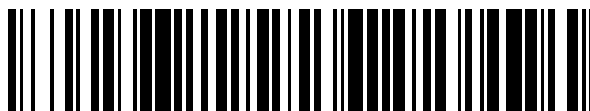


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 585**

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 15185767 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2982696**

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:
17.10.2019

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:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 727 585 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 su uso en un método para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (ALL) en un paciente adulto, en el que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (pH+).

10 Las leucemias son proliferaciones neoplásicas clonales de células hematopoyéticas inmaduras que se caracterizan por diferenciación aberrante o detenida. Las células de leucemia se acumulan en la médula ósea, reemplazando finalmente la mayoría de las células hematopoyéticas normales. Esto provoca el fallo de la médula ósea y sus consecuencias de anemia, hemorragia e infección. Las células de leucemia circulan en la sangre y otros tejidos en todo el organismo (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 pueden
15 agruparse ampliamente como linfoblásticas o mieloblásticas pueden identificarse fenotípicamente y genéticamente y se caracterizan por un curso clínico rápido que requiere tratamiento inmediato. Las leucemias agudas derivan de células progenitoras hematopoyéticas tempranas. En contraste, las leucemias crónicas tienen el fenotipo y el carácter biológico de células más maduras (DeVita *et al.*, loc. cit.). La leucemia linfoblástica aguda (ALL) se distingue de los linfomas porque los últimos se parecen a células linfoides más maduras y típicamente colonizan los ganglios linfoblásticos, el bazo u otros sitios extramedulares antes de propagarse a la médula ósea. Determinados linfomas tales como linfomas linfoblásticos o linfomas de Burkitt retienen las características tanto de las leucemias como de los linfomas, pero derivan de células progenitoras inmaduras y requieren tratamiento similar al usado para leucemia linfoblástica aguda (ALL). Otros linfomas, sin embargo, pueden propagarse ampliamente en la sangre y la médula ósea, y en dicha fase pueden describirse como linfomas leucémicos, pero no son leucemias verdaderas (De Vita *et al.*, loc. cit.). La leucemia linfoblástica aguda es una neoplasia relativamente infrecuente. La incidencia total de
20 leucemia linfoblástica aguda (ALL) es 1,1/100 000 por año. La incidencia tiene su máximo durante la niñez, disminuyendo de forma continua con el aumento de la edad. Desde la edad de 35 años en adelante la incidencia aumenta de nuevo y se observa un segundo máximo empezando a partir de la edad de 80 años (2,3/100 000 por año) (Hoelzer y Gökbuget; Der Onkologe 12 (2006); 983-1002). Aunque la etiología de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) no está clara, es una de las neoplasias más cuidadosamente estudiadas y mejor caracterizadas. Los subgrupos de leucemia linfoblástica aguda (ALL) se definen principalmente por el inmunofenotipado, la citogenética y la genética molecular. La leucemia linfoblástica aguda de linaje B (ALL) con un 74 % de casos comprende la mayoría de ALL. El setenta por ciento de todos los ALL son ALL de precursores B y un 4 % son ALL de linfocitos B maduros. Los ALL de linaje T cubren un 26 % de todos ALL (Hoelzer y Gökbuget; Der Onkologe 12 (2006); 983-
30 1002).

En los primeros años de la década de 1980, la leucemia linfoblástica aguda (ALL) en adultos era una enfermedad raramente curable con una supervivencia global de menos de un 10 %. Después del uso de regímenes adaptados administrados por grupos pediátricos el resultado mejoró hasta un 30-40 %. Un periodo de estancamiento estuvo
40 seguido de mejora únicamente en distintos subgrupos. Sin embargo, en los últimos cinco años, se ha progresado en cuanto al diagnóstico molecular de leucemia linfoblástica aguda (ALL). El trasplante de células madre (SCT) ha mejorado el resultado de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y ha hecho que el tratamiento sea más factible. Aunque diversos fármacos dirigidos nuevos están en evaluación, aún no están disponibles tratamientos dirigidos eficaces para leucemia linfoblástica aguda (ALL). El diagnóstico rápido y la clasificación de leucemia linfoblástica aguda (ALL) es cada vez más importante para identificar el pronóstico y los subconjuntos genéticos moleculares que serán el centro del tratamiento dirigido (Hoelzer y Gökbuget; Hematology (2006); 133-141). El cromosoma Philadelphia (Ph), el resultado de la translocación recíproca que fusiona el protooncogén abl del cromosoma 9 con las secuencias de la región de agrupamiento umbral en el cromosoma 22 fue la primera translocación específica de neoplasia en identificarse. La translocación (9;22) es la aberración genética más frecuente en leucemia linfoblástica aguda (ALL) en adultos. Se encuentra en un 20-30 % de los pacientes. La incidencia aumenta con la edad, aproximándose a un 50 % en pacientes mayores de 50 años. En los pasados estudios clínicos, pacientes mayores estaban subrepresentados debido a la futilidad percibida del tratamiento, pero este patrón está cambiando con la disponibilidad de opciones de tratamiento novedosas prometedoras. De forma notable, se encuentra casi
50 exclusivamente en leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B precursores CD10+ (c-ALL y ALL pre-B); informes infrecuentes de su presencia en ALL de linaje T pueden representar leucemia mieloide crónica (CML) en crisis linfoblástica en lugar de ALL Ph+ verdadera. Clínicamente, los pacientes que presentan un recuento de glóbulos blancos (WBC) variable, expresión superficial 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 ALL Ph+ tratados únicamente con quimioterapia es malo, con menos de un
60 10 % de probabilidad de supervivencia a largo plazo.

A causa del resultado lamentable con quimioterapia, actualmente se está considerando el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas (HSCT) como el tratamiento de elección en ALL Ph+ en adultos. Se ha informado de tasas de supervivencia a largo plazo de un 12 % a un 65 % para pacientes que experimentan SCT en la primera remisión completa (CR), lo que indica que este procedimiento es potencialmente curativo. Sin embargo, aproximadamente un 30 % de estos pacientes experimentan recidivas (Ottmann y Wassmann; Hematology (2005),
65

118-122). La presencia de células de leucemia por debajo del límite de detección citológico (5 % de células leucémicas) se define como enfermedad residual mínima (MRD). Si no hay MRD detectable ($<10^{-4}$, es decir, <1 célula de leucemia por 10^4 células de médula ósea) se alcanza una remisión molecular completa. En los últimos años, una serie de estudios retrospectivos ha demostrado que la MRD en leucemia linfoblástica aguda en adultos es un factor pronóstico independiente como ya se demostró para leucemia en niños. Las herramientas de diagnóstico para MRD son reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o citometría de flujo. El análisis de PCR puede detectar transcritos de fusión tales como bcr/abl y reordenamientos clonales individuales de inmunoglobulinas (IgH) y/o genes del receptor de linfocitos T (TCR). Aproximadamente un 25 % de los pacientes con enfermedad residual mínima (MRD) definida por reordenamiento comprenden un grupo de alto riesgo con un 94 % de tasa de recidiva en 3 años. En general, la disminución en MRD se produce más lentamente en adultos que en niños. La toma de decisiones acerca de la intensificación del tratamiento por trasplante de células madre de sangre periférica alogénicas (PBSCT) es, por lo tanto, demasiado prematura después del tratamiento de inducción. Sin embargo, después del inicio de la consolidación, la enfermedad residual mínima (MRD) en cualquier punto temporal está asociada con un alto riesgo de recidiva (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 (ALL) está llegando a ser cada vez más complejo ya que se introducen diversos protocolos de tratamiento para diferentes subtipos de la enfermedad, que reflejan la intención de adaptar de forma óptima el tratamiento a las entidades de enfermedad específicas adaptadas al riesgo. Andersen *et al.* (Blood J., vol. 80, n.º 11, páginas 2826-2834, (1992)) describen un heteroconjugado biespecífico entre un anticuerpo anti-CD19 y anti-CD3, que se dice que activa la lisis de células de leucemia linfoblástica aguda. Se han conseguido recientes mejoras introduciendo nuevos principios terapéuticos, tales como la adición temprana del inhibidor de tirosina cinasa imatinib en ALL Ph-positivo (Ph+) (Lee *et al.*, Blood 102 (2003), 3068-3070) o el uso del anticuerpo anti-CD20 rituximab en casos CD20⁺ de ALL de linaje B (véase, por ejemplo, Griffin *et al.*, Pediatr Blood Cancer 2008). Goulet *et al.* (Blood J. (1997), vol. 90 n.º 11, páginas 2364-2375) describen que la conjugación de ricina bloqueada a un anticuerpo monoclonal anti-CD19 aumenta la movilización de calcio celular inducida por anticuerpos y la internalización de CD19. Se consiguieron mejoras de diagnóstico evaluando el nivel de enfermedad residual mínima (MRD) por métodos genéticos moleculares o por citometría de flujo, que ha demostrado ser predictivo del resultado en varios 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). Las tasas de supervivencia con los protocolos de tratamiento modernos para pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) adultos ha alcanzado una meseta donde el beneficio potencial de regímenes quimioterapéuticos más agresivos a menudo se compensa por un exceso de mortalidad debido a complicaciones, haciendo por tanto que los esfuerzos por individualizar el tratamiento sean incluso más importantes. Mientras que los pacientes de riesgo convencional sin factores de riesgo convencionales que tienen más de un 50 % de posibilidades de supervivencia a largo plazo con quimioterapia en solitario (Hoelzer *et al.*, Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 1 (2002), 162-192) se ponen potencialmente en riesgo innecesario por tratamiento intensificado y prolongado, el resultado en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) recidivante es extremadamente malo, incluso si se consigue una segunda remisión. En un estudio reciente, el control de la enfermedad residual mínima (MRD) durante el primer año de quimioterapia intensiva dio lugar a una estratificación del riesgo basada en MRD (Brüggemann *et al.* (2006), loc. cit.). Esta clasificación permitió la identificación de un grupo de bajo riesgo de MRD que consiste en aproximadamente un 10 % de los pacientes con una probabilidad mínima de recidiva en tres años, un grupo de alto riesgo de MRD de aproximadamente un 25 % de pacientes con casi un 100 % de riesgo de recidiva y un grupo de riesgo intermedio de MRD. En el último grupo, aproximadamente un 30 % de los pacientes finalmente recayeron a pesar de ser MRD negativos o alcanzar niveles de MRD por debajo de 10^{-4} al final del primer año de tratamiento.

Estos datos muestran que la leucemia linfoblástica aguda (ALL) para la mayoría de pacientes sigue siendo una enfermedad fulminante e incurable. A la luz de esto, existe una necesidad urgente de tratamientos mejorados de ALL.

La presente invención proporciona una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para su uso en un método para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (ALL) en un paciente adulto, en el que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (Ph+). En una realización preferida de los métodos farmacéuticos y medios de la invención, dicha leucemia linfoblástica aguda (ALL) es leucemia linfoblástica aguda (ALL) de linaje B, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda de precursores B. La leucemia linfoblástica aguda (ALL) de linaje B comprende la mayoría de ALL con un 74 % de los casos. El setenta por ciento de todos los ALL son ALL de precursor B y un 4 % son ALL de linfocitos B maduros. Como el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en este documento está dirigido contra el marcador asociado a linfocitos B CD19, dicho anticuerpo es particularmente adecuado como agente terapéutico para leucemia linfoblástica aguda de linaje B, preferiblemente para ALL de precursor B que puede subdividirse además en ALL pro-B, ALL pre-B y ALL común (cALL).

La administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (también llamado blinatumomab o MT103) descrito en más detalle a continuación proporciona por primera vez una estrategia terapéutica que permite el tratamiento de enfermedad residual mínima en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL). Como se muestra en los siguientes ejemplos y se ilustra por 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 ligar linfocitos T con células diana que expresan CD19 provocando una respuesta de linfocitos T citotóxicos no restringida y activación de linfocitos T. Recientemente, un estudio en fase I ha demostrado actividad clínica significativa del anticuerpo monocatenario biespecífico a CD19xCD3 en linfoma no hodgkiniano (NHL) de linfocitos B recidivante (Bargou *et al.*, Science 321 (2008):974-7). Basándose en estos resultados, se diseñó un estudio en fase II en colaboración con el German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GMALL) para investigar la eficacia, seguridad y tolerabilidad del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) que consiguieron una remisión hemática completa, pero aún tenían enfermedad residual mínima (MRD). La MRD es un factor pronóstico independiente que refleja la resistencia al fármaco principal y está asociada con un alto riesgo de recidiva después del inicio de la consolidación. La MRD se midió con métodos normalizados por detección cuantitativa de reordenamientos individuales de inmunoglobulina o reordenamientos del receptor de linfocitos T (TCR), traslocaciones t(4;11) o por transcritos de fusión de bcr/abl (véase, por ejemplo, Van der Velden *et al.*, Leukemia 18 (2004), 1971-80). La población del estudio incluye pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (ALL) de precursor B aguda que muestra una señal de bcr/abl o señal de t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reordenamiento con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$. El criterio de valoración principal del estudio en fase II en curso es la tasa de conversión al estado negativo de enfermedad residual mínima (MRD) como se define por una señal de bcr/abl o de t(4;11) por debajo del límite de detección y/o por detección de reordenamientos individuales de genes de inmunoglobulina o receptor de linfocitos 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 estar seguida por trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas después del primer ciclo, o por ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. La dosificación de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$, mediante lo que se permite una escala de dosis en el paciente de hasta $30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$. El estado de enfermedad residual mínima (MRD) se controla después de cada ciclo de tratamiento. Los pacientes que consiguen negatividad de MRD podrían recibir ciclos de tratamiento adicionales.

Hasta la fecha, se han tratado diecisiete pacientes adultos con ALL, o aún están en tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. 14 pacientes recibieron el nivel de dosis de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, mientras que en tres pacientes la dosis se ha aumentado de 15 a $30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ después del primer ciclo de tratamiento o ciclos de tratamiento adicionales. Todos estos pacientes con ALL tenían enfermedad residual mínima (MRD): Once de ellos tenían MRD por reordenamientos de inmunoglobulina o TCR, dos pacientes tenían traslocaciones de t(4;11) y cuatro pacientes tenían transcritos de fusión de bcr/abl.

Como resultado, la respuesta de MRD fue evaluable en 16 de 17 pacientes. 13 de 16 pacientes llegaron a ser MRD negativos, que corresponde a una tasa de respuesta molecular completa extraordinaria de un 81 %. Más específicamente, en nueve de los once pacientes con reordenamientos de inmunoglobulina o TCR, en uno de dos pacientes con traslocaciones de t(4;11) y en tres de cuatro pacientes con transcritos de bcr/abl, pudo conseguirse negatividad de MRD. La máxima duración de negatividad de MRD observada hasta ahora en un paciente que no ha recibido un trasplante después del tratamiento con anticuerpos es de 41 semanas. Otro paciente tratado con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 con negatividad de MRD del 23-06-2008 al 27-10-2008 y que ha recibido un trasplante alogénico de células madre satisfactorio después de ello está sin recidiva hasta la fecha.

De forma notable, los pacientes con bcr/abl que se trataron satisfactoriamente con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 eran refractarios o intolerantes a inhibidores de tirosina cinasa imatinib y/o dasatinib en el régimen de tratamiento de ALL previo. Por ejemplo, uno de los sensibles de bcr/abl al tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 tenía una mutación T315I que era refractaria al tratamiento por inhibidores de tirosina cinasa. Por tanto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 ahora proporciona por primera vez un tratamiento para pacientes con ALL refractarios a imatinib y/o dasatinib con transcritos de bcr/abl. Únicamente tres de un total de 17 pacientes no llegaron a ser MRD negativos. Sin embargo, en dos de ellos pudo conseguirse enfermedad estable. Únicamente un paciente tuvo una recidiva testicular seguida de una recidiva hemática, después de 19 semanas de negatividad de MRD. Un paciente no fue evaluable debido a un evento adverso grave (SAE) en el día 2 del estudio.

En resumen, pudo conseguirse una tasa de respuesta molecular completa absolutamente excepcional de un 81 % en pacientes adultos con ALL de precursor B tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. Pudo observarse actividad del anticuerpo mencionado en todos los subconjuntos de pacientes de ALL tratados, incluyendo pacientes de bcr/abl refractarios a inhibidores de tirosina cinasa (T315I) y pacientes con traslocaciones de t(4;11). Todos los subconjuntos de pacientes con ALL en general se consideran incurables por tratamiento convencional normalizado de ALL, excepto por la opción de HSCT alogénico. Además, el tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 muestra un perfil de toxicidad favorable, en contraste con los tratamientos convencionales de ALL, tales como quimioterapia. A la luz de esto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en este documento proporciona una opción de tratamiento nueva y ventajosa para leucemia linfoblástica aguda (ALL) en adultos, en particular para casos en que la ALL es refractaria a tratamiento convencional de ALL, tal como quimioterapia y/o HSCT alogénica. Además, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona ahora por primera vez un tratamiento para ALL MRD positiva.

Los usos médicos de la presente invención proporcionan las siguientes ventajas principales:

1. Menos efectos adversos que los tratamientos convencionales de leucemia linfoblástica aguda (ALL), incluyendo quimioterapia o HSCT alogénica. Los tratamientos convencionales de ALL están asociados con riesgos considerables para la salud de los pacientes; véase, por ejemplo, Schmoll, Höffken, Possinger: Kompendium Internistische Onkologie, S. 2660 ff.; 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg).

2. Aunque la HSCT alogénica se considera actualmente el tratamiento de elección en ALL Ph+ adulta, aproximadamente un tercio de los pacientes trasplantados sufren recidiva. Los pacientes con ALL Ph+ portan el máximo riesgo de recidiva entre todos los pacientes dentro de los subtipos de ALL. Como se muestra en los siguientes ejemplos, la administración de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es especialmente apropiada para pacientes adultos con ALL con enfermedad residual mínima (MRD). Esto explica la enfermedad residual mínima (MRD) definida por la traslocación del cromosoma Philadelphia, así como para MRD definida por reordenamiento de inmunoglobulina o TCR o t(4;11). Los pacientes adultos con ALL, no elegibles para trasplante de médula ósea, que portan t(4;11) o pacientes de ALL Ph+ refractarios hasta ahora se han considerado incurables. Los métodos farmacéuticos de la invención, por lo tanto, proporcionan una estrategia terapéutica para el tratamiento, alivio o eliminación de MRD en ALL adulta positiva para el cromosoma Philadelphia (Ph+), reduciendo de ese modo o incluso anulando el riesgo de recidiva en el paciente. Es destacable que el tratamiento curativo para los pacientes con ALL MRD positiva no han estado disponibles hasta ahora.

3. En particular, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede usarse para tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (ALL) Ph+ MRD positiva refractaria a tratamiento convencional de ALL, tal como quimioterapia, administración de inhibidores de tirosina cinasa y/o HSCT.

4. No solamente el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede remplazar los tratamientos convencionales de leucemia linfoblástica aguda (ALL) en pacientes no elegibles para HSCT alogénica, también puede usarse para convertir pacientes ALL elegibles para dicho trasplante en un estado MRD negativo, ya que los pacientes MRD negativos tienen un menor riesgo de recidiva después del trasplante que los pacientes MRD positivos.

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 (ALL) incluyendo la leucemia linfoblástica aguda de precursor B y otros tipos de ALL de linaje B (linfocitos B), y los tratamientos de las mismas se revisan en, por ejemplo, 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. También puede encontrarse información con respecto a ALL, por ejemplo, en <http://www.cancer.gov>, <http://www.wikipedia.org> o <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

La expresión "anticuerpo monocatenario biespecífico" o "anticuerpo biespecífico monocatenario" o términos relacionados de acuerdo con la presente invención significan construcciones de anticuerpo que resultan de la unión de al menos dos regiones variables de anticuerpo en una única cadena polipeptídica desprovista de la parte o partes constantes y/o Fc presentes en inmunoglobulinas completas. Un "conector" como se usa en este documento conecta los dominios V de la misma especificidad, mientras que un "espaciador", como se usa en este documento, conecta dominios V de diferentes especificidades. Por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una construcción con un total de dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, dos regiones VH, cada una con capacidad de unión específica a un antígeno diferente, y conectadas entre sí mediante un espaciador polipéptido sintético corto (habitualmente de menos de 10 aminoácidos) de modo que las dos regiones variables de anticuerpo con su espaciador interpuesto existan como una única cadena polipeptídica contigua. Otro ejemplo de un anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una única cadena polipeptídica con tres regiones variables de anticuerpo. En esta ocasión, dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, una VH y una VL, pueden componer un scFv, en el que las dos regiones variables de anticuerpo están conectadas entre sí mediante un conector polipeptídico sintético, estando a menudo el último modificado genéticamente para que sea mínimamente inmunógeno mientras que el resto es máximamente resistente a proteólisis. Este scFv puede unirse específicamente a un antígeno particular, y se conecta a una región variable de anticuerpo adicional, por ejemplo, una región VH, con capacidad de unión a un antígeno diferente del que se une por el scFv. Otro ejemplo más de un anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una cadena polipeptídica única con cuatro regiones variables de anticuerpo. En esta ocasión, las dos primeras regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, una región VH y una región VL, pueden formar un scFv con capacidad de unión a un antígeno, mientras que la segunda región VH y región VL pueden formar un segundo scFv con capacidad de unión a otro antígeno. Dentro de una cadena polipeptídica contigua única, las regiones variables de anticuerpo individuales de una especificidad pueden estar separadas ventajosamente por un conector polipeptídico sintético como se describe anteriormente, mientras que los respectivos scFv pueden estar separados de forma ventajosa por un espaciador polipeptídico corto como se describe anteriormente. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos monocatenarios biespecíficos, así como métodos para producirlos se muestran en el documento WO 99/54440, documento WO 2004/106381, documento 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 este documento, "CD3" indica un antígeno que se expresa en linfocitos T, preferiblemente linfocitos T humanos como parte del complejo del receptor de linfocitos T multimolecular, consistiendo el CD3 de cinco cadenas diferentes: CD3 épsilon, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 eta y CD3 zeta. La agrupación de CD3 en linfocitos T, por ejemplo, por anticuerpos anti-CD3 da lugar a activación de linfocitos T similar a la unión de un antígeno, pero independiente de la especificidad clonal del subconjunto de linfocitos T. Por tanto, la expresión "anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3" como se usa en este documento se refiere a una construcción específica de CD3 con capacidad de unión al complejo de CD3 humano expresado en linfocitos T humanos y con capacidad de inducción de eliminación/lisis de células diana, en el que dichas células diana portan/presentan un antígeno que se une por la otra parte que no es de unión a CD3 del anticuerpo monocatenario biespecífico. La unión del complejo de CD3 por agentes de unión específicos de CD3 (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico que se administra de acuerdo con los métodos farmacéuticos de la invención) da lugar a la activación de linfocitos T como se sabe en la técnica; véase, por ejemplo, el documento WO 99/54440 o el documento WO 2007/068354. Por consiguiente, una construcción apropiada para los métodos farmacéuticos de la invención es ventajosamente capaz de eliminar/lisar células diana *in vivo* y/o *in vitro*. Las células diana correspondientes comprenden células que expresan un antígeno tumoral, tal como CD19, que se reconoce por la segunda especificidad (es decir, la parte que no es de unión a CD3 del anticuerpo monocatenario biespecífico) de la construcción mencionada. Preferiblemente, dicha segunda especificidad es por CD19 humano que ya se ha descrito en el documento WO 99/54440, documento WO 2004/106381 o documento WO 2007/068354. De acuerdo con esta 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:

VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3) (SEQ ID NO: 1).

