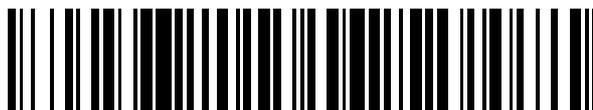


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 434**

51 Int. Cl.:

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 09760483 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2342227**

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

30 Prioridad:

07.11.2008 US 112323 P

02.06.2009 US 183291 P

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

04.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZUGMAIER, GERHARD y
DEGENHARD, EVELYN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 558 434 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

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

10 Las leucemias son proliferaciones neoplásicas clonales de células hematopoyéticas inmaduras que se caracterizan por diferenciación anormal o detenida. Las células de leucemia se acumulan en la médula ósea, sustituyendo a la larga la mayoría de las células hematopoyéticas normales. Esto produce insuficiencia de la médula ósea y sus consecuencias de anemia, hemorragia e infección. Las células de leucemia circulan en la sangre y otros tejidos a lo largo de todo el cuerpo (DeVita, Hellmann, Rosenberg. Cancer: principles and practice of oncology. Octava edición. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, ISBN 0-781-72387-6). Las leucemias agudas, que se pueden

15 agrupar ampliamente como linfoblásticas o mieloblásticas se pueden identificar fenotípica y genéticamente y se caracterizan por una evolución clínica rápida que requiere tratamiento inmediato. Las leucemias agudas derivan de células progenitoras hematopoyéticas tempranas. En contraste las leucemias crónicas tienen el fenotipo y carácter biológico de células más maduras (DeVita et al., loc. cit.). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se distingue de los linfomas porque los últimos se parecen a células linfoides más maduras y típicamente habitan los ganglios linfáticos, bazo u otros sitios extramedulares antes de extenderse a la médula ósea. Ciertos linfomas tal como linfomas linfoblásticos o linfomas de Burkitt retienen características tanto de leucemias como de linfomas pero derivan de células progenitoras inmaduras y requieren terapia similar a la usada para leucemia linfoblástica aguda (LLA). Otros linfomas, sin embargo, se pueden extender ampliamente en la sangre y médula ósea, y en tales se puede describir una fase como linfomas leucémicos pero no son verdaderas leucemias (De Vita et al., loc. cit.). La leucemia

20 linfoblástica aguda es una neoplasia maligna relativamente rara. La incidencia total de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es 1,1/100.000 al año. La incidencia tiene su pico durante la niñez, descendiendo continuamente al aumentar la edad. Desde la edad de 35 años la incidencia sube de nuevo y se observa un segundo pico que empieza a la edad de 80 años (2,3/100.000 al año) (Hoelzer y Gökbuget; Der Onkologe 12 (2006); 983-1002). Aunque la etiología de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) no está clara, es una de las neoplasias más cuidadosamente estudiadas y mejor caracterizada. Los subgrupos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) se definen principalmente por inmunofenotipado, citogenética y genética molecular. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linaje B con el 74% de los casos comprende la mayor parte de las LLA. El setenta por ciento de todas las LLA son LLA de precursores B y el 4% son LLA de células B maduras. Las LLA de linaje T cubren el 26% de todas las LLA (Hoelzer y Gökbuget; Der Onkologe 12 (2006); 983-1002).

35 A principios de la década de 1980, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) era una enfermedad raramente curable con una supervivencia global de menos del 10%. Después del uso de pautas adaptadas administradas por grupos pediátricos el desenlace mejoró al 30-40%. Siguió un periodo de estancamiento con mejora solo en distintos subgrupos. Sin embargo, en los últimos cinco años, se ha hecho progreso en el diagnóstico molecular de la leucemia linfoblástica aguda (LLA). El trasplante de células madre (TCM) ha mejorado el desenlace de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y ha hecho el tratamiento más factible. Aunque varios fármacos nuevos están en evaluación, las terapias dirigidas eficaces para leucemia linfoblástica aguda (LLA) no están aún disponibles. El diagnóstico y clasificación rápidos de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es cada vez más importante para

40 identificar subconjuntos pronósticos y genéticos moleculares que serán el foco del tratamiento dirigido (Hoelzer y Gökbuget; Hematology (2006); 133-141). El cromosoma Filadelfia (Ph), el resultado de una translocación recíproca que fusiona el protooncogén *abl* del cromosoma 9 con las secuencias de la región del punto de fractura en el cromosoma 22, fue la primera translocación específica de neoplasia que se identificó. La translocación (9;22) es la anomalía genética más frecuente en leucemia linfoblástica aguda (LLA) adulta. Se encuentra en el 20-30% de los pacientes. La incidencia aumenta con la edad, aproximándose al 50% en pacientes mayores de 50 años. En estudios clínicos pasados, los pacientes más viejos estaban infrarrepresentados debido a la futilidad percibida del tratamiento, pero este patrón está cambiando con la disponibilidad de novedosas opciones de tratamiento prometedoras. Notablemente, se encuentra casi exclusivamente en leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras CD10+ (c-LLA y LLA pre-B); las descripciones raras de su presencia en LLA de linaje T pueden representar leucemia mielóide crónica (LMC) en crisis hemoblástica linfóide más que LLA Ph+ auténtica.

45 Clínicamente, los pacientes presentan un recuento de glóbulos blancos variable, expresión de superficie de antígenos CD19, CD10 y CD34, y coexpresión frecuente de marcadores mieloides, por ejemplo, CD13 y CD33, tienen un riesgo aumentado de desarrollar leucemia meníngea. El pronóstico de pacientes adultos con LLA Ph+ tratados solo con quimioterapia es malo, con una probabilidad menor del 10% de supervivencia largo plazo.

60 Debido al malísimo desenlace con quimioterapia solo, el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alógeno está actualmente considerado el tratamiento de elección en LLA Ph+ adulta. Se han descrito índices de supervivencia a largo plazo del 12% al 65% en pacientes sometidos a TCM en primera remisión completa (RC), lo que indica que este procedimiento es potencialmente curativo. Sin embargo, aproximadamente el 30% de estos pacientes experimentan recaídas (Ottmann y Wassmann; Hematology (2005), 118-122). La presencia de células de leucemia por debajo del límite de detección citológica (5% de células leucémicas) se define como enfermedad residual mínima (ERM), Si no es detectable ERM ($<10^{-4}$, es decir, < 1 célula leucémica por 10^4 células de médula

ósea) se alcanza una remisión molecular completa. En los últimos años, una serie de estudios retrospectivos ha mostrado que la ERM en leucemia linfoblástica aguda es un factor pronóstico independiente como ya se había demostrado para la leucemia infantil. Las herramientas diagnósticas para ERM son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o citometría de flujo. El análisis por PCR puede detectar transcritos fusión tal como bcr/abl y reorganizaciones clonales individuales de genes de inmunoglobulinas (IgH) y/o receptor de células T (TCR). Aproximadamente el 25% de los pacientes con enfermedad residual mínima (ERM) definida por reorganización comprende un grupo de alto riesgo con un índice de recaída del 94% en 3 años. En general, el descenso en ERM se produce más lentamente en adultos que lo hace en niños. La toma de decisiones sobre la intensificación del tratamiento por trasplante de células madres de sangre periférica (TCMSP) alógenas es, por tanto, demasiado temprano después del tratamiento de inducción. Sin embargo, después del inicio de la consolidación, la enfermedad residual mínima (ERM) en cualquier punto temporal se asocia con un alto riesgo de recaída (Brüggemann et al., Blood 107 (2006), 1116-1123; Raff et al., Blood 109 (2007), 910-915).

El tratamiento de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) se vuelve cada vez más complejo según se introducen diversos protocolos de tratamiento para diferentes subtipos de la enfermedad, lo que refleja la intención de ajustar óptimamente la terapia a entidades de enfermedad adaptadas al riesgo.

Anderson et al. (Blood J. 80 (1992): 2826-34) describe un heteroconjugado biespecífico entre un anticuerpo anti-CD19 y anti-CD3 que se dice desencadena la lisis de células de leucemia linfoblástica aguda. JEHA SIMA, SEMINARS IN HEMATOLOGY 2009, 46:76-88, revisa las terapias de LLA.

Se han alcanzado mejoras recientes introduciendo nuevos principios terapéuticos, tal como la adición temprana del inhibidor de tirosinas quinasas imatinib en LLA positiva para Ph (Ph+) (Lee et al.; Blood 102 (2003), 3068-3070) o el uso del anticuerpo anti-CD20 rituximab en casos CD20⁺ de LLA de linaje B (véase, por ejemplo, Griffin et al., Pediatr Blood Cancer 2008). Se alcanzaron mejoras diagnósticas evaluando el nivel de enfermedad residual mínima (ERM) bien por métodos de genética molecular o por citometría de flujo, que se ha mostrado que es predictiva para el desenlace en un número de estudios en niños (véase, por ejemplo, Cave et al., N. Engl. J. Med. 339 (1998), 591-598) y adultos (véase, por ejemplo, Brüggemann et al., Blood 107 (2006), 1116-1123). Los índices de supervivencia con protocolos de tratamiento modernos para pacientes adultos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) han alcanzado una meseta donde el beneficio potencial de pautas quimioterapéuticas más agresivas con frecuencia se contrarresta por un exceso de mortalidad debido a complicaciones, haciendo de esta manera los esfuerzos para individualizar el tratamiento incluso más importantes. Mientras que los pacientes con riesgo estándar sin factores de riesgo convencionales, que tienen una posibilidad mayor del 50% de supervivencia a largo plazo con quimioterapia solo (Hoelzer et al., Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 1 (2002), 162-192) se ponen potencialmente en un riesgo innecesario por terapia intensificada y prolongada, el desenlace en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) con recaída es extremadamente malo, incluso si se alcanza una segunda remisión. En un estudio reciente, el seguimiento de la enfermedad residual mínima (ERM) durante el primer año de quimioterapia intensiva llevó a una estratificación de riesgo basada en ERM (Brüggemann et al., (2006), loc. cit.). Esta clasificación permitió la identificación de un grupo de bajo riesgo de ERM que consistía en aproximadamente el 10% de los pacientes con una posibilidad mínima de recaída en 3 años, un grupo de alto riesgo de ERM de aproximadamente el 25% de los pacientes con un riesgo de recaída de casi el 100%, y un grupo de riesgo intermedio de ERM. En el último grupo, aproximadamente el 30% de pacientes finalmente recaerá a pesar de convertirse en negativos para ERM o alcanzar niveles de ERM por debajo de 10⁻⁴ al final del primer año de terapia.

