C1q=complement component 1q; CDC=complement-dependent cytotoxicity; MAC=membrane attack complex; MOA=mechanism of action. ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCP, antibody-dependent cellular phagocytosis; ADP, adenosine diphosphate; CDC, complement-dependent cytotoxicity; Dara, daratumumab; Fc fragment crystallizable; Isa, isatuximab

References:

1. Martin TG et al. Cells. 2019;8(12):1522. doi:10.3390/cells8121522

1. Overdijk MB, et al. J Immunol. 2016;197:807-13; 2. van de Donk NWCJ, et al. Immunol Rev. 2016;270:95-112; 3. Horenstein AL, et al. Cells. 2015;4:520-97; 4. Viola D, et al. Leukemia. 2020; ePub. doi: 10.1038/s41375-020-0810-4; 5. Deckert J, et al. Clin Cancer Res. 2014;20:4574-88; 6. Jiang H, et al. Leukemia. 2016;30:399-408;

Daratumumab y CMF en MM

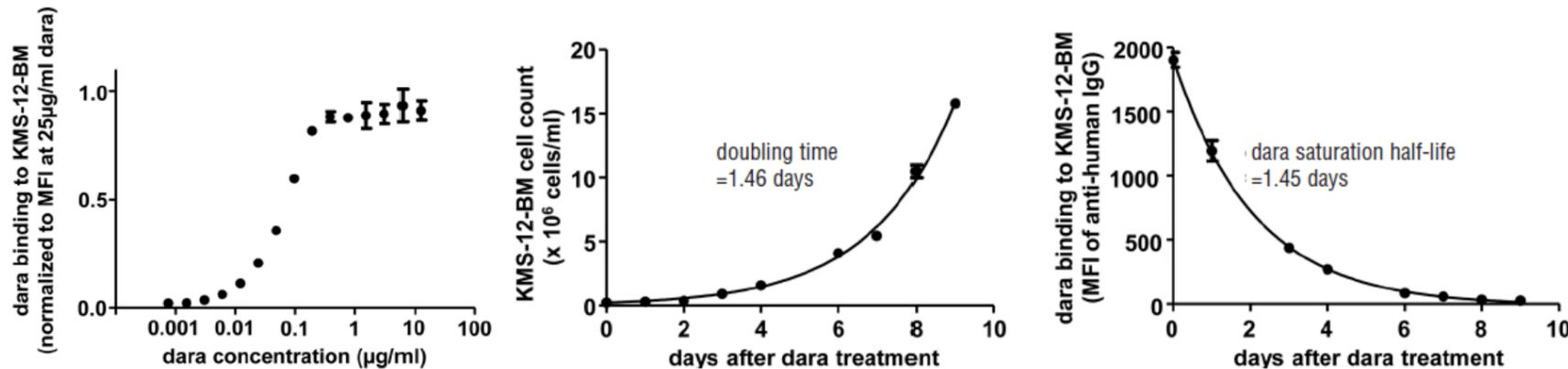


Posibles soluciones:

- Acs con expresión en CPs: CD229
- CD38 Multiepítipo
- VS38c
- CD38 nanobody

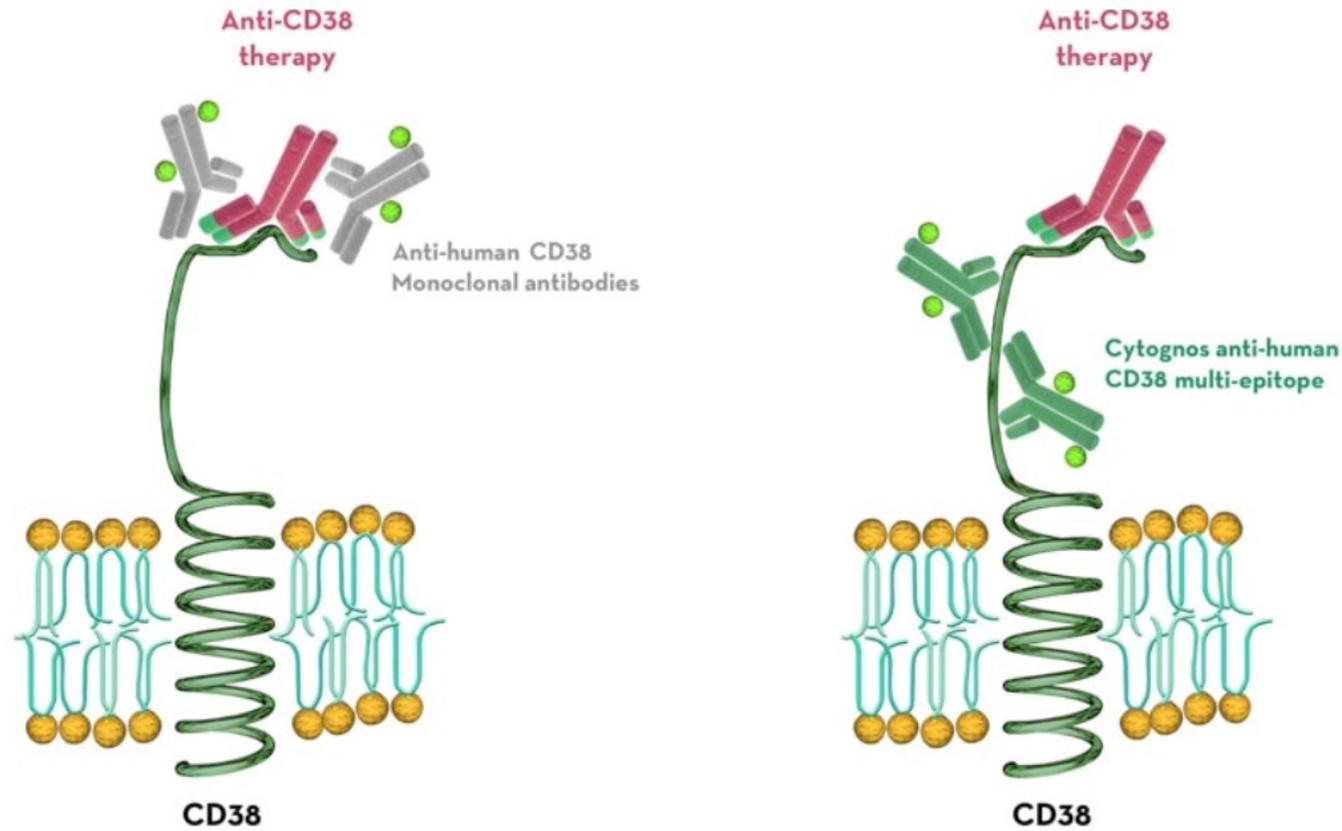
CMF en el paciente con Daratumumab

- Dara 0,2-0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ satura CD38 en líneas celulares MM.



- 6 SS despues de Dara, concentraciones plasmáticas de 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Dara compite por los mismos epitopos que anti-CD38 de CMF.