Dentro del significado de la invención, la expresión "unión específica" o términos relacionados tales como "especificidad" deben entenderse caracterizados 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 cuando lo hace). El epítipo que se une por un anticuerpo puede determinarse ventajosamente por, por ejemplo, una metodología FACS, ELISA, cartografiado de epítopos por péptidos o espectroscopia de masas. La potencia de unión del anticuerpo a un epítipo particular puede determinarse ventajosamente por, por ejemplo, metodologías conocidas de Biacore y/o ELISA. Una combinación de dichas técnicas permite el cálculo de una relación de señal:ruido como una medida representativa de la especificidad de unión. En dicha relación de señal:ruido, la señal representa la potencia de la unión del anticuerpo al epítipo de interés, mientras que el ruido representa la potencia de la unión del anticuerpo a otros epítopos no relacionados que difieren del epítipo de interés. Una relación de señal:ruido de, por ejemplo, al menos 50, pero preferiblemente de aproximadamente 80 por un epítipo respectivo de interés como se determina, por ejemplo, por Biacore, ELISA o FACS puede tomarse como una indicación de que el anticuerpo evaluado se une al epítipo de interés de una manera específica, es decir, es un "agente de unión específico". La expresión "unión a/interacción con" también puede referirse 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 concretas separadas en la secuencia primaria que quedan juntos en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega en la proteína nativa (Sela, (1969) Science 166, 1365 y Laver, (1990) Cell 61, 553-6). La expresión "epítipo discontinuo" significa epítopos no lineales que se ensamblan a partir de restos de partes distantes de la cadena polipeptídica. Estos restos quedan juntos 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 este documento significa, en el sentido más amplio, procedimientos médicos o aplicaciones que están destinados a aliviar la enfermedad. En el presente caso, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (preparado para la administración a un paciente con ALL Ph+ adulto) como se describe en este documento es para el tratamiento, alivio o eliminación de la enfermedad ALL en pacientes adultos, en el que dichos pacientes son positivos para el cromosoma Philadelphia (Ph+).

El término "paciente", como se usa en este documento, se refiere a un paciente adulto humano, en el que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (Ph+). La expresión "ALL adulta" o "paciente adulto con ALL" o "paciente adulto" como se menciona en este 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 paciente con 70, 75, 80, 85, 90, 100 años o mayores pueden tratarse por los métodos de la invención. La edad indicada debe entenderse como la edad del adulto en el diagnóstico de la enfermedad ALL.

El término "alivio", como se usa en este documento es sinónimo de mejora. Si el estado de un paciente adulto con ALL muestra alivio, el paciente está claramente mejor, hay más mejoras en su estado. Por ejemplo, puede ser una mejora en el estado del paciente con ALL, si puede conseguirse una estabilización de la enfermedad ALL (también

llamada enfermedad estable), es decir, la enfermedad ALL ya no es progresiva. Incluso mejor, la leucemia linfoblástica aguda (ALL) MRD positiva se convierte en un estado MRD negativo.

El término "eliminación", como se usa en este documento, significa la eliminación de células leucémicas del organismo de un paciente adulto con ALL. Como se muestra en el siguiente ejemplo, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede convertir leucemia linfoblástica aguda (ALL) MRD positiva en un estado MRD negativo en diversos subtipos de ALL.

El término "administración", como se usa en este documento, significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 mencionado anteriormente a un individuo, es decir un paciente humano. El paciente con ALL mencionado en este documento es un paciente adulto positivo para el cromosoma Philadelphia, como se define en este documento.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una dosis que produce los efectos para los que se administra, preferiblemente la conversión de un estado de leucemia linfoblástica aguda (ALL) de enfermedad residual mínima (MRD) positiva en un estado de ALL MRD negativo. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá averiguarse por un experto en la materia usando técnicas conocidas. Como se sabe en la técnica y como se describe anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para el suministro sistémico frente a localizado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción de fármacos y la gravedad de la afección, y podrán averiguarse con experimentación rutinaria por los expertos en la materia.

El médico a cargo y los factores clínicos determinarán la pauta posológica. Como se sabe bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el tiempo y vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se están administrando simultáneamente.

Como se sabe bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente adulto, el área superficial corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el tiempo y vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se están administrando simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en los intervalos expuestos en las realizaciones de la invención y los ejemplos adjuntos; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente.

La expresión "infusión continua" se refiere a una infusión que se permite que continúe permanentemente durante un periodo de tiempo, es decir, sin interrupción. "Infusión continua" se refiere a una infusión administrada de forma permanente. Por consiguiente, en el contexto de la invención, los términos "permanente" y "continuo" se usan como sinónimos. Dentro del significado de la invención, por ejemplo, la expresión "infusión continua de 4 semanas" indica una situación en que el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 usado en los métodos farmacéuticos de acuerdo con la invención se administra de forma continua al organismo de un paciente Ph+ adulto durante un periodo de 4 semanas de un modo constante y mantenido durante toda la duración 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 de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, es decir, una transición desde un estado en que este anticuerpo se está administrando al organismo del paciente a un estado en que este anticuerpo ya no se administra al organismo del paciente, o no se produce significativamente durante la duración completa de administración requerida por el medio farmacéutico y los métodos de la invención por otras razones diferentes a renovar el suministro de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 que se está administrando o intervenciones médicas que se vuelven necesarias y similares. En la medida en que dicha renovación necesaria da lugar a una interrupción temporal de la introducción del anticuerpo administrado, dicha administración aún debe entenderse como "ininterrumpida" o "permanente" en el sentido de los métodos farmacéuticos de acuerdo con la invención. En la mayoría de los casos, dicha renovación será generalmente de una duración tan corta que el tiempo durante el que no se está introduciendo el anticuerpo en el organismo del paciente será extremadamente corto en comparación con el tiempo planeado para el régimen de administración global de acuerdo con los métodos farmacéuticos de acuerdo con la invención. De acuerdo con la invención, debe entenderse un ciclo de tratamiento como una infusión continua de 4 semanas del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente con ALL Ph+ adulto, seguido de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. Puede ser que tras la estadificación de MRD del paciente o los pacientes tratados después de una administración continua de 4 semanas o un ciclo de tratamiento, pueda diagnosticarse una respuesta mínima o respuesta parcial al tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico. En este caso, la administración continua puede prolongarse en uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso hasta diez ciclos de tratamiento adicionales para conseguir un mejor resultado terapéutico, por ejemplo, enfermedad estable o incluso una respuesta completa. Preferiblemente, dicha respuesta completa es negatividad de MRD. En una realización alternativa, la infusión continua de 4 semanas del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente con ALL Ph+ adulto puede estar seguida de HSCT alogénica. También se prevé que un paciente tratado por uno, dos, tres, cuatro o incluso más ciclos de tratamiento como se expone anteriormente pueda recibir un trasplante HSCT alogénico después de ello.

Como se muestra en el siguiente ejemplo, 13 de 16 pacientes con ALL adultos llegaron a ser MRD negativos tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, que corresponde a una tasa de respuesta molecular extraordinariamente completa de 81 %. Más específicamente, en nueve de once pacientes con reordenamiento de inmunoglobulina o TCR, uno de dos pacientes con traslocaciones t(4;11) y tres de cuatro

pacientes con transcritos de bcr/abl pudo conseguirse negatividad de MRD. Preferiblemente, el objetivo terapéutico principal de la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, en solitario o en combinación con HSCT alogénico, a un paciente con ALL Ph+ adulto es la conversión de un estado MRD positivo en un estado MRD negativo, como se define en este documento.

La administración continuada ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico de la manera de los métodos farmacéuticos de acuerdo con la invención durante periodos más largos de tiempo permite la activación de linfocitos T ventajosa mencionada en los ejemplos para ejercer su efecto durante suficiente tiempo para eliminar de forma ventajosa todas las células enfermas del organismo. Como la tasa de anticuerpo monocatenario biespecífico administrado de forma ininterrumpida se mantiene baja, la aplicación del agente terapéutico puede continuarse más tiempo sin riesgo de efectos secundarios perjudiciales para el paciente.

El anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 como se usa en este documento está ventajosamente en forma de una composición farmacéutica para su administración a un paciente humano diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda (ALL) Ph+. El paciente humano es un adulto Ph+ como se define en este documento a continuación. Aunque el anticuerpo monocatenario biespecífico como se usa en este documento puede administrarse en solitario, se prefiere la administración en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, liposomas, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones salinas, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La pauta posológica se determinará por el médico a cargo y los factores clínicos. Como se sabe bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial del organismo, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se están administrando simultáneamente. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, o suspensiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones acuosas o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, o solución de Ringer con lactato. Los vehículos intravenosos incluyen renovadores de líquidos y nutrientes, renovadores de electrolitos (tales como los basados en solución de dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición podría comprender vehículos proteínicos como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición podría comprender, además del anticuerpo monocatenario biespecífico proteínico además agentes biológicamente activos, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Dichos agentes podrían ser agentes que actúan como citostáticos, agentes que evitan la hiperuricemia, agentes que inhiben las reacciones inmunitarias (por ejemplo, corticoesteroides, FK506), fármacos que actúan en el sistema circulatorio y/o agentes tales como moléculas coestimuladoras de linfocitos T o citocinas conocidas en la técnica.

Preferiblemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 como se define en este 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 uno o más aminoácidos y/o un azúcar. Los tensioactivos pueden ser detergentes, PEG o similares. Más preferiblemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 como se define en este 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 de la invención, la composición farmacéutica tiene que administrarse a un paciente adulto humano diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda (ALL), en la que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (Ph+).

El éxito del tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede controlarse por métodos convencionales establecidos para las entidades de enfermedad respectivas:

Para tratamiento de ALL de linfocitos B, puede usarse clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), aspiración de médula ósea y diversos parámetros de química clínica específica de leucemia y otros métodos convencionales establecidos. Se han descrito anteriormente métodos y medios para la determinación del estado de enfermedad residual mínima (MRD).

La citotoxicidad puede detectarse por métodos conocidos en la técnica y métodos ilustrados, por ejemplo, en el documento WO 99/54440, documento WO 2004/106381, documento WO 2007/068354:

En una realización preferida, la leucemia linfoblástica aguda (ALL) Ph+ del paciente o los pacientes adultos es refractaria a quimioterapia, preferiblemente refractaria a quimioterapia con respecto a MRD (es decir, la MRD en estos pacientes con ALL es resistente a quimioterapia). Incluso más preferido, la leucemia linfoblástica aguda (ALL) es refractaria a quimioterapia en pacientes no elegibles para HSCT alogénico.

