

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 257**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09764710 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2344539**

54 Título: **Tratamiento de leucemia linfoblástica aguda pediátrica**

30 Prioridad:

**07.11.2008 US 112323 P**

**02.06.2009 US 183291 P**

**29.06.2009 US 221269 P**

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

**07.05.2015**

73 Titular/es:

**AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (100.0%)**

**Staffelseestrasse 2**

**81477 München, DE**

72 Inventor/es:

**ZUGMAIER, GERHARD**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 535 257 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

Tratamiento de leucemia linfoblástica aguda pediátrica

5 La presente invención se refiere a una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 para su uso en un método para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica en un paciente de LLA pediátrica en necesidad de ello.

10 Con el actual tratamiento de LLA infantil, los índices de supervivencia sin complicaciones son de aproximadamente el 75%. Por tanto, la recaída es aún frecuente. Los problemas en el tratamiento de la recaída de LLA son la resistencia de las células leucémicas y la tolerancia reducida de los pacientes a una segunda ronda de tratamiento después de haber recibido ya terapia de primera línea intensiva, lo que produce un menor índice de remisión así como una mayor incidencia de posterior recaída y un desenlace inferior global. La poli quimioterapia intensificada es por tanto actualmente esencial para la inducción de una segunda remisión completa. Dependiendo de una variedad de factores pronósticos, la remisión se puede mantener con quimioterapia e irradiación craneal sola o con intensificación de tratamiento por trasplante de células madre (Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486).

20 Aunque se ha hecho un progreso tremendo en el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) (véase, por ejemplo, Möricke et al., Blood 111 (2008), p. 4477; Moghrabi et al., Blood 109 (2007), p. 896), la LLA con recaída es aún la cuarta neoplasia maligna pediátrica más común (Gaynon, Cancer 82 (1998), p. 1387). Especialmente para pacientes con recaída temprana de médula ósea a los tres años del diagnóstico, la terapia para estos pacientes es insatisfactoria y el trasplante de células madre alogénico es el único planteamiento curativo conocido hasta ahora. La recaída quimiorresistente después de trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) se asocia con un mal pronóstico, aunque las infusiones de linfocitos de donante (ILD) tras el trasplante podrían inducir remisión en pocos pacientes a través de la inducción de un efecto injerto contra leucemia (ICL) (Loren et al., BMT 41 (2008), p. 483). El segundo TCMH puede ser una opción y se han descrito algunos supervivientes a largo plazo. Sin embargo, el estado de enfermedad antes de TCMH es predictivo del desenlace tras el trasplante y se sabe que pacientes con enfermedad morfológica o niveles de ERM persistente de  $>10^4$  blastocitos leucémicos tienen un riesgo muy alto de recaída y un desenlace muy malo (Bader et al., J Clin Oncol. 27 (2009), p. 377-84). A la luz de esto, el estado de enfermedad antes del segundo TCMH es de la mayor importancia y se deben hacer todos los esfuerzos para lograr otra remisión. A pesar del uso de agentes quimioterapéuticos recientemente introducidos para leucemia resistente (Jeha, Semin Hematol. 46 (2009), 76-88), los pacientes con recaída después de TCMH con frecuencia tienen enfermedad quimiorresistente y estos pacientes son muy susceptibles a toxicidad quimioterapéutica. Para estos pacientes, se necesitan estrategias no quimioterapéuticas y menos tóxicas para inducir remisiones en tales pacientes.

40 En vista de las desventajas mencionadas anteriormente de las terapias de LLA pediátrica convencionales, todavía hay una necesidad para una pauta de tratamiento mejorada.

45 La presente invención se refiere a una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 para su uso en un método para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica en un paciente de ALL pediátrica en necesidad de ello. Este planteamiento inmunológico usando anticuerpos que involucran a células T por primera vez proporciona un tratamiento no quimioterapéutico y menos tóxico para LLA pediátrica.

50 Recientemente, un estudio en fase I ha demostrado actividad clínica significativa del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (blinatumomab) en linfoma no hodgkiniano (LNH) de células B positivo para CD19 en que se han observado regresiones tumorales parciales y completas impresionantes (Bargou et al., Science 321 (2008): 974-7). Anderson et al. (Blood J. 80 (1992): 2826-34) describen un heteroconjugado biespecífico entre un anticuerpo anti-CD19 y uno anti-CD3 que se dice desencadena la lisis de células de leucemia linfoblástica aguda.

55 En un ensayo clínico adicional aún en marcha, el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 anteriormente mencionado produjo la eliminación de células leucémicas quimiorresistentes en pacientes adultos positivos para ERM no trasplantados con LLA CD19<sup>+</sup>.

60 Ahora se ha encontrado sorprendentemente en dos usos compasivos que dicho anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 no es solo adecuado para el tratamiento de LLA en pacientes adultos, no trasplantados sino también de LLA con recaída pediátrica (o infantil) resistente a terapia convencional de LLA, incluyendo quimioterapia y trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico.

65 Aquí, los inventores informan sobre el poderoso efecto antileucémico del anticuerpo biespecífico CD19xCD3 en dos niños (a continuación nombrados paciente 1 y 2) con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores B, que tuvieron recaída quimiorresistente después de trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico de donantes no relacionados y haploidénticos coincidentes.

Antes del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, el paciente 1 se ha pretratado con TCMH alogénico y múltiples quimioterapias. Sin embargo, estas terapias de LLA pediátrica convencionales fallaron de modo que el paciente recaía repetidamente, con la consecuencia de que tenía un pronóstico extremadamente malo. A continuación, el paciente de LLA pediátrica recibió 15 microgramos/m<sup>2</sup>/24 horas del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 como una infusión continua durante cinco semanas. Durante el tratamiento con el anticuerpo, el paciente tuvo una expansión de linfocitos T CD8+ derivados de donante sin ningún signo de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Esta expansión de células T se asoció con una rápida eliminación de los blastocitos leucémicos del paciente y 10 días después del inicio del tratamiento con el anticuerpo, no se pudieron detectar blastocitos en la médula ósea del paciente más allá del nivel de detección de la enfermedad residual mínima (ERM) de 1 célula de 10000. El paciente permaneció negativo para ERM a lo largo del tratamiento con anticuerpo. El paciente se sometió a un segundo trasplante de células madre de su madre haploidéntica 2 semanas después del final del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 y permaneció negativo para ERM desde entonces (estado a noviembre 2009).

El paciente 2 de quince años fue diagnosticado con LLA de precursores B positivo para cromosoma Filadelfia y CD19 en abril de 2001. Después de la quimioterapia, recibió un TCMH de un hermano idéntico para HLA en octubre de 2001. En 2002, se diagnosticó una recaída de médula ósea y se alcanzó otra remisión con imatinib y quimioterapia. Después recibió un segundo TCMH de un donante no relacionado con HLA idéntico en octubre de 2004. En marzo de 2008, se diagnosticó una segunda recaída y fue tratado con quimioterapia a baja dosis y dasatinib debido a resistencia a imatinib. Después de quimioterapia adicional con clofarabina y citosina/arabinósido, alcanzó una remisión molecular y recibió un tercer TCMH alogénico de su padre haploidéntico con 3 de 6 alelos HLA no coincidentes con tratamiento tras el trasplante con dasatinib. Debido a hemorragia gastrointestinal y cardiomiopatía dilatada, se retiró dasatinib 5 meses después del trasplante. En abril de 2009, se diagnosticó una recaída combinada del sistema nervioso central (SNC) con  $7 \times 10^9/l$  de blastocitos en el SNC y el 3% de blastocitos en la médula ósea. El paciente se trató entonces con nilotinib, quimioterapia intratecal e irradiación fraccionada del SNC con 18 Gy. Tres meses después de este tratamiento, la médula ósea del paciente permaneció positiva para ERM a un nivel de  $1,1 \times 10^{-3}$  mientras que el SNC estaba libre de blastocitos. El análisis de quimerismo de la sangre periférica reveló una hematopoyesis derivada del donante completa de su padre haploidéntico.

El paciente se trató después con el agente único blinatumomab a  $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  durante 4 semanas por infusión continua sin efectos secundarios. Una aspiración de médula ósea al final del tratamiento mostró remisión completa con ERM indetectable en la médula ósea por debajo de  $<1 \times 10^{-4}$ . Como el paciente 1, el paciente 2 no mostró signos de EICH durante o después del tratamiento con blinatumomab. Actualmente está bien y asiste al colegio.

Estos datos demuestran impresionantemente que los anticuerpos biespecíficos que involucran células T pueden inducir un poderoso efecto del injerto contra leucemia (ICL) en ausencia de EICH en pacientes pediátricos con LLA de precursores B con recaída y resistente a terapia después de TCMH alogénico. Según esto, se prefiere en el tratamiento descrito en el presente documento de pacientes pediátricos que una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 induzca un efecto del injerto contra leucemia (ICL). Además, el tratamiento se tolera bien por los pacientes pediátricos. A la luz de esto, los métodos de esta invención proporcionan una opción de tratamiento sorprendentemente mejorada para leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, en particular, para casos en que la LLA pediátrica es resistente a terapia de LLA pediátrica convencional, incluyendo quimioterapia y/o TCMH alogénico. Según esto, y en una forma de realización adicional de la presente invención, las construcciones de cadena sencilla biespecífica que involucran células T empleadas en el presente documento (anti CD19xCD3) también se pueden emplear en pacientes pediátricos que han estado en trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) (alogénico). Como se ilustra en el presente documento, incluso pacientes pediátricos que tienen una recaída de su LLA después de TCMH de un donante sin relacionar o haploidéntico coincidente y/o pacientes pediátricos que eran resistentes a quimioterapia se pueden tratar con éxito con los métodos divulgados en el presente documento. Los pacientes ejemplificados como se documentado en el presente documento mostraron una respuesta antileucémica impresionante por la invención farmacéutica como se divulga en el presente documento y se volvieron negativos para ERM en ausencia de signos de EICH (enfermedad del injerto contra el huésped). Aunque la supervivencia de niños con LLA mejoró drásticamente durante las últimas décadas, la LLA con recaída es aún la principal causa de fallo del tratamiento. Para pacientes en la 2ª recaída, el TCMH alogénico es el único planteamiento curativo hasta ahora. Una de las principales acciones antileucémicas del TCMH es la inducción de un efecto ICL. Desafortunadamente, la aparición de ICL con frecuencia se asocia con la EICH, que es aún una causa principal de morbilidad y mortalidad después de TCMH. Por tanto, la inducción del ICL en ausencia de EICH es el tema de investigación intensiva. Un planteamiento para la inducción de un efecto ICL es infusiones de linfocitos de donantes (ILD) tras el trasplante, que preferentemente se usa para el tratamiento de LLA con recaída después de TCMH. Mientras que la ILD es muy eficaz en el tratamiento de LMC (Kolb, Blood 76 (1990), 2462), es menos eficaz en el tratamiento tras el trasplante de LLA con recaída (Loren, BMT 41 (2008), 483) y con frecuencia lleva a la aparición de EICH.

Los métodos farmacéuticos y médicos de la presente invención proporcionan un planteamiento novedoso para la inducción de ICL sin EICH. Este planteamiento es la activación in vivo de linfocitos derivados de donante después de TCMH usando dosis bajas del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 que involucra células T, que

dirige los linfocitos T contra los blastocitos LLA CD19+ de los pacientes. Este anticuerpo ha mostrado una actividad antilinfoma y antileucémica impresionante en la situación autóloga, pero no se había probado nunca en LLA pediátrica con recaída después de TCMH. Los dos pacientes pediátricos descritos en los ejemplos siguientes tenían una recaída de su LLA después de TCMH de un donante no relacionado o haploidéntico coincidente y eran resistentes a quimioterapia. Los pacientes mostraron una respuesta antileucémica impresionante después del inicio del tratamiento y se volvieron negativos para ERM en ausencia de ningún signo de EICH. La acción inmunológica del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 es independiente de la presentación de antígenos peptídicos, y esta es lo más probablemente la razón de que a pesar de la extensa expansión de células T derivadas de donante, no se indujera EICH. Dosis bajas del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 fueron suficientes para eliminar todos los blastocitos LLA en los pacientes más allá de los niveles de detección de ERM. Por tanto, el modo de acción de involucrar células T de este anticuerpo es muy diferente a anticuerpos convencionales, que requieren dosis mucho mayores y que no pueden involucrar células T a través de su parte Fc de la molécula de anticuerpo debido a la falta de receptores de Fc en las células T. A través del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, células T efectoras muy eficaces se pueden volver citotóxicas hacia blastocitos de LLA sin la inducción de una respuesta inmunitaria alorreactiva que resultante en EICH. Los inventores decidieron realizar un segundo TCMH alogénico de un donante haploidéntico en el paciente 1 después de que se volviera negativo para ERM. Hasta la fecha (noviembre de 2009), este paciente aún es negativo para ERM.

Desde la experiencia clínica inicial en estos dos pacientes con recaída quimiorresistente de LLA tras el trasplante, se ha concluido que el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 puede inducir remisiones completas impresionantes sin EICH. Por tanto, el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 en el marco pretrasplante para la reducción inmunológica de la carga leucémica y para el tratamiento de las recaídas tras el trasplante ofrece nuevas oportunidades terapéuticas para pacientes pediátricos con LLA avanzada.

El método de la presente invención proporciona las siguientes ventajas principales:

1. Como se demuestra en los siguientes ejemplos, la administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se puede usar para la terapia de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica que ha recaído y/o es resistente. No solo el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 puede sustituir a las terapias convencionales de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica (tal como quimioterapia) en pacientes pediátricos no elegibles para trasplante de células madre alogénico. También se puede usar para convertir pacientes de LLA pediátricos elegibles para dicho trasplante a un estado negativo de ERM. Este aspecto de la invención es importante en que los pacientes negativos para ERM tienen un menor riesgo de recaída después del trasplante que los pacientes positivos para ERM. En el mejor de los casos, la terapia de LLA pediátrica con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 hace la quimioterapia y/o el TCMH superfluos.

2. Se sabe que los pacientes pediátricos con enfermedad morfológica o niveles de ERM persistentes de  $>10^4$  blastocitos leucémicos tienen un riesgo muy alto de recaída y un desenlace muy malo (Bader et al., J Clin Oncol. 27 (2009), p. 377-84). Los niños tratados con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 mostraron una respuesta antileucémica impresionante después del inicio del tratamiento y se volvieron negativos para ERM durante el tratamiento, en ausencia de cualquier signo de EICH. Los métodos farmacéuticos de la invención proporcionan, por tanto, un planteamiento terapéutico para el tratamiento, alivio o eliminación de ERM en LLA pediátrica, reduciendo de esta manera o incluso eliminando el riesgo de una recaída para el paciente. El potencial curativo del TCMH depende del nivel de ERM antes del trasplante. El tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se puede usar para convertir los pacientes pediátricos de alto riesgo anteriormente mencionados a un estado negativo para ERM. Según esto, la ERM en LLA infantil resistente se puede tratar mediante el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 por primera vez.

3. Los métodos farmacéuticos de la invención no solo muestran un potente efecto antileucémico sino que también son menos tóxicos y producen menos efectos adversos que la terapia de LLA pediátrica convencional, incluyendo quimioterapia y/o TCMH alogénico. Hasta ahora no se han observado efectos secundarios a largo plazo después del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3. En contraste, las terapias de LLA pediátrica convencionales son muy agresivas y por tanto se asocian con considerables riesgos de salud para los pacientes pediátricos. Además, se han descritos efectos tardíos después de terapia de LLA pediátrica convencional en la niñez (véase, por ejemplo, Hudson MM, Late complications after leukemia therapy. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 750-773; Schmoll, Höffken, Possinger: Kompendium Internistische Onkologie, p. 2660 ff.; 4ª Edición, Springer Medizin Verlag Heidelberg; <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/lateeffects/HealthProfessional>). De hecho, los tratamientos de LLA pediátrica convencionales usan incluso pautas de tratamiento más agresivas que los planteamientos terapéuticos utilizados para LLA adulta. Sin embargo, como es evidente del aproximadamente 25% de índice de recaída en LLA pediátrica, ni siquiera estas terapias agresivas son suficientes para curar finalmente a todos los pacientes. A la luz de esto, es incluso más sorprendente que el tratamiento de pacientes de LLA pediátrica resistentes y/o con recaída con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 sea capaz de convertir dichos pacientes a un estado negativo para ERM que ofrece nuevas oportunidades terapéuticas para tales pacientes de alto riesgo. Esto es un resultado que no se podría alcanzar con terapia de LLA pediátrica convencional, tal como quimioterapia y/o TCMH.

