

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 126**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 17206868 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3330293**

54 Título: **Tratamiento de leucemia linfoblástica aguda pediátrica con anticuerpos biespecíficos contra CD3XCD19**

30 Prioridad:

07.11.2008 US 112323 P
02.06.2009 US 183291 P
29.06.2009 US 221269 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZUGMAIER, GERHARD

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 748 126 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de leucemia linfoblástica aguda pediátrica con anticuerpos biespecíficos contra CD3XCD19

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 (LLA) pediátrica, en un paciente de LLA pediátrica con necesidad del mismo, en donde dicha LLA pediátrica es resistente a la quimioterapia o trasplante de células madre hematopoyéticas alogénico (TCMH).

Con el tratamiento actual de LLA infantil, las tasas de supervivencia libre de eventos son aproximadamente un 75 %. Por lo tanto, la recidiva es aún frecuente. Los problemas en la gestión de la recidiva de LLA son la resistencia de las células leucémicas y la tolerancia reducida de los pacientes a una segunda ronda de tratamiento después de haber recibido ya una terapia de primera línea intensiva, lo que da lugar a una tasa de remisión inferior, así como a una incidencia mayor de recidiva subsecuente y a un resultado general inferior. La poliquimioterapia intensificada es actualmente esencial para inducir una segunda remisión completa. Dependiendo de una variedad de factores pronósticos, la remisión se puede mantener con quimioterapia e irradiación craneal solo o con intensificación del tratamiento por medio de trasplante de células madre (Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486).

Aunque se ha hecho un progreso enorme en el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) (véase, por ejemplo, Möricke *et al.*, Blood 111 (2008), p. 4477; Moghrabi *et al.*, Blood 109 (2007), p. 896), la LLA recidivante es todavía la cuarta neoplasia maligna pediátrica más común (Gaynon, Cancer 82 (1998), p. 1387). Especialmente para los pacientes con recidiva temprana de médula ósea dentro de los tres años de diagnóstico, la terapia para estos pacientes es insatisfactoria y el trasplante de células madre alogénico es el único planteamiento curativo hasta el momento. La recidiva resistente a la quimioterapia después de trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) se asocia con un pronóstico pobre, aunque la infusión de linfocitos del donante (ILD) tras el trasplante podría inducir remisiones en unos pocos pacientes por medio de la inducción de un efecto injerto contra leucemia (ICL) (Loren *et al.*, BMT 41 (2008), p. 483). Un segundo TCMH puede ser una opción y se han documentado algunos supervivientes a largo plazo. Sin embargo, el estado de la enfermedad antes del TCMH es predictivo para el resultado tras el trasplante y los pacientes con enfermedades morfológicas o niveles de EMR persistentes de $>10^{-4}$ de blastocitos leucémicos se sabe que tienen un riesgo muy alto de recidiva y un resultado muy pobre (Bader *et al.*, J Clin Oncol. 27 (2009), p. 377-84). A la luz de esto, el estado de la enfermedad antes del segundo TCMH es de suma importancia y se deberían hacer todos los esfuerzos para lograr otra remisión. A pesar del uso de agentes quimioterapéuticos presentados recientemente para la leucemia resistente (Jeha, Semin Hematol. 46 (2009), 76-88), los pacientes con recidiva después de TCMH tienen con frecuencia una enfermedad resistente a la quimioterapia y estos pacientes son muy susceptibles a toxicidad relacionada con quimioterapia. Para estos pacientes, se necesitan estrategias no quimioterapéuticas y menos tóxicas para inducir remisiones en los pacientes de este tipo.

En vista de las desventajas mencionadas anteriormente de las terapias de LLA pediátrica convencionales, existe aún la necesidad de un régimen de tratamiento mejorado.

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 (LLA) pediátrica, en un paciente de LLA pediátrica en la necesidad del mismo, en donde dicha LLA pediátrica es resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico. Este planteamiento inmunológico que utiliza anticuerpos que se unen a células T proporciona por primera vez un tratamiento no quimioterapéutico y menos tóxico para LLA pediátrica.

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

En un ensayo clínico adicional aún en marcha, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 mencionado dio lugar a la eliminación de células leucémicas resistentes a la quimioterapia en pacientes adultos de EMR positiva no trasplantados con LLA CD19⁺.

En la actualidad, se ha descubierto sorprendentemente dos usos compasivos en los que dicho anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 no es solo adecuado para el tratamiento de LLA en pacientes adultos no trasplantados, sino que también para LLA recidivante pediátrica (o infantil) resistente a la terapia de LLA convencional, que incluye quimioterapia y trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico.

En la presente memoria, los autores de la invención informan sobre el poderoso efecto antileucémico del anticuerpo biespecífico CD19xCD3 en dos niños (de ahora en adelante, denominados paciente 1 y 2) con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores B, que tuvieron una recidiva resistente a la quimioterapia después de trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico de donantes compatibles no emparentados y haploidénticos.

Antes del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, el paciente 1 se había tratado previamente con TCMH alogénico y múltiples quimioterapias. Sin embargo, estas terapias convencionales de LLA

pediátrica fracasaron de modo que el paciente recayó repetidamente, con la consecuencia de que tenía un pronóstico extremadamente pobre. A continuación, se administraron 15 microgramos/m²/24 h del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente de LLA pediátrica como infusión continua durante cinco semanas. Durante el tratamiento con anticuerpos, el paciente tuvo un aumento de linfocitos T CD8+ derivados del donante sin ningún signo de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Este aumento de células T se asoció con una rápida eliminación de los blastocitos leucémicos del paciente y, 10 días después del comienzo del tratamiento con anticuerpos, no se pudo detectar ningún blastocito en la médula ósea del paciente más allá del nivel de detección de enfermedad mínima residual (EMR) de 1 célula de 10.000. El paciente se mantuvo EMR negativo a lo largo del tratamiento con anticuerpos. El paciente se sometió a un segundo trasplante de células madre de su madre haploidéntica 2 semanas después del final del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y se mantuvo EMR negativo desde entonces (estado de noviembre de 2009).

El paciente 2 de quince años de edad se diagnosticó con el cromosoma Filadelfia y LLA de precursores B con CD19-positivo en abril de 2001. Después de la quimioterapia, recibió un TCMH de un hermano de HLA idéntico en octubre de 2001. En 2002, se le diagnosticó una recidiva de médula ósea y se consiguió otra remisión con matinib y quimioterapia. A continuación, recibió un segundo TCMH de un donante no emparentado de HLA idéntico en octubre de 2004. En marzo de 2008, se le diagnosticó una segunda recidiva y se trató con una quimioterapia de dosis baja y Dasatinib debido a la resistencia a Imatinib. Después de quimioterapia adicional con clofarabina y citosina/arabinósido, logró una remisión molecular y recibió un tercer TCMH alogénico de su padre haploidéntico incompatible en 3 de 6 alelos HLA con tratamiento postrasplante con Dasatinib. Debido a hemorragia gastrointestinal y cardiomiopatía dilatada, el Dasatinib se suspendió 5 meses después del trasplante. En abril de 2009, se le diagnosticó una recidiva del sistema nervioso central (SNC) combinada con $7 \times 10^9/l$ blastocitos en el SNC y un 3 % de blastocitos en la médula ósea. El paciente se trató a continuación con Nilotinib, quimioterapia intratecal e irradiación fraccionada del SNC con 18 Gy. Tres meses después de este tratamiento, la médula ósea del paciente se mantuvo EMR-positiva en un nivel de $1,1 \times 10^{-3}$, mientras el SNC estuvo libre de blastocitos. Un análisis de quimerismo de sangre periférica reveló una hematopoyesis completa derivada del donante de su padre haploidéntico.

El paciente se trató a continuación con agente único blinatumomab a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ durante 4 semanas por medio de infusión continua sin ningún efecto secundario. Una aspiración de médula ósea al final del tratamiento mostró remisión completa con EMR no detectable en la médula ósea por debajo de $<1 \times 10^{-4}$. Como el paciente 1, el paciente 2 no mostró ningún signo de EICH durante o después del tratamiento con blinatumomab. En la actualidad, se encuentra bien y asiste al colegio.

Estos datos demuestran de manera impresionante que los anticuerpos biespecíficos que se unen a células T inducen un efecto potente de injerto contra leucemia (ICL) en ausencia de EICH en pacientes pediátricos con LLA de precursores B resistente a la terapia y recidivante después de TCMH alogénico. Por consiguiente, en el tratamiento descrito en la presente memoria de pacientes pediátricos, se prefiere que una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 induzca un efecto injerto contra leucemia (ICL). Además, los pacientes pediátricos toleran bien el tratamiento. A la luz de esto, los métodos de esta invención proporcionan una opción de tratamiento sorprendentemente mejorada para leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica para los casos en los que la LLA pediátrica es resistente a la quimioterapia y/o TCMH alogénico. Por consiguiente, y en otra realización de la presente invención, las construcciones monocatenarias biespecíficas que se unen a células T (anti CD19xCD3) empleadas en la presente memoria se pueden emplear también en pacientes pediátricos que se han sometido a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) (alogénico). Como se ilustra en la presente memoria, incluso los pacientes pediátricos que tienen una recidiva de su LLA después de TCMH de un donante no emparentado compatible o haploidéntico y/o pacientes pediátricos que fueron resistentes a la quimioterapia se pueden tratar con éxito con los métodos descritos en la presente memoria. Los pacientes de ejemplo, como se documentan en la presente memoria, mostraron una respuesta antileucémica sorprendente por la intervención farmacéutica, como se describe en la presente memoria, y se volvieron EMR negativos en ausencia de cualquier signo de EICH (enfermedad del injerto contra el huésped). Aunque la supervivencia de los niños con LLA ha mejorado drásticamente durante las últimas décadas, la LLA recidivante es aún la causa más importante de fracaso del tratamiento. Para los pacientes en la segunda recidiva, el TCMH alogénico es el único planteamiento curativo hasta el momento. Una de las principales acciones antileucémicas del TCMH es la inducción de un efecto ICL. Desafortunadamente, la aparición de ICL se asocia con frecuencia con EICH, que es aún una causa importante de morbilidad y mortalidad después de TCMH. Por lo tanto, la inducción de ICL en ausencia de EICH es el tema de una investigación intensiva. Un planteamiento para la inducción de un efecto ICL es infusiones de linfocitos del donante (ILD) postrasplante, que se utilizan preferencialmente para el tratamiento de LLA recidivante después de TCMH. Mientras ILD es muy eficaz en el tratamiento de LMC (Kolb, Blood 76 (1990), 2462), es menos eficaz en el tratamiento postrasplante de LLA recidivante (Loren, BMT 41 (2008), 483) y con frecuencia provoca la aparición de EICH.

Los métodos farmacéuticos y médicos de la presente invención proporcionan un planteamiento innovador para la inducción de ICL sin EICH. Este planteamiento es la activación *in vivo* de los linfocitos derivados del donante después de TCMH utilizando bajas dosis del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 que se une a células T, que dirige linfocitos T contra los blastocitos de LLA CD19+ de los pacientes. Este anticuerpo ha mostrado una actividad antilinfoma y antileucémica sorprendente en la situación autóloga, pero nunca se ha sometido a prueba en

LLA pediátrica recidivante después de TCMH. Los dos pacientes pediátricos descritos en los siguientes ejemplos tuvieron una recidiva de su LLA después de TCMH de un donante no emparentado compatible o haploidéntico y fueron resistentes a la quimioterapia. Los pacientes mostraron una respuesta antileucémica sorprendente después de iniciar el tratamiento y se volvieron EMR negativos en ausencia de cualquier signo de EICH. La acción inmunológica del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es independiente de la presentación del antígeno peptídico, y esta es la razón más probable por la que, a pesar del amplio aumento de células T derivadas del donante *in vivo*, no se indujo EICH. Dosis bajas del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 fueron suficientes para eliminar los blastocitos de LLA en los pacientes más allá de los niveles de detección de EMR. Por consiguiente, el modo de unión a células T de acción de este anticuerpo es muy diferente a los anticuerpos convencionales, que requieren dosis mucho más altas y que no pueden unirse a las células T por medio de su parte Fc de la molécula de anticuerpo debido a la falta de receptores de Fc en las células T. Por medio del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, células T efectoras sumamente eficaces se pueden volver citotóxicas con respecto a los blastocitos de LLA sin la inducción de una respuesta inmunitaria alorreactiva que da lugar a EICH. Los autores de la invención decidieron realizar un segundo TCMH alogénico de un donante haploidéntico en el paciente 1 después de que se volviera EMR negativo. A día de hoy (noviembre de 2009), este paciente aún es EMR negativo.

Desde la experiencia clínica inicial en estos dos pacientes con recidiva resistente a la quimioterapia de LLA postransplante, se ha concluido que el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede inducir remisiones completas sorprendentes sin EICH. Por lo tanto, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en la situación previa al trasplante para reducción inmunológica de la carga leucémica y para el tratamiento de recidivas postransplante ofrece nuevas oportunidades terapéuticas para pacientes pediátricos con LLA avanzada.

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

1. Como se demuestra en los siguientes ejemplos, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede utilizar para la terapia de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica que es resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico. El anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede reemplazar las terapias convencionales de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica (tales como quimioterapia) en pacientes pediátricos no elegibles para trasplante de células madre alogénico. También se puede utilizar para convertir pacientes de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia y elegibles para dicho trasplante en un estado de EMR negativo. Este aspecto de la invención es importante porque los pacientes EMR negativos tienen un menor riesgo de recidiva después del trasplante que los pacientes EMR positivos. En el mejor de los casos, la terapia de LLA pediátrica con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 hace que la quimioterapia y/o TCMH sean superfluos.

