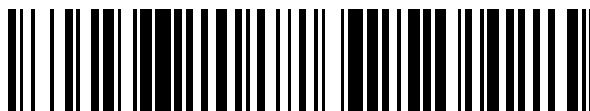


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 764**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/737** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2014** **PCT/EP2014/052406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014** **WO14122251**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2014** **E 14707953 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020** **EP 2953630**

54 Título: **Adhesión antileucocitaria para mitigación de posibles eventos adversos causados por dominios de unión específicos de CD3**

30 Prioridad:

**08.02.2013 US 201361762718 P**  
**12.04.2013 US 201361811526 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.03.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KLINGER, MATTHIAS;**  
**HOFFMANN, PATRICK;**  
**NAEGELE, VIRGINIE;**  
**DOPFER, ELAINE-PASHUPATI;**  
**NAGORSEN, DIRK;**  
**SCHEELE, JUERGEN;**  
**ZUGMAIER, GERHARD y**  
**KUFER, PETER**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 811 764 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Adhesión antileucocitaria para mitigación de posibles eventos adversos causados por dominios de unión específicos de CD3

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en esencia a un compuesto no glucocorticoide que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas para uso en un método de profilaxis y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente como se define en las reivindicaciones. Asimismo, la presente invención se refiere a kits que comprenden cualquiera de estos compuestos no glucocorticoides junto con un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 como se define en las reivindicaciones, una composición farmacéutica que comprende un compuesto no glucocorticoide junto con un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 como se define en las reivindicaciones y un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso en un método para redirigir células T contra células diana en un paciente como se define en las reivindicaciones.

15 Se mencionan varios documentos en el texto de la presente memoria. El contenido del presente documento no debe interpretarse como una admisión de que la invención no está autorizada a preceder en fecha la descripción de los documentos citados en la presente invención (incluidas todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.). Si el material contradice o no concuerda con la presente memoria, la memoria suplantarán a dicho material.

Antecedentes de la invención

20 En 2012, las malignidades de las células B constituyeron aproximadamente el 5 % de los tipos de cáncer recién diagnosticados en EE. UU. Las tasas de incidencia ajustadas por edad para leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma no Hodgkin de células B (B-NHL) fueron 1,6, 4,2 y 16,5 cada 100.000 hombres y mujeres por año, respectivamente (Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2009\\_pops09/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/), en base a la presentación de datos de SEER de noviembre de 2011, publicada en el sitio web de SEER, 2012). A pesar de los tratamientos estándar intensivos repetidos, las malignidades de las células B pueden volverse refractarias o recidivantes después de la terapia y frecuentemente permanecen incurables. Por lo tanto, existe una gran necesidad médica de modalidades de tratamiento innovadoras para mejorar el resultado en estas poblaciones de pacientes.

35 Las terapias antineoplásicas basadas en anticuerpos requieren un antígeno diana firmemente unido a la superficie de las células cancerosas con el fin de estar activas. Al unirse a la diana superficial, el anticuerpo puede suministrar directamente una señal letal a la célula cancerosa o indirectamente, por ejemplo, reclutando una célula T citotóxica, si es un anticuerpo biespecífico. En un escenario de tratamiento ideal, un antígeno diana está en abundancia presente en cada célula de cáncer y está ausente, protegido o mucho menos abundante en células normales. Esta situación sirve de base para una ventana terapéutica en la que una cantidad definida del agente terapéutico basado en anticuerpos afecta a las células cancerosas pero salva las células normales.

40 Los anticuerpos monoclonales se añadieron primero a una quimioterapia estándar hace aproximadamente 20 años, aun así, no se ha comprobado que esta combinación sea completamente curativa en malignidades de las células B. En los últimos años, un nuevo planteamiento terapéutico con anticuerpos monocatenarios biespecíficos se ha sometido a estudios clínicos y ha demostrado resultados iniciales promisorios. Los anticuerpos multiespecíficos, como los anticuerpos biespecíficos, que redirigen las células T, son de especial interés para el tratamiento de células diana cancerosas. El redireccionamiento de las células T implica que las células T estén equipadas con una especificidad receptora de antígenos que difiere de la especificidad del receptor de antígenos natural clonotípico de las células T, es decir, las células T redirigidas comprenden, por ejemplo, un dominio de unión que reconoce dichas células diana de cáncer. Esto se puede lograr, p. ej., vinculando las células T con anticuerpos bi- o multi-funcionales o derivados de anticuerpos, como anticuerpos biespecíficos que comprenden, entre otros, un dominio de unión específico de CD3, o por transducción de las células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR) como CAR que reconocen CD19 (véase Knochenderfer et al., Nature Reviews 2013; Clinical Oncology; "Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors"). Los anticuerpos biespecíficos que se dirigen a CD19 o CD20 en las células B y CD3 en las células T son de especial interés para el tratamiento de malignidades de las células B. Blinatumomab (algunas veces también indicado como AMG 103 o MT103) es un anticuerpo scFv biespecífico de CD19xCD3 recombinante que consiste en cuatro dominios variables de inmunoglobulina ensamblados en una sola cadena de polipéptidos. Dos de los dominios variables forman el sitio de unión para CD19 que es un antígeno de la superficie celular expresado en la mayoría de las células B normales y malignas. Los otros dos dominios variables forman el sitio de unión para CD3 que es parte del complejo receptor de células T en células T. Al unirse a CD19 en una célula B normal o maligna y vincularse de manera concomitante a una célula T mediante CD3, Blinatumomab induce la formación de una sinapsa citolítica (Offner et al. Mol Immunol. 2006; 43:763-71), conduciendo así a la erradicación de

la célula B unida. Blinatumomab está diseñado para redirigir en forma policlonal las células T citotóxicas contra múltiples células B tumorales.

Se han efectuado varios estudios clínicos que evalúan la seguridad y eficacia de Blinatumomab se han dirigido tanto en B-NHL (Bargou et al. Science. 2008; 321:974-7) como en ALL precursora de B (Topp et al. J Clin Oncol. 2011; 29:2493-8). Estos estudios establecieron pruebas clínicas del concepto de gran potencial terapéutico del formato de anticuerpo monocatenario biespecífico en general y de Blinatumomab en especial y validaron su posterior desarrollo en B-NHL, ALL y CLL.

Aunque los anticuerpos son un medio eficaz para tratar muchos trastornos, en particular cáncer, su administración no necesariamente está desprovista de efectos colaterales. El llamado síndrome de liberación de citocinas (CRS) que le sigue a la administración de un anticuerpo biespecífico de CD19 x CD3 se ha descrito, por ejemplo, en el documento WO2012/146394. Höpfner et al. 2003 ("Selectin-blocking semisynthetic sulfated polysaccharides as promising anti-inflammatory agents", 1 de enero de 2003, páginas 697-706, XP55277326, DOI: 10.1211/0022357021107) describe la capacidad de P-selectina de unirse a moléculas de adhesión endotelial. Un "efecto colateral" que a veces también se indica como "efecto adverso" o más frecuentemente como "evento adverso" (algunas veces se indica como "EA") en estudios clínicos, es un efecto perjudicial e indeseado que resulta de la medicación en el tratamiento de un paciente con una célula T redirigida, por ejemplo, mediante un anticuerpo multiespecífico o más preferiblemente un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio de unión específico de CD3. Los efectos adversos pueden causar un cambio reversible o irreversible en el estado de salud de un paciente. Como los eventos adversos podrían ser perjudiciales y potencialmente incluso mortales, se desea en gran medida evitarlos.