4. Por ejemplo, los pacientes pediátricos de LLA Ph+ (bcr/abl) tienen un riesgo muy alto para una recaída entre todos los pacientes dentro de los subtipos de LLA (véase posteriormente). Aunque el TCMH alogénico se considera actualmente que es el tratamiento de elección en LLA Ph+ pediátrica, aproximadamente un tercio de los pacientes trasplantados recaen. Además, como se muestra en más detalle posteriormente, los lactantes (<12 meses) con LLA tienen un mayor riesgo para fallo de tratamiento de LLA convencional o estándar, con el peor pronóstico para esos con reorganizaciones génicas de *MLL* (t(4;11)). Los resultados mostrados para el paciente 2 en los siguientes ejemplos y los datos obtenidos en el ensayo clínico en marcha anteriormente mencionado que trata pacientes de LLA adultos (no trasplantados), sugiere que incluso LLA Ph+ (bcr/abl) y LLA con reorganizaciones génicas en *MLL* se pueden tratar con éxito con la administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3. La administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 por tanto ofrece un nuevo planteamiento terapéutico para LLA Ph+ pediátrica o LLA con translocaciones t(4; 11), especialmente para pacientes de LLA pediátrica con enfermedad residual mínima (ERM). Esto representa la enfermedad residual mínima (ERM) definida, por ejemplo, por análisis de PCR o FACS.

5. Debido a su actividad citotóxica muy alta, solo dosis bajas del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 son suficientes para el tratamiento con éxito de LLA pediátrica, lo que permite la eliminación de células de leucemia incluso en la médula ósea.

6. Menor duración del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 en comparación con la terapia de LLA pediátrica convencional. La quimioterapia de LLA pediátrica convencional dura habitualmente de 2 a 3 años, mientras que se pudo observar una respuesta muy rápida al anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 en los pacientes pediátricos mostrado en los siguientes ejemplos. Además, la respuesta es de larga duración: el paciente 1 ha permanecido negativo para ERM más de 12 meses después del trasplante; véase los siguientes ejemplos.

7. Los pacientes de LLA pediátricos con recaída con frecuencia tienen enfermedad quimiorresistente y estos pacientes son muy susceptibles a toxicidad quimioterapéutica. Para estos pacientes, el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 proporciona por primera vez una estrategia no quimioterapéutica y menos tóxica para inducir remisiones en tales pacientes.

8. Como se ha encontrado en el ensayo clínico en marcha descrito anteriormente en LLA en pacientes adultos, el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 produjo la eliminación de células leucémicas quimiorresistentes en pacientes adultos positivos para ERM no trasplantados con LLA CD19+. Mientras que en estos pacientes las células T citotóxicas involucradas derivaban del paciente, no existían datos hasta ahora sobre el uso del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 después de TCMH alogénico en un marco donde las células T involucradas derivan del donante. Aquí, los inventores informan por primera vez sobre la poderosa inducción de un efecto ICL en ausencia de EICH inducido por las células T derivadas del donante involucradas con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 en dos pacientes pediátricos con recaída quimiorresistente de LLA CD19+ después de TCMH alogénico.

En resumen, el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 proporciona una terapia novedosa y mejorada para LLA pediátrica, particularmente LLA pediátrica resistente y/o con recaída.

En una forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica o infantil es LLA de linaje B pediátrica, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda LLA de precursores B pediátrica, más preferiblemente LLA pro-B, LLA pre-B o LLA común (LLAc) pediátrica. Incluso más preferido la LLA de precursores B pediátrica es LLA común (LLAc).

La gran mayoría de los casos de LLA pediátrica o infantil (>85%) son de fenotipo de células precursoras B (Schultz et al., Blood 109 (2007): 926-935). Puesto que el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento se dirige contra el marcador asociado a células B CD19, dicho anticuerpo es particularmente adecuado como un agente terapéutico para leucemia linfoblástica aguda de linaje B pediátrica, más preferiblemente para LLA de precursores B pediátrica. La LLA de precursores B pediátrica se puede subdividir además en LLA pro-B, LLA pre-B o LLA común (LLAc) pediátrica (véase, por ejemplo, Behm F.G., Immunophenotyping. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 150-209). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, incluyendo leucemia linfoblástica aguda de precursores B pediátrica y otros tipos de LLA de linaje (de células) B y los tratamientos de las mismas se revisan, por ejemplo, en Pui CH, Clin Adv Hematol Oncol. 4 (2006): 884-6; Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354 (2006): 166-178; Pui CH et al., Lancet 371 (2008): 1030-1043; Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007): 149-165). También se puede encontrar más información con respecto a LLA pediátrica, por ejemplo en <http://www.cancer.gov> o <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

Desde un punto de vista histórico, el Grupo Oncológico Pediátrico (POG) y el Grupo de Cáncer de Niños (CCG) adoptaron un conjunto común de criterios de riesgo en una conferencia internacional financiada por el Instituto Nacional del Cáncer (Smith M, et al., J Clin Oncol 14 (1996), 18-24), en 1993. Los criterios del NCI se basaban en factores que tenían una aceptación internacional y reproducibilidad: edad, recuentos iniciales de glóbulos blancos (GB), y la presencia de enfermedad extramedularmente en el diagnóstico. Para refinar adicionalmente la terapia,

tanto el POG como el CCG han usado también factores de riesgo adicionales que se ha mostrado que tienen un impacto en el desenlace del paciente (por ejemplo, ploidía, cariotipo de blastocitos, y una respuesta morfológica temprana). En 2000, el CCG y el POG se unieron para formar el Grupo de Oncología de Niños (COG). Esta fusión permitió el análisis de datos clínicos, biológicos y de respuesta temprana predictivos de supervivencia sin complicaciones (SSC) en leucemia linfoblástica aguda (LLA) para desarrollar un nuevo sistema de clasificación y algoritmo de tratamiento. De 11.779 niños (edad, de 1 a 21,99 años) con LLA de precursores B recién diagnosticada consecutivamente inscritos por el CCG (de diciembre de 1988 a agosto de 1995, n = 4986) y el POG (de enero de 1986 a noviembre de 1999, n = 6793), el estudio analizó retrospectivamente 6238 pacientes (CCG, 1182; POG, 5056) con datos citogenéticos informativos (Schultz et al., *Blood* 109 (2007): 926-935). Se definieron cuatro grupos de riesgo como riesgo muy alto (RMA; SSC de 5 años, el 45% o menor), riesgo menor (SSC de 5 años, al menos el 85%) y riesgo estándar y alto (los que permanecen en los respectivos grupos de riesgo del Instituto Nacional del Cáncer [NCI]). Los criterios de RMA incluían hipodiploidía extrema (menos de 44 cromosomas), t(9;22) y/o BCR/ABL, y fallo de inducción. Los pacientes con riesgo menor eran de riesgo estándar del NCI con bien t(12;21) (TEL/AML1) o trisomías simultáneas de los cromosomas 4, 10 y 17. Incluso con diferencias de tratamiento, había una alta concordancia entre los análisis del CCG y POG. El esquema de clasificación de riesgo del COG se usa para la división de LLA de precursores B en grupos de riesgo menor (27%), estándar (32%), alto (37%) y muy alto (4%) basados en la edad, recuento de glóbulos blancos (GB), citogenética, respuesta medular el día 14, y enfermedad residual mínima (ERM) de inducción final por citometría de flujo en ensayos de COG.

Actualmente, la asignación de tratamiento basada en riesgo se utiliza para leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil o pediátrica. Este planteamiento permite que niños que históricamente tienen un buen desenlace sean tratados con terapia modesta y se les evita un tratamiento más intenso y tóxico, al tiempo que permite que niños con una probabilidad históricamente menor de supervivencia a largo plazo reciban terapia más intensa que puede aumentar su probabilidad de cura. Se ha encontrado que niños mayores y adolescentes ( $\geq 10$  años) y lactantes ( $< 12$  meses) tienen un desenlace menos favorable que los niños con edades de 1 a 9 años en el diagnóstico, y generalmente se emplean tratamientos más agresivos para estos pacientes (Nachman J, *Br J Haematol* 130 (2005): 166-73). El tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 proporciona ahora una terapia mejorada, menos tóxica para tales poblaciones de pacientes pediátricos, es decir, niños mayores y adolescentes ( $\geq 10$  años) y lactantes ( $< 12$  meses), que tienen un desenlace menos favorable con terapia de LLA convencional, tal como quimioterapia y/o TCMH.

El tratamiento con éxito de niños con LLA requiere el control de la enfermedad sistémica (por ejemplo, médula, hígado y bazo, ganglios linfáticos) así como la prevención o tratamiento de la enfermedad extramedular, particularmente en el sistema nervioso central (SNC). Solo el 3% de los pacientes tienen implicación del SNC detectable por criterios convencionales en el diagnóstico ( $\geq 5$  GB/microlitro con células linfoblásticas presentes). Sin embargo, a menos que se dirija terapia específica al SNC, del 50% al 70% o más de niños desarrollarán por último leucemia sintomática en el SNC. Por tanto, actualmente se recomienda que todos los niños con LLA deben recibir quimioterapia de combinación sistémica junto con alguna forma de profilaxis en el SNC. Actualmente, la mayoría de los grupos tratan pacientes con leucemia en el SNC documentada en el diagnóstico ( $> 5$  GB/ $\mu$ l con blastocitos; CNS3), y esos con fenotipo de células T y alto recuento de GB en el diagnóstico, con terapia intratecal y posterior radiación craneal. Según esto, el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 preferiblemente se lleva a cabo en combinación con profilaxis en el SNC, tal como terapia intratecal y/o radiación craneal.

El tratamiento convencional o estándar para niños con LLA se divide en fases: inducción de la remisión, consolidación o intensificación, y terapia de mantenimiento (o continuación), con terapia de asilo en el SNC generalmente suministrada en cada fase. Se usa una fase de intensificación de la terapia después de la inducción de la remisión para todos los pacientes. La intensidad tanto de la terapia de inducción como de la terapia de posinducción se determina por los factores pronósticos clínicos y biológicos utilizados para la asignación de tratamiento basada en riesgo y algún tipo de evaluación de respuesta temprana. Esta evaluación puede incluir porcentaje de blastocitos en médula el día 7 y/o el día 14, recuento de blastocitos en sangre periférica el día 8, y determinaciones de enfermedad residual mínima en médula ósea y/o sangre periférica durante o al final de la inducción (Pui CH, Evans WE, *N Engl J Med* 354 (2006): 166-78). La duración de la terapia para niños con LLA varía entre 2 y 3 años. En contraste, se pudo observar una respuesta muy rápida al tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 en los pacientes pediátricos, como se muestra en los siguientes ejemplos. Además, el paciente 1 es negativo para ERM hasta la fecha (noviembre de 2009), lo que indica que se podría alcanzar una cura a largo plazo.

Los subgrupos de pacientes que tienen un mal pronóstico con la terapia estándar o convencional actual pueden requerir un tratamiento diferente. Por ejemplo, los lactantes con LLA tienen mayor riesgo para fallo de tratamiento, con el peor pronóstico para esos con reorganizaciones génicas *MLL* (Rubnitz JE, et al.: *Blood* 84 (1994): 570-3; Biondi A, et al., *Blood* 96 (2000): 24-33; Pui CH, et al., *Lancet* 359 (2002): 1909-15; Silverman LB, et al.: *Cancer* 80 (1997): 2285-95). Estos niños generalmente se tratan con pautas diseñadas específicamente para lactantes (Silverman, et al., (1997), loc. cit., Chessells JM, et al., *J Haematol* 117 (2002): 306-14; Reaman GH, et al., *J Clin Oncol* 17 (1999): 445-55; Pieters R, et al., *Lancet* 370 (2007): 240-50). Las pautas actuales para lactantes emplean planteamientos de tratamiento intensificado y pueden ofrecer control de la enfermedad mejorado comparado con

planteamientos menos intensivos previos, pero el desenlace a largo plazo y la toxicidad son desconocidos (Reaman (1999), loc. cit.; Pieters (2007), loc. cit.; Kosaka Y, et al., Blood 104 (2004): 3527-34; Hilden JM, et al., Blood 108 (2006): 441-51). Ciertos niños (mayores de 1 año) con LLA pueden tener una probabilidad menor del 50% de remisión a largo plazo con la terapia actual (por ejemplo, LLA positiva para cromosoma Filadelfia t[9;22], pacientes hipodiploides y esos con fallo de inducción inicial). Para estos pacientes, se considera el trasplante de médula ósea alogénico de un hermano coincidente para el antígeno de leucocito humano (HLA) durante la primera remisión (Snyder DS, et al., Leukemia 13 (1999): 2053-8; Arica M, et al., N Engl J Med 342 (2000): 998-1006; Schrauder A, et al., J Clin Oncol 24 (2006): 5742-9). El trasplante de donante hermano coincidente para HLA, sin embargo, no ha demostrado ser de beneficio en pacientes definidos como de alto riesgo solamente por recuento de GB, sexo y edad (Ribera JM, et al., J Clin Oncol 25 (2007): 16-24).

Puesto que la mielosupresión y la inmunosupresión generalizada son una consecuencia anticipada tanto de leucemia como de su tratamiento con quimioterapia, los pacientes se deben seguir estrechamente durante el tratamiento de LLA pediátrica convencional. Deben estar inmediatamente disponibles las instalaciones adecuadas tanto para el apoyo hematológico como para el tratamiento de infecciones y otras complicaciones a lo largo de todas las fases del tratamiento de leucemia. Aproximadamente el 1% de los pacientes mueren durante la terapia de inducción y otro del 1% al 3% mueren durante la primera remisión de complicaciones relacionadas con el tratamiento (Christensen MS, et al., Br J Haematol 131 (2005): 50-8).

El tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 proporciona una terapia alternativa y menos tóxica para LLA pediátrica, particularmente para LLA pediátrica resistente y/o con recaída. Dicho tratamiento evita las desventajas de las terapias de LLA infantil convencionales, tales como fallos de tratamiento, toxicidad y efectos adversos a largo plazo. Por tanto, es una alternativa muy eficaz pero menos tóxica y con menor riesgo para la salud a la quimioterapia y/o TCMH alogénico.

Según esto, en otra forma de realización de los métodos farmacéuticos de la invención, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es resistente y/o LLA con recaída.

La LLA pediátrica puede ser resistente a la quimioterapia o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico o a quimioterapia y trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico. La LLA puede ser LLA con recaída o LLA con recaída resistente a terapia de LLA convencional, incluyendo quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico. Sin embargo, también está en el ámbito de la invención que la LLA sea una LLA recién diagnosticada. En este marco, el tratamiento mediante el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 puede ser útil como primera terapia (de primera línea), solo o en combinación con TCMH.

El término "LLA pediátrica resistente" como se usa en el presente documento significa resistencia de la LLA pediátrica a terapia de LLA pediátrica convencional o estándar, tal como quimioterapia y/o TCMH. Actualmente, el índice de recaída en LLA pediátrica es aproximadamente el 25%. Puesto en otras palabras: la terapia de LLA pediátrica convencional o estándar no puede curar finalmente todos los pacientes pediátricos.