2. Los pacientes pediátricos con enfermedad morfológica o niveles de EMR persistentes de $>10^{-4}$ de blastocitos leucémicos se sabe que tienen un riesgo muy alto de recidiva y un resultado muy pobre (Bader *et al.*, J Clin Oncol. 27 (2009), p. 377-84). Los niños tratados con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 mostraron una respuesta antileucémica sorprendente después de iniciar el tratamiento y se volvieron EMR negativos durante el tratamiento, en ausencia de cualquier signo de EICH. Por lo tanto, los métodos farmacéuticos de la invención proporcionan un planteamiento terapéutico para el tratamiento, alivio o eliminación de EMR en LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico, reduciendo así o, incluso, suprimiendo el riesgo de una recidiva para el paciente. El potencial curativo de TCMH alogénico depende del nivel de EMR antes del trasplante. El tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede utilizar para convertir a los pacientes pediátricos de alto riesgo mencionados en un estado de EMR negativo. Por consiguiente, la EMR en LLA infantil resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico se pueden tratar por primera vez por medio del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3.

3. Los métodos farmacéuticos de la invención no solo muestran un efecto antileucémico potente, sino que son menos tóxicos y provocan menos efectos adversos que la terapia de LLA pediátrica convencional, que incluye quimioterapia y/o TCMH alogénico. Hasta el momento, no se han observado efectos secundarios a largo plazo después de tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. Por el contrario, las terapias de LLA pediátrica convencionales son muy agresivas y, por lo tanto, se asocian con riesgos para la salud considerables para los pacientes pediátricos. Además, los últimos efectos se han registrado después de terapia de LLA convencional en la infancia (véase, por ejemplo, Hudson MM, Late complications after leukemia therapy. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 750-773; Scholl, Höffken, Pössinger: Compendium Internistische Onkologie, S. 2660 ff.; 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg; <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/lateeffects/HealthProfessional>). De hecho, los tratamientos de LLA pediátrica convencionales utilizan regímenes de tratamiento incluso más agresivos que los planteamientos terapéuticos utilizados para LLA adulta. Sin embargo, como resulta evidente de la tasa de recidiva de aproximadamente un 25 % en LLA pediátrica, ni siquiera estas terapias agresivas son suficiente para curar finalmente a todos los pacientes. A la luz de esto, incluso es más sorprendente que el tratamiento de pacientes de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia y/o TCMH alogénico con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 sea capaz de convertir a dichos pacientes a un estado de EMR negativo que ofrece nuevas oportunidades terapéuticas para los pacientes de alto riesgo de este tipo. Este es un resultado que no se podría conseguir con terapia de LLA convencional, tal como quimioterapia y/o TCMH.

4. Por ejemplo, los pacientes pediátricos de LLA Ph+ (bcr/abl) tienen un riesgo muy alto de una recidiva entre todos los pacientes dentro de los subtipos de LLA (véase más adelante). Aunque el TCMH alogénico se considera actualmente el tratamiento de elección en LLA Ph+ pediátrica, aproximadamente una tercera parte de los pacientes trasplantados sufren recidiva. Además, como se expone más detalladamente a continuación, los infantes (<12 meses) con LLA tienen un riesgo mayor de fracaso en el tratamiento de LLA convencional o estándar, con el pronóstico más pobre para aquellos con reordenación de genes MLL (t(4;11)). Los resultados mostrados para el paciente 2 en los siguientes ejemplos y los datos obtenidos en el ensayo clínico en marcha mencionado anteriormente que trata pacientes de LLA adulta (no trasplantados) sugieren que incluso LLA Ph+ (bcr/abl) y LLA con reordenaciones de genes MLL resistentes a la quimioterapia o TCMH alogénico se pueden tratar con éxito con administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. Por lo tanto, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 ofrece un nuevo planteamiento terapéutico para LLA Ph+ pediátrica o LLA con translocaciones t(4;11) resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico, especialmente para los pacientes de LLA pediátrica con enfermedad mínima residual (EMR). Esto explica la enfermedad mínima residual (EMR) definida, por ejemplo, por medio de análisis de PCR o FACS.
5. Debido a su actividad citotóxica muy alta, solo bajas dosis del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 son suficiente para el tratamiento con éxito de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico, lo que permite la eliminación de las células leucémicas en la médula ósea.
6. La duración del tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es más corta en comparación con la terapia de LLA pediátrica convencional. La quimioterapia convencional de LLA pediátrica dura normalmente entre 2 a 3 años, mientras que se podría observar una respuesta muy rápida al anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en los pacientes pediátricos mostrados en los siguientes ejemplos. Además, la respuesta es de larga duración: El paciente 1 se ha mantenido EMR negativo más de 12 meses después del trasplante; véanse los siguientes ejemplos.
7. Los pacientes de LLA pediátrica con recidiva con frecuencia tienen una enfermedad resistente a la quimioterapia y estos pacientes son muy susceptibles a la toxicidad relacionada con quimioterapia. Para estos pacientes, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona por primera vez una estrategia no quimioterapéutica y menos tóxica para inducir remisiones en pacientes de este tipo.
8. Como se ha descubierto en el ensayo clínico aún en marcha descrito anteriormente en pacientes adultos de LLA, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 mencionado dio lugar a la eliminación de células leucémicas resistentes a la quimioterapia en pacientes adultos EMR positivos no trasplantados con LLA CD19+. Mientras que en estos pacientes las células T citotóxicas unidas derivaban de los pacientes, no existen datos hasta el momento sobre el uso del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 después de TCMH alogénico en una situación donde las células T unidas derivan de donantes. En la presente memoria, los autores de la invención informan por primera vez de la potente inducción de un efecto ICL en ausencia de EICH inducida por el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 que se une a las células T derivadas del donante en dos pacientes pediátricos con recidiva resistente a la quimioterapia de LLA CD19+ después de TCMH alogénico.
- En resumen, el tratamiento con anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona una terapia innovadora y mejorada para LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico.
- En una realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica o infantil resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico es LLA de linaje B pediátrica, preferiblemente, leucemia linfoblástica aguda LLA de precursores B pediátrica, más preferiblemente, LLA pro-B pediátrica, LLA pre-B o LLA común (LLAc). La LLA de precursores B pediátrica incluso más preferida es LLA común (LLAc).
- La gran mayoría de los casos de LLA pediátrica o infantil (>85 %) son del fenotipo de células B precursoras (Schultz *et al.*, Blood 109 (2007): 926-935). Ya que el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en la presente memoria se dirige contra el marcador asociado con células B CD19, dicho anticuerpo es particularmente adecuado como agente terapéutico para leucemia linfoblástica aguda de linaje B, más preferiblemente, para LLA de precursores B pediátrica. La LLA de precursores B pediátrica se puede subdividir además en LLA pro-B, LLA pre-B y LLA común (LLAc) pediátricas (véase, por ejemplo, Behm F.G., Immunophenotyping. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 150-209). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, que incluye leucemia linfoblástica aguda de precursores B pediátrica y otros tipos de LLA de linaje (celular) B pediátrica y los tratamientos de las mismas se revisan, por ejemplo, en Pui CH, Clin Adv Hematol Oncol. 4 (2006): 884-6; Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354 (2006): 166-178; Pui CH *et al.*, Lancet 371 (2008): 1030-1043; Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007): 149-165). Más información con respecto a LLA pediátrica se puede encontrar también, por ejemplo, en <http://www.cancer.gov> o <http://www.leukemia-lymphoma.org>
- Desde un punto de vista histórico, el Pediatric Oncology Group (POG) y el Children's Cancer Group (CCG) adoptaron un conjunto común de criterios de riesgo en una conferencia internacional apoyada por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (Smith M, *et al.*, J Clin Oncol 14 (1996), 18-24), en 1993. Los criterios del NCI se basaban en factores que tenían una aceptación y reproducibilidad internacionales: edad, recuento inicial de glóbulos blancos (RGB) y la presencia de enfermedad extramedular en el diagnóstico. Para mejorar aún más la

terapia, tanto el POG como el CCG han utilizado también factores de riesgo adicionales que han demostrado tener un impacto en los resultados de los pacientes (por ejemplo, ploidía, cariotipo de los blastocitos y respuesta morfológica temprana). En el 2000, el CCG y el POG se unieron para formar el Children's Oncology Group (COG). Esta fusión permitió el análisis de datos predictivos de respuesta clínica, biológica y temprana de la supervivencia libre de eventos (SLE) en leucemia linfoblástica aguda (LLA) para desarrollar un nuevo sistema de clasificación y algoritmo de tratamiento. A partir de 11779 niños (con edades entre 1 a 21,99 años) con LLA de precursores B recién diagnosticados inscritos consecutivamente por el CCG (entre diciembre de 1988 a agosto de 1995, n = 4986) y por el POG (entre enero de 1986 a noviembre de 1999 n = 6793), el estudio analizó retrospectivamente 6238 pacientes (CCG, 1182; POG, 5056) con datos citogenéticos informativos (Schultz *et al.*, Blood 109 (2007): 926-935). Se definieron cuatro grupos de riesgo como riesgo muy alto (RMA; 5 años de SLE, 45 % o menos), riesgo menor (5 años de SLE, al menos un 85 %) y riesgo estándar y alto (esos permanecieron en los grupos de riesgo respectivos del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos [NCI]). Los criterios de RMA incluyeron hipodiploidía (menos de 44 cromosomas), t(9;22) y/o BCR/ABL y fracaso de inducción. Los pacientes con riesgo menor fueron riesgo estándar el NCI tanto t(12;21) (TEL/AML1) como trisomías simultáneas de los cromosomas 4, 10 y 17. Incluso con diferencias de tratamiento, existió una alta concordancia entre los análisis del CCG y del POG. El esquema de clasificación de riesgo del COG se utiliza para dividir la LLA de precursores B en los grupos de riesgo menor (27 %), estándar (32 %), alto (37 %) y muy alto (4 %) basados en la edad, recuento de glóbulos blancos (RGB), citogenética, respuesta medular el día 14 y enfermedad mínima residual (EMR) de inducción final por citometría de flujo en ensayos del COG.

En la actualidad, la asignación de tratamiento basada en riesgo se utiliza para la leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil o pediátrica. Este planteamiento permite que los niños que tienen históricamente un buen resultado se traten con una terapia moderada y se les evita un tratamiento más intensivo y tóxico, mientras que permite que los niños con una probabilidad históricamente menor de supervivencia a largo plazo reciban una terapia más intensiva que puede aumentar su probabilidad de cura. Se ha descubierto que los niños mayores y adolescentes (≥ 10 años) e infantes (< 12 meses) tienen un resultado menos favorable que los niños con edades de entre 1 a 9 años en el diagnóstico, y, en términos generales, se emplean tratamientos más agresivos para estos pacientes (Nachman J, Br J Haematol 130 (2005): 166-73). El tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 proporciona en la actualidad una terapia mejorada menos tóxica para las poblaciones de pacientes pediátricos de este tipo, es decir, los niños mayores y adolescentes (≥ 10 años) e infantes (< 12 meses), que tienen un resultado menos favorable con terapia de LLA convencional, tal como quimioterapia y/o TCMH.

El tratamiento con éxito de niños con LLA requiere el control de la enfermedad sistémica (por ejemplo, médula, hígado y bazo, ganglios linfáticos) así como la prevención o tratamiento de la enfermedad extramedular, particularmente en el sistema nervioso central (SNC). Solo un 3 % de los pacientes tienen implicación del SNC detectable por medio de criterios convencionales en el diagnóstico (≥ 5 de RGB/microlitro con células linfoblásticas presentes). Sin embargo, a menos que se dirija una terapia específica hacia el SNC, entre un 50 % a un 70 % o más de los niños desarrollará con el tiempo leucemia sintomática en el SNC. Por lo tanto, en la actualidad, se recomienda que todos los niños con LLA deben recibir quimioterapia de combinación sistémica junto con alguna forma de profilaxis en el SNC. En la actualidad, la mayoría de los grupos tratan pacientes con leucemia en el SNC documentada en el diagnóstico (> 5 de RGB/ μ l con blastocitos; CNS3), y aquellos con fenotipo de células T y alto recuento RGB en el diagnóstico, con terapia intratecal y subsecuente radiación craneal. Por consiguiente, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 preferiblemente se lleva a cabo en combinación con profilaxis en el SNC, tal como terapia intratecal y/o radiación craneal.

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

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

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

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

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

Por consiguiente, en los métodos farmacéuticos de la invención, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico.

La LLA pediátrica puede ser resistente a la quimioterapia o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico o a la quimioterapia y trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico. LLA puede ser LLA recidivante resistente a la quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico. Sin embargo, también se encuentra dentro del ámbito de la invención que la LLA resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico es una LLA recién diagnosticada resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico. En esta situación, el tratamiento por medio del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede utilizar como una primera terapia (de primera línea), tanto solo como en combinación con TCMH.