No obstante, es difícil diseñar una terapia que comprenda redirigir las células T contra células diana en un paciente (por ejemplo una terapia basada en anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19xCD3) que no causa síntomas neurológicos, o en otros términos, se desea dar a conocer una terapia, por ejemplo una terapia basada en anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19xCD3 con mayor tolerabilidad del paciente, es decir, menos efectos colaterales perjudiciales o incluso ninguno tal como EA del SNC. Se desea particularmente mitigar EA del SNC hasta un grado tal de evitar la interrupción del tratamiento debido a EA del SNC, permitiendo así que los pacientes se beneficien plenamente con el tratamiento.

Existe una fuerte necesidad en la técnica de dar a conocer medios y métodos que atenúen o incluso eviten los efectos colaterales anteriormente mencionados que típicamente acompañan una terapia basada en células T redirigidas (como una terapia que hace uso de un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3).

La presente invención aborda esta necesidad y por lo tanto da a conocer, como una solución al problema técnico, un compuesto que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas para uso en un método de profilaxis y/o mejoría y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir células T contra células diana en un paciente.

Realizaciones adicionales de la presente invención se caracterizan y describen en este documento y también se reflejan en las reivindicaciones.

#### Compendio de la invención

La presente invención da a conocer un compuesto no glucocorticoide que (a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o (b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas para uso en un método de profilaxis y/o tratamiento de eventos adversos neurológicos causados por la administración de un medicamento que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, en donde dicho medicamento es un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde el compuesto no glucocorticoide se ha de administrar antes y en forma concomitante con (i) una dosis inicial, (ii) una re-exposición; y/o (iii) un incremento de dicha administración de un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde dichos eventos adversos neurológicos son uno o más de desorientación/confusión, dificultad para encontrar las palabras/afasia, convulsiones, temblores cinéticos, ataxia, disartria y problemas para escribir, en donde dicho paciente es un mamífero.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un compuesto no glucocorticoide que (a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o (b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas, para uso en un método de profilaxis y/o tratamiento de eventos adversos neurológicos causados por la administración de un medicamento que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, en donde dicho medicamento es un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde el compuesto no glucocorticoide se ha de administrar antes y en forma concomitante con (i) una dosis inicial, (ii) una re-exposición; y/o (iii) un incremento de dicha administración de un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde dichos eventos adversos neurológicos son uno o más de desorientación/confusión, dificultad para encontrar las palabras/afasia, convulsiones, temblores cinéticos, ataxia, disartria y problemas para escribir, en donde dicho paciente es un mamífero.

La presente descripción también da a conocer un método para identificar un compuesto para uso en un método de profilaxis y/o mejoría y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir células T contra células diana en un paciente, que comprende:

- 5 (a) poner en contacto dicho compuesto con una célula T mamífera, una célula endotelial mamífera, una molécula de adhesión de células T y/o una molécula de adhesión endotelial; y
- (b) evaluar si dicho compuesto:
  - (i) reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas;
  - (ii) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T,
  - (iii) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T,
  - 10 (iv) inhibe o reduce la expresión de una molécula de adhesión de células T,
  - (v) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial,
  - (vi) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, y/o
  - (vii) inhibe o reduce la expresión de una molécula de adhesión endotelial.

- 15 Como se describe en este documento, una terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, incluye una célula T genéticamente modificada que tiene un receptor de antígeno quimérico (CAR).

El compuesto no glucocorticoide que se ha de usar de acuerdo con la presente invención se ha de administrar antes y/o en forma concomitante con una dosis inicial, una re-exposición (es decir, una re-dosis, tal como por ejemplo una etapa de administración subsiguiente) y/o un incremento de la dosis de dicha terapia (que es práctica común cuando se administra por ejemplo un anticuerpo) que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente.

- 20 La presente invención da a conocer también un kit que comprende un compuesto no glucocorticoide que (a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o (b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, o que (c) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o (d) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas, junto con un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3.

- 25 También se describe un kit que comprende un compuesto como se define o identifica de acuerdo con la presente descripción, junto con un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR).

- 30 La presente invención también da a conocer una composición farmacéutica que comprende un compuesto no glucocorticoide que (a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o (b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, o que (c) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o (d) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas, junto con un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3.

- 35 La presente invención se refiere además a un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso en un método para redirigir células T contra células diana en un paciente, en donde dicho paciente está sujeto a terapia que comprende un compuesto no glucocorticoide que (a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o (b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, o que (c) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o (d) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas, en donde dicho paciente es un mamífero.

- 40 La presente descripción también se refiere a un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) para uso en un método de redirigir células T contra células diana en un paciente, en donde dicho paciente está sujeto a terapia que comprende el compuesto que se define en este documento.

- 45 El anticuerpo monocatenario biespecífico descrito en este documento comprende un dominio de unión que es específico de células B, preferiblemente específico de un marcador CD que se puede hallar en linfoma de células B tal como CD19, CD22, CD20 o CD79a, en donde se prefiere CD19. Dicho anticuerpo monocatenario biespecífico es un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 o CD20 x CD3.

El receptor de antígeno quimérico (CAR) descrito en este documento comprende un dominio de unión que es específico de células B, preferiblemente específico de un marcador CD que se puede hallar en un linfoma de células B tal como CD19, CD22, CD20 o CD79a, en donde se prefiere CD19.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, dicho anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 es Blinatumomab (algunas veces indicado como MT103 o AMG103).

En otra realización preferida de la presente invención, dicho paciente se caracteriza por una relación de células B/T de menos de 1:5 o un número de células B de menos de aproximadamente 50 células B por  $\mu\text{l}$  de sangre periférica.

- 5 Se contempla que el compuesto no glucocorticoide que se ha de utilizar en el contexto de la presente invención se selecciona entre los compuestos descritos en este documento.

Se describe también en este documento un método para la profilaxis, mitigación y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, en donde dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto definido en este documento.

En una realización de la presente invención, dichas células T mamíferas, cuya unión a células endoteliales mamíferas es reducida o inhibida por el compuesto no glucocorticoide que se define en este documento, son células T mamíferas redirigidas.

- 15 Se contempla también que las células endoteliales mamíferas mencionadas en el contexto de la presente invención como se describe en este documento, se aíslan de vasos sanguíneos grandes o capilares.

En una realización, dichas células endoteliales mamíferas se seleccionan entre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) o células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC), en donde se prefieren las HBMEC.

- 20 La molécula de adhesión de células T se selecciona, en el contexto de la presente invención, entre integrinas (como alfa4-integrinas; alfaL-beta2-integrinas, alfaL-integrinas, beta7-integrinas), selectinas (como L-selectina) y/o CD44.

La molécula de adhesión endotelial se selecciona, en el contexto de la presente invención, entre selectinas (como E- o P-selectina); moléculas de adhesión celular CAM (como ICAM-1, MAdCAM, VCAM-1) y/o PAR-1.

