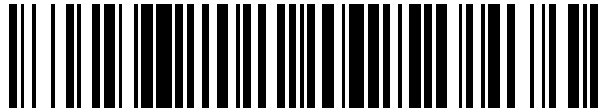


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 124**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2006 E 06818912 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 1976886**

54 Título: **Medios y procedimientos para el tratamiento de enfermedades tumorales**

30 Prioridad:

**16.12.2005 EP 05027606
01.03.2006 EP 06004144**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2015

73 Titular/es:

**AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (100.0%)
Staffelseestrasse 2
81477 München, DE**

72 Inventor/es:

**BAEUERLE, PATRICK;
KUFER, PETER;
KLINGER, MATTHIAS y
LEO, EUGEN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 532 124 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

Medios y procedimientos para el tratamiento de enfermedades tumorales

La invención se refiere a medios y procedimientos farmacéuticos para intervenciones médicas, inmunológicas, basados en la administración de construcciones de anticuerpos, en particular construcciones monocatenarias
 5 biospecíficas a pacientes. Específicamente, la invención se refiere a medios y procedimientos farmacéuticos de tratamiento de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B, medios y procedimientos que implican la administración de anticuerpos monocatenarios biospecíficos. La invención se refiere además a usos de anticuerpos monocatenarios biospecíficos para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B.

Los productos terapéuticos basados en anticuerpos se usan ampliamente en el tratamiento de enfermedades
 10 humanas. Normalmente, dichos regímenes de tratamiento conllevan múltiples "infusiones intravenosas rápidas" de agente terapéutico de anticuerpos, a saber múltiples inyecciones, normalmente intravenosas (i.v.) y de dosis alta, de anticuerpo que se extiende de forma intermitente a lo largo de todo el periodo de tratamiento (de acuerdo con Webster's Online Dictionary, "infusión intravenosa rápida" indica una única dosis de fármaco inyectada normalmente
 15 en un vaso sanguíneo durante un periodo de tiempo corto; véase también www.nlm.nih.gov/medlineplus y www.phoenix5.org/glossary). Por ejemplo, Rituximab (Rituxan), un anticuerpo anti-CD20 monoclonal para el tratamiento de linfoma no Hodgkin (NHL) de células B CD20+ folicular o de bajo grado en recidiva o resistente al tratamiento, se aplicó repetidamente como dosis semanales a lo largo de 4-8 semanas (Ghielmini M., J. Clin. Oncol. 2004). También se describieron patrones de infusión intravenosa rápida para Alemtuzumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD52 humanizado en leucemia linfocítica crónica (O'Brian, 2003, Cancer, 98, 2657-63), Trastuzumab (Herceptin, anticuerpo anti-Her2) en cáncer de mama metastásico, Gemtuzumab (Myelotarg, anticuerpo anti-CD33) en leucemia mielógena aguda (AML), Alemtuzumab (Campath, anticuerpo anti-CD52) en leucemia linfocítica crónica (CLL) de células B e Ibritumomab (Zevalin, anticuerpo anti-CD20) en NHL de células B de bajo grado, folicular o transformado en recidiva o resistente al tratamiento (para revisión véase Cersosimo, 2003, Am. J. Health-Syst-Pharm., 60, 1531-48).
 20 El anticuerpo monoclonal anti-17-1A Edrecolomab (Panorex) también se aplicó como infusiones repetidas comenzando con una dosis de carga alta (500 mg) seguido 2 semanas después por 100 mg i.v. cada 28 días (Makower, 2003, Cancer Invest., 2, 177-84).

Un fenómeno común observado en tratamiento con anticuerpos es la aparición de efectos secundarios relacionados con la infusión, tales como el síndrome de liberación de citocinas ("CRS"). El CRS es una complicación inmediata que
 30 se produce en respuesta a las infusiones de anticuerpos que se unen a células T. El CRS se ha asociado con la activación de células T/monocitos y, de forma secundaria, con la activación de la cascada del complemento. Estos procesos están mediados a través de la parte Fc de los anticuerpos que pueden entrecruzar células T y células mononucleares y activar el complemento. La patogenia del CRS se ha atribuido a la síntesis del factor de necrosis tumoral (TNF) alfa, IL-2 e IL-6 e interferón gamma en respuesta a la estimulación de linfocitos T por OKT3. En general, dichos anticuerpos se unen al receptor de células T, activando de este modo las células T. Las citocinas liberadas por las células T activadas (tales como TNF alfa, interleucinas (IL-2, IL-6) e interferones (IFN gamma)) producen un tipo de respuesta inflamatoria sistémica similar a la encontrada en una infección grave, y caracterizada por hipotensión, pirexia y escalofríos intensos. Los pacientes se sienten muy mal, como si experimentaran fiebre alta (de hecho, el CRS es realmente un tipo de fiebre no infecciosa). Otros efectos secundarios adversos descritos por estar asociados con el
 40 CRS son fatiga, vómitos, taquicardia, hipertensión, cefalea y dolor de espalda.

El CRS también se ha observado cuando se administran varios anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, la actividad antitumoral del anticuerpo anti-CD20 Rituximab se aprovecha para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL). El aumento gradual de la dosis, es decir, en incremento de las dosis, logrado por la dosificación tres veces por semana es necesaria para que Rituximab logre una actividad clínica significativa como agente individual
 45 (Lin, 2003, Seminar Oncol. 30, 483-92). Sin embargo, este esquema de administración desencadena la liberación de las citocinas TNF-alfa e IL-6, de las que los niveles séricos alcanzan un máximo 90 minutos después de comenzar una respectiva infusión. Este aumento en las citocinas está acompañado de fiebre, escalofríos moderados, hipotensión y náuseas (Winkler, 1999, Blood, 94, 2217-24). Se pudo reducir la toxicidad por infusión con un agente prefarmacéutico apropiado y un programa de administración escalonado (Lin, 2003, Seminar Oncol. 30, 483-492).

El CRS también se ha observado cuando se aplican otros formatos de anticuerpos, tales como anticuerpos biospecíficos. Las infusiones individuales de anticuerpo biospecífico MDX-2H12 (anti-receptor Fc gamma I x anti-Her-2/neu) en combinación con GCSF (factor estimulador de colonias de granulocitos) en pacientes con carcinoma de mama dieron lugar a niveles máximos de TNF-alfa e IL-6 a las 2 y 4 horas, respectivamente, después de la infusión de MDX-2H12. Los niveles máximos de TNF-alfa y IL-6 no se correlacionaban con la dosis de anticuerpo biospecífico aplicado (Repp, 2003, Br. J. Cancer. 89, 2234-43).
 55

Como se describe en el documento WO 99/54440, el CRS se ha observado en un estudio clínico interno realizado con anticuerpo monocatenario biospecífico anti-CD19 x anti-CD3 (bscCD19xCD3) aplicado en infusiones repetidas a un paciente con leucemia linfocítica crónica derivada de células B (B-CLL). Como se muestra en la Fig. 19 y 20 del documento WO 99/54440, se ha encontrado una liberación de TNF, IL-6 e IL-8 en respuesta a cada una de las dos
 60 infusiones administradas en 20 minutos (3 µg y 10 µg del anticuerpo monocatenario biospecífico, respectivamente),

con liberación de citocinas después de cada administración. Se observó una liberación de citocinas máxima después de la administración de 10 µg de anticuerpo monocatenario biespecífico.

El documento WO2005/040220 divulga proteínas de unión a CD3 desinmunizadas multiespecíficas sin indicación de las pautas temporales para la administración de estas proteínas de unión.

- 5 El documento WO2004/106381 divulga proteínas biespecíficas anti-CD3, anti-CD19 sin indicación de las pautas temporales para la administración de estas proteínas de unión.

Ten Berge et al., 1996, Transplant. Proc. 28, 3217-20 describe un estudio que implica la infusión continua del anticuerpo monoclonal anti-CD3 OKT3 durante 2 h. El objetivo de este estudio era el de determinar si las complicaciones tromboembólicas conocidas por estar asociadas con la administración de OKT3 dependen de la manera en la que se administra esta molécula. En general, la administración de OKT3 por medio de la infusión continua se toleró mejor que una única infusión intravenosa rápida.

La infusión continua también se ha descrito en la técnica anterior por los agentes farmacéuticos relacionados con anticuerpos. Por ejemplo, se infundió de forma continua el anticuerpo monoclonal específico del gangliósido GD3 R24, lo que dio lugar a toxicidades relacionadas con R24 predominantemente a dosis de 25 y 50 mg/m² (Alpaugh, 1998, Med. Oncol., 15, 191-8). La infusión continua durante 48 h en dos infusiones en 24 horas de un anticuerpo monoclonal IgM humano específico para el gangliósido GM3 en pacientes con melanoma metastásico indujo efectos secundarios menores durante y después de la infusión (Irie, 2004, Cancer Immunol. immunother. 53, 110-7). Aquí, se requirieron tasas de administración extremadamente altas del anticuerpo terapéutico para lograr un efecto clínico, a saber del orden de gramos de anticuerpo.

Además, se aplicó un anticuerpo biespecífico anti-CD 16 x anti-CD30, que se produjo como IgG1 murina de hibridomas híbridos, en diferentes pautas de infusión en pacientes con enfermedad hodgkiniana (Hartmann, 2001, Clin. Cancer Res., 7, 1873-1881). Este anticuerpo activa las células NK por medio de la unión a CD16 (receptor Fc-gamma III). Las infusiones se dieron como infusiones continuas durante 24 h en 4 días consecutivos o bien como una infusión de 1 h cada dos días. La dosis absoluta de anticuerpo biespecífico por infusión fue de 25 mg 4 veces en solución de albúmina humana al 5 %. Después de la infusión del anticuerpo biespecífico (independientemente de la pauta de aplicación) no se observaron cambios consistentes en los recuentos celulares en sangre periférica, aunque los últimos difirieron fuertemente entre los individuos. Los pacientes desarrollaron fiebre, independientemente de si la pauta de tratamiento con anticuerpo era continua o intermitente. La infusión de anticuerpo terapéutico de forma continua en lugar de intermitente como infusiones intravenosas rápidas no redujo la incidencia o la gravedad de los efectos secundarios sufridos por los pacientes. Se analiza que también puede ser necesario incrementar la eficacia antitumoral del tratamiento de anticuerpo biespecífico, por ejemplo, por la aplicación concomitante de citocinas con el fin de lograr un incremento en la cantidad y/o el estado de activación de las células efectoras selectivas. A pesar de la cantidad total de 100 mg de anticuerpo terapéutico usado en el estudio descrito anteriormente, el principal obstáculo contra un tratamiento exitoso y ampliamente aplicable con anticuerpos biespecíficos se identifica como la disponibilidad limitada del anticuerpo biespecífico. Los autores proponen que se puede lograr una mejora considerable en la eficacia clínica 1) incrementando las dosis del anticuerpo biespecífico y 2) incrementando el número de ciclos de tratamiento.

En consecuencia, es necesaria una reducción de los efectos secundarios no deseados.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar medios y procedimientos farmacéuticos para los tratamientos médicos basados en anticuerpos con un incremento en la tolerabilidad. Específicamente, es un objetivo que dichos medios y procedimientos permitan una retención máxima de la bioactividad del anticuerpo administrado, mientras se minimizan los efectos secundarios adversos y no deseados debidos a esta administración.

La presente invención se refiere al uso de una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento o mejora de un cáncer o un tumor sólido o no sólido, en la que dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se va a administrar permanentemente durante un periodo de tiempo más largo.

En consecuencia, un primer aspecto de la invención proporciona el uso de una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento o mejora de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B, en el que dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico comprende unir dominios específicos para CD3 humano y CD19 humano, en el que las correspondientes regiones variables de cadena pesada (V_H) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (V_L) están dispuestas, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, en el orden,

V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 2),

V_H(CD19)-V_L(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 4),

55 V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(CD19)-V_L(CD19) (SEQ ID NO.: 6), o

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_H(CD19) (SEQ ID NO.: 8)

y en el que dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se va a administrar durante al menos 1 semana en una dosis diaria de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente y donde dicha dosis diaria se va a administrar durante al menos 6 h.

- 5 La memoria descriptiva también divulga un procedimiento para la prevención, tratamiento o mejora de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B, comprendiendo el procedimiento la administración de una composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico a un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico dominios de unión específicos para CD3 humano y CD19 humano, en el que las correspondientes regiones variables de cadena pesada (V_H) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (V_L) están dispuestas, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, en el orden,

V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 2),

V_H(CD19)-V_L(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 4),

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(CD19)-V_L(CD19) (SEQ ID NO.: 6), o

- 15 V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_H(CD19) (SEQ ID NO.: 8),

en el que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se va a administrar durante al menos 1 semana en una dosis diaria de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente y en el que la dosis diaria se va a administrar durante al menos 6 h.

- 20 También se divulga en el presente documento un kit que comprende una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento o mejora de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B en humanos, en el que la composición farmacéutica comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende dominios de unión específicos para CD3 humano y CD19 humano, en el que las correspondientes regiones variables de cadena pesada (V_H) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (V_L) están dispuestas, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, en el orden,

- 25 V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 2),

V_H(CD19)-V_L(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 4),

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(CD19)-V_L(CD19) (SEQ ID NO.: 6), o

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_H(CD19) (SEQ ID NO.: 8)

- 30 y una hoja de instrucciones en la que se describe la pauta de administración para la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende una administración durante al menos 1 semana en una dosis diaria de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente y donde dicha dosis diaria se va a administrar durante al menos 6 h.

- 35 Otro modo de realización de la invención se refiere a un kit para su uso en la prevención, tratamiento o mejora de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B en humanos, que comprende la administración de una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende dominios de unión específicos para CD3 humano y CD 19 humano, en el que las correspondientes regiones variables de cadena pesada (V_H) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (V_L) están dispuestas, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, en el orden,

V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 2),

- 40 V_H(CD19)-V_L(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO.: 4),

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_H(CD19)-V_L(CD19) (SEQ ID NO.: 6), o

V_H(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_H(CD19) (SEQ ID NO.: 8),

- 45 en el que dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se va a administrar durante al menos 1 semana en una dosis diaria de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente y en el que dicha dosis diaria se va a administrar durante al menos 6 h, y en el que dicho kit contiene los siguientes componentes:

- (a) al menos 7 dosis diarias individuales de desde 140 µg a 320 µg de dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico; y
- (b) un medio para tener dispuestos los componentes de forma que se facilite el cumplimiento con el régimen.

El promedio del área de superficie corporal de un paciente se calcula de este modo en el contexto del procedimiento, kit o uso de acuerdo con la invención para que esté en un intervalo de 1,7 a 2,2 m².

De forma ventajosa, el kit de la presente invención comprende además, opcionalmente (a) tampón/tampones de reacción, soluciones de almacenamiento y/o restantes reactivos o materiales requeridos para el uso citado. Además, las partes del kit de la invención se pueden envasar individualmente en viales o frascos o en combinación en recipientes o unidades multirrecipiente. La fabricación de los kits sigue preferentemente procedimientos estándar que son conocidos por el experto en la técnica.

Con el fin de evaluar la seguridad y tolerabilidad del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 (bscCD19xCD3) como se describe en el presente documento, se ha administrado el compuesto por infusión continua prolongada a dos pacientes con linfoma no Hodgkin en recidiva (B NHL).

Se ha diagnosticado el primer paciente con un linfoma folicular en 2000. Aunque este paciente recibió en el pasado múltiples quimioterapias e inmunoterapias, no obstante, la enfermedad progresaba. Después del tratamiento con la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 descrita en el presente documento de acuerdo con los usos y procedimientos como se proporcionan en el presente documento, la enfermedad no sólo se detuvo, sino que, por primera vez, se pudo lograr una reducción drástica de las lesiones del linfoma. Como se documenta en los siguientes ejemplos no limitantes, cuando este paciente recibió la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD3 x anti-CD19 descrita en el presente documento a un nivel de dosis de 15 µg/m²/24h como infusión continua durante 4 semanas, se toleró bien el tratamiento, es decir, no se pudieron observar efectos secundarios adversos significativos. El tratamiento provocó una activación y expansión de células T fuerte. Las células T con un fenotipo citotóxico representan predominantemente la expansión de células T CD8⁺. Se indujo la activación y proliferación de células T dentro del tumor por células B del linfoma decoradas con anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD3 x anti-CD19 como se describe en el presente documento. La determinación de recuentos de células B durante el tratamiento mostró que dicha construcción puede eliminar totalmente las células B circulantes (linfoma) debido a su actividad citotóxica frente a las células de linfoma. En una restadificación después del tratamiento, se descubrió una clara reducción de las masas tumorales de linfoma de acuerdo con la evaluación de la respuesta para el NHL: Se diagnosticó una reducción en la suma de los productos de los diámetros (SPD) de seis lesiones de linfoma de referencia de un 58,0 %, correspondiente a una respuesta parcial (RP) en la evaluación de la respuesta tumoral por tomografía axial computarizada (CT).

Se ha diagnosticado el segundo paciente con un linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL o B-CLL) en 1999. En los 7 años de evolución de la enfermedad, durante los que el paciente recibió 7 pautas de quimioterapia diferentes así como inmunoterapia y radioterapia, sin demostrar ninguna respuesta principal, el tratamiento de este paciente con la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención, proporciona por primera vez un tratamiento exitoso ya que se pudo lograr una reducción de más de un 50 % de las lesiones de linfoma de referencia. Cuando dicho segundo paciente se ha tratado de forma continua con 15µg/m²/24h de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 descrita en el presente documento durante dos semanas, se han eliminado eficazmente las células B circulantes (linfoma). Además, se ha observado una eliminación total de células de linfoma de la médula ósea por la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 descrita en el presente documento. Este hallazgo es consistente con una respuesta de médula ósea completa que es difícil de lograr, por ejemplo, por quimioterapia convencional. En una restadificación después del tratamiento, se observó una clara reducción de las masas tumorales de linfoma: se diagnosticó una disminución de un 57,2 % en el tamaño de las seis lesiones de linfoma de referencia por tomografía axial computarizada (TAC), correspondientes a una respuesta parcial (RP) en la evaluación de la respuesta tumoral.

Los términos "anticuerpo monocatenario biespecífico" o "anticuerpo biespecífico monocatenario" o términos relacionados de acuerdo con la presente invención quieren decir construcciones de anticuerpos que resultan de la unión de al menos dos regiones variables de anticuerpo en una única cadena polipeptídica desprovista de la(s) porción/porciones constante y/o Fc presentes en las inmunoglobulinas completas. Un "enlazador" como se usa en el presente documento conecta dominios V de la misma especificidad, mientras que un "espaciador" como se usa en el presente documento conecta dominios V de diferentes especificidades. Por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una construcción con un total de dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo dos regiones VH, cada una se puede unir específicamente a un antígeno separado, y conectadas entre sí a través de un espaciador polipeptídico sintético corto (normalmente de menos de 10 aminoácidos) de modo que las dos regiones variables de anticuerpo con sus espaciadores interpuestos existen como una única cadena polipeptídica contigua. Otro ejemplo de anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una única cadena polipeptídica con tres regiones variables de anticuerpo. Aquí, dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo una VH y una VL, pueden componer un scFv, en el que las dos regiones variables de anticuerpo están conectadas entre sí por medio de un enlazador polipeptídico sintético, este último a menudo está genomanipulado para que sea mínimamente inmunógeno mientras que se mantiene resistente al máximo a la proteólisis. Este scFv se puede unir específicamente a un antígeno particular, y se conecta a otra región variable de anticuerpo, por ejemplo una región VH, que se puede unir a un antígeno diferente del unido por el scFv. Aún otro ejemplo de anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una única cadena polipeptídica con cuatro regiones variables de anticuerpo. Aquí, las dos primeras regiones variables de anticuerpo, por ejemplo una región VH y una región VL, pueden formar un scFv que se puede unir a un antígeno,

mientras que la segunda región VH y la región VL pueden formar un segundo scFv que se puede unir a otro antígeno. Dentro de una única cadena polipeptídica contigua, las regiones variables de anticuerpo individuales de una especificidad se pueden separar ventajosamente por un enlazador polipeptídico sintético como se describe anteriormente, mientras que los respectivos scFv se pueden separar ventajosamente por un espaciador polipeptídico corto, como se describe anteriormente. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos monocatenarios biespecíficos así como procedimientos para producirlos se muestran en los documentos WO 99/54440, WO 2004/106381, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-70; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-5; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-7; Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-103; Bruhl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426.

Como se usa en el presente documento, "CD3 humano" indica un antígeno que se expresa en células T humanas como parte del complejo multimolecular célula T receptor, consistiendo el CD3 en cinco cadenas diferentes: CD3-épsilon, CD3-gamma, CD3-delta, CD3-eta y CD3 zeta.

El agrupamiento de CD3 en células T, por ejemplo por anticuerpos anti-CD3, da lugar a una activación de la célula T similar a la unión de un antígeno pero independiente de la especificidad clonal del subconjunto de células T, como se describe anteriormente. Por tanto, el término "un anticuerpo monocatenario biespecífico que se une específicamente con una de sus especificidades al antígeno CD3 humano" como se usa en el presente documento se refiere a una construcción específica de CD3 que se puede unir al complejo CD3 humano expresado en células T humanas y que puede inducir la eliminación/lisis de células diana, en el que dichas células diana portan/presentan un antígeno que está unido por la otra porción de unión distinta de CD3 del anticuerpo monocatenario biespecífico: La unión del complejo CD3 por proteínas de unión específicas para CD3 (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico administrado de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención) da lugar a la activación de células T como es conocido en la técnica; véase por ejemplo, el documento WO 99/54440 o el documento WO 2004/106381. En consecuencia, una construcción apropiada para los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención puede eliminar/lisar ventajosamente células diana in vivo y/o in vitro. Las correspondientes células diana comprenden células que expresan un antígeno tumoral, tal como CD19, que se reconoce por la segunda especificidad (es decir, la porción de unión distinta a CD3 del anticuerpo monocatenario biespecífico) de la construcción mencionada. Preferentemente, dicha segunda especificidad es para CD 19 humano, lo que ya se ha descrito en el documento WO 99/54440 o en el documento WO 2004/106381. De acuerdo con este modo de realización, cada porción específica de antígeno del anticuerpo monocatenario biespecífico comprende una región VH de anticuerpo y una región VL de anticuerpo. Las variantes ventajosas de este anticuerpo monocatenario biespecífico son desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal:

$V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 2),

$V_H(\text{CD19})\text{-}V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 4),

$V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})\text{-}V_H(\text{CD19})\text{-}V_L(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 6), o

$V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 8).

Más en particular, dentro del significado de la invención, el término "se une específicamente" o términos relacionados tales como "especificidad" se entiende que están caracterizados principalmente por dos parámetros: un parámetro cualitativo (el epítipo de unión, o *donde* se une un anticuerpo) y un parámetro cuantitativo (la afinidad de unión, o *lo fuerte que* se une este anticuerpo donde se une). Se puede determinar ventajosamente qué epítipo se une por un anticuerpo, por ejemplo, por metodología FACS, ELISA, cartografía de epítopos de péptido-SPOT, o espectroscopía de masas. La fuerza de unión del anticuerpo a un epítipo particular se puede determinar ventajosamente, por ejemplo, por metodologías Biacore y/o ELISA conocidas. Una combinación de dichas técnicas permite el cálculo de una proporción de señal:ruido como medida representativa de la especificidad de unión. En una proporción de señal:ruido de este tipo, la señal representa la fuerza de unión del anticuerpo al epítipo de interés, mientras que el ruido representa la fuerza de unión del anticuerpo a otros epítopos, no relacionados, que difieren el epítipo de interés. Una proporción de señal:ruido de, por ejemplo al menos 50, pero preferentemente de aproximadamente 80 para un respectivo epítipo de interés determinado, por ejemplo, por Biacore, ELISA o FACS, se puede tomar como indicativo de que el anticuerpo evaluado se une al epítipo de interés de una manera específica, es decir es una "proteína de unión específica". El término "que se une a/que interacciona con" también se puede referir a un epítipo conformacional, un epítipo estructural o un epítipo discontinuo que consiste en dos regiones de las moléculas diana humanas o partes de las mismas. En el contexto de la presente invención, un epítipo conformacional se define por dos o más secuencias de aminoácidos discretas separadas en la secuencia primaria que se unen sobre la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega a la proteína natural (Sela, (1969) Science 166, 1365 y Laver, (1990) Cell 61, 553-6). El término "epítipo discontinuo" quiere decir en el contexto de la invención epítopos no lineales que se ensamblan a partir de residuos de porciones distantes de la cadena polipeptídica. Estos residuos se unen sobre la superficie de la molécula cuando la cadena polipeptídica se pliega en una estructura tridimensional para constituir un epítipo conformacional/estructural.

De acuerdo con la presente invención, el término "región variable" usado en el contexto con la interacción con antígeno derivado de Ig comprende fragmentos y derivados de polipéptidos que al menos comprenden una CDR derivada de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado del mismo. Está contemplado por la invención, que dicha al menos una

CDR es preferentemente una CDR3, más preferentemente la CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo (CDR-H3). Sin embargo, otras CDR derivadas de anticuerpo también están comprendidas particularmente por el término "región variable".