La expresión "LLA pediátrica resistente", tal como se utiliza en la presente memoria, significa resistencia de la LLA pediátrica a la terapia de LLA pediátrica convencional o estándar, tal como quimioterapia y/o TCMH. En la actualidad, la tasa de recidiva en LLA pediátrica es aproximadamente un 25 %. Dicho de otro modo: La terapia de LLA pediátrica convencional o estándar no es capaz de curar finalmente todos los pacientes pediátricos.

La expresión "LLA pediátrica recidivante", tal como se utiliza en la presente memoria, indica el regreso de los signos y síntomas de la enfermedad LLA después de que un paciente pediátrico haya disfrutado de una remisión. Por ejemplo, después de tratamiento de LLA convencional que utiliza quimioterapia y/o TCMH, un paciente de LLA pediátrica puede entrar en remisión sin signos o síntomas de LLA, permanecer en remisión durante un par de años, pero después sufrir una recidiva y tener que ser tratado una vez más para LLA.

Los pacientes de LLA pediátrica con recidiva con frecuencia tienen enfermedad resistente a la quimioterapia. Estos pacientes son muy susceptibles a la toxicidad relacionada con la quimioterapia que se puede evitar por medio del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3.

La expresión "terapia estándar" o "terapia convencional", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a terapia de LLA pediátrica que utiliza quimioterapia y/o TCMH. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, que incluye leucemia linfoblástica aguda de precursores B pediátrica y otros tipos de LLA de linaje (celular) B y los tratamientos de las mismas se revisan, por ejemplo, en Pui CH, Clin Adv Hematol Oncol. 4 (2006): 884-6; Pui CH, Evans WE, N Engl J Med 354 (2006): 166-178; Pui CH *et al.*, Lancet 371 (2008): 1030-1043; Pui CH, Jeha S, Nat Rev Drug Discov 6 (2007): 149-165; Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486). Más información con respecto a LLA pediátrica se puede encontrar también, por ejemplo, en <http://www.cancer.gov> o <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

La expresión "anticuerpo monocatenario biespecífico" o "anticuerpo biespecífico monocatenario" o términos relacionados según la presente invención significan construcciones de anticuerpo resultantes de unir al menos dos regiones variables de anticuerpo en un única cadena polipeptídica desprovista de la(s) porción (porciones) constante(s) y/o Fc presentes en las inmunoglobulinas completas. El anticuerpo monocatenario biespecífico, tal como se denomina en la presente memoria, es funcional, es decir, citotóxicamente activo, como monómero y, por lo tanto, claramente distinguible de diacuerpos o tandabs descritos en la técnica que son funcionales solo como

dímeros o multímeros. Un "enlazador", tal como se utiliza en la presente memoria, conecta dominios V de la misma especificidad, mientras que un "espaciador", tal como se utiliza en la presente memoria, 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 capaz de unirse específicamente a un antígeno separado, y conectadas entre sí a través de un espaciador polipeptídico corto (normalmente, menos de 10 aminoácidos), de modo que las dos regiones variables de anticuerpo con un espaciador interpuesto existen como una única cadena polipeptídica contigua. Otro ejemplo de un anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una cadena polipeptídica única con tres regiones variables de anticuerpo. En la presente memoria, dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, una VH y una VL, pueden hacer un scFv, en donde dos regiones variables de anticuerpo se conectan entre sí a través de un enlazador polipeptídico sintético, el último, con frecuencia, se diseña genéticamente para ser mínimamente inmunogénico, mientras que permanece máximamente resistente a proteólisis. Este scFv es capaz de unirse específicamente a un antígeno particular, y se conecta a una región variable de anticuerpo más, por ejemplo, una región VH, capaz de unirse a un antígeno diferente que el que se une al scFv. Todavía otro ejemplo de un anticuerpo monocatenario biespecífico puede ser una cadena polipeptídica única con cuatro regiones variables de anticuerpo. En la presente memoria, las dos primeras regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, una región VH y una región VL, puede formar un scFv capaz de unirse a un antígeno, mientras que la segunda región VH y región VL pueden formar un segundo scFv capaz de unirse a otro antígeno. En una única cadena polipeptídica contigua, las regiones variables de anticuerpo individuales de una especificidad se pueden separar de manera ventajosa por un enlazador polipeptídico sintético como se ha descrito anteriormente, mientras que los respectivos scFv se pueden separar de manera ventajosa por un espaciador polipeptídico corto como se ha descrito anteriormente. Se muestran ejemplos no limitativos de anticuerpos monocatenarios biespecíficos, así como métodos para producirlos en las publicaciones internacionales WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354, los documentos Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-70; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-5; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-7; Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-103; Brühl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "CD3" indica un antígeno que se expresa en células T, preferiblemente, células T humanas como parte del complejo del receptor de células T multimolecular, el CD3 consiste en cinco cadenas diferentes: CD3-épsilon, CD3-gamma, CD3-delta, CD3-eta y CD3 zeta. El agrupamiento de CD3 en células T, por ejemplo, por anticuerpos anti-CD3 da lugar a una activación de células T similar a la unión de un antígeno, pero independiente de la especificidad clonal del subconjunto de células T. Por lo tanto, "anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una construcción específica de CD3 capaz de unirse al complejo CD3 humano expresado en células T humanas y capaz de inducir la eliminación/lisis de células diana, en donde las células diana de este tipo tienen/muestran un antígeno que se une a la otra porción que no se une a CD3 del anticuerpo monocatenario biespecífico. La unión del complejo CD3 por enlazadores específicos de CD3 (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario biespecífico como se administra según los métodos farmacéuticos de la invención) da lugar a la activación de células T como se conoce en la técnica; véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales WO 99/54440 o WO 2007/068354. Por consiguiente, una construcción apropiada para los métodos farmacéuticos de la invención es capaz de manera ventajosa de eliminar/lisar células *in vivo* y/o *in vitro*. Las células diana correspondientes comprenden células que expresan un antígeno tumoral, tal como CD19, que es reconocido por la segunda especificidad (es decir, la porción que no se une a CD3 del anticuerpo monocatenario biespecífico) de la construcción mencionada. Preferiblemente, dicha segunda especificidad es para CD19 humano que ya se ha descrito en las publicaciones internacionales WO 99/54440, WO 2004/106381 o WO 2007/068354. Según esta realización, cada porción 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 desde el extremo N al extremo C:

$V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})$.

Dentro del significado de la invención, la expresión "se une específicamente" o términos relacionados tales como "especificidad" se debe(n) entender como que se caracteriza(n) principalmente por dos parámetros: un parámetro cualitativo (el epítipo de unión, o dónde se une un anticuerpo) y un parámetro cuantitativo (la afinidad de unión, o cómo de fuerte se une este anticuerpo donde lo hace). Se puede determinar de manera ventajosa qué epítipo se une un anticuerpo, por ejemplo, por medio de metodología FACS, ELISA, mapeo de epítopos por mancha de péptidos, o espectroscopía de masas. La fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítipo particular se puede determinar de manera ventajosa, por ejemplo, por medio de metodologías conocidas de Biacore y/o ELISA. Una combinación de técnicas de este tipo permite el cálculo de una relación señal:ruido como una medida representativa de la especificidad de unión. En una relación señal:ruido de este tipo, la señal representa la fuerza de la unión del anticuerpo al epítipo de interés, mientras que el ruido representa la fuerza de la unión del anticuerpo a otros epítopos no emparentados que difieren del epítipo de interés. Una relación señal:ruido de, por ejemplo, al menos 50, pero, preferiblemente, aproximadamente 80 para un epítipo de interés respectivo como se determina, por ejemplo, por medio de Biacore, ELISA o FACS se puede tomar como una indicación de que el anticuerpo evaluado se une al epítipo de interés de una manera específica, es decir, es un "enlazador específico". La expresión "unión a/interacción con" también se puede referir a un epítipo conformacional, un epítipo estructural o un epítipo discontinuo que consiste en dos o incluso más regiones de las moléculas diana humanas o partes de las mismas. Un epítipo conformacional se define por dos o más secuencias de aminoácidos discretas separadas en la secuencia

primaria que se juntan en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega a la proteína natural (Sela, (1969) Science 166, 1365 and Laver, (1990) Cell 61, 553-6). La expresión "epítopo discontinuo" significa epítopos no lineales que se ensamblan a partir de residuos de porciones distantes de la cadena polipeptídica. Estos residuos se unen en la superficie de la molécula cuando la cadena polipeptídica se pliega en una estructura tridimensional para constituir un epítopo conformacional/estructural.

El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente memoria, significa en el sentido más amplio procedimientos o aplicaciones médicas que se pretende que alivien la enfermedad. En el presente caso, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (preparado para la administración a un paciente de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico), tal como se describe en la presente memoria, es para el tratamiento, alivio o eliminación de la enfermedad LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico.

El término "alivio", tal como se utiliza en la presente memoria, es sinónimo de mejora. Si el estado de un paciente de LLA pediátrica muestra alivio, el paciente está claramente mejor —hay alguna mejora en su estado clínico. Por ejemplo, puede ser una mejora en el estado del paciente de LLA pediátrica, si se puede alcanzar una estabilización de la enfermedad LLA pediátrica, es decir, la enfermedad LLA ya no es progresiva. Esta fase de enfermedad también se denomina enfermedad estable. El alivio también puede ser una mejora del estado de EMR del paciente de LLA pediátrica. Por ejemplo, antes del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, pueden ser detectables 100 células de leucemia por 10^4 células de médula ósea en el paciente de LLA pediátrica. Debido al tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, el número de células de leucemia se puede reducir a 10 células de leucemia o incluso menos células de leucemia (por ejemplo, menos de una célula de leucemia) por 10^4 células de médula ósea en este caso de ejemplo.

El término "eliminación", tal como se utiliza en la presente memoria, significa la retirada de células leucémicas del cuerpo de un paciente de LLA pediátrica. Como se muestra en el siguiente ejemplo, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es capaz de convertir leucemia linfoblástica aguda (LLA) EMR positiva a un estado de EMR negativo, es decir, un estado en el que EMR no es detectable ($<10^{-4}$; es decir, menos de 1 célula de leucemia por 10^4 células de médula detectable). En este caso, se logra una remisión molecular completa.

El término "administración", tal como se utiliza en la presente memoria, significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 mencionado anteriormente (preferiblemente el mostrado en el SEQ ID NO. 1) a un individuo, es decir, un paciente pediátrico humano. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una dosis que produce los efectos para los que se administra, es decir, suficiente para destruir células de leucemia linfoblástica aguda. Preferiblemente, la dosis administrada del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 produce la eliminación de todas las células de leucemia linfoblástica aguda del cuerpo del paciente pediátrico, lo que da lugar a un estado de LLA EMR negativo, tal como se define en la presente memoria. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento y será comprobable por el experto en la técnica utilizando técnicas conocidas. El médico especialista y los factores clínicos determinarán el régimen de dosificación. Como se conoce en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente pediátrico dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente pediátrico, área de superficie corporal, edad, peso corporal, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, estado de salud general, y otros fármacos que se administran al mismo tiempo.

Una dosis típica se puede encontrar, por ejemplo, en los intervalos expuestos en las realizaciones de los métodos de la invención y en los ejemplos anejos; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo de ejemplo, especialmente que consideran los factores mencionados anteriormente.

La expresión "infusión continua" se refiere a una infusión que se permite que proceda permanentemente durante un periodo de tiempo, es decir, sin interrupción. "Infusión continua" se refiere a una infusión administrada permanentemente. Por consiguiente, en el contexto de la invención, los términos "permanente" y "continuo" se utilizan como sinónimos. Dentro del significado de la invención, por ejemplo, la expresión "administrado por infusión continua durante (al menos) 4 semanas" o similares indica(n) una situación en la que el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 utilizado en los métodos farmacéuticos según la invención se administra continuamente al cuerpo de un paciente pediátrico durante un periodo de (al menos) 4 semanas de una manera mantenida, constante a lo largo de la duración entera requerida en los métodos farmacéuticos de la invención. Los esquemas de administración continua del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se describen más detalladamente en la publicación internacional WO 2007/068354. Se evita una interrupción de la introducción del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, es decir, una transición desde un estado en el que este anticuerpo se administra al cuerpo del paciente pediátrico a un estado en el que este anticuerpo ya no se administra al cuerpo del paciente pediátrico no se produce, o no ocurre significativamente, durante la duración entera de la administración requerida por los métodos farmacéuticos de la invención por otras razones que rellenar el suministro de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 que se administra o intervenciones médicas que se vuelven necesarias y similares. En cuanto a que un reaprovisionamiento necesario de este tipo da lugar a una interrupción temporal de la introducción del anticuerpo administrado, una administración de este tipo se debe entender aún como que es "ininterrumpida" o "permanente" en el sentido de los métodos farmacéuticos según la invención. En la mayoría de los casos, un reaprovisionamiento de este tipo, generalmente, es de una duración tan corta que el tiempo durante el que

el anticuerpo no se introduce en el cuerpo del paciente pediátrico será muy reducido cuando se compara con el tiempo planeado para el régimen de administración global según los métodos farmacéuticos según la invención. Según la invención, un ciclo de tratamiento se puede entender como la infusión continua del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico durante un periodo de (al menos) 4 semanas, seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. La expresión "al menos", tal como se utiliza en la presente memoria, significa que la infusión continua se puede llevar a cabo también durante un periodo de tiempo superior a 4 semanas, por ejemplo, 5, 6, 7 u 8 semanas o incluso más largo, seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. Puede ser el caso que tras determinar la fase de EMR del (de los) paciente(s) pediátrico(s) tratado(s) después de una administración (o un ciclo de tratamiento) continua de (al menos) 4 semanas, se podría alcanzar una respuesta mínima o parcial pero no negatividad para EMR. En circunstancias de este tipo, la administración continua se puede prolongar durante uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso hasta diez ciclos de tratamiento adicionales para lograr un resultado terapéutico mejor, por ejemplo, una respuesta hematológica completa, o incluso molecular completa. Preferiblemente, dicha respuesta molecular completa es negatividad para EMR (como se define más adelante en la presente memoria) que disminuye el riesgo de reaparición de la enfermedad LLA. Por ejemplo, se ha descubierto que la negatividad para EMR o bajos niveles de EMR en pacientes de LLA pediátrica antes de TCMH alogénico reduce el riesgo de una recidiva (Bader P, *et al.*, J Clin Oncol 27 (2009): 377-384). Como se muestra en los siguientes ejemplos, la negatividad para EMR se puede alcanzar por medio de tratamiento de los pacientes de LLA pediátrica con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3.