En el contexto de la presente invención, dicho paciente es un mamífero, preferiblemente un primate, y lo más preferiblemente un ser humano.

- 25 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Cursos de tiempo ilustrativos de marcadores de farmacodinamia seleccionados durante la semana 1 de tratamiento de un paciente con B-NHL tratado con una dosis de Blinatumomab de  $60 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  en un estudio clínico de fase 1. Se muestran los recuentos/porcentaje celular y concentración de proteínas en sangre periférica y suero, respectivamente. A. Redistribución de células T caracterizada por una rápida desaparición de células T de sangre periférica inmediatamente (es decir, ya a 45 minutos) después del inicio de la infusión. B. Aumento del número de células T con afinidad intermedia (es decir, activadas) LFA-1 en el pico de su superficie celular con redistribución de células T. C. Aumento de concentraciones en suero de Ang-2 liberada por células endoteliales activadas durante la redistribución de células T. D. La redistribución de células T es acompañada por la desaparición de otras células mononucleares (como se muestra, p. ej., monocitos) de sangre periférica con recuperación prolongada hasta los recuentos basales.

Figura 2. Hipótesis actual del patomecanismo de múltiples etapas que conduce a eventos adversos del sistema nervioso central causados por Blinatumomab. A. Comienzo de la infusión o incremento gradual de la dosis de Blinatumomab, adhesión de células T al endotelio de los vasos. B. Las células T adherentes activan el endotelio y comienzan a extravasarse. Las células endoteliales activadas atraen otros leucocitos de sangre periférica, p. ej., monocitos. Las células T extravasadas segregan citocinas y quimiocinas que a su vez causan neuroinflamación y perturbación transitoria de la barrera hematoencefálica.

Figura 3. Cinética de redistribución de células T demorada en tres pacientes que recibieron medicación concomitante con PPS para la profilaxis o mitigación de los EA del SNC y prevención de interrupciones del tratamiento debidas a EA del SNC (D, E y F) en comparación con pacientes que no recibieron medicación concomitante con PPS (A, B y C). Se muestran los recuentos de células T y B como números absolutos por  $\mu\text{l}$  de sangre periférica. El eje de tiempo proporciona el período dentro del ciclo de tratamiento respectivo. Se indican los niveles de dosis de Blinatumomab, p. ej., 5, 15 o  $60 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ . Se indican los puntos de tiempo 0 h, 45 min y 2 h después del inicio de la infusión o cualquier aumento gradual de la dosis que revele diferencias en la cinética de redistribución de las células T.

Figura 4. Comparación de células endoteliales cultivadas en flujo frente a cultivadas en forma estática. A. Se cultivaron HBMEC en un portaobjetos  $\mu\text{-slide}$  Luer I<sup>0.4</sup> Collagen IV durante 48 h bajo tensión de cizalladura de pared de  $5 \text{ dyn}/\text{cm}^2$  (izquierda) o bajo condiciones estáticas (derecha). B. Se cultivaron HUVEC en un  $\mu\text{-slide}$  Luer I<sup>0.4</sup> ibiTreat durante 48 h bajo tensión de cizalladura de pared de  $10 \text{ dyn}/\text{cm}^2$  (izquierda) o bajo condiciones estáticas (derecha). El análisis microscópico se realizó con un objetivo de 10 x.

Figura 5. Influencia de AMG 103 sobre el rodamiento y la adhesión de células T en HUVEC bajo condiciones a corto plazo. Se preincubaron células T recién aisladas con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 40 min a 37°C antes del rodamiento de las células T en HUVEC cultivadas en flujo durante 45 seg. a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. Las velocidades de rodamiento y los números absolutos de células adherentes se determinaron microscópicamente usando el módulo de rastreo automatizado. A. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de células T. \*\*\*:  $P < 0,001$ . B. Los datos representan los números absolutos de células T adherentes. C. Tinción para inmunofluorescencia de HUVEC fijadas con PFA después del rodamiento de células T pre-incubadas con (+AMG 103) o sin (-AMG 103) AMG 103 a una tensión de corte de 1 dyn/cm<sup>2</sup> durante 45 seg. El análisis microscópico se realizó con un objetivo 20 x y luz UV. Se muestran tinción con ICAM-1 y P-selectina en rojo y verde, respectivamente.

Figura 6. Influencia de AMG 103 sobre el rodamiento de células T en HBMEC bajo condiciones a largo plazo. A. Se usaron células T recién aisladas con o sin adición de AMG 103 (10 ng/ml) para rodamiento sobre HBMEC cultivadas en flujo durante 120 min a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. Las adquisiciones de imágenes se realizaron inmediatamente después del inicio del rodamiento (0 min) y después de 45 min de rodamiento continuo en HBMEC. Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente usando el módulo de rastreo automatizado. Los datos representan  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de células T. \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns:  $P > 0,05$  (no significativo). B. Tinción para inmunofluorescencia de HBMEC fijadas con PFA después del rodamiento de células T en presencia (+AMG 103) o ausencia (-AMG 103) de AMG 103 durante 120 min a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. El análisis microscópico se efectuó con un objetivo 20 x y luz UV. Se muestra la tinción de ICAM-1, P-selectina y VCAM-1 en rojo, gris y azul, respectivamente.

Figura 7. Influencia de PPS sobre el rodamiento de células T en HBMEC estimuladas con histamina bajo condiciones a largo plazo. A. El rodamiento de células T recién aisladas en HBMEC estimuladas con histamina, no tratadas o pre-incubadas con PPS (200 µg/ml), cultivadas en flujo se efectuó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 60 min de rodamiento continuo a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente rastreando manualmente 30 células T para cada condición. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de células T en el punto de tiempo de 45 min. \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns:  $P > 0,05$  (no significativo). B. Tinción para inmunofluorescencia de HBMEC estimuladas con histamina fijadas con PFA, no tratadas (-PPS) o pre-incubadas con PPS (+PPS) después del rodamiento de células T en presencia (+AMG 103) o ausencia (-AMG 103) de AMG 103 durante 60 min a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. El análisis microscópico se efectuó con un objetivo 20 x y luz UV. La tinción con P-selectina se muestra en verde.

Figura 8. Influencia de PPS sobre el rodamiento de células T en HBMEC no estimuladas bajo condiciones a largo plazo. El rodamiento continuo de células T recién aisladas en HBMEC no estimuladas, no tratadas o pre-incubadas con PPS (200 µg/ml), cultivadas en flujo se efectuó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 60 min a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. Las velocidades de rodamiento se determinaron en forma microscópica por rastreo manual de 30 células T para cada condición. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en el punto de tiempo de 40 min. \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo).

Figura 9. Influencia de natalizumab sobre el rodamiento de células T en HBMEC no estimuladas bajo condiciones a largo plazo. El rodamiento continuo de células T recién aisladas pre-incubadas con o sin natalizumab (1 µg/ml) durante 10 min a 37°C en HBMEC no estimuladas, cultivadas en flujo se realizó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 60 min a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente por rastreo manual de 30 células T para cada condición. Los datos representan  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en el punto de tiempo de 40 min. \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*:  $P < 0,05$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo).

