



Brevetto europeo No. 2342227

Domanda di brevetto europeo No. 09760483.9

Data di deposito: 06 novembre 2009

Classificazione Internazionale: C07K16/28, C07K16/46, A61P35/02

5 Priorità: Statunitense No. 20080112323P del 07 novembre 2008

Statunitense No. 20090183291P del 02 giugno 2009

Titolo: TRATTAMENTO DI LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

Richiedente: Amgen Research (Munich) GmbH

Staffelseestrasse 2

10 81477 München

Germania

Inventori: ZUGMAIER, Gerhard

DEGENHARD, Evelyn

15 **Descrizione**

La presente invenzione concerne un costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso in un metodo per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione della leucemia linfoblastica acuta (*ALL, Acute Lymphoblastic Leukemia*) in un paziente adulto.

20 Le leucemie sono proliferazioni neoplastiche clonali di cellule ematopoietiche immature che sono caratterizzate da differenziamento aberrante o interrotto. Le cellule leucemiche si accumulano nel midollo osseo, sostituendo infine la maggior parte delle cellule ematopoietiche normali. Questo porta ad un'insufficienza del midollo osseo ed alle sue conseguenze, quali anemia, emorragia e infezione. Le cellule leucemiche circolano nel sangue ed in altri tessuti nel corpo (DeVita, Hellmann, Rosenberg. *Cancer: principles and practice of oncology*. Ottava edizione. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, ISBN 0-781-72387-6). Le leucemie acute, che possono essere
25 ampiamente raggruppate come linfoblastiche o mieloblastiche, possono essere identificate fenotipicamente e



genotipicamente e sono caratterizzate da un decorso clinico rapido, che necessita di un trattamento immediato. Le leucemie acute sono derivate da cellule ematopoietiche progenitore precoci. Al contrario, le leucemie croniche hanno il fenotipo ed il carattere biologico di cellule più mature (DeVita et al., loc. cit.). La leucemia linfoblastica acuta (ALL) è distinta dai linfomi dato che queste ultime sembrano cellule linfoidi più mature e insediano tipicamente i linfonodi, la milza o altri siti extramidollari, prima di distribuirsi al midollo osseo. Alcuni linfomi, come linfomi linfoblastici o linfomi di Burkitt, mantengono alcune caratteristiche sia delle leucemie che dei linfomi, ma sono derivati da cellule progenitore immature e necessitano di una terapia simile a quella usata per la leucemia linfoblastica acuta (ALL). Altri linfomi, tuttavia, possono diffondersi ampiamente nel sangue e nel midollo osseo e in una tale fase possono essere descritti come linfomi acuti, ma non sono vere leucemie (De Vita et al., loc. cit.). La leucemia linfoblastica acuta è una malignità relativamente rara. L'incidenza totale della leucemia linfoblastica acuta (ALL) è 1,1/100.000 all'anno. L'incidenza ha il proprio picco durante l'infanzia, diminuendo in continuo all'aumentare dell'età. Dall'età di 35 anni l'incidenza aumenta di nuovo ed è osservato un secondo picco a partire dall'età di 80 anni (2,3/100.000 per anno) (Hoelzer e Gökbuget; Der Onkologe 12 (2006); 983-1002). Sebbene l'eziologia della leucemia linfoblastica acuta (ALL) non sia chiara, essa è uno dei neoplasmi studiati più attentamente e meglio caratterizzati. I sottogruppi della leucemia linfoblastica acuta (ALL) sono definiti principalmente mediante immunofenotipizzazione, citogenetica e genetica molecolare. La leucemia linfoblastica acuta (ALL) della linea B, con il 74% dei casi, comprende la maggior parte delle ALL. Il settanta per cento di tutte le ALL sono ALL di precursori di cellule B ed il 4% sono ALL di cellule B mature. Le ALL della linea T coprono il 26% di tutte le ALL (Hoelzer e Gökbuget; Der Onkologe 12 (2006); 983-1002).

Nei primi anni '80, la leucemia linfoblastica acuta (ALL) nell'adulto era una malattia raramente curabile con una sopravvivenza generale inferiore al 10%. Dopo l'uso di regimi adattati somministrati da gruppi pediatrici l'esito è migliorato del 30-40%. E' seguito un periodo di stagnazione con miglioramenti solo in sottogruppi distinti. Tuttavia, negli ultimi cinque anni, sono stati fatti progressi nella diagnosi molecolare della leucemia linfoblastica acuta (ALL). Il trapianto di cellule staminali (SCT) ha migliorato l'esito della leucemia linfoblastica acuta (ALL) ed ha reso più possibile un trattamento. Sebbene vari nuovi farmaci mirati siano sotto valutazione, non sono ancora disponibili terapie



mirate efficaci per la leucemia linfoblastica acuta (ALL). La diagnosi rapida e la classificazione della leucemia linfoblastica acuta (ALL) sono sempre più importanti per identificare sottoinsiemi genetici prognostici e molecolari che saranno l'obiettivo del trattamento mirato (Hoelzer e Gokbuget; Hematology (2006); 133-141). Il cromosoma Philadelphia (Ph), il risultato di una traslocazione reciproca che porta alla fusione del proto-oncogene *abl* dal cromosoma 9 con le sequenze della regione di raggruppamento dei punti di rottura sul cromosoma 22, è stata la prima traslocazione specifica per i neoplasmi identificata. La traslocazione (9;22) è l'aberrazione genetica più frequente nella leucemia linfoblastica acuta (ALL) negli adulti. Essa è trovata nel 20-30% dei pazienti. L'incidenza aumenta con l'età, fino a quasi il 50% in pazienti con età superiore a 50 anni. In studi clinici precedenti, i pazienti più anziani sono stati sottorappresentati, a causa dell'inutilità del trattamento percepita, ma questo schema sta cambiando con la possibilità di nuove promettenti opzioni di trattamento. E' da notare, che esso è stato trovato quasi esclusivamente in leucemia linfoblastica acuta di precursori di cellule B CD10+ (c-ALL) e pre-B ALL); rare relazioni circa la sua presenza in ALL della linea T possono rappresentare la leucemia mieloide cronica (CML) nella crisi blastica linfoide piuttosto che in ALL Ph+ bona fide. Dal punto di vista clinico, i pazienti che presentano una conta variabile di globuli bianchi del sangue (WBC), espressione in superficie degli antigeni CD19, CD10 e CD34 e frequente co-espressione di marcatori mieloidi, ad esempio, presentano un rischio maggiore di sviluppare leucemia meningea. La prognosi di pazienti adulti con ALL Ph+ trattata solo con chemioterapia è scarsa, con una probabilità inferiore al 10% di sopravvivenza a lungo termine. Dato l'esito scarso con la chemioterapia, il trapianto allogenico cellule staminali ematopoietiche (HSCT) è attualmente considerato come il trattamento di elezione in ALL Ph+ nell'adulto. Sono stati riportati tassi di sopravvivenza a lungo termine dal 12% al 65% per pazienti sottoposti a SCT nella prima remissione completa (CR), indicando che questa procedura è potenzialmente curativa. Tuttavia, approssimativamente il 30% di questi pazienti presenta ricadute (Ottmann e Wassmann; Hematology (2005), 118-122). La presenza di cellule leucemiche al di sotto del limite di rilevamento citologico (cellule leucemiche al 5%) è definita come malattia minima residua (MRD, *Minimal Residual Disease*). Se non è rilevabile alcuna MRD ($<10^{-4}$, ovvero < 1 cellula leucemica per 10^4 cellule di midollo osseo) è raggiunta una remissione molecolare completa. Negli ultimi anni, una serie di studi retrospettivi, ha mostrato che la MRD in leucemia linfoblastica acuta nell'adulto è un fattore di prognosi indipendente, come già dimostrato per la



leucemia infantile. Gli strumenti diagnostici sono la reazione polimerasica a catena (PCR) e/o la citometria a flusso. L'analisi mediante PCR può rilevare trascritti di fusione come bcr/abl e riarrangiamenti di cloni individuali di geni di immunoglobuline (IgH) e/o di recettori di cellule T (TCR). Circa il 25% dei pazienti con la malattia minima residua (MRD) definita da riarrangiamenti comprendono un gruppo ad alto rischio con un tasso di ricaduta del 94% entro 3
5 anni. In generale, la diminuzione della MRD avviene più lentamente in adulti piuttosto che in bambini. La decisione circa l'intensificazione del trattamento mediante trapianto allogenico di cellule staminali del sangue periferico (PBSCT) è pertanto troppo precoce dopo il trattamento di induzione. Tuttavia, dopo l'inizio del consolidamento, la malattia residua minima (MRD) in qualsiasi momento è associata con un rischio elevato di ricaduta (Brüggemann et al., Blood 107 (2006), 1:116-1123; Raff et al., Blood 109 (2007), 910-915).

10 Il trattamento di pazienti adulti con leucemia linfoblastica acuta (ALL) diventa sempre più complessa, dato che diversi protocolli di trattamento sono introdotti per differenti sottotipi della malattia, riflettono l'intenzione di adeguare in modo ottimale la terapia a entità patologiche specifiche adatte al rischio.

Anderson et al. (Blood J. 80 (1992): 2826-34) descrive un eteroconiugato bi-specifico tra un anticorpo anti-CD19 ed uno anti-CD3 che intende indurre la lisi delle cellule di leucemia linfoblastica acuta. JEHA
15 SIMA, SEMINARS IN HEMATOLOGY 2009,46:76-88, descrive le terapie di ALL. Sono stati ottenuti miglioramenti recentemente introducendo nuovi principi terapeutici, come l'aggiunta precoce dell'inibitore di tirosin chinasi imatinib in ALL positiva per Ph (Ph+) (Lee et al., Blood 102 (2003), 3068-3070) o l'uso dell'anticorpo anti-CD20 rituximab in casi CD20⁺ di ALL della linea B (vedi, ad esempio, Griffin et al., Pediatr Blood Cancer 2008). Miglioramenti diagnostici sono stati ottenuti determinando il livello di malattia minima residua (MRD) mediante metodi genetici
20 molecolari o mediante citometria a flusso, che sono stati mostrati essere predittivi dell'esito in un numero di studi in bambini (vedi, ad esempio, Cave et al., N. Engl. J. Med. 339 (1998), 591-598) ed in adulti (vedi, ad esempio, Brüggemann et al., Blood 107 (2006), 1116-1123). I tassi di sopravvivenza con protocolli di trattamento moderni di pazienti con leucemia linfoblastica acuta nell'adulto (ALL) hanno raggiunto un plateau, in cui il potenziale beneficio di regimi terapeutici più aggressivi è spesso contrastato da una mortalità eccessiva dovuta a complicazioni, rendendo così
25 ancora più importanti i tentativi di individualizzare il trattamento. Sebbene i pazienti con rischio standard senza fattori



di rischio convenzionali, che hanno una probabilità superiore al 50% di sopravvivenza a lungo termine con la sola chemioterapia (Hoelzer et al., Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 1 (2002), 162-192) siano esposti potenzialmente ad un rischio non necessario mediante una terapia intensificata e prolungata, l'esito in pazienti con una leucemia linfoblastica acuta recidiva (ALL) è estremamente scarso, anche se è ottenuta una seconda remissione. In uno studio recente, il monitoraggio della malattia residua minima (MRD) durante il primo anno di chemioterapia intensiva ha portato ad una stratificazione del rischio basato su MRD (Brüggemann et al. (2006), loc. cit.). Questa classificazione ha consentito l'identificazione di un gruppo di MRD a basso rischio, consistente in circa il 10% dei pazienti con una possibilità minima di ricaduta in 3 anni, un gruppo di MRD ad alto rischio di circa il 25% di pazienti con un rischio di quasi il 100% di ricaduta ed un gruppo di MRD di rischio intermedio. In quest'ultimo gruppo, circa il 30% di pazienti avrà infine una ricaduta pur diventando negativo per MRD o raggiungendo livelli di MRD al di sotto di 10^{-4} alla fine del primo anno di terapia.

Questi dati mostrano che la leucemia linfoblastica acuta (ALL) rimane per molti pazienti una malattia fulminante e incurabile. In vista di ciò, vi è una necessità urgente di terapie per ALL migliorate.

La presente invenzione fornisce un costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso in un metodo per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione di ALL in un paziente adulto che lo necessita. In una forma di realizzazione preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione, detta leucemia linfoblastica acuta (ALL) è leucemia linfoblastica acuta della linea di cellule B, preferibilmente leucemia linfoblastica acuta dei precursori di cellule B. La leucemia linfoblastica acuta (AL) della linea B comprende la maggior parte delle ALL, con il 74% dei casi. Il settanta per cento di tutte le ALL sono ALL di precursori di cellule B ed il 4% sono ALL di cellule B mature. Dato che l'anticorpo a catena singola CD19xCD3 descritto qui è diretto contro il marcatore CD19 associato con le cellule B, detto anticorpo è particolarmente adatto come agente terapeutico per la leucemia linfoblastica acuta della linea B, preferibilmente per le ALL di precursori di cellule B, che possono essere ulteriormente suddivise in ALL pro-B, ALL preB e ALL comuni (cALL).

La somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 (denominato anche blinatumomab o MT103) descritto in maggiore dettaglio sotto, fornisce per la prima volta, un approccio terapeutico che



consente il trattamento della malattia minima residua in pazienti con leucemia linfoblastica acuta (ALL). Come mostrato nei seguenti esempi ed illustrato in Figura 1, è stato definito che l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 (le cui sequenza nucleotidica e sequenza amminoacidica sono raffigurate nelle SEQ ID NO. 2 e 1, rispettivamente) lega cellule T con cellule bersaglio che esprimono CD19 risultando in una risposta di cellule T citotossiche non limitata ed un'attivazione delle cellule T. Recentemente, uno studio di fase I ha dimostrato una significativa attività clinica dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 in linfoma non-Hodgkin di cellule B recidivo (NHL) (Bargou et al., Science 321 (2008):974-7). Sulla base di questi risultati, è stato progettato uno studio in collaborazione con il German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GMALL) per analizzare l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 in pazienti con leucemia linfoblastica acuta (ALL) che hanno ottenuto una completa remissione ematologica, ma che presentavano ancora una malattia minima residua (MRD). La MRD è un fattore prognostico indipendente che riflette principalmente la resistenza a farmaci e è associato con un alto rischio di ricaduta dopo l'inizio del consolidamento. La MRD è stata misurata con metodi standardizzati mediante rilevamento quantitativo di singoli riarrangiamenti di immunoglobuline e riarrangiamenti di recettori di cellule T, traslocazioni t(4;11) o mediante trascritti di fusione bcr/abl (vedi, ad esempio, Van der Velden et al., Leukemia 18 (2004), 1971-80). La popolazione di studio include pazienti adulti con leucemia linfoblastica acuta (ALL) di precursori di cellule B (ALL) che mostrano un segnale bcr/abl o un segnale t(4;11) al di sopra del limite di rilevamento e/o almeno un marcatore mediante riarrangiamento con una sensibilità del $\geq 10^{-4}$. Il punto finale principale dello studio di fase II in corso è il tasso di conversione verso lo stato negativo per la malattia minima residua (MRD) come definito da bcr/abl o un segnale t(4;11) al di sotto del limite di rilevamento e/o mediante il rilevamento di singoli riarrangiamenti di geni di immunoglobuline o di recettori di cellule T (TCR) al di sotto di 10^{-4} . Un ciclo di trattamento dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è un'infusione endovenosa continua per 4 settimane, che può essere seguita da un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche dopo il primo ciclo o mediante cicli ripetuti dopo un intervallo di 2 settimane senza trattamenti. Il dosaggio dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è 15 microgrammi/m²/24 ore, mentre è consentito un incremento della dose tra pazienti fino a 30 microgrammi/m²/24 ore. La condizione di malattia minima residua



(MRD) è controllata dopo ciascun ciclo di trattamento. I pazienti che sono negativi per MRD possono ricevere ulteriori cicli di trattamento.

Ad oggi, sono stati trattati diciassette pazienti con ALL o stanno ancora ricevendo un trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3. 14 pazienti hanno ricevuto il livello di dosi di 15 microgrammi/m²/24 ore di anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3, mentre in tre pazienti, la dose è stata incrementata da 15 a 30 microgrammi/m²/24 ore dopo il primo e ulteriori cicli di trattamento. Tutti questi pazienti con ALL avevano malattia minima residua (MRD): Undici di loro avevano MRD a causa di riarrangiamenti di immunoglobuline o TCR, due pazienti avevano traslocazioni t(4;11) e quattro pazienti avevano trascritti di fusione bcr/abl.

Come risultato, la risposta di MRD era valutabile in 16 pazienti su 17. 13 pazienti su 16 sono diventati negativi per la MRD, che corrispondeva ad un tasso di risposta molecolare completo straordinario del 81%. Più nello specifico, in nove di undici pazienti con riarrangiamenti di immunoglobuline o TCR, in uno di due pazienti con traslocazioni t(4;11) ed in tre di quattro pazienti con trascritti bcr/abl, poteva essere ottenuta la negatività per MRD. La durata più lunga di negatività per MRD osservata sinora in un paziente che non ha ricevuto un trapianto dopo il trattamento con anticorpi era di 41 settimane. Un altro paziente trattato con un anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 con negatività per MRD dal 23.06.2008 al 27.10.2008 ed avente ricevuto un trapianto allogenico di cellule staminali di successo in seguito è ad oggi senza ricadute.

E da notare, che i pazienti bcr/abl che possono essere trattati con successo con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 erano refrattari o intolleranti agli inibitori di tirosin chinasi imatinib e/o dasatinib in precedenti regimi di trattamento per ALL. Ad esempio, uno dei risponditori bcr/abl al trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 aveva una mutazione T315I che era refrattaria alla terapia con inibitori di tirosin chinasi. Pertanto, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 fornisce ora per la prima volta per pazienti con ALL refrattari a imatinib e/o dasatinib con i trascritti bcr/abl. Solo tre di un totale di 17 pazienti non sono diventati negativi per MRD. Tuttavia, in due di loro poteva essere ottenuta una malattia stabile. Solo



un paziente aveva una ricaduta testicolare seguita da una ricaduta ematologica dopo 19 settimane di negatività per MRD. Un paziente non era valutabile a causa di un grave evento avverso (SAE) sul giorno 2 di studio.

Riepilogando, un tasso di risposta molecolare completo eccezionale assoluto del 81% poteva essere ottenuto in pazienti adulti con ALL di precursori B dopo trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3.

5 L'attività dell'anticorpo menzionato poteva essere osservata in tutti i sottoinsiemi di pazienti con ALL trattati, compresi pazienti bcr/abl (T315I) refrattari ad inibitori di tirosin chinasi e pazienti con traslocazioni t(4;11). Questi sottoinsiemi di pazienti ALL sono considerati, in generale, incurabili, con una terapia di ALL standard convenzionale, eccetto per l'opzione di HSCT allogenico. In aggiunta, il trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 mostra un profilo di tossicità favorevole, al contrario rispetto a terapie di ALL convenzionali, come la chemioterapia. In vista di ciò, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 descritta qui, fornisce una nuova e vantaggiosa opzione di trattamento per la leucemia linfoblastica acuta (ALL) nell'adulto, in particolare per casi in cui la ALL è refrattaria a terapia di ALL convenzionale, come la chemioterapia e/o il HSCT allogenico. In aggiunta, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 fornisce ora per la prima volta una terapia per ALL positive per MRD.

15 Il metodo della presente invenzione fornisce i seguenti vantaggi principali:

1. Meno effetti avversi rispetto alle terapie convenzionali della leucemia linfoblastica acuta (ALL), compresi chemioterapia o HSCT allogenico. Le terapie di ALL convenzionali sono associate con rischi notevoli per la salute dei pazienti; vedi, ad esempio, Schmoll, Höffken, Possinger: Kompendium Internistische Onkologie, S. 2660 ff.; 4. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg).

20 2. Sebbene il HSCT allogenico sia considerato attualmente il trattamento di elezione nella ALL Ph+ nell'adulto, approssimativamente un terzo dei pazienti sottoposti a trapianto ha una ricaduta. I pazienti con ALL Ph+ mostrano il rischio maggiore di ricaduta tra tutti i pazienti tra i sottotipi di ALL. Come mostrato nei seguenti esempi, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è particolarmente appropriato per pazienti adulti con ALL con malattia minima residua (MRD). Questo è responsabile per la malattia minima residua (MRD) definita dalla traslocazione del cromosoma Philadelphia, così come per la MRD definita dal riarrangiamento di

25



immunoglobuline o di TCR o t(4;11). I pazienti con ALL dell'adulto, non adatti al trapianto di midollo osseo, che portano t(4;11) o pazienti con ALL Ph+ refrattari sono stati considerati sinora incurabili. I metodi farmaceutici dell'invenzione forniscono pertanto un approccio terapeutico per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione di MRD in ALL nell'adulto, riducendo in tal modo o persino abolendo il rischio di una ricaduta per il paziente. Vale la pena notare, che il trattamento curativo di pazienti con ALL positivi per MRD non è stato sinora disponibile.

3. In particolare, l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 può essere usato per la terapia di leucemia linfoblastica acuta (ALL) positiva per MRD refrattaria alla terapia convenzionale di ALL, come la chemioterapia, la somministrazione di inibitori di tirosin chinasi e/o HSCT.

4. Non solo l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 può sostituire le terapie convenzionali della leucemia linfoblastica acuta (ALL) in pazienti non adatti al HSCT allogenico, esso può anche essere usato per convertire i pazienti ALL adatti per detto trapianto a dare una condizione negativa per MRD, dato che i pazienti negativi per MRD hanno un rischio inferiore di ricadere dopo trapianto rispetto a pazienti positivi per MRD.

5. L'elevata attività citotossica dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 consente l'eliminazione delle cellule leucemiche nel midollo osseo.

La leucemia linfoblastica acuta (ALL), compresa la leucemia linfoblastica acuta dei precursori di cellule B e altri tipi di ALL della linea (di cellule) B ed i loro trattamenti sono descritti, ad esempio, in Pui e Evans, N. Engl. J. Med. 354 (2006), 166-178; Hoelzer e Gökbuget; Hematology (2006); 133-141; o Apostolidou et al., Drugs 67 (2007), 2153-2171. Informazioni con riferimento ad ALL possono anche essere trovate, ad esempio, in <http://www.cancer.gov>, <http://www.wikipedia.org> o <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

Il termine "anticorpo a catena singola bispecifico" o "anticorpo bispecifico a catena singola" o termini correlati in accordo con la presente invenzione indicano costrutti anticorpali risultanti dall'unione di almeno due regioni anticorpali variabili in una catena singola polipeptidica priva della(e) porzione(i) costante e/o Fc presente(i) nelle immunoglobuline complete. Un "linker", come usato qui, connette i domini V aventi la stessa specificità, mentre uno "spaziatore", come usato qui, connette i domini V aventi specificità differenti. Ad esempio, un anticorpo a catena singola bispecifico può essere un costrutto con un totale di due regioni variabili dell'anticorpo, ad esempio, due regioni



VH, ciascuna in grado di legare in modo specifico un antigene separato e connesse l'una con l'altra attraverso uno spaziatore polipeptidico sintetico corto (abituale inferiore a 10 amminoacidi), di modo che le due regioni variabili dell'anticorpo, con il loro spaziatore interposto esistono come catena polipeptidica singola contigua. Un altro esempio di un anticorpo bispecifico per a catena singola può essere una catena polipeptidica singola con tre regioni anticorpali variabili. Qui, due regioni variabili dell'anticorpo, ad esempio, una VH ed una VL, possono formare una scFv, in cui due regioni variabili dell'anticorpo sono connesse l'una all'altra attraverso un linker polipeptidico sintetico, quest'ultimo essendo geneticamente ingegnerizzato, in modo da essere minimamente immunogenico, rimanendo resistente al massimo alla proteolisi. Questo scFv è in grado di legare in modo specifico un particolare antigene ed è connesso ad un'ulteriore regione variabile dell'anticorpo, ad esempio, una regione VH, in grado di legare un antigene differenti rispetto a quello legato dalla scFv. Ancora un altro esempio di un anticorpo bispecifico a catena singola può essere una catena polipeptidica singola con quattro regioni anticorpali variabili. Qui, le prime due regioni variabili dell'anticorpo, ad esempio, una regione VH ed una regione VL, possono formare una scFv in grado di legare un antigene, mentre la seconda regione VH e la regione VL possono formare una seconda scFv in grado di legare un altro antigene. Entro una catena singola polipeptidica contigua, le singole regioni variabili dell'anticorpo di una specificità possono essere vantaggiosamente separate da un linker polipeptidico sintetico, come descritto sopra, mentre le rispettive scFv possono essere separate vantaggiosamente da uno spaziatore polipeptidico corto, come descritto sopra. Esempi non limitativi di anticorpi a catena singola bispecifico, così come metodi per produrli sono mostrati in WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 396,5-70; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-5; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-7; Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-103; Brühl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426.

Come usato qui, "CD3" denota un antigene espresso su cellule T, preferibilmente cellule T umane, come parte del complesso multimolecolare del recettore di cellule T, il CD3 consistendo in cinque differenti catene: CD3-epsilon, CD3-gamma, CD3-delta, CD3-eta e CD3 zeta. Il clustering di CD3 sulle T, ad esempio, mediante anticorpi anti-CD3 porta ad un'attivazione delle cellule T simile al legame di un antigene, ma è indipendente dalla specificità clonale del sottoinsieme di cellule T. Pertanto, il termine "anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3", come usato qui,



5 concerne un costrutto specifico per CD3 in grado di legare il complesso CD3 umano espresso su cellule T umane ed in grado di indurre l'eliminazione / lisi di cellule bersaglio, in cui tali cellule bersaglio portano / mostrano un antigene che è legato dall'altra porzione non legante CD3 dell'anticorpo a catena singola bispecifico. Il legame del complesso CD3 da parte di leganti specifici per CD3 (per esempio, un anticorpo a catena singola bispecifico come somministrato in
10 accordo con i metodi farmaceutici dell'invenzione) porta all'attivazione delle cellule T, come noto nell'arte, vedi, ad esempio, WO 99/54440 o WO 2007/068354. Di conseguenza, un costrutto appropriato per i metodi farmaceutici dell'invenzione è vantaggiosamente in grado di eliminare / lisare le cellule bersaglio in vivo e/o in vitro. Le cellule bersaglio corrispondenti comprendono cellule che esprimono un antigene tumorale, come CD19, che è riconosciuto dalla seconda specificità (ovvero, la porzione non legante CD3 dell'anticorpo a catena singola bispecifico) del costrutto
15 menzionato. Preferibilmente, detta seconda specificità è per CD19 umano, che è già stata descritta in WO 99/54440, WO 2004/106381 o WO 2007/068354. In accordo con questa forma di realizzazione, ogni porzione specifica per l'antigene dell'anticorpo a catena singola bispecifico comprende una regione VH dell'anticorpo e una regione VL dell'anticorpo. Una variante vantaggiosa di questo anticorpo a catena singola bispecifico è, dall'estremità N-terminale all'estremità C-terminale:

15 $V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 1).