Por lo tanto, en una realización de los métodos farmacéuticos de la invención, el uno o más ciclos de tratamiento, en los que se administra continuamente el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico, va seguido de TCMH alogénico. Dicho de otro modo: En esta realización preferida, el método de la invención es anterior al trasplante de células madre (TCMH) alogénico para convertir la LLA resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico a un estado de EMR negativo. De esta manera, el riesgo de una recidiva disminuye significativamente.

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

El procedimiento de trasplante puede ir seguido por uno o más ciclos de tratamiento posteriores con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. Esta realización es importante en casos de LLA pediátrica recidivante resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico, donde los pacientes han recibido quimioterapia y TCMH. Debido al fracaso de estas terapias convencionales, en la actualidad, la enfermedad puede recaer y curarse por la administración de dicho anticuerpo. Además, el tratamiento por medio del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede utilizar como terapia de consolidación después de TCMH para evitar otra recidiva de la enfermedad LLA resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico.

Los siguientes ejemplos proporcionan también datos sobre el uso del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 después de TCMH alogénico donde las células T unidas derivan del donante. Se podría observar una inducción potente de un efecto de injerto contra leucemia (ICL) en ausencia de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) inducido por el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en dos pacientes con recidiva resistente a la quimioterapia de LLA CD19+ después de TCMH hematopoyético alogénico. Por lo tanto, en otra realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, el paciente de LLA pediátrica se puede tratar con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 después de haber recibido TCMH alogénico. En el mejor de los casos, se prevé que el tratamiento de pacientes de LLA pediátrica con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 sea capaz de sustituir la terapia de LLA pediátrica convencional, tal como quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico.

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

Continuar la administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 de la manera de los métodos farmacéuticos según la invención durante periodos de tiempo más largos permite la activación de células T ventajosa mencionada en los ejemplos para ejercer su efecto durante lo suficiente para aclarar ventajosamente todas las células de leucemia linfoblástica aguda del cuerpo. Ya que la tasa de anticuerpo

monocatenario biespecífico administrado ininterrumpidamente se mantiene baja, la aplicación del agente terapéutico se puede continuar más tiempo sin riesgo de efectos secundarios perjudiciales para el paciente.

5 El anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, tal como se utiliza en la presente memoria, se va a preparar de manera ventajosa en forma de una composición farmacéutica para la administración a un paciente pediátrico humano diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Dicha LLA es una LLA resistente a la quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico o una LLA recidivante resistente a la quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico.

10 En una realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico es leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linaje B pediátrica, preferiblemente, leucemia linfoblástica aguda de precursores B pediátrica. La gran mayoría de los casos de LLA pediátrica (>85 %) son de fenotipo de células precursoras B. Se han propuesto varias clasificaciones de LLA de linaje B (véase, por ejemplo, Schultz *et al.*, Blood 109 (2007): 926-935). Para modular la intensidad de la terapia relativa a un riesgo de recidiva del paciente, los pacientes de LLA de precursores B se estratifican actualmente en grupos de riesgo "bajo", "estándar", "alto" o "muy alto" utilizando los parámetros de laboratorio y clínicos: edad del paciente, sexo, recuento de glóbulos blancos (RGB) en la presentación de la enfermedad y la presencia o ausencia de anomalías citogenéticas específicas. Las anomalías citogenéticas recurrentes frecuentemente que ayudan a definir estos grupos de riesgo incluyen, por ejemplo, t(12;21)[TEL-AML1]; t(1;19)[E2A-PBX]; t(4;11)[AF4-MLL]; t(9;22)[BCR-ABL]; hiperdiploidía (o trisomía de los cromosomas 4, 10 y 17) e hipodiploidía; véase, por ejemplo, Schultz *et al.*; Bader *et al.*, loc. cit. Utilizando los datos de varios estudios, se ha desarrollado e implementado un sistema de clasificación como COG AALLO3B1 (Clasificación de Leucemia Linfoblástica Aguda) (Raetz *et al.*, Personalized Med. 2 (2005), 349-361; Schultz *et al.*, Blood 109 (2007): 926-935). Ya que el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en la presente memoria se dirige contra el marcador asociado a células B CD19, dicho anticuerpo es particularmente adecuado como agente terapéutico para leucemia linfoblástica aguda de linaje B, preferiblemente, para LLA de precursores B pediátrica. La LLA de precursores B pediátrica se puede subdividir además en LLA pro-B pediátrica, LLA pre-B pediátrica y LLA común (LLAc). Como se muestra en los siguientes ejemplos, el tratamiento según los métodos de la invención del paciente 1 de siete años de edad con LLA común que es resistente contra cualquier tratamiento y, por lo tanto, propensa a ser letal, dio lugar no solo a la remisión hematológica completa, sino a remisión molecular completa. Dicho de otro modo: ya no se pudo detectar enfermedad mínima residual en este paciente después del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3. Particularmente preferido, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico es LLA de precursores B, más preferiblemente, LLaC. De forma importante, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es capaz de destruir no solo las células de LLA que tienen reordenamientos de TCR o inmunoglobulinas, sino también células de LLA con otras diversas anomalías citogenéticas: Por ejemplo, se ha descubierto en el paciente 2 descrito en los siguientes ejemplos, así como en pacientes de LLA adulta, que dicho anticuerpo es capaz de tratar LLA caracterizada por reordenaciones de inmunoglobulinas o TCR, translocaciones t(4;11) o transcritos de fusión bcr/abl (Ph+). En particular, se ha documentado que LLA Ph+ y LLA con translocaciones t(4;11) son extremadamente difíciles de tratar por medio de terapia de LLA convencional, pero se podrían tratar con éxito por medio del anticuerpo de monocatenario biespecífico CD19xCD3. Los datos mencionados indican que el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es capaz de tratar varias formas de LLA que incluyen, por ejemplo, LLA caracterizada por t(12;21)[TEL-AML1]; t(1;19)[E2A-PBX]; t(4;11)[AF4-MLL]; t(9;22)[BCR-ABL]; hiperdiploidía (o trisomía de los cromosomas 4, 10 y 17) e hipodiploidía así como reordenaciones de inmunoglobulinas o TCR, véase también la Tabla 1.

45 El diagnóstico de LLA pediátrica se basa en características morfológicas, citoquímicas e inmunológicas de las células, que incluye morfología de linfoblastos en frotis de médula ósea teñidos con Wright-Giemsa, tinción positiva para desoxinucleasa transferasa terminal (TdT), tinción negativa para mieloperoxidasa y expresión en la superficie celular de 2 o más antígenos de diferenciación linfoide de precursores de células B. El inmunofenotipado se describe, por ejemplo, por Behm F.G. (Immunophenotyping. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 150-209), y se puede realizar, por ejemplo, por inmunofluorescencia indirecta, inmunohistoquímica y/o citometría de flujo.

50 El término "paciente", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un paciente humano. La expresión "LLA pediátrica" o "paciente de LLA pediátrica", tal como se denomina en la presente memoria, indica niños con edades desde entre un mes hasta 18 años. La edad indicada se debe entender como la edad de los niños en el diagnóstico de la enfermedad LLA. Los niños se pueden subagrupar más específicamente en infantes (entre 1 a 12 meses de edad), niños más pequeños con edades de entre 1 a 9 años, y niños mayores y adolescentes (de entre 10 a 18 años de edad). Tal como se utiliza en la presente memoria, un intervalo de tiempo que se define como "X a Y" equivale al intervalo de tiempo que se define como "entre X e Y". Ambos intervalos de tiempo incluyen específicamente el límite superior y también el límite inferior. Esto significa que, por ejemplo, un intervalo de tiempo "de entre un mes a 18 años" incluye "un mes" y "18 años". Preferiblemente, el paciente que se va a tratar según la presente invención tiene como mucho 18 años de edad (que incluye los pacientes con 18 años de edad).

60 Como se muestra en los siguientes ejemplos, el paciente 1 tenía una edad de siete años cuando se trató con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, con LLA diagnosticada a los dos años de edad. El paciente 1

tenía una edad de quince años cuando se trató con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, con LLA diagnosticada en 2001.

Las definiciones anteriores se aplican *mutatis mutandis* a la expresión "leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica", "LLA infantil" o similares. Por ejemplo, LLA pediátrica o infantil se debe entender como LLA diagnosticada en un paciente pediátrico con edades de entre 1 mes (que incluye 1 mes) y 18 años (que incluye 18 años).

Mientras que el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, tal como se utiliza en la presente memoria, se puede administrar *per se*, la administración en un vehículo farmacéuticamente aceptable es preferida. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica e incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, liposomas, varios tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Se pueden formular composiciones que comprenden vehículos de este tipo por medio de métodos convencionales conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al paciente pediátrico a una dosis adecuada. El régimen de dosificación lo determinará el médico especialista y los factores clínicos. Como se conoce en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente pediátrico dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, peso corporal, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos que se administran al mismo tiempo. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones acuosas o no acuosas estériles o suspensiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son proplilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones o suspensiones acuosas, que incluyen disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio o lactato de Ringer. Los vehículos intravenosos incluyen reaprovisionamientos de líquido y nutrientes, reaprovisionamiento de electrolitos (tales como los basados en 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 proteináceos, como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición pudiera comprender, además del anticuerpo monocatenario biespecífico proteináceo, agentes activos biológicamente adicionales, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Los agentes de este tipo podrían ser agentes que actúan como citostáticos, agentes que previenen la hiperuricemia, agentes que inhiben las reacciones inmunitarias (por ejemplo, corticoesteroides, FK506), fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como moléculas coestimuladoras de células T o citocinas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede llevar a cabo en combinación con quimioterapia intratecal como profilaxis en el SNC, corticoides y/o alopurinol.

Preferiblemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, tal como se define en la presente memoria, se formula en un tampón, un estabilizante y un tensioactivo. El tampón puede ser un tampón fosfato, citrato, succinato o acetato. El estabilizante puede ser (un) aminoácido(s) y/o un azúcar. Los tensioactivos pueden ser detergentes, PEG o similares. Más preferiblemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, tal como se define en la presente memoria, se formula en citrato, lisina, trehalosa y Tween 80. Como diluyente para la composición farmacéutica de la invención, se prefiere disolución salina isotónica y Tween 80.

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

El éxito de la terapia con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede controlar por medio de métodos estándar establecidos para las respectivas entidades de enfermedad:

Para terapia de LLA de células B, se pueden utilizar clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), aspiración de médula ósea y varios parámetros químicos clínicos específicos de leucemia y otros métodos estándar establecidos conocidos en la técnica. Los métodos y medios para la determinación del estado de enfermedad mínima residual (ERM) se describen en la presente memoria.

La actividad citotóxica del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede detectar por medio de métodos conocidos en la técnica como se ilustra, por ejemplo, en las publicaciones internacionales WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354.

En una realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la LLA de precursores B resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico del (de los) paciente(s) pediátrico(s) es recidivante. Con el tratamiento actual de LLA infantil, las tasas de supervivencia sin sucesos son aproximadamente un 75 %. Por lo tanto, un 25 % de los pacientes recaen a pesar del tratamiento tóxico y con riesgo para la salud. Los problemas en la gestión de la recidiva de LLA son la resistencia de las células leucémicas y la tolerancia reducida de los pacientes pediátricos a una segunda ronda de tratamiento después de haber recibido ya una terapia de primera línea intensiva, lo que da lugar a una tasa de remisión inferior al igual que a una incidencia mayor de una recidiva subsecuente y a un resultado general inferior. La poli-quimioterapia intensificada es, por tanto, esencial para la inducción de una segunda remisión completa (Henze G, von Stackelberg A, Relapsed acute lymphoblastic leukemia. En: Childhood Leukemias, C-H Pui ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 473-486). La expresión "resistente a la quimioterapia y/o

trasplante de células madre alogénico", tal como se utiliza en la presente memoria, significa que los pacientes de LLA pediátrica son resistentes a estas terapias y, por lo tanto, recayeron después del tratamiento de LLA convencional. También se prevé que los pacientes pediátricos que recaen después del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 reciban uno o más ciclos de tratamiento con dicho anticuerpo adicionales para volver a los niños tratados EMR negativos. Dichos pacientes pueden, por ejemplo, recibir a continuación un segundo TCMH alogénico.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, los métodos farmacéuticos de la invención son particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes pediátricos positivos resistentes a las terapias de LLA convencionales. Aunque los pacientes pediátricos mostrados han sido pretratados fuertemente tanto con quimioterapia como con trasplante de células madre alogénico, los pacientes recayeron varias veces. Por lo tanto, los pacientes tenían un pronóstico extremadamente pobre. Sin embargo, después del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, los pacientes eran EMR negativos, es decir, mostraron una remisión molecular completa. Dicho de otro modo: El tratamiento eliminó las células de leucemia linfoblástica aguda del cuerpo de los pacientes pediátricos por debajo del límite de detección. Lo más importante, la médula ósea de los pacientes pediátricos se ha aclarado de células leucémicas.