Estos datos muestran que la leucemia linfoblástica aguda (LLA) permanece para la mayoría de los pacientes una enfermedad fulminante e incurable. A la luz de esto, hay una necesidad urgente para terapias mejoradas contra LLA.

La presente invención proporciona una construcción de anticuerpo monocatenario CD19xCD3 para uso en un método para el tratamiento, mejoría o eliminación de LLA en un paciente adulto en necesidad de ello. En una forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linaje B, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda de precursores B. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linaje B comprende la mayoría de LLA con el 74% de los casos. El setenta por ciento de todas las LLA son LLA de precursores B y el 4% son LLA de células B maduras. Puesto que el anticuerpo monocatenario 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, preferiblemente para LLA de precursores B que se puede subdividir además en LLA pro-B, LLA pre-B y LLA común (cLLA).

La administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (también denominado blinatumomab o MT103) descrita en más detalle posteriormente proporciona por primera vez un enfoque terapéutico que permite el tratamiento de enfermedad residual mínima en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Como se muestra en los ejemplos siguientes y se ilustra en la figura 1, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (cuya secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos se representa en las SEQ ID NO: 2 y 1, respectivamente) se ha diseñado para unir células T con células diana que expresan CD19 lo que produce una respuesta de células T citotóxicas y activación de células T no restrictivas. Recientemente, un estudio en fase I ha demostrado actividad clínica significativa del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en linfoma no hodgkiniano (LNH) de

células B con recaída (Bargou et al., Science 321 (2008):974-7). Basado en estos resultados, se diseñó un estudio de fase II en colaboración con el Grupo Alemán de Estudio Multicentro en Leucemia Linfoblástica Aguda (GMALL) para investigar la eficacia, seguridad, y tolerabilidad del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en pacientes de leucemia linfoblástica aguda (LLA) que alcanzaron remisión hematológica completa, pero aún tenían enfermedad mínima (ERM). La ERM es un factor pronóstico independiente que refleja resistencia a fármacos primaria y se asocia con un alto riesgo de recaída después de empezar la consolidación. Se midió la ERM con métodos estandarizados bien por detección cuantitativa de reorganizaciones individuales de inmunoglobulinas o reorganizaciones del receptor de células T (TCR), translocaciones t(4;11) o por transcritos fusión bcr/abl (véase, por ejemplo, Van der Velden et al., Leukemia 18 (2004), 1971-80). La población de estudio incluye pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores B agudos que muestran una señal bcr/abl o señal t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$. El criterio de valoración principal del estudio de fase II en marcha es el índice de conversión a estado negativo de enfermedad residual mínima (ERM) definido por un señal bcr/abl o t(4;11) por debajo del límite de detección y/o por detección de reorganizaciones individuales de genes de inmunoglobulina o receptor de células T (TCR) por debajo de 10^{-4} . Un ciclo de tratamiento del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es una infusión intravenosa continua de 4 semanas, que puede ir seguido por trasplante de células madre hematopoyéticas alogenas después del primer ciclo, o por ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. La dosis del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es 15 microgramos/m²/24 h, mediante lo cual se permite un aumento de la dosis de hasta 30 microgramos/m²/24 h. El estado de enfermedad residual mínima (ERM) se controla después de cada ciclo de tratamiento. Los pacientes que alcanzan negatividad de ERM podrían recibir ciclos de tratamiento adicionales.

Hasta la fecha, se han tratado diecisiete pacientes de LLA adultos, o están aún en tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. 14 pacientes recibieron el nivel de dosis de 15 microgramos/m²/24 h del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, mientras que en tres pacientes la dosis se ha aumentado de 15 a 30 microgramos/m²/24 h después del primero o ciclos de tratamiento adicionales. Todos estos pacientes de LLA tenían enfermedad residual mínima (ERM): once de ellos tenían ERM por reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR, dos pacientes tenían translocaciones t(4;11) y cuatro pacientes tenían transcritos fusión bcr/abl.

Como resultado, la respuesta de ERM fue evaluable en 16 de 17 pacientes. 13 de 16 pacientes se volvieron negativos para ERM, que corresponde a un índice de respuesta molecular completa extraordinario del 81%. Más específicamente, en nueve de once pacientes con reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR, en uno de dos pacientes con translocaciones t(4;11) y en tres de cuatro pacientes con transcritos bcr/abl, se pudo alcanzar la negatividad de ERM. La duración más larga de negatividad de ERM observada hasta ahora en un paciente que no ha recibido un trasplante después del tratamiento con anticuerpos es 41 semanas. Otro paciente tratado con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 con negatividad para ERM desde el 23/06/2008 al 27/10/2008 y que ha recibido un trasplante de células madre alogenas después de ello está libre de recaídas hasta la fecha.

Notablemente, los pacientes con bcr/abl que se pudieron tratar con éxito con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 eran resistentes o intolerantes a inhibidores de tirosinas quinasas imatinib y/o desatinib en pauta posológica previa contra LLA. Por ejemplo, uno de los respondedores de bcr/abl al tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tenía una mutación T315I que era resistente a la terapia por inhibidores de tirosina quinasa. Por tanto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona ahora por primera vez una terapia para pacientes de LLA resistentes a imatinib y/o desatinib con transcritos bcr/abl. Solo tres de un total de 17 pacientes no se volvió negativo para ERM. Sin embargo, en dos de ellos se pudo alcanzar enfermedad estable. Solo un paciente tuvo una recaída testicular seguida por una recaída hematológica, después de 19 semanas de negatividad para ERM. Un paciente no fue evaluable debido a un suceso adverso grave (SAG) el día 2 del estudio.

En resumen, se pudo alcanzar un índice de respuesta molecular completa absolutamente excepcional del 81% en pacientes adultos con LLA de precursores B tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. La actividad de anticuerpo mencionado se pudo observar en todos los subconjuntos de pacientes de LLA tratados, incluyendo pacientes de bcr/abl resistentes a inhibidores de tirosina quinasa (T315I) y pacientes con translocaciones t(4;11). Estos subconjuntos de pacientes de LLA generalmente se consideran incurables por terapia estándar contra LLA convencional, excepto para la opción de TCMH alogeno. Además, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 muestra un perfil de toxicidad favorable, en contraste con las terapias contra LLA convencionales, tal como quimioterapia. A la luz de esto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento proporciona una opción de tratamiento nueva y ventajosa para leucemia linfoblástica aguda (LLA) adulta, en particular para casos en los que la LLA es resistente a terapia contra LLA convencional, tal como quimioterapia y/o TCMH alogeno. Además, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona ahora por primera vez una terapia para LLA positiva para ERM.

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

1. Menos efectos adversos que las terapias contra leucemia linfoblástica aguda (LLA) convencionales, incluyendo quimioterapia o TCMH alógeno. Las terapias contra LLA convencionales se asocian con considerables riesgos de salud para los pacientes; véase, por ejemplo, Schmoll, Höffken, Possinger: Kompendium Internistische Onkologie, S. 2660 ff.; 4ª Edición, Springer Medizin Verlag Heidelberg).

2. Aunque actualmente se considera que el TCMH alógeno es el tratamiento de elección en LLA Ph+ adulta, aproximadamente un tercio de los pacientes trasplantados recaen. Los pacientes de LLA Ph+ tienen el mayor riesgo para una recaída entre todos los pacientes dentro de los subtipos de LLA. Como se muestra en los ejemplos siguientes, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es especialmente apropiada para pacientes de LLA adulta con enfermedad residual mínima (ERM). Esto responde de la enfermedad residual mínima (ERM) definida por la translocación del cromosoma Filadelfia así como de la ERM definida por reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR o t(4;11). Los pacientes de LLA adulta, no elegibles para trasplante de médula ósea, que tienen t(4;11) o pacientes de LLA Ph+ resistentes se han considerado hasta ahora incurables. Los métodos farmacéuticos de la invención, por tanto, proporcionan un enfoque terapéutico para el tratamiento, mejoría o eliminación de ERM en LLA adulta, reduciendo de esta manera o incluso eliminando el riesgo de una recaída para el paciente. Merece la pena indicar que el tratamiento curativo para pacientes de LLA positiva para ERM no ha estado disponible hasta ahora.

3. En particular, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede usar para terapia de leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para ERM resistente a terapia contra LLA convencional, tal como quimioterapia, administración de inhibidores de tirosina quinasa, y/o TCMH.

4. No solo el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede sustituir las terapias contra leucemia linfoblástica aguda (LLA) convencionales en pacientes no elegibles para TCMH alógeno, también se puede usar para convertir pacientes de LLA elegibles para dicho trasplante a un estado negativo para ERM, ya que los pacientes negativos para ERM tienen un menor riesgo de recaída después del trasplante que los pacientes positivos para ERM.