5 El término "fragmento de anticuerpo o derivado del mismo" se refiere a anticuerpos monocatenarios, o fragmentos de los mismos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, un F(ab2)', Fv o scFv, anticuerpos de dominio único, etc., o un derivado modificado químicamente de cualquiera de estos. Los anticuerpos que se van a emplear de acuerdo con la invención o sus correspondientes cadenas de inmunoglobulina se pueden modificar adicionalmente fuera de los motivos usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delección/delecciones, inserción/inserciones, sustitución/sustituciones, adición/adiciones y/o
10 recombinación/recombinaciones de aminoácidos y/o cualquier otra modificación (por ejemplo, modificaciones postraduccionales y químicas, tales como glucosilación y fosforilación) conocida en la técnica sola o bien en combinación. Los procedimientos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición 1989 y 3ª edición 2001.

El término "péptido" o "polipéptido" como se usa en el presente documento describe un grupo de moléculas que comprenden el grupo de péptidos, así como el grupo de polipéptidos. El grupo de péptidos consiste en moléculas con hasta 30 aminoácidos, el grupo de polipéptidos consiste en moléculas con más de 30 aminoácidos.

20 El término "fragmento de anticuerpo o derivado del mismo" se refiere particularmente a construcciones peptídicas o polipeptídicas que comprenden al menos una CDR, preferentemente una CDR-H3.

Los fragmentos o derivados de las moléculas de anticuerpo citadas definen péptidos o polipéptidos que son partes de las moléculas de anticuerpo anteriores y/o que están modificadas por procedimientos químicos/bioquímicos o de biológica molecular. Los procedimientos correspondientes son conocidos en la técnica y se describen, entre otros, en manuales de laboratorio (véase Sambrook et al., loc cit.; Gerhardt et al.; Methods for General and Molecular
25 Bacteriology; ASM Press, 1994; Lefkovits; Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques; Academic Press, 1997; Golemis; Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002).

Los procedimientos para la identificación de motivos en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido dado son conocidos para el experto en la técnica y se describen en varios manuales de laboratorio (por ejemplo, en Sambrook et al., loc cit.; Mulhardt; Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics; Spektrum Akademischer Verlag, 2001). Además, dichos procedimientos se ejemplifican en los ejemplos adjuntos.

35 El término "administrado" como se usa en el presente documento quiere decir la administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo monocatenario biespecífico mencionado anteriormente para un individuo. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será determinable por un experto en la técnica usando técnicas conocidas. Como se conoce en la técnica y como se describe anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para la administración sistémica frente a localizada, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, periodo de administración, interacción con fármacos y la gravedad de la afección, y serán determinables con experimentación rutinaria por los expertos en la técnica.

40 El médico especialista y los factores clínicos determinarán el régimen de dosificación. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente.

45 Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en los intervalos expuestos en los modos de realización de la invención y los ejemplos adjuntos; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, en especial al considerar los factores mencionados anteriormente.

50 Como se describe en el presente documento, los estudios previos han usado preferentemente infusiones intravenosas rápidas para la administración de anticuerpos terapéuticos. El término "infusión intravenosa rápida" como se usa en el presente documento se refiere a una infusión que se interrumpe antes de 6 horas, mientras que el término "infusión continua" se refiere a una infusión que se deja proseguir de forma permanente durante al menos 6 horas sin interrupción. "Infusión continua" se refiere a una infusión administrada de forma permanente. En consecuencia, en el
55 contexto de la invención, los términos "permanente" y "continua" se usan como sinónimos. Dentro del significado de la invención de la invención, el término "administración durante al menos 6 h" indica una situación en la que el anticuerpo monocatenario biespecífico usado en los medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención se administra de forma continua en el cuerpo de un paciente de forma sostenida, constante, a lo largo de toda la duración

requerida en los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención. Se evita una interrupción de la introducción del anticuerpo monocatenario biespecífico, es decir, no se produce, o no se produce significativamente, una transición desde un estado en el que este anticuerpo se va a administrar al cuerpo del paciente hasta un estado en el que este anticuerpo ya no se va a administrar al cuerpo del paciente, durante toda la duración de la administración requerida por los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención por razones distintas a la reposición de la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico que se está administrando o intervenciones médicas que se hacen necesarias y similares. En la medida en que dicha reposición necesaria da lugar a la interrupción temporal de la introducción del anticuerpo administrado, dicha administración aún se debe entender como que es "ininterrumpida" o "permanente" en el sentido de los medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención. En la mayoría de los casos, dicha reposición, en general, será de una duración corta tal que el tiempo durante el que no se introduce el anticuerpo en el cuerpo del paciente será extremadamente pequeño en comparación con el tiempo planeado para el régimen de administración global de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención. Son especialmente preferentes los escenarios en los que la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico se produce de forma ininterrumpida o permanente durante al menos 1 semana; o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas o incluso más tiempo. En un modo de realización más preferente, el anticuerpo monocatenario biespecífico se administra de forma continua durante 24 h durante de 4 a 8 semanas, es decir durante 4, 5, 6, 7 o 8 semanas. Por ejemplo, puede ser que, después de la estadificación del/de los paciente(s) tratado(s) después de una administración continua de 4 semanas, se pueda diagnosticar una respuesta mínima o parcial (como se define a continuación) al anticuerpo monocatenario biespecífico tratamiento. En este caso, la administración continua se puede extender con el fin de lograr un resultado terapéutico aún mejor, por ejemplo, una respuesta completa. La administración ininterrumpida continua del anticuerpo monocatenario biespecífico en la manera de los medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención durante periodos de tiempo más largos permite que la activación ventajosa de células T mencionada a continuación ejerza su efecto el tiempo suficiente para eliminar ventajosamente todas las células enfermas del cuerpo. Puesto que la tasa de anticuerpo monocatenario biespecífico administrado de forma ininterrumpida se mantiene baja, se puede continuar más tiempo con la aplicación de agente terapéutico sin riesgo de efectos secundarios perjudiciales para el paciente.

Se ha descubierto que los efectos beneficiosos e inesperados de los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención se pueden obtener administrando el anticuerpo monocatenario biespecífico en una dosis diaria de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal. La dosis diaria se puede mantener constante durante el periodo de administración. Sin embargo, también está dentro del ámbito de este modo de realización que para el/los día(s) inicial(es) del periodo de infusión, se administre una dosis menor de anticuerpo monocatenario biespecífico ("dosis inicial") antes de los procedimientos farmacéuticos descritos en el presente documento, mientras que para el periodo de infusión restante se aplique una dosis mayor ("dosis de mantenimiento"). Por ejemplo, se pueden administrar 5 µg de anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal el primer día del periodo de infusión seguido de la administración de 15 µg por metro cuadrado de superficie corporal como dosis diaria durante el periodo restante. O, se pueden administrar 15 µg de anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal el primer día del periodo de infusión seguido de la administración de 45 µg por metro cuadrado de superficie corporal como dosis diaria durante el periodo restante. También se prevé que se puedan administrar 5 µg de anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal el primer día del periodo de infusión, seguido de la administración de 15 µg de anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal el segundo día del periodo de infusión, seguido de la administración de 45 µg por metro cuadrado de superficie corporal como dosis diaria (mantenimiento) durante el periodo restante. Por tanto, el primer día o el primer y segundo día de tratamiento, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico como se describe en el presente documento se puede administrar en una dosis inicial (diaria) de menos de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente con el fin de adaptar lentamente el organismo del paciente al tratamiento. A continuación, se puede administrar la dosis de mantenimiento real de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente. El promedio del área de superficie corporal de un paciente se calcula de este modo en el contexto del procedimiento, kit o uso de acuerdo con la invención para que esté en un intervalo de 1,7 a 2,2 m². Los inventores han descubierto que manteniendo la tasa de anticuerpo monocatenario biespecífico administrado de forma ininterrumpida (es decir, infundido de forma continua) en el mínimo absoluto requerido para lograr el efecto terapéutico deseado con el tiempo, se puede producir mejor el incremento en la activación de células T descrito anteriormente como tan beneficioso. Además de las ventajas enumeradas a continuación asociadas con la imitación de la activación de células T naturales, la aplicación de tasas menores de anticuerpo monocatenario biespecífico implica cantidades absolutas más pequeñas de anticuerpo monocatenario biespecífico administrado. Esto da como resultado menos costes para el paciente individual, lo que hace que el tratamiento de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención sea asequible para un segmento más amplio de pacientes que lo necesitan.

Dentro del significado de la invención, el término "linfoma no Hodgkin de células B" o "linfoma no Hodgkin derivado de células B" comprende el linfoma no Hodgkin de células B (B NHL) tanto indoloro como agresivo. El término "linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL)" como se usa en el presente documento representa enfermedades tumorales derivadas de células B malignas. Los B NHL indoloros son linfomas malignos de grado bajo. Los B-NHL agresivos son linfomas malignos de grado alto. El linfoma no Hodgkin de células B (B NHL) puede ser ventajosamente un linfoma folicular, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de células de la zona marginal, linfoma de células del manto (MCL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico de células pequeñas

(SLL/CLL) y cualquier otro subtipo derivado de células B. El término "leucemia de células B" como se usa en el presente documento puede ser ventajosamente cualquier leucemia de células B (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica o leucemia linfocítica aguda). Para referencia adicional, véase por ejemplo, <http://www.cancer.org>. Preferentemente, el linfoma de células B no Hodgkin indoloro se puede tratar con un anticuerpo monocatenario biespecífico dirigido contra tanto CD3 humano como CD19 humano como se demuestra en los siguientes ejemplos.

El término "prevención" como se usa en el presente documento se debe entender como sigue: Después de una remisión completa de la(s) lesión/lesiones de linfoma en un paciente humano después de tratamiento quimioterápico o radiológico de la(s) lesión/lesiones de linfoma puede darse el caso de que no todas las células del linfoma se puedan eliminar del cuerpo. Sin embargo, estas células tumorales restantes pueden dar lugar a linfomas recidivantes. Los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención se pueden usar para destruir estas células tumorales restantes con el fin de prevenir la recidiva del linfoma (que se origina de las células de linfoma ocultas que permanecen en el cuerpo después de un tratamiento primario). De esta forma, los medios y procedimientos farmacéuticos ayudan a prevenir la recidiva de la enfermedad en pacientes con B NHL o leucemia de células B.

En estudios clínicos internos, se ha evaluado el perfil de seguridad de un anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. Como resultado, se han descubierto efectos de la primera dosis no deseados después de infusiones intravenosas rápidas repetidas de dosis iguales de anticuerpo monocatenario biespecífico en pacientes con neoplasias malignas de células B resistentes al tratamiento. Como se muestra en el presente documento a continuación, la intensidad del CRS era la mayor después de la administración de la primera dosis, con una disminución en la respuesta a infusiones posteriores de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3. Después de 6 infusiones, casi no se observó inducción de niveles de citocinas en comparación con los niveles de referencia. Además, cuando se han administrado dosis en aumento gradual de anticuerpo monocatenario biespecífico a pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B en recidiva o resistente al tratamiento, se pudo observar una reducción en la intensidad del CRS después de la administración repetida de anticuerpo monocatenario biespecífico. Sin comprometerse con ninguna teoría, el fenómeno indicado se atribuye de forma más probable a una adaptación de las células T a un estímulo repetido ("silenciación de células T"). Además, cuando se monitorizan los números de células T en los pacientes tratados, se han descubierto fluctuaciones fuertes después de cada infusión, lo que sugiere una activación de células T de tipo ráfaga, a corto plazo. Se pudo demostrar la actividad biológica de un anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 en estos estudios, dando como resultado la activación de células T, liberación de citocinas y la disminución de los recuentos de células B, pero no se definió ninguna dosis biológica óptima (OBD). Además, se han observado efectos secundarios adversos asociados con CRS.

En contraste y como se descubrió sorprendentemente en el contexto de la presente invención, se pueden lograr los efectos biológicos deseados, es decir, la activación y expansión prolongadas de células T y la actividad citotóxica contra células tumorales por el anticuerpo monocatenario biespecífico descrito en el presente documento (reduciendo, minimizando o eliminando completamente además los efectos secundarios no deseados asociados normalmente con la aplicación intravenosa rápida de un anticuerpo terapéutico) por ejemplo, por la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico durante al menos 1 semana en una dosis diaria de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente, en la que dicha dosis diaria se administra durante al menos 6 h. Como se documenta en los ejemplos no limitantes adjuntos, son suficientes cantidades bajas de anticuerpo monocatenario biespecífico, es decir 15 µg/m² de anticuerpo monocatenario biespecífico administradas de forma continua durante 24 h durante al menos dos semanas a pacientes con linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL/CLL) o linfoma folicular, para la activación y proliferación in vivo prolongadas de células T, dando como resultado una respuesta antitumoral sustancial: Dos pacientes tuvieron una respuesta parcial (RP), es decir una reducción de seis linfomas de referencia de más de un 50 %. Además, en uno de estos pacientes, se ha demostrado una eliminación eficaz de células de linfoma de médula ósea, lo que es difícil de lograr por enfoques convencionales tales como quimioterapia. De forma importante, dichas dosis bajas de anticuerpo monocatenario biespecífico dan lugar a una respuesta de células T más fisiológica en pacientes en comparación con la administración intravenosa rápida de anticuerpo monocatenario biespecífico. Además, los procedimientos y usos proporcionados en el presente documento no provocan efectos secundarios adversos significativos asociados normalmente con la activación de células T, tales como CRS. Estas dosis bajas aún pueden inducir una respuesta antitumoral beneficiosa en pacientes con linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B.

Con los esquemas de administración previos que usan infusiones intravenosas rápidas, aún con la dosis de partida más baja administrada en ensayos clínicos de fase I internos, se ha observado una caída repentina en los recuentos leucocitos de sangre periférica, incluyendo células T CD3+, CD4+, y CD8+ (véanse los ejemplos). Una explicación para esta caída es la repentina adhesión y migración (al menos parcial) de células T activadas y otros leucocitos activados en tejidos. Se cree que la disfunción y perturbación endoteliales resultantes de los perfiles de citocinas locales provocadas por esta activación de células T de tipo ráfaga del anticuerpo monocatenario biespecífico administrado de forma intravenosa rápida, contribuyen significativamente a los efectos secundarios adversos observados normalmente en CRS. Por el contrario, como se demuestra en los siguientes ejemplos, los medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención permiten una activación (y desplazamiento) más gradual de poblaciones de células T lo que sugiere que la cantidad de citocinas liberadas se reduce drásticamente. La provisión de medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención evita, por tanto, fenómenos tales como una perturbación repentina de redes de citocinas locales. Consecuentemente, no se ha informado de efectos secundarios

adversos significativos de pacientes tratados de acuerdo con los procedimientos y usos de la presente invención. Además, la administración de anticuerpo monocatenario biespecífico de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención no provoca ninguna fluctuación drástica de células T como se observa, por ejemplo, después de las infusiones intravenosas rápidas de anticuerpo monocatenario biespecífico.

5 Como se muestra en los ejemplos, aunque se pudo observar un ligero descenso en el número de células T al comienzo del periodo de infusión (que es lo más probable debido al esteroide coadministrado), el tratamiento de acuerdo con la invención más bien da lugar a un incremento en el número de células T activadas en la sangre. Específicamente, los números de células T CD8+ citotóxicas se incrementan debido a la proliferación. Esto es de particular relevancia para enfermedades tumorales que muestran proporciones de células efectoras:diana (*effector:target*, E:T) no favorables, tales como lesiones de linfomas de células B, alcanzando proporciones de E:T de 1:100 - 1:1000 in vivo. Dichas proporciones de E:T no favorables pueden dar como resultado una destrucción de células B mucho más lenta como se sugiere por experimentos in vitro anteriores. Bajo dichas condiciones se debe suponer que las mismas células T tienen el potencial para la destrucción repetida de células B dando lugar a una reducción significativa de la masa tumoral. Además, se puede plantear como hipótesis que se puede requerir una expansión del conjunto de células T localizado en la neoplasia maligna de células B (por ejemplo, en el linfoma de células B) que mejore la proporción de E:T, para lograr un resultado terapéutico. Puesto que los medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención proporcionan al menos un incremento constante o uniforme en los números de células T activadas en el torrente circulatorio, el potencial citotóxico frente a células tumorales, por ejemplo, células B tumorales en linfomas de células B se mejora con el tiempo.

20 Además, los medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención dan lugar a una activación prolongada de células T CD8+ ejemplificada por el marcador de activación de células T HLA-DR (marcador de activación prolongada) en comparación con CD69 o CD25 (marcador de activación a corto plazo). Como se ha señalado anteriormente, la cantidad baja de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 administrada de forma continua es suficiente para incrementar el número de células T CD8+ activadas durante un largo periodo de tiempo, como se demuestra, por ejemplo, en los ejemplos adjuntos y en las figuras 6 a 8. Esto está en claro contraste con la activación de células T de tipo ráfaga observada después de la administración intravenosa rápida de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3; véase, por ejemplo, la fig. 1. La presencia prolongada de anticuerpo monocatenario biespecífico de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención que permite la activación y proliferación prolongadas de células T gradual es, por tanto, particularmente adecuada para el tratamiento de enfermedades tumorales caracterizadas por proporciones de E:T no favorables, tales como linfomas de células B. Además, se ha observado que después de un reinicio de la infusión continua (por ejemplo, después de una intervención médica), se produce una activación y expansión mucho más rápidas y más fuertes de células T CD8+ citotóxicas. Por tanto, es preferente que se lleven a cabo varias rondas de ciclos de infusión seguido por periodos sin infusión. Por ejemplo, está dentro del alcance de la presente invención que un paciente pueda recibir una infusión continua del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento durante cuatro semanas seguido de un periodo sin infusión de cuatro semanas. A continuación, se puede repetir esta secuencia una vez, dos veces, tres veces o incluso más a menudo.

40 Además, aunque se puede observar una activación prolongada de células T en pacientes tratados de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención, los efectos secundarios adversos asociados se reducen significativamente o incluso se eliminan. Por tanto, los efectos secundarios relacionados con CRS se pueden minimizar o prevenir por la aplicación del anticuerpo monocatenario biespecífico de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención.

45 Finalmente, se debe recalcar que aunque se han aplicado cantidades bajas de anticuerpo monocatenario biespecífico en los usos, procedimientos y kits descritos en el presente documento; el tratamiento con anticuerpo es muy eficaz en la eliminación de células B tumorales, provocando de este modo una respuesta antitumoral detectable in vivo. Esto se ejemplifica por los recuentos de células B en las figuras 9 y 11 y por las reducciones de tamaño de linfoma mostradas en las figuras 10 y 13. En particular, dos pacientes tratados de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención tuvieron una respuesta parcial, es decir una reducción de seis lesiones de linfoma de referencia de más de un 50 %. Además, en uno de estos pacientes, se ha demostrado una eliminación eficaz de células de linfoma de la médula ósea, véase la figura 12. Por lo tanto, cuando se aplican los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención, los efectos secundarios adversos se reducen o se eliminan sin ninguna disminución concomitante de la actividad citotóxica.

55 Por el contrario, un modo de administración intravenosa rápida de productos terapéuticos de anticuerpo da como resultado una activación a corto plazo, masiva, de células T y la posterior relocalización/desplazamiento de células T activadas al endotelio y al tejido dejando sólo pequeños números de células T eficaces en el torrente circulatorio. Como es conocido en la técnica, el endotelio se puede romper gravemente por la activación masiva de células T y la posterior adhesión de células T a las células endoteliales y la migración a los tejidos. Bajo condiciones patológicas, se puede observar una activación repentina de células T, por ejemplo, en septicemia masiva provocada por toxinas bacterianas (véase, por ejemplo, Li (2004), Br. J. Pharmacol. 141(4): 709-16; Matzen (2004), Virus Res. 104(2): 145-55; Jacob HS. (1980) Arch. Pathol. Lab. Med. 104(12): 617-20; Salyer (1990), Am. J. Pathol. 136(4): 831-41; Okajima (2004) Curr. Vase. Pharmacol. 2(2): 125-33; Ferrero (2004) Methods Mol. Med. 98: 127-36). Además, esta activación de células T de tipo ráfaga está asociada con efectos secundarios adversos provocados por citocinas. Con

los estudios de dosificación previos que usan infusiones intravenosas rápidas, aún con la dosis de partida más baja administrada en ensayos clínicos de fase I internos, también se ha observado una caída repentina en los recuentos leucocitos de sangre periférica, incluyendo células T CD3+, CD4+, y CD8+. Una explicación para esta caída es la repentina adhesión y migración (al menos parcial) de células T activadas y otros leucocitos activados en tejidos. Se plantea la hipótesis de que dicha activación y desplazamiento abruptos de enormes poblaciones de células T activadas (aproximadamente un 70 % del conjunto de células T humanas reside en cualquier momento en la sangre periférica) dan como resultado una perturbación en la homeostasis de células T y perfiles de citocinas locales en tejidos.

Por tanto, una exposición significativamente prolongada al anticuerpo monocatenario biespecífico y una disminución significativa en la dosis dada por unidad de tiempo en comparación con los estudios de fase I previos incrementa potencialmente la tolerabilidad y maximizan la actividad antitumoral del fármaco.

En estudios clínicos previos que investigan la seguridad y tolerabilidad de infusiones intravenosas rápidas repetidas de anticuerpo monocatenario biespecífico anti CD19 x anti CD3, se han observado fluctuaciones no deseadas de números de células T después de cada infusión, lo que sugiere una activación de células T de tipo ráfaga dependiente de cada infusión. De forma notable, se ha descubierto este efecto para la administración de las dosis tanto iguales como en aumento del anticuerpo monocatenario biespecífico indicado.

La provisión de medios y procedimientos farmacéuticos de acuerdo con la invención manifiesta un patrón cualitativamente distinto de la activación de células T en comparación con el obtenido después de una infusión intravenosa rápida de mayores cantidades de anticuerpo. Específicamente, se ha descubierto que la administración de anticuerpo monocatenario biespecífico de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención da lugar a un incremento inicial lento seguido del mantenimiento de una respuesta inmunitaria celular constante o incluso incrementada que imita *in vivo* a la observada en la evolución de infecciones naturales, por ejemplo, infecciones víricas. En una infección natural, las células T circulantes específicas para un antígeno patógeno se activan cuando se encuentran con este antígeno al drenar tejidos linfáticos. Después de dicha activación en una infección natural, se produce una proliferación de subconjuntos de células T, que son específicos para el antígeno patógeno. Este incremento se correlaciona, debido a la proliferación de células T CD8⁺, con un incremento en el potencial citotóxico frente al patógeno invasor, o hacia células infectadas por este patógeno. Los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención simulan, por tanto, la respuesta inmunitaria para una infección natural, por ejemplo, una infección vírica ya que se produce un incremento lento y gradual en el número de células T activadas.

En resumen, la presente invención proporciona principales ventajas:

- simulación de una respuesta de células T más fisiológica, sin fluctuaciones drásticas de células T, número constante o incluso incrementado de células T efectoras (citotóxicas) en el torrente circulatorio
- reducción en la liberación de citocinas/sin efectos de la primera dosis debido a bajas cantidades de anticuerpo monocatenario biespecífico, con actividad antitumoral eficaz (CTL) (dos pacientes con respuesta parcial, de los que uno presenta eliminación eficaz de células de linfoma de la médula ósea)
- reducción en los efectos secundarios adversos
- minimización de la activación de células T anómala provocada por ciclos repetidos de activación y desactivación de células T
- activación y expansión prolongadas de células T citotóxicas
- presencia prolongada del fármaco que ayuda a superar las proporciones no favorables de E:T presentes con frecuencia en lesiones de linfoma que dan lugar a una destrucción de las células B mucho más lenta de lo que se esperaba originalmente
- presencia prolongada del fármaco que permite que tenga lugar la destrucción repetida de células B, realizada por una y la misma célula T, y por tanto, garantiza la reducción de masas tumorales significativas
- una expansión de un conjunto de células T localizado mejora la proporción de E:T y el resultado terapéutico
- hay una notable variación en la actividad *in vitro* (reflejada en la variación del valor de CE₅₀) entre donantes diferentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El tiempo de exposición extendida al fármaco mejora la actividad citotóxica dirigida a anti-CD19 en una proporción significativa de pacientes.

Por tanto, una exposición significativamente prolongada al fármaco y una disminución significativa en la dosis dada por unidad de tiempo en comparación con los estudios de fase I previos incrementan potencialmente la tolerabilidad y maximizan la actividad antitumoral del fármaco dando como resultado un mejor perfil de seguridad.

La administración de acuerdo con el régimen de la invención puede ser durante 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h por día, o incluso durante 24 h. Preferentemente, la administración de acuerdo con el régimen de la invención es durante 10 h, más preferentemente durante 12 h, o aún más preferente durante 24 h.