En una realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) del (de los) paciente(s) pediátrico(s) es resistente a la quimioterapia y/o TCMH alogénico con respecto a EMR. Dicho de otro modo: la EMR en los pacientes de LLA pediátrica es resistente a la quimioterapia y/o TCMH alogénico. Se prevé que los métodos farmacéuticos de la invención sean adecuados también para el tratamiento de LLA pediátrica recién diagnosticada resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico en que proporciona una alternativa a los regímenes de tratamiento de LLA pediátrica convencionales, tales como quimioterapia y/o TCMH alogénico.

En otra realización preferida, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico recae a los tres años del diagnóstico, preferiblemente, a los dos años del diagnóstico, incluso más preferiblemente, al año del diagnóstico. Preferiblemente, dicha recidiva es una recidiva de médula ósea.

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

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

hacer que los pacientes de LLA pediátrica resistentes a la quimioterapia o TCMH alogénico sean EMR negativos, es particularmente útil para el tratamiento de pacientes de LLA resistentes a la quimioterapia y/o TCMH alogénico. A la luz de esto, la expresión "resistente a la quimioterapia y/o TCMH alogénico", tal como se utiliza en la presente memoria, indica resistencia de las células de leucemia linfoblástica aguda a la quimioterapia y/o TCMH alogénico.

5 La expresión "trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico", tal como se utiliza en la presente memoria, significa trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico o trasplante de médula ósea que es un procedimiento médico en el campo de la hematología y oncología que implica trasplante de células madre hematopoyéticas (CMH). Se realiza con más frecuencia para pacientes con enfermedades de la sangre o médula ósea, o ciertos tipos de cáncer, tales como LLA. La mayoría de los receptores de TCMH son pacientes de leucemia
10 (por ejemplo, LLA) que se beneficiarían del tratamiento con altas dosis de quimioterapia o irradiación total del cuerpo. El TCMH alogénico en niños con LLA se describe, por ejemplo, en Schrauder A, *et al.* (Bone Marrow Transplantation 41 (2008): Suppl2 S71-74). Sin embargo, el trasplante de células madre alogénico permanece siendo un procedimiento arriesgado, en particular para pacientes pediátricos.

15 La expresión "elegible para trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico", tal como se utiliza en la presente memoria, significa que el trasplante de células madre alogénico es la terapia requerida para el paciente de LLA pediátrica. En casos donde el paciente de LLA pediátrica es elegible para trasplante de células madre alogénico, se pueden prever los siguientes dos escenarios. En primer lugar, en los medios y métodos farmacéuticos descritos en el contexto de la invención, la administración del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (solo o preferiblemente como una composición farmacéutica) se puede utilizar para reemplazar el trasplante de
20 células madre alogénico utilizado como terapia convencional para pacientes de LLA pediátrica elegibles para trasplante. De modo que el método de la invención puede evitar los riesgos de salud para los pacientes de LLA pediátrica asociados a TCMH alogénico. Además, aproximadamente un 30 % de los pacientes de LLA pediátrica trasplantados normalmente recaen después del trasplante. De modo que el método de la invención se puede utilizar para tratar a estos pacientes resistentes a la quimioterapia o TCMH alogénico. En una realización alternativa, la infusión continua del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 al paciente de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico puede ir seguido por un trasplante de células madre alogénico. En esta realización, la administración de una composición farmacéutica que comprende la construcción del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede utilizar para convertir pacientes de LLA pediátrica resistentes a la quimioterapia o
25 TCMH alogénico, pero elegibles para trasplante, a un estado de EMR negativo antes de que reciban el trasplante. De esta manera, el método de la invención se puede utilizar para eliminar la EMR, que da lugar a un menor riesgo de recidiva que el tratamiento de trasplante de pacientes EMR positivos. Los siguientes ejemplos presentan un paciente pediátrico (paciente 1) que se ha convertido primero a un estado de EMR negativo tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3, seguido por un trasplante alogénico. A día de hoy (noviembre de 2009), este paciente pediátrico es todavía EMR negativo.

35 La expresión "no elegible para trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico", tal como se utiliza en la presente memoria, significa aquellos pacientes pediátricos para los que el trasplante de células madre alogénico no es el tratamiento de LLA de elección, por ejemplo, debido a razones médicas. También podría pasar que no esté disponible un donante adecuado para el trasplante de células madre alogénico.

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

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

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

Se encuentra dentro el ámbito de los métodos farmacéuticos de la invención, que la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se administre a pacientes de LLA resistentes a la quimioterapia o TCMH alogénico que han recibido quimioterapia, sola o en combinación con trasplante de células madre alogénico y que hayan recaído después del mismo.

55 En otra realización preferida, el método de la invención es para el tratamiento, alivio o eliminación de la enfermedad mínima residual (EMR) en un paciente pediátrico con leucemia linfoblástica aguda (LLA) resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico.

La expresión "enfermedad mínima residual (EMR)" tal como se define en la presente memoria, indica un término utilizado después del tratamiento, por ejemplo, con agentes quimioterapéuticos cuando las células leucémicas no se pueden encontrar en la médula ósea utilizando pruebas estándar, tales como métodos microscópicos. Más bien, se tienen que utilizar pruebas más sensibles tales como citometría de flujo (métodos basados en FACS) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para encontrar evidencia de que las células de leucemia permanecen en la médula ósea del paciente de LLA pediátrica. Más específicamente, la presencia de células de leucemia por debajo del límite de detección citológica (5 % de células de leucemia) se define como enfermedad mínima residual (EMR). Si la EMR no es detectable ($<10^{-4}$, es decir, menos de 1 célula de leucemia por 10^4 células de médula ósea detectable), se consigue una remisión molecular completa (negatividad para EMR o estado EMR negativo). Un "estado EMR positivo", tal como se define en la presente memoria, significa una señal medida por medio de PCR o FACS por encima del límite de detección o un umbral cuantitativo. Un "estado EMR negativo", tal como se define en la presente memoria, significa por debajo del límite de detección y/o por debajo de un umbral cualitativo medido por medio de PCR o FACS. El valor pronóstico de la cuantificación de la enfermedad mínima residual en LLA infantil se ha descrito, por ejemplo, en Bader *et al.* (J. Clin. Oncol. 27 (2009): 377-384) o Eckert *et al.* (Lancet 358 (2001): 1239-41). El estado de EMR se puede medir por medio de análisis de PCR o FACS en que las anomalías citogenéticas individuales mencionadas en la presente memoria y/o reordenaciones de genes de inmunoglobulinas o reordenaciones del receptor de células T (TCR) se detectan cuantitativamente. Por ejemplo, el análisis de PCR puede detectar fusión de transcritos tal como bcr/abl o translocaciones t(4;11) así como reordenaciones clonales individuales de genes de inmunoglobulinas (IgH) y/o receptor de células T (TCR).

Como se demuestra en los siguientes ejemplos, tras el tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en la presente memoria, todas las células de leucemia linfoblástica aguda se podrían eliminar del cuerpo de los pacientes de LLA pediátrica, de modo que se podría lograr una remisión molecular completa (es decir, estado de EMR negativo).

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

Tabla 1:

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

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

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

(i) Una translocación entre los cromosomas 9 y 22, el cromosoma Filadelfia (Ph+), se produce en aproximadamente un 20 % de los adultos y un 5 % en casos pediátricos de LLA.

(ii) Una translocación entre los cromosomas 4 y 11 se produce en aproximadamente un 4 % de los casos y es más común en infantes menores de 12 meses.

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

En otra realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicho paciente de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico es EMR positivo en remisión hematológica completa.

La expresión "remisión" o "remisión hematológica completa", tal como se utiliza en la presente memoria, se debe entender como que no tiene evidencia de enfermedad LLA después del tratamiento estándar, por ejemplo, después de quimioterapia y/o trasplante. Esto significa que la médula ósea contiene menos de un 5 % de blastocitos determinado por medio de microscopía óptica y no hay signos o síntomas de enfermedad LLA, el recuento de células sanguíneas está dentro de los límites normales. No obstante, puede suceder que no todas las células de leucemia se podrían eliminar del cuerpo. Un paciente de este tipo, aunque clasificado como que está en remisión o remisión hematológica completa, es aún EMR positivo. Estas células tumorales restantes pueden dar lugar a leucemia recurrente. Los métodos farmacéuticos de la invención se pueden utilizar para destruir estas células tumorales restantes para evitar la recaída de la leucemia que se origina a partir de las células de leucemia ocultas que permanecen en el cuerpo después de la terapia primaria. De esta manera, los métodos farmacéuticos ayudan a evitar la recidiva de la enfermedad en pacientes de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico.

Por el contrario, una "remisión completa molecular" significa que no hay evidencia de células de leucemia en biopsias de la médula ósea, incluso cuando se utilizan pruebas muy sensibles tales como análisis de PCR o FACS. Dicho de otro modo: Si la EMR no es detectable ($<10^{-4}$, es decir, menos de una célula de leucemia por 10^4 células de médula ósea), se logra una remisión molecular completa.

En otra realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la administración de dicha composición farmacéutica convierte la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica EMR positiva resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico a un estado EMR negativo.

En otra realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la EMR se mide con detección cuantitativa de al menos una de las anomalías citogenéticas o reordenaciones seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

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

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

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

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

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

hipodiploidía (es decir, menos de 44 cromosomas);

reordenaciones de genes de inmunoglobulina; y

reordenaciones del receptor de las células T (TCR).

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

El método de la invención proporciona un planteamiento terapéutico para el tratamiento, alivio o eliminación de la EMR, al reducir o incluso eliminar de esta manera el riesgo de recidiva para el paciente de LLA pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico. Particularmente, el tratamiento curativo de EMR en pacientes de LLA pediátrica no había estado todavía disponible hasta ahora.

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

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

Por ejemplo, la expresión "por encima de la señal de bcr/abl por encima del límite de detección", tal como se utiliza en la presente memoria, significa que el análisis de PCR o FACS da lugar a una señal de bcr/abl detectable. De manera similar, una señal de translocación t(4;11) significa que dicha translocación se puede detectar por PCR o

FACS. Esta se aplica, *mutatis mutandis* a las otras anomalías citogenéticas o reordenaciones mencionadas en la presente memoria. La expresión "con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$ " en contexto con las reordenaciones significa que al menos se puede detectar una célula de leucemia o más de una célula de leucemia (con la reorganización de TCR o inmunoglobulina mencionada) por 10^4 células de médula ósea por medio de los métodos mencionados.

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

La expresión "recidiva molecular", tal como se utiliza en la presente memoria, significa que dicho paciente pediátrico muestra una señal para una anomalía citogenética por encima del límite de detección y/o al menos un marcador por reorganización con una sensibilidad de $\geq 10^{-4}$, por PCR y/o FACS, como se ha expuesto anteriormente.

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

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

20 En otra realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en el SEQ ID NO. 1, o una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferiblemente, al menos un 95 % idéntica al SEQ ID NO. 1.

25 La invención describe una molécula de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se representa en el SEQ ID NO. 1, así como una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % o, preferiblemente, un 95 % idéntica, de manera más preferida, al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO. 1. La invención también describe la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos como se representa en el SEQ ID NO. 2 así como una secuencia de ácidos nucleicos al menos un 90 %, preferiblemente, un 95 % idéntica, de manera más preferida, al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en el SEQ ID NO. 2. Se debe entender que la identidad de secuencia se determina sobre la secuencia de nucleótidos o aminoácidos entera. Además, se debe entender que una molécula de anticuerpo monocatenario biespecífico que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % o, preferiblemente, un 95 % idéntica, de manera más preferida, al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO. 1 contiene todas las secuencias CDR mostradas en los SEQ ID NO. 11 a 22. Para alineamientos de secuencia, por ejemplo, se pueden utilizar los programas Gap o BestFit (Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith y Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), que están contenidos en el paquete de *software* GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711 (1991)). Es un método rutinario para los expertos en la técnica determinar e identificar una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que tiene, 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 la presente memoria. Por ejemplo, según la hipótesis Wobble de Crick, la base 5' en el anticodón no está tan espacialmente confinada como las otras dos bases y, por lo tanto, podría tener apareamiento de bases no estándar. Dicho de otro modo: la tercera posición en un triplete codón puede variar de modo que dos tripletes que se diferencian en esta tercera posición pueden codificar el mismo residuo de aminoácido. Dicha hipótesis la conocen bien los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548-55). Además, es un procedimiento rutinario para los expertos en la técnica determinar e identificar la actividad citotóxica de una secuencia de nucleótidos o aminoácidos de este tipo que tiene, 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 la presente memoria. La actividad citotóxica del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 o una construcción de anticuerpo que tiene, por ejemplo, un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de secuencia del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se puede determinar por medio de métodos como se ilustra, por ejemplo, en las publicaciones internacionales WO 99/54440, WO 2004/106381 o WO 2007/068354.