El término "LLA pediátrica con recaída" como se usa en el presente documento indica el regreso de signos y síntomas de la enfermedad LLA después de que un paciente pediátrico haya disfrutado de una remisión. Por ejemplo, después de tratamiento de LLA convencional usando quimioterapia y/o TCMH, un paciente de LLA pediátrica puede entrar en remisión sin signos o síntomas de LLA, permanece en remisión durante un par de años, pero después padece una recaída y se tiene que tratar una vez más para LLA.

Los pacientes de LLA pediátrica con recaída con frecuencia tienen enfermedad quimiorresistente. Estos pacientes son muy susceptibles a toxicidad quimioterapéutica que se puede evitar mediante el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3.

El término "terapia estándar" o "terapia convencional" como se usa en el presente documento se refiere a terapia de LLA pediátrica usando quimioterapia y/o TCMH. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, incluyendo leucemia linfoblástica aguda de precursores B pediátrica y otros tipos de LLA de linaje (de células) B, y los tratamientos de las mismas se revisan, por ejemplo, en Pui CH, Clin Adv Hematol Oncol. 4 (2006): 884-6; Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354 (2006): 166-178; Pui CH et al., Lancet 371 (2008): 10301043; Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007): 149-165). También se puede encontrar más información con respecto a LLA pediátrica, por ejemplo en <http://www.cancer.gov> o <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

El término "anticuerpo de cadena sencilla biespecífico" o "anticuerpo biespecífico de cadena sencilla" o términos relacionados según la presente invención significan construcciones de anticuerpos resultantes de unir al menos dos regiones variables de anticuerpos en un única cadena polipeptídica desprovista de la(s) parte(s) constante y/o Fc presentes en las inmunoglobulinas completas. El anticuerpo de cadena sencilla biespecífico como se denomina en el presente documento es funcional, es decir, citotóxicamente activo, como un monómero y por tanto claramente distinguible de diacuerpos o tandabs descritos en la técnica que son funcionales solo como dímeros o multímeros. Un "enlazador" como se usa en el presente documento une dominios V de la misma especificidad, mientras que un "espaciador" como se usa en el presente documento une dominios V de diferentes especificidades. Por ejemplo, un

anticuerpo de cadena sencilla biespecífico puede ser una construcción con un total de dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, dos regiones VH, cada una capaz de unirse específicamente a un antígeno separado, y unidas entre sí a través de un espaciador polipeptídico sintético corto (habitualmente menos de 10 aminoácidos) de modo que las dos regiones variables de anticuerpo con un espaciador interpuesto existen como un única cadena polipeptídica contigua. Otro ejemplo de un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico puede ser una cadena polipeptídica única con tres regiones variables de anticuerpo. Aquí, dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo una VH y una VL, pueden hacer un scFv, en donde dos regiones variables de anticuerpo están unidas entre sí a través de un enlazador polipeptídico sintético, el último con frecuencia está genéticamente manipulado para ser mínimamente inmunógeno mientras que permanece máximamente resistente a proteólisis. Este scFv es capaz de unirse específicamente a un antígeno particular, y está unido a una región variable de anticuerpo más, por ejemplo una región VH, capaz de unirse a un antígeno diferente que el que se une al scFv. Aun otro ejemplo de un anticuerpo de cadena sencilla 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, puede formar un scFv capaz de unirse a un antígeno, mientras que la segunda región VH y región VL pueden formar un segundo scFv capaz de unirse a otro antígeno. En una única cadena polipeptídica contigua, regiones variables de anticuerpo individuales de una especificidad pueden estar ventajosamente separadas por un enlazador polipeptídico sintético como se ha descrito anteriormente, mientras que los respectivos scFv pueden estar ventajosamente separados por un corto espaciador polipeptídico como se ha descrito anteriormente. Se muestran ejemplos no limitantes de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos así como métodos para producirlos en los documentos WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-70; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-5; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-7; Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-103; Brühl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426.

Como se usa en el presente documento, "CD3" indica un antígeno que se expresa en células T, preferiblemente células T humanas como parte del complejo del receptor de células T multimolecular, CD3 consiste 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 produce la activación de células T similar a la unión de un antígeno pero independiente de la especificidad clonal del subconjunto de células T. Por tanto, el término "anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3" como se usa en el presente documento se refiere a una construcción específica para CD3 capaz de unirse al complejo CD3 humano expresado en células T humanas y capaz de inducir la eliminación/lisis de células diana, en donde tales células diana tienen/muestran un antígeno que está unido por la otra parte que no se une a CD3 del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico. La unión del complejo CD3 por unidores específicos de CD3 (por ejemplo un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico como se administra según los métodos farmacéuticos de la invención) produce la activación de células T como se sabe en la técnica; véanse, por ejemplo, los documentos WO 99/54440 o WO 2007/068354. Según esto, una construcción apropiada para los métodos farmacéuticos de la invención es ventajosamente capaz de eliminar/lisar células in vivo y/o in vitro. Las células diana correspondientes comprenden células que expresan un antígeno tumoral, tal como CD19, que es reconocido por la segunda especificidad (es decir, la parte que no se une a CD3 del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico) de la construcción mencionada. Preferiblemente, dicha segunda especificidad es para CD19 humano que ya se ha descrito en los documentos WO 99/54440, WO 2004/106381 o WO 2007/068354. Según esta forma de realización, cada parte específica de antígeno del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico comprende una región VH de anticuerpo y una región VL de anticuerpo. Una variante ventajosa de este anticuerpo de cadena sencilla biespecífico es del extremo N al extremo C:

V<sub>L</sub>(CD19)-V<sub>H</sub>(CD19)-V<sub>H</sub>(CD3)-V<sub>L</sub>(CD3).

Dentro del significado de la invención, el término "se une específicamente" o términos relacionados tales como "especificidad" se debe(n) entender como que se caracteriza(n) principalmente por dos parámetros: un parámetro cualitativo (el epítipo de unión, o *dónde* se une un anticuerpo) y un parámetro cuantitativo (la afinidad de unión, o *cómo de fuerte* se une este anticuerpo donde lo hace). Se puede determinar ventajosamente qué epítipo se une a un anticuerpo por ejemplo, por metodología FACS, ELISA, mapeo de epítipo de mancha de péptido, o espectroscopía de masas. La fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítipo particular se puede determinar ventajosamente por ejemplo, por tecnologías conocidas de Biacore y/o ELISA. Una combinación de tales técnicas permite el cálculo de una proporción señal:ruido como una medida representativa de la especificidad de unión. En tal proporción señal:ruido, la señal representa la fuerza de la unión del anticuerpo al epítipo de interés, mientras que el ruido representa la fuerza de la unión del anticuerpo a otros epítipos no relacionados que se diferencian del epítipo de interés. Una proporción señal:ruido de, por ejemplo, al menos 50, pero preferiblemente aproximadamente 80 para un epítipo de interés respectivo determinado, por ejemplo, por Biacore, ELISA o FACS se puede tomar como una indicación de que el anticuerpo evaluado se une al epítipo de interés de una manera específica, es decir, es un "unidor específico". El término "unión a/interacción con" también se puede referir a un epítipo conformacional, un epítipo estructural o un epítipo discontinuo que consiste en dos o incluso más regiones de las moléculas diana humanas o partes de las mismas. Un epítipo conformacional se define por dos o más secuencias de aminoácidos discretas separadas en la secuencia primaria que se juntan en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega a la proteína nativa (Sela, (1969) Science 166, 1365 y Laver, (1990) Cell 61, 553-6). El término "epítipo discontinuo" significa epítipos no lineales que se ensamblan de residuos de partes distantes de la cadena

polipeptídica. Estos residuos se unen en la superficie de la molécula cuando la cadena polipeptídica se pliega en una estructura tridimensional para constituir una epítipo conformacional/estructural.

5 El término “tratamiento” como se usa en el presente documento significa en el sentido más amplio procedimientos o aplicaciones médicas que se pretende alivien la enfermedad. En el caso presente, la administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (preparado para la administración a un paciente de LLA pediátrica) como se describe en el presente documento es para el tratamiento, alivio o eliminación de la enfermedad LLA pediátrica.

10 El término “alivio” como se usa en el presente documento es sinónimo de mejora. Si el estado de un paciente de LLA pediátrica muestra alivio, el paciente está claramente mejor -hay alguna mejora en su estado clínico. Por ejemplo, puede ser una mejora en el estado del paciente de LLA pediátrica, si se puede alcanzar una estabilización de la enfermedad LLA pediátrica, por ejemplo, la enfermedad LLA ya no progresa. Esta fase de enfermedad también se denomina enfermedad estable. El alivio también puede ser una mejora del estado de ERM del paciente de LLA pediátrica. Por ejemplo, antes del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, pueden ser detectables 100 células de leucemia por  $10^4$  células de médula ósea en el paciente de LLA pediátrica. Debido al  
15 tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, el número de células de leucemia se puede reducir a 10 células de leucemia o incluso menos células de leucemia (por ejemplo, menos de una célula de leucemia) por  $10^4$  células de médula ósea en este caso ejemplar.

20 El término “eliminación” como se usa en el presente documento significa la extracción de células leucémicas del cuerpo de un paciente de LLA pediátrica. Como se muestra en el siguiente ejemplo, la administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 es capaz de convertir leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para ERM a un estado negativo para ERM, es decir un estado en el que ERM no es detectable ( $<10^{-4}$ ; es decir, menos de 1 célula por  $10^4$  células de médula detectable). En este caso, se alcanza una remisión molecular completa.

25 El término “administración” como se usa en el presente documento significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 anteriormente mencionado (preferiblemente el mostrado en SEQ ID NO. 1) a un individuo, es decir, un paciente pediátrico humano. Mediante “cantidad terapéuticamente eficaz” se quiere decir una dosis que produce los efectos para los que se administra, es decir, suficiente para destruir células de leucemia linfoblástica aguda. Preferiblemente, la dosis administrada del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 produce la eliminación de todas las células de leucemia linfoblástica aguda del cuerpo del paciente pediátrico, produciendo un estado de LLA negativo para ERM, como se define en el presente documento. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento, y será comprobable por el experto en la materia usando técnicas conocidas. El médico y factores clínicos determinarán la pauta de dosis.  
30 Como se sabe bien en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente pediátrico dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente pediátrico, área de superficie corporal, edad, peso corporal, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, estado de salud general, y otros fármacos que se administran al mismo tiempo.

40 Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en los intervalos mostrados en las formas de realización de los métodos de la invención y los ejemplos adjuntos; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores anteriormente mencionados.

45 El término “infusión continua” se refiere a una infusión que se deja seguir permanentemente durante un periodo de tiempo, es decir, sin interrupción. “Infusión continua” se refiere a una infusión administrada permanentemente. Según esto, en el contexto de la invención, los términos “permanente” y “continua” se usan como sinónimos. Dentro del significado de la invención, por ejemplo, el término “administrado por infusión continua durante (al menos) 4 semanas” o similar indica una situación en la que el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 usado en los métodos farmacéuticos según la invención se administra continuamente al cuerpo de un paciente pediátrico durante un periodo de (al menos) 4 semanas de una manera sostenida, constante a lo largo de la duración entera  
50 requerida en los medios y métodos farmacéuticos de la invención. Los esquemas de administración continua del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se describen en más detalle en el documento WO 2007/068354. Se evita una interrupción de la introducción del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, es decir, una transición de un estado en que este anticuerpo se administra al cuerpo del paciente pediátrico a un estado en que este anticuerpo no se administra más al cuerpo del paciente pediátrico no se produce, o no significativamente, durante la duración entera de la administración requerida por los métodos farmacéuticos de la invención por otras razones que rellenar el suministro de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 que se administra o intervenciones médicas que se hacen necesarias o similares. En cuanto a que tal reaprovisionamiento necesario produce una interrupción temporal de la introducción del anticuerpo administrado, tal  
55 administración se debe aún entender como que es “ininterrumpida” o “permanente” en el sentido de los métodos farmacéuticos según la invención. En la mayoría de los casos tal reaprovisionamiento generalmente es de tal corta duración que el tiempo durante el que el anticuerpo no se introduce en el cuerpo del paciente pediátrico será muy reducido cuando se compara con el tiempo planeado para la pauta de administración global según los métodos farmacéuticos según la invención. Según la invención, un ciclo de tratamiento se puede entender como la infusión continua del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 al paciente de LLA durante un periodo de (al menos) 4 semanas, seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. El término “al menos” como se usa en el  
60  
65

presente documento significa que la infusión continua también se puede llevar a cabo durante un periodo de tiempo más largo de 4 semanas, por ejemplo, 5, 6, 7 u 8 semanas o incluso más largo, seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. Puede ser el caso que tras determinar la fase de ERM del/de los paciente(s) pediátrico(s) tratado(s) después de una administración continua de (al menos) 4 semanas (o un ciclo de tratamiento), se pudiera alcanzar una respuesta mínima o parcial pero no negatividad para ERM. En tales circunstancias, la administración continua se puede extender durante uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso hasta diez ciclos de tratamiento adicionales para alcanzar un resultado terapéutico mejor, por ejemplo, una respuesta hematológica completa, o incluso molecular completa. Preferiblemente, dicha respuesta molecular completa es negatividad para ERM (como se define posteriormente en el presente documento) que disminuye el riesgo de recaída de la enfermedad LLA. Por ejemplo, se ha encontrado que la negatividad para ERM o bajos niveles de ERM en pacientes de LLA pediátrica antes e TCMH alogénico reduce el riesgo de una recaída (Bader P, et al., J Clin Oncol 27 (2009): 377-384). Como se muestra en los siguientes ejemplos, la negatividad para ERM se puede alcanzar por tratamiento de los pacientes de LLA pediátrica con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3.

Por tanto, en una forma de realización de los métodos farmacéuticos de la invención, el uno o más ciclo(s) de tratamiento, en que administra continuamente el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 al paciente de LLA pediátrica, está(n) seguido(s) por TCMH alogénico. Puesto en otras palabras: en esta forma de realización preferida, el método de la invención es anterior al trasplante de células madre (TCMH) alogénico para convertir la LLA positiva para ERM a un estado negativo para ERM. De esta manera, el riesgo de una recaída disminuye significativamente.

En otra forma de realización del método de la invención, el método es después del trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico.

El procedimiento de trasplante puede estar seguido por uno o más ciclo(s) de tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3. Esta forma de realización es importante en casos de LLA pediátrica con recaída, donde los pacientes han recibido quimioterapia y TCMH. Debido al fallo de estas terapias convencionales, la enfermedad puede recaer y ser curada ahora por la administración de dicho anticuerpo. Además, el tratamiento mediante el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se puede usar como terapia de consolidación después de TCMH para evitar otra recaída de la enfermedad LLA.

Los siguientes ejemplos también proporcionan datos sobre el uso del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 después de TCMH alogénico donde las células T involucradas derivan del donante. Se pudo observar una inducción poderosa de un efecto de injerto contra leucemia (ICL) en ausencia de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) inducido por el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 en dos pacientes con recaída quimiorresistente de LLA CD19+ después de TCMH hematopoyético alogénico. Por tanto, en otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, el paciente de LLA pediátrico se puede tratar con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 después de haber recibido TCMH alogénico.

En el mejor de los casos se prevé que el tratamiento de pacientes de LLA pediátrica con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 sea capaz de sustituir la terapia de LLA pediátrica convencional, tal como quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, el tratamiento del paciente de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 es capaz de eliminar las células de leucemia linfoblástica aguda del cuerpo de los pacientes por debajo del límite de detección. Preferiblemente, el principal fin terapéutico de la administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, bien solo o en combinación con TCMH alogénico, a un paciente pediátrico de LLA es la conversión de un estado positivo para ERM a un estado negativo para ERM produciendo supervivencia sin leucemia, como se define en el presente documento posteriormente. Como se demuestra en el presente documento, los pacientes de LLA pediátrica positivos para ERM se volvieron negativos para ERM después del primer ciclo de tratamiento en el que el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se ha administrado continuamente durante cinco semanas (paciente 1) o cuatro semanas (paciente 2). En el paciente 1, el ciclo de tratamiento ha sido seguido por un TCMH haploide. Desde noviembre de 2009, este paciente permanece en remisión completa negativo para ERM, es decir sin tumor.