Nel significato dell'invenzione, il termine "legame specifico" o i termini correlati, come "specificità" sono in grado di essere compresi, come caratterizzati principalmente da due parametri: un parametro qualitativo (l'epitopo di legame o *dove* un anticorpo si lega) ed un parametro quantitativo (l'affinità di legame o *quanto forte* questo anticorpo si
20 lega dove si lega). Quale epitopo sia legato da un anticorpo può essere vantaggiosamente determinato, ad esempio, con la metodologia FACS, ELISA, la mappatura di epitopi a spot con peptidi o la spettroscopia di massa. La forza del legame dell'anticorpo ad un particolare epitopo può essere vantaggiosamente determinata, ad esempio, mediante le metodologie note Biacore e/o ELISA. Una combinazione di tali tecniche consente il calcolo del rapporto segnale:rumore, come misura rappresentativa della specificità di legame. In un tale rapporto di segnale:rumore, il segnale rappresenta la forza del legame anticorpale all'epitopo di interesse, mentre il rumore rappresenta la forza del
25 legame dell'anticorpo all'altro degli epitopi non correlato, differente dall'epitopo di interesse. Un rapporto



segnale:rumore, ad esempio, di almeno 50, ma preferibilmente di circa 80 per un rispettivo epitopo di interesse, come determinato, ad esempio, mediante Biacore, ELISA o FACS può essere considerato come indicazione del fatto che l'anticorpo valutato legghi l'epitopo di interesse in modo specifico, ovvero, è un "legante specifico". Il termine "legare/interagire con" può concernere anche un epitopo conformazionale, un epitopo strutturale o un epitopo discontinuo, consistenti in due o persino più regioni delle molecole umane bersaglio o loro parti. Un epitopo conformazionale è definito da due o più sequenze amminoacidiche discrete separate nella sequenza primaria che si uniscono sulla superficie della molecola, quando il polipeptide si ripiega a dare la proteina nativa (Sela, (1969) Science 166, 1365 e Laver, (1990) Cell 61, 553-6). Il termine "epitopo discontinuo" indica epitopi non lineari che sono assemblati da residui da porzioni distanti della catena polipeptidica. Questi residui si uniscono sulla superficie della molecola, quando la catena polipeptidica si ripiega a dare una struttura tri-dimensionale per costituire un epitopo conformazionale/strutturale.

Il termine "trattamento", come usato qui, indica nel senso più ampio, procedure o applicazioni mediche che intendono alleviare la malattia. Nel presente caso, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 (preparato per la somministrazione ad un paziente adulto con ALL) come descritta qui è prevista per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione della malattia ALL in pazienti adulti.

Il termine "paziente", come usato qui è riferito ad un paziente umano adulto. Il termine "ALL dell'adulto" o "paziente adulto con ALL", come vi si fa riferimento qui, denotano adulti di età superiore a 18 anni, ovvero pazienti aventi 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 50 anni o più. Anche pazienti aventi 70, 75, 80, 85, 90, 100 anni o più possono essere trattati con i metodi dell'invenzione. L'età indicata dev'essere intesa come età dell'adulto al momento della diagnosi della malattia ALL.

Il termine "miglioramento", come usato qui, è sinonimo di miglioria. Se una condizione di ALL dell'adulto nel paziente mostra miglioramento, il paziente sta chiaramente meglio, ovvero vi è un miglioramento nella sua condizione. Ad esempio, può essere un miglioramento nella condizione di ALL nel paziente, se una stabilizzazione della malattia ALL può essere ottenuta (anche chiamata malattia stabile), ovvero, la malattia ALL non progredisce più. Ancor meglio, la leucemia linfoblastica acuta (ALL) positiva per MRD è convertita in una condizione negativa per MRD.



Il termine "eliminazione", come usato qui, significa la rimozione di cellule leucemiche da, corpo di un paziente adulto con ALL. Come mostrato nel seguente esempio, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è in grado di convertire la leucemia linfoblastica acuta (ALL) positiva per MRD in una condizione negativa per MRD in vari sottotipi di ALL.

5 Il termine "somministrazione", come usato qui, indica la somministrazione di una dose terapeuticamente efficace dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 menzionato precedentemente ad un individuo, ovvero un paziente umano.

Il paziente con ALL a cui si fa riferimento qui è un paziente adulto, come definito qui.

10 Con "quantità terapeuticamente efficace" si intende una dose che produce gli effetti per cui è somministrato, preferibilmente la conversione da una condizione della leucemia linfoblastica acuta (ALL) positiva per la malattia minima residua (MRD) in una condizione di ALL negativa per MRD. La dose esatta dipenderà dallo scopo del trattamento e potrà essere determinata da un esperto nell'arte usando tecniche note. Come noto nell'arte e descritto sopra, gli aggiustamenti in base al rilascio sistemico rispetto a quello localizzato, all'età, al peso corporeo, alla salute generale, al sesso, alla dieta, al tempo di somministrazione, all'interazione tra farmaci e alla gravità della condizione
15 saranno necessari e potranno essere determinati mediante una sperimentazione di routine da parte di coloro esperti nell'arte.

Il medico curante ed i fattori clinici determineranno il regime di dosaggio. Come ben noto nelle arti mediche, i dosaggi per uno qualsiasi dei pazienti dipenderanno da molti fattori del paziente, compresi la dimensione, l'area di superficie corporea, l'età, il particolare composto da somministrare, il tempo e la via di somministrazione, la condizione
20 di salute generale e altri farmaci somministrati in concomitanza.

Come ben noto nelle arti mediche, i dosaggi per uno qualsiasi dei pazienti dipenderanno da molti fattori del paziente adulto, compresi la dimensione, l'area di superficie corporea, l'età, il particolare composto da somministrare, il tempo e la via di somministrazione, la condizione di salute generale e altri farmaci somministrati in concomitanza. Una tipica dose sarà, ad esempio, negli intervalli esposti nelle forme di realizzazione dell'invenzione e negli esempi allegati;



tuttavia, dosi al di sotto o al di sopra di questo intervallo esemplificativo sono presi in considerazione, in particolare valutando i fattori menzionati precedentemente.

Il termine "infusione continua" è riferito ad un'infusione che è lasciata procedere permanentemente per un periodo di tempo, ovvero, senza interruzione. "Infusione continua" è riferito ad un'infusione somministrata permanentemente. Di conseguenza, nel contesto dell'invenzione, i termini "permanente" e "continuo", sono usati come sinonimi. Nel significato dell'invenzione, ad esempio, il termine "infusione continua per 4 settimane" denota una situazione nella quale l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 usato nei mezzi e nei metodi farmaceutici in accordo con l'invenzione è somministrato in continuo al corpo di un paziente adulto per un periodo di 4 settimane in modo prolungato e costante per l'intera durata richiesta nei metodi farmaceutici dell'invenzione. Gli schemi per la somministrazione continua dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono descritti in maggiore dettaglio in WO 2007/068354. Un'interruzione dell'introduzione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è evitata, ovvero una transizione da uno stato in cui l'anticorpo è somministrato al corpo del paziente ad una condizione in cui questo anticorpo non è più somministrato al corpo del paziente, non avviene o sostanzialmente non avviene per l'intera durata della somministrazione richiesta dai metodi farmaceutici dell'invenzione per altre ragioni, piuttosto che per rifornire la fornitura di anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 somministrato o per interventi medici che risultano necessari o simili. Dato che tale rifornimento necessaria porta ad un'interruzione temporanea dell'introduzione dell'anticorpo somministrato, tale somministrazione dev'essere intesa ancora come "non interrotta" o "permanente" ai sensi dei metodi farmaceutici in accordo con l'invenzione. Nella maggior parte dei casi, tale rifornimento sarà di una breve durata tale per cui il tempo nel quale l'anticorpo non è introdotto nel corpo del paziente sarà trascurabilmente piccolo, quando confrontato con il tempo pianificato per il regime di somministrazione generale in accordo con i metodi farmaceutici in accordo con l'invenzione. In accordo con l'invenzione, un ciclo di trattamento dev'essere inteso come un'infusione continua di 4 settimane dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 al paziente adulto con ALL, seguito da un intervallo di 2 settimane privo di trattamento. E' possibile che dopo una valutazione della MRD del(i) paziente(i) trattato(i) dopo una somministrazione continua di 4 settimane o dopo un ciclo di trattamento, possa essere diagnosticata una risposta minima o una risposta parziale al trattamento con l'anticorpo a



catena singola bispecifico. In questo caso la somministrazione continua può essere prolungata per altri uno, due, tre, quattro, cinque o persino fino a dieci cicli di trattamento per ottenere un miglior risultato terapeutico, per esempio, stabilizzare la malattia o persino ottenere una risposta completa. Preferibilmente, detta risposta completa è la negatività per MRD. In una forma di realizzazione alternativa, l'infusione continua di 4 settimane dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 al paziente adulto con ALL può essere seguita da HSCT allogenico. E' anche previsto che un paziente trattato con uno, due, tre, quattro o persino più cicli di trattamento, come esposto sopra, possa ricevere successivamente un trapianto HSCT allogenico.

5
10
15
Come mostrato nel seguente esempio, 13 pazienti adulti con ALL di 16 sono diventati negativi per MRD dopo trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3, corrispondendo ad un tasso straordinario di risposta molecolare completa del 81%. Più nello specifico, in nove di undici pazienti con riarrangiamenti di immunoglobuline o TCR, in uno di due pazienti con traslocazioni t(4;11) ed in tre di quattro pazienti con trascritti bcr/abl, poteva essere ottenuta la negatività per MRD. Preferibilmente, l'obiettivo terapeutico principale della somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3, solo o in combinazione con HSCT allogenico, ad un paziente adulto con ALL è la conversione da una condizione positiva per MRD in una condizione negativa per MRD, come definito qui.

20
La continuazione della somministrazione ininterrotta dell'anticorpo a catena singola bispecifico nel modo indicato dai metodi farmaceutici in accordo con l'invenzione per periodi di tempo più lunghi consente l'attivazione vantaggiosa delle cellule T menzionata negli esempi per esercitare il suo effetto per un tempo sufficientemente lungo ad eliminare vantaggiosamente tutte le cellule malate dal corpo. Dato che il tasso di anticorpo a catena singola bispecifico somministrato in modo ininterrotto è mantenuto basso, l'applicazione dell'agente terapeutico può essere continuata più a lungo senza il rischio di effetti collaterali deleteri per il paziente.

25
L'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 come usato qui è vantaggiosamente sotto forma di una composizione farmaceutica per la somministrazione ad un paziente umano a cui è stata diagnosticata la leucemia linfoblastica acuta (ALL). Il paziente umano è un adulto come definito qui sotto. Sebbene l'anticorpo a catena singola bispecifico come usato qui possa essere somministrato solo, la somministrazione è preferita in un trasportatore



farmaceuticamente accettabile. Esempi di trasportatori farmaceutici adatti sono ben noti nell'arte ed includono soluzioni saline tamponate con fosfati, acqua, liposomi, vari tipi di agenti umettanti, soluzioni sterili, ecc. Composizioni comprendenti tali trasportatori possono essere formulate con metodi convenzionali ben noti. Queste composizioni farmaceutiche possono essere somministrate al soggetto in una dose adatta. Il regime di dosaggio sarà determinato dal medico curante e in base a fattori clinici. Come ben noto nelle arti mediche, i dosaggi per uno qualsiasi dei pazienti dipenderanno da molti fattori del paziente, compresi la dimensione, l'area di superficie corporea, l'età, il particolare composto da somministrare, il tempo e la via di somministrazione, la condizione di salute generale e altri farmaci somministrati in concomitanza. Le preparazioni per la somministrazione parenterale includono soluzioni acquose o non acquose sterili o sospensioni. Esempi di solventi non acquosi sono propilen glicole, polietilen glicole e esteri organici iniettabili, come etil oleato. Trasportatori acquosi includono acqua, soluzioni acquose o sospensioni, compresi soluzioni saline e terreni tamponati. Veicoli parenterali includono soluzione di cloruro di sodio, destrosio di Ringer, destrosio e cloruro di sodio o Ringer lattato. I veicoli endovenosi includono rifornimenti di fluidi e nutrienti, rifornimenti di elettroliti (come quelli basati su destrosio di Ringer) e simili. Possono anche essere presenti conservanti o altri additivi come, ad esempio, antimicrobici, anti-ossidanti, agenti chelanti e gas inerti e simili. In aggiunta, la composizione può comprendere trasportatori proteici come, ad esempio, albumina serica o immunoglobulina, preferibilmente di origine umana. E' previsto che la composizione possa comprendere, oltre all'anticorpo a catena singola bispecifico proteico, altri agenti biologicamente attivi, a seconda dell'uso previsto della composizione farmaceutica. Tali agenti possono essere agenti che agiscono come citostatici, agenti che prevengono l'iperuricemia, agenti che inibiscono reazioni immunitarie (per esempio, corticosteroidi, FK506), farmaci che agiscono sul sistema circolatorio e/o agenti come molecole co-stimolanti le cellule T o citochine note nell'arte.