55 En otra realización preferida de los métodos farmacéuticos de la invención, la composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar por infusión continua durante al menos cuatro semanas seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. Un ciclo de tratamiento se debe entender como la infusión continua de dicho anticuerpo durante al menos cuatro semanas, seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas. Este intervalo puede, a su vez, ir seguido por uno o más ciclos de tratamiento o por un TCMH alogénico. Preferiblemente, dicha administración por infusión continua del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (es decir, un ciclo de tratamiento) se va a repetir al menos dos,

60

tres veces, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o incluso hasta diez veces, después de la determinación de un estado de EMR negativo, para consolidación.

5 En una realización de los métodos farmacéuticos de la invención, el método es anterior al trasplante de células madre alogénico para convertir la LLA EMR positiva resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico a un estado de EMR negativo.

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

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

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, un intervalo de dosis que se define como "X a Y" equivale al 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 entre 10 µg a 100 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente incluye "10 µg" y "100 µg".

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

El área de superficie corporal media de un paciente pediátrico se calcula en la presente memoria en el contexto del método o uso según la invención que se encuentra en un intervalo de aproximadamente 0,2 a 2,2 m². Para el cálculo véase, por ejemplo, las fórmulas proporcionadas por <http://www.cato.eu/koerperoberflaeche-kinder.html>.

25 En otra realización de los métodos farmacéuticos de la invención, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico es recién diagnosticada o resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico y LLA recidivante. La LLA pediátrica recién diagnosticada, tal como se utiliza en la presente memoria, significa que la enfermedad LLA se ha diagnosticado en el paciente pediátrico por primera vez.

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

35 De manera ventajosa, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 como se describe en la presente memoria comprende además, opcionalmente (un) tampón (tampones) de reacción, disoluciones de almacenamiento y/o reactivos o materiales restantes requeridos para el método o uso enumerado. Además, dichos componentes se pueden envasar individualmente en viales o botellas o en combinación en envases o unidades multienvase.

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

40 Se ha descubierto que los efectos beneficiosos e inesperados de los métodos farmacéuticos de la invención se pueden obtener al administrar el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 en una dosis diaria de entre 10 microgramos a 100 microgramos por metro cuadrado de área de superficie corporal. La dosis diaria se puede mantener constante durante el periodo de administración. Sin embargo, también se encuentra dentro del ámbito de esta realización que para el (los) día(s) inicial(es) del periodo de infusión se administre una dosis inferior del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 ("dosis inicial") antes de los métodos farmacéuticos descritos en la presente memoria, mientras que, para el periodo de infusión restante, se aplica una dosis mayor ("dosis de mantenimiento"). Esta medida puede ayudar a adaptar el cuerpo del paciente al tratamiento con el anticuerpo y/o evitar efectos secundarios indeseados. Por ejemplo, se pueden administrar 5 microgramos del anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal como una dosis inicial el (los) primer(os) día(s) (por ejemplo, el primer día, o primer y segundo día, o primer, segundo y tercer día, etc., hasta el séptimo día) del periodo de infusión seguido por la administración de 15 microgramos por metro cuadrado de área de superficie corporal durante el periodo restante. O se pueden administrar 5 microgramos del anticuerpo monocatenario biespecífico por metro cuadrado de área de superficie corporal como dosis inicial el (los) primer(os) día(s) del periodo de infusión seguido por la administración de 30 o 45 microgramos por metro cuadrado de área de superficie corporal como dosis diaria durante el periodo restante. También se prevé que se puedan administrar 5 microgramos del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 por metro cuadrado de área de superficie corporal en el (los) primer(os) día(s) del periodo de infusión seguido por la administración de 15 microgramos del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 por metro cuadrado de área de superficie corporal durante el (los) día(s) siguiente(s) del periodo de infusión, seguido por la administración de 30 o 45 microgramos por metro

cuadrado de área de superficie corporal como dosis diaria (de mantenimiento) durante el periodo de administración restante de un total de al menos 4 semanas. Las dos dosis iniciales se pueden administrar no solo durante un día, sino también durante 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o incluso más. El área de superficie corporal media de un paciente se calcula en la presente memoria en el contexto de los métodos farmacéuticos según la invención para encontrarse en un intervalo de entre 0,2 a 2,2 m².

La administración ininterrumpida del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 puede ser intravenosa, parenteral, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular o pulmonar. El modo de administración intravenosa en la mayoría de los casos será el modo de elección para administrar ininterrumpidamente el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 y, como podría ser el caso, para la coadministración de un agente farmacéutico como parte de un régimen de coterapia. Como tal, la administración intravenosa es especialmente preferida. En este caso, se puede elegir de manera ventajosa un dispositivo de dosificación adecuado tal como la bomba de infusión multiterapia modelo 6060 fabricada por Baxter. Cualquiera que sea el dispositivo de dosificación elegido, debe tener un diseño de este tipo y construcción que minimice o, mejor, excluya una interrupción de la administración del agente terapéutico en el caso de intercambio de cartucho y/o reemplazo o recarga de la batería. Esto se puede lograr, por ejemplo, al elegir un dispositivo con un depósito secundario de disolución de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 aparte del cartucho que se va a intercambiar de modo que la infusión continua desde este segundo depósito en el paciente pediátrico pueda continuar incluso mientras el cartucho vacío o casi vacío se retira y reemplaza con uno nuevo.

Un modo de administración intravenosa y, según pueda ser el caso, de coadministración como parte de un régimen de coterapia implica la implantación de una bomba en el cuerpo del paciente pediátrico para dosificar una administración de este tipo. Un experto en la técnica conoce la bombas de dosificación de este tipo, por ejemplo, el modelo 6060 fabricado por Baxter como se ha expuesto anteriormente.

Como ejemplo no limitativo, puede ser que la administración ininterrumpida, es decir, continua, se vaya a realizar por medio de un sistema de bomba pequeño llevado por o implantado en el paciente pediátrico para dosificar la entrada del agente terapéutico en el cuerpo del paciente. Los sistemas de bomba de este tipo se conocen generalmente en la técnica y, comúnmente, se basan en el intercambio periódico de cartuchos que contienen el agente terapéutico que se va a infundir. Cuando se intercambia el cartucho en un sistema de bomba de este tipo, se puede producir una interrupción temporal del flujo de otra manera ininterrumpido de agente terapéutico en el cuerpo del paciente pediátrico. En tal caso, la fase de administración antes del reemplazo del cartucho y la fase de administración después del reemplazo del cartucho todavía se considerarían dentro del significado de los métodos farmacéuticos de la invención para hacer conjuntamente una "administración ininterrumpida" de un agente terapéutico de este tipo. Lo mismo se aplicaría para administraciones muy largas en las que el cartucho requeriría reemplazo más de una vez, o en las que las baterías que impulsan la bomba requerirían reemplazo, dando lugar a una compensación temporal del flujo de la disolución terapéutica en el cuerpo del paciente.

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

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

Además, la invención se refiere a una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico, en donde dicho anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a preparar para la administración a un paciente pediátrico.

La invención se refiere además al uso de una construcción de anticuerpo monocatenario CD19xCD3 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico. Por lo tanto, la presente invención se refiere también a una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 como se define en la presente memoria para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico. Las realizaciones descritas en la presente memoria en el contexto de los medios y métodos farmacéuticos se aplican en la presente memoria, *mutatis mutandis*, para la preparación de la correspondiente composición farmacéutica que comprende las construcciones anti CD19xCD3 de construcciones monocatenarias para la administración a un paciente pediátrico resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico, en particular, en el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico.

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

- 5 En una realización preferida de los usos médicos mencionados, dicha LLA de precursores B pediátrica es resistente a la quimioterapia y/o TCMH alogénico.

Preferiblemente, dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico recae aproximadamente a los tres años del diagnóstico.

- 10 En otra realización preferida de los usos médicos mencionados, el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 es para el tratamiento, alivio o eliminación de la enfermedad mínima residual (EMR) en un paciente pediátrico con leucemia linfoblástica aguda (LLA) resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico. Preferiblemente, dicho paciente pediátrico es EMR positivo en remisión hematológica completa.

- 15 En otra realización preferida de los usos médicos mencionados, la administración de dicho anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 convierte la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica ERM positiva resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico a un estado EMR negativo.

Preferiblemente, la EMR se mide con detección cuantitativa de la anomalía citogenética individual, como se define en la presente memoria, utilizando análisis de PCR y/o FACS.

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

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

- 25 En otra realización preferida de los usos médicos mencionados, las correspondientes regiones variables de cadena pesada (V_H) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (V_L) en dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se disponen, desde el extremo N al extremo C, en el orden $V_L(\text{CD19})-V_H(\text{CD19})-V_H(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$. Preferiblemente, dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en el SEQ ID NO. 1, o una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferiblemente, un 95 % idéntica al SEQ ID NO. 1.

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

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

En otra realización, la administración es anterior al trasplante de células madre alogénico para convertir la LLA EMR positiva resistente a la quimioterapia o TCMH alogénico a un estado de EMR negativo.

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

En otra realización preferida de los usos médicos mencionados, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de entre 10 μg a 100 μg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.

- 40 Preferiblemente, la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de entre 15 μg a 30 μg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.

En los usos médicos mencionados, la administración de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 reemplaza al trasplante de células madre alogénico en pacientes pediátricos elegibles para trasplante de células madre alogénico.

- 45 Las realizaciones, definiciones y explicaciones proporcionadas con respecto a los métodos farmacéuticos de la invención se aplican *mutatis mutandis* a los usos médicos de la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 descrito en la presente memoria.

Las Figuras muestran:

- 50 Figura 1: Modo de acción del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (CD19xCD3 bscab). El anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (SEQ ID NO. 1) redirige las células T citotóxicas positivas de CD3 para eliminar células de leucemia linfoblástica aguda humanas que tienen el antígeno CD19.

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

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

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

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

La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos:

35 Ejemplos:

1. Anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3

La generación, expresión y actividad citotóxica del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se ha descrito en la publicación internacional WO 99/54440. Las correspondientes secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se muestran en los 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 los 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 los SEQ ID NO. 3 a 6, respectivamente.

2. Análisis fenotípico de linfocitos y análisis de quimerismo

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

3. Detección de EMR

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

4. Casos clínicos

4.1 Caso clínico paciente 1

Este paciente de 7 años de edad se diagnosticó con LLA común CD10+ de alto riesgo (CD19, CD34 positivo; CD45 reducido; reordenamiento de TCR; SNC negativo) en 2004. Después del tratamiento, experimentó una recidiva de médula ósea en junio de 2006 y se trató según el estudio ALL-REZ BFM en el grupo S3. Después de dos ciclos de quimioterapia, el paciente tenía enfermedad persistente y alcanzó una remisión completa después de 3 ciclos de clofarabina. En 2007, recibió un TCMH alogénico de un donante no emparentado con 9 de diez alelos HLA compatibles después de acondicionamiento con irradiación total del cuerpo y etopósido. Un año después del TCMH, experimentó otra recidiva de médula ósea y recibió quimioterapia subsecuente que incluía 1 ciclo de clofarabina/ciclofosfamida/VP16 (Nobuko), 2 ciclos de amsacrina, VP16, prednisona (Hamburgo) y 1 ciclo de melfalán/citarabina; véase la Figura 2. A pesar de esta quimioterapia agresiva, el paciente tuvo enfermedad morfológica persistente a lo largo del tratamiento, como es evidente por los altos niveles de EMR en la Figura 2. Después, se trató en uso compasivo con una infusión continua de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ del anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (blinatumomab; SEQ ID NO. 1) durante 5 semanas; véase la Figura 3. El análisis en serie de las poblaciones de linfocitos antes (día 0) y durante el tratamiento con el anticuerpo mencionado mostró un aumento sorprendente de linfocitos T CD8+, mientras que no se advirtió cambio en la células T CD4+ y células NK CD56+. Tras el tratamiento con el anticuerpo, se pudo alcanzar la negatividad de EMR. El análisis de quimerismo concomitante mostró un quimerismo de donante de un 100 %. Como se muestra en la Figura 4, el análisis de la médula ósea el 10^o día de tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 reveló una eliminación completa de los blastocitos de médula ósea ($\text{EMR} < 10^{-4}$). Otro análisis de la MO al final del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 mostró de nuevo la ausencia completa de blastocitos leucémicos de la médula ósea ($\text{EMR} < 10^{-4}$). El análisis en serie de la EMR antes, durante y después del tratamiento con dicho anticuerpo se representa en la Figura 5. Antes del tratamiento con el anticuerpo, el paciente pediátrico tenía un pronóstico muy pobre y no era elegible para TCMH debido a su mal estado clínico. Tras el tratamiento con el anticuerpo, se pudo alcanzar la negatividad de EMR. Además de signos discretos transitorios de ataxia, no se observaron efectos secundarios importantes y no se vieron signos de EICH a pesar del aumento sorprendente de los linfocitos T CD8+ derivados del donante. En 10/2008, 2 semanas después del final del tratamiento con el anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 (día 0 en las Figuras 3 a 5), se sometió a un segundo TCMH de su madre haploidéntica utilizando un régimen preparatorio no mieloablativo consistente en clofarabina, tiotepa y melfalán (Lang). Desde 11/2009, el paciente ha permanecido en remisión completa con EMR negativa.