Seguir la administración ininterrumpida del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 de la manera de los métodos farmacéuticos según la invención durante periodos más largos de tiempo permite la ventajosa activación de células T mencionada en los ejemplos para ejercer su efecto durante lo suficiente para depurar ventajosamente todas las células de leucemia linfoblástica aguda del cuerpo. Puesto que la tasa de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico administrado ininterrumpidamente se mantiene baja, la aplicación del agente terapéutico se puede seguir más tiempo sin riesgo de efectos secundarios perjudiciales para el paciente.

El anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 como se usa en el presente documento ventajosamente se va a preparar en forma de una composición farmacéutica para la administración a un paciente pediátrico humano diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Dicha LLA puede ser LLA recién diagnosticada, una LLA

resistente a quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico, una LLA con recaída o una LLA con recaída resistente a quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico.

- 5 En una forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica es leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linaje B pediátrica, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda de precursores B pediátrica. La gran mayoría de los casos de LLA pediátrica (>85%) son de fenotipo de células precursoras B. Se han propuesto varias clasificaciones de LLA de linaje B (véase, por ejemplo, Schultz et al., *Blood* 109 (2007): 926-935). Para modular la intensidad de la terapia relativa a un riesgo de recaída del paciente, los pacientes de LLA de precursores B se estratifican actualmente en grupos de riesgo “bajo”, “estándar”, “alto” o “muy alto” usando parámetros de laboratorio y clínicos: edad, sexo del paciente, recuento de glóbulos blancos (GB) en la presentación de la enfermedad, y la presencia o ausencia de anomalías citogenéticas específicas. Las anomalías citogenéticas frecuentemente recurrentes que ayudan a definir estos grupos de riesgo incluyen, por ejemplo: t(12;21)[TEL-AML1]; t(1;19)[E2A-PBX]; t(4;11)[AF4-MLL]; t(9;22)[BCR-ABL]; hiperdiploidía (o trisomía de los cromosomas 4, 10 y 17) e hipodiploidía; véase, por ejemplo, Schultz et al.; Bader et al., loc. cit.
- 10 Usando los datos de varios estudios, un sistema de clasificación se ha desarrollado e implementado como COG AALLO3B1 (Clasificación de Leucemia Linfoblástica Aguda) (Raetz et al., *Personalized Med.* 2 (2005), 349-361; Schultz et al., *Blood* 109 (2007): 926-935). Puesto que el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento se dirige contra el marcador asociado a células B CD19, dicho anticuerpo es particularmente adecuado como un agente terapéutico para leucemia linfoblástica aguda de linaje B pediátrica, preferiblemente para LLA de precursores B pediátrica. La LLA de precursores B pediátrica se puede subdividir además en LLA pro-B pediátrica, LLA pre-B pediátrica y LLA común (LLAc). Como se muestra en los siguientes ejemplos, el tratamiento según los métodos de la invención del paciente 1 de siete años de edad con LLA común que es resistente contra cualquier tratamiento y por tanto propensa a ser letal, produjo no solo la remisión hematológica completa sino remisión molecular completa. Puesto en otras palabras: no se pudo detectar más enfermedad residual mínima en este paciente después del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3. Particularmente preferido, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica es LLA de precursores B, más preferiblemente LLAc. De forma importante, el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 es capaz de destruir no solo las células de LLA que tienen reorganizaciones de TCR o inmunoglobulinas, sino también células de LLA con varias otras anomalías citogenéticas: por ejemplo, se ha encontrado en el paciente 2 descrito en los siguientes ejemplos así como en pacientes de LLA adulta que dicho anticuerpo es capaz de tratar LLA caracterizada por reorganizaciones de inmunoglobulinas o TCR, translocaciones t(4;11) o transcritos fusión bcr/abl (Ph+). Particularmente se ha descrito que LLA Ph+ y LLA con translocaciones t(4;11) son extremadamente difíciles de tratar mediante terapia de LLA convencional pero se podrían tratar con éxito mediante el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3. Los datos mencionados indican que el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 es capaz de tratar varias formas de LLA incluyendo, por ejemplo LLA caracterizada por t(12;21)[TEL-AML1]; t(1;19)[E2A-PBX]; t(4;11)[AF4-MLL]; t(9;22)[BCR-ABL]; hiperdiploidía (o trisomía de los cromosomas 4, 10 y 17) e hipodiploidía así como reorganizaciones de inmunoglobulinas o TCR, véase también la tabla 1.
- 15 20 25 30 35 40
- El diagnóstico de LLA pediátrica se basa en características morfológicas, citoquímicas e inmunológicas de las células, incluyendo morfología de linfoblasto en frotis de médula ósea teñidos con Wright-Giemsa, tinción positiva para desoxinucleasa transferasa terminal (TdT), tinción negativa para mieloperoxidasa, y expresión en la superficie celular de 2 o más antígenos de diferenciación linfocitoide de precursores de células B. El inmunofenotipado se describe, por ejemplo, por Behm F.G. (*Immunophenotyping*. En: *Childhood Leukemias*, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 150-209), y se puede realizar, por ejemplo, por inmunofluorescencia indirecta, inmunohistoquímica y/o citometría de flujo.
- 45
- El término “paciente” como se usa en el presente documento se refiere a un paciente humano. El término “LLA pediátrica” o “paciente de LLA pediátrica” como se denomina en el presente documento indica niños de edades desde un mes hasta 18 años. La edad indicada se debe entender como la edad de los niños en el diagnóstico de la enfermedad LLA. Los niños se pueden subagrupar más específicamente en lactantes (de 1 a 12 meses de edad), niños más pequeños con edades de 1 a 9 años, y niños mayores y adolescentes (de  $\geq 10$  a 18 años de edad). Como se usa en el presente documento, un intervalo de tiempo que se define como “de X a Y” equivale a un intervalo que se define como “entre X e Y”. Ambos intervalos de tiempo incluyen específicamente el límite superior y también el límite inferior. Esto significa que por ejemplo, un intervalo de tiempo “de un mes a 18 años” incluye “un mes” y “18 años”. Preferiblemente, el paciente que se va a tratar según la presente invención tiene como mucho 18 años de edad (incluyendo pacientes con edad de 18 años).
- 50 55
- 60 Como se muestra en los siguientes ejemplos, el paciente 1 tenía una edad de siete años cuando se trató con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, con la LLA diagnosticada a los dos años de edad. El paciente 1 tenía edad de quince años cuando se trató con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, con la LLA diagnosticada en 2001.

Las definiciones anteriores se aplican mutatis mutandis al término "leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica", "LLA infantil", o similares. Por ejemplo, LLA pediátrica o infantil se debe entender como LLA diagnosticada en un paciente pediátrico con edades entre 1 mes (incluyendo 1 mes) y 18 años (incluyendo 18 años).

5 Mientras que el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 como se usa en el presente documento se puede administrar por sí, la administración en un soporte farmacéuticamente aceptable es preferida. Los ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, liposomas, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Se pueden formular composiciones que comprenden tales soportes por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al paciente pediátrico a una dosis adecuada. La pauta de dosis la determinará el médico y factores clínicos. Como se sabe bien en las artes médicas, la dosis para un paciente pediátrico depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, peso corporal, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administran al mismo tiempo. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los soportes acuosos incluyen agua, soluciones o suspensiones acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, o lactato de Ringer. Los vehículos intravenosos incluyen reaprovisionamientos de líquido y nutrientes, reaprovisionamiento de electrolitos (tal como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tal como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares. Además, la composición podría comprender soportes proteináceos, como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición pudiera comprender, además del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico proteináceo agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso deseado de la composición farmacéutica. Tales agentes podrían ser agentes que actúan como citostáticos, agentes que previenen la hiperuricemia, agentes que inhiben las reacciones inmunitarias (por ejemplo, corticoesteroides, FK506), fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como moléculas coestimuladoras de células T o citoquinas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se puede llevar a cabo en combinación con quimioterapia intratecal como profilaxis en el SNC, corticoides y/o alopurinol.

Preferiblemente, el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 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. Más preferiblemente, el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 como se define en el presente documento se formula en citrato, trehalosa y Tween 80. Como diluyente para la composición farmacéutica de la invención, se prefiere solución salina isotónica y Tween 80.

Preferiblemente, en los métodos farmacéuticos de la invención, la composición farmacéutica se va a preparar para la administración de un paciente pediátrico humano diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

El éxito de la terapia con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se puede seguir por métodos estándar establecidos para las respectivas entidades enfermedades: para terapia de LLA de células B, se pueden usar separación celular activada por fluorescencia (FACS), aspiración de médula ósea y varios parámetros químicos clínicos específicos de leucemia y otros métodos estándar establecidos conocidos en la técnica. Los métodos y medios para la determinación del estado de enfermedad residual mínima (ERM) se describen en el presente documento.

La actividad citotóxica del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se puede detectar por métodos conocidos en la técnica como se ilustra, por ejemplo, en los documentos WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354.

En una forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la LLA de precursores B del/de los paciente(s) pediátrico(s) ha recaído y/o es resistente al tratamiento. Con el tratamiento de LLA infantil actual, los índices de supervivencia sin complicaciones son de aproximadamente el 75%. Por tanto, el 25% de los pacientes recaen a pesar del tratamiento tóxico y con riesgo para la salud. Los problemas en el tratamiento de la recaída de LLA son la resistencia de las células leucémicas y la tolerancia reducida de los pacientes pediátricos a una segunda ronda de tratamiento después de haber recibido ya terapia de primera línea intensiva, que produce menores índices de remisión así como una mayor incidencia de recaída posterior y un desenlace inferior global. La poliquimioterapia intensificada es pues esencial para la inducción de una segunda remisión completa (Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486). El término "resistente a quimioterapia y/o trasplante de células madre alogénico" como se usa en el presente documento significa que los pacientes de LLA pediátrica son resistentes a estas terapias y por tanto recayeron después de tratamiento de LLA convencional. También se prevé que los pacientes pediátricos que recaen después del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 reciban uno o más

ciclos de tratamiento con dicho anticuerpo para hacer los niños tratados negativos para ERM. Dichos pacientes pueden, por ejemplo, recibir después una segunda TCMH alogénico.

5 Como se muestra en los siguientes ejemplos, los métodos farmacéuticos de la invención son particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes pediátricos resistentes a terapias de LLA convencionales. Aunque los  
 10 pacientes pediátricos mostrados han sido pretratados fuertemente tanto con quimioterapia como con trasplante de células madre alogénico, los pacientes recayeron varias veces. Por tanto, los pacientes tenían un pronóstico extremadamente malo. Sin embargo, después del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, los pacientes eran negativos para ERM, es decir, mostraron una remisión molecular completa. Puesto  
 15 en otras palabras: el tratamiento eliminó las células de leucemia linfoblástica aguda del cuerpo de los pacientes pediátricos por debajo del límite de detección. Lo más importante, la médula ósea de los pacientes pediátricos ha sido depurada de células leucémicas.

15 En una forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) del/de los paciente(s) pediátrico(s) es resistente a quimioterapia y/o TCMH alogénico con respecto a ERM. Puesto en otras palabras: la ERM mínima de los pacientes de LLA pediátrica es resistente a quimioterapia y/o TCMH alogénico.

20 Se prevé que los métodos farmacéuticos de la invención sean adecuados también para el tratamiento de LLA pediátrica recién diagnosticada en que proporciona una alternativa a pautas de tratamiento de LLA pediátrica convencionales, tal como quimioterapia y/o TCMH alogénico.

25 En una forma de realización preferida adicional, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) recae a los tres años del diagnóstico, preferiblemente a los dos años del diagnóstico, incluso más preferiblemente al año del diagnóstico. Preferiblemente, dicha recaída es una recaída de la médula ósea.

30 El término "quimioterapia" como se usa en el presente documento indica quimioterapia para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica. La quimioterapia es el tratamiento inicial de elección para LLA pediátrica (véase, por ejemplo, Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007): 149-165; Schmiegelow K, Gustafsson G. Acute lymphoblastic leukemia. En: Cancer in Children: Clinical Management. Voute PA, Barret A, Stevens MCG, Caron HN (eds). Londres, RU, Oxford University Press, 2005, p. 138-170; Schmoll, Höffken, Possinger, loc. cit.). La mayoría de los pacientes de LLA pediátrica terminan recibiendo una combinación de diferentes tratamientos. En el  
 35 tratamiento de LLA pediátrica, no hay opciones quirúrgicas, debido a la distribución en todo el cuerpo de las células malignas. En general, la quimioterapia citotóxica para LLA pediátrica combina múltiples fármacos antileucémicos en varias combinaciones. La quimioterapia para LLA pediátrica consiste en tres fases: inducción de remisión, intensificación y terapia de mantenimiento. La quimioterapia también está indicada para proteger el sistema nervioso central de leucemia. El fin de la inducción de remisión es destruir rápidamente la mayoría de las células tumorales y llevar al paciente pediátrico en remisión hematológica completa. Esto se define como la presencia de menos del 5%  
 40 de blastocitos leucémicos en la médula ósea (determinado por microscopía óptica). Por ejemplo, se usa clofarabina, ciclofosfamida, VP16, amsacrina, prednisona, melfalán o citarabina, solas o en combinación, para inducir remisión. La intensificación usa altas dosis de quimioterapia multifármaco intravenosa para reducir más la carga tumoral. Los protocolos de intensificación típicos usan vincristina, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, etopósido, tioguanina o mercaptopurina dadas como bloques en diferentes combinaciones. Puesto que las células de LLA algunas veces penetran en el sistema nervioso central (SNC), la mayoría de los protocolos incluyen administración de quimioterapia  
 45 en el líquido del SNC comúnmente conocida como quimioterapia intratecal. Algunos centros tumorales administran el fármaco a través de un depósito Ommaya (un dispositivo quirúrgicamente colocado bajo el cuero cabelludo y usado para administrar fármacos al líquido del SNC y extraer líquido del SNC para varias pruebas). Otros centros realizan múltiples punciones lumbares según sea necesario para pruebas y administración del tratamiento. Habitualmente se usa metotrexato o citarabina intratecal para este fin. El fin de la terapia de mantenimiento es destruir cualquier célula residual que no se destruyó por las pautas de inducción de la remisión e intensificación.  
 50 Aunque tales células son pocas, causan recaída si no se erradican. Para este fin, mercaptopurina oral diaria, metotrexato oral una vez a la semana, curso de 5 días al mes de vincristina intravenosa. La duración de la terapia de mantenimiento es de 3 años para chicos, 2 años para chicas y adultos. La recaída en el sistema nervioso se trata con administración intratecal de hidrocortisona, metotrexato y citarabina. Como las pautas de quimioterapia pueden ser intensivas y prolongadas (con frecuencia aproximadamente 2 años en el caso de los protocolos GMALL UKALL, hiperCVAD o CALGB; aproximadamente 3 años para varones en protocolos del COG), muchos pacientes tienen un catéter intravenoso insertado en una vena grande (llamado un catéter venoso central o un línea de Hickman) o un Portacath (un puerto en forma de cono con una cabeza de silicona que se planta quirúrgicamente bajo la piel, habitualmente cerca de la clavícula). Sin embargo, la quimioterapia permanece un procedimiento muy tóxico, en particular para pacientes pediátricos.  
 60

65 Los pacientes pueden experimentar recaída de LLA después de la terapia inicial y/o volverse resistentes a la quimioterapia después del tratamiento. Los pacientes de LLA pediátrica que son resistentes a la quimioterapia tienen un pronóstico marcadamente malo. En particular, el pronóstico de pacientes pediátricos con LLA Ph+ o LLA con translocaciones t(4;11) tratados solo con quimioterapia es malo. Puesto que el método de la invención es capaz de hacer los pacientes de LLA pediátrica negativos para ERM, es particularmente útil para el tratamiento de pacientes

de LLA resistentes a quimioterapia y/o TCMH alogénico. A la luz de esto, el término “resistente a quimioterapia y/o TCMH alogénico” como se usa en el presente documento indica resistencia de las células de leucemia linfoblástica aguda a quimioterapia y/o TCMH alogénico.