Preferibilmente, l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3, come definito qui è formulato in un tampone, uno stabilizzante ed un tensioattivo. Il tampone può essere un tampone fosfato, citrato, succinato o acetato. Lo stabilizzante può essere un amminoacido(i) e/o uno zucchero. I tensioattivi possono essere detergenti, PEG o simili. Più preferibilmente, l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3, come definito qui, è formulato in un citrato,



lisina, trealosio e Tween 80. Come diluenti per la composizione farmaceutica dell'invenzione, sono preferiti una soluzione salina isotonica e Tween 80.

Preferibilmente, negli usi o nei metodi dell'invenzione, la composizione farmaceutica dev'essere somministrata ad un paziente umano adulto a cui è stata diagnosticata la leucemia linfoblastica acuta (ALL).

5 Il successo della terapia con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 può essere monitorato con metodi standard consolidati per le entità della rispettiva malattia: Per la terapia di ALL di cellule B, possono essere usati separazione cellulare attivata da fluorescenza (FACS), aspirazione di midollo osseo e vari parametri chimici clinici specifici per la leucemia ed altri metodi standard stabiliti. I metodi ed i mezzi per la determinazione della condizione di malattia minima residua (MRD) sono stati descritti sopra.

10 La citotossicità può essere rilevata con metodi noti nell'arte e metodi come illustrati, ad esempio, in WO 99/54440, WO 2004/106381, WO 2007/068354.

15 In una forma di realizzazione preferita, la leucemia linfoblastica acuta (ALL) del(i) paziente(i) adulto(i) è refrattaria alla chemioterapia, preferibilmente refrattaria alla chemioterapia con riferimento alla MRD (ovvero, la MRD in questi pazienti con ALL è resistente alla chemioterapia). In modo ancor più preferito, la leucemia linfoblastica acuta (ALL) è refrattaria alla chemioterapia in pazienti non adatti per il HSCT allogenico.

20 Il termine "chemioterapia", come usato qui, denota la chemioterapia usata per il trattamento della leucemia linfoblastica acuta (ALL). La chemioterapia è il trattamento iniziale d'elezione per ALL. La maggior parte dei pazienti con ALL finiscono per ricevere una combinazione di trattamenti differenti. Nel trattamento di ALL, non vi sono opzioni chirurgiche, a causa dell'ampia distribuzione nel corpo delle cellule maligne. In generale, la chemioterapia citotossica per ALL combina molteplici farmaci anti-leucemici in varie combinazioni. La chemioterapia per ALL consiste in tre fasi: induzione della remissione, intensificazione e terapia di mantenimento. La chemioterapia è anche indicata per proteggere il sistema nervoso centrale dalla leucemia. L'obiettivo dell'induzione della remissione è quello di uccidere rapidamente la maggior parte delle cellule tumorali e portare il paziente in remissione. Questo è definito come la presenza inferiore al 5% di blasti leucemici nel midollo osseo (come determinato mediante microscopia ottica), cellule ematiche normali ed assenza di cellule tumorali dal sangue ed assenza di altri segni e sintomi della malattia. Ad

25



esempio, può essere usata una combinazione di prednisolone o desametasone (nei bambini), vincristina, asparaginasi e daunorubicina (usata in ALL dell'adulto) per indurre remissione. L'intensificazione usa elevate dosi di chemioterapia multifarmaco endovenosa per ridurre ulteriormente il carico tumorale. I protocolli tipici di intensificazione usano vincristina, ciclofosfamide, citarabina, daunorubicina, etoposide, tioguanina o mercaptopurina somministrati come blocchi in differenti combinazioni. Dato che le cellule di ALL penetrano talvolta nel sistema nervoso centrale (SNC), la maggior parte dei protocolli include la chemioterapia nel fluido del SNC (denominata chemioterapia intratecale). Alcuni centri rilasciano il farmaco attraverso il serbatoio di Ommaya (un dispositivo posizionato chirurgicamente sotto lo scalpo ed usato per rilasciare farmaci al fluido del SNC ed estrarre il fluido del SNC per vari test). Altri centri eseguono punture lombari multiple, come necessarie per il test ed il rilascio del trattamento. Il metotressato o la citarabina intratecali sono usate abitualmente per questo scopo. L'obiettivo della terapia di mantenimento è quello di uccidere qualsiasi cellula residua che non è stata uccisa dall'induzione della remissione e dai regimi di intensificazione. Sebbene tali cellule siano poche, esse causeranno una ricaduta, se non eradicata. A tal scopo, sono usati abitualmente la mercaptopurina orale giornaliera, il metotressato orale una volta alla settimana, un ciclo di 5 giorni una volta al mese di vincristina endovenosa e corticosteroidi orali. La durata della terapia di mantenimento è di 3 anni per i maschi, 2 anni per le femmine e gli adulti. La ricaduta nel sistema nervoso centrale è trattata con la somministrazione intratecale di idrocortisone, metotressato e citarabine (Hoffbrand et al., Essential Hematology, Blackwell, 5a edizione, 2006). Dato che i regimi chemioterapici possono essere intensivi e protratti (spesso per circa 2 anni nel caso dei protocolli GMALL UKALL, HyperCVAD o CALGB; circa 3 anni per i maschi nei protocolli COG), a molti pazienti è inserito un catetere endovenoso in una vena grande (denominato catetere venoso centrale o linea di Hickman) o un Portacath (un accesso a forma di cono con un ugello di silicone che è impiantato chirurgicamente sotto la pelle, abitualmente vicino alla clavicola).

La chemioterapia per ALL è stata descritta, ad esempio, in Schmoll, Höffken, Possinger (loc. cit.).

In vista di quanto sopra, il termine "refrattario alla chemioterapia", come usato qui, denota resistenza delle cellule di leucemia linfoblastica acuta alla chemioterapia.



I pazienti possono subire una ricorrenza di ALL dopo terapia iniziale e/o diventare refrattari alla chemioterapia in seguito al trattamento. I pazienti con ALL che sono refrattari alla chemioterapia hanno una prognosi notevolmente scarsa. In particolare, la prognosi di pazienti adulti con ALL Ph+ trattata solo con chemioterapia è scarsa, con una probabilità inferiore al 10% di sopravvivenza a lungo termine. Dato che i metodi farmaceutici dell'invenzione sono in grado di rendere i pazienti adulti con ALL negativi per MRD, essi sono particolarmente utile per il trattamento di pazienti con ALL refrattari alla chemioterapia.

Il termine "trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche", come usato qui, indica trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) o trapianto di midollo (BMT), che è una procedura medica nel campo dell'ematologia e dell'oncologia che coinvolge il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSC). E' spesso condotto in pazienti con malattia dei linfonodi, sangue o midollo osseo, come ALL. HSCT allogenico è una procedura in cui una persona riceve cellule staminali formanti sangue (cellule da cui si sviluppano tutte le cellule del sangue) da un donatore geneticamente simile, ma non identico. Questo è spesso un parente prossimo, come una madre, un padre, una sorella o un fratello, ma può anche essere un donatore non imparentato. La maggior parte dei riceventi un HSCT sono pazienti leucemici (per esempio, ALL) che beneficerebbero del trattamento con elevate dosi di chemioterapia o irraggiamento del corpo intero. Tuttavia, il HSCT allogenico rimane un trattamento rischioso e tossico.

Il termine "non adatto per HSCT", come usato qui, indica quei pazienti adulti per cui il HSCT allogenico non è il trattamento d'elezione, ad esempio, per cause mediche. Ad esempio, questo può essere il caso nel quale non è disponibile nessun donatore o il paziente ha superato il limite d'età superiore. Come mostrato nel seguente esempio, tutti i pazienti erano refrattari alla chemioterapia o, nel caso di ALL Ph+ erano anche refrattari o intolleranti alla tirosin chinasi prima di essere inclusi nello studio. Otto pazienti trattati con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 non erano adatti al HSCT allogenico, come ad esempio i pazienti 111-003, 108-002, 109-006 o 109-007.

Sinora, ALL era la condanna a morte per i pazienti refrattari alla chemioterapia e non adatti per il HSCT allogenico. I metodi farmaceutici dell'invenzione forniscono per la prima volta una terapia per questa popolazione di pazienti in quanto elimina la malattia minima residua (MRD) che causerebbe una ricaduta o ucciderebbe detti pazienti.



In una forma di realizzazione del metodo farmaceutici dell'invenzione, detto metodo è seguito da trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche o detto metodo sostituisce il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche in pazienti adulti adatti per il HSCT allogenico.

5 Il termine "adatto per il HSCT allogenico", come usato qui indica il HSCT allogenico è la terapia necessaria per il paziente adulto con ALL. In casi in cui il paziente con ALL è adatto per il HSCT allogenico possono essere previsti per i seguenti due scenari. Innanzitutto, in una forma di realizzazione, i metodi farmaceutici dell'invenzione, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 (solo o preferibilmente come composizione farmaceutica) possono essere usati per sostituire il HSCT allogenico usato come terapia convenzionale per i pazienti adulti con ALL adatti per il trapianto. Così i metodi farmaceutici dell'invenzione possono evitare i rischi per la salute per i pazienti con ALL associati con il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietici. In aggiunta, il 30% dei pazienti con ALL che hanno ricevuto un trapianto hanno abitualmente una ricaduta dopo il trapianto. Così i metodi ed i mezzi farmaceutici dell'invenzione possono essere usati per trattare questi pazienti. In una forma di realizzazione alternativa, l'infusione continua dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 al paziente adulto con ALL può essere seguita da trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche. In questa forma di realizzazione, la somministrazione di una composizione farmaceutica comprendente il costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 può essere usato per convertire pazienti con ALL adatti per il trapianto nella condizione negativa per MRD prima che essi ricevano il trapianto. Così, i metodi farmaceutici dell'invenzione possono essere usati per eliminare la MRD, che presentano un rischio inferiore di ricaduta rispetto al trattamento con trapianto di pazienti positivi per MRD. I presenti esempi, un paziente che è stato convertito innanzitutto in una condizione negativa per MRD dopo trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3, seguito da un trapianto allogenico. Sinora, questo paziente è rimasto negativo per MRD, la durata della negatività per MRD essendo di 47 settimane, ad oggi.

15
20
25 Rientra anche nell'ambito dei metodi farmaceutici dell'invenzione, che il costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 possa essere somministrato a pazienti adulti con ALL che hanno ricevuto un HSCT allogenico e successiva ricaduta.



In un'altra forma di realizzazione, i metodi farmaceutici dell'invenzione sono previsti per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione della malattia minima residua (MRD) in un paziente adulto con leucemia linfoblastica acuta (ALL).

5 Il termine "malattia minima residua (MRD)", come definito qui, denota una condizione patologica dopo
trattamento, ad esempio, con agenti chemioterapici, quando le cellule di leucemia non possono essere più trovate nel
midollo osseo con metodi di microscopia ottica. I test più sensibili, come citometria a flusso (metodi basati su FACS) o
reazione polimerasica a catena (PCR) devono essere usati per poter trovare prove che le cellule leucemiche sono rimasti
nel midollo osseo del paziente con ALL. Più nello specifico, la presenza di cellule leucemiche al di sotto del limite di
rilevamento citologico (cellule leucemiche al 5%) è definita come malattia minima residua (MRD). Se non è rilevabile
10 alcuna MRD ($<10^{-4}$, ovvero meno di 1 cellula leucemica per 10^4 cellule di midollo osseo) è raggiunta una remissione
molecolare completa. Una "condizione positiva per MRD" come definito qui indica un segnale bcr/abl o un segnale
t(4;11) al di sopra del limite superiore e/o mediante riarrangiamenti individuali di geni di immunoglobuline o di
recettori di cellule T (TCR) 10^{-4} di cui sopra. Una "condizione negativa per MRD" come definito qui indica un segnale
15 bcr/abl o un segnale t(4;11) al di sotto del limite superiore o mediante riarrangiamenti individuali di geni di
immunoglobuline o di recettori di cellule T (TCR) 10^{-4} di cui sotto. La condizione di MRD può essere misurata
mediante analisi PCR o FACS, in quanto i singoli riarrangiamenti dei geni delle immunoglobuline o riarrangiamenti dei
recettori di cellule T o i trascritti di fusione bcr/abl o t(4;11) sono rilevati quantitativamente. Ad esempio, l'analisi
mediante PCR può rilevare trascritti di fusione come bcr/abl o le traslocazioni t(4;11) e riarrangiamenti di cloni
individuali di geni di immunoglobuline (IgH) e/o di recettori di cellule T (TCR).

20 Le anomalie cromosomiali ricorrenti nelle cellule maligne di pazienti con leucemia linfoblastica acuta sono
segni caratteristici della malattia (Harrison e Foroni, Rev. Clin. J. Exp. Hematol. 6(2002):91-113). Aberrazioni
specifiche che sono frequentemente indicative di lesioni molecolari correlate alla base possono aiutare o persino
stabilire la diagnosi e determinare la terapia ottimale. Nella ALL dell'infanzia, sono stati identificati sottogruppi
citogenetici buoni e ad elevato rischio che sono regolarmente usati per stratificare pazienti in particolari terapie (Pui e
25 Evans, N. Engl. J. Med. 354(2006):166-178). Tuttavia, in ALL dell'adulto il ruolo della citogenetica nella gestione dei



5 pazienti stato ampiamente incentrato sulla presenza del cromosoma Philadelphia (Ph) che insorge abitualmente da t(9;22)(q34;q11.2) e porta alla fusione BCR-ABL (bcr/abl) (Faderl et al., Blood 91 (1998), 3995-4019). Sebbene l'incidenza generale di ALL Ph+ nell'adulto sia di approssimativamente il 25%, essa è correlata con l'età ed insorge fino ad oltre il 50% tra pazienti di oltre 55 anni di età (Appelbaum, American Society, of Clinical Oncology 2005 education book. Alexandria: ASCO, 2005: 528-532). Altre traslocazioni citogenetiche associate con specifiche anomalie genetiche molecolari in leucemia linfoblastica acuta (ALL) sono mostrate in Tabella 1.