El término "quimioterapia", como se usa en este documento, indica quimioterapia usada para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (ALL). La quimioterapia es el tratamiento inicial de elección para ALL. La mayoría de los pacientes con ALL acaban recibiendo una combinación de diferentes tratamientos. En el tratamiento de ALL, no hay opciones quirúrgicas, debido a la distribución por todo el organismo de las células malignas. En general, la quimioterapia citotóxica para ALL combina múltiples fármacos antileucémicos en diversas combinaciones. La quimioterapia para ALL consiste en tres fases: inducción de remisión, intensificación y tratamiento de mantenimiento. La quimioterapia también está indicada para proteger al sistema nervioso central de leucemia. El objetivo de la inducción de remisión es eliminar rápidamente la mayoría de células tumorales e introducir al paciente en remisión. Esto se define como la presencia de menos de un 5 % de hemoblastos leucémicos en la médula ósea (que se determina 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, asparaginasa y daunorrubicina (usada en ALL adulta) para inducir remisión. La intensificación usa altas dosis de quimioterapia intravenosa de múltiples fármacos para reducir adicionalmente la carga tumoral. Los protocolos de intensificación típicos usan vincristina, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, etopósido, tioguanina o mercaptopurina administrados como bloques en diferentes combinaciones. Como las células de ALL a veces penetran en el sistema nervioso central (SNC), la mayoría de los protocolos incluyen el suministro de quimioterapia al líquido del SNC (llamada quimioterapia intratecal). Algunos centros suministran el fármaco mediante el depósito Ommaya (un dispositivo colocado quirúrgicamente bajo el cuero cabelludo y usado para suministrar fármacos al líquido del SNC y para extraer líquido del SNC para diversos ensayos). Otros centros realizan múltiples punciones lumbares según lo necesario para ensayo y el suministro del tratamiento. Habitualmente se usa metotrexato o citarabina intratecal para este fin. El objetivo del tratamiento de mantenimiento es eliminar cualquier célula residual que no se eliminara por la inducción de remisión, y los regímenes de intensificación. Aunque dichas células son pocas, causarán recidiva si no se erradican. Para este fin, habitualmente se usa mercaptopurina oral diaria, metotrexato oral una vez a la semana, un ciclo de 5 días mensual de vincristina intravenosa y corticoesteroides orales. La duración del tratamiento de mantenimiento es de 3 años para niños, 2 años para niñas y adultos. La recidiva del sistema nervioso central se trata con administración intratecal de hidrocortisona, metotrexato y citarabina (Hoffbrand *et al.*, *Essential Hematology*, Blackwell, 5.ª edición, 2006). Como los regímenes de quimioterapia pueden ser intensivos y prolongados (a menudo aproximadamente 2 años en caso de los protocolos GMALL UKALL, HyperCVAD o CALGB; aproximadamente 3 años para hombres en protocolos COG), muchos pacientes tienen un catéter intravenoso insertado en una vena grande (llamado catéter venoso central o línea de Hickman) o un Portacath (un acceso con forma de cono con una punta de silicona que se implanta quirúrgicamente bajo la piel, habitualmente cerca de la clavícula).

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

A la luz de lo anterior, la expresión "refractario a quimioterapia", como se usa en este documento, indica resistencia de las células de leucemia linfoblástica aguda a la quimioterapia.

Los pacientes pueden experimentar una recidiva de ALL después del tratamiento inicial y/o llegar a ser refractarios a la quimioterapia después del tratamiento. Los pacientes con ALL que son refractarios a quimioterapia tienen un pronóstico notablemente malo. En particular, el pronóstico de pacientes adultos con ALL Ph+ tratados únicamente con quimioterapia es malo, con una probabilidad de menos de un 10 % de supervivencia a largo plazo. Como los métodos farmacéuticos de la invención pueden hacer que los pacientes con ALL Ph+ adulto sean MRD negativos, son particularmente útiles para el tratamiento de pacientes con ALL refractarios a quimioterapia.

La expresión "trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas", como se usa en este documento, significa trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) alogénico o trasplante de médula ósea (BMT) que es un procedimiento médico en el campo de hematología y oncología que implica el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC). Se realiza muy a menudo en pacientes con enfermedades de los ganglios linfáticos, la sangre o la médula ósea, tal como ALL. El HSCT alogénico es un procedimiento en que una persona recibe células madre que forman la sangre (células a partir de las que se desarrollan todas las células sanguíneas) de un donador genéticamente similar, pero no idéntico. A menudo es un pariente cercano, tal como una madre, padre, hermana o hermano, pero también podría ser un donador no relacionado. La mayoría de los destinatarios de HSCT son pacientes con leucemia (por ejemplo, ALL) que se beneficiarían del tratamiento con altas dosis de quimioterapia o irradiación de todo el cuerpo. Sin embargo, el HSCT alogénico sigue siendo un tratamiento de riesgo y tóxico.

La expresión "no elegible para HSCT", como se usa en este documento, significa aquellos pacientes adultos para los que el HSCT alogénico no es el tratamiento para ALL de elección, por ejemplo, debido a razones médicas. Por ejemplo, puede ser el caso de que no haya donador apropiado disponible, o el paciente haya excedido el límite de edad superior. Como se muestra en el siguiente ejemplo, todos los pacientes han sido refractarios a quimioterapia, o en caso de ALL Ph+ también refractarios o intolerantes a tirosina cinasa ante de la inclusión en el estudio. Ocho

pacientes tratados con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 no han sido elegibles para HSCT alogénico, tal como, por ejemplo, los pacientes 111-003, 108-002, 109-006 o 109-007.

Hasta ahora, ALL significa la sentencia de muerte para pacientes refractarios a quimioterapia y no elegibles para HSCT alogénico. Los métodos farmacéuticos de la invención proporcionan por primera vez un tratamiento para esta población de pacientes por que elimina la enfermedad residual mínima (MRD) que de lo contrario causaría una recidiva y mataría a dichos pacientes.

En una realización alternativa de los usos médicos de la invención, dicho método va seguido de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas o dicho método reemplaza el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas en pacientes Ph+ adultos elegibles para HSCT alogénico.

La expresión "elegible para HSCT alogénico", como se usa en este documento, significa que el HSCT alogénico es el tratamiento requerido para el paciente con ALL adulto. En casos donde el paciente con ALL es elegible para HSCT alogénico, pueden preverse los dos siguientes escenarios. En primer lugar, en una realización de los métodos farmacéuticos de la invención, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (en solitario o preferiblemente como una composición farmacéutica) puede usarse para reemplazar HSCT alogénico usado como tratamiento convencional para pacientes con ALL Ph+ adultos elegibles para trasplante. De modo que los métodos farmacéuticos de la invención pueden evitar los riesgos para la salud para los pacientes con ALL Ph+ asociados con el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. Además, un 30 % de los pacientes con ALL trasplantados habitualmente recaen después del trasplante. De modo que los métodos farmacéuticos de la invención pueden usarse para tratar a estos pacientes. En una realización alternativa, la infusión continua del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente con ALL Ph+ adulto puede estar seguida por un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. En esta realización, la administración de la composición farmacéutica que comprende la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede usarse para convertir pacientes con ALL Ph+ elegibles para trasplante en un estado MRD negativo antes de que reciban el trasplante. De modo que los usos médicos de la invención pueden usarse para eliminar la MRD, que da lugar a un riesgo menor de recidiva que el tratamiento de trasplante de pacientes MRD positivos. El ejemplo presenta un paciente que en primer lugar se ha convertido en un estado MRD negativo tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, seguido de un trasplante alogénico. Hasta ahora, este paciente aún es MRD negativo, con una duración de negatividad de MRD de 47 semanas hasta la fecha.

También está dentro del alcance de los usos médicos de la invención que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se administre a pacientes con ALL Ph+ adultos que han recibido un HSCT alogénico y han recaído después de ello.

En otra realización preferida, los usos médicos de la invención son para el tratamiento, alivio o eliminación de enfermedad residual mínima (MRD) en un paciente adulto con leucemia linfoblástica aguda (ALL), en el que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (Ph+).

La expresión "enfermedad residual mínima (MRD)", como se define en este documento, indica un estado de enfermedad después del tratamiento, por ejemplo, con agentes quimioterapéuticos cuando las células de leucemia ya no se pueden encontrar en la médula ósea por métodos de microscopía óptica. Tienen que usarse ensayos más sensibles tales como citometría de flujo (métodos basados en FACS) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para encontrar evidencias de que quedan células de leucemia en la médula ósea del paciente con ALL. Más específicamente, la presencia de células de leucemia por debajo del límite de detección citológico (un 5 % de células leucémicas) se define como enfermedad residual mínima (MRD). Si no es detectable MRD ($<10^{-4}$, es decir, menos de 1 célula de leucemia por 10^4 células de médula ósea detectables), se alcanza una remisión molecular completa. Un "estado MRD positivo", como se define en este documento, significa una señal de bcr/abl o señal de t(4;11) por encima del límite de detección y/o por reordenamientos individuales de genes de inmunoglobulina o receptor de linfocitos T (TCR) por encima de 10^{-4} . Un "estado MRD negativo", como se define en este documento, significa una señal de bcr/abl o una señal de traslocación t(4;11) por debajo del límite de detección o por reordenamientos individuales de genes de inmunoglobulina o receptor de linfocitos T (TCR) por debajo de 10^{-4} . El estado de MRD puede medirse por PCR o análisis FACS por que los reordenamientos individuales de los genes de inmunoglobulina o reordenamientos del receptor de linfocitos T (TCR), o los transcritos de fusión de bcr/abl, o t(4;11) se detectan cuantitativamente. Por ejemplo, un análisis de PCR puede detectar transcritos de fusión tales como bcr/abl o traslocaciones de t(4;11) y reordenamientos clonales individuales de inmunoglobulinas (IgH) y/o genes de receptor de linfocitos T (TCR).

Las anomalías cromosómicas recurrentes en las células malignas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda son características distintivas de la enfermedad (Harrison y Foroni, Rev. Clin. Exp. Hematol. 6 (2002), 91-113). Las aberraciones específicas que son frecuentemente indicativas de lesiones moleculares subyacentes coherentes pueden ayudar o incluso establecer el diagnóstico y determinar el tratamiento óptimo. En ALL infantil, se han identificado numerosos subgrupos citogenéticos buenos y de alto riesgo que se usan de forma regular para estratificar a los pacientes para tratamientos particulares (Pui y Evans, N. Engl. J. Med. 354 (2006), 166-178). Sin embargo, en ALL adulta la función de la citogenética en el tratamiento de los pacientes se ha centrado en gran

medida en la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph) que habitualmente surge de t(9;22)(q34;q11.2) y provoca fusión de BCR-ABL (*bcr/abl*) (Faderl *et al.*, Blood 91 (1998), 3995-4019). Aunque la incidencia global de ALL Ph+ en adultos es de aproximadamente un 25 %, se correlaciona con la edad y aumenta hasta más de un 50 % entre pacientes mayores de 55 años (Appelbaum, American Society of Clinical Oncology 2005 education book. Alexandria: ASCO, 2005: 528-532). Otras traslocaciones citogenéticas asociadas con anomalías genéticas moleculares específicas en leucemia linfoblástica aguda (ALL) se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

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

- 10 La citogenética cada vez está más reconocida como un factor de predicción importante del resultado en ALL (Moormann *et al.*, Blood 109 (2007), 3189-97).

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

- 15 (i) Una traslocación entre los cromosomas 9 y 22, el cromosoma Philadelphia (Ph+) se produce en aproximadamente un 20 % de los casos en adultos y un 5 % en los casos pediátricos de ALL.

(ii) Una traslocación entre los cromosomas 4 y 11 se produce en aproximadamente un 4 % de los casos y es más habitual en bebés por debajo de 12 meses de edad.

- 20 Se han descrito en la técnica reordenamientos de genes de inmunoglobulina o reordenamientos del receptor de linfocitos T (TCR) y su función en ALL (véase, por ejemplo, Szczepański *et al.*, Leukemia 12 (1998), 1081-1088).

- 25 En otra realización preferida de los usos médicos de la invención, dicho paciente Ph+ adulto es MRD positivo en remisión hemática completa.