Figura 10. Influencia de minociclina sobre el rodamiento de células T en HUVEC no estimuladas bajo condiciones a largo plazo. Rodamiento continuo de células T recién aisladas pre-incubadas con o sin minociclina (50 µg/ml) durante 2 h a 37°C en HUVEC no estimuladas, cultivadas con flujo se realizó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 45 min a tensiones de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente usando el módulo de rastreo automatizado. Los datos representan  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en el punto de tiempo de 40 min. \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo).

Figura 11. Influencia de minociclina sobre la adhesión de células T a HUVEC no estimuladas en condiciones a largo plazo. Rodamiento continuo de células T recién aisladas pre-incubadas con o sin minociclina (50 µg/ml) durante 2 h a 37°C en HUVEC no estimuladas, cultivadas en flujo con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 45 min a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. Los números absolutos de células T adherentes se determinaron microscópicamente por recuento celular manual. Los datos representan el número absoluto de células T adherentes por sección de imágenes en un punto de tiempo de 40 min.

Figura 12. Influencia de un anticuerpo anti-ICAM-1 sobre el rodamiento de células T en HBMEC no estimuladas en condiciones a largo plazo. El rodamiento continuo de células T recién aisladas en anticuerpo no estimuladas, no tratadas o pre-incubadas con anticuerpo ICAM-1 antihumano de ratón (10 µg/ml), cultivadas en flujo HBMEC se efectuó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 45 min a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>. Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente por rastreo manual de 30 células T para cada condición. Los datos

representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en un punto de tiempo de 30 min. \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo). Ab: anticuerpo.

Figura 13. Influencia de un anticuerpo anti-P-selectina sobre el rodamiento de células T en HBMEC no estimuladas en condiciones a largo plazo. El rodamiento continuo de células T recién aisladas en HBMEC no estimuladas, no tratadas o pre-incubadas con anticuerpo P-selectina antihumano de ratón (10  $\mu\text{g/ml}$ ), cultivadas en flujo se efectuó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 45 min a una tensión de cizalladura de 1  $\text{dyn/cm}^2$ . Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente por rastreo manual de 30 células T para cada condición. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en un punto de tiempo de 40 min. \*\*:  $P < 0,01$ ; \*:  $P < 0,05$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo). Ab: anticuerpo.

Figura 14. Influencia de un anticuerpo anti-CD11a sobre el rodamiento de células T en HBMEC no estimuladas en condiciones a largo plazo. El rodamiento continuo de células T recién aisladas pre-incubadas con o sin anticuerpo anti-CD11a (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 10 min a 37°C en HBMEC no estimuladas cultivadas en flujo se efectuó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 45 min a una tensión de cizalladura de 1  $\text{dyn/cm}^2$ . Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente usando el módulo de rastreo automatizado. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en un punto de tiempo de 10 min. \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo). Ab: anticuerpo.

Figura 15. Influencia de un anticuerpo anti-CD162 sobre el rodamiento de células T en HBMEC no estimuladas en condiciones a largo plazo. El rodamiento de células T recién aisladas pre-incubadas o bien con o sin anticuerpo anti-CD162 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) o con anticuerpo control de isotipo de ratón (10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 10 min a 37°C en HBMEC no estimuladas, cultivadas con flujo se efectuó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 45 min a una tensión de cizalladura de 1  $\text{dyn/cm}^2$ . Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente por rastreo manual de 30 células T para cada condición. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en el punto de tiempo de 45 min. \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ ; \*:  $P < 0,05$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo). Ab: anticuerpo.

Figura 16. Influencia de P-selectina recombinante sobre el rodamiento de células T en HBMEC estimuladas bajo condiciones a largo plazo. El rodamiento continuo de células T recién aisladas pre-incubadas con o sin P-selectina recombinante (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 15 min a 37°C en HBMEC no estimuladas cultivadas en flujo se efectuó con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 45 min a una tensión de cizalladura de 1  $\text{dyn/cm}^2$ . Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente por rastreo manual de 40 células T para cada condición. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en el punto de tiempo de 45 min. \*\*:  $P < 0,01$ ; \*:  $P < 0,05$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo). rec.: recombinante.

Figura 17. Influencia de Blinatumomab (AMG 103) sobre el rodamiento de las células T en moléculas de adhesión humanas recombinantes en condiciones a semi-corto plazo. Se incubaron células T recién aisladas con o sin AMG 103 (10 ng/ml) durante 35 min a 37°C antes del rodamiento continuo con o sin AMG 103 en proteínas recombinantes durante 15 min a una tensión de cizalladura de 1,1  $\text{dyn/cm}^2$ . Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente usando el módulo de rastreo automatizado. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en el punto de tiempo  $t = 45$  min en A. ICAM-1 (\*\*\*:  $P < 0,001$ ), B. VCAM-1 (\*\*\*:  $P < 0,001$ ) y en el punto de tiempo  $t = 50$  min en C. P-selectina (\*\*\*\*:  $P < 0,0001$ ). Asimismo, se usaron células T Jurkat E6.1 como se describió anteriormente en lugar de células T recién aisladas. Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente usando el módulo de rastreo automatizado. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en el punto de tiempo  $t = 45$  min en D. ICAM-1 / VCAM-1 (\*\*\*:  $P < 0,001$ ), y E. P-selectina (\*\*:  $P < 0,01$ ).

Figura 18. Influencia del inhibidor de Src cinasa PP2 sobre el rodamiento de células T en moléculas de adhesión humanas recombinantes en condiciones a semi-corto plazo. Células T recién aisladas pre-incubadas con inhibidor de Src cinasa PP2 (15  $\mu\text{M}$ ) o vehículo control DMSO durante 40 min a 37°C se incubaron adicionalmente con o sin AMG 103 (10 ng/ml) en presencia de PP2 o DMSO durante 35 min a 37°C antes del rodamiento continuo en VCAM-1 recombinante humana durante 15 min a una tensión de cizalladura de 1,1  $\text{dyn/cm}^2$ . Las velocidades de rodamiento se determinaron microscópicamente por rastreo manual de 30 células T para cada condición. Los datos representan la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en el punto de tiempo  $t = 40$  min. \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns:  $P \geq 0,05$  (no significativo).

#### Descripción detallada de la invención

Se llevaron a cabo varios estudios clínicos que evalúan la seguridad y la eficacia de Blinatumomab, tanto en B-NHL (Bargou et al. Science. 2008; 321:974-7) como en el B-precursor ALL (Topp et al. J Clin Oncol. 2011; 29:2493-8). En B-NHL, las dosis de tan solo 0,005  $\text{mg/m}^2/\text{día}$  administradas por infusión intravenosa continua (civ) durante cuatro semanas provocaron una eliminación completa y sostenida de células de linfoma B en sangre periférica. Se observaron primero respuestas parciales y completas en un nivel de dosis de 0,015  $\text{mg/m}^2/\text{día}$  y la mayoría de los pacientes con B-NHL tratados en un nivel de dosis de 0,06  $\text{mg/m}^2/\text{día}$  experimentaron una regresión sustancial del tumor. Blinatumomab también condujo al aclaramiento de células B malignas de la médula ósea y el hígado en esta indicación. En el B-precursor ALL, los pacientes con enfermedad residual mínima y enfermedad recidivante o