Tabella 1:

Traslocazione citogenetica	Anormalità genetica molecolare
t(9;22)(q34;q11)	Fusione BCR-ABL (P185)
t(12;21)CRYPTIC	Fusione TEL-AML1
t(1;19)(q23;p13)	Fusione E2A-PBX
t(4;11)(q21;q23)	Fusione MLL-AF4
t(8;14)(q24;q32)	Fusione IGH-MYC
t(11;14)(p13;q11)	Fusione TCR-RBTN2

La citogenetica è stata riconosciuta in modo crescente come importante predittore dell'esito in ALL (Moormann et al., Blood 109 (2007), 3189-97).

10 Alcuni sottotipi citogenetici hanno una prognosi peggiore rispetto ad altri. Questi includono, ad esempio:

(i) Una traslocazione tra i cromosomi 9 e 22, il cromosoma Philadelphia (Ph+), si manifesta in circa 20% degli adulti e in circa 5% in casi pediatrici di ALL.

(ii) Una traslocazione tra i cromosomi 4 e 11 si manifesta in circa il 4% di casi ed è maggiormente comune in infanti sotto i 12 mesi.

15 I riarrangiamenti dei geni delle immunoglobuline o i riarrangiamenti dei recettori di cellule T (TCR) sono stati descritti nell'arte (vedi, ad esempio, Szczepanski et al., Leukemia 12 (1998), 1081-1088).

In un'altra forma di realizzazione preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione, detto paziente adulto è positivo per MRD nella remissione ematologica completa.



I termini "remissione" o "remissione ematologica", come usati qui devono essere intesi come presenza di nessuna prova di malattia dopo il trattamento, per esempio, dopo chemioterapia o trapianto. Questo significa che il midollo osseo contiene meno di 5% di blastociti, come determinato mediante microscopia ottica, le conte delle cellule del sangue sono entro i limiti normali e non vi sono segni o sintomi della malattia ALL. Una remissione molecolare completa indica che non vi sono prove di cellule leucemiche in biopsie del midollo osseo, anche quando si usano test molto sensibili, come la PCR. In altre parole: Se non è rilevabile alcuna MRD ($<10^{-4}$, ovvero < 1 cellula leucemica per 10^4 cellule di midollo osseo) è raggiunta una remissione molecolare completa.

Dopo remissione completa della(e) lesione(i) da leucemia in un paziente adulto umano con ALL mediante trattamento chemioterapico o trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, può essere il caso che non tutte le cellule siano state eliminate dal corpo. Tuttavia, queste cellule tumorali rimanenti possono dare origine a leucemia ricorrente. I metodi farmaceutici dell'invenzione possono essere usati per uccidere queste cellule tumorali rimanenti per prevenire la ricorrenza della leucemia (che origina dalle cellule di leucemia occulte che rimangono nel corpo dopo terapia primaria). In questo modo, i metodi farmaceutici aiutano a prevenire la ricaduta della malattia in pazienti adulti con ALL.

In un'altra forma di realizzazione dei metodi farmaceutici dell'invenzione, la somministrazione di detta composizione farmaceutica converte detta composizione farmaceutica converte la leucemia linfoblastica acuta (ALL) positiva per MRD in una condizione negativa per MRD.

In un'altra forma di realizzazione preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione la MRD è misurata con rilevamento quantitativo di singoli riarrangiamenti di geni delle immunoglobuline o riarrangiamenti dei recettori di cellule T (TCR) o mediante trascritti di fusione bcr/abl o t(4;11) usando analisi mediante PCR o FACS.

Come mostrato nei seguenti esempi, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è particolarmente appropriato per pazienti adulti con malattia minima residua (MRD). Questo è responsabile per la malattia minima residua (MRD) definita dalla traslocazione del cromosoma di Philadelphia o t(4;11), così come per la MRD definita dal riarrangiamento di immunoglobuline o riarrangiamenti di TCR. I metodi farmaceutici dell'invenzione forniscono pertanto un approccio terapeutico per il trattamento, il miglioramento o



l'eliminazione di MRD, riducendo in tal modo o persino abolendo il rischio di una ricaduta per il paziente adulto. E' da notare, che il trattamento curativo di MRD in pazienti con ALL non è stato sinora disponibile.

5 In un'altra forma di realizzazione preferita dei metodi dell'invenzione, detto paziente mostra un segnale bcr/abl o un segnale t(4;11) al di sopra del limite di rilevamento e/o almeno un marcatore mediante riarrangiamento con una sensibilità del $\geq 10^{-4}$.

Il termine "segnale bcr/abl o segnale di traslocazione t(4;11) al di sopra del limite di rilevamento" come usato qui indica che l'analisi PCR o FACS porta ad un segnale bcr/abl o t(4;11) rilevabili.

Come descritto qui, nei metodi farmaceutici dell'invenzione, il tempo di ricaduta molecolare (rilevabile con i saggi descritti sopra) è superiore a quattro mesi.

10 Il termine "ricaduta molecolare" come usato qui indica che detto paziente mostra un segnale bcr/abl o di traslocazione t(4;11) al di sopra del limite di rilevamento e/o almeno un marcatore mediante riarrangiamento con una sensibilità del $\geq 10^{-4}$.

Il termine "con una sensibilità del $\geq 10^{-4}$ " come usato qui indica che una o più di una cellula di leucemia possano essere rilevate in 10.000 cellule, in particolare cellule di midollo osseo.

15 In un'altra forma di realizzazione preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione, le regioni variabili della catena pesante (V_H) e le corrispondenti regioni variabili della catena leggera (V_L) in detto costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono disposte, dall'estremità N-terminale a quella C-terminale, nell'ordine V_L(CD19)-V_H(CD19)-V_H(CD3)-V_L(CD3).

20 Le corrispondenti regioni variabili della catena pesante (V_H) e delle corrispondenti regioni variabili della catena leggera (V_L) dei domini di legame di CD3 e CD19 dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono mostrate nelle SEQ ID NO. da 3 a 10, rispettivamente. Le corrispondenti regioni CDR delle rispettive regioni V_H e V_L anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono mostrate nelle SEQ ID NO. da 11 a 22.

25 In un'altra forma di realizzazione preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione, detto costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 comprende una sequenza amminoacidica come esposta in SEQ ID NO: 1, o una sequenza amminoacidica identica per almeno il 90%, preferibilmente almeno il 95% rispetto alla SEQ ID NO. 1.



L'invenzione descrive una molecola anticorpale a catena singola bispecifica comprendente una sequenza amminoacidica come illustrata in SEQ ID NO. 1, così come una sequenza amminoacidica identica per almeno il 90 % o preferibilmente per il 95 %, in modo maggiormente preferito identica al 96, 97, 98 o 99 % alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO.1. L'invenzione descrive anche la corrispondente sequenza di acidi nucleici come illustrata in SEQ ID NO. 2, così come una sequenza di acidi nucleici identica per almeno il 90 % o preferibilmente per il 95 %, in modo maggiormente preferito identica al 96, 97, 98 o 99 % alla sequenza di acidi nucleici di SEQ ID NO. 2. Dev'essere compreso che l'identità di sequenza è determinata per l'intero nucleotide o per l'intera sequenza amminoacidica. Inoltre, dev'essere compreso che una molecola anticorpale a catena singola bispecifica comprendente una sequenza amminoacidica identica per almeno il 90 % o preferibilmente per il 95 %, in modo maggiormente preferito identica al 96, 97, 98 o 99 % alla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO 1 contiene tutte le sequenze CDR mostrate in SEQ ID NO. da 11 a 22. Per gli allineamenti di sequenze, possono essere usati i programmi Gap o BestFit (Needleman e Wunsch J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453; Smith e Waterman, Adv. Appl. Math 2 (1981), 482-489), che è contenuto nel pacchetto di software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)). E' un metodo di routine per coloro esperti nell'arte determinare e identificare una sequenza nucleotidica o amminoacidica avente, ad esempio, il 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità di sequenze nucleotidiche o amminoacidiche dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 descritto qui. Ad esempio, in accordo con l'ipotesi di Crick's Wobble, la base in 5' sull'anti-codone non è spazialmente confinata come le altre due basi e può pertanto avere un appaiamento delle basi non standard. In altre parole: la terza posizione in una tripletta di codoni può variare che due triplette che differiscono in questa terza posizione possono codificare per lo stesso residuo amminoacidico. Detta ipotesi è ben nota alla persona esperta nell'arte (vedi, per esempio, http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis; Crick, J Mol Biol 19 (1966): 548-55).

In una forma di realizzazione preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione, un ciclo di trattamento è un'infusione continua di 4 settimane, seguita da cicli ripetuti dopo un intervallo di 2 settimane privo di trattamento o mediante un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.



In un'altra forma di realizzazione preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione, il ciclo di trattamento è ripetuto almeno tre volte, preferibilmente quattro, cinque, sei, sette o persino fino a dieci volte dopo la determinazione di una condizione negativa per MRD (consolidamento).

5 In un'altra forma di realizzazione preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione, l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 deve essere somministrato in una dose giornaliera da 10µg a 100µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente.

10 Come usato qui, un intervallo di dosi che è definito come "da X a Y" equivale ad un intervallo che è definito come "tra X e Y". L'intervallo include il limite superiore ed anche il limite inferiore. Questo indica che ad esempio una dose giornaliera da 10µg a 100µg per area di superficie corporea del paziente in metri quadri include da "10µg" e "100µg".

15 In una forma di realizzazione ancora più preferita dei metodi farmaceutici dell'invenzione, l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 deve essere somministrato in una dose giornaliera di 15µg, 30µg, 60 µg or 90 µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente. In modo ancor più preferito, detto anticorpo dev'essere somministrato in una dose giornaliera da 15 a 30 µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente, in modo maggiormente preferito in una dose giornaliera di 15 o 30 µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente.

L'area di superficie corporea media di un paziente adulto è calcolato così nel contesto del metodo farmaceutico o dell'uso in accordo con l'invenzione dev'essere in un intervallo da 1,7 a 2,2 m².

20 Vantaggiosamente, la composizione comprendente l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 come descritto qui comprende inoltre opzionalmente (a) tampone(i) di reazione, soluzioni di conservazione e/o reagenti o materiali rimanenti necessari per il metodo o l'uso menzionati. Inoltre, detti componenti possono essere confezionati singolarmente in fiale o in bottiglie o in combinazione in contenitori o in unità multicontenitore.

Per poter valutare la sicurezza e la tollerabilità dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 come descritto qui, il composto deve essere somministrato mediante infusione continua a lungo termine.



E' stato trovato che gli effetti benefici ed inattesi dei metodi farmaceutici dell'invenzione possono essere ottenuti somministrando l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 in una dose giornaliera da 10 microgrammi a 100 microgrammi per metro quadrato di area di superficie corporea. La dose giornaliera può essere mantenuta costante per il periodo di somministrazione. Tuttavia, rientra anche nell'ambito di questa forma di realizzazione che il(i) giorno(i) iniziale(i) del periodo di infusione sia somministrata una dose inferiore dell'anticorpo a catena singola bispecifico ("dose iniziale") prima dei metodi farmaceutici descritti qui, mentre per il periodo di infusione rimanente può essere applicata una dose maggiore ("dose di mantenimento"). Ad esempio, 5 grammi di anticorpo a catena singola bispecifico per metro quadro di area di superficie corporea possono essere somministrati al(i) primo(i) giorno(i) del periodo di infusione, seguito dalla somministrazione di 15 microgrammi per metro quando di superficie corporea come dose giornaliera per il rimanente periodo di trattamento. Oppure, 15 grammi di anticorpo a catena singola bispecifico per metro quadro di area di superficie corporea possono essere somministrati al(i) primo(i) giorno(i) del periodo di infusione, seguito dalla somministrazione di 30 o 45 microgrammi per metro quadro di superficie corporea come dose giornaliera per il rimanente periodo di trattamento. La dose iniziale può essere somministrata per uno, due o più giorni o persino per una settimana (sette giorni). E' anche previsto che 5 microgrammi di anticorpo a catena singola bispecifico per metro quadro di area di superficie corporea possono essere somministrato al(i) primo(i) giorno(i) del periodo di infusione, seguito dalla somministrazione di 15 microgrammi di anticorpo a catena singola bispecifico per metro quadro di area di superficie corporea al(i) seguente(i) giorno(i) del periodo di infusione, seguito dalla somministrazione di 45 microgrammi per metro quadro di superficie corporea come dose giornaliera (di mantenimento) per il periodo di trattamento rimanente. L'area di superficie corporea media di un paziente adulto è calcolato così nel contesto del metodo farmaceutico o dell'uso in accordo con l'invenzione dev'essere in un intervallo da 1,7 a 2,2 m².

In un'altra forma di realizzazione dei metodi e degli usi dell'invenzione, la dose è incrementata dopo il primo ciclo di trattamento o successivi, ad esempio, da 15 a 30 o 60 o persino 90 microgrammi/m²/24 ora.