5 El término “trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico” como se usa en el presente documento significa trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico o trasplante de médula ósea que es un procedimiento médico en el campo de la hematología y oncología que implica trasplante de células madre hematopoyéticas (CMH). Se realiza con más frecuencia para pacientes con enfermedades de la sangre o médula ósea, o ciertos tipos de cáncer, tal como LLA. La mayoría de los receptores de TCMH son pacientes de leucemia  
10 (por ejemplo, LLA) que se beneficiarían del tratamiento con altas dosis de quimioterapia o irradiación total del cuerpo. El TCMH alogénico en niños con LLA se describe, por ejemplo, en Schrauder A, et al. (Bone Marrow Transplantation 41 (2008): Supl2 S71-74). Sin embargo, el trasplante de células madre alogénico permanece un procedimiento con riesgo, en particular para pacientes pediátricos.

15 El término “elegible para trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico” como se usa en el presente documento significa que el trasplante de células madre alogénico es la terapia requerida para el paciente de LLA pediátrica. En casos donde el paciente de LLA pediátrica es elegible para trasplante de células madre alogénico, se pueden prever los siguientes dos escenarios. Primero, en una forma de realización de los métodos farmacéuticos de la invención, la administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (solo o preferiblemente como una composición farmacéutica) se puede usar para sustituir el trasplante de células madre alogénico usado como la terapia convencional para pacientes de LLA pediátrica elegibles para trasplante. Así el método de la invención puede evitar los riesgos de salud para los pacientes de LLA pediátrica asociados con TCMH alogénico. Además, aproximadamente el 30% de los pacientes de LLA pediátrica trasplantados habitualmente recae después del trasplante. Así el método de la invención se puede usar para tratar a esos pacientes. En una forma de  
20 realización alternativa, la infusión continua del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 al paciente de LLA pediátrica puede ir seguido por un trasplante de células madre alogénico. En esta forma de realización, la administración de una composición farmacéutica que comprende la construcción del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se puede usar para convertir pacientes de LLA pediátrica elegibles para trasplante a un estado negativo para ERM antes de que reciban el trasplante. De esta manera, el método de la invención se puede  
25 usar para eliminar la ERM, que produce un menor riesgo de recaída que el tratamiento de trasplante de pacientes positivos para ERM. Los siguientes ejemplos presentan un paciente pediátrico (paciente 1) que se ha convertido primero a un estado negativo para ERM tras el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, seguido por un trasplante alogénico. Hasta ahora (noviembre de 2009), este paciente pediátrico es todavía negativo para ERM.

35 El término “no elegible para trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico” como se usa en el presente documento significa esos pacientes pediátricos para los que el trasplante de células madre alogénico no es el tratamiento de elección de LLA, por ejemplo, debido a razones médicas. También podría pasar que no esté disponible un donante adecuado para el trasplante de células madre alogénico.

40 Según esto, en una forma de realización, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es resistente a quimioterapia y/o TCMH alogénico en pacientes pediátricos no elegibles o ya no elegibles para TCMH alogénico. Por ejemplo, un paciente pediátrico puede estar en tal mal estado clínico que no se puede llevar a cabo un trasplante de células madre alogénico por razones médicas.

45 El paciente 1 mostrado en los siguientes ejemplos no ha sido elegible para trasplante de células madre alogénico antes del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3, debido a su mal estado de salud. En tal caso, el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 proporciona un nuevo planteamiento terapéutico para LLA pediátrica.

50 Hasta ahora, LLA significaba la sentencia de muerte para pacientes pediátricos resistentes a quimioterapia y no elegibles para TCMH alogénico. El método de la invención proporciona por primera vez una terapia para esta población de pacientes pediátricos en que elimina la enfermedad residual mínima (ERM) que de otra manera causaría una recaída y que por último mataría a dichos pacientes.

55 Está en el ámbito de los métodos farmacéuticos de la invención, que la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se administre a pacientes de LLA pediátrica que han recibido quimioterapia, sola o en combinación con trasplante de células madre alogénico, y han recaído después de ello.

60 En otra forma de realización preferida, el método de la invención es para el tratamiento, alivio o eliminación de enfermedad residual mínima (ERM) en un paciente pediátrico con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

65 El término “enfermedad residual mínima (ERM)” como se define en el presente documento indica un término usado después del tratamiento, por ejemplo, con agentes quimioterapéuticos cuando las células leucémicas no se pueden encontrar en la médula ósea usando pruebas estándar, tal como métodos microscópicos. Más bien, se tienen que usar pruebas más sensibles tal como citometría de flujo (métodos basados en FACS) o reacción en cadena de la

5 polimerasa (PCR) para encontrar evidencia de que las células leucémicas permanecen en la médula ósea del paciente de LLA pediátrico. Más específicamente, la presencia de células leucémicas por debajo del límite de detección citológica (5% de células leucémicas) se define como enfermedad residual mínima (ERM). Si la ERM no es detectable ( $<10^{-4}$ , es decir menos de 1 célula leucémica por  $10^4$  células de médula ósea detectable), se alcanza una remisión molecular completa (negatividad para ERM o estado negativo de ERM). Un “estado positivo de ERM” como se define en el presente documento significa una señal medida por PCR o FACS por encima del límite de detección o un umbral cuantitativo. Un “estado negativo de ERM” como se define en el presente documento significa por debajo del límite de detección y/o por debajo de un umbral cualitativo medido por PCR o FACS. El valor pronóstico de la cuantificación de la enfermedad residual mínima en LLA infantil se ha descrito, por ejemplo, en Bader et al. (J. Clin. Oncol. 27 (2009): 377-384) o Eckert et al. (Lancet 358 (2001): 1239-41). El estado de ERM se puede medir por análisis de PCR o FACS en que las anomalías citogenéticas individuales mencionadas en el presente documento, y/o reorganizaciones de genes de inmunoglobulinas o reorganizaciones del receptor de células T (TCR) se detectan cuantitativamente. Por ejemplo, el análisis de PCR puede detectar transcritos fusión tal como bcr/abl o translocaciones t(4;11) así como reorganizaciones clonales individuales de genes de inmunoglobulinas (IgH) y/o receptor de células T (TCR).

20 Como se demuestra en los siguientes ejemplos, tras el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento, todas las células de leucemia linfoblástica aguda se pudieron eliminar del cuerpo de los pacientes pediátricos de LLA de modo que se pudo alcanzar una remisión molecular completa (es decir, estado negativo de ERM).

25 Las anomalías cromosómicas recurrentes en las células malignas de pacientes pediátricos y adultos con leucemia linfoblástica aguda son una marca de la enfermedad (Harrison y Foroni, Rev. Clin. Exp. Hematol. 6 (2002), 91-113). Las aberraciones específicas que son frecuentemente indicativas de lesión molecular subyacente consistente pueden ayudar o incluso establecer el diagnóstico y determinar la terapia óptima. En LLA infantil, se han identificado numerosos subgrupos citogenéticos buenos y de alto riesgo que se usan regularmente para estratificar pacientes a terapias particulares (Pui y Evans, N. Engl. J. Med. 354 (2006), 166-178). En LLA adulta, el papel de la citogenética en el tratamiento de pacientes se ha centrado grandemente en la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph) que habitualmente surge de t(9;22)(q34;q11.2) y produce la fusión BCR-ABL (Faderl et al., Blood 91 (1998), 3995-4019). Aunque la incidencia global de LLA Ph+ en adultos es aproximadamente el 25%, se correlaciona con la edad y aumenta a más del 50% entre pacientes mayores de la edad de 55 años (Appelbaum, Sociedad Americana de Oncología Clínica 2005 libro de educación. Alexandria: ASCO, 2005: 528-532). Otras translocaciones citogenéticas asociadas con anomalías genéticas moleculares específicas en leucemia linfoblástica aguda (LLA) se muestran en la tabla 1 y también se describen en Schultz et al. o Bader et al., loc. cit.

35 Tabla 1:

Translocación citogenética	Anormalidad genética molecular
t(9;22)(q34;q11)	Fusión BCR-ABL (P185)
t(12;21)CRYPTIC	Fusión TEL-AML1
t(1;19)(q23;p13)	Fusión E2A-PBX
t(4;11)(q21;q23)	Fusión MLL-AF4
t(8;14)(q24;q32)	Fusión IGH-MYC
t(11;14)(p13;q11)	Fusión TCR-RBTN2

40 La citogenética se ha reconocido crecientemente como un factor de predicción importante del desenlace en LLA (Moormann et al., Blood 109 (2007), 3189-97).

Algunos subtipos citogenéticos tienen un peor pronóstico que otros. Estos incluyen, por ejemplo:

- 45 (i) Una translocación entre los cromosomas 9 y 22, el cromosoma Filadelfia (Ph+), se produce en aproximadamente el 20% de los adultos y el 5% en casos pediátricos de LLA.
- (ii) Una translocación entre los cromosomas 4 y 11 se produce en aproximadamente el 4% de los casos y es más común en lactantes menores de 12 meses.

50 Las reorganizaciones de genes de inmunoglobulinas o reorganizaciones del receptor de células T (TCR) y su papel en LLA se han descrito en la técnica (véase, por ejemplo, Szczepanski et al., Leukemia 12 (1998), 1081-1088).

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicho paciente de LLA pediátrica es positivo para ERM en remisión hematológica completa.

55 El término “remisión” o “remisión hematológica completa” como se usa en el presente documento se debe entender como que no tiene evidencia de enfermedad LLA después del tratamiento estándar, por ejemplo, después de quimioterapia y/o trasplante. Esto significa que la médula ósea contiene menos del 5% de blastocitos determinado por microscopía óptica y no ha signos o síntomas de enfermedad LLA. No obstante, puede suceder que no todas las

células leucémicas se pudieran eliminar del cuerpo. Tal paciente, aunque clasificado como que está en remisión o remisión hematológica completa, es aún positivo para ERM. Estas células tumorales restantes pueden dar lugar a leucemia recurrente. Los métodos farmacéuticos de la invención se pueden usar para destruir estas células tumorales restantes para prevenir la recaída de la leucemia que se origina de las células de leucemia ocultas que permanecen en el cuerpo después de la terapia primaria. De esta manera, los medios y métodos farmacéuticos ayudan a prevenir la recaída de la enfermedad en pacientes de LLA pediátrica.

En contraste, una “remisión completa molecular” significa que no hay evidencia de células de leucemia en biopsias de médula ósea, incluso cuando se usan pruebas muy sensibles tal como análisis de PCR o FACS. Puesto en otras palabras: si no es detectable ERM ( $<10^{-4}$ , es decir menos de 1 célula leucémica por  $10^4$  células de médula ósea), se alcanza una remisión molecular completa.

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la administración de dicha composición farmacéutica convierte la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica positiva para ERM a un estado negativo de ERM.

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la ERM se mide con detección cuantitativa de al menos una de las anomalías citogenéticas o reorganizaciones seleccionada del grupo que consiste en:

t(12;21)[TEL-AML1];

t(1;19)[E2A-PBX];

t(4;11)[AF4-MLL];

t(9;22)[BCR-ABL];

hiperdiploidía o trisomías simultáneas de los cromosomas 4, 10 y 17;

hipodiploidía (es decir, menos de 44 cromosomas);

reorganizaciones de genes de inmunoglobulinas; y

reorganizaciones del receptor de células T (TCR).

La ERM se mide con detección cuantitativa de al menos uno de: (i) las anomalías citogenéticas mencionadas en el presente documento, tal como t(12;21)[TEL-AML1]; t(1;19)[E2A-PBX]; t(4;11)[AF4-MLL]; t(9;22)[BCR-ABL]; hiperdiploidía (o trisomías simultáneas de los cromosomas 4, 10 y 17), hipodiploidía (es decir, menos de 44 cromosomas), o (ii) las reorganizaciones de genes de inmunoglobulinas o reorganizaciones del receptor de células T (TCR); véase también la tabla 1. Dicha detección cuantitativa de las anomalías citogenéticas o reorganizaciones mencionadas preferiblemente se lleva a cabo usando, por ejemplo, análisis por PCR o FACS.

El método de la invención proporciona un planteamiento terapéutico para el tratamiento, alivio o eliminación de la ERM, reduciendo o incluso eliminando de esta manera el riesgo de recaída para el paciente de LLA pediátrica. Notablemente, el tratamiento curativo de ERM en pacientes de LLA pediátrica no ha estado aún disponible hasta ahora.

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicho paciente pediátrico que tiene ERM muestra una señal para una anomalía citogenética por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad de  $\geq 10^{-4}$ . Preferiblemente, la ERM se detecta por análisis de PCR y/o FACS.

Las anomalías citogenéticas individuales mencionadas en el presente documento incluyen, por ejemplo, t(12;21)[TEL-AML1]; t(1;19)[E2A-PBX]; t(4;11)[AF4-MLL]; t(9;22)[BCR-ABL]; hiperdiploidía (o trisomías simultáneas de los cromosomas 4, 10 y 17); hipodiploidía. Las reorganizaciones incluyen, por ejemplo, reorganizaciones de genes de inmunoglobulinas o reorganizaciones del receptor de células T (TCR); véase también la tabla 1. La ERM representada por las células de LLA que tienen dichas anomalías citogenéticas y/o reorganizaciones se pueden detectar por análisis de PCR o FACS.

Por ejemplo, el término “por encima de la señal de bcr/abl por encima del límite de detección” como se usa en el presente documento significa que el análisis de PCR o FACS produce una señal de bcr/abl detectable. Similarmente, una señal de translocación t(4;11) significa que dicha translocación se puede detectar por PCR o FACS. Esta se aplica, mutatis mutandis a otras anomalías citogenéticas o reorganizaciones mencionadas en el presente documento. El término “con una sensibilidad de  $\geq 10^{-4}$ ” en contexto con las reorganizaciones significa que al menos se puede detectar una célula de leucemia o más de una célula de leucemia (con la reorganización de TCR o inmunoglobulina mencionada) por  $10^4$  células de médula ósea por los métodos mencionados.

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, el tiempo hasta la recaída molecular (detectable por los ensayos descritos anteriormente) es más de 6 meses, preferiblemente más de 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o incluso más preferido durante 2, 3, 4, 5 o más años.

El término “recaída molecular” como se usa en el presente documento significa que dicho paciente pediátrico muestra una señal para una anomalía citogenética por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad de  $\geq 10^{-4}$ , por PCR y/o FACS, como se ha mostrado anteriormente.

5 En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, las correspondientes regiones variables de la cadena pesada ( $V_H$ ) y las correspondientes regiones variables de la cadena ligera ( $V_L$ ) en dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 están organizados, desde el extremo N al extremo C, en el orden,  $V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})$ .

10 Las correspondientes regiones variables de la cadena pesada ( $V_H$ ) y las correspondientes regiones variables de la cadena ligera ( $V_L$ ) de los dominios de unión a CD3 y CD19 del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se muestran en SEQ ID NO. 3 a 10, respectivamente. Las correspondientes regiones CDR de las respectivas regiones  $V_H$  y  $V_L$  del mencionado anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se muestran en SEQ ID NO. 11 a 22.

15 En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 1, o una secuencia de aminoácidos al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95% idéntica a SEQ ID NO. 1.