refractaria lograron una respuesta hematológica cuando se trataron con infusiones de cuatro semanas en un nivel de dosis de 0,015 mg/m<sup>2</sup>/día. Estos estudios establecieron pruebas clínicas del concepto de alto potencial terapéutico del formato de anticuerpo monocatenario biespecífico en general y de Blinatumomab en especial, y validaron su posterior desarrollo en B-NHL, ALL y CLL. En estos estudios en B-NHL y B-precursor ALL, se evaluaron varios marcadores de farmacodinamia. Las características generales seleccionadas se describirán en lo sucesivo. La cinética de las células T exhibió un perfil muy distinguido más allá del nivel de dosis o de la presencia de células B circulantes. Se caracterizó una redistribución ágil después del inicio de la infusión y en cualquier etapa de la dosis, es decir, una rápida desaparición de las células T circulantes dentro de las primeras 6 - 12 horas y una reaparición subsiguiente durante los siguientes 2 - 7 días, en donde los altos recuentos de células B iniciales se correlacionaron con cinéticas desaceleradas de reaparición de células T (Figura 1A). Este curso pareció ser desencadenado por cualquier cambio significativo de la dosis de Blinatumomab más que de las concentraciones en suero absolutas. Asimismo, la adhesividad de las células T se midió durante la semana 1 del tratamiento analizando la unión de proteínas de fusión ICAM-1-Fc solubles a LFA-1 en células T. La conformación de LFA-1 se desplazó de un estado de baja afinidad antes del inicio de la infusión a un estado de afinidad intermedia después del inicio de la infusión de cualquier etapa de la dosis; el aumento de la afinidad de unión hacia ICAM-1 alcanzó una meseta dentro de las 48 horas y retornó a la situación inicial al cabo de 5 días a partir de allí (Figura 1B). Este hallazgo coincidió con la redistribución de células T y respaldó el concepto de la adhesión de células T inducida por Blinatumomab al endotelio durante la redistribución.

La angiopoyetina-2 (Ang-2) es un marcador del suero para la activación endotelial (o incluso el estrés endotelial) que se almacena en los llamados cuerpos Weibel-Palade dentro del citoplasma de las células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos. Una vez que las células endoteliales se activan, las vesículas se condensan con la membrana celular y liberan la Ang-2 preformada al suero. Además, las moléculas de adhesión que se unen a vesículas, p. ej., P-selectina, aparecen entonces en la superficie celular aumentando más de este modo la adhesividad de las células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos. La cinética de las concentraciones en el suero de Ang-2 se asemejó al aumento de la adhesividad de las células T mediada por LFA-1, alcanzando una meseta durante la redistribución de las células T y declinando nuevamente a la situación inicial dentro de la semana 1 de tratamiento. Con concentraciones en suero máximas de Ang-2 que coinciden con la desaparición de células T, esta observación indicó además la adhesión pronunciada de las células T a las células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos (que por lo tanto se activaron) como mecanismo subyacente de redistribución de las células T (Figura 1C). Si bien no están directamente unidos por Blinatumomab, los monocitos exhibieron cinéticas de redistribución similares a las de las células T. Este hallazgo también respaldó el concepto de la unión de las células T inducida por Blinatumomab al endotelio, que genera la activación de las células endoteliales que a su vez aumentan las moléculas de adhesión adicionales y se permitió así una gran unión de otras células mononucleares y trombocitos (es decir, los recuentos de trombocitos circulantes también disminuyeron después del inicio de la infusión y de cualquier etapa de la dosis). No obstante, la recuperación de los recuentos de monocitos en la sangre periférica podría prolongarse ya que los monocitos activados (p. ej., adhiriéndose a células endoteliales activadas) tendieron a transmigrar hacia el tejido subyacente antes de retornar a la circulación (Figura 1D).

En función de lo antedicho, los presentes inventores concibieron una hipótesis de un posible patomecanismo de múltiples etapas que podría conducir, entre otros, a eventos adversos del sistema nervioso central (EA del SNC) causados por las células T mamíferas redirigidas (p. ej., células T redirigidas por Blinatumomab). Esta hipótesis se ilustra en la Figura 2. Fig. 2A: Comienzo de la infusión o incremento gradual de la dosis de Blinatumomab, incremento de adhesión de células T hacia el endotelio de los vasos sanguíneos. Fig. 2B: las células T adherentes activan el endotelio y comienzan a extravasarse. Las células endoteliales activadas atraen otros leucocitos de sangre periférica, p. ej., monocitos que a su vez causan neuroinflamación transitoria y perturbación de la barrera hematoencefálica.

Con el fin de comprobar la hipótesis anterior, los presentes inventores contemplaron un esquema de co-medición en donde se administró Blinatumomab de manera concomitante con pentasánpolisulfato heparinoide (PPS), un inhibidor de moléculas pequeñas de P-selectina (Höpfner et al. J Pharm Pharmacol. 2003; 55:697-706). La adhesión de anti-leucocitos se ensayó exitosamente en un estudio clínico de fase 1 infundiendo transitoriamente a pacientes con PPS antes y después del inicio de la infusión de Blinatumomab, además de antes y después de cualquier incremento gradual de la dosis de Blinatumomab. Se sabe que P-selectina media la primera etapa de la adhesión leucocitaria a las células endoteliales y parece cumplir una función particular importante para la extravasación de leucocitos circundantes mediante microvasos menínges hacia el espacio leptomeníngeo y las meninges (Kivisäkk et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100:8389-94).

Tres pacientes recibieron en particular una infusión intravenosa de PPS durante la fase de inicio de la infusión a 5 µg/m<sup>2</sup>/día de Blinatumomab y la fase de aumento gradual de la dosis hasta 60 µg/m<sup>2</sup>/día después de la semana 1 de tratamiento (véase también la sección de Ejemplos para más detalles). A pesar de conllevar un alto riesgo de desarrollar EA del SNC debido a sus bajas relaciones de células B:T en la sangre periférica (véanse los criterios subyacentes descritos en PCT/EP2010/066207), ninguno de estos tres pacientes tuvo que suspender el tratamiento con Blinatumomab debido a efectos adversos neurológicos. Por lo tanto, para gran sorpresa de los presentes inventores, fue de hecho posible mitigar los EA del SNC esperados en estos pacientes, reduciendo la adhesión de células T redirigidas hacia las células endoteliales respectivas. Dos de los tres pacientes alcanzaron una respuesta completa después de 8 semanas de tratamiento con Blinatumomab; un paciente experimentó una enfermedad estable

después de 4 semanas de tratamiento. Asimismo, los tres pacientes que habían recibido PPS intravenoso para la mitigación de los posibles EA del SNC exhibieron cinética demorada de redistribución de las células T (en ausencia de células diana CD19-positivas) tras comenzar la infusión o el incremento gradual de la dosis de Blinatumomab (Figura 3). Como se describió anteriormente, los pacientes que reciben Blinatumomab sin medicación concomitante con PPS demostraron consistentemente una rápida disminución de los recuentos de células T en la sangre periférica tan solo 45 minutos después del inicio de la infusión o el incremento gradual de la dosis (como se muestra en las Figuras 3A, B y C). En contraste, no se observó una disminución de los recuentos de células T en comparación con los valores iniciales respectivos 45 minutos después del inicio de la infusión o el aumento gradual de la dosis en los tres pacientes que recibieron medicación concomitante con PPS durante el inicio de la infusión y la fase de aumento gradual de la dosis (Figuras 3D, E y F). En dos casos (D y E), hubo incluso un aumento del recuento de células T a los 45 minutos. En un caso (F), se observó aún un aumento del recuento de células T a las 2 horas. El proceso de redistribución y por lo tanto la adhesión subyacente de leucocitos al endotelio de los vasos sanguíneos obviamente se ralentizó por la intervención con PPS intravenoso, ya que la disminución de los recuentos de células T en la sangre periférica no se detectó antes de las 2 horas del inicio de la infusión o el aumento gradual de la dosis de Blinatumomab.