La somministrazione ininterrotta dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 può essere endovenosa, parenterale, sottocutanea, transdermica, intraperitoneale, intramuscolare o polmonare. La modalità



5 endovenosa di somministrazione sarà la modalità d'elezione nella maggior parte dei casi per la somministrazione ininterrotta dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 e, a seconda del caso, per la co-somministrazione di un agente farmaceutico come parte di un regime di co-terapia. Come tale, la somministrazione endovenosa è particolarmente preferita. In questo caso, può essere scelto vantaggiosamente un dispositivo di misurazione adatto come pompa di infusione multi-terapia, modello 6060 prodotto da Baxter. Qualsiasi dispositivo di misurazione sia scelto, dovrebbe essere di progettazione e costruzione tali da minimizzare o meglio precludere un'interruzione della somministrazione dell'agente terapeutico nell'evento di sostituzione della cartuccia e/o sostituzione o ricarica della batteria. Questo può essere ottenuto, ad esempio, scegliendo un dispositivo con un serbatoio secondario della soluzione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 oltre alla cartuccia da sostituire, di modo che l'infusione continua da questo serbatoio secondario in un paziente può continuare anche quando la cartuccia vuota o quasi vuota è rimossa o sostituita con una nuova.

10 Una modalità di somministrazione e, a seconda del caso, di co-somministrazione come parte di un regime di co-terapia coinvolge l'impianto di una pompa nel corpo del paziente per misurare tale somministrazione. Uno di ordinaria esperienza nell'arte è a conoscenza di tali pompe di misurazione, ad esempio, il modello 6060 prodotto da Baxter, come esposto sopra.

15 Come esempio non limitativo, può essere prevista che la somministrazione ininterrotta, ovvero continua, debba essere realizzata con un piccolo sistema di pompa o impiantato nel paziente per dosare l'influsso dell'agente terapeutico nel corpo del paziente. Tali sistemi di pompe sono generalmente noti nell'arte e si basano comunemente sullo scambio periodico di cartucce contenenti l'agente terapeutico da infondere. Quando si sostituisce la cartuccia in un tale sistema di pompe, può seguire un'interruzione temporanea del flusso altrimenti non interrotto di agente terapeutico nel corpo del paziente. In un tale caso, la fase di somministrazione prima della sostituzione della cartuccia e la fase di somministrazione in seguito alla sostituzione della cartuccia sarebbe considerato nel significato dei metodi farmaceutici dell'invenzione per creare una "somministrazione ininterrotta" di tale agente terapeutico. Lo stesso potrebbe essere applicabile per somministrazione molto lunghe in cui la cartuccia necessiterebbe sostituzione più di una volta o in cui le



batterie che guidano la pompa necessiterebbero la sostituzione, portando ad una temporanea interruzione del flusso della soluzione terapeutica nel corpo del paziente.

5 Dovrebbero essere intraprese anche misure per minimizzare il rischio di infezione al sito di iniezione della somministrazione nel corpo del paziente, dato che tali ferite a lungo termine siano particolarmente predisposte a tale infezione. Quanto sopra è applicabile anche per la somministrazione endovenosa con un simile sistema di rilascio.

10 La somministrazione continua può essere transdermica per mezzo di un cerotto portato sulla pelle e sostituito ad intervalli. Uno avente esperienza nell'arte è a conoscenza di sistemi di cerotti per il rilascio di farmaci adatti a tal scopo. E' da notare che la somministrazione transdermica è particolarmente appropriata per la somministrazione ininterrotta, dato che lo scambio di un primo cerotto esausto può essere eseguita vantaggiosamente contemporaneamente con il posizionamento di un secondo nuovo cerotto, ad esempio sulla superficie della pelle immediatamente adiacente al primo cerotto esaurito e immediatamente prima della rimozione del primo cerotto esausto. Non sono insorte problematiche di interruzione del flusso o di insuccesso della batteria.

15 In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la somministrazione continua è ottenuta mediante una via polmonare, ad esempio, attraverso un tubo in una o in entrambe le narici del naso, il tubo essendo connesso ad un serbatoio pressurizzato, il cui contenuto è precisamente dosato.

Inoltre, l'invenzione concerne un costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso in un metodo per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione della leucemia linfoblastica acuta (ALL) dell'adulto in un paziente adulto.

20 L'invenzione concerne l'uso di un costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per la preparazione di una composizione farmaceutica per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione della leucemia linfoblastica acuta (ALL) dell'adulto. Preferibilmente, detta leucemia linfoblastica acuta (ALL) è leucemia linfoblastica acuta della linea di cellule B, più preferibilmente leucemia linfoblastica acuta di precursori di cellule B. In una forma di realizzazione preferita degli usi medici menzionati, detta leucemia linfoblastica acuta (ALL) è refrattaria alla chemioterapia in pazienti non adatti per il HSCT allogenico.



In una forma di realizzazione alternativa degli usi medici menzionati, la somministrazione del costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è seguita da HSCT allogenico o detti usi sostituiscono HSCT allogenico in pazienti adatti per il HSCT allogenico.

5 In un'altra forma di realizzazione degli usi medici menzionati, il costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3, i metodi farmaceutici dell'invenzione sono previsti per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione della malattia minima residua (MRD) in un paziente adulto con leucemia linfoblastica acuta (ALL). Preferibilmente, detto paziente è positivo per MRD in remissione ematologica completa.

10 In un'ulteriore forma di realizzazione preferita degli usi medici menzionati, la somministrazione di detto anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 porta ad una malattia stabile o converte la leucemia linfoblastica acuta (ALL) positiva per MRD in una condizione negativa per MRD. Preferibilmente, la MRD è misurata con rilevamento quantitativo di singoli riarrangiamenti di geni delle immunoglobuline o riarrangiamenti dei recettori di cellule T (TCR) o mediante trascritti di fusione bcr/abl o t(4;11) usando analisi mediante PCR o FACS.

15 In modo ancor più preferito, il paziente con ALL mostra un segnale bcr/abl o t(4;11) al di sopra del limite di rilevamento e/o almeno un marcatore mediante riarrangiamento con una sensibilità del $\geq 10^{-4}$. In un'altra forma di realizzazione preferita degli usi medici menzionati, il tempo fino alla ricaduta molecolare rilevabile con i metodi di rilevamento indicati è superiore a 4 mesi.

20 In un'altra forma di realizzazione preferita degli usi medici menzionati, le regioni variabili della catena pesante (VH) e le corrispondenti regioni della catena leggera (VL) in detto costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono disposte, dall'estremità N-terminale a quella C-terminale, nell'ordine $V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})$.

Preferibilmente, detto costruito a catena singola bispecifico per CD19xCD3 comprendente una sequenza amminoacidica come illustrata in SEQ ID NO. 1, o una sequenza amminoacidica identica per almeno il 90%, preferibilmente il 95% rispetto alla SEQ ID NO. 1.

25 In una forma di realizzazione ulteriormente preferita degli usi medici menzionati, un ciclo di trattamento è un'infusione continua di 4 settimane, seguita da cicli ripetuti dopo un intervallo di 2 settimane privo di trattamento.



Preferibilmente, il ciclo di trattamento è ripetuto almeno tre volte, dopo determinazione di una condizione negativa per MRD (consolidamento).

5 In un'altra forma di realizzazione preferita degli usi medici menzionati, l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 deve essere somministrato in una dose giornaliera da 10µg a 100µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente.

Preferibilmente, il costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 deve essere somministrato in una dose giornaliera da 15µg a 30µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente.

Le definizioni e le spiegazioni come fornite con riferimento ai metodi farmaceutici dell'invenzione si applicano mutatis mutandis agli usi medici del costruito anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 descritto qui.

10 Le Figure mostrano:

Figura 1: Modalità di azione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3. L'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 (blinatumomab o MT103) reindirizza le cellule T citotossiche positive per CD3 per eliminare le cellule umane di leucemia linfocitica acuta che portano l'antigene CD19.

15 Figura 2: Esempio del corso della malattia minima residua (MRD). Le misurazioni basate su PCR del riarrangiamento di TCR (MRD) in un paziente con leucemia linfoblastica acuta (cALL) 109-002 mostra una positività per MRD prima del trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 e una negatività per MRD in corso dopo il 1° ciclo con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3.

20 Figura 3: Cinetica delle cellule T di cellule T CD4 e CD8 del paziente 109-002 durante il ciclo 1 di trattamento. Esempio rappresentativo della farmacodinamica che mostra rapida distribuzione delle cellule T ed un aumento principalmente nel numero di cellule T citotossiche CD8.

Figura 4: Cinetica delle cellule T di sottoinsiemi di cellule T del paziente 109-002 durante il ciclo 1 di trattamento. Esempio rappresentativo della farmacodinamica, che mostra rapida redistribuzione di cellule T ed espansione delle cellule T effettrici della memoria (TEM). Le cellule T native non si sono espanse.



Figura 5: Primi quattro pazienti che sono stati arruolati nello studio di fase II. Tutti i pazienti avevano ricevuto precedentemente regimi standard di chemioterapia per ALL in accordo con protocolli GMALL comprendenti almeno un trattamento di consolidamento.

5 Figura 6: Le risposte della malattia minima residua nei pazienti con ALL indicati (ovvero, i primi quattro pazienti arruolati nello studio di Fase II) dopo il primo ciclo di trattamento con l'anticorpo a catena singola specifico CD19xCD3.

10 Figura 7: Aggiornamento sulle risposte della malattia minima residua (MRD). In nove di undici pazienti con riarrangiamenti di immunoglobuline o TCR, in uno di due pazienti con traslocazioni t(4;11) ed in tre di quattro pazienti con trascritti bcr/abl, poteva essere ottenuta la negatività per MRD. In somma, 13 di 16 pazienti valutabili (81%) sono diventati negativi per MRD.

15 Figura 8: Durata della negatività per la malattia minima residua (MRD) (condizione come al 25.05.2009). La durata più lunga di negatività per MRD osservata sinora nel paziente 108-001 che non ha ricevuto un trapianto dopo il trattamento con anticorpi era di 41 settimane. Il paziente 111-001 con negatività per MRD dal 23.06.2008 al 27.10.2008 dopo trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 e che ha ricevuto un successivamente un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche di successo è privo di ricadute fino ad oggi. La freccia indica che la risposta è in corso (condizione al 25 maggio, 2009). Il paziente 109-002 (*) aveva una ricaduta testicolare seguita da ricaduta ematologica dopo 19 settimane di negatività per MRD.

L'invenzione è ulteriormente illustrata dal seguente esempio:

Esempio:

20 1. La generazione, l'espressione e l'attività citotossica dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono state descritte in WO 99/54440. Le corrispondenti sequenze amminoacidiche e di acidi nucleici dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono mostrate nelle SEQ ID NO. 1 e 2, rispettivamente. Le regioni VH e VL del dominio legante CD3 dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono mostrate nelle SEQ ID NO. da 7 a 10, rispettivamente, mentre le regioni VH e VL del dominio legante CD19 dell'anticorpo a



catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono mostrate nelle SEQ ID NO. Le corrispondenti regioni CDR sono mostrate nelle SEQ ID NO. da 11 a 22.

2. Il test di fase I in corso in pazienti con B-NHL con ricaduta mostra elevata velocità di risposta a 60µg/m²/giorno dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3. Le risposte hanno una durata fino a oltre 12 mesi (in corso per diversi pazienti). La rimozione delle cellule di B-NHL infiltranti il midollo osseo è iniziata a 15µg/m²/giorno (Bargou et al., Science 2008).

3. Sulla base di questi risultati, è stato progettato uno studio di fase II con incremento di dosi in collaborazione con il German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GMALL) per analizzare l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 in pazienti con leucemia linfoblastica acuta (ALL) adulti (non sottoposti a trapianto) che hanno ottenuto una completa remissione ematologica, ma che sono rimasti ancora positivi per la malattia minima residua (MRD). La MRD è un fattore prognostico indipendente che riflette principalmente la resistenza a farmaci e è associato con un alto rischio di ricaduta dopo l'inizio del consolidamento. Questo può essere applicato per ALL positiva e negativa per Ph+/BCR-ABL. La MRD è stata misurata con metodi standardizzati mediante rilevamento quantitativo di singoli riarrangiamenti di immunoglobuline e riarrangiamenti di recettori di cellule T (TCR) o mediante trascritti di fusione bcr/abl o traslocazioni t(4;11). La popolazione di studio include pazienti adulti con leucemia linfoblastica acuta (ALL) di precursori di cellule B che mostrano bcr/abl o un segnale t(4;11) al di sopra del limite di rilevamento e/o almeno un marcatore mediante riarrangiamento con una sensibilità del $\geq 10^{-4}$. Più nello specifico, i principali criteri di inclusione includevano:

○ Pazienti con ALL di precursori di cellule B nella remissione ematologica completa con insufficienza molecolare o ricaduta molecolare a partire in qualsiasi momento dopo consolidamento I della terapia di prima linea con protocolli standard.

○ I pazienti devono avere un marcatore molecolare per la valutazione della malattia minima residua che è bcr/abl o una traslocazione t(4;11) a qualsiasi livello di rilevamento di riarrangiamento individuale della immunoglobulina o geni di TCR misurata con un saggio avente una sensibilità di minima di 10^{-4} ed un intervallo quantitativo fino a 10^{-4} per almeno un marcatore.