En un modo de realización preferente de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento, uso o kit de la invención, la dosis diaria de dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se administra durante al menos 8 h, más preferentemente al menos 10 h.

5 En un modo de realización aún más preferente de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento, uso o kit de la invención, la dosis diaria se administra durante al menos 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h o 22 h. Lo más preferentemente, la dosis diaria se administra durante todo el día, es decir durante 24 h.

10 En otro modo de realización preferente de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento, uso o kit de la invención, dichas regiones V_H y V_L de dicho dominio específico de CD3 se derivan de un anticuerpo específico de CD3 seleccionado del grupo que consiste en: OKT-3, X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT31, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2 y F101.01. Cada uno de estos anticuerpos está bien descrito en la técnica.

15 Más en particular, dicha región V_H de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR3 que comprende o que es la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 11, dicha región V_H de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR2 que comprende o que es la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 10 y/o dicha región V_H de dicho dominio específico de CD3 comprende preferentemente al menos una región CDR1 que comprende o que es la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 9.

20 La construcción de la invención también puede comprender regiones V_L . Dicha región V_L de dicho dominio específico de CD3 puede comprender al menos una región CDR3 que comprende o que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 14, dicha región V_L de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR2 que comprende o que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 13 y/o dicha región V_L de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR1 que comprende o que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 12.

25 Se entiende que en un modo de realización más preferente, las CDR definidas anteriormente (CDR1, CDR2, CDR3) están comprendidas en una única construcción biespecífica que se va a administrar de acuerdo con la presente invención.

30 En otro modo de realización preferente de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento, uso o kit de acuerdo con la invención, la región V_H de dicho dominio específico de CD3 comprende o es SEQ ID NO 17, la región V_H de dicho dominio específico de CD19 comprende o es SEQ ID NO 15, la región V_L de dicho dominio específico de CD3 comprende o es SEQ ID NO 18 y/o la región V_L de dicho dominio específico de CD19 comprende o es SEQ ID NO 16.

También se prevé que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento, uso o kit de la invención haga uso de una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

- (a) una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO 2,4, 6 u 8;
- 35 (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO 1,3, 5 o 7;
- (c) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % con una secuencia de ácido nucleico de (b), en la que dicha secuencia de aminoácidos se puede unir (específicamente) a CD3 y CD19; y
- 40 (d) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que es redundante como resultado del código genético para una secuencia de ácido nucleico de (b), en la que dicha secuencia de aminoácidos se puede unir (específicamente) a CD3 y CD 19.

45 Si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es idéntica al menos en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos definida en el presente documento se puede determinar de forma convencional usando programas informáticos conocidos. Un procedimiento preferente para determinar el mejor emparejamiento global entre una secuencia de consulta (una secuencia definida en el presente documento) y una secuencia sujeto, también denominada alineación de secuencias global, se puede determinar usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245(1990)). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y sujeto son ambas secuencias de

50 ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar convirtiendo U en T.

En un modo de realización preferente de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento, uso o kit de la invención, dichos dominios variables están conectados por secuencias enlazadoras y/o espaciadoras adicionales como se define anteriormente y como se muestra, por ejemplo, en el documento WO 2004/106381.

En un modo de realización preferente de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento, uso o kit de la invención, la administración diaria se continúa durante al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas o al menos 8 semanas. En consecuencia, también se prevé que se lleve a cabo la administración en una base permanente durante al menos 6 h por día, preferentemente durante al menos 8 h por día, más preferentemente al menos 10 h por día, lo más preferentemente 24 h por día, durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas o incluso más tiempo. También se prevé que se lleven a cabo varias rondas de ciclos de infusión seguido por periodos sin infusión. Por ejemplo, un paciente puede recibir una infusión continua del anticuerpo monocatenario biespecífico definido en el presente documento durante cuatro semanas seguido de un periodo sin infusión de cuatro semanas. A continuación, esta secuencia se puede repetir una vez, dos, tres veces o incluso más a menudo, hasta que las lesiones de linfoma están bajo un nivel detectable por medios convencionales, por ejemplo, tomografía axial computarizada. De forma ventajosa, la administración se extiende hasta que se logra una respuesta completa, es decir se destruyen todas o esencialmente todas las células de linfoma. Además, se ha observado que después de un reinicio de la infusión continua (por ejemplo, después de un periodo sin infusión o después de una intervención médica), se produce una activación y expansión mucho más rápidas y más fuertes de células T CD8+ citotóxicas. Por tanto, es preferente que se lleven a cabo varias rondas de ciclos de infusión seguido por periodos sin infusión.

En otro modo de realización preferente de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento, uso o kit de acuerdo con la invención, la composición farmacéutica se administra en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticos.

La presente invención también es útil en conductas coterapéuticas y en régimen/regímenes de coterapias. En determinados modos de realización, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en el presente documento se van a administrar en combinación con uno o más de otros tratamientos. En determinados modos de realización, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en el presente documento se van a administrar a un paciente simultáneamente con uno o más de otros tratamientos. Preferentemente, dichos tratamientos son útiles para el tratamiento de B NHL o leucemia de células B como se define en el presente documento. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de agentes farmacéuticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino más bien quiere decir que los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en el presente documento y el otro agente se van a administrar a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en el presente documento pueden actuar juntos con el otro agente para proporcionar un incremento en el beneficio mayor que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente farmacéutico o terapéutico se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden a diferentes puntos temporales; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, se deben administrar lo suficientemente próximos en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o farmacéutico deseado.

Cada agente (co)terapéutico se puede administrar por separado, es una forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En otros modos de realización, los anticuerpos monocatenarios biespecíficos como se definen en el presente documento se van a administrar antes, simultáneamente o después de intervención quirúrgica. Preferentemente, la intervención quirúrgica retira completamente los linfomas localizados o reduce el tamaño de tumores grandes. También se puede realizar una intervención quirúrgica como medida preventiva o para aliviar el dolor.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en el presente documento se engloban por los términos terapéuticamente eficaces. Típicamente, la dosificación y la frecuencia variarán adicionalmente de acuerdo con factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o farmacéuticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de B NHL o leucemia de células B, la vía de administración, así como la edad, peso corporal, respuesta, y los antecedentes personales del paciente. Se pueden seleccionar regímenes adecuados por un experto en la técnica considerando dichos factores y siguiendo, por ejemplo, dosificaciones informadas en la literatura y recomendadas en el Physicians' Desk Reference (59ª ed., 2005).

En algunos modos de realización, el tratamiento por administración de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos se define en el presente documento se puede combinar con la administración de uno o más tratamientos tales como quimioterapias, radioterapias, hormonoterapia y/o tratamientos biológicos/inmunoterapias. Los agentes farmacéuticos o terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, moléculas proteínicas, incluyendo, pero sin limitarse a, péptidos, polipéptidos, proteínas, incluyendo proteínas modificadas postraduccionalmente, anticuerpos etc.; o moléculas pequeñas (menos de 1000 daltons), compuestos orgánicos o inorgánicos; o moléculas de ácido nucleico incluyendo, pero sin limitarse a, ADN monocatenario o bicatenario, o ARN monocatenario o bicatenario; así como moléculas de ácido nucleico de triple hélice. Los agentes farmacéuticos o terapéuticos se pueden derivar de cualquier organismo conocido (incluyendo, pero sin limitarse a, animales, plantas, bacterias, hongos y protistas o virus) o de una colección de moléculas sintéticas.

Dicho cotratamiento comprende la coadministración de uno o más agentes terapéuticos o farmacéuticos antes, durante y/o después de la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico. Dichos agentes terapéuticos o farmacéuticos que se van a coadministrar con el anticuerpo biespecífico son preferentemente productos quimioterápicos usados en tratamiento de linfoma no Hodgkin (NHL) estándar, tales como derivados de platino, antraciclinas, agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa, antibióticos, inhibidores de la

mitosis, antitubulinas y similares. Sin embargo, el cotratamiento también puede estar destinado a reducir la inflamación. Aquí, es especialmente preferente coadministrar, de cualquiera de las maneras establecidas anteriormente, un agente antiinflamatorio, por ejemplo, un glucocorticoesteroide. Como se describe en los ejemplos adjuntos, antes de la administración continua del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3, se han administrado 100 mg de esteroide a los pacientes con el fin de suprimir la producción de citocinas en la fase inicial de la administración continua. De forma alternativa, también se puede administrar esteroide en la fase inicial del día 1 al día 4 de la administración continua de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. La dosificación de esteroide administrado por ejemplo, 1 h antes de la infusión continua el día 1 puede ser de 500 mg, el día 2 (después de 24 h de infusión continua) 250 mg, el día 3 (después de 48 h de infusión continua) 125 mg y el día 4 (después de 72 h de infusión continua) 125 mg. Sin embargo, también se prevé que no se administre ningún esteroide antes, durante o después de la administración continua de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. Por supuesto, también se pueden administrar en combinación productos quimioterapéuticos y agentes antiinflamatorios. En el caso en el que se produce la coadministración durante la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico, se puede producir dicha coadministración durante toda la duración de la administración de dicho anticuerpo, o durante sólo una o más partes del mismo. Por ejemplo, está dentro de del ámbito de este modo de realización de la invención que dicha coadministración se pueda iniciar antes de la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico, y pueda terminar después de que haya comenzado la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico. En un caso de este tipo, puede ser ventajoso omitir cualquier coadministración adicional en todo el resto de la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico, o de forma alternativa puede ser ventajoso reanudar la coadministración de un agente farmacéutico en un punto más tarde, durante y/o después de la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico. También puede ser ventajoso estructurar el régimen de cotratamiento de modo que cualquier coadministración se produzca sólo antes y/o después de la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico, pero no durante la administración ininterrumpida. Como tal, "un régimen de cotratamiento" dentro del significado de este modo de realización de la invención se debe entender como que comprende, en un sentido cronológico, la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico. Esto quiere decir que el régimen de cotratamiento se puede realizar, en algunos casos, durante un periodo de tiempo más largo que la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico, puesto que es posible coadministrar un agente farmacéutico como parte del cotratamiento antes de y/o después de la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico. A la inversa, el régimen de cotratamiento se puede realizar durante un periodo de tiempo más corto que la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico, puesto que la coadministración del régimen de cotratamiento puede tener lugar durante sólo una fracción de tiempo durante la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico. Preferentemente, dicho esteroide se administra de acuerdo con el esquema y en la dosificación mostrada en los ejemplos o como se indica anteriormente.

Si se da la coadministración como infusión continua a lo largo de todo el periodo de tiempo de la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico de acuerdo con la invención, ambos agentes (el/los usado(s) para el cotratamiento y el anticuerpo monocatenario biespecífico) se podían combinar en una solución. El agente usado para el cotratamiento se podía añadir directamente a la solución/formulación en la que el anticuerpo monocatenario biespecífico se aplica al paciente. Además, el agente usado para el cotratamiento y el anticuerpo monocatenario biespecífico también se pudo aplicar en paralelo como soluciones separadas durante el mismo tiempo.

En algunos casos, el cotratamiento puede ser ventajoso o necesario, dependiendo de las condiciones existentes, presuntas o esperadas en el paciente que se somete al tratamiento de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención. Dicha coadministración se puede producir como una o más aplicaciones intravenosas rápidas antes, durante o/y después de la administración ininterrumpida de acuerdo con los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención. De forma alternativa, dicha coadministración también puede ser de una naturaleza ininterrumpida, y, en este caso, puede tener lugar al mismo tiempo, e incluso en el mismo vehículo de administración que la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico como se expone en el procedimiento, kit o uso de acuerdo con la invención.

El anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento y el/los otro(s) agente(s) terapéutico(s) pueden actuar de forma sinérgica. Como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" se refiere a una combinación de tratamientos (por ejemplo, una combinación de un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento y (un) otro(s) agente(s) farmacéutico(s) o terapéutico(s) como se expone en el presente documento) que es más eficaz que los efectos aditivos de cualquiera de dos o más tratamientos individuales (por ejemplo, uno o más agentes farmacéuticos o terapéuticos). Un efecto sinérgico de una combinación de tratamientos (por ejemplo, una combinación de un anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento y (un) otro(s) agente(s) farmacéutico(s) o terapéutico(s) como se expone en el presente documento) permite el uso de menores dosificaciones de uno o más de los tratamientos (por ejemplo, uno o más agentes farmacéuticos o terapéuticos) y/o la administración menos frecuente de dichos tratamientos a un paciente con una enfermedad, por ejemplo, B NHL o leucemia de células B como se define en el presente documento. La capacidad de utilizar menores dosificaciones de tratamientos (por ejemplo, agentes farmacéuticos o terapéuticos) y/o de administrar dichos tratamientos con menos frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de dichos tratamientos a un sujeto sin reducir la eficacia de dichos tratamientos en la prevención o tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, B NHL o leucemia de células B como se define en el presente documento. Además, un

- efecto sinérgico puede dar como resultado una mejora en la eficacia de los tratamientos (por ejemplo, agentes farmacéuticos o terapéuticos) en la prevención, abordaje, tratamiento y/o mejora de B NHL o leucemia de células B como se define en el presente documento. Finalmente, el efecto sinérgico de una combinación de tratamientos (por ejemplo, agentes farmacéuticos o terapéuticos) puede evitar o reducir efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier tratamiento individual.
- 5 En otro modo de realización, el cotratamiento puede estar destinado a reducir la inflamación. Aquí, es especialmente preferente coadministrar, en cualquiera de las maneras establecidas anteriormente, un agente antiinflamatorio, por ejemplo, un glucocorticoesteroide.
- 10 El régimen de cotratamiento de este modo de realización de la invención también puede proporcionar ventajosamente una señal de activación para las células efectoras inmunitarias, para la proliferación celular o para la estimulación celular.
- 15 La administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser intravenosa, parenteral, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular o pulmonar. El modo de administración intravenoso, en la mayoría de los casos, será el modo de elección para administrar de forma ininterrumpida el anticuerpo monocatenario biespecífico y, según sea el caso, para la coadministración de un agente farmacéutico como parte de un régimen de cotratamiento. Como tal, la administración intravenosa es especialmente preferente. En este caso, se puede elegir de forma ventajosa un dispositivo de dosificación adecuado tal como una bomba de infusión multitratamiento modelo 6060 fabricado por Baxter. Sea cual sea el dispositivo de dosificación elegido, debe ser de un diseño y construcción tales como para minimizar o, mejor, impedir una interrupción de la administración del agente terapéutico en el caso de intercambio de cartucho y/o reemplazo o recarga de la pila eléctrica. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, eligiendo un dispositivo con un depósito secundario de solución de anticuerpo monocatenario biespecífico aparte del cartucho que se va a intercambiar de modo que la infusión continua de este segundo depósito en el paciente puede continuar aún cuando el cartucho vacío o casi vacío se retira y se reemplaza con uno nuevo.
- 20 Un modo de administración intravenosa y, según sea el caso, de coadministración como parte de un régimen de cotratamiento implica la implantación de una bomba en el cuerpo del paciente para dosificar dicha administración. Un experto en la técnica tiene conocimiento de dichas bombas de dosificación, por ejemplo, el modelo 6060 fabricado por Baxter como se expone anteriormente.
- 25 Como ejemplo no limitante, puede ser que la administración ininterrumpida, es decir continua, se va a realizar por un sistema de bomba pequeño llevado por o implantado en el paciente para dosificar la entrada de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. Dichos sistemas de bomba, en general, son conocidos en la técnica, y comúnmente se basan en el intercambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico que se va a infundir. Cuando se intercambia el cartucho en un sistema de bomba de este tipo; puede darse una interrupción temporal del flujo ininterrumpido de otro modo de agente terapéutico en el cuerpo del paciente. En este caso, la fase de administración anterior al reemplazo del cartucho y la fase de administración después del reemplazo del cartucho aún se consideraría dentro del significado de los medios y procedimientos farmacéuticos de la invención para formar conjuntamente una "administración ininterrumpida" de dicho agente terapéutico. Se aplicaría lo mismo para administraciones muy largas en las que el cartucho requeriría el reemplazo más de una vez, o en el que las pilas eléctricas que accionan la bomba requerirían un reemplazo, dando lugar a una compensación temporal del flujo de solución terapéutica en el cuerpo del paciente.
- 30 También se deben tomar medidas apropiadas para minimizar el daño de infección en el sitio de administración de punción en el cuerpo del paciente, ya que dichas heridas prolongadas son especialmente propensas a dicha infección. Lo anterior también se aplica para la administración intramuscular por medio de un sistema de administración similar.
- 35 La administración continua puede ser transdérmica por medio de un parche puesto sobre la piel y reemplazado a intervalos. Un experto en la técnica tiene conocimiento de sistemas de parches para una administración de fármaco adecuada para este propósito. Cabe señalar que la administración transdérmica es especialmente adecuada para una administración ininterrumpida, ya que el intercambio de un primer parche agotado se puede lograr de forma ventajosa simultáneamente con la colocación de un nuevo segundo parche, por ejemplo sobre la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche agotado e inmediatamente antes de la retirada del primer parche agotado. No surgen problemas de interrupción de flujo ni de fallos en la pila eléctrica.
- 40 En otro modo de realización preferente, la administración continua se logra por medio de una vía pulmonar, por ejemplo, por medio de un tubo puesto en una o ambas narinas de la nariz, estando conectado el tubo a un depósito presurizado, del que el contenido está dosificado de forma precisa.
- 45 Sin embargo, como se ilustra en el presente documento y en los ejemplos adjuntos, el modo de administración más preferente es una administración intravenosa durante el tiempo/periodo de tiempo dado.
- 50 El anticuerpo monocatenario biespecífico como se usa en el presente documento está ventajosamente en forma de una composición farmacéutica para su administración a un paciente humano. Aunque el anticuerpo monocatenario biespecífico como se usa en el presente documento se puede administrar solo, es preferente la administración en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la
- 55

técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, liposomas, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. El régimen de dosificación se determinará por el médico especialista y por factores clínicos.

5 Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen suspensiones o soluciones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos
10 inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, suspensiones o soluciones acuosas, incluyendo medios tamponados y solución salina. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio o Ringer con lactato. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en la dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antibióticos, antioxidantes,
15 agentes quelantes, y gases inertes y similares. Además, la composición puede comprender vehículos proteináceos, como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferentemente de origen humano. Se prevé que la composición pueda comprender, además del anticuerpo monocatenario biespecífico proteináceo, otros agentes biológicamente activos, dependiendo del uso destinado de la composición farmacéutica. Dichos agentes pueden ser agentes que actúan como agentes citostáticos, agentes que previenen la hiperuricemia, agentes que inhiben
20 reacciones inmunitarias (por ejemplo, corticoesteroides, FK506), fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como moléculas coestimuladores de células T o citocinas conocidas en la técnica.

Preferentemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento se formula en un tampón, un estabilizante y un tensioactivo. El tampón puede ser un tampón fosfato, citrato, succinato o acetato. El estabilizante puede ser (un) aminoácido(s) y/o un azúcar. Los tensioactivos pueden ser detergentes, PEG, o similares.
25 Más preferentemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico como se define en el presente documento se formula en citrato, lisina, trehalosa y Tween 80. Como diluyente para la composición farmacéutica de la invención, es preferente solución salina isotónica y Tween 80.

Preferentemente, en los usos, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en procedimientos o kits de la invención, la composición farmacéutica se va a administrar a un paciente humano.

30 El éxito del tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico se puede monitorizar por procedimientos estándar establecidos por las respectivas entidades de enfermedad: Para el tratamiento de leucemia de células B se pueden usar por ejemplo, recuentos de leucocitos, fórmulas leucocitarias, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), aspiración de médula ósea y varios parámetros químicos clínicos específicos de leucemia y otros procedimientos estándar establecidos. Para el tratamiento de linfoma de células B se pueden usar por ejemplo,
35 tomografía computarizada, rayos X, tomografía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, para la evaluación de la respuesta basada en los criterios del National Cancer Institute (Cheson (1999), J. Clin. Oncol.; 17(4):1244), detección por tomografía de emisión de positrones, recuentos de leucocitos, fórmulas leucocitarias, clasificación de células activadas por fluorescencia, aspiración de médula ósea, biopsias/histologías de ganglios linfáticos, y varios parámetros químicos clínicos específicos de linfoma (por ejemplo, lactato deshidrogenasa) y otros procedimientos estándar establecidos.
40

La citotoxicidad se puede detectar por procedimientos conocidos en la técnica y procedimientos que se ilustran en el presente documento a continuación y en los ejemplos adjuntos.

Figura 1: Estudio de aumento escalado de la dosis del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 intravenoso (bscCD19xCD3) administrado a un paciente con linfoma no Hodgkin de células B en recidiva (B NHL) -
45 efecto en los recuentos de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ periféricos. El paciente 0202 diagnosticado con NHL de células B en recidiva recibió seis administraciones intravenosas de bscCD19xCD3, durante 4 horas en una pauta de tratamiento de dos veces por semana. La dosis de bscCD19xCD3 se aumentó de forma escalada en las siguientes dosis: 1, 2, 4, 7, 10 y 13 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de área de superficie corporal. El número de linfocitos T CD3+ (diamantes grises), linfocitos T CD4+ (cuadrados negros) y linfocitos T CD8+ (triángulos negros), indicado como el porcentaje de número total de linfocitos, se determinó por citometría de flujo antes y al final de 4 h de infusión los días 0, 2, 7, 9, 14 y 16,
50 respectivamente. Los periodos de infusión de 4 h se indican por flechas y barras grises.

Figura 2: Estudio de aumento escalado de la dosis de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 intravenoso (bscCD19xCD3) administrado a un paciente con una neoplasia maligna de células B resistentes al tratamiento - efecto sobre las concentraciones séricas de TNF alfa. El paciente 1003 diagnosticado con un linfoma de células del manto (MCL) recibió seis infusiones de 1,5 (dosis inicial el día 0) y 3 μg (dosis de mantenimiento los siguientes días del estudio) bscCD19xCD3, durante cuatro horas, los días del estudio 0, 2, 4, 14, 16 y 18. Las concentraciones séricas de TNF alfa se determinaron antes y después del periodo de infusión de 4 h. Los periodos de infusión de 4 h se indican por flechas y barras grises.
55

Figura 3: Estudio de aumento escalado de la dosis de bscCD19xCD3 intravenoso administrado al paciente 1003 como se indica en la leyenda para la figura 2 - efecto sobre las concentraciones séricas de IFN gamma.
60

Figura 4: Estudio de aumento escalado de la dosis de bscCD19xCD3 intravenoso administrado al paciente 1003 como se indica en la leyenda para la figura 2 - efecto sobre concentraciones séricas de IL6.

Figura 5: Estudio de aumento escalado de la dosis de bscCD19xCD3 intravenoso administrado al paciente 1003 como se indica en la leyenda para la figura 2 - efecto sobre concentraciones séricas de IL10.

5 Figura 6: Análisis de recuentos de células T CD3⁺ / CD8⁺ y CD3⁺ / CD4⁺. Las células T CD8⁺ y CD4⁺ desaparecieron en gran parte de la sangre periférica después del inicio de la infusión del bscCD19xCD3, lo que se explica como un fenómeno distribucional desencadenado por la activación de células T a través de la reticulación por el bscCD19xCD3 de células T y B de sangre periférica. Sin embargo, después de media semana de tratamiento, las células T CD8⁺ y CD4⁺ reaparecieron en la sangre y se incrementaron adicionalmente en número hasta el día 7 y 21, respectivamente.
10 En comparación con sus valores de partida, las células T CD8⁺ y CD4⁺ mostraron una expansión de 3,5 a 4 veces en las sangre. Los recuentos de células T CD8⁺ y CD4⁺ permanecieron altos durante las semanas de tratamiento 2 y 3, antes de que los números de células T comenzaran a disminuir durante la cuarta semana de tratamiento. Los recuentos de células T CD8⁺ y CD4⁺ todavía estuvieron por encima de los correspondientes valores de pretratamiento después de 4 semanas de infusión del bscCD19xCD3, cuando se diagnosticó la reducción tumoral sustancial
15 cumpliendo los criterios de una respuesta parcial.

Figura 7: Análisis de subpoblaciones de células T CD8⁺. El subconjunto de memoria efector TEM fue responsable casi exclusivamente de la expansión de células T CD8⁺ inducida por el bscCD19xCD3. Las células T CD8⁺ representan la mayoría de la actividad citotóxica entre todas las células T y las células TEM junto con el subconjunto TEMRA representan la mayoría de la actividad citotóxica entre las células T CD8⁺. Excepto por el subconjunto TEM, no se
20 pudieron observar cambios significativos en recuentos celulares entre las otras subpoblaciones de células T CD8⁺ como las células T indiferenciadas que no pueden proliferar después de una única señal de activación proporcionada por el bscCD19xCD3 o el subconjunto TEMRA que no puede proliferar en absoluto. Por tanto, la expansión selectiva de las células TEM CD8⁺ competentes para proliferación se puede atribuir claramente a la división celular y la proliferación en respuesta al contacto de las células TEM CD8⁺ con las células de linfoma B decoradas por el
25 bscCD19xCD3 dentro del tumor. Se puede excluir una contribución significativa a la expansión de células T de las células de linfoma B decoradas por el bscCD19xCD3 circulante en la sangre, debido a que las células de linfoma B circulantes ya se han eliminado de la sangre periférica el día 3, es decir, antes de la expansión de células T observada.