Por lo tanto, se identificó en los pacientes un marcador de farmacodinamia (es decir, cinética de redistribución de células T demorada) para el modo de acción de PPS pronosticado y destinado. Los cursos clínicos de los pacientes que recibieron medicación concomitante con PPS son consistentes con las observaciones de estos biomarcadores y también con los pronósticos de la hipótesis actual sobre el patomecanismo de eventos adversos del sistema nervioso central. Por consiguiente, interferir con la adhesión de leucocitos al endotelio de los vasos sanguíneos (es decir, adhesión antileucocitaria) es un planteamiento de intervención basado en un mecanismo para prevenir o mejorar los efectos colaterales tales como EA del SNC causados por terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, como Blinatumomab (AMG 103).

Para investigar en más detalle y confirmar que la unión inicial de las células T redirigidas (humanas) a las respectivas células endoteliales (humanas) es de hecho causante de los EA del SNC anteriormente mencionados, los presentes inventores establecieron adicionalmente un sistema de ensayo que simula el rodamiento, la fijación y adhesión de células T redirigidas (humanas) y otros leucocitos en/hacia (cerebro humano) las células endoteliales microvasculares bajo condiciones de flujo hidrodinámicas en un sistema *in vitro* ("sistema de flujo"). Otros detalles de este sistema de ensayo pueden derivar de los ejemplos anexos que explican la configuración experimental en gran y suficiente detalle (véase la sección de Ejemplos). En este sistema de flujo, la velocidad de rodamiento celular, así como también el número de células adherentes, pueden ser medidos fácilmente por el experto en la técnica. Se espera que la interferencia con cualquier etapa (molecular) (es decir, requerimiento) del rodamiento de múltiples etapas y del proceso de adhesión de las células sanguíneas en/hacia las células endoteliales influya tanto la velocidad de rodamiento celular como el número de células adherentes.

La adición de un dominio de unión específico de CD3, en particular Blinatumomab, al sistema de flujo (creando así una célula T redirigida), disminuyó rápida y significativamente la velocidad de rodamiento de las células T en células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC). Simultáneamente, las HBMEC se activaron con estas células T redirigidas, como se muestra por el aumento de P-selectina de moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1 en su superficie celular (véase la Figura 6B). No obstante, la adición de células T sin Blinatumomab (que resulta en células T no redirigidas) no influyó en la expresión de las moléculas de adhesión endotelial anteriormente mencionadas (véase la Figura 6B). Estas observaciones se asemejan y corresponden de manera inequívoca a la redistribución de células T como se observa en pacientes y se describe en detalle en este documento. Además, la adición del agente bloqueante de P-selectina PPS al sistema de flujo (es decir, pre-incubación de HBMEC con PPS) pudo bloquear de manera eficiente la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad de rodamiento de las células T en HBMEC. Como se demostró después de la adición de Blinatumomab al sistema de flujo, la pre-incubación con PPS pudo neutralizar cualquier efecto inducido por Blinatumomab y revertir que la velocidad de rodamiento de las células T volviera a niveles comparables a aquellos observados para la velocidad de rodamiento de las células T sin la adición de Blinatumomab al sistema de flujo. Además, las HBMEC se activaron menos cuando el PPS estuvo presente en el sistema de flujo por expresión reducida de la superficie celular de P-selectina. Estas observaciones respaldan el hallazgo clínico de que la adición de un compuesto que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a las células endoteliales (como el agente bloqueante de P-selectina, PPS) es de hecho capaz de reducir/demorar la adhesión de las células T a las células endoteliales y así prevenir y/o mitigar los eventos adversos clínicos del tratamiento causados por una terapia que comprende redirigir las células T contra las células diana en un paciente.

Por lo tanto, el sistema de flujo establecido imita verdaderamente el rodamiento de las células T y la adhesión, entre otros, de células T redirigidas en/hacia las células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos bajo condiciones de flujo hidrodinámicas como se observa durante la redistribución de las células T en pacientes tratados con un medicamento que comprende redirigir las células T contra células diana, que se puede lograr, por ejemplo, con un dominio de unión específico de CD3 tal como Blinatumomab. Especialmente, los efectos de infundir PPS a pacientes y añadir PPS al sistema de flujo en la redistribución de las células T y la velocidad de rodamiento de las células T, respectivamente, son muy comparables en el sentido que el PPS interfiere claramente con la adhesión de las células T a las células endoteliales. De acuerdo con la hipótesis actual sobre el patomecanismo de EA del SNC, esta interferencia (es decir, adhesión anti-leucocitaria, reducción o inhibición de leucocitos como células T mamíferas

y, en particular, células T redirigidas, a las células endoteliales mamíferas) puede tratar, prevenir o mitigar cualquier efecto colateral adverso, como EA del SNC, causados por la administración de un medicamento que comprende redirigir las células T contra células diana a un paciente (que se puede lograr, por ejemplo, por dominio de unión específico de CD3 o CAR que se explican en otra parte de este documento). Asimismo, el sistema de flujo establecido ejemplificado en este documento es capaz de, y puede ser usado por el experto en la técnica, en un método para identificar un compuesto para uso en un método de profilaxis y/o mitigación y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende re-dirigir las células T contra células diana en un paciente. El sistema de flujo ejemplificado es por lo tanto adecuado para identificar/definir compuestos con propiedades antiadhesivas (en particular compuestos que reducen o inhiben la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas) que se pueden administrar antes, en forma concurrente y/o subsiguiente al tratamiento de un paciente con, por ejemplo, un dominio de unión específico de CD3 para la profilaxis o mitigación de EA del SNC causados por dicho dominio de unión específico de CD3. En otros términos, se espera que los compuestos que demuestran cualquier efecto anti-adhesivo sobre los leucocitos, en particular las células T, y lo más preferiblemente células T redirigidas en el sistema de flujo (es decir, por ejemplo, reversión de reducción de la velocidad de las células T inducida por el dominio de unión específico de CD3 en las células endoteliales del revestimiento de los vasos sanguíneos comparable a los efectos observados para la adición de PPS al sistema de flujo) prevengan o mitiguen cualquier EA del SNC causado por el tratamiento de un paciente con un dominio de unión específico de CD3 cuando se administran antes, en forma concurrente y/o subsiguiente al tratamiento con dicho dominio de unión específico de CD3. La identificación, modificación y/o confirmación de dichos compuestos es una tarea sencilla para el experto en la materia, ya que hace uso de una metodología consolidada.

Los presentes inventores han preparado entonces el camino para resolver los problemas técnicos identificados en este documento.