5. La alta actividad citotóxica del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 permite la eliminación de células de leucemia en la médula ósea.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA), incluyendo leucemia linfoblástica aguda de precursores B y otros tipos de LLA de linaje (de células) B, y los tratamientos de las mismas se revisan, por ejemplo, en Pui y Evans, N. Engl. J. Med. 354 (2006), 166-178; Hoelzer y Gökbuget; Hematology (2006); 133-141; o Apostolidou et al., Drugs 67 (2007), 2153-2171.

Se puede encontrar información con respecto a LLA por ejemplo, en <http://www.cancer.gov>, <http://www.wikipedia.org> o <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

El término "anticuerpo monocatenario biespecífico" o "anticuerpo biespecífico monocatenario" o términos relacionados según la presente invención significan construcciones de anticuerpos resultantes de unir al menos dos regiones variables de anticuerpos en una única cadena polipeptídica desprovista de la(s) parte(s) constante y/o Fc presentes en las inmunoglobulinas completas. 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 monocatenario 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 monocatenario 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 las 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. Aún otro ejemplo de un anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una única cadena polipeptídica con cuatro regiones variables de anticuerpo. Aquí, las dos primeras regiones variables de anticuerpo, por ejemplo una región VH y una región VL, pueden formar un scFv 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 monocatenarios 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 monocatenario 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 monocatenario biespecífico. La unión del complejo CD3 por unidores específicos de CD3 (por ejemplo un anticuerpo monocatenario 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 monocatenario 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 monocatenario biespecífico comprende una región VH de anticuerpo y una región VL de anticuerpo. Una variante ventajosa de este anticuerpo monocatenario biespecífico es del extremo N al extremo C:

V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3) (SEQ ID NO: 1).

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 un epítipo conformacional/estructural.

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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 (preparado para la administración a un paciente de LLA adulta) como se describe en el presente documento es para el tratamiento, mejoría o eliminación de la enfermedad LLA en pacientes adultos.

El término "paciente" como se usa en el presente documento se refiere a un paciente adulto humano. El término "LLA adulta" o "paciente de LLA adulto" o "paciente adulto" como se denomina en el presente documento indica adultos con edades de más de 18 años, es decir, pacientes con edades de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 50 años o más. Incluso pacientes con 70, 75, 80, 85, 90, 100 años o mayores se pueden tratar por los métodos de la invención. La edad indicada se debe entender como la edad del adulto en el diagnóstico de la enfermedad LLA.

El término "mejoría" como se usa en el presente documento es sinónimo de mejora. Si el estado de un paciente de LLA adulta muestra mejoría, 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, si se puede alcanzar una estabilización de la enfermedad LLA (también denominada enfermedad estable), por ejemplo, la enfermedad LLA ya no progresa. Incluso mejor, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para ERM se convierte a un estado negativo para ERM.

El término "eliminación" como se usa en el presente documento significa la eliminación de células leucémicas del cuerpo de un paciente de LLA adulta. Como se muestra en el siguiente ejemplo, la administración del anticuerpo

monocatenario biespecífico CD19xCD3 es capaz de convertir la leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para ERM a un estado negativo para ERM en varios subtipos de LLA.

5 El término “administración” como se usa en el presente documento significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 anteriormente mencionado a un individuo, es decir, un paciente humano.

10 El paciente de LLA a que se hace referencia en el presente documento es un paciente adulto, como se define en el presente documento.

15 Mediante “cantidad terapéuticamente eficaz” se quiere decir una dosis que produce los efectos para los que se administra, preferiblemente, la conversión de un estado de leucemia linfoblástica aguda (LLA) positivo para enfermedad residual mínima (ERM) a un estado de LLA negativo para ERM. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento, y será comprobable por el experto en la materia usando técnicas conocidas. Como se sabe en la técnica y se describe anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para la administración sistémica frente a local, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción de fármacos y la gravedad de la afección, y serán comprobables con experimentación rutinaria por los expertos en la materia.

20 El médico y factores clínicos determinarán la pauta posológica. Como se sabe bien en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, 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.

25 Como se sabe bien en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente adulto, área de superficie corporal, edad, 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. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en los intervalos mostrados en las formas de realización 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.

30 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 “infusión continua de 4 semanas” indica una situación en la que el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 usado en los medios y métodos farmacéuticos según la invención se administra continuamente al cuerpo de un paciente adulto durante un periodo de 4 semanas de una manera sostenida, constante a lo largo de la duración entera requerida en los métodos farmacéuticos de la invención. Los esquemas de administración continua del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se describen en más detalle en el documento WO 2007/068354. Se evita una interrupción de la introducción del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, es decir, una transición de un estado en que este anticuerpo se administra al cuerpo del paciente a un estado en que este anticuerpo no se administra más al cuerpo del paciente 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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 que se administra o intervenciones médicas que se hacen necesarias y similares. En cuanto a que tal reaprovisionamiento necesario produce una interrupción temporal de la introducción del anticuerpo administrado, tal 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 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 debe entender como la infusión continua de 4 semanas del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente de LLA adulta, 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) tratado(s) después de una administración continua de 4 semanas o un ciclo de tratamiento, se pudiera diagnosticar una respuesta mínima o parcial al anticuerpo monocatenario biespecífico. En este caso, 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, enfermedad estable, o incluso una respuesta completa. Preferiblemente, dicha respuesta completa es negatividad para ERM. En una forma de realización alternativa, la infusión continua de 4 semanas del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente de LLA adulta puede ir seguida por TCMH alógeno. También se prevé que un paciente tratado durante uno, dos, tres, cuatro o incluso más ciclos de tratamiento como se ha explicado anteriormente pueda recibir un trasplante TCMH alógeno después de ello.

65 Como se muestra en el siguiente ejemplo, 13 de 16 pacientes de LLA adulta se volvieron negativos para ERM tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, que corresponde a un índice de respuesta molecular completa extraordinario del 81%. Más específicamente, en nueve de 11 pacientes con reorganizaciones de inmunoglobulinas o TCR, uno de dos pacientes con translocaciones t(4;11) y tres de cuatro pacientes con

transcritos bcr/abl se pudo alcanzar negatividad para ERM. Preferiblemente, el fin terapéutico principal de la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, sea solo o en combinación con TCMH alógeno, a un paciente de LLA adulta es la conversión de un estado positivo para ERM a un estado negativo para ERM, como se define en el presente documento.

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

El anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 como se usa en el presente documento está ventajosamente en forma de una composición farmacéutica para la administración a un paciente humano diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda (LLA). El paciente humano es un adulto como se define en el presente documento posteriormente. Mientras que el anticuerpo monocatenario biespecífico 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 farmacéuticos adecuados 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 sujeto a una dosis adecuada. La pauta posológica la determinará el médico y factores clínicos. Como se sabe bien en las artes médicas, la dosis para cualquier paciente 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 reaprovisionadores de líquido y nutrientes, reaprovisionadores 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 proteínicos, como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición pudiera comprender, además del anticuerpo monocatenario biespecífico proteínico 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.

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

Preferiblemente, en los usos o métodos farmacéuticos de la invención, la composición farmacéutica se va a administrar a un paciente adulto humano diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

El éxito de la terapia con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede seguir por métodos estándar establecidos para las respectivas entidades patológicas: 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. Los métodos y medios para la determinación del estado de enfermedad residual mínima (ERM) se han descrito anteriormente.

La citotoxicidad se puede detectar por métodos conocidos en la técnica y métodos como se ilustra, por ejemplo, en los documentos WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354.

En una forma de realización preferida, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) del/de los paciente(s) adulto(s) es resistente a quimioterapia, preferiblemente resistente a quimioterapia con respecto a ERM (es decir, la ERM en todos estos pacientes de LLA es resistente a quimioterapia). Incluso más preferido, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es resistente a quimioterapia en pacientes no elegibles para TCMH alógeno.

El término "quimioterapia" como se usa en el presente documento indica quimioterapia usada para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (LLA). La quimioterapia es el tratamiento inicial de elección para LLA. La mayoría de los

pacientes de LLA terminan recibiendo una combinación de diferentes tratamientos. En el tratamiento de LLA, no hay opciones quirúrgicas, debido a la distribución en todo el cuerpo de las células malignas. En general, la quimioterapia citotóxica para LLA combina múltiples fármacos antileucémicos en varias combinaciones. La quimioterapia para LLA 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 a remisión. Esto se define como la presencia de menos del 5% de blastocitos leucémicos en la médula ósea (determinado por microscopía óptica), células sanguíneas normales y ausencia de células tumorales de la sangre, y ausencia de otros signos y síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, se usa una combinación de prednisolona o dexametasona (en niños), vincristina, asparraginasa, y daunorubicina (usada en LLA adulta) 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, daunorubicina, 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 en el líquido del SNC (denominada quimioterapia intratecal). Algunos centros 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. Aunque tales células son pocas, causan recaída si no se erradican. Para este fin, habitualmente se usan mercaptopurina oral diaria, metotrexato oral una vez a la semana, tratamiento de 5 días una vez al mes de vincristina intravenosa y corticosteroides orales. 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 central se trata con administración intratecal de hidrocortisona, metotrexato y citarabina (Hoffbrand et al., Essential Hematology, Blackwell, 5ª edición, 2006). 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).

La quimioterapia para LLA se ha descrito, por ejemplo, en Schmoll, Höffken, Possinger (loc. cit.).

A la luz de lo anterior, el término “resistente a quimioterapia” como se usa en el presente documento indica resistencia de las células de leucemia linfoblástica aguda a quimioterapia.