Figura 8: Análisis de marcadores de activación de células T CD8⁺. La expansión de células T CD8⁺ está precedida por la fuerte activación de células T CD8⁺ como se indica por una regulación por incremento sostenida del marcador de
30 activación HLA-DR. Otros marcadores de activación como CD69 y CD25 sólo mostraron una corta regulación por incremento transitoria después del inicio de la infusión del bscCD19xCD3, lo que se explica por la activación a través de la célula de linfoma B decorada con el bscCD19xCD3 circulante en la sangre siempre y cuando las células de linfoma B circulantes se eliminaran durante los primeros 3 días de tratamiento. Por el contrario, la regulación por incremento sostenida de HLA-DR durante 3 semanas refleja la activación de células T CD8⁺ dentro del tumor a través
35 del contacto con células de linfoma B residentes en el tumor decoradas por el bscCD19xCD3. La activación intratumoral de las células T da como resultado una respuesta de células T proliferativa dentro del tumor lo que da lugar a la expansión de las células T, que, de forma secundaria, también aparece en la sangre circulante. Esas células T activadas en el tumor y a continuación migradas a la sangre todavía muestran el marcador de activación prolongado HLA-DR pero ya han regulado por disminución los marcadores de activación a corto plazo CD69 y CD25.

40 Figura 9: Recuentos de células B del paciente #105003. El paciente comenzó con aproximadamente 140 células (de linfoma) B por ml de sangre antes del tratamiento. Después del comienzo de la infusión del, las células (de linfoma) B circulantes descendieron rápidamente dentro de los 3 primeros días de tratamiento y finalmente desaparecieron por completo de la sangre periférica al final de la primera semana de tratamiento. Por tanto, el bscCD19xCD3 puede eliminar totalmente las células (de linfoma) B circulantes debido a su actividad citotóxica frente a dichas células.

45 Figura 10: (A) Medida del tamaño de la lesión de linfoma #2 (como se expone en la tabla en la figura 10(B)) antes (panel izquierdo; 26,09,05) y después (panel derecho; 31,10,05) de 4 semanas de tratamiento con el bscCD19xCD3 por tomografía axial computarizada (TAC). (B) La reducción de tamaño del linfoma mostrado en (A) se cuantificó como se representa en la tabla mostrada en (B) junto con otras cinco lesiones de linfoma seleccionadas para la evaluación de la eficacia. La reducción de tamaño de linfoma total se expresa como porcentaje de disminución de la suma de los
50 productos de los diámetros transversales más largos (es decir, Suma de diámetros de productos (*Sum Product Diameters*) o SPD) de las seis lesiones de linfoma seleccionadas. En consecuencia, se pudo diagnosticar una reducción del linfoma de un 58,0 % cumpliendo los criterios de una respuesta parcial (RP).

Figura 11: Recuentos de células B del paciente #102003. El paciente comenzó con 920 células (de linfoma) B por ml de sangre antes del tratamiento. Después del inicio de la infusión del bscCD19xCD3, las células (de linfoma) B
55 circulantes mostraron una rápida disminución seguido de una fase transitoria de recuperación limitada de 600 células por ml dentro de los 3 primeros días consistente con la redistribución de células. En el curso adicional de tratamiento, las células (de linfoma) B se eliminaron totalmente de la circulación hasta que se diagnosticó la respuesta parcial (RP) después de 2 semanas de tratamiento. Estos datos confirman que el bscCD19xCD3 puede eliminar completamente las células (de linfoma) B circulantes como parte de su eficacia clínica.

Figura 12: Histopatología de médula ósea del paciente #102003 antes y después de 2 semanas de tratamiento con el bscCD19xCD3.

5 Panel izquierdo antes del tratamiento con el bscCD19xCD3: La médula ósea muestra una infiltración de médula ósea de un 40-50 % por células de linfoma linfocítico de células pequeñas. Panel derecho después de dos semanas de tratamiento con el bscCD19xCD3: Ya no se pudieron encontrar pruebas de infiltración con células de linfoma linfocítico de células pequeñas, mientras que se pudo observar un incremento significativo de células T.

10 Figura 13: (A) Medida del tamaño de 4 lesiones de linfoma mediastínico del paciente #102003 (como se expone en la tabla en la figura 13(B)) antes (panel izquierdo; 02,05,05) y después (panel derecho; 31,05,05) de 2 semanas después del tratamiento con el bscCD19xCD3 por tomografía axial computarizada (TAC). (B) La reducción de tamaño del linfoma mostrado en (A) se cuantificó como se representa en la tabla mostrada en (B) junto con otras dos lesiones de linfoma (retroperitoneal y mesenterial) seleccionadas para la evaluación de la eficacia. La reducción de tamaño de linfoma total se expresa como porcentaje de disminución de la suma de los productos de los diámetros transversales más largos (es decir, Suma de diámetros de productos (Sum Product Diameters) o SPD) de las seis lesiones de linfoma seleccionadas. En consecuencia, se pudo diagnosticar una reducción del linfoma de un 57,2 % cumpliendo los
15 criterios de una respuesta parcial (RP).

20 Figura 14: La expansión de células T CD8+ se correlaciona con las diferentes respuestas clínicas. Se muestran los cursos celulares de los subconjuntos de TEM CD8+ para 2 pacientes, es decir, los pacientes # 109002 (respuesta completa) y # 105003 (respuesta parcial) que alcanzaron diferentes respuestas clínicas. También se representa la contribución de las 4 primeras y segundas semanas de tratamiento, respectivamente a la respuesta clínica global así como el área bajo la curva del subconjunto TEM (ABC) para las 4 primeras semanas. La contribución máxima a la respuesta clínica de los pacientes se produce dentro de las 4 primeras semanas de tratamiento y se correlaciona bien con la expansión del subconjunto TEM CD8+. La proliferación de estas células T altamente citotóxicas parece ser un
25 prerequisite para un beneficio clínico como se destaca por las observaciones de que tanto el número absoluto de células alcanzado como el incremento relativo en comparación con los niveles de pre-tratamiento contribuyen a una respuesta clínica óptima.

Figura 15: linfoma ilíaco detectado por TAC (marcado por círculo) en el paciente # 109002: Tamaño antes del tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 3,2 x 2,2 cm². La misma lesión de linfoma ha disminuido de tamaño a 1,7 x 1,2 cm² después de 4 semanas de infusión continua de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. Después de 8 semanas de infusión continua de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3, el linfoma había desaparecido, es decir, el tamaño se había normalizado al de un ganglio linfático normal (0,8 x 0,8 cm²).
30

Figura 16: La infusión continua de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 al paciente # 109002 normalizó el tamaño del bazo, que se agrandó de forma masiva antes del tratamiento.

35 La invención se describirá ahora por referencia a los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y no se deben interpretar como una limitación del alcance de la invención.

Ejemplo 1:

1. Construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos CD19xCD3 y CD3xCD19 que comprenden varios reordenamientos de dominios.

40 En general, se diseñaron moléculas de anticuerpo monocatenario biespecífico, comprendiendo cada una un dominio con especificidad de unión por el antígeno de CD3 humana, así como un dominio con especificidad de unión por el antígeno de CD19 humana, como se expone en la siguiente tabla 1:

Tabla 1: Formatos de moléculas de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprenden especificidades anti-CD3 y anti-CD 19

Número de construcción	SEQ ID NO (nucl/prot)	Formatos de construcciones de proteína (N→C)
1	1/2	VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3)
2	3/4	VH(CD19)-VL(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3)
3	5/6	VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CD19)-VL(CD19)
4	7/8	VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CD19)-VH(CD19)

45 Los dominios variable de cadena ligera (VL) y variable de cadena pesada (VH) del hibridoma HD37 (Pezutto, J. Immunol. 138 (1997), 2793-9) se clonaron de acuerdo con procedimientos PCR estándar (Orlandi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 3833-7). La síntesis de ADNc se llevó a cabo con cebadores oligo dT y Taq polimerasa. Para la amplificación de los dominios anti-CD19 V por medio de PCR, se usaron los cebadores 5' L1 (SEQ ID NO: 19) y 3' K

(SEQ ID NO: 20), que flanquean el dominio VL, y 5H1 (SEQ ID NO: 21), y 3'G (SEQ ID NO: 22) para la cadena pesada, en base a los cebadores descritos por Dubel, J. Immunol. Methods 175 (1994), 89-95. El ADNc del fragmento scFv anti-CD3 se proporcionó amablemente por Traunecker (Traunecker, EMBO J. 10 (1991)3655-9).

5 La construcción 1 como se expone en la tabla 1 se generó como sigue. Para obtener un fragmento scFv anti-CD19, se clonaron las correspondientes regiones VL y VH en vectores plasmídicos separados, sirvieron como moldes para una PCR específica de VL y VH usando los pares de cebadores oligonucleotídicos 5'VLB5RRV (SEQ ID NO: 23) / 3'VLGS15 (SEQ ID NO: 24) y 5'VHGS15 (SEQ ID NO: 25) / 3'VHBspE1 (SEQ ID NO: 26), respectivamente.

10 Se introdujeron secuencias complementarias superpuestas en los productos de PCR que se combinaron para formar la secuencia codificante de enlazador (Gly₄Ser₁)₃ de 15 aminoácidos durante la posterior PCR de fusión. Se realizó la etapa de amplificación con el par de cebadores 5'VLB5RRV (SEQ ID NO: 23) / 3'VHBspE1 (SEQ ID NO: 26) y el producto de fusión resultante (o más bien fragmento scFv anti-CD 19) se escindió con las enzimas de restricción EcoRV y BspE1 y así se clonó en el vector Bluescript KS (Statagene), que contenía la secuencia codificante (EcoR1/Sal1 clonado) del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-17-1A/anti-CD3 (en realidad la versión sin la marca Flag) (Kufer, Cancer Immunol. Immunother. 45 (1997) 193). De este modo, se reemplazó la especificidad anti-17-1A por el fragmento scFV anti-CD 19, preservando el enlazador Gly₄Ser de 5-aminoácidos que conecta con el fragmento scFv anti-CD3 C terminal. Posteriormente, el fragmento de ADN que codifica el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19/anti-CD3 con el ordenamiento de dominio VL_{CD19}-VH_{CD19}-VH_{CD3}-VL_{CD3} se subclonó en los sitios EcoR1/Sal1 del vector de expresión descrito pEF-DHFR (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-5). Se transfectó el ADN plasmídico resultante en células CHO deficientes en DHFR por electroporación. La selección, amplificación de genes y producción de proteínas se realizaron como se describe previamente (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-5). La secuencia de ADN correspondiente a la construcción 1 como se expone en la tabla 1 es como se representa en SEQ ID NO: 1. La traducción de proteína de esta secuencia de ADN (con líder) es como se representa en SEQ ID NO: 2.

25 Las construcciones restantes como se exponen en la tabla 1 se construyeron como sigue. Se usó la secuencia de ADN correspondiente a SEQ ID NO: 1 (construcción 1), de la que su traducción de proteína se representa por SEQ ID NO: 2, como molde de PCR en el diseño de varios anticuerpos monocatenarios biespecíficos anti-CD3 / anti-CD19 expuestos en la tabla 1.

30 Para generar un ordenamiento VH-VL de CD 19 en la posición A1 y A2 (como se define en las figuras 1A y 1B del documento WO2004/106381), se usó la PCR con la respectiva combinación de cebadores 5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36) y 3'VHCD19GS15 (SEQ ID NO: 37) o 5'VLCD19GS15 (SEQ ID NO: 38) y 3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39). Durante esos ciclos de PCR se introdujeron secuencias complementarias superpuestas en los productos de PCR formando la secuencia codificante de un enlazador de 15 aminoácidos durante la posterior PCR de fusión. Se fusionaron los dominios VL y VH amplificados en una segunda reacción de PCR (PCR de fusión) en la que sólo se requirieron los cebadores externos, a saber 5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36) y 3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39), y ambos amplicones.

Se usó un procedimiento similar que empleaba otras combinaciones de cebadores para la construcción de otros ordenamientos de dominio. Se diseñó un conjunto de cebadores apropiados para realizar múltiples etapas de clonación a base de PCR, dando como resultado finalmente los diversos ordenamientos de dominios VL-VH. Las combinaciones de cebadores usadas se enumeran en la siguiente tabla:

40 Tabla 2: Resumen de las etapas de clonación a base de PCR usadas para la construcción de las posiciones A1 y A2 de las construcciones 1 a 4 como se muestra en la tabla 1

Etapa PCR	Cebadores usados		Etapa PCR	Cebadores usados	Orden de dominio N terminal resultante
PCR A1	5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36)	3'VHCD19GS15 (SEQ ID NO: 37)	PCR fusión A1+A2	5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36)	CD 19 VH-VL
PCR A2	5'VLCD19GS15 (SEQ ID NO: 38)	3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39)		3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39)	
PCR A1	5'VHBsrGI (SEQ ID NO: 32)	3'VHL2KGS15 (SEQ ID NO: 33)	PCR fusión A1 +A2	5'VHL2KBsrGI (SEQ ID NO: 32)	Anti-CD3 VH-VL
PCR A2	5'VLL2KGS15 (SEQ ID NO: 34)	3'VLL2KBspEI (SEQ ID NO: 35)		3'VLL2KBspEI (SEQ ID NO: 35)	
PCR A1	5'VLL2KBsrGI (SEQ ID NO: 40)	3'VLL2KGS15 (SEQ ID NO: 41)	PCR fusión A1+A2	5'VLL2KBsrGI (SEQ ID NO: 40)	Anti-CD3 VL-VH
PCR A2	5'VHL2KGS15 (SEQ ID NO: 42)	3'VHL2KBspEI (SEQ ID NO: 43)		3'VHL2KBspEI (SEQ ID NO: 43)	

Con el fin de cambiar el ordenamiento de dominio VH-VL en la posición C terminal, a saber las posiciones B1 y B2 como se define en las figuras 1A y 1B del documento WO2004/106381, se diseñaron los siguientes cebadores que comprenden los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para realizar las etapas de clonación a base de PCR.

- 5 Tabla 3: Resumen de las etapas de clonación a base de PCR usadas para la construcción de las posiciones B1 y B2 de las construcciones 1 a 4 como se muestra en la tabla 1

Etapa PCR	Cebadores usados		Orden de dominio C terminal resultante
PCR B1 + B2	5'VLCD19BspEIGS (SEQ ID NO: 31)	3'VHCD19BspEI (SEQ ID NO: 44)	CD19VL-VH
	5' VHCD19BspEIGS (SEQ ID NO: 29)	3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 30)	CD19 VH-VL
	5' VLL2KBspEIGS (SEQ ID NO: 27)	3'VHL2KBspEI (SEQ ID NO: 28)	Anti-CD3 VL-VH

10 Se clonó el correspondiente producto de PCR, que se flanqueó por dos sitios BspEI, en un plásmido designado BS-CTI, que se digirió con las enzimas de restricción BspEI y XmaI. Se insertó antes un polienlazador designado CTI (SEQ ID NO: 45) en el vector Bluescript KS (número de acceso de GenBank X52327) usando los sitios de escisión de enzimas de restricción XbaI y Sall con el fin de proporcionar sitios de escisión adicionales así como la secuencia que codifica un enlazador G4S, seis residuos de histidina consecutivos y un codón de terminación. Durante la etapa de clonación, se fusionó el sitio BspEI del dominio VH con el sitio XmaI del plásmido destruyendo de este modo ambos sitios. La orientación correcta del dominio variable se verificó por secuenciación de acuerdo con protocolos estándar.

15 Todos los procedimientos biológicos moleculares indicados anteriormente se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos estándar descritos en Sambrook, Molecular Cloning (A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001).

20 Los ADN que codifican los anticuerpos monocatenarios biespecíficos en la tabla 1 (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7) se transfectaron en células CHO deficientes en DHFR para la expresión de proteínas eucariotas en células CHO deficientes en DHFR como se describe en Mack et al. (Mack, Proc Natl Acad Sci USA 92 (1995), 7021-25). La amplificación de genes de la construcción se indujo incrementando las concentraciones de metotrexato (MTX) hasta una concentración final de MTX 20 nM. A continuación, se expandieron las células transfectadas y se produjo 1 litro de sobrenadante.

2. Expresión y purificación de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos dirigidos frente a CD3 y CD19

25 Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO). Se realizó la transfección del vector de expresión siguiendo un tratamiento con fosfato de calcio de las células ("Molecular Cloning", Sambrook et. al. 1989). Se hicieron crecer las células en frascos rotatorios con medio DMEM modificado para CHO (HiQ®, HiClone) durante 7 días antes de la recogida. Se retiraron las células por centrifugación y el sobrenadante que contenía la proteína expresada se almacenó -20 °C.

30 Para la cromatografía se usaron el sistema Akta® FPLC (Pharmacia) y el programa informático Unicorn®. Todos los productos químicos eran de calidad de investigación y se compraron de Sigma (Deisenhofen) o Merck (Darmstadt). Se realizó una cromatografía de afinidad de metales inmovilizados ("IMAC") usando una columna Fractogel® (Merck) que se cargó con ZnCl₂ de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Se equilibró la columna con tampón A2 (tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,5, NaCl 0,4 M) y se aplicó el sobrenadante de cultivo celular (500 ml) a la columna (10 ml) a un caudal de 3 ml/min. Se lavó la columna con tampón A2 para retirar la muestra no unida. Se eluyó la proteína unida se eluyó usando un gradiente en 2 etapas de tampón B2 (tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,5, NaCl 0,4 M, imidazol 0,5 M) de acuerdo con lo siguiente:

Etapa 1: tampón B2 al 20 % en 6 volúmenes de columna;

Etapa 2: tampón B2 al 100 % en 6 volúmenes de columna.

Las fracciones de proteína eluida a partir de la etapa 2 se agruparon para su purificación adicional.

40 Se realizó una cromatografía de filtración en gel en una columna Sephadex S200 HiPrep (Pharmacia) equilibrada con PBS (Gibco). Las muestras de proteína eluidas (caudal 1 ml/min) se sometieron a SDS-PAGE estándar y análisis de bandas western para su detección. Antes de la purificación, se calibró la columna para la determinación del peso molecular (kit de marcadores de peso molecular, Sigma MW GF-200). Se determinaron las concentraciones de proteína usando un colorante de ensayo de proteínas (MicroBCA, Pierce) e IgG (Biorad) como proteína estándar.

45 Se aislaron los anticuerpos monocatenarios biespecíficos en un procedimiento de purificación de dos etapas de IMAC y filtración en gel. El producto principal tenía un peso molecular de aproximadamente 52 kDa en condiciones naturales,

como se determina por filtración en gel en PBS. Este peso molecular corresponde al anticuerpo monocatenario biespecífico. Todas las construcciones se purificaron de acuerdo con este procedimiento.

5 La proteína de anticuerpo monocatenario biespecífico purificada se analizó en SDS PAGE en condiciones reductoras realizada con geles bis-tris preformados al 4-12 % (Invitrogen). La preparación y la aplicación de las muestras se realizaron de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Se determinó el peso molecular con patrón proteínico MultiMark (Invitrogen). El gel se tiñó con Coomassie coloidal (protocolo de Invitrogen). La pureza de la proteína aislada fue de un > 95 %, como se determinó por SDS-PAGE.

10 El análisis de bandas western se realizó usando una membrana Optitrans® BA-S83 y el módulo de bandas de Invitrogen de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Los anticuerpos usados se dirigieron contra la marca His (Penta His, Qiagen) e Ig de cabra anti-ratón marcada con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) y BCIP/NBT (Sigma) como sustrato. El anticuerpo monocatenario biespecífico se pudo detectar específicamente por Western Blot. Se detectó una única banda a 52 kD correspondiente a la molécula biespecífica purificada.

3. Análisis de unión por citometría de flujo de polipéptidos específicos de CD19xCD3

15 Con el fin de probar la funcionalidad de las construcciones con respecto a la capacidad de unión a CD19 y CD3, se realizó el análisis FACS. Para este propósito, se usaron células NALM-6 positivas para CD19 (leucemia precursora de células B humanas) y células Jurkat positivas para CD3 (leucemia de células T humanas). Se incubaron respectivamente 200.000 células NALM-6 y 200.000 células Jurkat durante 30 min en hielo con 50 µl del sobrenadante celular puro de cultivos de células CHO expresando cada uno anticuerpos biespecíficos con diferentes ordenamientos de dominios VH y VL de CD19 y CD3 (como se describe en la sección 2, *supra*). Se lavaron dos veces las células en PBS y se detectó la unión de la construcción como sigue. Las células tratadas como se describe anteriormente se pusieron en contacto con un anticuerpo penta His murino no unido (diluido 1:20 en 50 µl de PBS con FCS al 2 %; Qiagen; N.º orden 34660), que se une específicamente a la construcción unida a células por medio de la marca histidina C terminal de las construcciones. Siguió una etapa de lavado para retirar el anticuerpo Penta His murino no unido. Se detectaron los anticuerpos anti-His unidos con un anticuerpo específico frente a Fc gamma (Dianova) conjugado con ficoeritrina, diluido 1:100 en 50 µl de PBS con FCS al 2 %. Como control negativo, se usó medio de cultivo recién preparado en lugar de sobrenadante de cultivo.

20 Se analizaron las células por citometría de flujo en un aparato FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg). La tinción de FACS y la medida de la intensidad de fluorescencia se realizaron como se describe en Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach y Strober, Wiley-Interscience, 2002). La capacidad de unión de varios ordenamientos de dominio fueron claramente detectables como se muestra en el documento WO2004/106381. En el análisis FACS, todas las construcciones con ordenamiento diferente de los dominios VH y VL específicos para CD 19 y CD3 mostraron una unión a CD3 en comparación con el control negativo usando medio de cultivo y anticuerpo de detección 1. y 2. Se observó una fuerte actividad de unión resultante en un desplazamiento en la intensidad de fluorescencia $>5 \times 10^1$ para las construcciones a las que se hace referencia en la tabla 1.

35 4. Bioactividad de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos específicos para CD19 y CD3

Se determinó la actividad citotóxica de los anticuerpos biespecíficos con los dominios VH y VL reordenados en un ensayo de citotoxicidad basado en la liberación de fluorocromos. Se usaron células NALM-6 positivas para CD19 como células diana ($1,5 \times 10^7$) marcadas con calceína AM 10 µM (Molecular Probes, Leiden, Netherland, n.º C-1430) durante 30 min a 37 °C en medio de cultivo celular. Después de dos lavados en el medio de cultivo celular, se contaron las células y se mezclaron con las células CB15 de clones de células T positivas para CD4 (amablemente proporcionadas por el Dr. Fickenscher, Universidad de Erlangen/Nuernberg, Alemania). Se mezclaron 2×10^6 células CB15 y 2×10^5 células NALM-6 por ml (proporción E:T de 1:10) y se usaron 50 µl de esta suspensión por pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se diluyeron los anticuerpos en RPMI/FCS al 10 % hasta la concentración requerida y se añadieron 50 µl de esta solución a la suspensión celular. Se incubó una reacción estándar a 37 °C/CO₂ al 5 % durante 2 horas. Después de la reacción citotóxica, el colorante liberado en el medio de incubación se puede cuantificar en un lector de fluorescencia (Tecan, Crailsheim, Alemania) y comparar con la señal de fluorescencia de una reacción de control (sin anticuerpo biespecífico), y la señal de fluorescencia obtenida para las células totalmente lisadas (durante 10 min en saponina al 1 %). En base a estas lecturas, se calculó la citotoxicidad específica de acuerdo con la siguiente fórmula: [Fluorescencia (Muestra) - Fluorescencia (Control)] : [Fluorescencia (Lisis total) - Fluorescencia (Control)] x 100.

Típicamente, las curvas de respuesta a la dosis sigmoidales tuvieron valores de $R^2 > 0,97$ como se determinó por Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, EE. UU.). Los valores de CE₅₀ calculados por el programa de análisis se usaron para la comparación de la bioactividad.

55 Como se muestra en el documento WO2004/106381, todas las construcciones revelaron actividad citotóxica frente a células NALM-6 que expresan CD19. La bioactividad más fuerte con valores de CE₅₀ < 500 pg/ml se detectó para las construcciones mostradas en la tabla 1, *supra*.