#### Definiciones:

Se ha de observar que como se usan en este documento, las formas en singular "uno", "una", y "el", "la", incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de dichos reactivos diferentes y la referencia "al método" incluye referencias a etapas y métodos equivalentes conocidos por el experto en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en la presente invención.

A menos que se indique algo distinto, la expresión "por lo menos", que precede a una serie de elementos, se ha de entender que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar, usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. Dichos equivalentes tienen como fin ser abarcados por la presente invención.

La expresión "y/o", dondequiera que se emplee en este documento, incluye el significado de "y", "o" y "todas y cada una de las combinaciones de los elementos conectados por dicho término".

El término "aproximadamente", tal como se emplea en esta memoria, significa dentro de  $\pm 20\%$ , preferiblemente dentro de  $\pm 15\%$ , más preferiblemente dentro de  $\pm 10\%$  y lo más preferiblemente dentro de  $\pm 5\%$  de un valor o intervalo determinado.

En toda la memoria y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, el término "comprender", y variaciones tales como "que comprende" y "que comprenden", se entenderá que implica la inclusión de un entero o grupo de enteros o etapas establecidas, pero no la exclusión de ningún entero o etapa o grupo de enteros o etapas. Cuando se usa en este documento, la expresión "que comprende" se puede sustituir con la expresión "que contiene" o "que incluye" o algunas veces cuando se usa en este documento con la expresión "que tiene".

Cuando se usa en este documento "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento reivindicado. Cuando se usa en este documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales ni etapas que no afecten materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación.

En cada caso de la presente invención, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede reemplazar con cualquiera de las otras dos expresiones.

La presente invención se refiere en una realización a un compuesto no glucocorticoide que (a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o (b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas para uso en un método de profilaxis y/o tratamiento de eventos adversos neurológicos causados por la administración de un medicamento que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, en donde dicho medicamento es un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde el compuesto no glucocorticoide se ha de administrar antes y en forma concomitante con (i) una dosis inicial, (ii) una re-exposición; y/o (iii) un aumento de dicha administración de un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde dichos eventos adversos

neurológicos son uno o más de desorientación/confusión, problemas para encontrar las palabras/afasia, convulsiones, temblores cinéticos, ataxia, disartria y problemas con la escritura, en donde dicho paciente es un mamífero.

El término "unión" de células T mamíferas se ha de entender que incluye cualquier etapa secuencial conocida que típicamente caracteriza el movimiento de leucocitos fuera del sistema circulatorio, un proceso que usualmente se indica como extravasación de leucocitos. Las etapas antes mencionadas incluyen el "rodamiento de los leucocitos" (los leucocitos escasamente se adhieren a las células endoteliales pero incluso son arrastrados con el torrente circulatorio, lo que resulta en un movimiento de rodamiento de los leucocitos en la superficie de las células endoteliales); el "enlace de los leucocitos" (a veces también indicado como sujeción firme – los leucocitos se sujetan firmemente a las células endoteliales, mientras que los receptores de esta interacción son diferentes de aquellos implicados en el proceso de rodamiento) y la "etapa de diapedesis" (a veces también indicada como transmigración – los leucocitos previamente principalmente esféricos se esparcen sobre el endotelio y transmigran activamente a través de la barrera endotelial). Los compuestos de la presente invención o bien influyen todas estas etapas, o solo algunas de estas etapas, o solo una de estas etapas.

El "compuesto" no glucocorticoide aplicado en la presente invención (es decir, el compuesto no glucocorticoide que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas) es uno que, se dice que actúa, por ejemplo, sobre el lateral de las células T, es decir, sobre una molécula de adhesión de células T o sobre el lateral de las células endoteliales, es decir, sobre la molécula de adhesión de las células endoteliales. No obstante, el compuesto no glucocorticoide puede además ser uno que actúa sobre el lateral de las células y sobre el lateral de las células endoteliales. Dicho compuesto, cuando se aplica en la presente invención, reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas. Como tal, un compuesto no glucocorticoide de la presente invención es un compuesto que afecta los efectos antiadhesivos, o bien sobre las células T o las células endoteliales, o ambas. Por ejemplo, un compuesto puede actuar tanto sobre las moléculas de adhesión de células T como sobre las moléculas de adhesión de células endoteliales o se aplica una mezcla de dos o más compuestos, uno actúa sobre las moléculas de adhesión de células T y el otro o los otros sobre las moléculas de adhesión de células endoteliales. Un efecto antiadhesivo preferiblemente incluye que el compuesto reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a las células endoteliales mamíferas. Los compuestos no glucocorticoides preferidos de la presente invención se ilustran en la Tabla 1.

Se contempla también que el compuesto no glucocorticoide de la invención, es decir un compuesto no glucocorticoide que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a las células endoteliales mamíferas, es capaz de aumentar la  $\pm$  SD de la media de velocidad de rodamiento de las células T ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) sobre HBMEC en presencia de +10 ng/ml AMG 103 por aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% o incluso más (véase Ejemplo 2 – la influencia de PPS sobre la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T según lo observado 45 min después de la adición de 10 ng/ml de Blinatumomab al sistema de flujo se evaluó en condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de velocidad de rodamiento de las células T sobre HBMEC de  $430 \pm 92 \mu\text{m}/\text{seg}$  (-AMG 103) a  $281 \pm 96 \mu\text{m}/\text{seg}$  (+AMG 103), la posterior adición de PPS al sistema de flujo revirtió esta reducción a una  $\pm$  SD de la media de velocidad de rodamiento de las células T de  $483 \pm 157 \mu\text{m}/\text{seg}$  según lo observado en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +PPS;  $442 \pm 156 \mu\text{m}/\text{seg}$ ).

Se sabe que las células T interactúan con las células endoteliales mediante moléculas de adhesión, es decir, moléculas de adhesión de células T y moléculas de adhesión de células endoteliales. Tanto las moléculas de adhesión de células T y células endoteliales pertenecen a la familia de la integrinas, selectinas y superfamilia de inmunoglobulina G (IgG). Estas últimas se caracterizan por tener un dominio de inmunoglobulina. CD44, ya que el receptor de ácido hialurónico presente en la superficie de las células endoteliales también se considera molécula de adhesión de células T.

Por consiguiente, los compuestos no glucocorticoides preferidos que reducen o inhiben la unión de células T a las células endoteliales son antagonistas de integrinas, antagonistas de selectinas, antagonistas de moléculas de adhesión celular de la superfamilia de Ig o antagonistas de CD44, respectivamente. Por lo tanto, un compuesto aplicado en el contexto de la presente invención es preferiblemente un antagonista de integrina, un antagonista de selectina, un antagonista de moléculas de adhesión de células de la superfamilia de Ig o un antagonista de CD44, respectivamente. Cualquiera de estos antagonistas es, en el contexto de la presente invención, capaz de reducir o inhibir la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas. Los antagonistas de integrina se conocen comúnmente en la técnica; véase, p. ej., Curley et al. (1999), Cellular and Molecular Life Science 56, 427-441. Los antagonistas de selectina se conocen comúnmente en la técnica; véase, p. ej., Lefer (2010), Ann. Rev. Pharmacol Toxicol 40 283-294. Los antagonistas de CD44 se conocen comúnmente en la técnica; véase, p. ej., Hirota-Takahata (2007), J. Antibiotics 60, 633-639. Lo mismo rige para los antagonistas de moléculas de adhesión celular de la superfamilia de IgG. Un compuesto que reduce o inhibe la unión de células T a las células endoteliales es preferiblemente un antagonista de integrina, antagonista de selectina, antagonista de moléculas de adhesión celular de la superfamilia de Ig, o un antagonista de CD44 puede preferiblemente ensayarse y/o identificarse aplicando dicho antagonista potencial al ensayo de cámara de flujo como se describe en este documento, en particular en el Ejemplo 2, mediante lo cual un antagonista preferiblemente aumenta la  $\pm$  SD de la media de velocidad de rodamiento de las células T ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) sobre HBMEC en presencia de +10 ng/ml AMG 103 por aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% o incluso más, como se describió anteriormente.