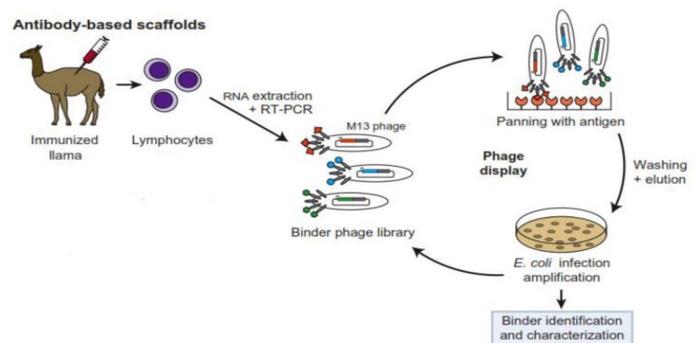
CD38-multiepitopo



VS38c

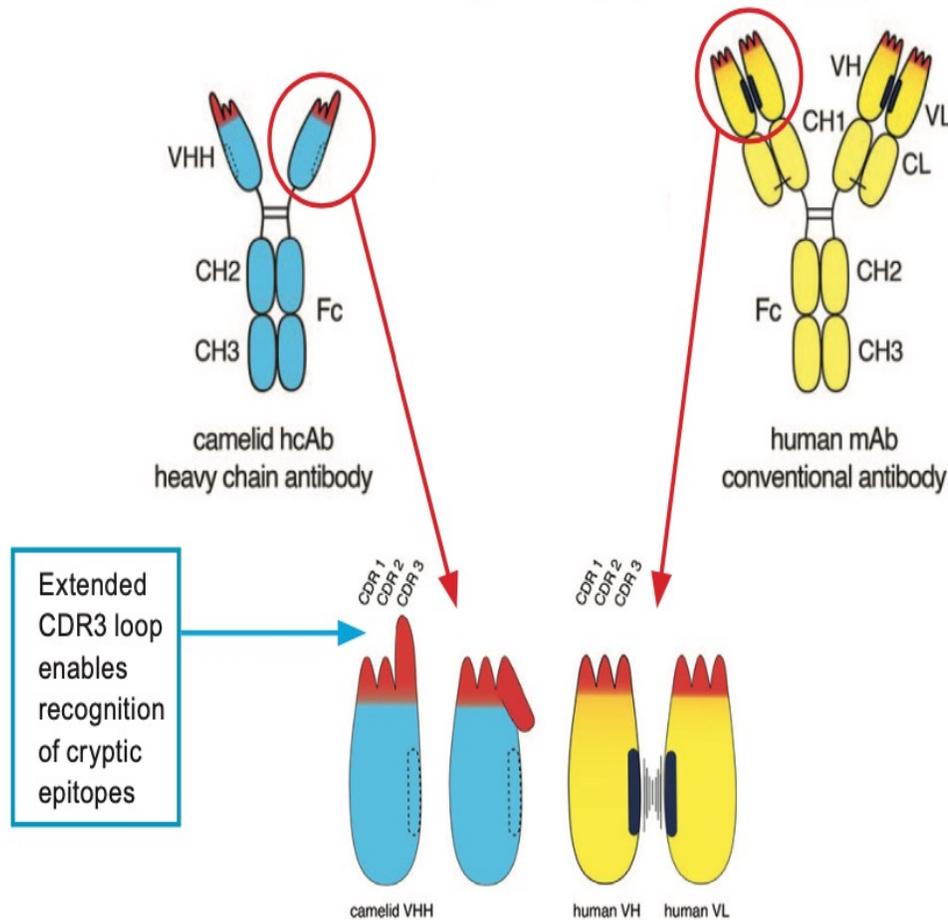
- VS38c reconoce la fracción intracelular de CD38
- Utilizado durante un largo tiempo en técnicas inmunohistoquímicas
- Recientemente utilizado en citometría de flujo- VS38c-FITC
- Marcaje intracitoplásmico
- Alternativa para el marcaje de CD38 en muestras de pacientes en tto con anti-CD38

Anti CD38 nanobody



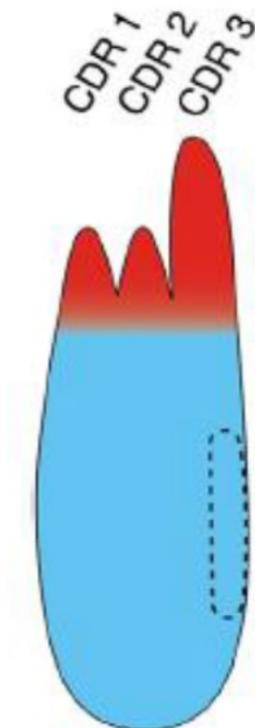
- Son derivados de Ac de cadena pesada que se encuentran en llamas y otros camélidos
- Los nanocuerpos tienen propiedades únicas con importantes ventajas para las aplicaciones analíticas y terapéuticas
- La primera terapia basada en nanocuerpos fue Caplacizumab, aprobada por la FDA en 2019