Ejemplo 2:

Uso clínico de bscCD19xCD3 en un paciente con linfoma de células B

5 En un uso compasivo, una paciente (mujer, nacida en 1937) que padece de leucemia linfocítica crónica derivada de células B (B-CLL) se ha tratado con el anticuerpo monocatenario biespecífico bscCD19xCD3 (SEQ ID NO.2) como se describe en detalle en el documento WO 99/54440. El análisis FACS reveló que un 95 % de las células de sangre periférica de la paciente eran células positivas para CD19 mientras que un 77 % de las células expresaban el antígeno CD20. La incubación de las células de sangre periférica de la paciente con el bscCD19xCD3 mostró una eliminación pronunciada de células B positivas para CD19. Para prevenir cualquier reacción aguda de citocinas y complicaciones de lisis tumoral, la paciente tomó dosis profilácticas IV de 2 mg de clemastina (Tavegil®) y 200 mg de cimetidina (Tagamet®) así como 300 mg de alopurinol y 20 mg de omeprazol (Antra®).

10 La paciente recibió una primera dosis de 3 µg de bscCD19xCD3 como infusión de 20 min en tampón fosfato isotónico que contenía seroalbúmina humana al 5 % (HSA). Durante la infusión, la paciente no tuvo ningún efecto adverso. Aproximadamente 1 hora después de la infusión, la paciente tuvo escalofríos durante aproximadamente 5 minutos seguido de sudoración, una disminución moderada de la presión sanguínea en aproximadamente 10 mm Hg y un incremento moderado de la temperatura corporal (+ 0,5 °C) durante unas pocas horas. Además, su cefalea empeoró ligeramente. La paciente se trató con otros 2 mg de Tavegil® y 200 mg de Tagamet®, 250 mg de prednisolona (Solu-Decortin®) y 50 mg de petidina (Dolantin®). Todos los síntomas se liberaron sin secuelas el mismo día.

15 Se administró una segunda dosis de 10 µg de bscCD19xCD3 un día después bajo las mismas condiciones referidas anteriormente. Aproximadamente 1 hora después de la infusión, la paciente tuvo escalofríos notables, fiebre (39,2 °C), ligera hiperventilación y una reacción hipotensiva. La paciente se trató con 2 mg de Tavegil, 200 mg de Tagamet y 300 mg de Solu-Decortin y 15 mg de piritramida (Dipidolor®). Para la estabilización de su función cardiovascular, la paciente recibió una infusión de dopamina y reposición de la volemia. Después de este tratamiento, los síntomas disminuyeron notablemente.

20 Durante los 3 días siguientes, la paciente continuó teniendo una temperatura subfebril (aproximadamente 37,2 °C) y desarrolló derrame pleural menor un día después de la segunda dosis y edema leve de las extremidades inferiores.

25 Se realizó una ecografía del bazo y de cinco ganglios linfáticos abdominales y axilares un día y 4 días después de la administración de la segunda dosis de bscCD19xCD3. Ya un día después de la dosis de 10 µg, los ganglios linfáticos así como el bazo mostraron una reducción de aproximadamente un 20 % en comparación con el tamaño de los ganglios linfáticos y el bazo antes del tratamiento. Esta observación se confirmó en una segunda evaluación con ecografía. El peso del bazo disminuyó en 350 g (de 1630 g antes del tratamiento a 1280 g después del tratamiento).

30 El número de leucocitos, que incluyen mayormente células B malignas, disminuyó durante el curso del tratamiento y los días de seguimiento. La proteína C reactiva (CRP) es una proteína de reacción de fase aguda que refleja la activación de células T y el efecto de citocinas proinflamatorias. Se incrementó notablemente después de la administración de 10 µg de bscCD19xCD3, seguido de una disminución continua durante los 3 días de observación siguientes.

35 El nivel de citocinas séricas que refleja la respuesta inmunológica aguda a la administración del compuesto, se midió antes y en varios intervalos después de la administración del compuesto. Los niveles séricos de citocinas se midieron por un ensayo ELISA cuantitativo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El factor de necrosis tumoral TNF-α se incrementó significativamente de manera dependiente de la dosis dentro de la primera hora después de la administración de bscCD19xCD3. La interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 8 (IL-8) también mostraron un incremento significativo y dependiente de la dosis. Sus niveles máximos se observaron de 2 a 4 horas después de la administración del bscCD19xCD3.

40 Como conclusión, se administró bscCD19-CD3 de forma segura a una paciente que padece de B-CLL resistente al tratamiento. Aunque se han observado efectos secundarios adversos debidos lo más probablemente a la liberación de citocinas, la tolerabilidad del bscCD19xCD3 a las dosis de 3 µg y 10 µg era aceptable y se pudo controlar bien por medio de medidas profilácticas y tratamiento sintomático. De forma importante, el bscCD19xCD3 provocó una reducción de los ganglios linfáticos y del bazo previamente agrandados de la paciente, como se muestra en la ecografía. Puesto que el agrandamiento del bazo y los ganglios linfáticos está provocado por infiltraciones con células B malignas, la reducción refleja la destrucción de las células B malignas como resultado de la administración de bscCD19xCD3.

Ejemplo 3:

Estudio en fase I del aumento escalado de la dosis - paciente 0202

55 El propósito de este estudio en fase I de aumento escalado de la dosis era el de investigar la dependencia de la dosis de cambios en la actividad inmunológica en tejido diana tumoral de pacientes con linfoma no Hodgkin de células B en recidiva (NHL). Para este fin, se programó que cada paciente recibiera seis administraciones intravenosas de un anticuerpo biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO.2; véase también el documento WO 99/54440), durante 4

horas en una pauta de tratamiento de una o dos veces por semana los días 0, 2, 7, 9, 14 y 16. La dosis de anti-CD19 x anti-CD3 se aumentó de forma escalada intra-individualmente en las siguientes dosis: 1, 2, 4, 7, 10 y 13 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de área de superficie corporal.

5 Para evaluar la influencia de las dosis de bscCD19xCD3 aumentadas de forma escalada sobre el número y la distribución de subconjuntos de linfocitos circulantes, se recogieron muestras de sangre completa antes y durante la administración. El número total de linfocitos se determinó por análisis de fórmula leucocitaria y el número de subpoblaciones de linfocitos determinado por análisis de FACS y expresado como el porcentaje de linfocitos totales, como se describe en el ejemplo 2. En particular, los números de células T CD3+, CD4+ y CD8+ en células mononucleares de sangre periférica se ha determinado por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

10 Como se ejemplifica en la figura 1 para un paciente (es decir, paciente 0202) que completó la fase de tratamiento con el fármaco, incluso con la dosis de partida más baja de anticuerpo biespecífico, se ha observado un descenso repentino en los números de células T CD3+, CD4+ y CD8+ (mostrado como un porcentaje del número total de linfocitos) dentro del periodo de infusión de 4 h. Los números de células T se restablecieron a los valores aproximadamente de predosis en 24 a 48 h. Se ha observado una progresión de curva similar de recuentos de células T en otros pacientes incluidos en este estudio. Una explicación para esta caída es la repentina adhesión y migración (al menos parcial) de células T y otros leucocitos activados en tejidos. Se plantea la hipótesis de que dicha activación y desplazamiento repentinos de enormes poblaciones de células T activadas (aproximadamente un 80 % del conjunto de células T humanas reside en cualquier momento en la sangre periférica) dan como resultado una perturbación en la homeostasis de células T así como una alteración en los perfiles de citocinas locales en tejidos. De hecho, la administración de fármaco a los pacientes de acuerdo con el modo mostrado en la figura 1 dio lugar a efectos secundarios adversos. Este resultado sugirió que una activación y desplazamiento más graduales de las poblaciones de células T pueden estar más próximas a una respuesta inmunitaria fisiológica y pueden evitar fenómenos tales como la perturbación repentina de redes de citocinas locales y efectos secundarios adversos que resultan de los mismos.

25 Ejemplo 4:

Fase I del ensayo clínico - paciente 1003

30 En otro ensayo clínico, el perfil de seguridad de infusión intravenosa repetida del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO: 2; véase también el documento WO 99/54440), la dosis tolerada máxima y la dosis biológica óptima se sometió a prueba en pacientes con linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo resistente al tratamiento (B NHL) o leucemia de células B. Cada paciente recibió seis infusiones de anti-CD19 x anti-CD3, durante dos o cuatro horas, los días del estudio 0, 2, 4, 14, 16 y 18. Se trató a un total de 15 pacientes con dosis de hasta 3,0 $\mu\text{g}/\text{m}^2$.

35 Se tomaron muestras de sangre a diferentes puntos temporales antes y durante la administración del fármaco para seguir los parámetros bioquímicos, hematológicos e inmunológicos. Los números de células T se han determinado como se describe. Además, usando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y matriz citométrica de microesferas (CBA), se han determinado los niveles séricos de citocinas de los pacientes.

40 Cuando se monitorizan los números de células T en los pacientes tratados, se han descubierto fluctuaciones fuertes después de cada infusión, lo que sugiere una activación de células T de tipo ráfaga, a corto plazo, como también se observa en estudios previos; véase el ejemplo 3. Además, como se muestra en las figuras 2 a 5 para un paciente (es decir, paciente 1003) diagnosticado con un linfoma de células del manto (MCL), tras la infusión del anticuerpo biespecífico, se ha descubierto una fuerte liberación de citocinas de TNF alfa, interferón gamma, interleucina-6 e interleucina-10 en los pacientes tratados. La intensidad de liberación de citocinas era la mayor tras la administración de la primera dosis, con una disminución de la respuesta a posteriores infusiones del anticuerpo biespecífico anti-CD 19x anti-CD3 (efecto de la primera dosis). Después de 6 infusiones, casi no se observó inducción de niveles de citocinas.

45 Como en el estudio mostrado en el ejemplo 3, la activación repentina de células T y la liberación de citocinas dio lugar a efectos secundarios adversos en los pacientes. La mayoría de estos acontecimientos fueron de gravedad leve a moderada y todos transitorios. Las anomalías de laboratorio más frecuentes se observaron en varios parámetros hematológicos y de coagulación, siendo también transitorios, y mayormente de leves a moderados en naturaleza y significación clínica. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que puede ser necesaria una activación de células T más gradual para evitar fenómenos tales como la perturbación repentina de redes de citocinas locales observadas en el ensayo clínico descrito anteriormente.

50 Ejemplo 5:

1. Estudio para el tratamiento de infusión continua de pacientes con linfoma no Hodgkin (B NHL) con anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO. 2)

55 Con el fin de evaluar la seguridad y la tolerabilidad del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 (bscCD19xCD3; secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO.2), se ha administrado el compuesto por infusión continua prolongada. Dos pacientes con linfoma no Hodgkin de células B (B NHL) en recidiva se muestran en las siguientes secciones 2 y 3 (paciente #105003 y paciente #102003). En el primer día de tratamiento, los dos pacientes

recibieron una "dosis de exposición inicial" de $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ de anticuerpo biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 como infusión intravenosa continua (i.v.). A continuación, se incrementó la dosificación hasta una "dosis de mantenimiento" de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ que se administró como infusión intravenosa continua durante el periodo de infusión restante de 2 (para el paciente #102003) o 4 semanas (para el paciente #105003). La dosis diaria del fármaco investigado se administró en 500 ml de solución de NaCl isotónica que contenía HSA al 5 %. Cada uno de los pacientes recibieron

5 cotratamiento con un glucocorticoesteroide (metilprednisolona) a una concentración de $1 \times 100 \text{ mg}$ (i.v.) 1 h antes del inicio de la infusión de anticuerpo biespecífico con el fin de suprimir la liberación de citocinas en la fase inicial del periodo de infusión.

10 La sección 4 de este ejemplo 5 proporciona datos de resumen adicionales de pacientes tratados con una "dosis de exposición inicial" (entre $0,5$ y $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$) y "dosis de mantenimiento" de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$.

2. Paciente #105003 diagnosticado con linfoma folicular (linfoma no Hodgkin de células B)

15 A este paciente varón de 44 años se le diagnosticó un linfoma folicular en el año 2000. El había recibido previamente múltiples quimioterapias (CHOP; Bendamustina) e inmunoterapias (Rituximab; anticuerpo monoclonal anti-CD20). Después de la participación durante 2 años en un ensayo de vacunación, la enfermedad evolucionó una vez más. En el otoño de 2005, el paciente experimentó un incremento en la infiltración en la médula ósea, dando como resultado anemia, y la infiltración del pulmón con insuficiencia en la función respiratoria. Además, la calidad de vida de este paciente se redujo claramente debido a un empeoramiento del B-sintomático (esplenomegalia, incremento en la sudoración nocturna y una pérdida de peso de 3 kg durante 3 semanas). Este estado clínico hizo necesario un nuevo tratamiento.

20 A continuación, el paciente recibió el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO.2) a un nivel de dosis de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ como infusión continua durante 4 semanas como se detalla anteriormente. El tratamiento se inició el 03,10,2005 y se toleró bien, es decir, no se pudieron observar efectos secundarios adversos significativos.

2.1. Activación y proliferación de células T por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3

25 Las células mononucleares de muestras de sangre periférica obtenidas del paciente #105003 en diferentes puntos temporales de acuerdo con el protocolo de estudio se analizaron por citometría de flujo de 4 colores después de tinción con las siguientes combinaciones de 4 diferentes anticuerpos o marcadores de superficie:

Panel 1: CD2 x CD3 x CD4 x CD8 (células T)

Panel 2: CD3 x CD16 x CD19 x CD56 (recuentos de linfocitos: células B, T y NK)

30 Panel 3: CD8 x CD25 x CD69 x HLA-DR (activación de células T CD8⁺)

Panel 4: CD8 x CD28 x CD45RA x CCR7 (subconjuntos de células T CD8⁺)

Los recuentos celulares absolutos de subconjuntos de linfocitos, es decir, células B, T y NK definidas como células CD19⁺/CD3⁻, CD3⁺ y CD3⁺/CD56⁺, respectivamente, se calcularon a partir del panel 2 como $\%(\text{células B, T o NK}) / (\% \text{células B} + \% \text{T} + \% \text{NK})$ multiplicado por los recuentos totales de linfocitos de la respectiva muestra de sangre de

35 como se determina por un laboratorio rutinario. Los recuentos absolutos de células T CD4⁺ y CD8⁺ se calcularon a partir del panel 1 como $\% \text{células CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^- / \% \text{células CD3}^+$ o $\% \text{células CD3}^+ \text{CD4}^- \text{CD8}^+ / \% \text{células CD3}^+$, respectivamente, multiplicado por los recuentos absolutos de células T como se calcula del panel 2. Los recuentos celulares absolutos de subconjuntos de células T CD8⁺ se calcularon a partir de las siguientes proporciones de porcentajes obtenidos del panel 4 multiplicadas cada una por los recuentos absolutos de células T CD8⁺ como se

40 calcula del panel 2:

$\% \text{células CD8}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD28}^- / \% \text{células CD8}^+$ (correspondiente a células T CD8⁺ naive),

$\% \text{células CD8}^+ \text{CD45RA}^- \text{CCR7}^+ / \% \text{células CD8}^+$ (correspondiente a células T CD8⁺ de memoria centrales = T_{CM}),

$\% \text{células CD8}^+ \text{CD45RA}^- \text{CCR7}^- / \% \text{células CD8}^+$ (correspondiente células T CD8⁺ de memoria efectoras = T_{EM}), y

45 $\% \text{células CD8}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD28}^- / \% \text{células CD8}^+$ (correspondiente CTL (células T citotóxicas) terminalmente diferenciadas = células T CD8⁺ de memoria efectoras positivas para CD45RA = T_{EMRA}).

La activación de células T en este paciente se determinó como $\%$ células T CD8⁺ que expresan los marcadores de activación de superficie celular CD25, CD69 o HLA-DR (panel de citometría de flujo 3) de todas las células T CD8⁺.

50 En primer lugar, se han analizado los recuentos de células T CD4⁺ y CD8⁺. Como se muestra en la figura 6, las células T CD8⁺ y CD4⁺ desaparecieron en gran parte de la sangre periférica después del inicio de la infusión del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3, lo que se explica como un fenómeno distribucional desencadenado por la activación de células T a través de la reticulación de células T y B de sangre periférica mediada por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. Sin embargo, después de media semana de tratamiento, las células

T CD8⁺ y CD4⁺ reaparecieron en la sangre y se incrementaron adicionalmente en número hasta el día 7 y 21, respectivamente. En comparación con sus valores de partida, las células T CD8⁺ y CD4⁺ mostraron una expansión de 3,5 a 4 veces en la sangre. Los recuentos de células T CD8⁺ y CD4⁺ permanecieron altos durante las semanas de tratamiento 2 y 3, antes de que los números de células T comenzaran a disminuir durante la cuarta semana de tratamiento. Los recuentos de células T CD8⁺ y CD4⁺ todavía estuvieron por encima de los correspondientes valores de pretratamiento después de 4 semanas de infusión del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3, cuando se diagnosticó la reducción tumoral sustancial cumpliendo los criterios de una respuesta parcial, como se expone a continuación.

A continuación, se han analizado con más detalle las subpoblaciones de células T CD8⁺. Como se muestra en la figura 7, el análisis de las subpoblaciones de células T CD8⁺ reveló que el subconjunto TEM de memoria efectoras era responsable casi exclusivamente de la expansión de las células T CD8⁺ inducidas por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. Las células T CD8⁺ representan la mayoría de la actividad citotóxica entre todas las células T y las células TEM junto con el subconjunto TEMRA representan la mayoría de la actividad citotóxica entre las células T CD8⁺. Excepto por el subconjunto TEM, no se pudieron observar cambios significativos en recuentos celulares entre las otras subpoblaciones de células T CD8⁺ como las células T indiferenciadas que no pueden proliferar después de una única señal de activación proporcionada por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 o el subconjunto TEMRA que no puede proliferar en absoluto. Por tanto, la expansión selectiva de las células TEM CD8⁺ competentes para proliferación se puede atribuir claramente a la división celular y la proliferación en respuesta al contacto de las células TEM CD8⁺ con las células de linfoma B decoradas por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 dentro del tumor, véase también la figura 14. Se puede excluir una contribución significativa a la expansión de células T de las células de linfoma B decoradas por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 circulante en la sangre, debido a que las células de linfoma B circulantes ya se han eliminado de la sangre periférica el día 3, es decir, antes de la expansión de células T observada.

Finalmente, se ha analizado la activación de células T CD8⁺ ya que se han seguido los marcadores de activación de células T como se muestra en la figura 8. La expansión de células T CD8⁺ está precedida por la fuerte activación de células T CD8⁺ como se indica por una regulación por incremento sostenida del marcador de activación HLA-DR. Otros marcadores de activación como CD69 y CD25 sólo mostraron una corta regulación por incremento transitoria después del inicio de la infusión de la construcción de la invención, lo que se explica por la activación a través de la célula de linfoma B decorada con el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 circulante en la sangre siempre y cuando las células de linfoma B circulantes se eliminaran durante los primeros 3 días de tratamiento. Por el contrario, la regulación por incremento sostenida de HLA-DR durante 3 semanas refleja la activación de células T CD8⁺ dentro del tumor a través del contacto con células de linfoma B residentes en el tumor decoradas por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. La activación intratumoral de las células T da como resultado una respuesta de células T proliferativa dentro del tumor lo que da lugar a la expansión de las células T, que, de forma secundaria, también aparece en la sangre circulante. Esas células T activadas en el tumor y a continuación migradas a la sangre todavía muestran el marcador de activación prolongado HLA-DR pero ya han regulado por disminución los marcadores de activación a corto plazo CD69 y CD25.

Como conclusión, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 provocó la activación y expansión prolongadas de células T. Las células T con un fenotipo citotóxico representan predominantemente la expansión de células T CD8⁺. La activación y proliferación de células T están inducidas dentro del tumor por células B del linfoma decoradas con el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. La disminución en la activación de células T durante la tercera semana y la disminución en los recuentos de células T durante la cuarta semana de infusión se pueden explicar por la eficacia del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 en este paciente, lo que dio lugar a una reducción del tumor de un 58,0 % como se diagnosticó después de 4 semanas de tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 (véase a continuación) reduciendo de este modo el número global de células de linfoma B, lo que puede inducir la activación de células T y la proliferación mediada por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3.

2.2. Eliminación de células (de linfoma) B de sangre periférica por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3

Las células mononucleares de muestras de sangre periférica obtenidas del paciente de estudio #105003 en diferentes puntos temporales hasta la mejor respuesta clínica, se analizaron por citometría de flujo de 4 colores de acuerdo con procedimientos estándar después de la tinción con una combinación de anticuerpos frente a los 4 marcadores de superficie celular siguientes: CD3 (marcador de células T) x CD16 (marcador de células NK/macrófagos) x CD19 (marcador de células B) x CD56 (marcador de células NK). Los recuentos celulares absolutos de subconjuntos de linfocitos, es decir, células B, T y NK definidas como células CD19⁺/CD3⁻, CD3⁺ y CD3⁺/CD56⁺, respectivamente, se calcularon como $\%(\text{células B, T o NK}) / (\% \text{células B} + \% \text{T} + \% \text{NK})$ multiplicado por los recuentos totales de linfocitos de la respectiva muestra de sangre de como se determina por un laboratorio rutinario. Por tanto, los números absolutos de células (de linfoma) B se calcularon como números totales de células CD19⁺/CD3⁻.

Como se muestra en la figura 9, el paciente comenzó con aproximadamente 140 células (de linfoma) B por ml de sangre antes del tratamiento. Después del comienzo de la infusión del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3, las células (de linfoma) B circulantes descendieron rápidamente dentro de los 3 primeros días de

tratamiento y finalmente desaparecieron por completo de la sangre periférica al final de la primera semana de tratamiento. Además, las células (de linfoma) B se mantuvieron ausentes de la sangre periférica hasta que se diagnosticó la respuesta parcial después de 4 semanas de tratamiento; véase a continuación. Estos datos muestran que el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 puede eliminar totalmente las células (de linfoma) B circulantes debido a su actividad citotóxica frente a dichas células.

2.3. Reducción de tamaños de linfoma por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3

Para la evaluación de la eficacia del tratamiento por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3, se han usado criterios de respuesta estandarizados para la evaluación de la respuesta para linfoma no Hodgkin (NHL). De acuerdo con estos criterios, han de seleccionarse 6 lesiones de linfoma representativas. La suma del producto de los mayores diámetros transversales de las lesiones de linfoma se define como la SPD de referencia (Suma de productos de diámetros). A continuación, se evalúa el cambio de esta SPD a una base regular durante todo el periodo de tratamiento y de seguimiento del estudio. Por ejemplo, una respuesta parcial se define como una disminución de un $\geq 50\%$ en SPD.

Como se demuestra en la figura 10, en una restadificación después de 4 semanas de tratamiento, se descubrió una clara reducción de las masas tumorales de linfoma de acuerdo con la evaluación de la respuesta para NHL expuesta anteriormente: Se diagnosticó una reducción en la SPD de 6 lesiones de linfoma de referencia de un 58,0 %, correspondiente a una respuesta parcial (RP) en la evaluación de la respuesta tumoral por tomografía axial computarizada (CT). 8 semanas después del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3, se confirmó la respuesta parcial por tomografía computarizada mostrando una reducción tumoral de un 66 % (SPD).

3. Paciente #102003 diagnosticado con linfoma linfocítico de células pequeñas (B-CLL)

A este paciente varón de 60 años se le diagnosticó un linfoma linfocítico de células pequeñas en abril de 1999. Los hallazgos relevantes en los antecedentes del paciente fueron síndrome de apnea del sueño, insuficiencia renal aguda, herpes zóster, bronquitis intermitente y hepatopatía intermitente. El paciente tenía antecedentes de múltiples quimioterapias (Clorambucilo; Fludarabina; Knospe; Endoxan), inmunoterapias (Rituximab; anticuerpo monoclonal anti-CD20), y tratamiento radiológico de la región abdominal.

En los 7 años de antecedentes de la enfermedad, el paciente recibió 7 regímenes diferentes de quimioterapia así como Rituximab como monoterapia o tratamiento de combinación y radioterapia sin demostrar ninguna respuesta principal.

La administración del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 fue el 13^o régimen de tratamiento para este paciente. El paciente recibió el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 (SEQ ID NO.2) a un nivel de dosis de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ durante 2 semanas como infusión continua como se detalla anteriormente. El tratamiento se inició el 09.05.2005. Después de dos semanas de tratamiento, tuvo lugar una restadificación completa, de la que los resultados se presentan a continuación.

3.1. Eliminación de células (de linfoma) B de sangre periférica por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3

Se han determinado recuentos de células B como se expone en la sección 2.2, *supra*. Como se muestra en la figura 11, el paciente comenzó con 920 células (de linfoma) B por ml de sangre antes del tratamiento. Después del inicio de la infusión del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3, las células (de linfoma) B circulantes mostraron una rápida disminución seguido de una fase transitoria de recuperación limitada de 600 células por ml dentro de los 3 primeros días consistente con la redistribución de células. En el curso adicional de tratamiento, las células (de linfoma) B se eliminaron totalmente de la circulación hasta que se diagnosticó la respuesta parcial después de 2 semanas de tratamiento. Estos datos confirman que el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 puede eliminar completamente las células (de linfoma) B circulantes como parte de su eficacia clínica.