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 que son resistentes a la quimioterapia tienen un pronóstico marcadamente malo. En particular, el pronóstico de pacientes adultos con LLA Ph+ tratados solo con quimioterapia es malo, con menos del 10% de probabilidad de supervivencia a largo plazo. Puesto que los métodos farmacéuticos de la invención son capaces de hacer los pacientes de LLA adulta negativos para ERM, son particularmente útiles para el tratamiento de pacientes de LLA resistentes a quimioterapia.

El término “trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno” como se usa en el presente documento significa trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alógeno o trasplante de médula ósea (TMO) 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 los ganglios linfáticos, sangre o médula ósea, tal como LLA. El TCMH alógeno es un procedimiento en el que una persona recibe células madre formadoras de sangre (células de las que se desarrollan las células sanguíneas) de un donante genéticamente similar, pero no idéntico. Este es con frecuencia un pariente cercano, tal como una madre, padre, hermana o hermano, pero también podría ser un donante no relacionado. La mayoría de los receptores de TCMH son pacientes de leucemia (por ejemplo LLA) que se beneficiarían del tratamiento con altas dosis de quimioterapia o irradiación total del cuerpo. Sin embargo, el TCMH alógeno permanece un procedimiento con riesgo y tóxico.

El término “no elegible para TCMH” como se usa en el presente documento significa esos pacientes adultos para los que el TCMH alógeno no es el tratamiento de elección de LLA, por ejemplo, debido a razones médicas. Por ejemplo, puede ser el caso que no esté disponible un donante apropiado, o que el paciente haya superado el límite superior de edad. Como se muestra en el siguiente ejemplo, todos los pacientes eran resistentes a quimioterapia, o en el caso de LLA Ph+ también resistentes o intolerantes a tirosina quinasa antes de su inclusión en el estudio. Ocho pacientes tratados con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 eran no elegibles para TCMH alógeno, tal como por ejemplo, los pacientes 111-003, 108-002, 109-006 o 109-007.

Hasta ahora, LLA significaba la sentencia de muerte para pacientes resistentes a quimioterapia y no elegibles para TCMH alógeno. Los métodos farmacéuticos de la invención proporcionan por primera vez una terapia para esta población de pacientes en que elimina la enfermedad residual mínima (ERM) que de otra manera causaría una recaída y mataría a dichos pacientes.

En una forma de realización alternativa de los métodos farmacéuticos de la invención, dicho método va seguido por trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno o dicho método sustituye al trasplante de células madre alógeno en pacientes adultos elegibles para TCMH alógeno.

- 5 El término “elegible para TCMH alógeno” como se usa en el presente documento significa que el TCMH alógeno es la terapia requerida para el paciente de LLA adulta. En casos donde el paciente de LLA es elegible para TCMH alógeno, se pueden prever los siguientes dos escenarios. Primero, en una forma de realización de los métodos farmacéuticos de la invención, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (solo o preferiblemente como una composición farmacéutica) se puede usar para sustituir TCMH alógeno usado como la
- 10 terapia convencional para pacientes de LLA adulta elegibles para trasplante. Así los métodos farmacéuticos de la invención pueden evitar los riesgos de salud para los pacientes de LLA asociados con el trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno. Además, el 30% de los pacientes de LLA trasplantados habitualmente recae después del trasplante. Así los métodos y medios farmacéuticos de la invención se pueden usar para tratar a esos pacientes. En una forma de realización alternativa, la infusión continua del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al
- 15 paciente de LLA adulta puede ir seguida por un trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno. En esta forma de realización, la administración de una composición farmacéutica que comprende la construcción del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede usar para convertir pacientes de LLA elegibles para trasplante a un estado negativo para ERM antes de que reciban el trasplante. De esta manera, los métodos farmacéuticos de la invención se pueden usar para eliminar la ERM, lo que produce un menor riesgo de recaída que
- 20 el tratamiento de trasplante de pacientes positivos para ERM. El ejemplo presenta un paciente que primero se ha convertido a un estado negativo para ERM tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, seguido por un trasplante alógeno. Hasta ahora, este paciente es todavía negativo para ERM, con una duración de la negatividad para ERM de 47 semanas hasta la fecha.
- 25 Está también en el ámbito de los métodos farmacéuticos de la invención, que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se administre a pacientes de LLA adulta que han recibido TCMH alógeno, y han recaído después de ello.

30 En otra forma de realización preferida, los métodos farmacéuticos de la invención son para el tratamiento, mejoría o eliminación de enfermedad residual mínima (ERM) en un paciente adulto con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

El término “enfermedad residual mínima (ERM)” como se define en el presente documento indica un estado de enfermedad después del tratamiento, por ejemplo, con agentes quimioterapéuticos cuando las células leucémicas no se pueden encontrar ya en la médula ósea por métodos microscópicos ópticos. Se tienen que usar pruebas más

35 sensibles tal como citometría de flujo (métodos basados en FACS) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para encontrar evidencia de que las células leucémicas permanecen en la médula ósea del paciente de LLA. 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. Un

40 “estado positivo de ERM” como se define en el presente documento significa una señal de bcr/abl o una señal de t(4;11) por encima del límite de detección y/o por reorganizaciones individuales de genes de inmunoglobulina o receptor de células T (TCR) por encima de 10^{-4} . Un “estado negativo de ERM” como se define en el presente documento significa una señal de bcr/abl o una señal de t(4;11) por debajo del límite de detección y/o por reorganizaciones individuales de genes de inmunoglobulina o receptor de células T (TCR) por debajo de 10^{-4} . El

45 estado de ERM se puede medir por análisis de PCR o FACS en que las reorganizaciones individuales del genes de inmunoglobulina o reorganizaciones del receptor de células T (TCR), o transcritos fusión bcr/abl, o t(4;11) se detectan cuantitativamente. Por ejemplo, el análisis de PCR puede detectar transcritos fusión tal como bcr/abl, o translocaciones t(4;11) y reorganizaciones clonales individuales de genes de inmunoglobulina (IgH) o receptor de células T (TCR).

50 Las anomalías cromosómicas recurrentes en las células malignas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda son marcas de la enfermedad (Harrison y Feroni, 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

55 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). Sin embargo, 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 (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

60 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.

Tabla 1:

Translocación citogenética	Anomalia 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

5 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:

- 10 (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.

15 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 adulto es positivo para ERM en remisión hematológica completa.

20 El término "remisión" o "remisión hematológica" como se usa en el presente documento se debe entender como que no tiene evidencia de enfermedad después del tratamiento, por ejemplo, después de quimioterapia o trasplante. Esto significa que la médula ósea contiene menos del 5% de blastocitos determinado por microscopía óptica, los recuentos de células sanguíneas están dentro los límites normales, y no hay signos o síntomas de enfermedad LLA. 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 PCR. Puesto en otras palabras: si ERM no es detectable ($<10^{-4}$, es decir < 1 célula leucémica por 10^4 células de médula ósea), se alcanza una remisión molecular completa.

30 Después de la remisión completa de la(s) lesión(es) de leucemia en un paciente humano de LLA adulta por tratamiento quimioterapéutico o trasplante de células madre hematopoyéticas alogeno puede ser el caso de que no todas las células de leucemia se puedan eliminar del cuerpo. Sin embargo, 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 células de leucemia ocultas que quedan en el cuerpo después de la terapia primaria). De esta manera, los métodos farmacéuticos ayudan a prevenir la recaída de la enfermedad en pacientes de LLA adulta.

35 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) positiva para ERM a un estado negativo de ERM.

40 En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la ERM se mide con detección cuantitativa de reorganizaciones individuales de genes de inmunoglobulina o reorganizaciones del receptor de células T (TCR), o por transcritos fusión bcr/abl, o t(4;11) usando análisis de PCR o FACS.

45 Como se muestra en los siguientes ejemplos, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es específicamente apropiada para pacientes adultos con enfermedad residual mínima (ERM). Esto responde de enfermedad residual mínima (ERM) definida por la translocación del cromosoma Filadelfia o t(4;11) así como para ERM definida por reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR. Los métodos farmacéuticos de la invención, por tanto, proporcionan un enfoque terapéutico para el tratamiento, mejoría o eliminación de ERM, reduciendo por tanto o incluso eliminando el riesgo de recaída para el paciente adulto. Notablemente, el tratamiento curativo de ERM en pacientes de LLA no ha estado disponible hasta ahora.

50 En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicho paciente muestra una señal de bcr/abl o una señal t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad $\geq 10^{-4}$.

55 El término "señal de bcr/abl o señal de translocación t(4;11) 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 o señal t(4;11) detectable.

Como se describe en el presente documento, en los métodos farmacéuticos de la invención, el tiempo hasta la recaída molecular (detectable por los ensayos descritos anteriormente) es más de 4 meses.

El término “recaída molecular” como se usa en el presente documento significa que dicho paciente muestra una señal de bcr/abl o translocación t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$.

El término “con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$ ” como se usa en el presente documento significa que se puede detectar una o más célula(s) de leucemia en 10.000 células, en particular células de médula ósea.

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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 están organizadas, desde el extremo N al extremo C, en el orden, $V_L(\text{CD19})$ - $V_H(\text{CD19})$ - $V_H(\text{CD3})$ - $V_L(\text{CD3})$.

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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 se muestran en SEQ ID NO: 3 a 10, respectivamente. Las correspondientes regiones CDR de las respectivas regiones VH y VL del mencionado anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se muestran en SEQ ID NO: 11 a 22.

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicha construcción de anticuerpo monocatenario 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.

La invención describe una molécula de anticuerpo monocatenario biespecífico 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 monocatenario 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 a las secuencias de nucleótidos o aminoácidos del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento. Por ejemplo, según la hipótesis del bamboleo 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; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548-55).

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, un ciclo de tratamiento es una infusión continua de 4 semanas, seguido por ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas o por un trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno.