- 30 El término "remisión" o "remisión hemática", como se usa en este documento, debe entenderse sin evidencias de enfermedad después del tratamiento, por ejemplo, después de quimioterapia o trasplante. Esto significa que la médula ósea contiene menos de un 5 % de hemoblastos determinados por microscopía óptica, los recuentos de células sanguíneas están dentro de los límites normales y no hay signos o síntomas de la enfermedad ALL. Una remisión completa molecular significa que no hay evidencia de células de leucemia en biopsias de la médula ósea, incluso cuando se usan ensayos muy sensibles tales como PCR. En otras palabras: Si no hay MRD detectable ($<10^{-4}$, es decir, <1 célula de leucemia por 10^4 células de médula ósea), se alcanza una remisión molecular completa.

- 35 Después de la remisión completa de la lesión o las lesiones de leucemia en un paciente con ALL adulto humano por tratamiento quimioterapéutico o trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas puede darse el caso de que no pudieran eliminarse todas las células de leucemia del organismo. Sin embargo, estas células tumorales restantes pueden dar lugar a leucemia recidivante. Los usos médicos de la invención pueden usarse para eliminar estas células tumorales restantes para evitar la recidiva de la leucemia (originaria de las células de leucemia ocultas que quedan en el organismo después del tratamiento principal). De esta manera, los métodos farmacéuticos ayudan a evitar la recidiva de la enfermedad en pacientes con ALL Ph+ adultos.

- 40 En otra realización preferida de los usos médicos de la invención, la administración de dicha composición farmacéutica convierte la leucemia linfoblástica aguda (ALL) Ph+ MRD positiva en un estado MRD negativo.

- 45 En otra realización preferida de los usos médicos de la invención, la MRD se mide con detección cuantitativa de reordenamientos individuales de genes de inmunoglobulina o reordenamientos del receptor de linfocitos T (TCR), o por transcritos de fusión de *bcr/abl* o t(4;11) usando PCR o análisis FACS.

- 50 Como se muestra en los siguientes ejemplos, la administración de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es especialmente apropiada para pacientes adultos con enfermedad residual mínima (MRD). Esto explica la enfermedad residual mínima (MRD) definida por la traslocación del cromosoma Philadelphia o t(4;11), así como para MRD definida por reordenamientos de inmunoglobulina o TCR. Los usos médicos de la invención, por lo tanto, proporcionan una estrategia terapéutica para el tratamiento, alivio o eliminación de MRD, reduciendo de ese

modo o incluso anulando el riesgo de recidiva para el paciente adulto. De forma notable, hasta ahora no ha estado disponible tratamiento curativo de MRD en los pacientes ALL.

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

La expresión "señal de bcr/abl o señal de traslocación de t(4;11) por encima del límite de detección", como se en este documento, significa que el análisis por PCR o FACS da lugar a una señal de bcr/abl o señal de t(4;11) detectable.

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

La expresión "recidiva molecular", como se usa en este documento, significa que dicho paciente muestra una señal de bcr/abl o de traslocación de t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reordenamiento con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$.

La expresión "con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$ ", como se usa en este documento, significa que una o más de una célula de leucemia puede detectarse en 10 000 células, en particular células de médula ósea.

En otra realización preferida de los usos médicos de la invención, las regiones de cadena pesada variables (V_H) correspondientes y las regiones de cadena ligera variables (V_L) correspondientes en dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 se ordenan, del 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 regiones de cadena pesada variables (V_H) correspondientes y las regiones de cadena ligera variables (V_L) correspondientes de los dominios de unión a CD3 y CD19 del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se muestran en las SEQ ID NO: 3 a 10, respectivamente. Las regiones CDR correspondientes de las regiones V_H y V_L respectivas del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 mencionado se muestran en las SEQ ID NO: 11 a 22.

En otra realización preferida, dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

También se describe una molécula de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende una secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1, así como una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % o preferiblemente un 95 % idéntica, mucho más preferiblemente al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. También se describe la secuencia de ácido nucleico correspondiente representada en la SEQ ID NO: 2, así como una secuencia de ácido nucleico al menos un 90 %, preferiblemente un 95 % idéntica, muchos más preferiblemente al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 2. Debe entenderse que la identidad de secuencia se determina sobre la secuencia completa de nucleótidos o aminoácidos. Además, debe entenderse que una molécula de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % o preferiblemente un 95 % idéntica, mucho más preferiblemente al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 contiene todas las secuencias CDR mostradas en las SEQ ID NO: 11 a 22. Para alineación de secuencia, por ejemplo, pueden usarse 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 programas informáticos 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 tenga, por ejemplo, un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos o aminoácidos del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en este documento. Por ejemplo, de acuerdo con la hipótesis de bamboleo de Crick, la base 5' en el anticodón no está confinada espacialmente como las otras dos bases y, por tanto, podría no tener un emparejamiento de bases convencional. En otras palabras: la tercera posición en un triplete de codón puede variar de modo que dos tripletes que difieren en esta tercera posición pueden codificar el mismo resto aminoacídico. Dicha hipótesis es bien conocida para 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 realización preferida, un ciclo de tratamiento es una infusión continua de 4 semanas, seguida de ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas o por un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.

En otra realización preferida, 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 MRD negativo (consolidación).

En otra realización preferida, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico tiene que administrarse en una dosis diaria de 10 µg a 100 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente.

5 Como se usa en este documento, un intervalo de dosis que se define como "X a Y" es igual 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 superficial del organismo del paciente incluye "10 µg" y "100 µg".

10 En una realización incluso más preferida, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 tiene que administrarse en una dosis diaria de 15 µg, 30 µg, 60 µg o 90 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente. Incluso más preferido, dicho anticuerpo tiene que administrarse en una dosis diaria de 15 a 30 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente, mucho más preferido en una dosis diaria de 15 o 30 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente.

15 El área superficial promedio del organismo de un paciente adulto de esta manera se calcula en el contexto del método farmacéutico o uso de acuerdo con la invención en el intervalo de 1,7 a 2,2 m².

20 Ventajosamente, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 como se describe en este documento, comprende además opcionalmente, (a) uno o más tampones de reacción, soluciones de almacenamiento y/o reactivos o materiales restantes requeridos para el método o uso indicado. Además, dichos componentes pueden envasarse individualmente en viales o frascos o en combinación en recipientes o unidades de múltiples recipientes.

25 Para evaluar la seguridad y tolerabilidad del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tal como describe en este documento, el compuesto tiene que administrarse por infusión continua a largo plazo.

Se ha descubierto que los efectos beneficiosos e inesperados de los usos médicos de la invención pueden obtenerse administrando el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en una dosis diaria de 10 microgramos a 100 microgramos por metro cuadrado de área superficial del organismo. La dosis diaria puede mantenerse constante durante el periodo de administración. Sin embargo, también está dentro del ámbito de esta realización que para el día o los días iniciales del periodo de infusión se administre una dosis inferior de anticuerpo monocatenario biespecífico ("dosis inicial") antes de los métodos farmacéuticos descritos en este documento, mientras que para el periodo restante de infusión se aplica una dosis mayor ("dosis de mantenimiento"). Por ejemplo, pueden administrarse 5 microgramos de anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área superficial del organismo en el primer día o los primeros días del periodo de infusión seguido de administración de 15 microgramos por metro cuadrado de superficie corporal como dosis diaria para el periodo de tratamiento restante. O pueden administrarse 15 microgramos de anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área superficial del organismo en el primer día o los primeros días del periodo de infusión seguido de administración de 30 o 45 microgramos por metro cuadrado de superficie corporal como dosis diaria para el periodo de tratamiento restante. La dosis inicial puede administrarse durante uno, dos o más días o incluso durante una semana (siete días). También se prevé que pueden administrarse 5 microgramos de anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área superficial del organismo en el primer día o los primeros días del periodo de infusión, seguido de administración de 15 microgramos de anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área superficial del organismo en el siguiente o los siguientes días del periodo de infusión, seguido de administración de 45 microgramos por metro cuadrado de superficie corporal como dosis diaria (de mantenimiento) para el periodo de tratamiento restante. El área superficial promedio del organismo de un paciente adulto de esta manera se calcula en el contexto del método farmacéutico o uso de acuerdo con la invención en un intervalo de 1,7 a 2,2 m².

50 En otra realización de los usos médicos de la invención, la dosis se cambia de escala después del primer ciclo de tratamiento o posteriores, por ejemplo, de 15 a 30 o 60 o incluso 90 µg/m²/24 h.

La administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede ser intravenosa, parenteral, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular o pulmonar. El modo intravenoso de administración será, en la mayoría de los casos, el modo de elección para administrar ininterrumpidamente el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y, según pueda ser el caso, para la coadministración de un agente farmacéutico como parte de un régimen de cotratamiento. Por tanto, la administración intravenosa es especialmente preferida. En este caso, puede elegirse ventajosamente un dispositivo de medición adecuado tal como la bomba de infusión de multitratamiento modelo 6060 fabricada por Baxter. Sea cual sea el dispositivo de medición elegido, debe ser de un diseño y construcción tales que minimicen o, mejor, imposibiliten una interrupción de la administración del agente terapéutico en el caso de intercambio del cartucho y/o remplazo o recarga de la pila. Esto puede conseguirse, por ejemplo, eligiendo un dispositivo con un depósito secundario de solución de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 separado del cartucho a intercambiar de modo que la infusión continua desde este depósito secundario al paciente pueda continuar incluso aunque se retire el cartucho vacío o casi vacío y se remplace con un nuevo.

Un modo de administración intravenosa y, según pueda ser el caso, de coadministración como parte de un régimen de cotratamiento implica el implante de una bomba en el organismo del paciente para medir dicha administración. Un experto en la materia será consciente de dichas bombas de medición, por ejemplo, el modelo 6060 fabricado por Baxter como se expone anteriormente.

Como ejemplo no limitante, puede ser que la administración ininterrumpida, es decir, continua se logre mediante un sistema de bomba pequeño usado por o implantado en el paciente para medir el flujo entrante de agente terapéutico al organismo del paciente. Dichos sistemas de bomba son generalmente conocidos en la técnica, y dependen habitualmente del intercambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico a infundir. Cuando se intercambia el cartucho en dicho sistema de bomba, puede sobrevenir una interrupción temporal del flujo por lo demás ininterrumpida de agente terapéutico al organismo del paciente. En dicho caso, la fase de administración antes del replazo del cartucho y la fase de administración después del replazo del cartucho aún se considerarían dentro del significado de los métodos farmacéuticos de la invención para juntos componer una "administración ininterrumpida" de dicho agente terapéutico. Lo mismo se aplicaría para administraciones muy largas en que el cartucho requeriría el replazo más de una vez, o en que las pilas que accionan la bomba requirieran replazo, dando lugar a una compensación temporal del flujo de solución terapéutica al organismo del paciente.

También deben tomarse medidas apropiadas para minimizar el peligro de infección en el sitio de punción de administración en el organismo del paciente, ya que dichas heridas a largo plazo son especialmente propensas a dicha infección. Lo anterior también se aplica para administración intramuscular mediante un sistema de suministro similar.

La administración continua puede ser transdérmica mediante un parche usado sobre la piel y replazo a intervalos. Un experto en la materia es consciente de sistemas de parche para suministro de fármacos adecuados para este fin. Cabe destacar que la administración transdérmica es especialmente susceptible a administración ininterrumpida, ya que el intercambio de un primer parche agotado puede conseguirse ventajosamente de forma simultánea con el replazo de un segundo parche nuevo, por ejemplo, sobre la superficie de la piel inmediatamente adyacente al primer parche agotado e inmediatamente antes de la eliminación del primer parche agotado. No surgen problemas de interrupción de flujo o fallo de pilas.

En una realización preferida adicional, la administración continua se consigue mediante una vía pulmonar, por ejemplo, mediante un tubo usado en una o ambas fosas nasales de la nariz, estando conectado el tubo a un tanque presurizado, cuyo contenido se mide de forma precisa.