Anticuerpos humanos/Ac de camélidos y dominio VHH



- Los nanocuerpos son fragmentos de anticuerpos de dominio variable único (VHH) que exponen una región determinante de la complementariedad 3 alargada (CDR3)
- El constructo Rb-JK36 marcado con fluorescencia es la primera aplicación en CF para superar las limitaciones del enmascaramiento del epítipo con los tratamientos biológicos

Tecnología nanobody



- Alta especificidad.
- Alta solubilidad.
- Gran estabilidad.
 - Térmica.
 - A distintos pH.
- Elevada capacidad para penetrar en tejidos.
- Capacidad funcional intracelular in vivo.
- Preferencia por epítopos:
 - con conformación cóncava.
 - El loop largo CDR3 accede a epítopos críticos.

Tipo de muestra: Diagnostico confirmado de MM (n=10)

600uL de Muestra filtrada y ajustada a un **máximo** de 10.000 cels/uL

Marcaje de 3 tubos (100uL/tubo)
Panel: CD38/CD56/CD19/CD138/CD45
Variable CD38:
1. CD38 FITC MoAb estándar
2. CD38 FITC Multiepitopo
3. NanoCD38 AF 700

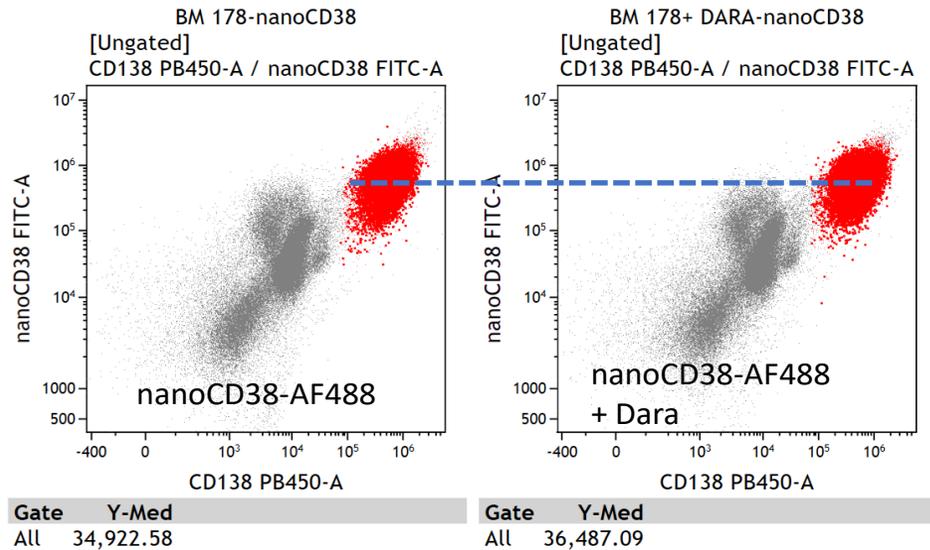
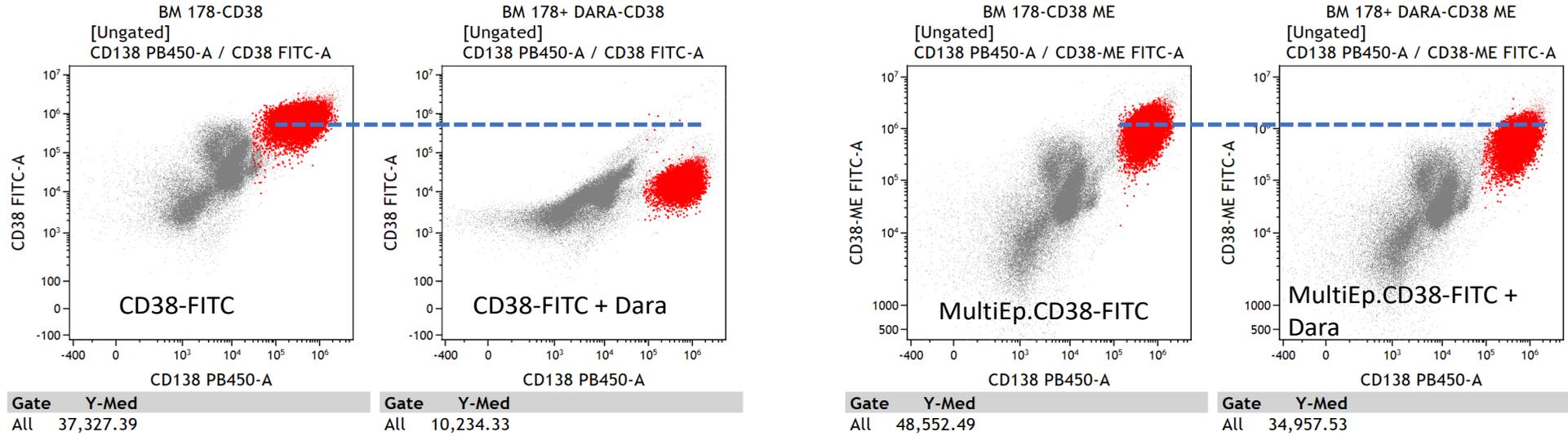
600uL de Muestra filtrada y ajustada a un máximo de 10.000 cels/uL