En otra forma de realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, el ciclo de tratamiento se repite al menos tres veces, preferiblemente, cuatro, cinco, seis, siete, o incluso hasta diez veces, después de la determinación de un estado negativo de ERM (consolidación).

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

Como se usa en el presente documento, un intervalo de dosis que se define como “de X a Y” equivale a 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 ”.

En una forma de realización incluso más preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la construcción de anticuerpo monocatenario 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.

El área de superficie corporal media de un paciente adulto se calcula en el presente documento en el contexto del método o uso farmacéutico según la invención que está en un intervalo de aproximadamente 1,7 a 2,2 m².

Ventajosamente, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monocatenario 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.

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

Se ha encontrado que los efectos beneficiosos e inesperados de los métodos farmacéuticos de la invención se pueden obtener administrando el anticuerpo monocatenario biespecífico 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 monocatenario biespecífico ("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"). Por ejemplo, se pueden administrar 5 microgramos del anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal el/los primer(os) día(s) 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 15 microgramos el anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal 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. La dosis inicial se puede administrar durante uno, dos o más días o incluso durante una semana (siete días). También se prevé que se puedan administrar 5 microgramos del anticuerpo monocatenario biespecífico 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 monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal durante el/los día(s) siguiente(s) del periodo de infusión, seguido por la administración de 45 microgramos por metro cuadrado de área de superficie corporal como dosis diaria (de mantenimiento) durante el periodo de administración restante. El área de superficie corporal media de un paciente adulto se calcula en el presente documento en el contexto del método o uso según la invención que está en un intervalo de aproximadamente 1,7 a 2,2 m².

En otra forma de realización de los métodos y usos de la invención, la dosis se aumenta después del primer o ciclos de tratamiento adicionales, por ejemplo de 15 a 30 o 60 o incluso 90 microgramos/m²/24 h.

La administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario 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 monocatenario 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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 aparte del cartucho que se va a intercambiar de modo que la infusión continua desde este segundo depósito en el paciente puede continuar 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 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 un 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 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

- 5 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. 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.
- 10 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.
- 15 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 susceptible 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.
- 20 En una forma de realización preferida adicional, la administración continua se logra a través de una vía pulmonar, por ejemplo, a través de un tubo que se lleva en una o ambas narinas de la nariz, el tubo está conectado a un tanque presurizado, cuyo contenido se mide de forma precisa.
- 25 Además, la invención se refiere a una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso en un método de tratamiento, mejoría o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) en un paciente adulto.
- 30 La invención se refiere además al uso de una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento, mejoría o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) adulta. Preferiblemente, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es leucemia linfoblástica aguda de linaje B, más preferiblemente leucemia linfoblástica aguda de precursores B.
- 35 En una forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es resistente a quimioterapia en pacientes no elegibles para TCMH alógeno.
- 40 En una forma de realización alternativa de los usos médicos mencionados, la administración de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 está seguida por TCMH alógeno o dichos usos sustituyen al TCMH alógeno en pacientes elegibles para TCMH alógeno.
- 45 En otra forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es para el tratamiento, mejoría o eliminación de enfermedad residual mínima (ERM) en un paciente adulto con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Preferiblemente dicho paciente es positivo para ERM en remisión hematológica completa.
- 50 En una forma de realización preferida adicional de los usos médicos mencionados, la administración de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 produce enfermedad estable o convierte la leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para ERM a un estado negativo para ERM.
- 55 Preferiblemente, la ERM se mide con detección cuantitativa de reorganizaciones individuales de genes de inmunoglobulina o reorganizaciones del receptor de células T (TCR), o por transcritos fusión bcr/abl, o t(4;11), usando análisis de PCR y/o FACS.
- Incluso más preferido, el paciente de LLA muestra una señal de bcr/abl o t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$.
- 60 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 4 meses.
- 65 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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 están organizadas, desde el extremo N al extremo C, en el orden, $V_L(\text{CD19})$ - $V_H(\text{CD19})$ - $V_H(\text{CD3})$ - $V_L(\text{CD3})$.

Preferiblemente, dicha construcción de anticuerpo monocatenario 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.

5 En una forma de realización preferida adicional de los usos médicos mencionados, un ciclo de tratamiento es una infusión continua de 4 semanas, seguido por ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas.

Preferiblemente, el ciclo de tratamiento se repite al menos tres veces, después de la determinación del estado negativo de ERM (consolidación).

10 En otra forma de realización preferida de los usos médicos mencionados, la construcción de anticuerpo monocatenario 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 Preferiblemente, la construcción de anticuerpo monocatenario 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.

20 Las 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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento.

Las figuras muestran:

25 **Figura 1:** Modo de acción del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. El anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (blinatumomab o MT103) dirige las células T citotóxicas positivas para CD3 para eliminar células de leucemia linfoblástica aguda humanas que tienen el antígeno CD19.

30 **Figura 2:** Ejemplo de ciclo de enfermedad residual mínima (ERM). La medida basada en PCR de reorganización de TCR (ERM) en el paciente de leucemia linfoblástica aguda común (cLLA) 109-002 muestra una positividad para ERM antes del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y negatividad para ERM en curso que empieza después del 1er ciclo de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3.

35 **Figura 3:** Cinética de células T de células T CD4 y CD8 del paciente 109-002 durante el ciclo de tratamiento 1. Ejemplo representativo de farmacodinámica, que muestra redistribución rápida de células T y un aumento principalmente en el número de células T CD8 citotóxicas.

40 **Figura 4:** Cinética de células T de células T CD4 y CD8 del paciente 109-002 durante el ciclo de tratamiento 1. Ejemplo representativo de farmacodinámica, que muestra redistribución rápida de células T y expansión de células T efectoras memoria (TEM). Las células T no inducidas no se expanden.

45 **Figura 5:** Los primeros cuatro pacientes que se inscribieron en el estudio de fase II. Todos los pacientes habían recibido previamente pautas de quimioterapia estándar para LLA según protocolos GMALL incluyendo al menos un tratamiento de consolidación.

50 **Figura 6:** Respuestas de enfermedad residual mínima (ERM) en los pacientes de LLA indicados (es decir, los primeros cuatro pacientes inscritos en el estudio de fase II) después del primer ciclo de tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3.

55 **Figura 7:** Actualización en las respuestas de enfermedad residual mínima (ERM). En nueve de once pacientes con reorganizaciones de inmunoglobulinas o TCR, en uno de dos pacientes con translocaciones t(4;11) y en tres de cuatro pacientes con transcritos bcr/abl, se pudo alcanzar negatividad para ERM. En suma, 13 de 16 pacientes evaluables (81%) se convirtieron en negativos para ERM.

60 **Figura 8:** Duración de la negatividad de enfermedad residual mínima (ERM) (estado el 25/05/2009). La duración más larga de la negatividad para ERM observada hasta ahora en el paciente 108-001 que no había recibido trasplante después del tratamiento con el anticuerpo es de 41 semanas. El paciente 111-001 con negatividad para ERM del 23/06/2008 al 27/10/2008 después del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y haber recibido un trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno exitoso después de ello está sin recaída hasta la fecha. La punta de flecha significa que la respuesta está aún en marcha (estado a 25 de mayo, 2009). El paciente 109-002 (*) tuvo una recaída testicular seguida por recaída hematológica después de 19 semanas de negatividad para ERM.

La invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo:

Ejemplo:

1. La generación, expresión y actividad citotóxica del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se ha descrito en el documento WO 99/54440. Las correspondientes secuencias de aminoácidos y ácido nucleico del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se muestran en SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Las regiones VH y VL del dominio de unión a CD3 del anticuerpo monocatenario 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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 se muestran en SEQ ID NO: 3 a 6, respectivamente. Las correspondientes regiones CDR se muestran en SEQ ID NO: 11 a 22.

2. Un ensayo de fase 1 en marcha en pacientes de LNH-B con recaída muestra alto índice de respuesta a 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. Las respuestas tienen una duración de hasta más de 12 meses (en curso en varios pacientes). La eliminación de células de LNH-B que infiltran la médula ósea empezó a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ (Bargou et al., Science 2008).

3. Basado en estos resultados, se diseñó un estudio con aumento de dosis de fase II en colaboración con el Grupo Alemán de Estudio Multicentro en Leucemia Linfoblástica Aguda Adulta (GMALL) para investigar la eficacia, seguridad y tolerabilidad del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en pacientes de leucemia linfoblástica aguda (LLA) adultos (no trasplantados) que alcanzaron remisión hematológica completa, pero permanecieron positivos para enfermedad residual mínima (ERM). La ERM es un factor pronóstico independiente que refleja resistencia a fármaco primaria y se asocia con un alto riesgo de recaída después del inicio de la consolidación. Esto aplica para LLA positiva y negativa para Ph+/BCR-ABL. Se midió ERM con métodos estandarizados bien por detección cuantitativa de reorganizaciones individuales de inmunoglobulina o reorganizaciones del receptor de células T (TCR), o por transcritos fusión bcr/abl o translocaciones t(4;11). La población de estudio incluye pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores B que muestran una señal bcr/abl o translocación t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad $\geq 10^{-4}$. Más específicamente, los criterios principales de inclusión incluían:

- Pacientes de LLA de precursores B en remisión hematológica completa con fallo molecular o recaída molecular que empieza en cualquier momento después de la consolidación 1 de terapia de primera línea con protocolos estándar.
- Los pacientes deben tener un marcador molecular para la evaluación de enfermedad residual mínima que es bien bcr/abl o una translocación t(4;11) en cualquier nivel de detección o reorganizaciones individuales de genes de inmunoglobulina o TCR medidas por un ensayo con una sensibilidad de mínimo 10^{-4} y un intervalo cuantitativo a 10^{-4} para al menos un marcador.