4.2 Caso clínico paciente 2

Este paciente de quince años de edad se diagnosticó con el cromosoma Filadelfia y LLA de precursores B con CD19-positivo en abril de 2001. Después de la quimioterapia, recibió un TCMH de un hermano idéntico de HLA en octubre de 2001 después de acondicionamiento con TBI de 12 Gy y etopósido. En 2002, se le diagnosticó una recidiva de médula ósea y se consiguió otra remisión con matinib y quimioterapia. A continuación, recibió un segundo TCMH de un donante no emparentado de HLA idéntico en octubre de 2004. En marzo de 2008, se le diagnosticó una segunda recidiva y se trató con una quimioterapia de dosis baja y Dasatinib debido a la resistencia a Imatinib. Después de quimioterapia adicional con clofarabina y citosina/arabinósido, alcanzó una remisión molecular y recibió un tercer TCMH alogénico de su padre haploidéntico con 3 de 6 alelos HLA no compatibles con tratamiento postrasplante con Dasatinib. Debido a hemorragia gastrointestinal y cardiomiopatía dilatada, el Dasatinib se suspendió 5 meses después del trasplante. En abril de 2009, se le diagnosticó una recidiva del sistema nervioso central (SNC) combinada con $7 \times 10^9/l$ blastocitos en el SNC y un 3 % de blastocitos en la médula ósea. El paciente se trató a continuación con Nilotinib, quimioterapia intratecal e irradiación fraccionada del SNC con 18 Gy. Tres meses después de este tratamiento, la médula ósea del paciente se mantuvo EMR-positiva en un nivel de $1,1 \times 10^{-3}$, mientras el SNC estuvo libre de blastocitos. Un análisis de quimerismo de sangre periférica reveló una hematopoyesis completa derivada del donante de su padre haploidéntico.

El paciente se trató a continuación en uso compasivo con agente único blinatumomab a 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ durante 4 semanas por medio de infusión continua sin ningún efecto secundario. Una aspiración de médula ósea al final del tratamiento mostró remisión completa con EMR no detectable en la médula ósea por debajo de $< 1 \times 10^{-4}$. Como el paciente 1, el paciente 2 no mostró ningún signo de EICH durante o después del tratamiento con blinatumomab. Dos semanas después del final del tratamiento con blinatumomab, el paciente experimentó una reacción hemolítica transitoria desencadenada por una infección. En la actualidad, el paciente 2 se encuentra sin recidiva cuatro semanas después del tratamiento. Está bien y asiste al colegio.

4.3 Resumen

Los fármacos disponibles hasta ahora para el tratamiento de LLA son de baja especificidad y afectan una variedad de otras células, lo que da lugar a efectos secundarios graves tales como inmunosupresión, aplasia de médula ósea, mucositis, neuropatía, cardiotoxicidad y alopecia. Por lo tanto, se necesitan urgentemente planteamientos mejor dirigidos con menos efectos secundarios. Además, en algunos pacientes, los clones de LLA desarrollan resistencia completa a la quimioterapia convencional, en particular, aquellos clones que surgen tras el TCMH, de modo que los fármacos con un modo de acción distinto son deseables. Se pudo demostrar la eficacia de la citotoxicidad

dependiente de anticuerpo a través de los receptores de Fc de células NK y granulocitos en combinación con quimioterapia en LLA pediátrica utilizando el anticuerpo quimérico monoclonal rituximab. En la actualidad, el blinatumomab es el único anticuerpo en ensayos clínicos que permite la unión de células T citotóxicas para dirigirse a CD19 en linfomas no hodgkinianos de células B y leucemias linfáticas. Se considera que las células T tienen un potencial citotóxico mayor que aquellas células inmunitarias unidas por anticuerpos monoclonales convencionales.

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

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

Niveles de dosis de blinatumomab de tan sólo 15 µg/m² al día fueron suficiente para inducir un aumento de linfocitos T derivados del donante y para eliminar los blastocitos de LLA por debajo del nivel de detección de EMR. Esto destaca que la unión de las células T es muy diferente del modo de acción de los anticuerpos monoclonales convencionales, que requieren dosis muy superiores y no pueden unirse a las células T citotóxicas debido a su falta de receptores de Fc.

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

De esta primera experiencia clínica en LLA pediátrica, los autores de la invención concluyen que el blinatumomab se tolera bien y puede inducir rápidamente remisiones hematológicas y EMR negativas completas en niños con enfermedad resistente a la terapia después de múltiples recidivas de LLA de precursores B con CD19 positiva después de TCMH alogénico. Es notable que ninguno de los pacientes mostrara ningún signo de EICH a pesar de un aumento de linfocitos T derivados del donante, incluso después de trasplante haploidéntico no compatible.

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

Los resultados se pueden resumir brevemente como sigue:

Los dos pacientes pediátricos se han tratado en base a un uso compasivo.

Negatividad de EMR continua en dichos pacientes.

No se observaron sucesos adversos (SA) importantes.

Todos los SA transitorios, interrupción del tratamiento no necesaria.

Listado de secuencias

<110> AMGEN Research (Múnich) GMBH

<120> Tratamiento de leucemia linfoblástica aguda pediátrica

<130> MIM14229PCTEPD2

<150> 61/221.269

<151> 29-06-2009

<150> 61/183.291
<151> 02-06-2009

5 <150> 61/112.323
<151> 07-11-2009

<160> 22

<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 498

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 sintético

<400> 1

ES 2 748 126 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 2 748 126 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

ES 2 748 126 T3

370

375

380

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys

<210> 2

<211> 1494

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 sintético

<400> 2

ES 2 748 126 T3

gatatccagc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagtattt gaactggtag 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 aaaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc 360
tccggtggtg gtggttctca ggtgcagctg cagcagctcg gggctgagct ggtgaggcct 420
gggtcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag ctactggatg 480
aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat ttggcctgga 540
gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggtaaag ccaactctgac tgcagacgaa 600
tcctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc tgcggtctat 660
ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggta ggccgttatt actatgctat ggactactgg 720
ggccaagga ccacggtcac cgtctcctcc ggaggtggtg gatccgatat caaactgcag 780
cagtcagggg ctgaactggc aagacctggg gcctcagtgga agatgtcctg caagacttct 840
ggctacacct ttactagga cacgatgcac tgggtaaaac agaggcctgg acagggtctg 900
gaatggattg gatacattaa tctagccgt ggttatacta attacaaatca gaagtcaag 960
gacaaggcca cattgactac agacaaatcc tccagcacag cctacatgca actgagcagc 1020
ctgacatctg aggactctgc agtctattac tgtgcaagat attatgatga tcattactgc 1080
cttgactact ggggccaagg caccactctc acagtctcct cagtcgaagg tgggaagtgga 1140
ggttctggtg gaagtggagg ttcaggtgga gtcgacgaca ttcagctgac ccagtctcca 1200
gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag gtcacatga cctgcagagc cagttcaagt 1260
gtaagtaca tgaactggta ccagcagaag tcaggcacct ccccaaaaag atggatttat 1320
gacacatcca aagtggcttc tggagtccct tatcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc 1380
tcatactctc tcacaatcag cagcatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgcca 1440
cagtgaggta gtaaccgct cacgttcggt gctgggacca agctggagct gaaa 1494

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

<220>
<223> Polipéptido de anti-CD19 VH sintético

10 <400> 3

ES 2 748 126 T3

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
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido de anti-CD19 VH sintético

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

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Polipéptido de anti-CD19 VL sintético

<400> 5

ES 2 748 126 T3

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

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 6
- <211> 333
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido de anti-CD19 VL sintético

10 <400> 6

gatatccagc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc	60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttattt gaactggtac	120
caacagattc caggacagcc acccaaacctc ctcatctatg atgcatccaa tctagtttct	180
gggatcccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg	300
acgttcggtg gagggaccaa gctcagatc aaa	333

- 15 <210> 7
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido de anti-CD3 VH sintético

<400> 7

ES 2 748 126 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 8
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido de anti-CD3 VH sintético

10 <400> 8

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

15 <210> 9
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido de anti-CD3 VL sintético

<400> 9

ES 2 748 126 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

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

<220>
<223> Polinucleótido sintético

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

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

<220>
<223> Péptido de anti-CD19 L1 sintético

<400> 11

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn
1 5 10 15

20 <210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de anti-CD19 L2 sintético

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser
 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de anti-CD19 L3 sintético
 <400> 13
Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
 10 1 5
 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido de anti-CD19 H1 sintético
 <400> 14
Ser Tyr Trp Met Asn
 1 5
 20 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de anti-CD19 H2 sintético
 25 <400> 15
Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15
Gly
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de anti-CD19 H3 sintético
 <400> 16
Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15
 35 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido de anti-CD3 H1 sintético
 <400> 17

Arg Tyr Thr Met His
 1 5
 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de anti-CD3 H2 sintético
 <400> 18
Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
Asp
 10 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Péptido de anti-CD3 H3 sintético
 <400> 19
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de anti-CD3 L1 sintético
 <400> 20
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
 25 1 5 10
 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido de anti-CD3 L2 sintético
 <400> 21
Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 1 5
 <210> 22
 35 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de anti-CD3 L3 sintético
 40 <400> 22

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 para su uso en un método para el tratamiento, alivio o eliminación de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica en un paciente de LLA pediátrica, en donde dicha LLA pediátrica es resistente a la quimioterapia o trasplante de células madre hematopoyéticas alogénico (TCMH).
2. La construcción para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica es resistente a la quimioterapia y trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH).
3. La construcción para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha leucemia linfoblástica aguda (LLA) es LLA recidivante o LLA recidivante resistente a la quimioterapia y/o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH).
- 10 4. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método es para el tratamiento, alivio o eliminación de enfermedad mínima residual (EMR) en un paciente de LLA pediátrica.
5. La construcción para el uso de la reivindicación 4, en donde dicho paciente de LLA pediátrica es EMR positivo en remisión hematológica completa.
- 15 6. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las correspondientes regiones variables de cadena pesada (VH) y las correspondientes regiones variables de cadena ligera (VL) en dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se disponen, desde el extremo N al extremo C, en el orden VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3).
- 20 7. La construcción para el uso de la reivindicación 6, en donde dicha construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en el SEQ ID NO. 1, o una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferiblemente, un 95 % idéntica al SEQ ID NO. 1.
8. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición farmacéutica que comprende una construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar por infusión continua durante al menos cuatro semanas seguido por un intervalo sin tratamiento de 2 semanas.
- 25 9. La construcción para el uso de la reivindicación 8, en donde dicha administración se va a repetir al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces, después de la determinación del estado EMR negativo.
10. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de entre 10 µg a 100 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.
- 30 11. La construcción para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de entre 15 µg a 30 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.
12. La construcción para el uso de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se va a administrar en una dosis diaria de 15 µg, 30 µg, 60 µg o 90 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente.
- 35 13. La construcción para el uso de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la construcción de anticuerpo monocatenario biespecífico CD19xCD3 se debe administrar en una dosis de 5 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente en el (los) primer(os) día(s), seguido por la administración de 15 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente en el (los) siguiente(s) días, seguido por la administración de 30 µg o 45 µg por metro cuadrado de área de superficie corporal del paciente como dosis diaria durante el periodo de administración restante de un total de cuatro semanas.
- 40 14. La construcción para el uso de la reivindicación 13, en donde las dos dosis iniciales se administran durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o incluso más.