Il punto finale principale dello studio di fase II (in corso) è il tasso di conversione verso lo stato negativo per la malattia minima residua (MRD) come definito da bcr/abl o un segnale t(4;11) al di sotto del limite di rilevamento e/o mediante il rilevamento di singoli riarrangiamenti di geni di immunoglobuline o di recettori di cellule T (TCR) al di sotto di 10^{-4} . I punti finali secondari sono tempo rispetto a ricaduta ematologica, tempo rispetto a progressione di MRD e tempo rispetto a ricaduta molecolare. Un ciclo di trattamento dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è un'infusione endovenosa continua per 4 settimane, che può essere seguita da un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche dopo il primo ciclo o ulteriori cicli o mediante cicli ripetuti dopo un intervallo di 2 settimane senza trattamenti. La condizione di malattia minima residua (MRD) è controllata dopo ciascun ciclo di trattamento. Il livello di dose di partenza è 15 microgrammi/m²/24 ore, che può essere incrementato a 30 microgrammi/m²/24 ore e a livelli di dosi superiori (60 microgrammi/m²/24 ore o 90 microgrammi/m²/24 ore) sulla base dell'attività clinica e di dati di sicurezza. Per la progettazione statistica, è usata una progettazione in due fasi MinMax di Simon (da 14 a 21 pazienti).

In seguito, i dati dei primi quattro pazienti arruolati nello studio sono presentati a titolo esemplificativo in maggiore dettaglio. Questi quattro pazienti, di età 31, 57, 62 e 65 hanno ricevuto il livello iniziale di dosi di 15 microgrammi/m²/24 ore. Come mostrato in Figura 5, ai pazienti no. 111001, 109002 e 110002 è stata diagnosticata c-ALL, mentre il paziente no. 108001 è un paziente pre-B-ALL. I quattro pazienti avevano ricevuto precedentemente regimi standard di chemioterapia per ALL in accordo con protocolli GMALL comprendenti almeno un trattamento di consolidamento. Tutti loro erano refrattari alla chemioterapia con riferimento alla malattia minima residua (MRD). Più nello specifico, tutti i pazienti erano positivi per MRD in remissione ematologica completa. I pazienti no. 110002, 108001 e 109002 non erano adatti al trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, mentre il paziente no. 111001 era adatto per detto trapianto.

Come mostrato in Figura 6, tre dei primi 4 pazienti arruolati nello studio avevano malattia minima residua (MRD) mediante riarrangiamenti di immunoglobuline o TCR ai livelli di 10^{-4} (paziente no. 111001), 10^{-3} (paziente no. 108001) e 10^{-1} (paziente no. 109002) ed un paziente (paziente no. 110002) avevano MRD mediante trascritti bcr/abl ad un livello di 10^{-4} . Tre dei 3 pazienti, ovvero i pazienti no. 111001, 108001 e 109002 con riarrangiamenti di



immunoglobuline o TCR sono diventati negativi dopo il primo ciclo di trattamento, indipendentemente dal livello di positività per MRD alla base. Il paziente no. 111001, l'unico dei quattro pazienti adatto per il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, hanno ricevuto un trapianto dopo essere stati convertiti a negatività per MRD dopo trattamento con anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3.

5 La Figura 2 fornisce un esempio del corso della malattia minima residua (MRD) nel paziente 109002. Le misurazioni basate su PCR del riarrangiamento di TCR (MRD) nel paziente 109002 con leucemia linfoblastica acuta comune (cALL) mostra una positività per MRD prima del trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 (Blinatumomab) e una negatività per MRD prolungata dopo il 1° ciclo con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 e durevole fino alla settimana 19. In seguito il paziente aveva una ricaduta testicolare, seguita da una ricaduta ematologica.

10 L'altro paziente avente il no. 110002 aveva un livello stabile di bcr/abl senza segni di ricaduta ematologica dopo il ciclo iniziale di trattamento; vedi Figura 6.

Il trattamento dei pazienti con anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è stato ben tollerato: Ad eccezione della febbre nei primi 3 giorni di trattamento, non sono registrate tossicità clinicamente significative.

15 Nel frattempo, sono stati trattati diciassette pazienti o stanno ancora ricevendo un trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3, fino ad oggi. Tutti i pazienti erano refrattari alle terapie convenzionali di ALL, compresa la chemioterapia, prima del trattamento con anticorpi. Nessuno di loro ha ricevuto un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche prima del trattamento con anticorpi. L'età media dei pazienti era 48 anni, variando da 20 a 77 anni. Dieci dei pazienti erano femmine, sette erano pazienti maschi. 14 pazienti hanno ricevuto il

20 livello di dose di 15 microgrammi/m²/24 ore di anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3, mentre in tre pazienti, la dose è stata incrementata da 15 a 30 microgrammi/m²/24 ore dopo il primo o ulteriori cicli di trattamento; nel paziente 109-004 l'incremento della dose è stata eseguita dopo il secondo ciclo di trattamento (con un totale di tre cicli di trattamento, seguito da trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche), nel paziente 109-003 dopo il terzo ciclo di trattamento (con un totale di quattro cicli di trattamento) e nel paziente 110-002 dopo il sesto ciclo di

25 trattamento (con un totale di sette cicli di trattamento). Undici di questi pazienti avevano malattia minima residua



(MRD) a causa di riarrangiamenti di immunoglobuline o TCR, due pazienti avevano traslocazioni t(4;11) e quattro pazienti avevano trascritti di fusione bcr/abl.

5 Come risultato, la risposta di MRD era valutabile in 16 pazienti su 17. Come mostrato in Figura 7, 13 pazienti valutabili su 16 sono diventati negativi per la MRD, che corrispondeva ad un tasso di risposta molecolare completo straordinario del 81%. Più nello specifico, in nove di undici pazienti con riarrangiamenti di immunoglobuline o TCR, in uno di due pazienti con traslocazioni t(4;11) ed in tre di quattro pazienti con trascritti bcr/abl, poteva essere ottenuta la negatività per MRD. Come mostrato in Figura 8, la durata più lunga della negatività per MRD nel paziente 108-001 non
10 .avente ricevuto un trapianto dopo il trattamento con anticorpi osservata sinora è 41 settimane. Un altro paziente con negatività per MRD da 23.06.2008 a 27.10.2008 ed avente ricevuto un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche di successo dopo il trattamento con anticorpi è privo di ricadute, ad oggi, vedi il paziente 111-001 in
15 Figura 8. E da notare, che i pazienti bcr/abl che possono essere trattati con successi con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 erano refrattari o intolleranti agli inibitori di tirosin chinasi imatinib e/o dasatinib in precedenti regimi di trattamento per ALL. In particolare, uno dei risponditori bcr/abl al trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 aveva una mutazione T315I che è refrattaria alla terapia con inibitori di
20 tirosin chinasi. Pertanto, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 fornisce ora per la prima volta per pazienti con ALL refrattari a dasatinib con i trascritti bcr/abl. Solo tre di un totale di 17 pazienti non sono diventati negativi per MRD. Tuttavia, in due di loro poteva essere ottenuta una malattia stabile. Solo un paziente con malattia iniziale stabile aveva una ricaduta ematologica nel terzo ciclo di trattamento. Un paziente non era valutabile a causa di un SAE al giorno 2 di studio.

20 Riepilogando, un tasso di risposta molecolare completo eccezionale assoluto del 81% poteva essere ottenuto in pazienti con ALL di precursori B dopo trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3. L'attività dell'anticorpo menzionato poteva essere osservata in tutti i sottoinsiemi di pazienti trattati, compresi pazienti bcr/abl (T315I) refrattari ad inibitori di tirosin chinasi e pazienti con traslocazioni t(4;11). In aggiunta, il trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 mostra un profilo di tossicità favorevole, al contrario rispetto a
25 terapie di ALL convenzionali, come la chemioterapia. In vista di ciò, la somministrazione dell'anticorpo a catena



singola bispecifico per CD19xCD3 descritta qui, fornisce una nuova e vantaggiosa opzione di trattamento per la leucemia linfoblastica acuta (ALL), in particolare per casi in cui la ALL è refrattaria a terapia di ALL convenzionale, come la chemioterapia. In aggiunta, somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 fornisce ora per la prima volta una terapia per ALL positive per MRD.

5 Questi risultati aggiornati indicano che il trattamento dei pazienti con leucemia linfoblastica acuta (ALL) con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 è in grado di convertire la leucemia linfoblastica acuta (ALL) positiva per la malattia minima residua (MRD) in una condizione negativa per MRD (come esemplificato dai pazienti con ALL con riarrangiamenti di immunoglobuline o TCR, trascritti bcr/abl o traslocazioni t(4;11) e che tale trattamento è ben tollerato. In vista di ciò, la somministrazione dell'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3 descritta
10 qui, fornisce un'opzione di trattamento alternativa specialmente per la leucemia linfoblastica acuta (ALL) nell'adulto, in particolare per ALL refrattaria a terapia di ALL convenzionale, come la chemioterapia e/o il HSCT. Il trattamento con l'anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD13 è particolarmente vantaggioso per il trattamento della ALL positiva per MRD.



ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> Micromet AG

<120> Nuovo trattamento della leucemia linfoblastica acuta

<130> P3255 PCT S3

5 <150> 61/112,323 <151> 07/11/2008

<150> 61/183,291 <151> 02/06/2009

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 498

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>



<221> fonte

<223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3"

<400> 1

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



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
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> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

5 <223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: anticorpo a catena singola bispecifico per CD19xCD3"

<400> 2

```
gatatccagc tgaccagtc tccagcttct ttggetgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttattt gaactggtag 120
caacagattc caggacagcc acccaactc ctcctctatg atgcatcaa tctagtttct 180
gggatccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggaga aggtggatgc tgcaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
acgttcggtg gagggaccaa gctcgagatc aaaggtggtg gtggttctgg cggcggcggc 360
```



tccgggtggtg	gtggttctca	ggtgcagctg	cagcagctctg	gggctgagct	ggtgaggcct	420
gggtcctcag	tgaagatttc	ctgcaaggct	tctggctatg	cattcagtag	ctactggatg	480
aactgggtga	agcagaggcc	tggacagggt	cttgagtgga	ttggacagat	ttggcctgga	540
gatggtgata	ctaactacaa	tggaaagtcc	aagggtaaag	ccactctgac	tgcagacgaa	600
tcctccagca	cagcctacat	gcaactcagc	agcctagcat	ctgaggactc	tgcgggtctat	660
ttctgtgcaa	gacgggagac	tacgacggta	ggccggtatt	actatgctat	ggactactgg	720
ggccaagggg	ccacggtcac	cgtctcctcc	ggagggtggtg	gatccgatat	caaactgcag	780
cagtcagggg	ctgaactggc	aagacctggg	gcctcagtga	agatgtcctg	caagacttct	840
ggctacacct	ttactaggta	cacgatgcac	tgggtaaaac	agaggcctgg	acagggctctg	900
gaatggattg	gatacattaa	tcctagccgt	ggttatacta	attacaatca	gaagttcaag	960
gacaaggcca	cattgactac	agacaaatcc	tccagcacag	cctacatgca	actgagcagc	1020
ctgacatctg	aggactctgc	agtctattac	tgtgcaagat	attatgatga	tcattactgc	1080
cttgactact	ggggccaagg	caccactctc	acagtctcct	cagtcgaagg	tggaagtgga	1140
ggttctggtg	gaagtggagg	ttcaggtgga	gtogacgaca	ttcagctgac	ccagttctca	1200
gcaatcatgt	ctgcatctcc	aggggagaag	gtcaccatga	cctgcagagc	cagttcaagt	1260
gtaagttaca	tgaactggta	ccagcagaag	tcaggcacct	cccccaaaag	atggatttat	1320
gacacatcca	aagtggcttc	tggagtccct	tatcgcttca	gtggcagtg	gtctgggacc	1380
tcatactctc	tcacaatcag	cagcatggag	gctgaagatg	ctgccactta	ttactgcaa	1440
cagtgagta	gtaaccegt	cacgttcggt	gctgggacca	agctggagct	gaaa	1494

<210> 3

<211> 124



< 212> PRT

< 213> Sequenza artificiale

<220>

< 221> fonte

5 < 223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: VH anti CD19"

<400> 3

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

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

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



35 40 45

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 372

<212> DNA

5 <213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: VH anti CD19"



<400> 4

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

<210> 5

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: VL anti CD19"

10 <400> 5



<220>

<221> fonte

<223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: VL anti CD19"

<400> 6

gatatccagc tgacccagtc tcagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagggcacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggcg atagtattt gaactggtac 120
caacagattc caggacagcc acccaaactc ctcatctatg atgcatcaa tctagttct 180
gggatccac ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcacct caacatccat 240
cctgtggaga aggtggatgc tgaacctat cactgtcagc aaagtactga ggatccgtgg 300
5 acgttcggtg gagggaccaa gctcgagatc aaa 333

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

10 <220>

<221> fonte



<223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: VH anti CD3"

<400> 7

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

<210> 8

5

<211> 357



<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

5 <223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: VH anti CD3"

<400> 8

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

<210> 9

<211> 106

10 <212> PRT

<213> Sequenza artificiale



<220>

<221> fonte

<223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: VL anti CD3"