20 La invención describe una molécula de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO. 1, así como una secuencia de aminoácidos al menos el 90%, o preferiblemente el 95% idéntica, lo más preferido al menos el 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1. La invención también describe la correspondiente secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO. 2 así como una secuencia de ácido nucleico al menos el 90%, preferiblemente el 95% idéntica, lo más preferido al menos el 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO. 2. Se debe entender que la identidad de secuencia se determina sobre la secuencia de nucleótidos o aminoácidos entera. Además, se debe entender que una molécula de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90%, o preferiblemente el 95% idéntica, lo más preferido al menos el 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 contiene todas las secuencias CDR mostradas en SEQ ID NO. 11 a 22. Para alineamientos de secuencia, por ejemplo, se pueden usar los programas Gap o BestFit (Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith y Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), que están contenidos en el paquete de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE UU 53711 (1991)). Es un método rutinario para los expertos en la materia determinar e identificar una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que tiene, por ejemplo, el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento. Por ejemplo, según la hipótesis Wobble de Crick, la base 5' en el anticodón no está tan espacialmente confinada como las otras dos bases, y por tanto podría tener apareamiento de bases no estándar. Puesto en otras palabras: la tercera posición en un triplete codón puede variar de modo que dos tripletes que se diferencian en esta tercera posición pueden codificar el mismo residuo de aminoácido. Dicha hipótesis la conocen bien los expertos en la materia (véase, por ejemplo, [http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble\\_Hypothesis](http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis); Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548-55). Además es un procedimiento de rutina para los expertos en la materia determinar la actividad citotóxica de tal secuencia de aminoácidos que tiene, por ejemplo, el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia respecto al anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento.

45 La actividad citotóxica del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 o una construcción de anticuerpo que tiene, por ejemplo, el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se puede determinar por métodos como se ilustra, por ejemplo, en los documentos WO 99/54440, WO 2004/106381 o WO 2007/068354.

50 En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar por infusión continua durante al menos cuatro semanas seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. Un ciclo de tratamiento se debe entender como la infusión continua de dicho anticuerpo durante al menos cuatro semanas, seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. Este intervalo puede a su vez estar seguido por uno o más ciclos de tratamiento o por un TCMH alogénico. Preferiblemente, dicha administración por infusión continua del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (es decir, un ciclo de tratamiento) se va a repetir al menos dos, tres veces, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o incluso hasta diez veces, después de la determinación de un estado negativo de ERM, para consolidación.

60 En una forma de realización de los métodos farmacéuticos de la invención, el método es anterior al trasplante de células madre alogénico para convertir la LLA positiva para ERM a un estado negativo de ERM.

65 En otra forma de realización de los métodos farmacéuticos de la invención, el método es después de TCMH alogénico, por ejemplo, en casos donde la LLA pediátrica recayó después de terapia de LLA convencional usando quimioterapia y/o trasplante de células madre alogénico.

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de 10 µg a 100 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.

5 Como se usa en el presente documento, un intervalo de dosis se define como “de X a Y” equivale con un intervalo de dosis que se define como “entre X e Y”. El intervalo incluye el límite superior y también el límite inferior. Esto significa que por ejemplo una dosis diaria de 10 µg a 100 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente incluye “10 µg” y “100 µg”.

10 En una forma de realización incluso más preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de 15 µg, 30 µg, 60 µg o 90 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente. Incluso más preferido, dicho anticuerpo se va a administrar en una dosis diaria de 15 a 30 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente, lo más preferido, en una dosis diaria de 15 o 30 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.

15 El área de superficie corporal media de un paciente pediátrico se calcula en el presente documento en el contexto del método o uso según la invención que está en un intervalo de aproximadamente 0,2 a 2,2 m<sup>2</sup>. Para el cálculo véase, por ejemplo, las fórmulas proporcionadas por <http://www.cato.eu/koerperoberflaeche-kinder.html>.

20 En otra forma de realización de los métodos farmacéuticos de la invención, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica es recién diagnosticada, LLA pediátrica resistente o con recaída, o LLA resistente y con recaída. La LLA pediátrica recién diagnosticada como se usa en el presente documento significa que la enfermedad LLA se ha diagnosticado en el paciente pediátrico por primera vez.

25 En otra forma de realización de los métodos farmacéuticos de la invención, dicho método es para un paciente con alto riesgo de recaída según la clasificación COGAALL03B1 de leucemia linfoblástica aguda.

Ventajosamente, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 como se describe en el presente documento comprende además, opcionalmente (un) tampón(es) de reacción, soluciones de almacenamiento y/o reactivos o materiales restantes para el método o uso enumerado. Además, dichos componentes se pueden embalar individualmente en viales o botellas o en combinación en envases o unidades multienvase.

30 Para evaluar la seguridad y tolerabilidad del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 como se describe en el presente documento, el compuesto se va a administrar por infusión continua a largo plazo.

35 Se ha encontrado que los efectos beneficiosos e inesperados de los métodos farmacéuticos de la invención se pueden obtener administrando el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 en una dosis diaria de 10 microgramos a 100 microgramos 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 esta forma de realización que para el/los día(s) inicial(es) del periodo de infusión se administre una dosis inferior del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (“dosis inicial”) antes de los métodos farmacéuticos descritos en el presente documento, mientras que para el periodo de infusión restante se aplica una dosis mayor (“dosis de mantenimiento”). Esta medida puede ayudar a adaptar el cuerpo del paciente al tratamiento con el anticuerpo y/o evitar efectos secundarios indeseados. Por ejemplo, se pueden administrar 5 microgramos del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal como una dosis inicial el/los primer(os) día(s) (por ejemplo, el primer día, o primer y segundo días, o primer, segundo y tercer día, etc., hasta el séptimo día) del periodo de infusión seguido por la administración de 15 microgramos por metro cuadrado de área de superficie corporal durante el periodo restante. O se pueden administrar 5 microgramos el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal como una dosis inicial el/los primer(os) día(s) del periodo de infusión seguido por la administración de 30 o 45 microgramos por metro cuadrado de área de superficie corporal como dosis diaria durante el periodo restante. También se prevé que se puedan administrar 5 microgramos del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 por metro cuadrado de área de superficie corporal en el/los primer(os) día(s) del periodo de infusión seguido por la administración de 15 microgramos del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 por metro cuadrado de área de superficie corporal durante el/los día(s) siguiente(s) del periodo de infusión, seguido por la administración de 30 o 45 microgramos por metro cuadrado de área de superficie corporal como dosis diaria (de mantenimiento) durante el periodo de administración restante de un total de al menos 4 semanas. Las dos dosis iniciales se pueden administrar no solo durante un día, sino también durante 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o incluso más. El área de superficie corporal media de un paciente se calcula en el presente documento en el contexto del método o uso según la invención que está en un intervalo de aproximadamente 0,2 a 2,2 m<sup>2</sup>.

60 La administración ininterrumpida del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 puede ser intravenosa, parenteral, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular o pulmonar. El modo de administración intravenosa en la mayoría de los casos será el modo de elección para administrar ininterrumpidamente el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 y, como pudiera ser el caso, para la coadministración de un agente

farmacéutico como parte de una pauta de coterapia. Como tal, la administración intravenosa es especialmente preferida. En este caso, se puede elegir ventajosamente un dispositivo de medida adecuado tal como la bomba de infusión multiterapia modelo 6060 fabricada por Baxter. Cualquiera que sea el dispositivo de medida elegido, debe ser de tal diseño y construcción que minimice o, mejor, excluya una interrupción de la administración del agente terapéutico en el caso de intercambio de cartucho y/o sustitución o recarga de la batería. Esto se puede lograr, por ejemplo, eligiendo un dispositivo con un depósito secundario de solución de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 aparte del cartucho que se va a intercambiar de modo que la infusión continua desde este segundo depósito en el paciente pediátrico continúe incluso mientras el cartucho vacío o casi vacío se elimina y sustituye con uno nuevo.

Un modo de administración intravenosa y, según pueda ser el caso, de coadministración como parte de una pauta de coterapia implica el implante de una bomba en el cuerpo del paciente pediátrico para medir tal administración. El experto en la materia conoce tales bombas de medida, por ejemplo el modelo 6060 fabricado por Baxter como se ha mostrado anteriormente.

Como ejemplo no limitante, puede ser que la administración ininterrumpida, es decir, continua se vaya a realizar por un sistema de bomba pequeño llevado por o implantado en el paciente pediátrico para medir la entrada del agente terapéutico en el cuerpo del paciente. Tales sistemas de bomba generalmente se conocen 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 tal sistema de bomba, se puede producir una interrupción temporal del flujo de otra manera ininterrumpido de agente terapéutico en el cuerpo del paciente pediátrico. En tal caso, la fase de administración antes de la sustitución del cartucho y la fase de administración después de la sustitución del cartucho todavía se considerarían dentro del significado de los métodos farmacéuticos de la invención para hacer juntos una "administración ininterrumpida" de tal agente terapéutico. Lo mismo se aplicaría para administraciones muy largas en las que el cartucho requeriría sustitución más de una vez, o en las que las baterías que mueven la bomba requerirían sustitución, produciendo una parada temporal del flujo de la solución terapéutica en el cuerpo del paciente.

También se deben tomar medidas apropiadas para minimizar el peligro de infección en el sitio de punción de administración en el cuerpo del paciente, ya que tales heridas a largo plazo son especialmente propensas a tal infección. Lo anterior también se aplica para la administración intramuscular a través de un sistema de administración similar.

La administración continua puede ser transdérmica por medio de un parche llevado en la piel y sustituido a intervalos. El experto en la materia conoce sistemas de parche para administración de fármacos adecuados para este fin. Es importante que la administración transdérmica es especialmente flexible para la administración ininterrumpida, ya que el intercambio de un primer parche gastado ventajosamente se puede lograr simultáneamente con la colocación de un nuevo, segundo parche, por ejemplo en la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche gastado e inmediatamente antes de la eliminación del primer parche gastado. No surgen problemas de interrupción de flujo o fallo de baterías.

Además, la invención se refiere a una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 para uso en un método de tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, en donde dicho anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a preparar para la administración a un paciente pediátrico.

La invención se refiere además al uso de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica. Por tanto, la presente invención también se refiere a una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 como se define en el presente documento para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica. Las formas de realización divulgadas en el presente documento en el contexto de los métodos farmacéuticos se aplican aquí, mutatis mutandis, para la preparación de la correspondiente composición farmacéutica que comprende construcciones de cadena sencilla anti construcciones CD19xCD3 para la administración a un paciente pediátrico, en particular en el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica.

Preferiblemente, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica es leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linaje B pediátrica, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda LLA de precursores B pediátrica, más preferiblemente LLA pro-B pediátrica, LLA pre-B pediátrica o LLA común (LLAc). Incluso más preferido, la LLA es LLAc.

En una forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, dicha LLA de precursores B pediátrica ha recaído y/o es resistente a tratamiento de LLA convencional, tal como quimioterapia y/o TCMH.

Preferiblemente, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) recae aproximadamente a los tres años del diagnóstico.

En otra forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 es para el tratamiento, alivio o eliminación de enfermedad residual mínima (ERM) en un paciente pediátrico con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Preferiblemente dicho paciente pediátrico es positivo para ERM en remisión hematológica completa.

5 En una forma de realización preferida adicional de los usos médicos mencionados, la administración de dicho anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 convierte la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica positiva para ERM a un estado negativo de ERM.

10 Preferiblemente, la ERM se mide con detección cuantitativa de anomalías citogenéticas individuales o reorganizaciones, como se define en el presente documento, usando análisis de PCR y/o FACS.

Incluso más preferido, el paciente de LLA pediátrica muestra una señal para una anomalía citogenética por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad de  $\geq 10^{-4}$ .

15 En otra forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, el tiempo hasta la recaída molecular detectable por los métodos de detección indicados es más de 6 meses.

20 En otra forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, las correspondientes regiones variables de la cadena pesada ( $V_H$ ) y las correspondientes regiones variables de la cadena ligera ( $V_L$ ) en dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 están organizados, desde el extremo N al extremo C, en el orden,  $V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ .

25 Preferiblemente, dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 1, o una secuencia de aminoácidos al menos el 90%, preferiblemente el 95% idéntica a SEQ ID NO. 1.

30 En una forma de realización preferida adicional de los usos médicos mencionados, un ciclo de tratamiento es una infusión continua durante al menos cuatro semanas, seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas.

35 Preferiblemente, dicha administración se va a repetir al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces, después de la determinación del estado negativo de ERM.

En otra forma de realización, la administración es anterior al trasplante de células madre alogénico para convertir LLA positiva para ERM a un estado negativo de ERM.

En una forma de realización alternativa, la administración es después del trasplante de células madre alogénico.

40 En otra forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de 10  $\mu\text{g}$  a 100  $\mu\text{g}$  por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.

45 Preferiblemente, la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de 15  $\mu\text{g}$  a 30  $\mu\text{g}$  por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.

En otra forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, la administración de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 sustituye al trasplante de células madre alogénico en pacientes pediátricos elegibles para trasplante de células madre alogénico.

50 Las formas de realización, definiciones y explicaciones proporcionadas con respecto a los métodos farmacéuticos de la invención se aplican mutatis mutandis a los usos médicos de la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento.

Las figuras muestran:

55 **Figura 1:** Modo de acción del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (accsb CD19xCD3). El anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (SEQ ID NO. 1) redirige las células T citotóxicas positivas para CD3 para eliminar células de leucemia linfoblástica aguda humanas que tienen el antígeno CD19.

60 **Figura 2:** Fallo de terapia de LLA convencional en un paciente de 7 años de edad con LLA común. Un año después de TCMH, el paciente pediátrico experimentó una segunda recaída de médula ósea y recibió quimioterapia posterior incluyendo 1 ciclo de clofarabina/ciclofosfamida/VP16, 2 ciclos de amsacrina, VP16, prednisona y 1 ciclo de melfalán/citarabina. A pesar de esta quimioterapia agresiva, el paciente tuvo enfermedad morfológica persistente a lo largo del tratamiento, como se demuestra por los altos niveles de ERM. El eje y izquierdo indica % de ERM-FACS, el eje y derecho indica ERM-PCR (de  $10^0$  a  $<10^4$ ), el eje x indica días desde el primer TCMH; véase el ejemplo 4.

65

**Figura 3:** Tratamiento con éxito del paciente pediátrico por la administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (accsb CD19xCD3; SEQ ID NO. 1), como se demuestra por la ERM antes, durante y después del tratamiento con dicho anticuerpo. Después del fallo de la terapia de LLA convencional, el paciente se trató con una infusión continua de 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (SEQ ID NO. 1) durante 5 semanas. Tras el tratamiento con el anticuerpo, se pudo alcanzar negatividad de ERM. En 10/2008, es decir, 2 semanas después del final del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (día 0 en las figuras 3 a 5), se sometió a un segundo TCMH de su madre haploidéntica usando una pauta preparativa no mieloablative consistente en clofarabina, tiotepa y melfalán (Lang) indicado por la barra de acondicionamiento. El eje y izquierdo indica % de ERM-FACS, el eje y derecho indica ERM-PCR (de  $10^0$  a  $<10^4$ ), el eje x indica días desde el primer TCMH, día "0" indica el día del segundo TCMH (después del tratamiento con anticuerpo); véase el ejemplo 4.

**Figura 4:** Desarrollo temporal de recuentos de blastocitos antes y después del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (accsb CD19xCD3; SEQ ID NO. 1). Un análisis de médula ósea el día 10 del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 reveló una eliminación completa de los blastocitos de médula ósea (ERM  $<10^4$ ) por el anticuerpo. Otro análisis de MO al final del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 el día 35 confirmó la ausencia completa de blastocitos leucémicos de la médula ósea (ERM  $<10^4$ ). El eje y izquierdo indica recuento de blastocitos por citometría de flujo en %, el eje y derecho indica recuento de blastocitos por microscopía en %, el eje x indica días desde el TCMH, con los días negativos que indican días desde el primer TCMH, día "0" indica el día del segundo TCMH (después del tratamiento con anticuerpo) y los días positivos indican los días después del segundo TCMH.