Figura 1

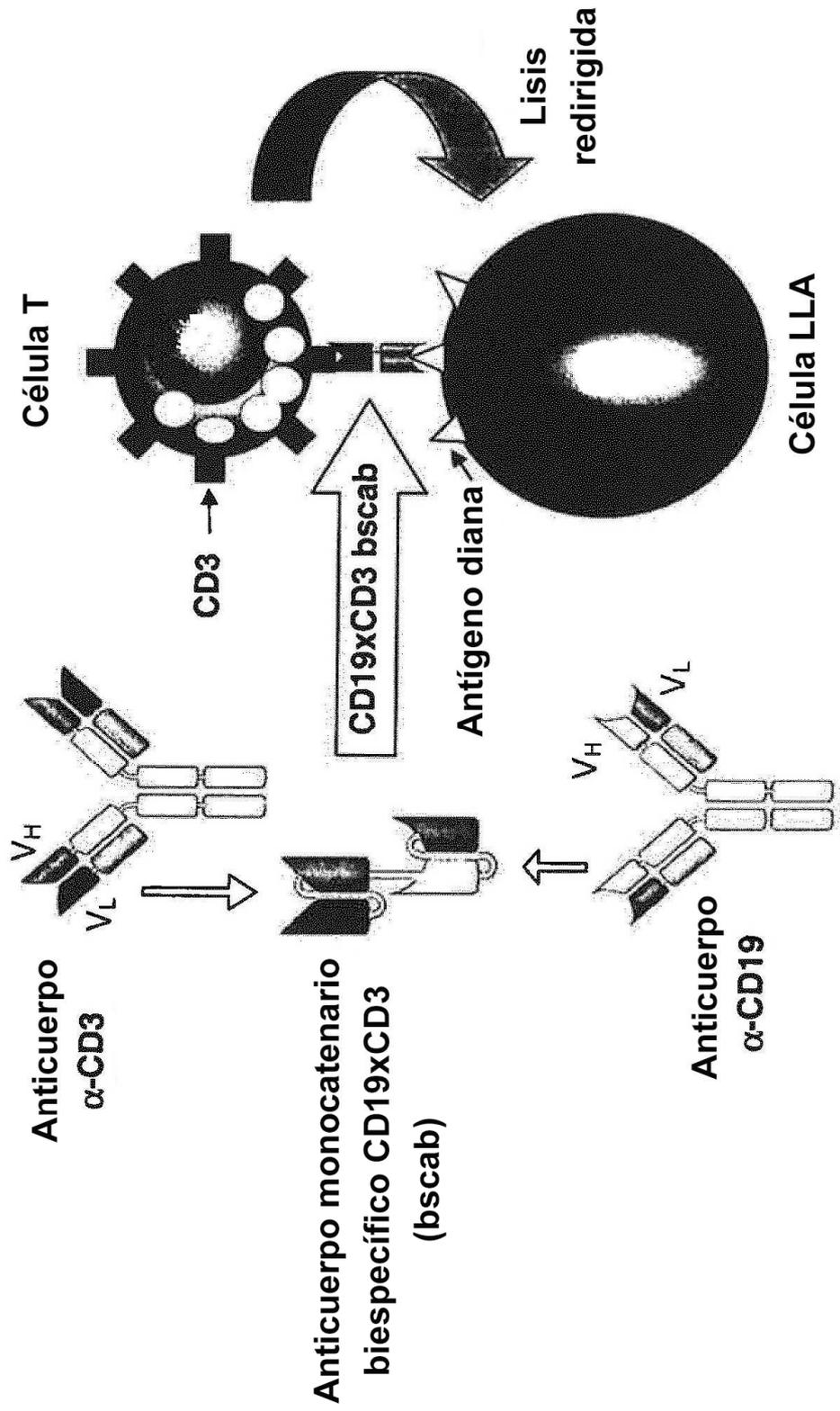


Figura 2

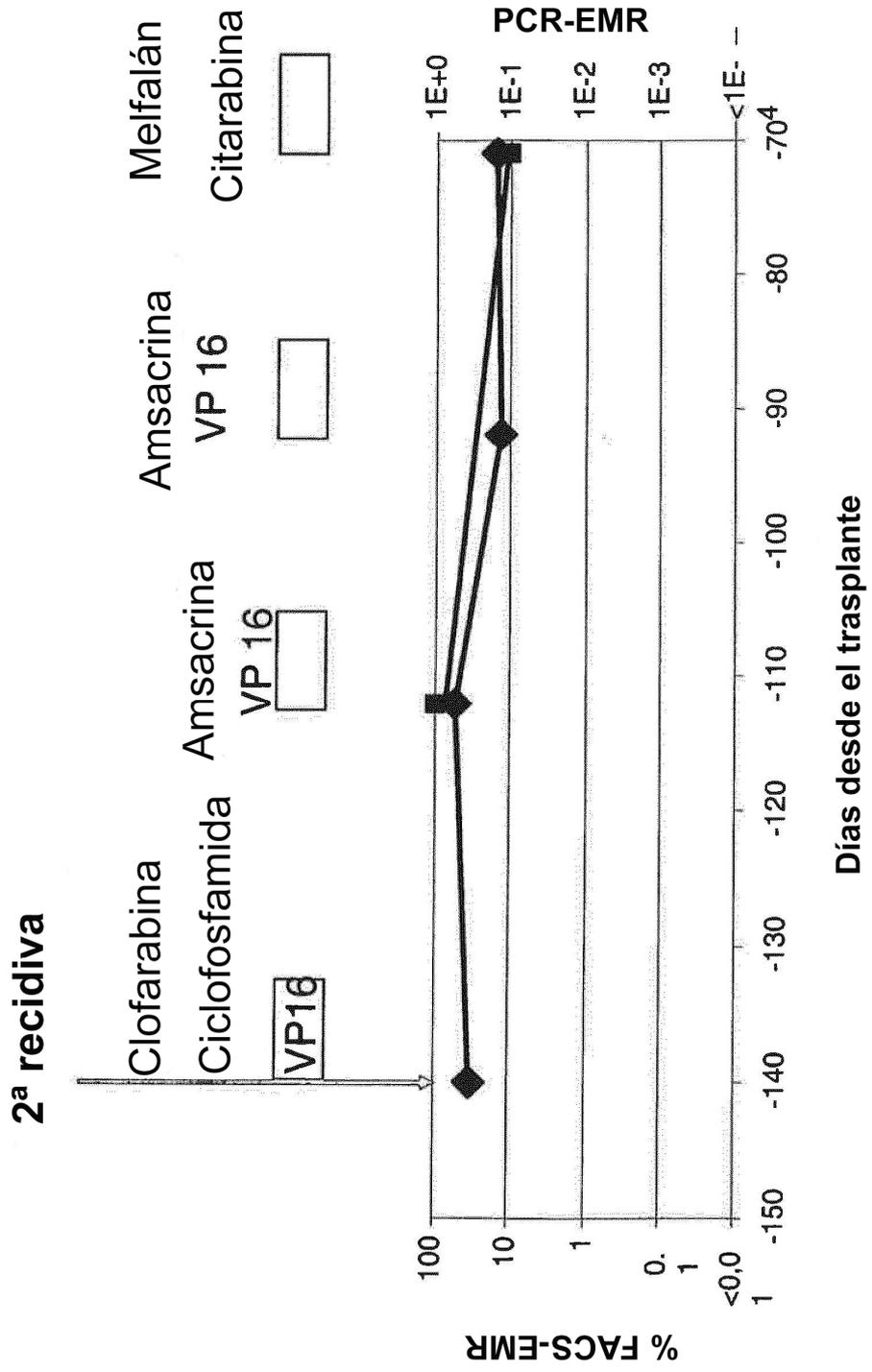
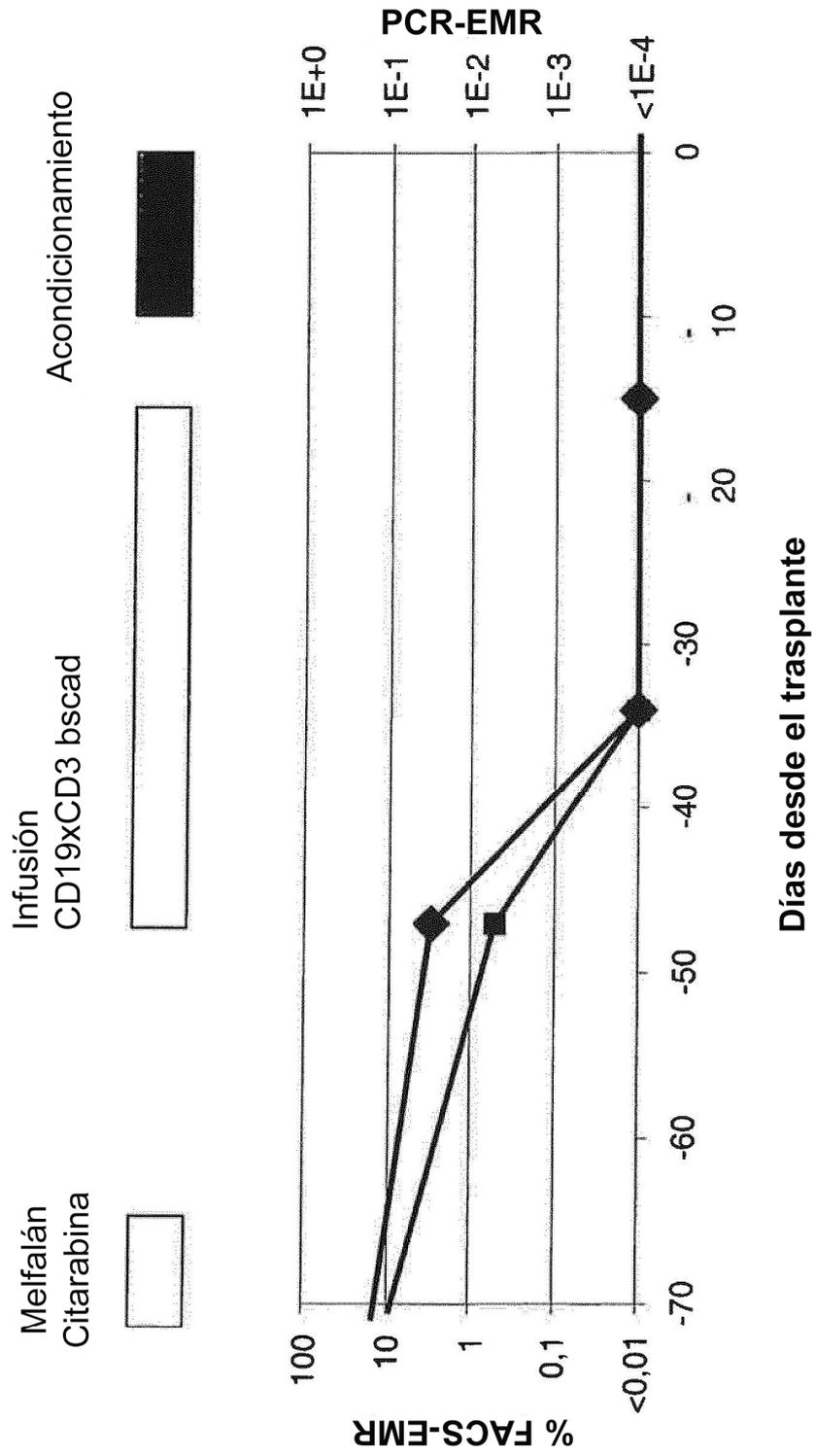


Figura 3

2° TMO



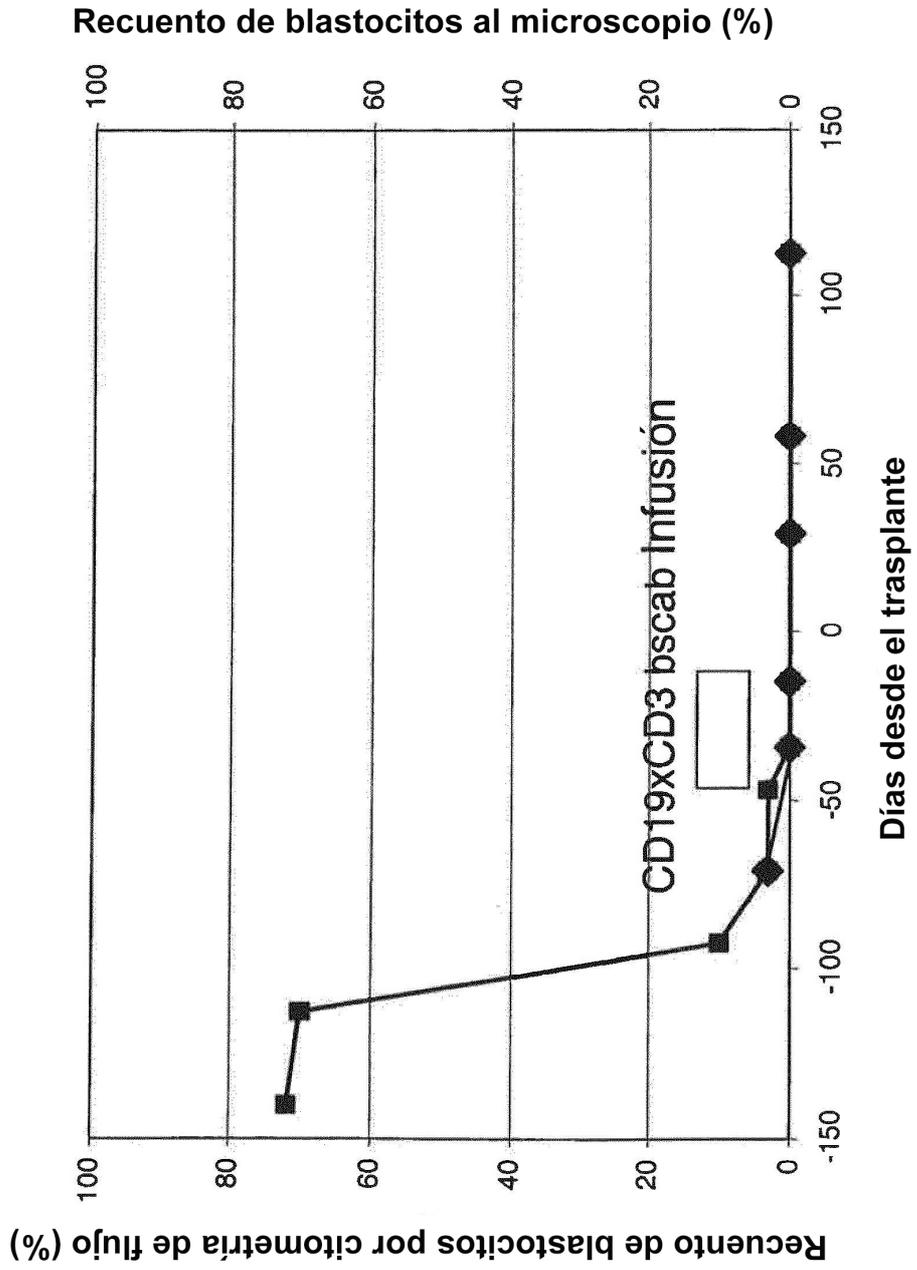


Figura 4

Figura 5