Además, la invención se refiere a una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para su uso en un método para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (ALL) adulta en un paciente adulto, en el que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (Ph+). 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, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (ALL) adulta en un paciente adulto, en el que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (Ph+). Preferiblemente, dicha leucemia linfoblástica aguda (ALL) Ph+ es leucemia linfoblástica aguda de linaje B, más preferiblemente leucemia linfoblástica aguda de precursor B.

En una realización preferida de los usos médicos mencionados, dicha leucemia linfoblástica aguda (ALL) Ph+ es refractaria a quimioterapia en pacientes no elegibles para HSCT alogénico.

En una realización alternativa de los usos médicos mencionados, la administración de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 está seguida por HSCT alogénico o dichos usos rempazan el HSCT alogénico en pacientes elegibles para HSCT alogénico.

En otra realización preferida de los usos médicos mencionados, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es para el tratamiento, alivio o eliminación de enfermedad residual mínima (MRD) en un paciente adulto con leucemia linfoblástica aguda (ALL), en el que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (Ph+). Preferiblemente, dicho paciente es MRD positivo en remisión hemática completa.

En una realización preferida adicional de los usos médicos mencionados, la administración de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 provoca enfermedad estable o convierte leucemia linfoblástica aguda (ALL) MRD positiva en un estado MRD negativo.

Preferiblemente, la MRD se mide con detección cuantitativa de reordenamientos individuales de genes de inmunoglobulina o reordenamientos del receptor de linfocitos T (TCR), o por transcritos de fusión de bcr/abl o t(4;11), usando PCR o análisis FACS.

Incluso más preferido, el paciente de ALL muestra una señal de bcr/abl o de t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reordenamiento con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$.

En otra realización preferida de los usos médicos mencionados, el tiempo hasta recidiva molecular detectable por los métodos de detección indicados es de más de 4 meses.

En otra realización preferida de los usos médicos mencionados, las regiones de cadena pesada variables (V_H) correspondientes y las regiones de cadena ligera variables (V_L) correspondientes en dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 están ordenadas, de extremo N a 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 expuesta en la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferiblemente un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida adicional de los usos médicos mencionados, un ciclo de tratamiento es una infusión continua de 4 semanas, seguida de 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 de un estado MRD negativo (consolidación).

En otra realización preferida de los usos médicos mencionados, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tiene que administrarse en una dosis diaria de 10 μg a 100 μg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente.

Preferiblemente, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tiene que administrarse en una dosis diaria de 15 μg a 30 μg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente.

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 descrita en este documento.

Las figuras muestran:

Figura 1: Modo de acción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. El anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (blinatumomab o MT103) redirige los linfocitos T citotóxicos CD3 positivos para eliminar las células de leucemia linfoblástica aguda humanas que portan el antígeno CD19.

Figura 2: Ejemplo del curso de enfermedad residual mínima (MRD). La medición basada en PCR del reordenamiento de TCR (MRD) en el paciente con leucemia linfoblástica aguda común (cALL) 109-002 muestra positividad de MRD antes del tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y negatividad de MRD en curso empezando después del 1.^{er} ciclo de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3.

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

Figura 4: Cinética de linfocitos T de subconjuntos de linfocitos T del paciente 109-002 durante el ciclo de tratamiento 1. Ejemplo representativo de farmacodinámica, que muestra rápida redistribución de linfocitos T y expansión de linfocitos T efectores de memoria (TEM). Los linfocitos T vírgenes no se expanden.

Figura 5: Los primeros cuatro pacientes que se han incluido en el estudio en fase II. Todos los pacientes habían recibido previamente regímenes de quimioterapia convencional para ALL de acuerdo con los protocolos GMALL incluyendo al menos un tratamiento de consolidación.

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

Figura 7: Actualización sobre las respuestas de enfermedad residual mínima (MRD). En nueve de once pacientes con reordenamientos de inmunoglobulina o TCR, en uno de dos pacientes con traslocaciones de t(4;11) y en tres de cuatro pacientes con transcritos de bcr/abl, pudo conseguirse negatividad de MRD. En resumen, 13 de 16 pacientes evaluables (81 %) se volvieron MRD negativos.

Figura 8: Duración de la negatividad de enfermedad residual mínima (MRD) (estado según el 25-05-2009). La máxima duración de negatividad de MRD observada hasta ahora en el paciente 108-001 que no ha recibido trasplante después del tratamiento con anticuerpos es 41 semanas. El paciente 111-001 con negatividad de MRD desde el 23-06-2008 al 27-10-2008 después de tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y que ha recibido un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas satisfactorio después de ello está sin

recidiva hasta la fecha. La cabeza de flecha significa que la respuesta aún está en curso (estado de 25 de mayo de 2009). El paciente 109-002 (*) tuvo recidiva testicular seguida de recidiva hemática después de 19 semanas de negatividad de MRD.

5 La invención se ilustra además por el siguiente ejemplo:

Ejemplo:

10 1. La generación, expresión y actividad citotóxica del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se ha descrito en el documento WO 99/54440. Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico correspondientes del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se muestran en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Las regiones VH y VL del dominio de unión a CD3 del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se muestran en las 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 las SEQ ID NO: 3 a 6, respectivamente. Las regiones CDR correspondientes se muestran en las SEQ ID NO: 11 a 12.

20 2. Un ensayo en fase I en curso en pacientes de B-NHL recidivantes muestra una alta tasa de respuesta a $60 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ de 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 B-NHL infiltrantes de médula ósea empezó en $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ (Bargou *et al.*, Science 2008).

25 3. Basándose en estos resultados, se diseñó un estudio de aumento de dosis en fase II en colaboración con el German Multicenter Study Group en leucemia linfoblástica aguda (GMALL) adulta para investigar la eficacia, seguridad y tolerabilidad del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en pacientes adultos (no trasplantados) con leucemia linfoblástica aguda (ALL) que consiguieron una remisión hemática completa, pero permanecieron positivos para enfermedad residual mínima (MRD). La MRD es un factor pronóstico independiente que refleja la resistencia al fármaco principal y está asociado con un alto riesgo de recidiva después del inicio de la consolidación. Esto se aplica para ALL Ph+/BCR-ABL positivo y negativo. La MRD se midió con métodos normalizados por detección cuantitativa de reordenamientos individuales de inmunoglobulina o reordenamientos del receptor de linfocitos T (TCR), o por transcritos de fusión de bcr/abl o traslocaciones de t(4;11). Esta población de estudio incluye pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda (ALL) de precursor B que muestran una señal de bcr/abl o de traslocación de t(4;11) por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reordenamiento con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$. Más específicamente, los criterios de inclusión principales incluyeron:

35 - Pacientes con ALL de precursor B en remisión hemática completa con fallo molecular o recidiva molecular empezando en cualquier momento después de la consolidación 1 del tratamiento de primera línea con protocolos convencionales.

40 - Los pacientes deben tener un marcador molecular para evaluación de enfermedad residual mínima que es bcr/abl o una traslocación de t(4;11) a cualquier nivel de detección o reordenamientos individuales de genes de inmunoglobulina o TCR medidas por un ensayo con una sensibilidad de 10^{-4} como mínimo e intervalo cuantitativo de 10^{-4} para al menos un marcador.

45 El criterio de valoración principal del estudio en fase II (en curso) es la tasa de conversión al estado negativo de enfermedad residual mínima (MRD) que se define por una señal de bcr/abl o traslocación de t(4;11) por debajo del límite de detección y/o por la detección de reordenamientos individuales de genes de inmunoglobulina o receptor de linfocitos T (TCR) por debajo de 10^{-4} . Los criterios de valoración secundarios son el tiempo hasta recidiva hemática, tiempo hasta progresión de MRD y tiempo hasta recidiva molecular.

50 Un ciclo de tratamiento del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es una infusión intravenosa continua de 4 semanas que puede estar seguida por trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas después del primer ciclo o ciclos adicionales, o por ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. El estado de enfermedad residual mínima (MRD) se controla después de cada ciclo de tratamiento. El nivel de dosis de partida es $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$, que puede cambiarse de escala hasta $30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ y niveles de dosis mayores ($60 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ o $90 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$) basándose en la actividad clínica y los datos de seguridad. Para el diseño estadístico, se está usando un diseño de dos fases de Mín. y Máx. de Simon (14 a 21 pacientes).

60 A continuación, se presentan los datos de los primeros cuatro pacientes incluidos en el estudio de forma ejemplar en más detalle. Estos cuatro pacientes con edades de 31, 57, 62 y 65 años recibieron el nivel de dosis inicial de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$. Como se muestra en la figura 5, los pacientes con n.º 111001, 109002 y 110002 se han diagnosticado con c-ALL, mientras que el paciente n.º 108001 es un paciente con ALL pre-B. Los cuatro pacientes habían recibido previamente regímenes convencionales de quimioterapia para ALL de acuerdo con los protocolos GMALL incluyendo al menos un tratamiento de consolidación. Todos ellos han sido refractarios a quimioterapia en cuanto a enfermedad residual mínima (MRD). Más específicamente, todos los pacientes han sido MRD positivos en remisión hemática completa. Los pacientes n.º 110002, 108001 y 109002 no han sido elegibles para trasplante

aloténico de células madre hematopoyéticas, mientras que el paciente n.º 111001 ha sido elegible para dicho trasplante.

Como se muestra en la figura 6, tres de los primeros 4 pacientes incluidos en el estudio tenían enfermedad residual mínima (MRD) por reordenamientos de inmunoglobulina o TCR a niveles de 10^{-4} (paciente n.º 111001), 10^{-3} (paciente n.º 108001) y 10^{-1} (paciente n.º 109002) y un paciente (paciente n.º 110002) tenía MRD por transcritos de fusión de bcr/abl a un nivel de 10^{-4} . Tres de los 3 pacientes, es decir los pacientes n.º 111001, 108001 y 109002 con reordenamientos de inmunoglobulina o TCR se volvieron MRD negativos después del primer ciclo de tratamiento, independiente del nivel de positividad de MRD al inicio. El paciente n.º 111001, el único de los cuatro pacientes elegible para trasplante aloténico de células madre hematopoyéticas, recibió un trasplante después de haberse convertido a negatividad de MRD tras el tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3.

La figura 2 proporciona un ejemplo del curso de enfermedad residual mínima (MRD) en el paciente 109002. La medición basada en PCR del reordenamiento de TCR (MRD) en el paciente 109002 con leucemia linfoblástica aguda común (cALL) muestra una positividad de MRD antes del tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (blinatumomab) y negatividad de MRD empezando después del 1.º ciclo de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y que dura hasta la semana 19. Después de ello, el paciente tuvo una recidiva testicular, seguida de una recidiva hemática.

El otro paciente que tiene el n.º 110002 tenía un nivel estable de bcr/abl sin signos de recidiva hemática después del ciclo de tratamiento inicial; véase la figura 6.

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

Por el momento, se han tratado diecisiete pacientes adultos, o aún están en tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 hasta la fecha. Todos los pacientes han sido refractarios a tratamientos convencionales de ALL, incluyendo quimioterapia, antes del tratamiento con anticuerpo. Ninguno de ellos ha recibido un trasplante aloténico de células madre hematopoyéticas antes del tratamiento con anticuerpos. La edad media de los pacientes era 48 años, que varía de 20 a 77 años. Diez de los pacientes eran mujeres, siete eran hombres. 14 pacientes recibieron el nivel de dosis de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, mientras que en tres pacientes la dosis se ha cambiado de escala de 15 a $30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ después del primer ciclo de tratamiento o posteriores: en el paciente 109-004 el aumento de dosis se realizó después del segundo ciclo de tratamiento (con un total de tres ciclos de tratamiento, seguidos de trasplante aloténico de células madre hematopoyéticas), en el paciente 109-003 después del tercer ciclo de tratamiento (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 (MRD) por reordenamientos de inmunoglobulina o TCR, dos pacientes tenían traslocaciones de t(4;11) y cuatro pacientes tenían transcritos de fusión de bcr/abl.