El criterio de valoración principal del estudio de fase II (en marcha) es el índice de conversión a estado negativo para enfermedad residual mínima (ERM) definido por una señal de bcr/abl o translocación t(4;11) por debajo del límite de detección y/o por detección de reorganizaciones individuales de genes de inmunoglobulina o receptor de células T (TCR) por debajo de 10^{-4} . Los criterios de valoración secundarios son el tiempo hasta la recaída hematológica, tiempo a evolución de ERM, y tiempo a la recaída molecular.

Un ciclo de tratamiento del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es una infusión intravenosa continua de 4 semanas, que puede estar seguido por trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno después del primer ciclo o ciclos adicionales, o por ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. El estado de la enfermedad residual mínima (ERM) se controla después de cada ciclo de tratamiento. El nivel de dosis inicial es 15 microgramos/ $\text{m}^2/24$ h, que se puede aumentar a 30 microgramos/ $\text{m}^2/24$ h y niveles de dosis mayores (60 microgramos/ $\text{m}^2/24$ h o 90 microgramos/ $\text{m}^2/24$ h) basados en datos de actividad clínica y seguridad. Para el diseño estadístico, se usa el diseño de dos fases MinMax de Simon (de 14 a 21 pacientes).

A continuación, se presentan los datos de los primeros cuatro pacientes inscritos en el estudio ejemplarmente en más detalle. Estos cuatro pacientes con edades de 31, 57, 62 y 65 años recibieron el nivel de dosis inicial de 15 microgramos/ $\text{m}^2/24$ h. Como se muestra en la figura 5, los pacientes no. 111001, 109002 y 110002 habían sido diagnosticados con c-LLA, mientras que el paciente no. 108001 es un paciente de LLA pre-B. Los cuatro pacientes habían recibido previamente pautas de quimioterapia estándar para LLA según protocolos GMALL que incluyen al menos un tratamiento de consolidación. Todos ellos han sido resistentes a quimioterapia respecto a enfermedad residual mínima (ERM). Más específicamente, todos los pacientes habían sido positivos para ERM en remisión hematológica completa. Los pacientes no. 110002, 108001 y 109002 habían sido no elegibles para trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno, mientras que el paciente no. 111001 había sido elegible para dicho trasplante.

Como se muestra en la figura 6, tres de los 4 primeros pacientes inscritos en el estudio tenían enfermedad residual mínima (ERM) por reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR a niveles de 10^{-4} (paciente no. 111001), 10^{-3} (paciente no. 108001) y 10^{-1} (paciente no. 109002), y un paciente (paciente no. 110002) tenía ERM por transcritos fusión bcr/abl a un nivel de 10^{-4} . Tres de los 3 pacientes, es decir, los pacientes no. 111001, 108001 y 109002 con reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR se volvieron negativos para ERM después del primer ciclo de

tratamiento, independientemente del nivel de positividad para ERM basal. El paciente no. 111001, el único de los cuatro pacientes elegible para trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno, recibió un trasplante después de haberse convertido a negatividad para ERM tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3.

La figura 2 proporciona un ejemplo del curso de la enfermedad residual mínima (ERM) en el paciente 109002. La medida basada en PCR de la reorganización de TCR (ERM) en el paciente de leucemia linfoblástica aguda común (cLLA) 109002 muestra una positividad para ERM antes del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (Blinatumomab) y negatividad para ERM que empieza después del 1er ciclo del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y que dura hasta la semana 19. Después de ello, el paciente tuvo una recaída testicular, seguido por una recaída hematológica.

El otro paciente que tenía el no. 110002 tenía nivel estable de bcr/abl sin signos de recaída hematológica después del ciclo de tratamiento inicial; véase la figura 6.

El tratamiento de los pacientes con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 fue bien tolerado: excepto por fiebre en los primeros 3 días de tratamiento, no se registraron toxicidades clínicamente significativas.

Mientras tanto, diecisiete pacientes adultos han sido tratados, o están aún en tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, hasta la fecha. Todos los pacientes eran resistentes a terapias contra LLA convencionales, incluyendo quimioterapia, antes del tratamiento con el anticuerpo. Ninguno de ellos ha recibido trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno antes del tratamiento con el anticuerpo. La edad mediana de los pacientes era 48 años, variando de 20 a 77 años. Diez de los pacientes eran mujeres, siete eran hombres. 14 pacientes recibieron el nivel de dosis de 15 microgramos/m²/24 h de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, mientras que en tres pacientes la dosis se ha aumentado de 15 a 30 microgramos/m²/24 h después del primer ciclo o ciclos de tratamiento adicionales: en el paciente 109-004 el aumento de dosis se llevó a cabo después del segundo ciclo de tratamiento (con un total de tres ciclos de tratamiento, seguido por trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno), en el paciente 109-003 después del tercer ciclo (con un total de cuatro ciclos de tratamiento), y en el paciente 110-002 después del sexto ciclo de tratamiento (con un total de siete ciclos de tratamiento). Once de estos pacientes tenían enfermedad residual mínima (ERM) por reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR, dos pacientes tenían translocaciones t(4;11) y cuatro pacientes tenían transcritos fusión bcr/abl.

Como resultado, la respuesta a ERM era evaluable en 16 de 17 pacientes. Como se muestra en la figura 7, 13 de 16 pacientes evaluables se volvieron negativos para ERM, que corresponde a un índice de respuesta molecular completa extraordinario del 81%. Más específicamente, en nueve de once pacientes con reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR, uno de dos pacientes con translocaciones t(4;11) y tres de cuatro pacientes con transcritos bcr/abl se pudo alcanzar negatividad para ERM. Como se muestra en la figura 8, la duración más larga de negatividad para ERM en el paciente 108-001 que no había recibido un trasplante después del tratamiento con anticuerpo observada hasta ahora es 41 semanas. Otro paciente con negatividad para ERM del 23/06/2008 al 27/10/2008 y que ha recibido un trasplante de células madre hematopoyéticas alógeno con éxito después del tratamiento con el anticuerpo está libre de recaída hasta la fecha; véase el paciente 111-001 en la figura 8. Notablemente, los pacientes de bcr/abl que se pudieron tratar con éxito con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 eran resistentes o intolerantes a los inhibidores de tirosina quinasa imatinib y/o dasatinib en una pauta previa de tratamiento de LLA. En particular, uno de los respondedores de bcr/abl al tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tenía una mutación T315I que es resistente a terapia por inhibidores de tirosina quinasa. Por tanto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona ahora por primera vez una terapia para pacientes de LLA resistentes a dasatinib con transcritos bcr/abl. Solo tres de un total de 17 pacientes no se volvió negativo para ERM. Sin embargo, en dos de ellos se pudo alcanzar enfermedad estable. Solo un paciente con enfermedad estable inicial tuvo una recaída hematológica en el tercer ciclo de tratamiento. Un paciente no fue evaluable debido a un SAG el día de estudio 2.

En resumen, se pudo lograr un índice de respuesta molecular completa absolutamente excepcional del 81% en pacientes con LLA de precursores B tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. Se pudo observar actividad del anticuerpo mencionado en todos los subconjuntos de pacientes tratados, incluyendo los pacientes bcr/abl resistentes a inhibidores de tirosina quinasa (T315I) y pacientes con translocaciones t(4;11). Además, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 muestra un perfil de toxicidad favorable, en contraste a las terapias contra LLA convencionales, tal como quimioterapia. A la luz de esto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento proporciona una nueva y ventajosa opción de tratamiento para leucemia linfoblástica aguda (LLA), en particular para casos en los que la LLA es resistente a terapia contra LLA convencional, tal como quimioterapia. Además, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona ahora por primera vez una terapia para LLA positiva para ERM.

Los resultados actualizados indican que el tratamiento de pacientes de leucemia linfoblástica aguda (LLA) con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es capaz de convertir leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva

5 para enfermedad residual mínima (ERM) a un estado negativo para ERM (como se ejemplifica por los pacientes de LLA con reorganizaciones de inmunoglobulina o TCR, transcritos bcr/abl o translocaciones t(4;11), y que este tratamiento se tolera bien. A la luz de esto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en el presente documento proporciona una opción de tratamiento alternativo especialmente para leucemia linfoblástica aguda (LLA) adulta, en particular para LLA resistente a terapia contra LLA convencional, tal como quimioterapia y/o TCMH. El tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es especialmente ventajoso para el tratamiento de LLA positiva para ERM.