3.2. Eliminación del infiltrado de linfoma de la médula ósea por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3

Además, se realizó la histopatología de médula ósea antes y después del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. Como se muestra en la figura 12, panel izquierdo, antes del tratamiento, se pudo observar una infiltración de médula ósea de un 40-50 % por células de linfoma linfocítico de células pequeñas. Se confirmó el diagnóstico de linfoma linfocítico de células pequeñas / CLL.

Como se representa en la figura 12, panel derecho, después del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3, ya no se pudieron encontrar pruebas de infiltración por células de linfoma linfocítico de células pequeñas, mientras que se pudo observar un incremento significativo de células T. Estos datos demuestran la eliminación de células de linfoma de la médula ósea por debajo del límite de detección por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3. Este hallazgo es consistente con una respuesta de médula ósea completa que es difícil de lograr, por ejemplo, por quimioterapia convencional.

3.3. Reducción de tamaños de linfoma por el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3

Además, en una restadificación después de 2 semanas de tratamiento, se observó una clara reducción de las masas tumorales de linfoma: Como se muestra en la figura 13, se diagnosticó una disminución de un 57,2 % en el tamaño de las seis lesiones de linfoma de referencia por tomografía axial computarizada (TAC), correspondientes a una respuesta parcial (RP) en la evaluación de la respuesta tumoral.

En los 7 años de evolución de la enfermedad, durante los que el paciente recibió 7 pautas de quimioterapia diferentes así como inmunoterapia y radioterapia, sin demostrar ninguna respuesta principal, el tratamiento de este paciente con el anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3, proporciona por primera vez un tratamiento exitoso ya que se pudo lograr una reducción de más de un 50 % de las lesiones de linfoma de referencia.

4. Sumario de datos clínicos

Los pacientes con NHL indoloro en recidiva se incluyeron de acuerdo con un diseño clásico de aumento escalado de la dosis 3+3 con dosis iniciales de $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$. Se dio una cobertura de esteroides inicial para mitigar los síntomas de liberación de citocinas supuestos. Se evaluaron la seguridad y la tolerabilidad por CTC-AE (criterios de terminología común para acontecimientos adversos). NCI (National Cancer Institute) Common Terminology Criteria for Adverse Events es una terminología descriptiva que se puede utilizar para el informe de acontecimientos adversos (AE). Se proporciona una escala de graduación (gravedad) para cada criterio de duración de AE y el aumento escalado de la dosis sólo se permitió, después de que el comité de revisión de los datos concluyera la seguridad de la dosis previa con un periodo de DLT (toxicidad limitante de la dosis) de 14 días. La actividad biológica se monitorizó investigando los niveles de citocinas sistémicas usando ELISA específicos y por cuantificación y caracterización de los subconjuntos de células inmunitarias periféricas por medio de análisis de FACS. Después de 4 semanas de tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3, se realizó un TAC (tomografía computarizada) de control. Si los pacientes fueron al menos estables de acuerdo con los criterios estandarizados de Cheson (revisados por radiología central), se ofreció un ciclo adicional de 4 semanas de anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD 19 x anti-CD3 a los pacientes. Los criterios de Cheson se desarrollaron por el National Cancer Institute y la industria farmacéutica internacional para proporcionar una directriz para evaluar la respuesta clínica en NHL. De acuerdo con los criterios, se obtiene una respuesta completa cuando existe una desaparición completa de todas las pruebas clínicas y radiográficas detectables de enfermedad y de síntomas relacionados con la enfermedad, todos los ganglios linfáticos han vuelto a su tamaño normal, el bazo ha vuelto a su tamaño y la médula ósea está limpia de linfoma. Para una respuesta parcial, debe existir una disminución de un 50 % del tamaño de los seis ganglios linfáticos dominantes más grandes, ningún incremento en el tamaño de los otros ganglios, hígado o bazo, los nódulos esplénicos, hepáticos han de remitir al menos en un 50 % y no debe haber nuevos sitios de enfermedad.

Hasta el momento, se han incluido 19 pacientes con una mediana en número de 4 quimio/inmunoterapias previas. Durante el aumento escalado de la dosis de DL1 ($0,5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$) (DL = nivel de dosis) hasta DL3 ($5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$) no se observó toxicidad limitante de la dosis y en general los AE (acontecimientos adversos) fueron moderados. En el DL4 ($5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ en el primer día, $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ como dosis de mantenimiento), se trataron 7 pacientes, recibiendo 2 pacientes menos de 14 días de tratamiento (1 DLT, 1 interrupción por decisión del investigador).

Se observó una eliminación completa de células (de linfoma) B circulantes al final de la infusión de anticuerpo monocatenario biespecífico CD 19 x CD3 en 9 de los 14 pacientes evaluables (tratamiento > 2 semanas y células B detectables en sangre periférica antes de la infusión del anticuerpo monocatenario biespecífico anti-CD19 x anti-CD3). Un incremento dependiente de la dosis en la frecuencia alcanzó el 100 % en el DL4. En el DL4, 3 de 7 tuvieron infiltración de médula ósea (BM) relevante (> 10 %) mostrando 1 paciente una mejora y mostrando 2 pacientes la completa desaparición de células de linfoma en la BM. La mejor respuesta tumoral global en los 14 pacientes evaluados (tratamiento > 2 semanas y detección de todas las áreas implicadas) fue 1 CR (respuesta completa en el paciente # 109002, un hombre de 61 años diagnosticado con linfoma folicular, grado 1, estadio IIIa), 2 RP (respuesta parcial), 1 MR (respuesta menor), 7 SD (enfermedad estable) y 3 PD (enfermedad progresiva). En particular, el paciente #109002 mostró impresionantes resultados adicionales, a saber una remisión completa (CR); véanse las figuras 14 a 16. Esta remisión completa se logró en dicho paciente por una dosis inicial de $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ el primer día de tratamiento y una posterior dosis de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ durante 4 semanas. Después de estas 4 semanas, el paciente # 109002 mostró respuestas parciales y el paciente recibió de inmediato una dosis adicional de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ durante otras 4 semanas, dando lugar a la respuesta completa.

Sin estar limitado por lo siguiente, la técnica define "respuesta completa", "respuesta parcial", "progresión de la enfermedad" y "respuesta menor" como sigue:

A menudo se declara una respuesta completa si las lesiones no se detectan por formación de imágenes de TAC y otras pruebas. Si la formación de imágenes de TAC y una prueba de médula ósea no muestran pruebas de enfermedad, es una respuesta completa definida más rigurosamente.

La respuesta parcial describe una respuesta al tratamiento en la que se mide una reducción de al menos un 50 % en la masa tumoral medible.

Se considera que un paciente presenta una progresión de la enfermedad cuando experimenta síntomas (fiebre, sudores nocturnos, etc.) y cuando los ganglios linfáticos se incrementan de tamaño o se observan nuevos ganglios linfáticos agrandados.

- 5 Se considera que un paciente presenta una enfermedad estable o en retroceso cuando no experimenta síntomas y cuando los ganglios linfáticos no crecen, o se observa que retroceden en tamaño. A veces esta condición o inactividad de la enfermedad observada clínicamente se describe como remisión.

"Respuesta menor" aproximadamente quiere decir una pequeña cantidad de reducción. Una respuesta menor no es realmente un término estándar pero se usa cada vez más. A grandes rasgos, una respuesta menor es más de un 25 % del volumen tumoral total pero menos de un 50 % del que haría una respuesta parcial (RP).

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Micromet AG
- 5 <120> Tratamiento de enfermedades tumorales
- <130> L1410 PCT S3
- <160> 45
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1587
- 15 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> scFv CD 19 x CD3 biespecífico

<400> 1

```

gaattccacc atgggatgga gctgatatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt      60
ccactccgat atccagctga cccagctctc agcttctttg gctgtgtctc tagggcagag      120
ggccaccatc tcctgcaagg ccagccaaag tggtgattat gatggtgata gttattgaa      180
ctggtaccaa cagattccag gacagccacc caaactcctc atctatgatg catccaatct      240
agtttctggg atcccaccca ggttagtggt cagtgggtct gggacagact tcaccctcaa      300
catccatcct gtggagaagg tggatgctgc aacctatcac tgtcagcaaa gtactgagga      360
tccgtggacg ttcggtggag ggaccaagct cgagatcaaa ggtgggtggg gttctggcgg      420
cggcggctcc ggtgggtggg gttctcaggt gcagctgcag cagtctgggg ctgagctggt      480
gaggcctggg tcctcagtga agatttctct caaggctctt ggctatgcat tcagtagcta      540
ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acagggtctt gagtggattg gacagatttg      600
gcctggagat ggtgatacta actacaatgg aaagttcaag ggtaaagcca ctctgactgc      660
agaagaatcc tccagcacag cctacatgca actcagcagc ctagcatctg aggactctgc      720
ggtctatttc tgtgcaagac gggagactac gacggtagge cgttattact atgctatgga      780
ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctccgga ggtgggtggat ccgatatcaa      840
actgcagcag tcaggggctg aactggcaag acctggggcc tcagtgaaga tgtcctgcaa      900
gacttctggc tacaccttta ctaggtacac gatgcactgg gtaaaacaga ggcctggaca      960
gggtctggaa tggattggat acattaatcc tagccgtggg tatactaatt acaatcagaa     1020
gttcaaggac aaggccacat tgactacaga caaatcctcc agcacagcct acatgcaact     1080
gagcagcctg acatctgagg actctgcagt ctattactgt gcaagatatt atgatgatca     1140
ttactgcctt gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctcag togaaggtgg     1200
    
```

ES 2 532 124 T3

aagtggaggt tctggtggaa gtggaggttc aggtggagtc gacgacattc agctgaccca 1260
 gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc accatgacct gcagagccag 1320
 ttcaagtgta agttacatga actggtacca gcagaagtca ggcacctccc ccaaagatg 1380
 gatttatgac acatccaaag tggcttctgg agtcccttat cgcttcagtg gcagtgggtc 1440
 tgggacctca tactctctca caatcagcag catggaggct gaagatgctg ccacttatta 1500
 ctgccaacag tggagtagta acccgctcac gttegggtgct gggaccaagc tggagctgaa 1560
 acatcatcac catcatcatt agtcgac 1587

<210> 2
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> scFv CD 19 x CD 3 biespecifico

<400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
 35 40 45

Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
 50 55 60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly
 65 70 75 80

Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 85 90 95

Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln
 100 105 110

Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
 145 150 155 160
 Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser
 165 170 175
 Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 180 185 190
 Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
 195 200 205
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
 210 215 220
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 225 230 235 240
 Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met
 245 250 255
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro
 275 280 285
 Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 290 295 300
 Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 305 310 315 320
 Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln
 325 330 335
 Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 340 345 350
 Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 355 360 365
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly
 370 375 380

ES 2 532 124 T3

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly
385 390 395 400

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr
405 410 415

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
420 425 430

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
435 440 445

Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val
450 455 460

Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
465 470 475 480

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
485 490 495

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
500 505 510

Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His His
515 520

<210> 3
<211> 1533
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> CD 19 VH/VL x CD3 VH/VL (BsrG I a Sal I)

<400> 3
tgtacactcc caggtgcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc 60
agtgaagatt tcttgcagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt 120
gaagcagagg cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttggcctg gagatgggtg 180
tactaactac aatggaaagt tcaagggtaa agccactctg actgcagacg aatcctccag 240
cacagcctac atgcaactca gcagcctagc atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc 300
aagacggggag actacgacgg taggocgtta ttactatgct atggactact ggggccaagg 360
gaccacggtc accgtctcct ccggtggtgg tggttctggc ggcggcgget ccggtggtgg 420

ES 2 532 124 T3

tggttctgat atccagctga cccagctctcc agcttctttg gctgtgtctc tagggcagag 480
 ggccaccatc tccctgcaagg ccagccaaag tgttgattat gatggtgata gttatttgaa 540
 ctggtaccaa cagattccag gacagccacc caaactectc atctatgatg catccaatct 600
 agtttctggg atcccaccca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact tcaccctcaa 660
 catccatcct gtggagaagg tggatgctgc aacctatcac tgtcagcaaa gtactgagga 720
 tccgtggacg ttcggtggag ggaccaagct cgagatcaaa tccggagggtg gtggatccga 780
 tatcaaactg cagcagtcag gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc 840
 ctgcaagact tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc 900
 tggacagggc ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtgggtata ctaattacaa 960
 tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tccctcagca cagcctacat 1020
 gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga 1080
 tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagtcga 1140
 aggtggaagt ggaggttctg gtggaagtgg aggttcaggt ggagtcgacg acattcagct 1200
 gaccagctct ccagcaatca tgtctgcatc tccaggggag aaggtcacca tgacctgag 1260
 agccagttca agtgaagt acatgaactg gtaccagcag aagtcaggca cctcccccaa 1320
 aagatggatt tatgacacat ccaaagtggc ttctggagtc ccttatcgct tcagtggcag 1380
 tgggtctggg acctcact ctctcacaat cagcagcatg gaggtgaag atgctgccac 1440
 ttattactgc caacagtgga gtagtaacce gctcaagttc ggtgctggga ccaagctgga 1500
 gctgaaacat catcaccatc atcattagtc gac 1533

<210> 4
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CD 19 VH/VL x CD3 VH/VL (proteína madura w/o Líder)

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ES 2 532 124 T3

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr
130 135 140

Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile
145 150 155 160

Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu
165 170 175

Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
180 185 190

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
195 200 205

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val
210 215 220

Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
260 265 270

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
275 280 285

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 290 295 300

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 305 310 315 320

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 325 330 335

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 340 345 350

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 355 360 365

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
 385 390 395 400

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 405 410 415

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 420 425 430

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 435 440 445

Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 450 455 460

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 465 470 475 480

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 485 490 495

Glu Leu Lys His His His His His His
 500 505

- <210> 5
- <211> 1531
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> CD3 VH/VL x CD19 VH/VL (BsrG I a Sal I)

ES 2 532 124 T3

<400> 5
 tgtacactcc gatatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc 60
 agtgaagatg tcoctgcaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt 120
 aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta 180
 tactaattac aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag 240
 cacagcctac atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc 300
 aagatattat gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt 360
 ctctcaggt ggtggtggtt ctggcggcgg eggetccggg ggtggtggtt ctgacattca 420
 gctgaccag tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaaggtea ccatgacctg 480
 cagagccagt tcaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag cagaagtcag gcacctcccc 540
 caaaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtcccttata gcttcagtgg 600
 cagtgggtct gggacctcat actctctcac aatcagcagc atggaggctg aagatgctgc 660
 cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg ttgggtgctg ggaccaagct 720
 ggagctgaaa tccggaggtg gtggatccca ggtgcagctg cagcagtctg gggctgagct 780
 ggtgaggcct gggtcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag 840
 ctactggatg aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat 900
 ttggcctgga gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggtaaag ccactctgac 960
 tgcagacgaa tcoctcagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc 1020
 tgcggtctat ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggta ggccgttatt actatgctat 1080
 ggactactgg ggccaagggg ccacggtcac cgtctctccc ggtggtggtg gttctggcgg 1140
 cggcggctcc ggtggtggtg gttctgatat ccagctgacc cagtctccag cttctttggc 1200
 tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatctc ctgcaaggcc agccaaagtg ttgattatga 1260
 tggatgatgt tatttgaact ggtaccaaca gattccagga cagccaccca aactcctcat 1320
 ctatgatgca tccaatctag tttctgggat cccaccagg tttagtggca gtgggtctgg 1380
 gacagacttc acctcaaca tccatcctgt ggagaagggt gatgctgcaa cctatcactg 1440
 tcagcaaagt actgaggatc cgtggacgtt cgggtggagg accaagctcg agatcaaate 1500
 cgggcatcat caccatcatc attgagtcga c 1531

<210> 6
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> CD3 VH/VL x CD19 VH/VL

<400> 6

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
 180 185 190

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 195 200 205

10

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 210 215 220

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
 245 250 255

Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 260 265 270

Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
 275 280 285

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr
 290 295 300

Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
 325 330 335

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg
 340 345 350

Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 355 360 365

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 370 375 380

Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 385 390 395 400

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr
 405 410 415

Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro
 420 425 430

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro
 435 440 445

ES 2 532 124 T3

Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
 450 455 460

His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser
 465 470 475 480

Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 485 490 495

Ser Gly His His His His His His
 500

- <210> 7
- <211> 1528
- <212> ADN
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> CD3 VH/VL x CD19 VL/VH (BsrG I a Sal I)

<400> 7
 tgtacactcc gatatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc 60
 agtgaagatg tcttgcaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt 120
 aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaataccta gccgtgggta 180
 tactaattac aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag 240
 cacagcctac atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc 300
 aagatattat gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt 360
 ctctcaggt ggtggtggtt ctggcggcgg cggctccggt ggtggtggtt ctgacattca 420
 gctgacccag tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaaggtea ceatgacctg 480
 cagagccagt tcaagtgtaa gttacatgaa ctgggtaccag cagaagtcag gcacctcccc 540
 caaaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtcccttata gcttcagtgg 600
 cagtgggtct gggacctcat actctctcac aatcagcagc atggaggctg aagatgctgc 660
 cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg ttcgggtgctg ggaccaagct 720
 ggagctgaaa tccggagggtg gtggatccga tatecagctg acccagtctc cagcttcttt 780
 ggctgtgtct ctagggcaga gggccaccat ctctgcaag gccagccaaa gtgttgatta 840
 tgatggtgat agttatttga actggtacca acagattcca ggacagccac ccaaactcct 900
 catctatgat gcatccaatc tagtttctgg gateccaccc aggttttagtg gcagtgggtc 960
 tgggacagac ttcaccctca acatccatcc tgtggagaag gtggatgctg caacctatca 1020

10

ES 2 532 124 T3

ctgtcagcaa agtactgagg atccgtggac gttcgggtgga gggaccaagc tcgagatcaa 1080
 aggtggtggt ggttctggcg gcggcggtc cggtggtggt ggttctcagg tgcagctgca 1140
 gcagtctggg gctgagctgg tgaggcctgg gtcctcagtg aagatttctt gcaaggcttc 1200
 tggttatgca ttcagtagct actggatgaa ctgggtgaag cagaggcctg gacagggtct 1260
 tgagtggatt ggacagattt ggctggaga tggtgatact aactacaatg gaaagttcaa 1320
 gggtaaagcc actctgactg cagacgaatc ctccagcaca gcctacatgc aactcagcag 1380
 cctagcatct gaggactctg cggctctattt ctgtgcaaga cgggagacta cgacggtagg 1440
 ccgttattac tatgctatgg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg tctctccgg 1500
 gcatcatcac catcatcatt gagtcgac 1528

<210> 8
 <211> 503
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> CD3 VH/VL x CD19 VL/VH (proteina madura w/o Líder)

10 <400> 8

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
 180 185 190

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 195 200 205

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 210 215 220

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 245 250 255

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
 260 265 270

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 275 280 285

Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
 290 295 300

Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 305 310 315 320

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr
 325 330 335

His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 340 345 350

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 355 360 365

ES 2 532 124 T3

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
 370 375 380

Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
 385 390 395 400

Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
 405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
 420 425 430

Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser
 435 440 445

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala
 450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr
 465 470 475 480

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 485 490 495

Gly His His His His His His
 500

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> CD3 CDR-H1

10 <400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
 1 5 10

<210> 10
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> CD3 CDR-H2

<400> 10

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

5 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CD3 CDR-H3
 <400> 11

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CD3 CDR-L1
 <400> 12

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
 1 5 10

25 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CD3 CDR-L2
 <400> 13

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 1 5

35 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> CD3 CDR-L3

<400> 14

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 1 5

45 <210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 532 124 T3

<220>
<223> anti-CD19 VH

5 <400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> anti-CD19 VL

15

<400> 16

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 17
 <211> 119
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> anti-CD3 VH

10 <400> 17

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18
 <211> 106

ES 2 532 124 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> anti-CD3 VL

<400> 18
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

10 <210> 19
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador 5'L1

<400> 19
 gaagcagcgc tagatatckt gmtsacccaa wctcca 36

20 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador 3'K

<400> 20
 gaagatggat ccagcggccg cagcatcagc 30

30 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador 5'H1

<400> 21
 cagccggcca tggcgcaggt scagctgcag sag 33

5 <210> 22
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador 3'G

<400> 22
 accaggggcc agtggataga caagcttggg tgcgtttt 39

15 <210> 23
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador 5'VLB5RRV

<400> 23
 aggtgtacac tcctgatata cagctgaccc agtctcca 38

25 <210> 24
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador 3'VLGS15

<400> 24
 ggagccgccc cgcaccagaac caccaccttt gatctcgagc ttgggtccc 48

35 <210> 25
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador 5'VHGS15

<400> 25
 ggcggcggcg gctccggtgg tgggtgttct caggtsmarc tgcagsagtc wgg 53

45 <210> 26
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Cebador 3'VHBspEI

<400> 26
 aatccggagg agacgggtgac cgtgggtccct tggccccag 39

<210> 27

	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador 5'VLL2KBspEIGS		
	<400> 27		
	cttccggagg tggatggatcc gacattcagc tgaccag		38
10	<210> 28		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador 3'VHL2KBspEI (C-terminal)		
	<400> 28		
	cctccggagg agactgtgag agtgg		25
20	<210> 29		
	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador 5'VHCD19BspEIGS		
	<400> 29		
	cttccggagg tggatggatcc caggtgcagc tgcagcag		38
30	<210> 30		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador 3'VLCD19BspEI (C-terminal)		
	<400> 30		
	cctccggatt tgatctcgag cttgg		25
40	<210> 31		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador 5'VLCD19BspEIGS		
	<400> 31		
	cttccggagg tggatggatcc gatattccagc tgacc		35
50	<210> 32		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Cebador 5'VHL2KBsrGI		

ES 2 532 124 T3

<400> 32
 aggtgtacac tccgatatca aactgcagca g 31

5 <210> 33
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador 3'VHL2KGS15

<400> 33
 ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc tgaggagact gtgagagtgg 50

15 <210> 34
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador 5'VLL2KGS15

<400> 34
 ggccggccgc gctccgggtgg tgggtggttct gacattcagc tgaccagtc tcc 53

25 <210> 35
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador 3'VLL2KBspEI

<400> 35
 aatccggatt tcagctccag cttgg 25

35 <210> 36
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador 5'VHCDI9BsrGI

<400> 36
 aggtgtacac tcccaggtgc agctgcagca g 31

45 <210> 37
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Cebador 3'VHCD19GS15

<400> 37
 ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc ggaggagacg gtgaccgtgg 50

<210> 38
 <211> 53

ES 2 532 124 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador 5'VLCD19GS15

 <400> 38
 ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggttct gatataccagc tgaccagtc tcc 53

 <210> 39
 10 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> Cebador 3'VLCD19BspEI

 <400> 39
 aatccggatt tgatctcgag cttgg 25

 <210> 40
 20 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador 5'VLI2KBsrGI

 <400> 40
 aggtgtacac tccgacattc agctgaccca gtctc 35

 <210> 41
 30 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Cebador 3'VLL2KGS15

 <400> 41
 ggagccgccc cgcgcagaac caccaccacc ttccagctcc agcttggtcc 50

 <210> 42
 40 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Cebador 5'VHL2KGS15

 <400> 42
 ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggttct gatatacaac tgcagcagtc agg 53

 <210> 43
 50 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 55 <223> Cebador 3'VHL2KBspEI

ES 2 532 124 T3

<400> 43
aatccggatg aggagactgt gagagtggtg 30

<210> 44
<211> 25
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cebador 3"VHCD19BspEI (C-terminal)

<400> 44
cctccggagg agacggtgac cgtgg 25

<210> 45
<211> 73
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> Cebador polienlazador CTI

<400> 45
tctagaattc ttcgaatccg gaggtgggtgg atccgatatc cccgggcatc atcaccatca 60
tcattgagtc gac 73

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para su uso en un procedimiento para la prevención, tratamiento o mejora de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B, comprendiendo el procedimiento la administración de dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico a un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico dominios de unión específicos para CD3 humano y CD 19 humano, en la que las correspondientes regiones variables de cadena pesada (V_H) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (V_L) están dispuestas, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, en el orden,
- 5 $V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
- 10 $V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
- $V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ o
- $V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$,
- en el que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se va a administrar durante al menos 1 semana en una dosis diaria de 10 μg a 80 μg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente y en el que la dosis diaria se va a administrar durante al menos 6 h.
- 15 2. Uso de una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento o mejora de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B, comprendiendo dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico unir dominios específicos para CD3 humano y CD19 humano, en el que las correspondientes regiones variables de cadena pesada (V_H) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (V_L) están dispuestas, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, en el orden,
- 20 $V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
- $V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
- $V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ o
- 25 $V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$
- y en el que dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se va a administrar durante al menos 1 semana en una dosis diaria de 10 μg a 80 μg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente y donde dicha dosis diaria se va a administrar durante al menos 6 h.
- 30 3. Un kit para su uso en la prevención, tratamiento o mejora de linfoma no Hodgkin de células B indoloro o agresivo (B NHL) o leucemia de células B en humanos, de acuerdo con un régimen de al menos una semana que comprende la administración de una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende dominios de unión específicos para CD3 humano y CD19 humano, en el que las correspondientes regiones variables de cadena pesada (V_H) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (V_L) están dispuestas, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, en el orden,
- 35 $V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
- $V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
- $V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_H(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ o
- $V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})$
- en el que dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se va a administrar durante al menos 1 semana en una dosis diaria de 10 μg a 80 μg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente y en el que dicha dosis diaria se va a administrar durante al menos 6 h, y en el que dicho kit contiene los siguientes componentes:
- 40 (a) al menos 7 dosis diarias individuales de desde 140 μg a 320 μg de dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico farmacéutica activa; y
- 45 (b) un medio para tener dispuestos los componentes de forma que se facilite el cumplimiento con el régimen.
4. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o el kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la dosis diaria se administra durante al menos 10 h.

5. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 4, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 4 o el kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde la dosis diaria se administra durante al menos 12 h.
- 5 6. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 4 o 5, el uso de acuerdo con la reivindicación 2, 4 o 5, o el kit para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 3-5, en donde la dosis diaria se administra durante 24 h.
- 10 7. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en donde dicha región VH de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO. 11.
- 15 8. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde dicha región VH de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO. 10.
- 20 9. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en donde dicha región VH de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO. 9.
- 25 10. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en donde dicha región VL de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO. 14.
- 30 11. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en donde dicha región VL de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO. 13.
- 35 12. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-11, en donde dicha región VL de dicho dominio específico de CD3 comprende al menos una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO. 12.
- 40 13. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-12, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-12, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-12, en donde dicha región VH de dicho dominio específico de CD3 comprende SEQ ID NO. 17, dicha región VH de dicho dominio específico de CD19 comprende SEQ ID NO. 15, dicha región VL de dicho dominio específico de CD3 comprende SEQ ID NO. 18 y/o dicha región VL de dicho dominio específico de CD19 comprende SEQ ID NO. 16.
- 45 14. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-13, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-13, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-13, en donde dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en
 - (a) una secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO 2, 4, 6 u 8;
 - 50 (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO 1, 3, 5 o 7;
 - (c) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % con una secuencia de ácido nucleico de (b), en la que dicha secuencia de aminoácidos se puede unir específicamente a CD3 y CD19; y

- (d) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que es redundante como resultado del código genético para una secuencia de ácido nucleico de (b), en la que dicha secuencia de aminoácidos se puede unir específicamente a CD3 y CD19.
- 5 15. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-14, en donde dichos dominios variables están conectados por secuencias enlazadoras adicionales.
- 10 16. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-15, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-15, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-15, en donde la administración diaria se continúa durante al menos 2 semanas, al menos 3 semanas o al menos 4 semanas.
- 15 17. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-16, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-16, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-16, en donde la composición farmacéutica se administra en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticos.
18. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-17, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-17, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-17, en donde la composición farmacéutica se administra a un paciente humano.
- 20 19. La construcción de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-18, el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 4-18, o el kit para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-18, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico se va a administrar en una dosis inicial de menos de 10 µg a 80 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente el primer día.