Como resultado, la respuesta de MRD fue evaluable en 16 de 17 pacientes. Como se muestra en la figura 7, 13 de 16 pacientes evaluables se volvieron MRD negativos, que corresponde a una tasa de respuesta molecular completa extraordinaria de un 81 %. Más específicamente, en nueve de once pacientes con reordenamientos de inmunoglobulina o TCR, uno de dos pacientes con traslocaciones de t(4;11) y tres de cuatro pacientes con transcritos de bcr/abl pudieron conseguir negatividad de MRD. Como se muestra en la figura 8, la máxima duración de negatividad de MRD en el paciente 108-001 que no ha recibido un trasplante después del tratamiento con anticuerpos observado hasta ahora es de 41 semanas. Otro paciente con negatividad de MRD desde el 23-06-2008 hasta el 27-10-2008 y que ha recibido un trasplante aloténico de células madre hematopoyéticas satisfactorio después del tratamiento con anticuerpos está sin recidiva hasta la fecha; véase el paciente 111-001 en la figura 8. De forma notable, los pacientes con bcr/abl que pudieron tratarse satisfactoriamente con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 eran refractarios o intolerantes a los inhibidores de tirosina cinasa imatinib y/o dasatinib en el régimen de tratamiento previo para ALL. En particular, uno de los sensibles de bcr/abl al tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tenía una mutación T315I que es refractaria a tratamiento por inhibidores de tirosina cinasa. Por tanto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona ahora por primera vez un tratamiento para pacientes con ALL refractarios a dasatinib con transcritos de bcr/abl. Únicamente tres de un total de 17 pacientes no se volvieron MRD negativos. Sin embargo, en dos de ellos pudo conseguirse enfermedad estable. Únicamente un paciente con enfermedad estable inicial tuvo recidiva hemática en el tercer ciclo de tratamiento. Un paciente no fue evaluable debido a un SAE en el día 2 del estudio.

En resumen, pudo conseguirse una tasa de respuesta molecular completa absolutamente excepcional de un 81 % en pacientes con ALL de precursor B tras tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. Pudo observarse actividad del anticuerpo mencionado en todos los subconjuntos de pacientes tratados, incluyendo pacientes con bcr/abl refractarios a inhibidores de tirosina cinasa (T315I) y pacientes con traslocaciones t(4;11). Además, el tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 muestra un perfil de toxicidad favorable, en contraste con los tratamientos convencionales para ALL, tales como quimioterapia. A la vista de esto,

la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en este documento proporciona una opción de tratamiento nueva y ventajosa para leucemia linfoblástica aguda (ALL), en particular para casos en que, la ALL es refractaria a tratamiento convencional de ALL, tal como quimioterapia. Además, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 ahora proporciona por primera vez un tratamiento para ALL MRD positiva.

Estos resultados actualizados indican que el tratamiento de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede convertir la leucemia linfoblástica aguda (ALL) positiva para enfermedad residual mínima (MRD) en un estado MRD negativo (como se ejemplifica por los pacientes de ALL con reordenamientos de inmunoglobulina o TCR, transcritos de bcr/abl o traslocaciones de t(4;11), y que este tratamiento se tolera bien. A la vista de esto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en este documento proporciona una opción de tratamiento alternativa especialmente para leucemia linfoblástica aguda (ALL) adulta, en particular para ALL refractaria a tratamiento convencional de ALL, tal como quimioterapia y/o HSCT. El tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es especialmente ventajoso para el tratamiento de ALL MRD positiva.

Lista de secuencias

<110> Amgen Research (Munich) GmbH

<120> Tratamiento de leucemia linfoblástica aguda

<130> MIM14233PCTEPD1

<140> Solicitud divisional basada en el documento EP 09760483.9

<141> 06-11-2009

<150> 61/112.323

<151> 07-11-2008

<150> 61/183.291

<151> 02-06-2009

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 498

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3

<400> 1

ES 2 727 585 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	Gly	100	105	110	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	115	120	125	

ES 2 727 585 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
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
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
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
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	370	375	380

ES 2 727 585 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys

<210> 2
 <211> 1494
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3

<400> 2

gatatccagc tgacccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggtg atagttattht gaactgggtac 120
 caacagattc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg atgcatccaa tctagtttct 180
 gggatcccac ccagggttag tggcagtggtg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
 acgttcgggtg gagggaccaa gctcgagatc aaaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc 360
 tccggtgggtg gtggttctca ggtgcagctg cagcagctctg gggctgagct ggtgaggcct 420
 gggtcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag ctactggatg 480
 aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat ttggcctgga 540
 gatggtgata ctaactacaa tggaaagtgc aagggttaaag ccactctgac tgcagacgaa 600
 tcctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc tgcggtctat 660

ES 2 727 585 T3

```

ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggta ggccgttatt actatgctat ggactactgg 720
ggccaagggg ccacgggtcac cgtctcctcc ggaggtgggtg gatccgatat caaactgcag 780
cagtcagggg ctgaactggc aagacctggg gcctcagtga agatgtcctg caagacttct 840
ggctacacct ttactaggtg cagcatgcac tgggtaaaac agaggcctgg acaggggtctg 900
gaatggattg gatacattaa tcctagccgt gggtatacta attacaatca gaagttcaag 960
gacaaggcca cattgactac agacaaatcc tccagcacag cctacatgca actgagcagc 1020
ctgacatctg aggactctgc agtctattac tgtgcaagat attatgatga tcattactgc 1080
cttgactact ggggccaagg caccactctc acagtctcct cagtcgaagg tggaaagtga 1140
ggttctgggtg gaagtggagg ttacagtgga gtcgacgaca ttcagctgac ccagtctcca 1200
gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag gtcacatga cctgcagagc cagttcaagt 1260
gtaagttaca tgaactggta ccagcagaag tcaggcacct ccccaaaaag atggatttat 1320
gacacatcca aagtggcttc tggagtcctt tatcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc 1380
tcatactctc tcacaatcag cagcatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgcca 1440
cagtgaggta gtaaccgct caggttcggt gctgggacca agctggagct gaaa 1494

```

<210> 3
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 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
35        40        45

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

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

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

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

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

```

<210> 4
 <211> 372
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH anti-CD19

5

<400> 4

```

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

```

10

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> VL anti-CD19

<400> 5

```

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

```

20

<210> 6

25

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> VL anti-CD19

<400> 6

ES 2 727 585 T3

```

gatataccagc tgacccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc      60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggtg atagttattt gaactgggtac      120
caacagattc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg atgcatccaa tctagtttct      180
gggatcccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      240
cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg      300
acgttcggtg gagggaccaa gctcgagatc aaa                                    333

```

<210> 7

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH anti-CD3

10

<400> 7