Lista de secuencias

- 10 <110> Micromet AG
- <120> Tratamiento novedoso de leucemia linfoblástica aguda pediátrica
- 15 <130> P3255 PCT S3
- <150> 61/112.323
- <151> 07-11-2008
- 20 <150> 61/183.291
- <151> 02-06-2009
- <160> 22
- 25 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 498
- <212> PRT
- 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD13"

35 <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

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

ES 2 558 434 T3

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

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

ES 2 558 434 T3

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

- 5 <210> 2
- <211> 1494
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monocatenario biespecifico CD19xCD13"

<400> 2
 gatatccagc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gaggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgtgat tatgatggtg atagttattt gaactggtac 120
 caacagattc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg atgcatcaa tctagtttct 180
 gggatcccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
 acgttcggtg gagggaccaa gctcgagatc aaaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc 360

ES 2 558 434 T3

tccggtggtg gtggttctca ggtgcagctg cagcagctg gggctgagct ggtgaggcct 420
 gggctctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag ctactggatg 480
 aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtga ttggacagat ttggcctgga 540
 gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggtaaag ccactctgac tgcagacgaa 600
 tcctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc tgcggtctat 660
 ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggta ggccgttatt actatgctat ggactactgg 720
 ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctcc ggaggtggtg gatccgatat caaactgcag 780
 cagtcagggg ctgaactggc aagacctggg gcctcagtga agatgtcctg caagacttct 840
 ggctacacct ttactaggta cacgatgcac tgggtaaac agaggcctgg acagggtctg 900
 gaatggattg gatacattaa tcctagccgt ggttatacta attacaatca gaagttcaag 960
 gacaaggcca cattgactac agacaaatcc tccagcacag cctacatgca actgagcagc 1020
 ctgacatctg aggactctgc agtctattac tgtgcaagat attatgatga tcattactgc 1080
 cttgactact ggggccaagg caccactctc acagtctcct cagtcgaagg tgggaagtgga 1140
 ggttctggtg gaagtggagg ttcagggtga gtcgacgaca ttcagctgac ccagtctcca 1200
 gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag gtcaccatga cctgcagagc cagttcaagt 1260
 gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag tcaggcacct cccccaaaag atggatttat 1320
 gacacatcca aagtggcttc tggagtcctt tatcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc 1380
 tcatactctc tcacaatcag cagcatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccaa 1440
 cagtgagta gtaacccgct cacgttcggt gctgggacca agctggagct gaaa 1494

5 <210> 3
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <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
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 558 434 T3

	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 gtcttgagt 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"

25 <400> 5

ES 2 558 434 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 2 558 434 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

- <210> 8
- <211> 357
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- 10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: VH anti CD3"
- <400> 8
- gatatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
- tcttgcaga 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 2 558 434 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

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

<220>
<220>
10 <221> fuente
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: VL anti CD3"
<400> 10
gacattcagc tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gagccagttc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120
acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaagtgg cttctggagt cccttatcgc 180
ttcagtgcca gtgggtctgg gacctcatac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca 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

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
30 <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
 10
 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: anti-CD19 H1"
 <400> 14
 Ser Tyr Trp Met Asn
 1 5
 20
 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <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
 25
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <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
 30
 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso en un método para el tratamiento, mejoría o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) en un paciente adulto.
2. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 1, en donde dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es leucemia linfoblástica aguda de linaje B, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda de precursores B.
- 10 3. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es resistente a quimioterapia en pacientes no elegibles para trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.
- 15 4. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 1 o 2, seguida por trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas o en donde dicho método sustituye al trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas en pacientes elegibles para trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.
- 20 5. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método es para el tratamiento, mejoría o eliminación de enfermedad residual mínima (ERM) en un paciente con leucemia linfoblástica aguda (LLA).
- 25 6. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 5, en donde dicho paciente es positivo para ERM en remisión hematológica completa.
- 30 7. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 5 o 6, en donde la administración de dicha composición farmacéutica produce enfermedad estable o convierte leucemia linfoblástica aguda (LLA) positiva para ERM a un estado negativo para ERM.
- 35 8. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la ERM se mide con detección cuantitativa de reorganizaciones individuales de genes de inmunoglobulina o reorganizaciones del receptor de células T (TCR), o por transcritos fusión bcr/abl, o por translocaciones t(4;11) usando análisis de PCR o FACS.
- 40 9. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 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 monocatenario biespecífico CD19xCD3 están organizadas, del extremo N al extremo C, en el orden, VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3).
- 45 10. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 9, en donde dicha construcción de anticuerpo monocatenario 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.
- 50 11. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde un ciclo de tratamiento es una infusión continua de 4 semanas, seguida por ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas.
- 55 12. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 11, en donde el ciclo de tratamiento se repite al menos tres veces, después de la determinación de un estado negativo para ERM (consolidación).
- 60 13. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar a una dosis diaria de 10 µg a 100 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.
- 65 14. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 13, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar a una dosis diaria de 15 µg a 30 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.
15. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar a una dosis diaria de 15 µg, 30 µg, 60 µg o 90 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.

- 5 16. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar a una dosis de 5 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente en el/los primer(os) día(s) del periodo de infusión seguido por la administración de 15 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente en el/los día(s) siguiente(s) del periodo de infusión, seguido por la administración de 45 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente como dosis diaria durante el periodo restante del tratamiento.
- 10 17. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para uso de la reivindicación 16, en donde la dosis inicial se va a administrar durante uno, dos o más días o durante siete días.

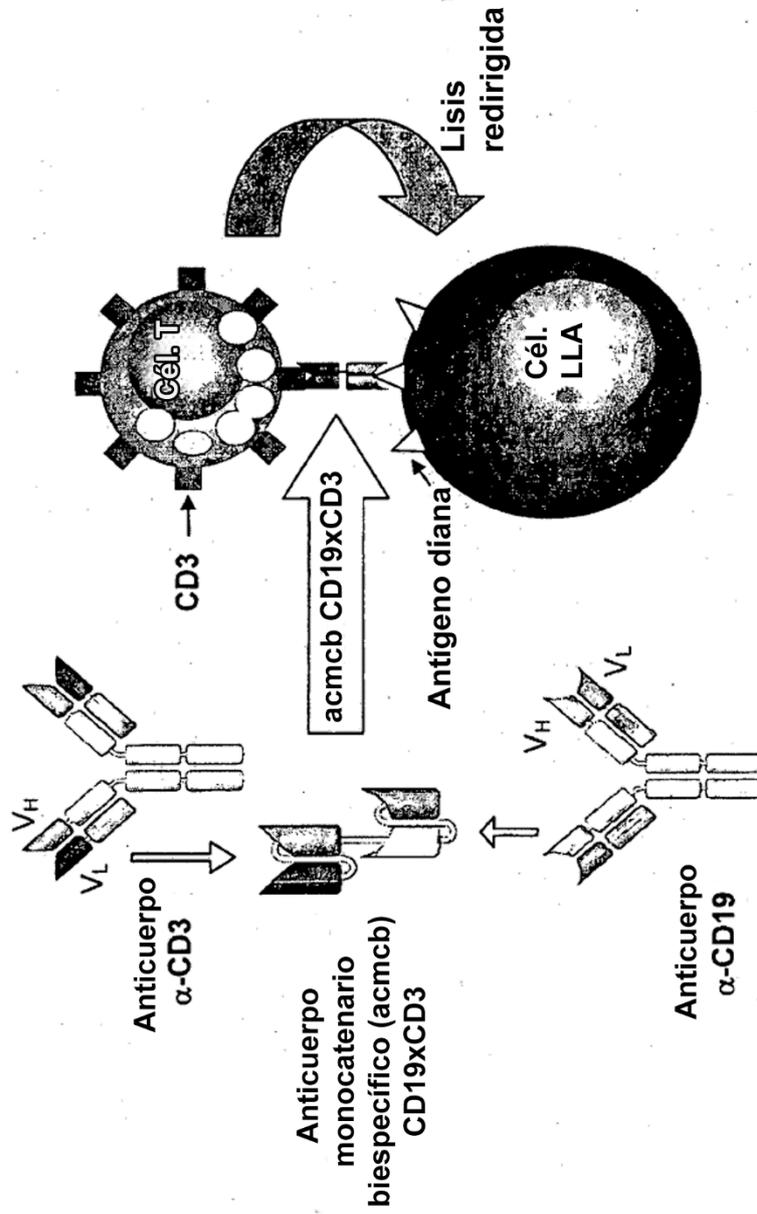
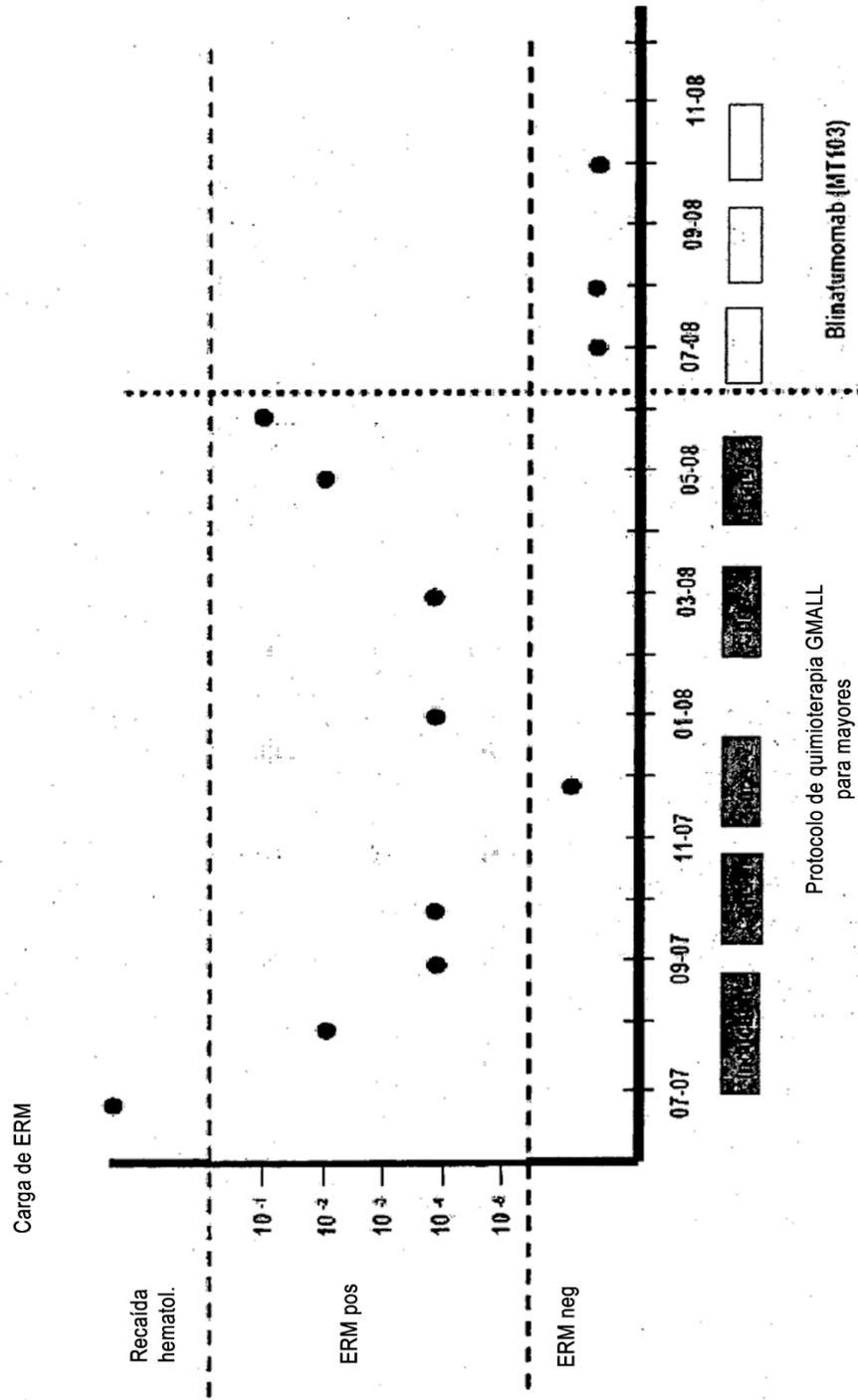