25

Figura 1

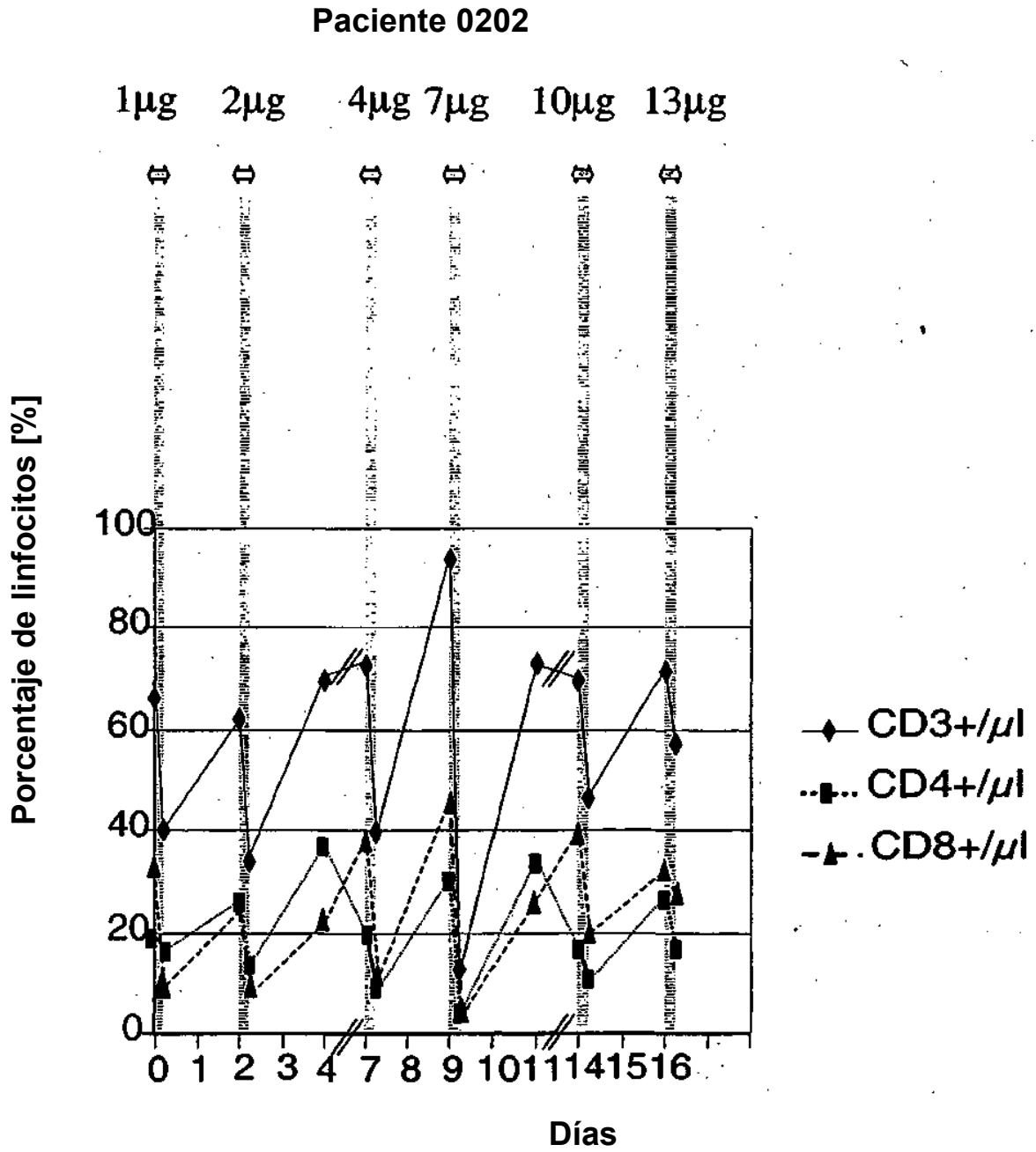


Figura 2

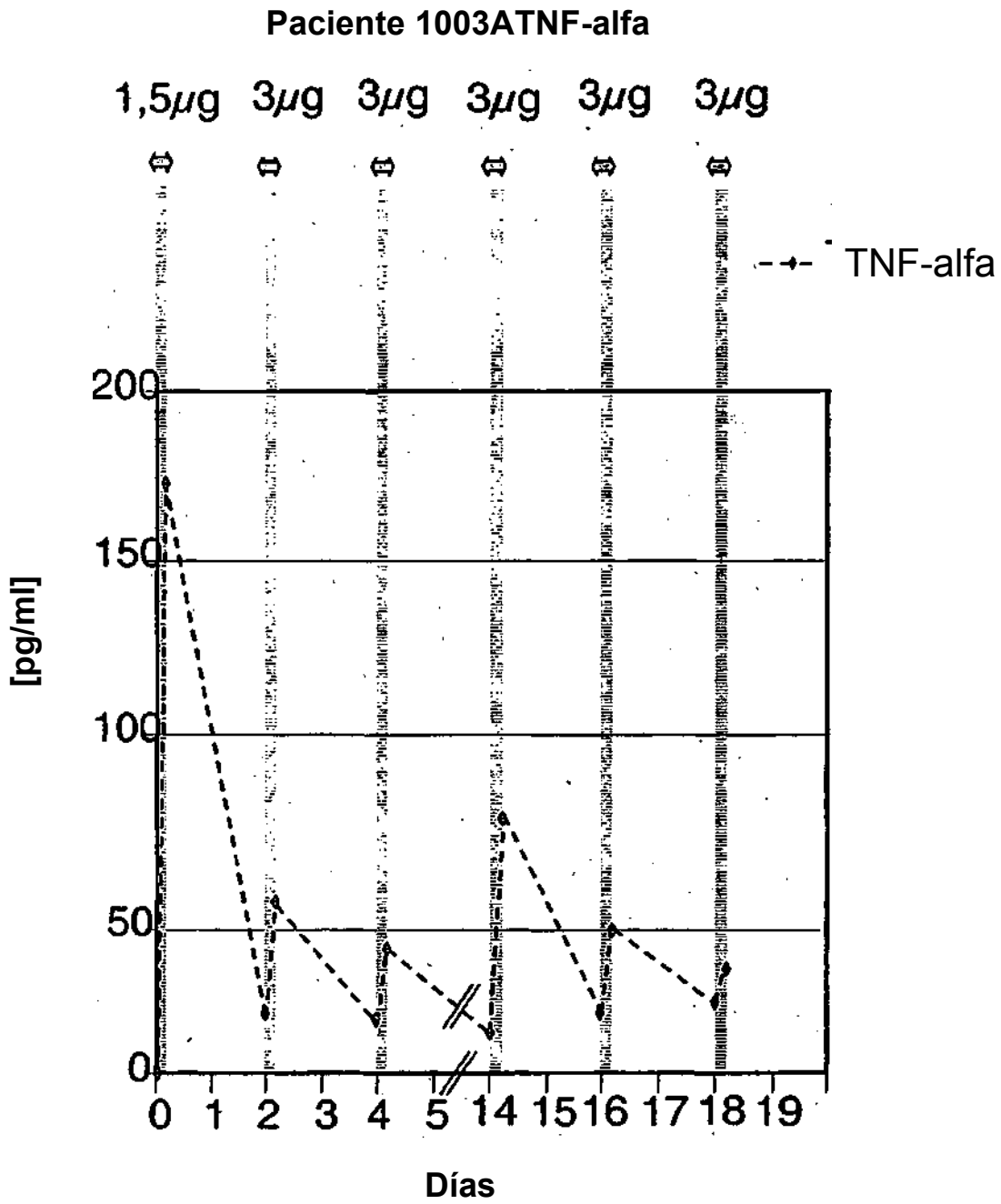


Figura 3

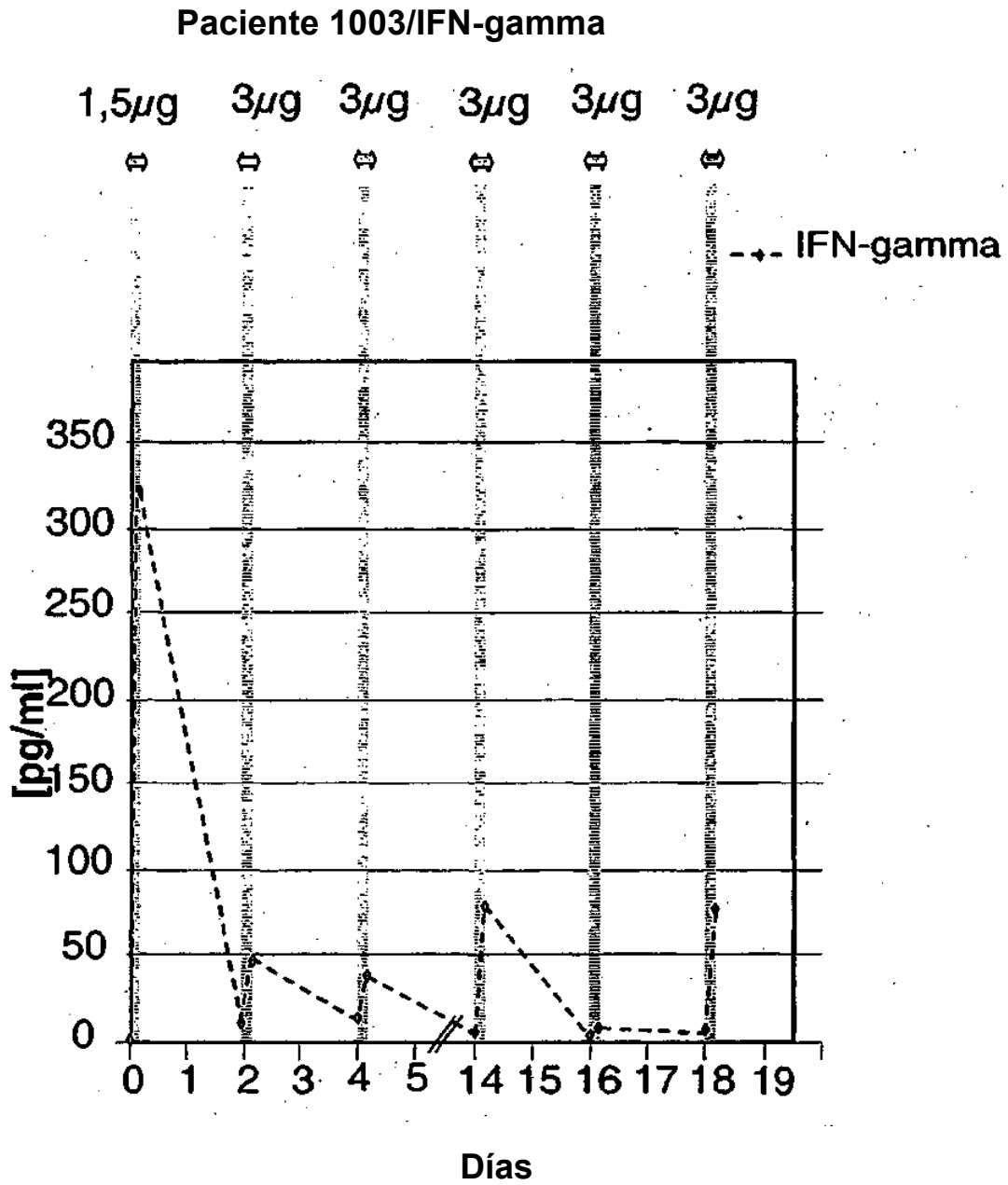


Figura 4

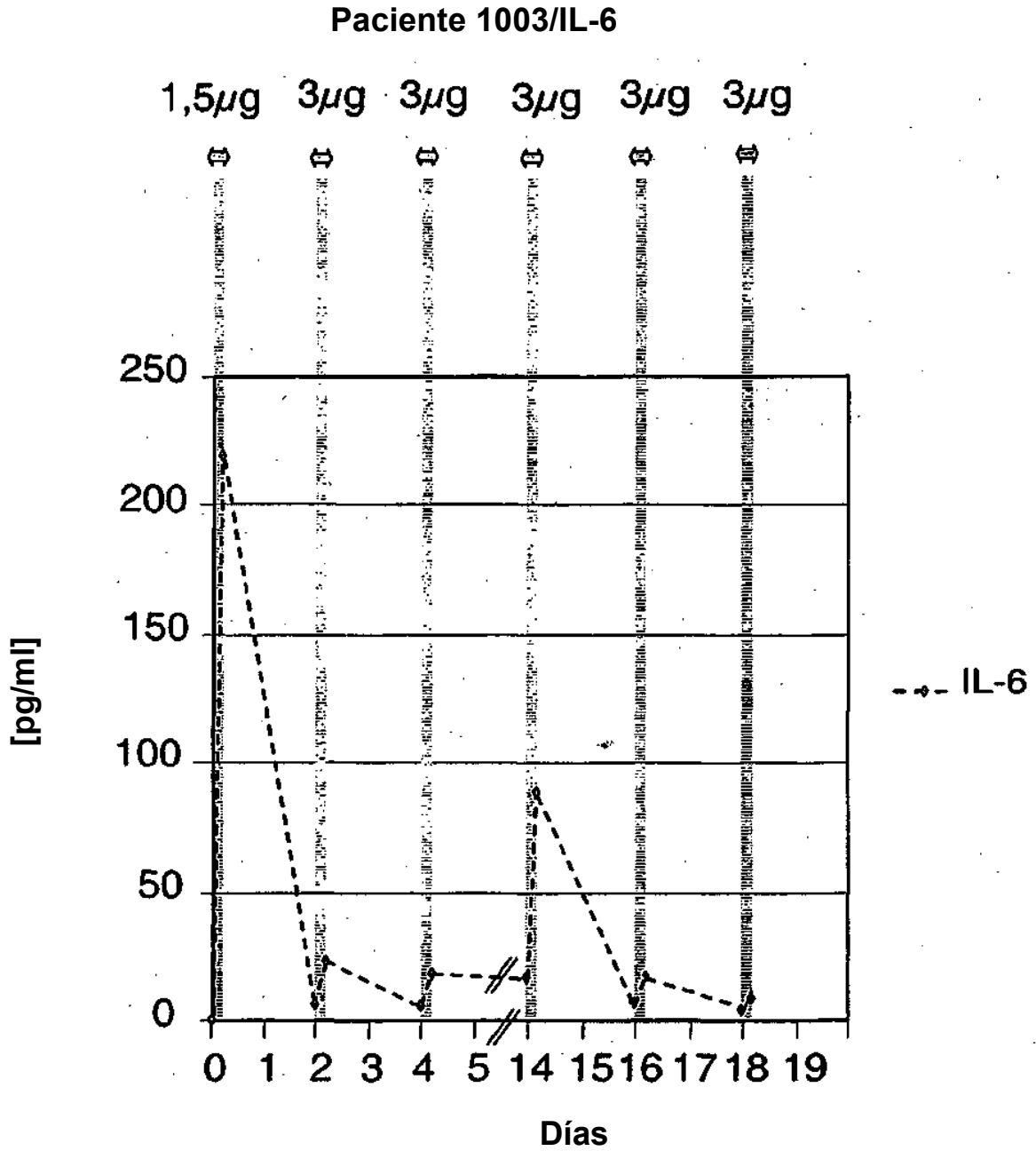


Figura 5

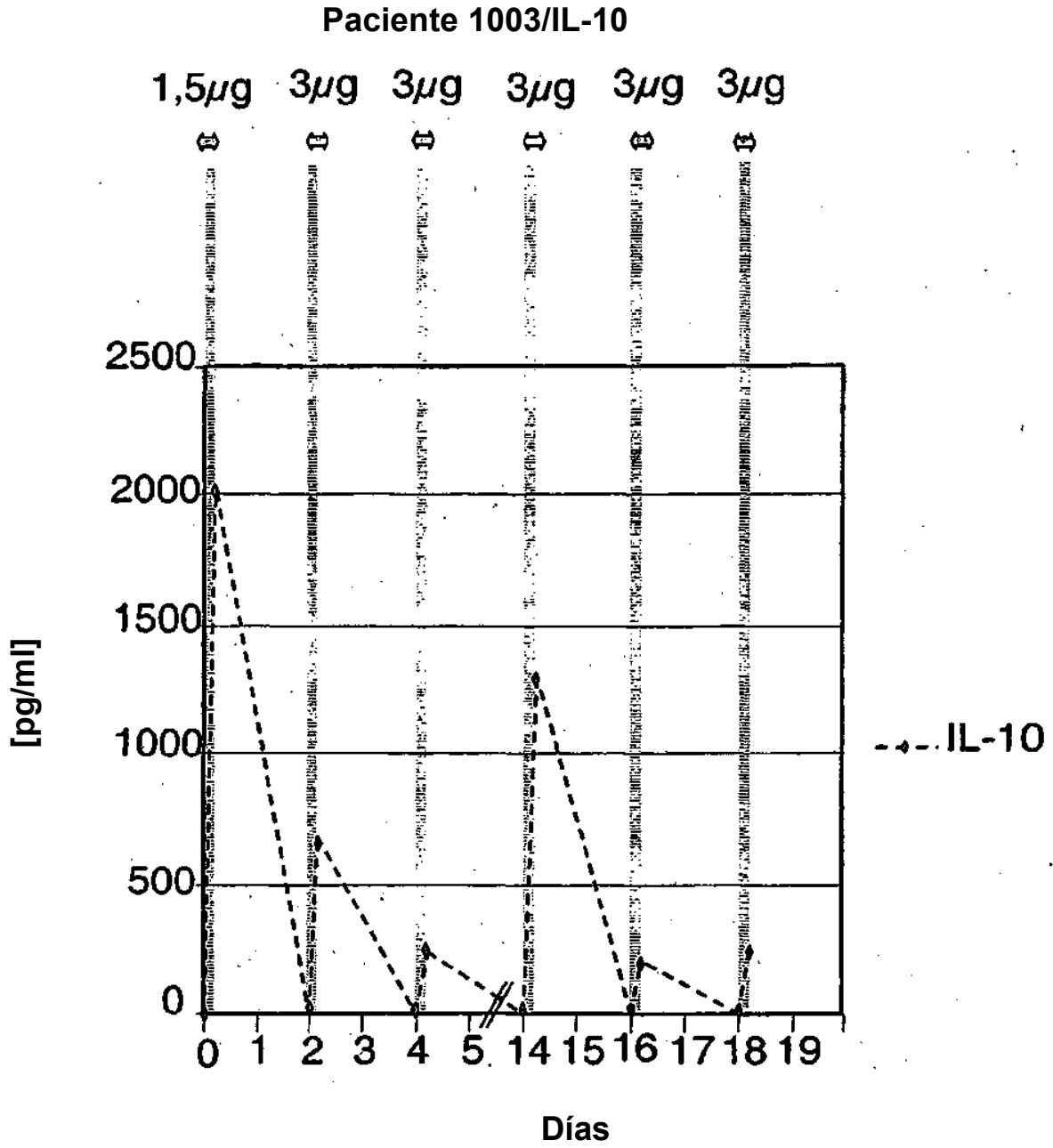


Figura 6

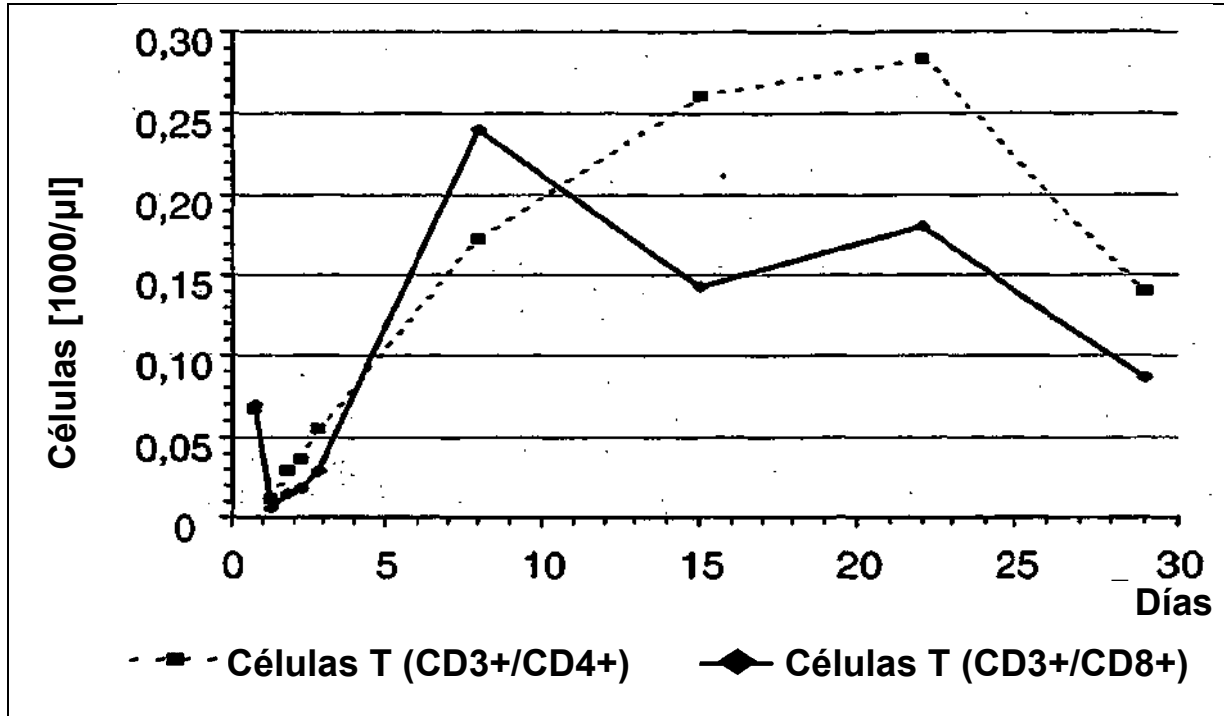


Figura 7

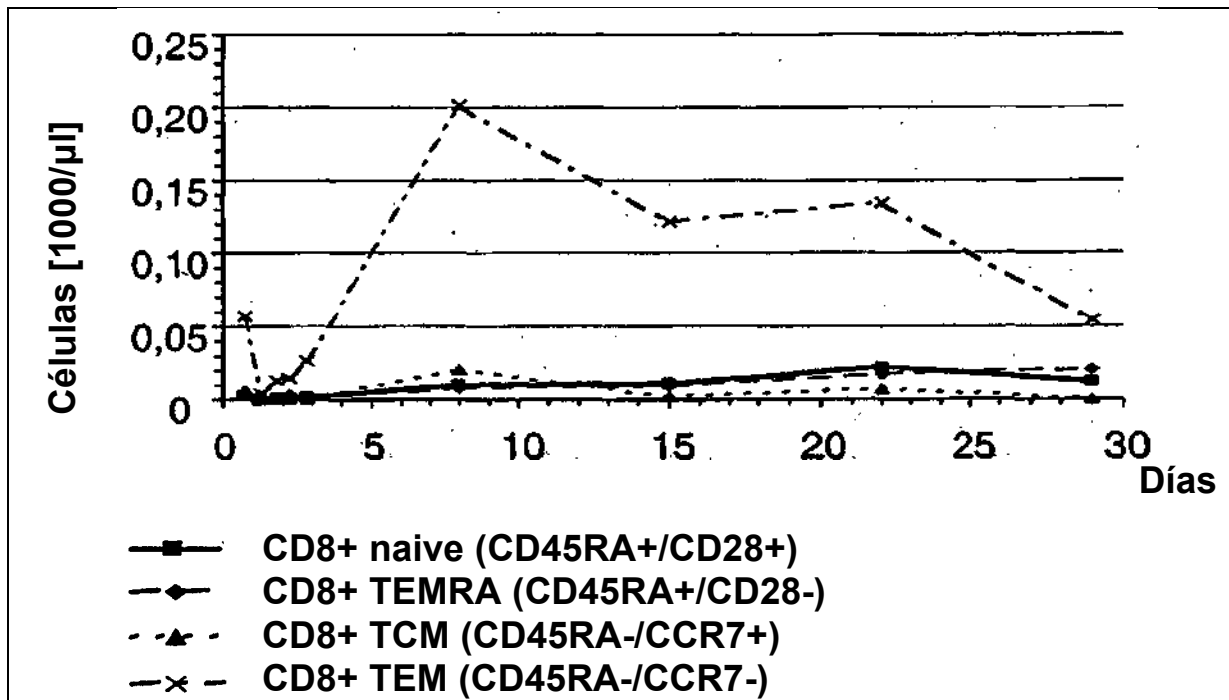


Figura 8

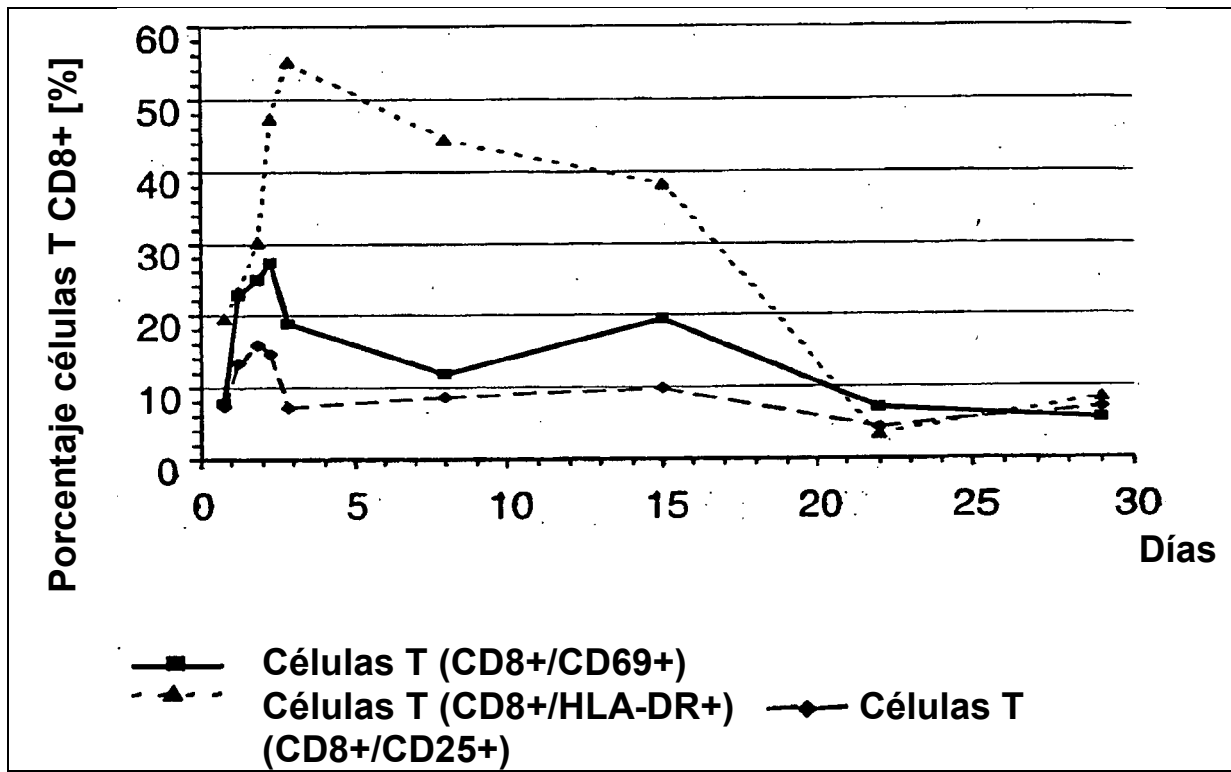


Figura 9

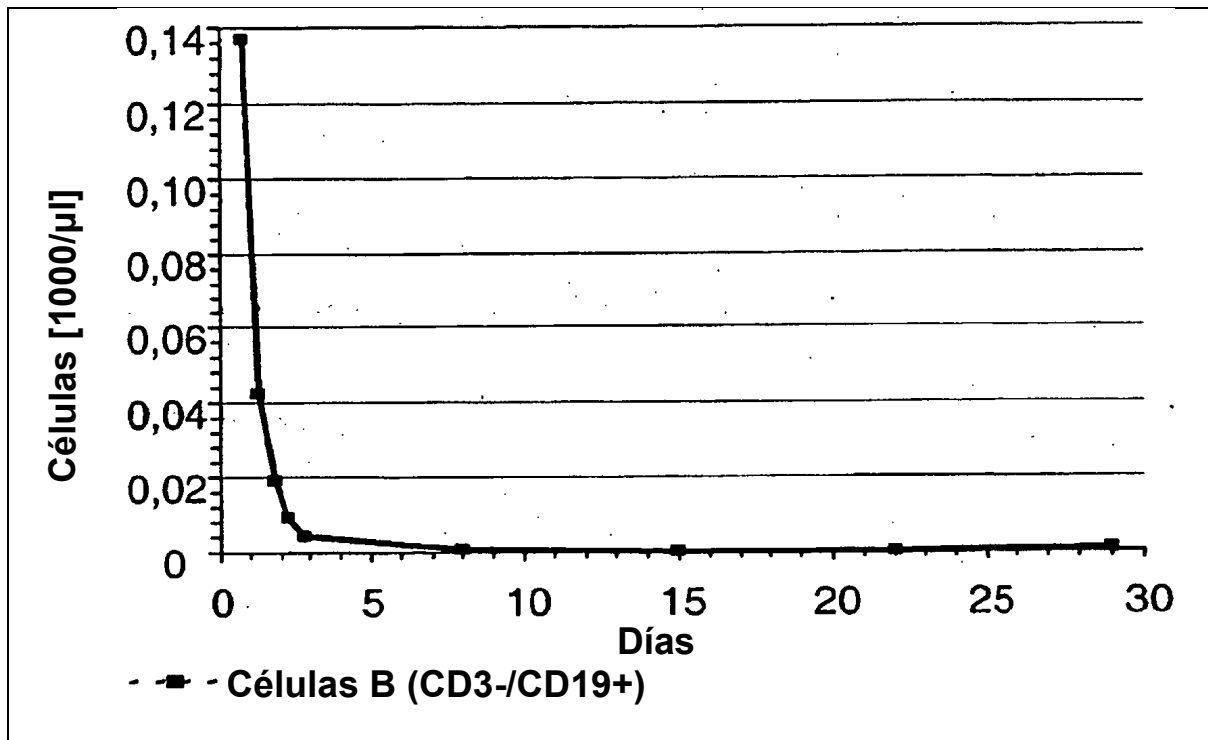
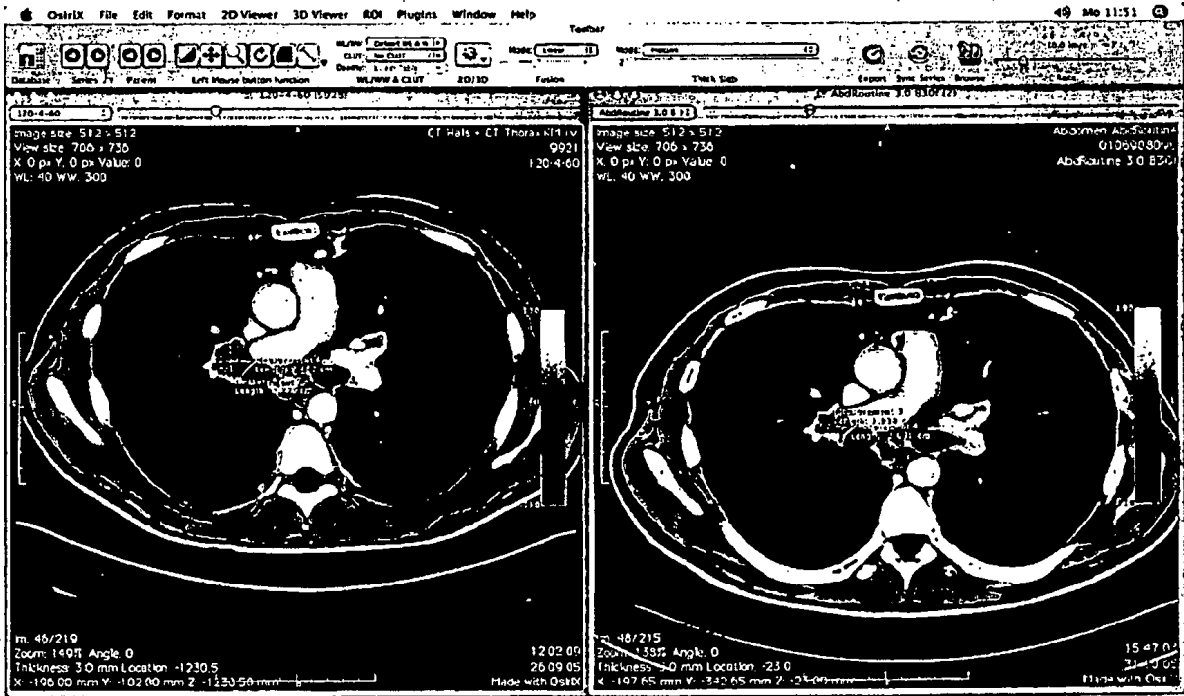


Figura 10

A

antes del tratamiento

después de 4 semanas de tratamiento



5

B

Lesión	Localización	Fecha 26,09.			Fecha 31,10.		
		a	b	Producto	a	b	Producto
1	mediastino	2,8	1,4	3,92	2,1	1,1	2,31
2	hiliar r	2,8	2,5	7,00	2,1	1,9	3,99
3	pulmonar r	3,4	1,5	5,10	1,8	1,0	1,80
4	retroperitoneal	2,1	1,6	3,36	1,2	1,0	1,20
5	ilíaca l	3,6	2,4	8,64	2,1	1,2	2,52
6	nucal l	1,3	1,0	1,30	0,8	0,6	0,48
			Suma	29,32		Suma	12,30
	SCR				Día 29		-58,0 %

Figura 11

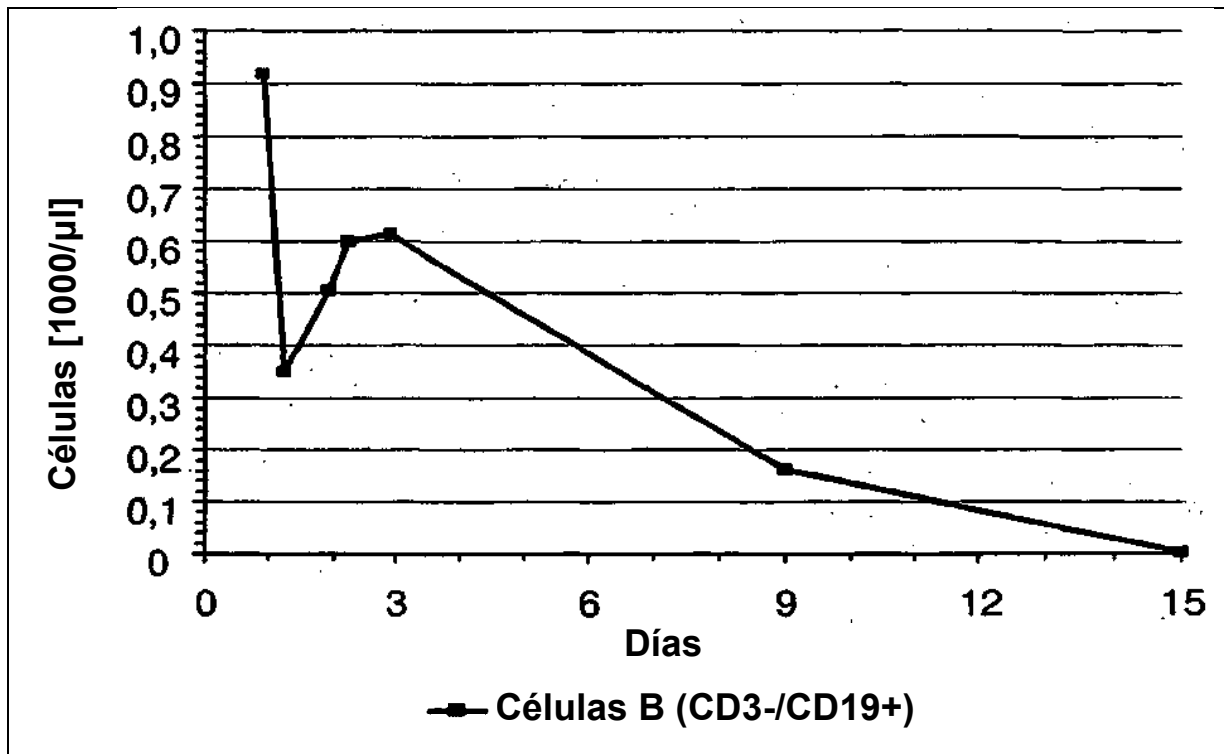
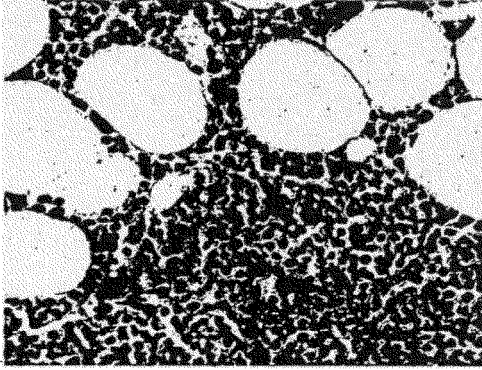


Figura 12

Antes del tratamiento



Después de 2 semanas de tratamiento

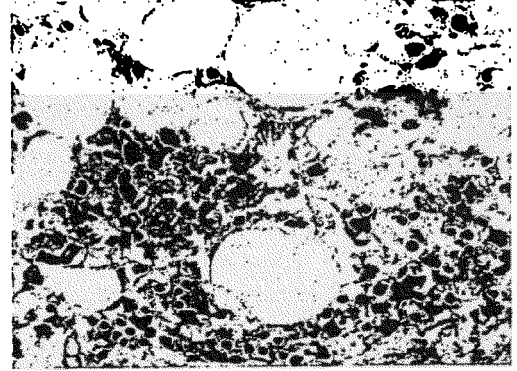
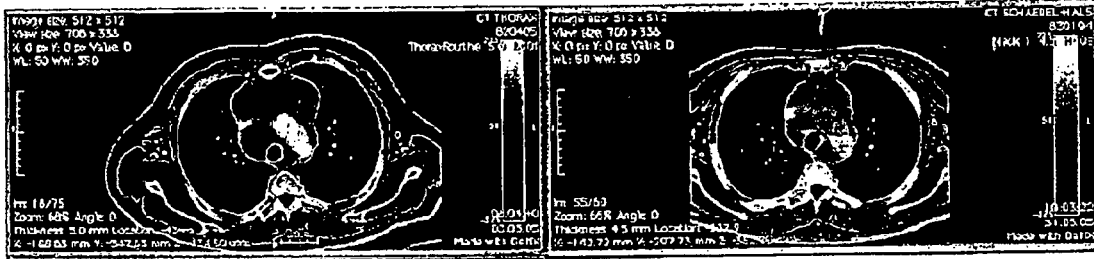


Figura 13

A

antes del tratamiento

después de 2 semanas de tratamiento

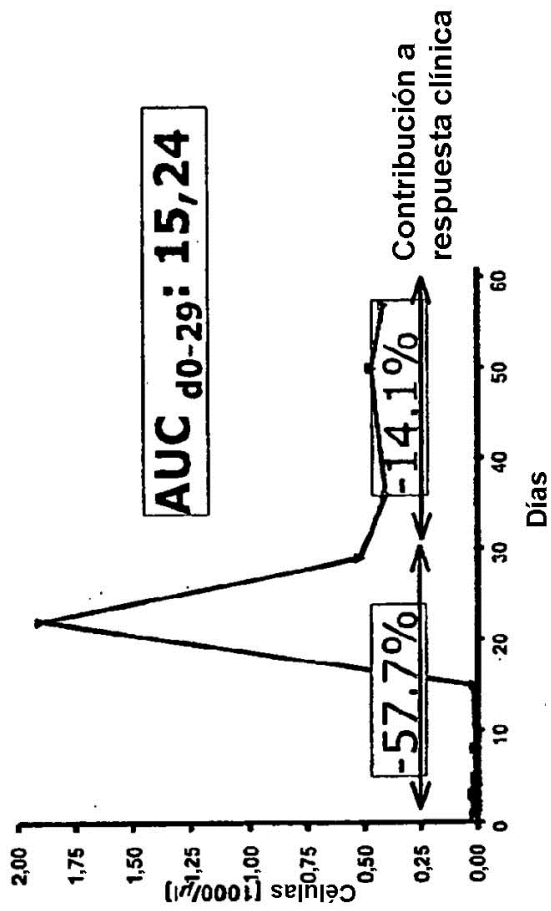


B

Lesión	Localización	Fecha 02.05			Fecha 31.05.		
		a	b	Producto	a	b	Producto
1	mediastínico (1)	12,0	3,0	36,00	7,0	2,8	19,60
2	mediastínico (2)	4,1	4,0	16,40	3,4	2,2	7,48
3	mediastínico (3)	6,5	5,1	33,15	4,0	2,1	8,40
4	mediastínico (4)	3,3	3,0	9,90	2,1	1,5	3,15
5	retroperitoneal	3,0	2,7	8,10	2,3	2,4	5,52
6	mesentérica	1,9	1,5	2,85	1,0	1,3	1,30
			Suma	106,40		Suma	45,45
		SCR			Día 21		-57,2 %

Figura 14

→ 109-002 Respuesta completa



→ 105-003 Respuesta parcial

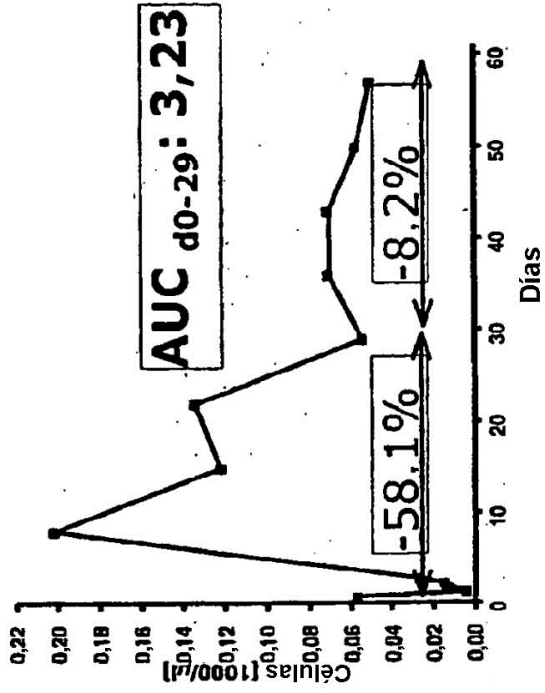


Figura 15

antes del tratamiento

después de 4 semanas y

después de 8 semanas de
tratamiento

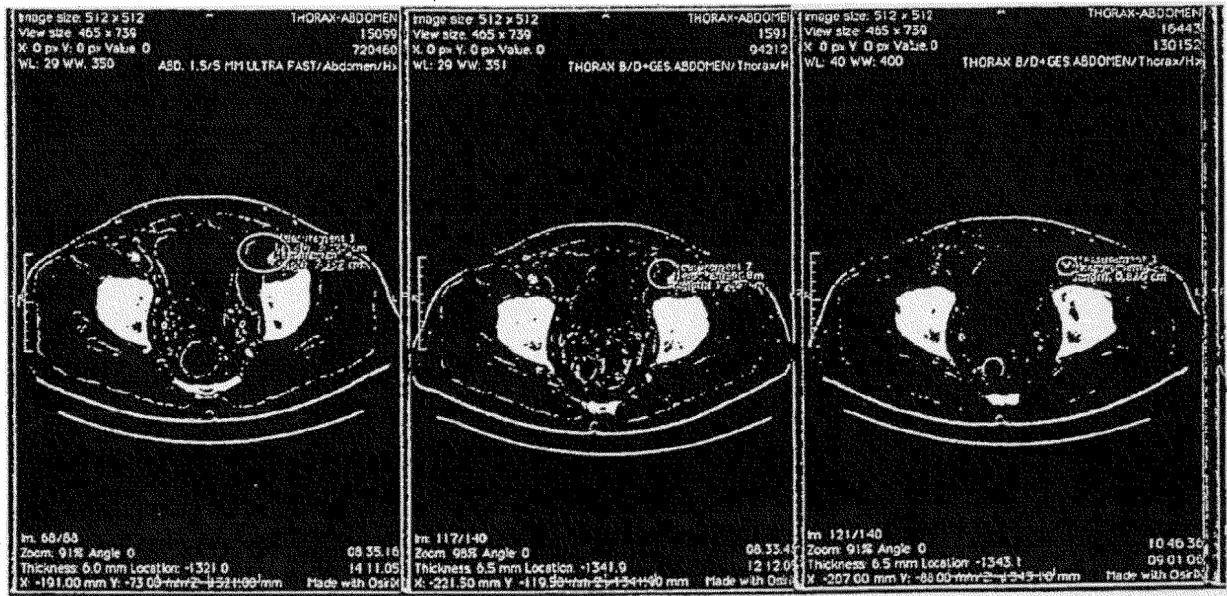
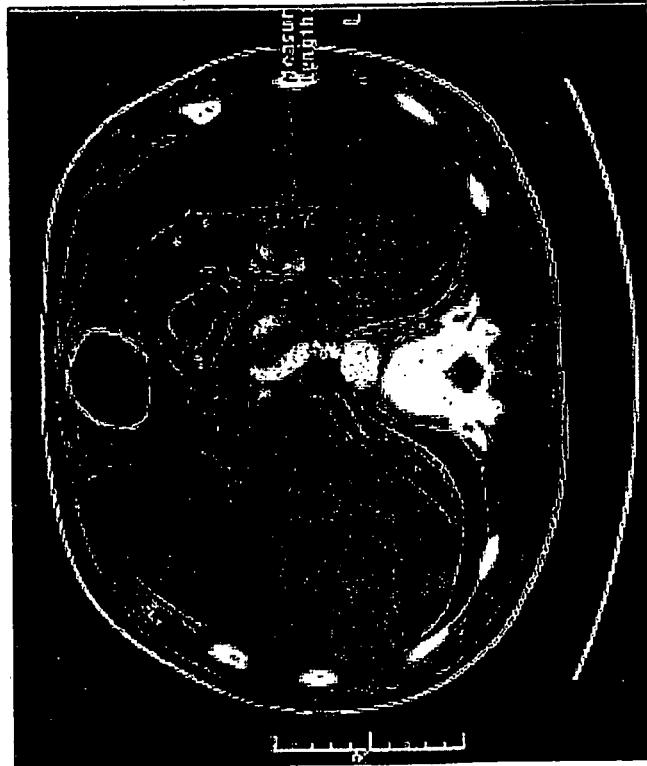


Figura 16

antes del tratamiento



después del tratamiento