```

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

```

15

<210> 8

<211> 357

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH anti-CD3

25 <400> 8

ES 2 727 585 T3

gatatacaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357

<210> 9

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL anti-CD3

10

<400> 9

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

15

<210> 10

<211> 318

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL anti-CD3

25

<400> 10

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

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para su uso en un método para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (ALL) en un paciente adulto, en el que dicho paciente es positivo para el cromosoma Philadelphia (Ph+).
2. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha leucemia linfoblástica aguda (ALL) es leucemia linfoblástica aguda de linaje B, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda de precursor B.
3. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha leucemia linfoblástica aguda (ALL) sufre recidiva después de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas y/o es refractaria a quimioterapia.
4. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha leucemia linfoblástica aguda (ALL) es refractaria o intolerante a inhibidores de tirosina cinasa.
5. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 4, en el que dichos inhibidores de tirosina cinasa son imatinib y/o dasatinib.
6. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, seguido de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas o en el que dicho método reemplaza el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas en pacientes elegibles para trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.
7. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el método es para el tratamiento, alivio o eliminación de enfermedad residual mínima (MRD) en un paciente con leucemia linfoblástica aguda (ALL).
8. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 7, en el que dicho paciente es MRD positivo en remisión hemática completa.
9. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 7 u 8, en el que la administración de dicha composición farmacéutica provoca enfermedad estable o convierte la leucemia linfoblástica aguda (ALL) MRD positiva en un estado MRD negativo.
10. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la MRD se mide con detección cuantitativa de reordenamientos individuales de genes de inmunoglobulina o reordenamientos de receptor de linfocitos T (TCR), o por transcritos de fusión bcr/abl o por traslocaciones de t(4;11) usando PCR o análisis FACS.
11. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las regiones de cadena pesada variables (VH) correspondientes y las regiones de cadena ligera variables (VL) correspondientes en dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 están ordenadas, de extremo N a extremo C en el orden VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3).
12. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 11, en el que dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferiblemente un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
13. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que un ciclo de tratamiento es una infusión continua de 4 semanas, seguida de ciclos repetidos después de un intervalo sin tratamiento de 2 semanas.
14. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 13, en el que el ciclo de tratamiento se repite al menos tres veces, después de la determinación de un estado MRD negativo (consolidación).
15. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tiene que administrarse en una dosis diaria de 10 µg a 100 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente.

16. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de la reivindicación 15, en el que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tiene que administrarse en una dosis diaria de 15 µg, 30 µg, 60 µg o 90 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente.

5 17. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tiene que administrarse en una dosis diaria de 5 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente en el primer día o los primeros días del periodo de infusión seguido de administración de una dosis diaria de 15 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente para el periodo de tratamiento restante.

10 18. La construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 tiene que administrarse en una dosis diaria de 5 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente en el primer día o los primeros días del periodo de infusión seguido de administración de una dosis diaria de 15 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente, seguido de una dosis diaria cambiada de escala de 30 µg o 60 µg o 90 µg por metro cuadrado de área superficial del organismo del paciente para el periodo de tratamiento restante.

15

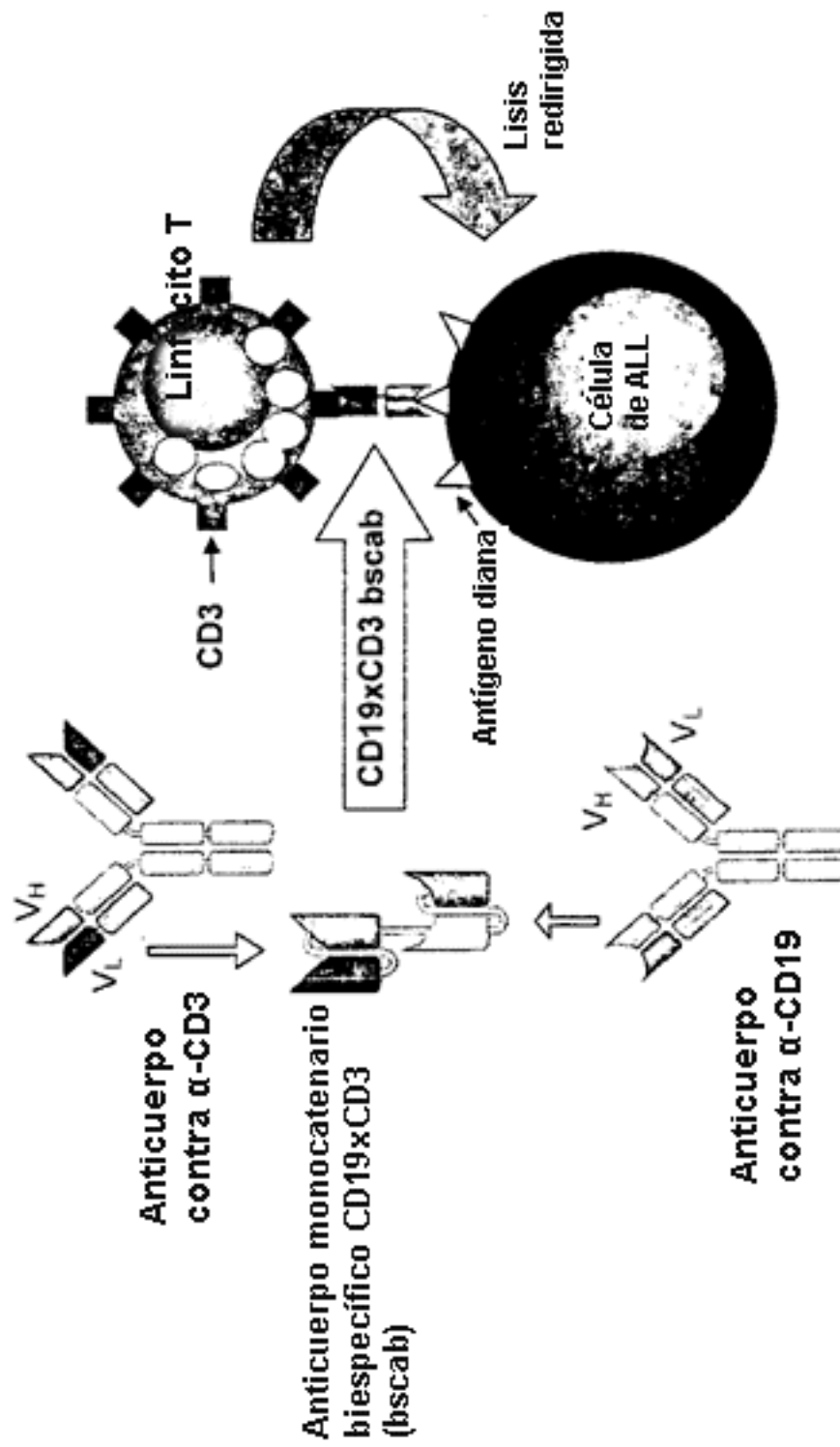


Figura 1

Figura 2

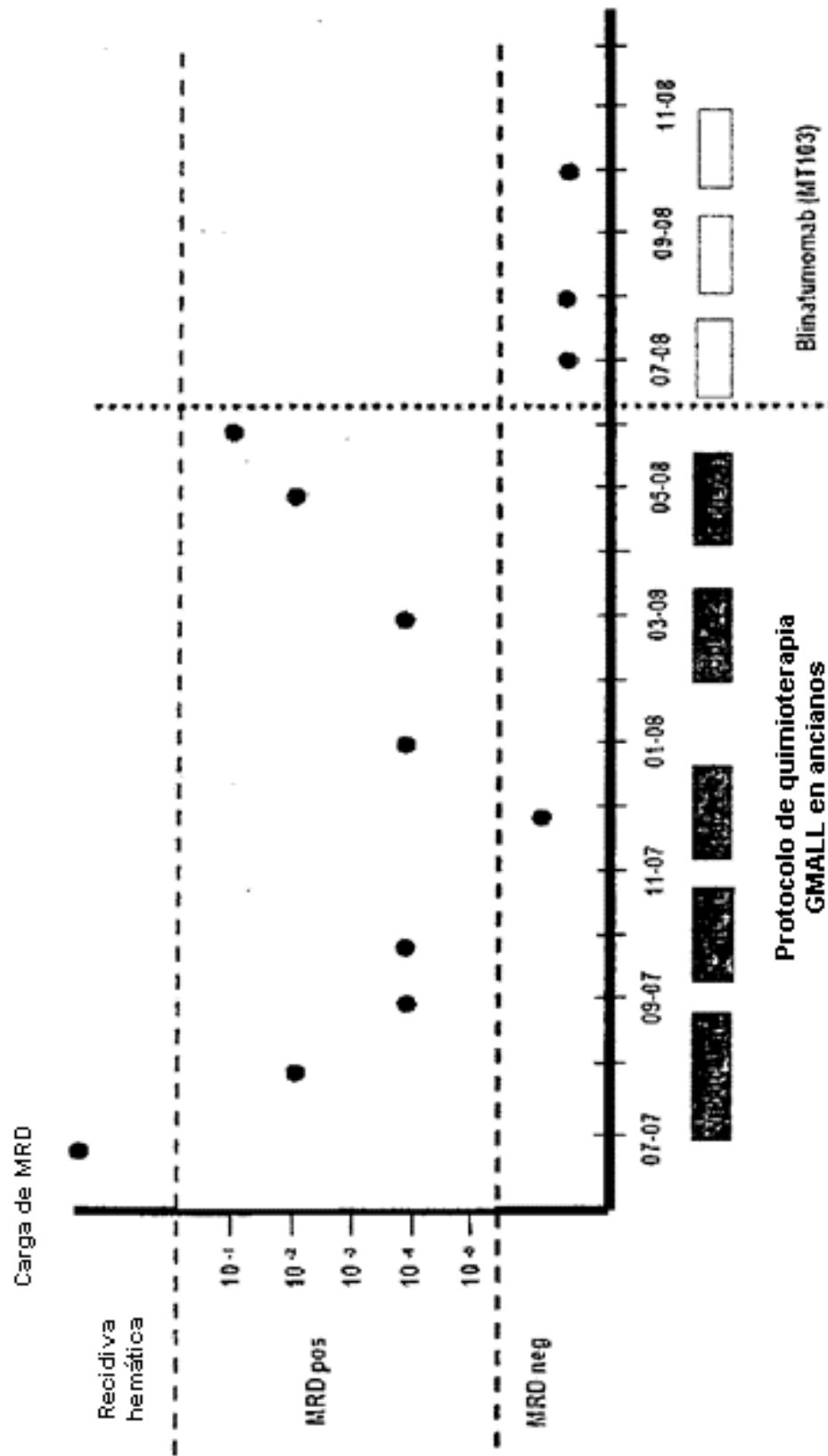


Figura 3

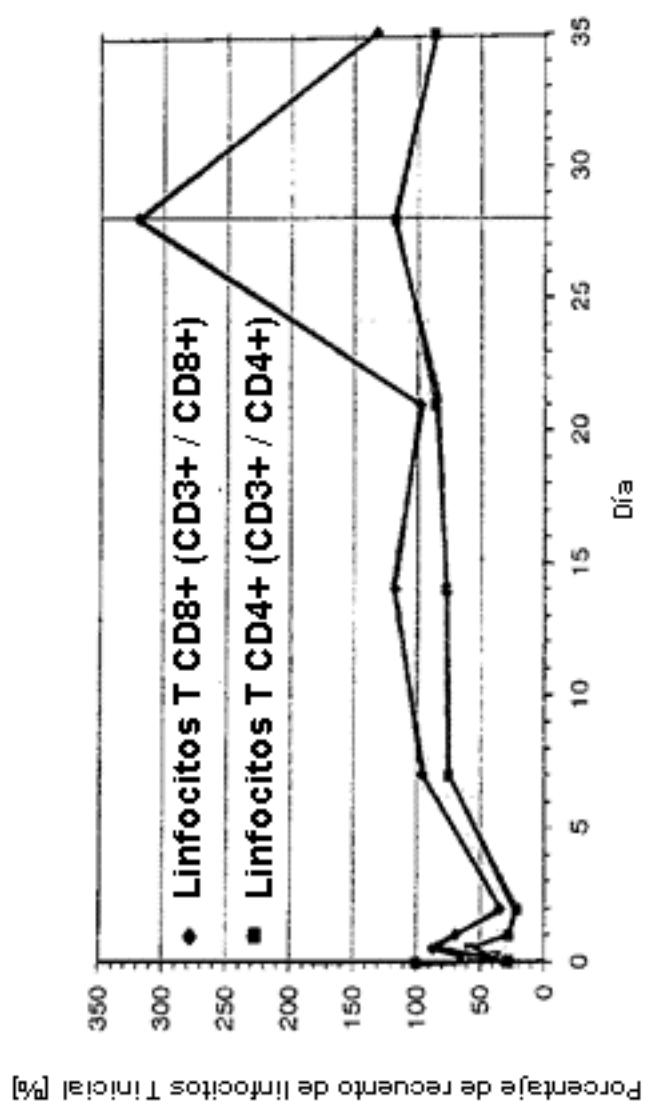


Figura 4

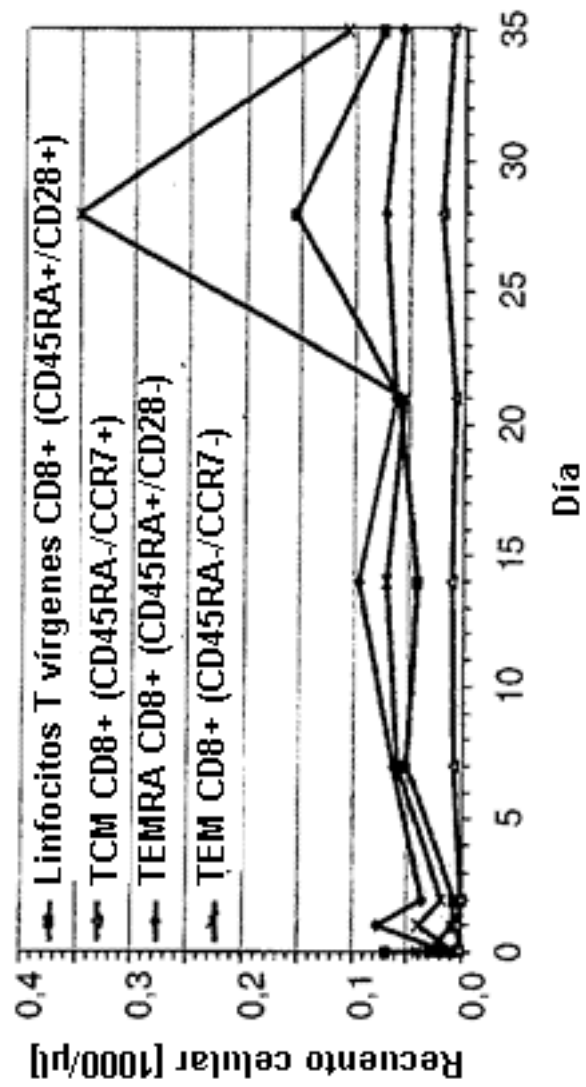


Figura 5

Número de paciente	Género y edad	Diagnóstico	MRD
111001	Mujer 31 años	c-ALL	Reordenamiento de Ig
108001	Mujer 57 años	ALL pre-B	Reordenamiento de Ig
109002	Hombre 62 años	c-ALL	Reordenamiento de TCR
110002	Hombre 65 años	c-ALL	bcr/abl

Figura 6

N.º de paciente	Cribado	Estado de MRD después del primer ciclo	Seguimiento
111001	8×10^{-4}	Negativo	MRD negativo desde el 23-06-2008 hasta el 27-10-2008 Trasplante alogénico de células madre satisfactorio Sin recidiva hasta la fecha
108001	1×10^{-3}	Negativo	Estado MRD negativo en curso desde el 28-07-2008
109002	1×10^{-1}	Negativo	Recidiva testicular seguida de recidiva hemática después de 19 semanas de negatividad de MRD
110002	bcr/abl $1,73 \times 10^{-4}$	$5,54 \times 10^{-4}$	Estado de MRD estable en curso

Figura 7

	Número de pacientes	Negatividad de MRD conseguida
Reordenamientos individuales (Inmunoglobulina o TCR)	11	9
Traslocación t(4;11)	2	1
Bcr/abl positivo	4	3
total	17	13
Tasa de respuesta de MRD entre 16 pacientes evaluables		81 %

Figura 8