Figura 1

Figura 2



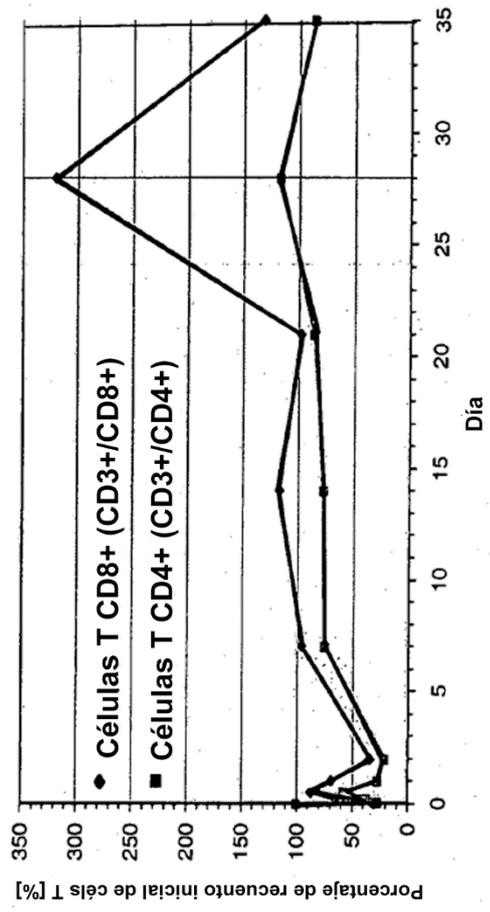


Figura 3

Figura 4

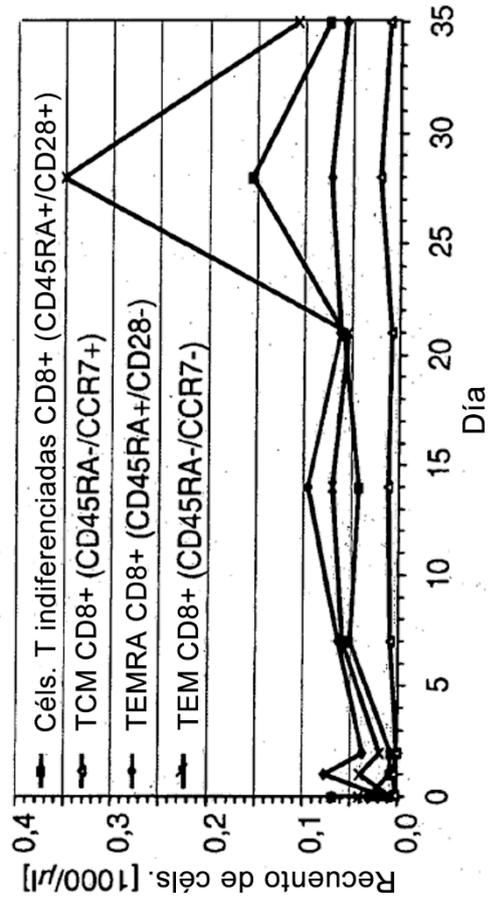


Figura 5

Número de paciente	Sexo edad	Diagnóstico	ERM
111001	Mujer 31 años	c-LLA	Reorganización de Ig
108001	Mujer 57 años	LLA pre-B	Reorganización de Ig
109002	Hombre 62 años	c-LLA	Reorganización de TCR
110002	Hombre 65 años	c-LLA	bcr/abl

Figura 6

Número de paciente	Cribado	Estado de ERM después del primer ciclo	Seguimiento
111001	8×10^{-4}	Negativo	ERM negativa desde el 23/06/2008 al 27/10/2008. Trasplante de células madre alógenas con éxito. Sin recaída hasta la fecha
108001	1×10^{-3}	Negativo	Estado de ERN negativo en curso desde el 28/07/2008
109002	1×10^{-1}	Negativo	Recaída testicular seguida por recaída hematológica después de 19 semanas de negatividad de ERM
110002	bcr/abl $1,73 \times 10^{-4}$	$5,54 \times 10^{-4}$	Estado de ERM estable en curso

Figura 7

	Número de pacientes	Negatividad de ERM alcanzada
Reorganizaciones individuales (inmunoglobulina o TCR)	11	9
translocación t(4;11)	2	1
Bcr/abl positivo	4	3
total	17	13
Índice de respuesta ERM entre 16 pacientes evaluables		81%

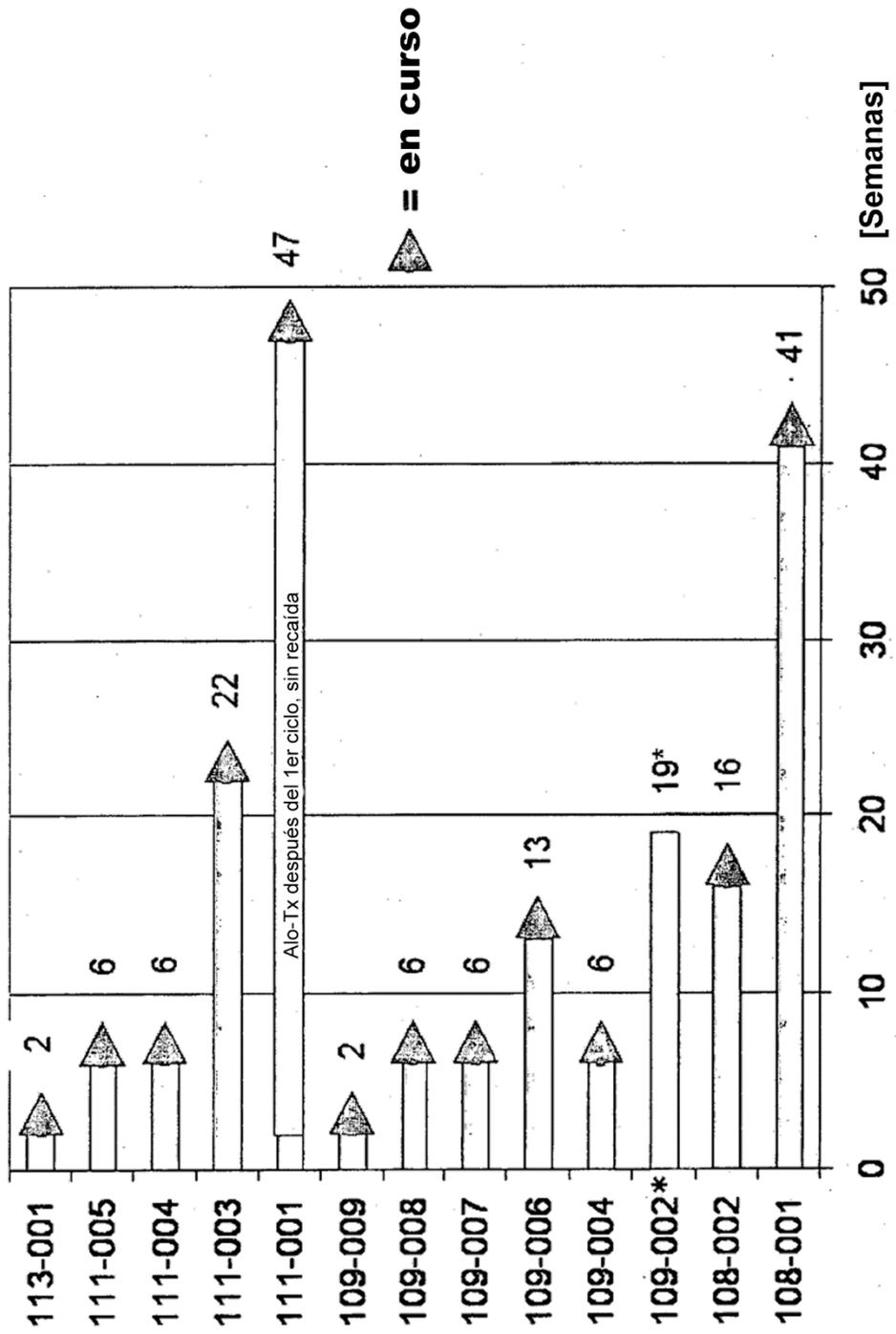


Figura 8