Añadir Daratumumab para dejar una concentración final de 10nM e incubar durante 1h (Temp amb)

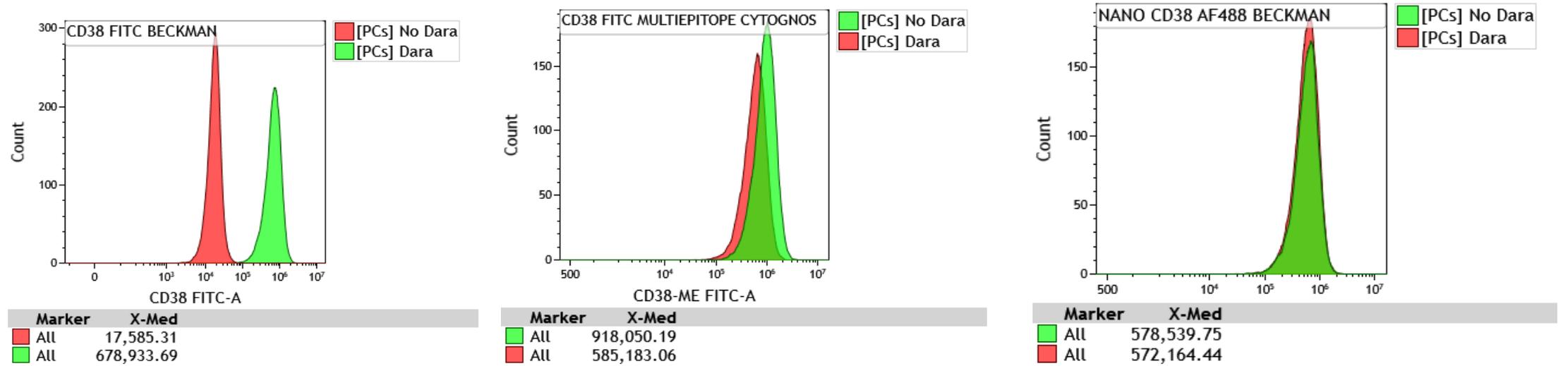
Marcaje de 3 tubos (100uL/tubo)
Panel: CD38/CD56/CD19/CD138/CD45
Variable CD38:
1. CD38 FITC MoAb estándar
2. CD38 FITC Multiepitopo
3. NanoCD38 AF700