**Figura 5:** Disminución de los niveles de ERM tras el tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (accsb CD19xCD3; SEQ ID NO. 1). Tras el tratamiento con el anticuerpo, se pudo alcanzar la negatividad de ERM. Desde el 6/2009, el paciente permanece en remisión molecular completa negativa para ERM. El eje y izquierdo indica % de ERM-FACS, el eje y derecho indica ERM-PCR (de  $10^0$  a  $<10^4$ ), el eje x indica días desde el TCMH, con los días negativos que indican días desde el primer TCMH y "0" que indica el día del segundo TCMH y los días positivos que indican los días después del segundo TCMH.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

### Ejemplos:

#### 1. Anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3

La generación, expresión y actividad citotóxica del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se ha descrito en el documento WO 99/54440. Las correspondientes secuencias de aminoácidos y ácido nucleico del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se muestran en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Las regiones VH y VL del dominio de unión a CD3 del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se muestran en SEQ ID NO. 7 a 10, respectivamente, mientras que las regiones VH y VL del dominio de unión a CD19 del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se muestran en SEQ ID NO. 3 a 6, respectivamente.

#### 2. Análisis fenotípico de linfocitos y análisis de quimerismo

Para el análisis fenotípico de linfocitos y análisis de quimerismo, se recogieron muestras de sangre del paciente antes, durante y después del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 usando tubos de recogida que contenían EDTA. El número absoluto de linfocitos en las muestras de sangre se determinó mediante análisis de sangre diferencial en Advia. Los linfocitos se tiñeron usando anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos contra CD3, CD4, CD8, CD19 y CD56 (todos obtenidos de Becton-Dickinson, Heidelberg, Alemania). El análisis de células marcadas y la recogida de datos se realizaron con un FACSCalibur (Becton-Dickinson).

#### 3. Detección de ERM

Para la detección de ERM, se usó bien un ensayo basado en la reacción cadena de la polimerasa (PCR) (Bader et al., loc. cit.) o análisis de FACS. Brevemente, se aisló el ADN mediante el kit DNeasy Blood&Tissue (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania). Se ha mostrado recientemente que la reorganización de genes de inmunoglobulina y receptor de células T como dianas basadas en PCR son marcadores estables para seguir ERM en leucemia linfoblástica aguda después de trasplante de células madre (Kreyenberg, Leukemia, 2009).

#### 4. Casos clínicos

##### 4.1. Caso clínico del paciente 1

Este paciente de 7 años de edad fue diagnosticado con LLA común CD10+ de alto riesgo (CD19, CD34 positivo; CD45 reducido; reorganización de TCR; SNC negativo) en 2004. Después del tratamiento, experimentó una recaída de médula ósea en junio de 2006 y se trató según el estudio ALL-REZ BFM en el brazo S3. Después de dos ciclos

de quimioterapia, el paciente tenía enfermedad persistente y alcanzó una remisión completa después de 3 ciclos de clofarabina. En 2007, recibió un TCMH alogénico de un donante no relacionado con 9 de diez alelos HLA coincidentes después de acondicionamiento con irradiación total del cuerpo y etopósido. Un año después del TCMH, experimentó otra recaída de médula ósea y recibió posterior quimioterapia incluyendo 1 ciclo de clofarabina/ciclofosfamida/VP16 (Nobuko), 2 ciclos de amsacrina, VP16, prednisona (Hamburgo) y 1 ciclo de melfalán/citarabina; véase la figura 2. A pesar de esta quimioterapia agresiva, el paciente tuvo enfermedad morfológica persistente a lo largo del tratamiento, como se demuestra por los altos niveles de ERM en la figura 2. Se trató después en uso compasivo con una infusión continua de 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (blinatumomab; SEQ ID NO. 1) durante 5 semanas; véase la figura 3. El análisis en serie de las poblaciones de linfocitos antes (día 0) y durante el tratamiento con el anticuerpo mencionado mostró una expansión impresionante de linfocitos T CD8+, mientras que no se advirtió cambio en células T CD4+ y células NK CD56+. Tras el tratamiento con el anticuerpo, se pudo alcanzar la negatividad de ERM. El análisis de quimerismo concomitante mostró quimerismo de donante al 100%. Como se muestra en la figura 4, el análisis de la médula ósea el 10º días de tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 reveló una eliminación completa de los blastocitos de médula ósea (ERM  $<10^{-4}$ ). Otro análisis de la MO al final del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 mostró de nuevo la ausencia completa de blastocitos leucémicos de la médula ósea (ERM  $<10^{-4}$ ). El análisis en serie de la ERM antes, durante y después del tratamiento con dicho anticuerpo se representa en la figura 5. Antes del tratamiento con el anticuerpo, el paciente pediátrico tenía un pronóstico muy malo y no era elegible para TCMH debido a su mal estado clínico. Tras el tratamiento con el anticuerpo, se pudo alcanzar la negatividad de ERM. Además de signos discretos transitorios de ataxia, no se observaron efectos secundarios principales y no se vieron signos de EICH a pesar de la impresionante expansión de linfocitos T CD8+ derivados del donante. En 10/2008, 2 semanas después del final del tratamiento con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 (es decir, día 0 en las figuras 3 a 5), se sometió a un segundo TCMH de su madre haploidéntica usando una pauta preparativa no mieloablativa consistente en clofarabina, tiotepa y melfalán (Lang). Desde 11/2009, el paciente ha permanecido en remisión completa negativa para ERM.

#### 4.2 Caso clínico del paciente 2

Este paciente de quince años fue diagnosticado con LLA de precursores B positiva para cromosoma Filadelfia y CD19 en abril de 2001. Después de la quimioterapia, recibió un TCMH de un hermano idéntico para HLA en octubre de 2001 después de acondicionamiento con TBI de 12 Gy y etopósido. En 2002, se diagnosticó una recaída de médula ósea y se alcanzó otra remisión con matinib y quimioterapia. Después recibió un segundo TCMH de un donante no relacionado idéntico para HLA en octubre de 2004. En marzo de 2008, se diagnosticó una segunda recaída y se trató con quimioterapia a baja dosis y dasatinib debido a la resistencia a imatinib. Después de quimioterapia adicional con clofarabina y citosina/arabinósido, alcanzó una remisión molecular y recibió un tercer TCMH alogénico de su padre haploidéntico con 3 de 6 alelos HLA no coincidentes con tratamiento postrasplante con dasatinib. Debido a hemorragia gastrointestinal y cardiomiopatía dilatatoria, se interrumpió dasatinib 5 meses después del trasplante. En abril de 2009, se diagnosticó una recaída combinada en el sistema nervioso central (SNC) con  $7 \times 10^9/\text{l}$  blastocitos en el SNC y 3% de blastocitos en la médula ósea. El paciente se trató después con nilotinib, quimioterapia intratecal e irradiación fraccionada del SNC con 18 Gy. Tres meses después de este tratamiento, la médula ósea del paciente permaneció positiva para ERM a un nivel de  $1,1 \times 10^{-3}$  mientras que el SNC estaba libre de blastocitos. El análisis de quimerismo de sangre periférica reveló una hematopoyesis derivada del donante completa de su padre haploidéntico.

El paciente se trató después en uso compasivo con el agente único blinatumomab a 15  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  durante 4 semanas por infusión continua sin efectos secundarios. Una aspiración de médula ósea al final del tratamiento mostró remisión completa con ERM indetectable en la médula ósea por debajo de  $<1 \times 10^{-4}$ . Como el paciente 1, el paciente 2 no mostró signos de EICH durante o después del tratamiento con blinatumomab. Dos semanas después del final del tratamiento con blinatumomab, el paciente experimentó una reacción hemolítica transitoria desencadenada por una infección. El paciente 2 actualmente está sin recaída cuatro semanas después del tratamiento. Está bien y acude al colegio.

#### 4.3 Resumen

Los fármacos disponibles hasta ahora para el tratamiento de LLA son de baja especificidad y afectan una variedad de otras células produciendo efectos secundarios graves tal como inmunosupresión, aplasia de médula ósea, mucositis, neuropatía, cardiotoxicidad y alopecia. Planteamientos mejor dirigidos con menos efectos secundarios, por tanto, se necesitan urgentemente. Además, en algunos pacientes, los clones de LLA desarrollan resistencia completa a quimioterapia convencional, en particular, esos clones que surgen tras el TCMH, de modo que los fármacos con un modo de acción distinto son deseables. Se pudo demostrar la eficacia de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo a través de los receptores de Fc de células NK y granulocitos en combinación con quimioterapia en LLA pediátrica usando el anticuerpo quimérico monoclonal rituximab. Actualmente, blinatumomab es el único anticuerpo en ensayos clínicos que permite la implicación de células T citotóxicas para dirigirse a CD19 en linfomas no hodgkinianos de células B y leucemias linfáticas. Se considera que células T tienen un potencial citotóxico mayor que esas células inmunitarias involucradas por anticuerpos monoclonales convencionales.

El efecto ICH alogénico se supone que una de las principales razones para la eficacia antileucémica del TCMH. Desafortunadamente, la aparición del ICL con frecuencia se asocia con EICH, que todavía es una causa principal de morbilidad y mortalidad después de TCMH alogénico. Por tanto, la inducción de ICL en ausencia de EICH es un tema de investigación intensiva. Un planteamiento para la inducción de un efecto ICL es la infusión de linfocitos de donante (ILD). Mientras que la ILD es muy eficaz en el tratamiento de LMC, es menos eficaz en el tratamiento postrasplante de LLA con recaída y con frecuencia produce la aparición de EICH crónica con alteración significativa de la calidad de vida para los niños afectados.

Un planteamiento posible para inducir ICL sin EICH es la activación in vivo de linfocitos T derivados del donante después del TCMH usando dosis bajas del anticuerpo que involucra células T blinatumomab, que puede dirigir linfocitos T contra los blastocitos de LLA CD19 positivos de los pacientes. Este anticuerpo ha mostrado una actividad antilinfoma y antileucémica impresionante en la situación autóloga, pero nunca se ha probado en LLA con recaída después de TCMH o en niños. En la situación autóloga, las remisiones moleculares se han inducido en 13 de 16 pacientes adultos evaluables con LLA positiva para ERM. Ambos pacientes pediátricos descritos anteriormente mostraron una respuesta antileucémica impresionante después del inicio del tratamiento. En ambos casos, la ERM cayó por debajo del nivel de detección sin signos de EICH, a pesar de una expansión extensiva de células T derivadas de donante. Esto podría ser debido al hecho de que la acción de blinatumomab es independiente de presentación de antígenos peptídicos regulares y puede no implicar la implicación del repertorio de células T no sensibilizadas.

Blinatumomab se toleró bien en ambos pacientes produciendo solo fatiga, ataxia leve y temblor de CTCAE de grado 1-2. En el paciente 2, no se vieron efectos secundarios en absoluto a pesar de sus pretratamientos intensivos. La infusión i.v. continua durante varias semanas fue bien aceptada por ambos pacientes pediátricos.

De esta primera experiencia clínica en LLA pediátrica, los inventores concluyen que blinatumomab se tolera bien y puede inducir rápidamente remisiones hematológicas y negativas para ERM completas en niños con enfermedad resistente a terapia después de múltiples recaídas de LLA de precursores B CD19 positiva tras TCMH alogénico. Es notable que ninguno de los pacientes mostrara ningún signo de EICH a pesar de una expansión de linfocitos T derivados de donante, incluso después de trasplante haploidéntico no coincidente.

Estos primeros resultados indican que el tratamiento de pacientes de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica con el anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 es capaz de eliminar por completo células de leucemia linfoblástica aguda del cuerpo de los pacientes pediátrico. De forma importante, este tratamiento produjo no solo remisión hematológica completa sino remisión molecular completa en que la leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para enfermedad residual mínima (ERM) se ha convertido a un estado negativo de ERM. El tratamiento se toleró bien. A la luz de esto, la administración del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento proporciona una opción de tratamiento mejorado para leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, en particular para LLA resistente a quimioterapia y/o TCMH alogénico y/o LLA con recaída.

Estos resultados se pueden resumir brevemente como sigue:

- Dos pacientes pediátricos han sido tratados en base a un uso compasivo.
- Negatividad de ERM continua en dichos pacientes.
- Sin sucesos adversos (SA) principales observados.
- Todos los SA transitorios, interrupción del tratamiento no necesaria.

#### Lista de secuencias

<110> Micromet AG

<120> Tratamiento novedoso de leucemia linfoblástica aguda pediátrica

<130> R2201 PCT S3

<150> 61/112.323

<151> 07-11-2008

<150> 61/221.269

<151> 29-06-2011

<150> 61/183.291

<151> 02-06-2009

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

ES 2 535 257 T3

<210> 1  
<211> 498  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD13"

<400> 1  
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 Gly  
100 105 110

ES 2 535 257 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val  
 115 120 125

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val  
 130 135 140

Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met  
 145 150 155 160

Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln  
 165 170 175

Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly  
 180 185 190

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln  
 195 200 205

Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
 210 215 220

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp  
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

ES 2 535 257 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys

- <210> 2
- <211> 1494
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- 10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo de cadena sencilla biespecifico CD19xCD13"

<400> 2  
 gatatccagc tgaccagtc tccagttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttattt gaactggtac 120  
 caacagattc caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg atgcatcaa tctagtttct 180  
 gggatccac ccaggtttag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

ES 2 535 257 T3

cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300  
 acgttcgggtg gagggaccaa gctcgagatc aaaggtgggtg gtggttctgg cggcggcggc 360  
 tccggtgggtg gtggttctca ggtgcagctg cagcagtctg gggctgagct ggtgaggcct 420  
 gggctcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag ctactggatg 480  
 aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat ttggcctgga 540  
 gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggtaaag cactctgac tgcagacgaa 600  
 tctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc tgcggctctat 660  
 ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggta ggccgttatt actatgctat ggactactgg 720  
 ggccaaggga ccacggtcac cgtctctccc ggaggtgggtg gatccgatat caaactgcag 780  
 cagtcagggg ctgaactggc aagacctggg gcctcagtga agatgtcctg caagacttct 840  
 ggctacacct ttactaggta cacgatgcac tgggtaaaac agaggcctgg acagggctctg 900  
 gaatggattg gatacattaa tctagccgt ggttatacta attacaatca gaagttcaag 960  
 gacaaggcca cattgactac agacaaatcc tccagcacag cctacatgca actgagcagc 1020  
 ctgacatctg aggactctgc agtctattac tgtgcaagat attatgatga tcattactgc 1080  
 cttgactact ggggccaagg caccactctc acagtctctc cagtcgaagg tgggaagtgga 1140  
 ggttctgggtg gaagtggagg ttcaggtgga gtcgacgaca ttcagctgac ccagtctcca 1200  
 gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag gtcacatga cctgcagagc cagttcaagt 1260  
 gtaagttaca tgaactgta ccagcagaag tcaggcaact cccccaaaag atggatttat 1320  
 gacacatcca aagtggcttc tggagtcctt tatcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc 1380  
 tcatactctc tcacaatcag cagcatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgcaa 1440  
 cagtgagta gtaaccgct cacgttcggt gctgggacca agctggagct gaaa 1494

<210> 3

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: VH anti CD19"

<400> 3

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

ES 2 535 257 T3

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

5 <210> 4  
 <211> 372  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: VH anti CD19"

<400> 4  
 caggtgcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60  
 tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120  
 cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttggcctg gagatggtga tactaactac 180  
 aatggaaagt tcaagggtaa agccactctg actgcagacg aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcaactca gcagcctagc atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagacgggag 300  
 actacgacgg taggccgta ttactatgct atggactact ggggcccaagg gaccacggtc 360  
 accgtctcct cc 372