<400> 9

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

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

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

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
           85           90           95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
           100           105
```

5

<210> 10



<211> 318

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

5 <221> fonte

<223> /note="Descrizione della sequenza artificiale: VL anti CD3"

<400> 10

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

<210> 11

10 <211> 15

<212> PRT



< 213> Sequenza artificiale

<220>

< 221> fonte

< 223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD19L1"

5 <400> 11

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

<210> 12

< 211> 7

< 212> PRT

10 < 213> Sequenza artificiale

<220>

< 221> fonte

< 223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD19 L2"

<400> 12



Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD19 L3"

<400> 13

10 Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT



< 213> Sequenza artificiale

<220>

< 221> fonte

< 223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD19 H1"

5 <400> 14

Ser	Tyr	Trp	Met	Asn
1				5

<210> 15

< 211> 17

< 212> PRT

10 < 213> Sequenza artificiale

<220>

< 221> fonte

< 223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD19 H2"

<400> 15



< 212> PRT

< 213> Sequenza artificiale

<220>

< 221> fonte

5 < 223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD3 H1"

<400> 17

Arg	Tyr	Thr	Met	His
1				5

<210> 18

< 211> 17

10 < 212> PRT

< 213> Sequenza artificiale

<220>

< 221> fonte

< 223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD3 H2"



<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

5

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD3 L1"

<400> 20

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

10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>



< 221> fonte

< 223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD3 L2"

<400> 21

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
1 5

5 <210> 22

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Sequenza artificiale

<220>

10 < 221> fonte

< 223> /nota="Descrizione della sequenza artificiale: anti-CD3 L3"

<400> 22

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
1 5



Rivendicazioni

1. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso in un metodo per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione di leucemia linfoblastica acuta (ALL) in un paziente adulto.
2. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 1, in cui detta
5 leucemia linfoblastica acuta (ALL) è una leucemia linfoblastica acuta della linea di cellule B, preferibilmente una leucemia linfoblastica acuta dei precursori di cellule B.
3. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 1 o 2, in cui detta leucemia linfoblastica acuta (ALL) è refrattaria alla chemioterapia in pazienti che non sono adatti al trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.
- 10 4. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 1 o 2, seguito dal trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche o in cui detto metodo sostituisce il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche in pazienti adatti al trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.
5. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il metodo è previsto per il trattamento, il miglioramento o l'eliminazione della malattia minima residua
15 (MRD) in un paziente con leucemia linfoblastica acuta (ALL).
6. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 5, in cui detto paziente è positivo per MRD in remissione ematologica completa.
7. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 5 o 6, in cui la somministrazione di detta composizione farmaceutica porta alla stabilizzazione della malattia e converte la leucemia
20 linfoblastica acuta (ALL) positiva per MRD in una condizione negativa per MRD.
8. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 5 a 7, in cui la MRD è misurata con rilevamento quantitativo di singoli riarrangiamenti di geni delle immunoglobuline o riarrangiamenti dei recettori di cellule T (TCR) o mediante trascritti di fusione bcr/abl o mediante traslocazioni t(4;11) usando analisi mediante PCR o FACS.



9. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui le corrispondenti regioni variabili della catena pesante (VH) e le corrispondenti regioni variabili della catena leggera (VL) in detto costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 sono disposte, dall'estremità N-terminale a quella C-terminale, nell'ordine $V_L(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD19})\text{-}V_H(\text{CD3})\text{-}V_L(\text{CD3})$.
- 5 10. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 9, in cui detto costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 comprende una sequenza amminoacidica come esposta in SEQ ID NO: 1, o una sequenza amminoacidica identica per almeno il 90%, preferibilmente il 95% rispetto alla SEQ ID NO. 1.
- 10 11. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui un ciclo di trattamento è un'infusione continua di 4 settimane, seguita da cicli ripetuti dopo un intervallo di 2 settimane prive di trattamento.
12. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 11, in cui il ciclo di trattamento è ripetuto almeno tre volte dopo la determinazione di una condizione negativa per MRD (consolidamento).
- 15 13. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui il costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 deve essere somministrato con una dose giornaliera da 10 µg a 100 µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente.
14. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 13, cui il costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 deve essere somministrato con una dose giornaliera da
- 20 15µg a 30µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente.
15. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui il costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 deve essere somministrato con una dose giornaliera di 15µg, 30µg, 60µg o 90µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente.
- 25 16. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui il costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 dev'essere somministrato in una

D.ssa Federica TRUPIANO (USBM-CPI-026 BM)



dose di 5µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente al(i) primo(i) giorno(i) del periodo di infusione, seguito dalla somministrazione di 15µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente durante il(i) seguente(i) giorno(i) del periodo di infusione, seguito dalla somministrazione di 45µg per metro quadrato di area di superficie corporea del paziente come dose giornaliera per il restante periodo di trattamento.

- 5 17. Costrutto anticorpale a catena singola bispecifico per CD19xCD3 per l'uso della rivendicazione 16, in cui la dose iniziale dev'essere somministrata per uno, due o più giorni o per sette giorni.

10

Il sottoscritto dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale.

15

D.ssa Federica TRUPIANO (USBM-CPI-026 BM)



20

TAVOLA I

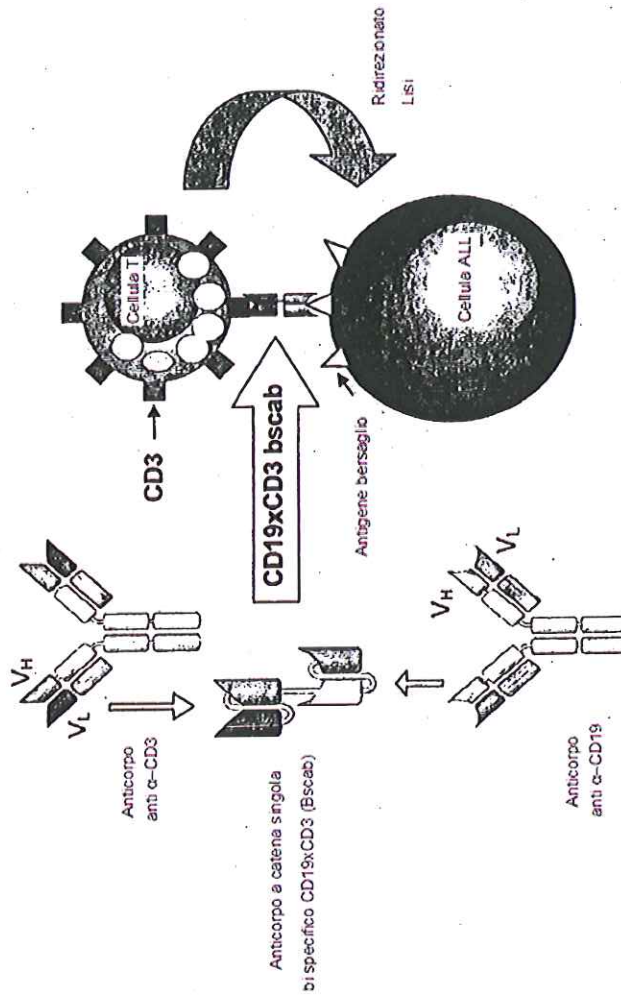


Figura 1

TAVOLA II

Figure 2

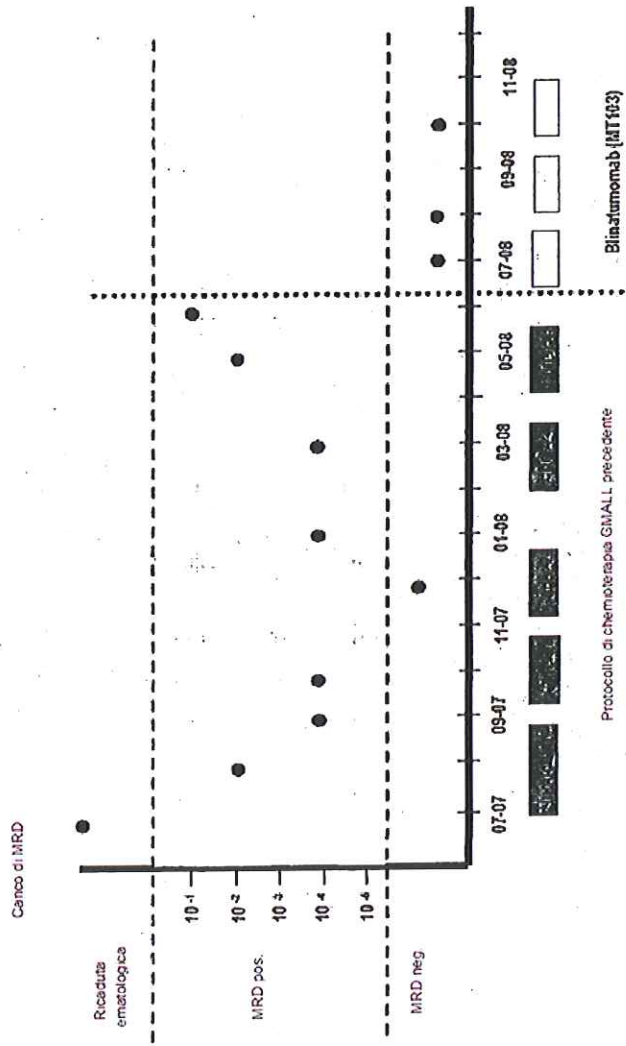




TAVOLA III

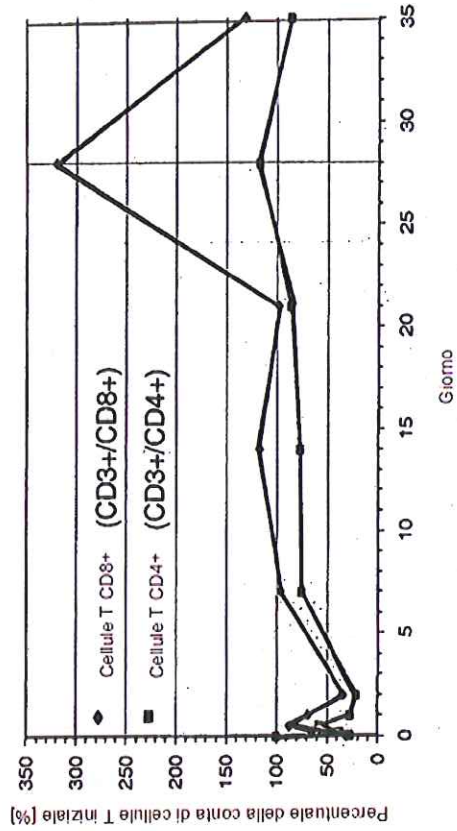


Figura 3

TAVOLA IV



Figura 4



TAVOLA V

Numero del paziente	Genere – Età	Diagnosi	M/RD
111001	Femmina, 31 anni	C-ALL	Riarrangiamento di Ig
108001	Femmina, 57 anni	Pre-B-ALL	Riarrangiamento di Ig
109002	Maschio, 62 anni	C-ALL	Riarrangiamento di TCR
110002	Maschio, 65 anni	C-ALL	bcr/abi

Figura 5

TAVOLA VI

Numero del paziente	Screening	Condizione di MRD dopo il primo ciclo	Follow up
111001	8×10^{-4}	Negative	Negativo per MRD da 23.06.2008 a 27.10.2008 Trapianto di cellule staminali allogeniche di successo Nessuna ricaduta ad oggi
108001	1×10^{-3}	Negative	Condizione negativa per MRD in corso da 07/28/2008
109002	1×10^{-1}	Negative	Ricaduta testicolare seguita da ricaduta ematologica dopo 19 settimane di negatività per MRD
110002	bcr/abl 1.73×10^{-4}	5.54×10^{-4}	Condizione di MRD stabile in corso

Figura 6



TAVOLA VII

	Numero dei pazienti	Negatività per MRD ottenuta
Riarrangiamenti individuali (immunoglobuline o TCR)	11	9
Trislocazione t(4;11)	2	1
Positivo per bcr/abl	4	3
Totale	17	13
Tasso di risposta di MRD tra 16 pazienti valutabili		81%

Figura 7



TAVOLA VIII

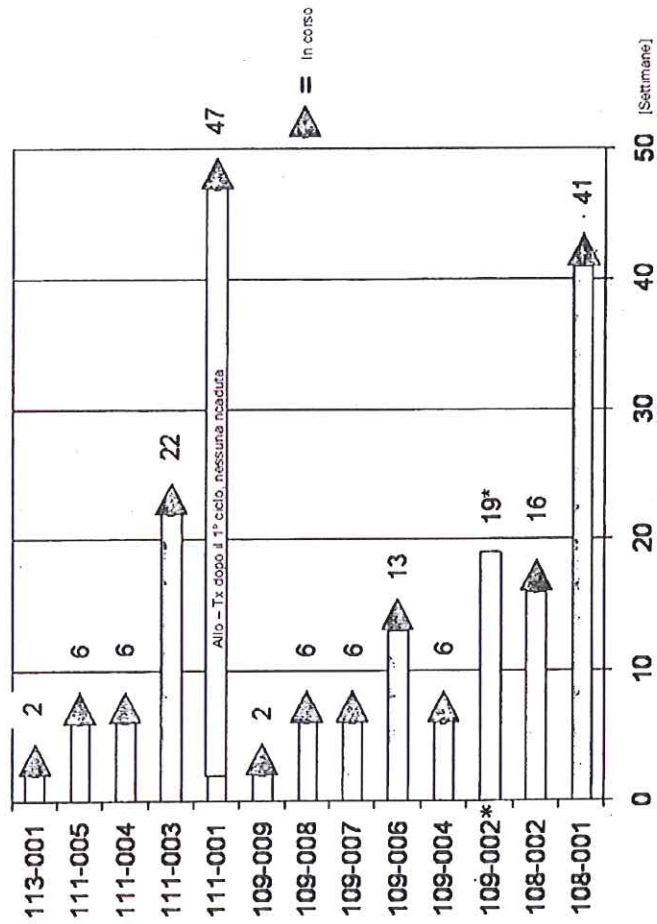


Figure 8