Análisis comparativo de cada muestra con su control y tras la incubación con Dara

nanoCD38-AF488 test. Médula Ósea paciente MM + Daratumumab en el tubo



nanoCD38-AF488 test. Médula Ósea paciente MM + Daratumumab en el tubo



CD38	Normal MFI	MFI with DARA	MFI with DARA (%)	MFI DARA vs Monoclonal NO-DARA (%)
MONOCLONAL-FITC	678,933.69	17,585.31	-97.41	0.00
MULTIEPITOPE-FITC CYTOGNOS	918,050.19	585,183.06	-36.26	-13.81
NANO-A700 BECKMAN	578,539.75	572,164.44	-1.10	-15.73

Comparar MFI basal y MFI dara entre monoclonal normal, multiepítopo y nano

Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	MFI_BASAL_MONO - MFI_DARA_MONO	276889,748	129515,317	35921,0860	198624,425	355155,071	7,708	12	,000
Par 2	MFI_BASAL_MULTI - MFI_DARA_MULTI	114945,258	112041,680	31074,7708	47239,1483	182651,367	3,699	12	,003
Par 3	MFI_BASAL_NANO - MFI_DARA_NANO	19817,2531	45030,9181	12489,3296	-7394,6584	47029,1646	1,587	12	,139

- Encontramos diferencias entre MFI basal y MFI tras incubación con dara en el Ac CD38 estandar y Ac-CD 38 multiepítopo pero no con el nano-Ac
- El CV entre las MFI basal y tras incubación con dara es menor para el nano-Ac

Tipo de muestra: MM Post-tto de Daratumumab

Realizar la rutina normal del laboratorio.
Bulk-Lysis/MDR-MM (sensibilidad <0,0001)

Marcaje de 3 tubos:

Tubo 1 MDR-MM:

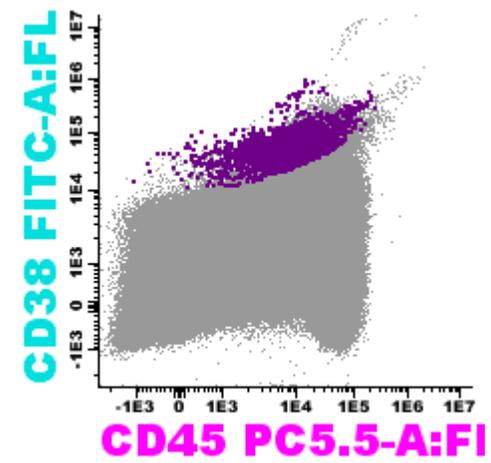
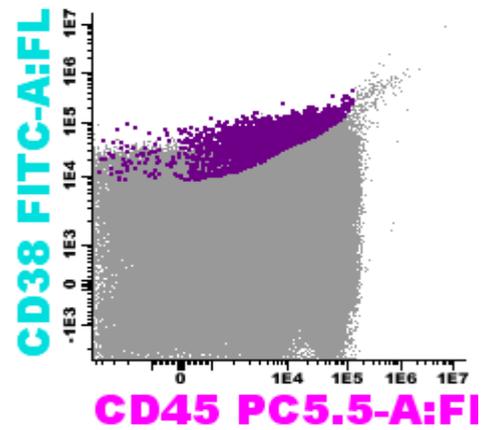
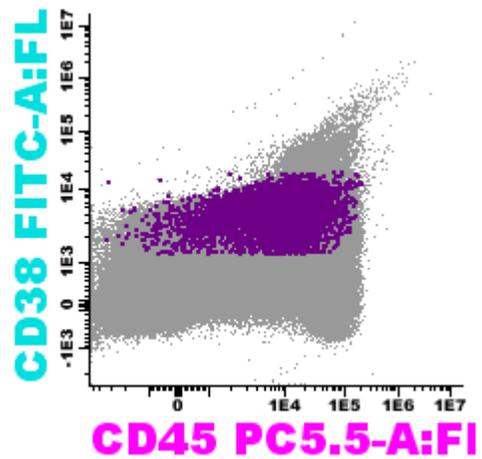
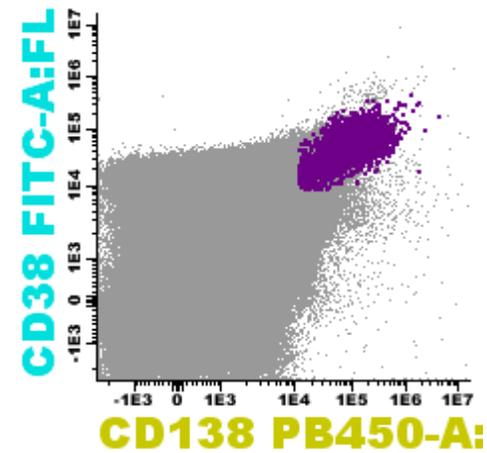
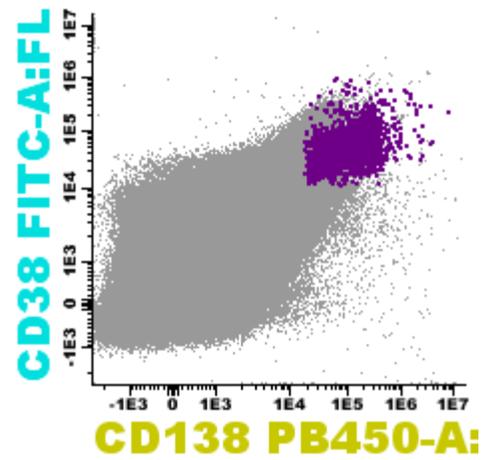
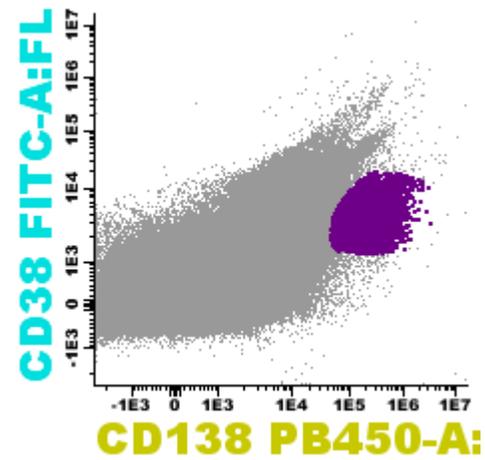
CD38/CD56/CD45/CD19/CD117/CD81/CD138/CD27