15 <210> 5  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: VL anti CD19"

<400> 5

ES 2 535 257 T3

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> 6
- <211> 333
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- 10 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: VL anti CD19"

<400> 6  
 gatatccagc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttattt gaactggtac 120  
 caacagattc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg atgcatcaa tctagtttct 180  
 gggatccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
 cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300  
 acgttcggtg gagggaccaa gctcgagatc aaa 333

- 15 <210> 7
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <221> fuente
- <223> VH anti CD3
- <400> 7

ES 2 535 257 T3

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

- 5 <210> 8
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
  
- 10 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: VH anti CD3"
  
- <400> 8
- gatatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
- tcttgaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
- cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaataccta gccgtgggta tactaattac 180
- aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
- atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
- gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357
  
- 15 <210> 9
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
  
- 20 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: VL anti CD3"
  
- <400> 9

ES 2 535 257 T3

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

5 <210> 10  
<211> 318  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<220>  
<221> fuente

<400> 10  
gacattcagc tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
atgacctgca gagccagttc aagtgttaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120  
acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaagtgg cttctggagt cccttatcgc 180  
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcatac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240  
gatgctgccca cttattactg ccaacagtgg agtagtaacc cgctcacgtt cggtgctggg 300  
accaagctgg agctgaaa 318

15 <210> 11  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD19 L1"

<400> 11  
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn  
25 1 5 10 15

30 <210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD19 L2"  
 5  
 <400> 12  
 Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser  
 1 5  
 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD19 L3"  
 <400> 13  
 Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr  
 1 5  
 20  
 <210> 14  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD19 H1"  
 <400> 14  
 Ser Tyr Trp Met Asn  
 1 5  
 <210> 15  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD19 H2"  
 <400> 15  
 Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 45  
 <210> 16  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD19 H3"  
 <400> 16  
 Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10 15  
 55  
 <210> 17  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD3 H1"

<400> 17  
 Arg Tyr Thr Met His  
 1 5

10 <210> 18  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD3 H2"

20 <400> 18  
 Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Asp

<210> 19  
 <211> 10  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 30 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD3 H3"

<400> 19  
 Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr  
 1 5 10

35 <210> 20  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD3 L1"

<400> 20  
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn  
 1 5 10

45 <210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD3 L2"

55 <400> 21  
 Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser  
 1 5

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD3 L3"

10

<400> 22  
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
1 5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 para uso en un método para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica en un paciente de LLA pediátrica.
- 10 2. La construcción para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica es leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica de linaje B, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores B pediátrica, más preferiblemente LLA pro-B, LLA pre-B o LLA común (LLAc) pediátrica.
- 15 3. La construcción para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es LLA resistente y/o con recaída.
- 20 4. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método es para el tratamiento, alivio o eliminación de enfermedad residual mínima (ERM) en un paciente de LLA pediátrica.
- 25 5. La construcción para el uso de la reivindicación 4, en donde dicho paciente de LLA pediátrica es positivo para ERM en remisión hematológica completa.
- 30 6. La construcción para el uso de la reivindicación 4 o 5, en donde la ERM se mide con detección cualitativa de al menos una de las anomalías citogenéticas o reorganizaciones seleccionadas del grupo que consiste en:  
 t(12;21)[TEL-AML1];  
 t(1;19)[E2A-PBX];  
 t(4;11)[AF4-MLL];  
 t(9;22)[BCR-ABL];  
 hiperdiploidía o trisomías simultáneas de los cromosomas 4, 10 y 17;  
 hipodiploidía;  
 reorganizaciones de genes de inmunoglobulinas; y  
 reorganizaciones del receptor de células T (TCR).
- 35 7. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las correspondientes regiones variables de la cadena pesada (VH) y las correspondientes regiones variables de la cadena ligera (VL) en dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 están organizadas, del extremo N al extremo C, en el orden, VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3).
- 40 8. La construcción para el uso de la reivindicación 7, en donde dicha construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 1. o una secuencia de aminoácidos al menos el 90%, preferiblemente el 95% idéntica a SEQ ID NO. 1.
- 45 9. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición farmacéutica que comprende la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar por infusión continua durante al menos cuatro semanas seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas.
- 50 10. La construcción para el uso de la reivindicación 9, en donde dicha administración se va a repetir al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces, después de la determinación de un estado negativo de ERM.
- 55 11. La construcción para el uso de la reivindicación 9 o 10, en donde el método es anterior al trasplante de células madre (TCMH) alogénico para convertir LLA positiva para ERM a un estado negativo de ERM.
- 60 12. La construcción para el uso de la reivindicación 9 o 10, en donde el método es después del trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico.
- 65 13. La construcción para el uso de la reivindicación 12, en donde una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 induce un efecto de injerto contra leucemia (ICL).
14. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de 10 µg a 100 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.
15. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de 15 µg a 30 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.

- 5
- 10
- 15
16. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de 15 µg, 30 µg, 60 µg, o 90 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.
  17. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis de 5 µg el/los primer(os) día(s), seguido por la administración de 15 µg el/los día(s) siguiente(s), seguido por una administración de 30 o 45 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente como dosis diaria durante el periodo de administración restante de un total de 4 semanas.
  18. La construcción para el uso de la reivindicación 17, en donde las dosis iniciales se administran durante 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días o incluso más.
  19. La construcción para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho paciente es no elegible para trasplante de células madre alogénico.

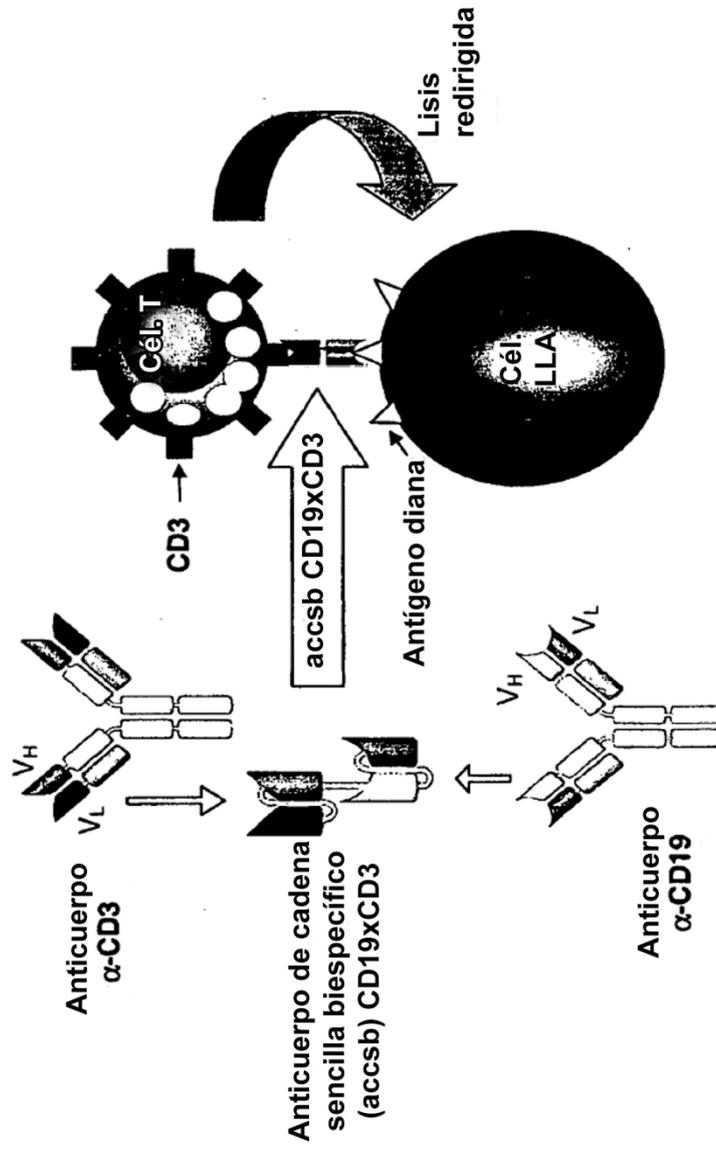
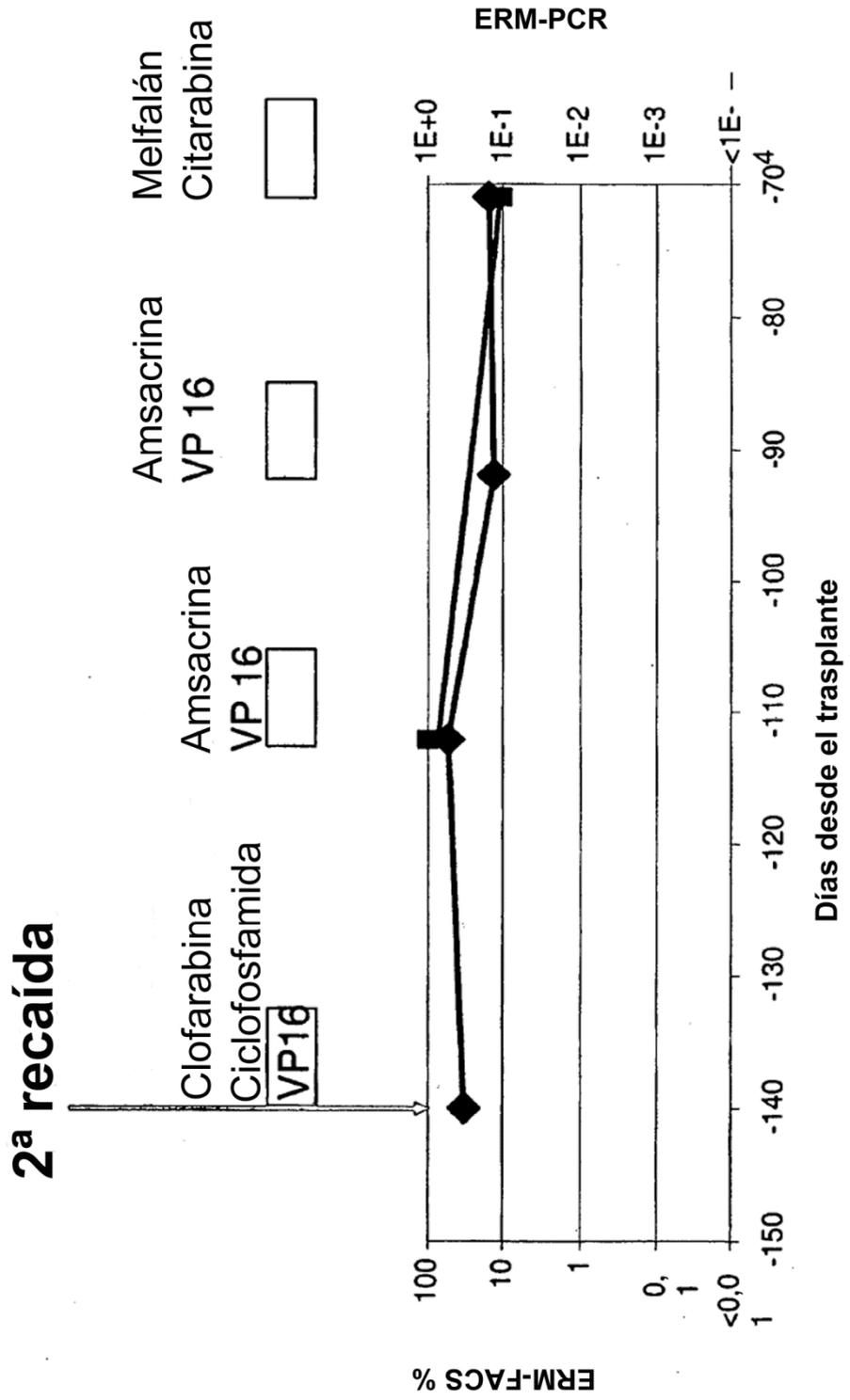


Figura 1

Figura 2



# 2° TMO

Figura 3

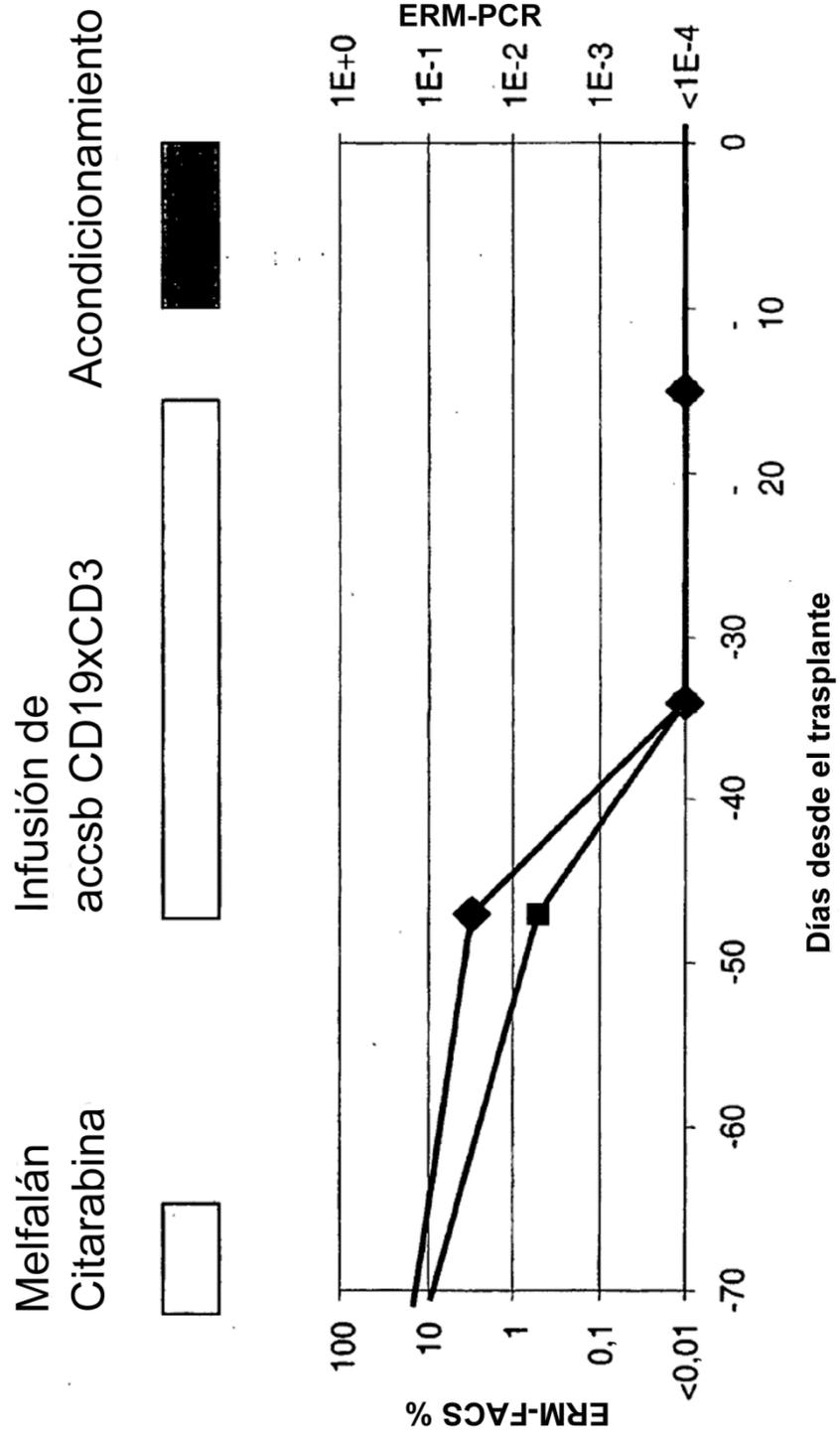


Figura 4