Variable CD38:

1. **Control:** CD38 FITC MoAb estándar
2. **Cytognos:** CD38 FITC Multiepitopo
3. **BC:** NanoCD38 FITC

Tubo 2 MDR-MMEuroflow

Análisis comparativo de cada muestra CD38 estándar/Multiepitopo/Nano



CD38- multiepítopo

CD38- nanoAc

EMR en pacientes en tto con anti-CD38

- N = 17
- EMR positiva en todos los pacientes con $LOD < 0,0001$
- Concordancia 100% de la EMR entre ambas aproximaciones

Estimaciones

Medida: MFI_DARA

Tratamiento	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	3316,932	832,508	1552,093	5081,772
2	51430,125	7985,653	34501,297	68358,953
3	52306,335	7505,695	36394,972	68217,699

- 1 Ac CD38 estándar
- 2 Ac CD38 multipítopo
- 3 Nanoanticuerpo CD38

- No hay diferencias al comparar MIF entre multiepítopo y nano
- Pero si CD38 multiepítopo y CD38 nano frente al estándar

Remarcar ...

- Anti-CD38 es una de las principales estrategias terapéuticas en pacientes con MM
- Interfiere en las determinaciones de CF, incluso meses tras finalizar el tto.
- CD38-nanoanticuerpo muestra una MIF con menor CV que el CD38-multiepitopo. Importante para la estandarización.
- Nano CD38 es útil en el análisis de EMR en pacientes bajo tratamiento con daratumumab. Concordancia 100% de los resultados de EMR vs multiepitopo
- Ambos, mutiepitopo y nanoAc nos permiten realizar estudios de EMR en pacientes en tto con daratumumab
- Potencial uso de los nanoanticuerpos para monitorizar terapias biológicas en otras enfermedades (AntiCD19, AntiCD22,...)

MUCHAS GRACIAS