Se caracteriza un compuesto que actúa sobre el lateral de las células T como se describió anteriormente

- (a) que es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T,
- (b) que es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, y/o
- (c) que inhibe o reduce la expresión de una molécula de adhesión de células T.

Una "molécula de adhesión de células T" es una molécula que está presente sobre la superficie de una célula T y que funciona o tiene una función en la adhesión de una célula T a otras células tales como las células endoteliales, en donde se prefieren las últimas en el contexto de la presente invención. Típicamente, una molécula de adhesión de células T interactúa con una molécula de adhesión de una célula endotelial. La molécula de adhesión de una célula endotelial puede, por lo tanto, considerarse como ligando para la molécula de adhesión de células T. Una interacción entre una molécula de adhesión de células T y un ligando presente en la superficie de una célula endotelial usualmente tiene lugar entre un sitio de unión de una molécula de adhesión de células T (es decir, un sitio de unión al ligando) y se designa ligando, es decir, una molécula de adhesión de una célula endotelial.

Una molécula de adhesión de células T, como se describe en este documento, posee preferiblemente un dominio de la superfamilia de inmunoglobulina. Dicha molécula de adhesión es preferiblemente una integrina que preferiblemente tiene un dominio de unión de RGD, como alfa4-integrina, alfaL-beta2-integrina, alfaL-integrina, beta7-integrina; una selectina tal como L-selectina o CD44. Las células T usan integrinas y/o selectinas y/o CD44 para migrar dentro y fuera de los vasos y/o ganglios linfáticos para luego migrar, p. ej., hacia otros tejidos, el espacio leptomeníngeo o perivascular. CD44 actúa principalmente como receptor de ácido hialurónico que está presente sobre la superficie de las células endoteliales que alinean los vasos.

Un compuesto no glucocorticoide de la presente invención se caracteriza, en una realización, por ser capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T. Como tal, un compuesto se une y por lo tanto preferiblemente desprende la molécula de adhesión de células T de forma tal que la molécula de adhesión de células T disminuye, preferiblemente ya no es capaz de interactuar con una molécula de adhesión endotelial. Como consecuencia de la unión del compuesto a una molécula de adhesión de células T, una célula T por lo menos disminuye, preferiblemente ya no interactúa con una molécula de adhesión endotelial. Un compuesto no glucocorticoide preferido que se une a una molécula de adhesión de células T es una molécula capaz de unirse a otra molécula, tal como una lipocalina muteína, o un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, la molécula de unión puede ser específicamente dirigida hacia la molécula de adhesión de células T. Dado que un anticuerpo cumple ese criterio, un compuesto preferido que se une a una molécula de adhesión de células T es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, tal como Natalizumab, Efalizumab o Etrolizumab.

Un compuesto no glucocorticoide de la presente invención se caracteriza adicional o alternativamente por ser capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T. "Bloquear" significa prevenir que el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T interactúe con su ligando, preferiblemente con el sitio de unión de su ligando, en la célula endotelial. Como consecuencia del bloqueo de un compuesto, el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, una célula T por lo menos disminuye, preferiblemente ya no es capaz de interactuar con una molécula de adhesión endotelial. Los ejemplos no limitativos de sitios de unión de una molécula de adhesión de células T son sitios de unión para ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, MadCAM, GlyCAM, CD31 (PECAM-1), CD62P (P-selectina), CD62E (E-selectina), CD62L, fibrinógeno y condroitina.

Los compuestos no glucocorticoides preferidos que bloquean el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T son fragmentos solubles de moléculas de adhesión celular de células endoteliales, dichos fragmentos solubles preferiblemente se modifican como para unirse al sitio de unión de una molécula de adhesión de células T sin causar un efecto fisiológico tal como la transducción de una señal a la célula T. Un compuesto no glucocorticoide preferido que bloquea el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que bloquea un sitio de unión a ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, MadCAM, GlyCAM, CD31, CD62P, CD62E, CD62L, fibrinógeno y/o condroitina en una molécula de adhesión de células T, p. ej., en VLA-4 y/o LPAM-1, respectivamente. Dicho anticuerpo es Natalizumab que es por lo tanto un compuesto preferido aplicado en la presente invención. También un compuesto no glucocorticoide preferido que se aplica en la presente invención es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que bloquea un sitio de unión ICAM-1 en una molécula de adhesión de células T. Dicho anticuerpo es Efalizumab que es por lo tanto un compuesto antiglucocorticoide preferido aplicado en la presente invención.

Se prefiere además como compuesto no glucocorticoide que se aplica en la presente invención un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que bloquea un sitio de unión a VCAM-1 y/o MadCAM en una molécula de adhesión de células T. Dicho anticuerpo es Etrolizumab, que es por lo tanto un compuesto no glucocorticoide preferido aplicado en la presente invención. Otro compuesto no glucocorticoide preferido es AJM300, una molécula pequeña que bloquea el sitio de unión de moléculas de adhesión de células T.

Otro compuesto no glucocorticoide preferido es SAR 1118, una molécula pequeña que bloquea el sitio de unión a ICAM-1, ICAM-2 y/o ICAM-3 en una molécula de adhesión de células T. Otro compuesto no glucocorticoide también preferido es BOL-303225-A, una molécula pequeña que actúa como antagonista de las integrinas alfaLbeta2 y/o alfaMbeta2.

- 5 Otro compuesto no glucocorticoide preferido es un quelante, preferiblemente un quelante para cationes bivalentes, como calcio. Un quelante preferido es ácido etilendiamintetracético (EDTA). Ácido hialurónico (HA) o sulfato de condroitina son otros compuestos no glucocorticoides preferidos, ya que se sabe que ambos bloquean el sitio de unión a HA y E-selectina en CD44, bloqueando así la interacción entre CD44 en las células T y las células endoteliales.

- 10 Un compuesto no glucocorticoide de la presente invención se caracteriza adicional o alternativamente por inhibir o reducir la expresión de una molécula de adhesión de células T. Dicho compuesto puede actuar sobre la expresión que incluye transcripción y/o traducción de genes que codifican moléculas de adhesión de células T, como la supresión de expresión génica, interferencia con la transcripción, empalme o traducción. Esto podría, por ejemplo, lograrse por interferencia de ARN con medios y métodos conocidos en la técnica. No obstante, se sabe que otros compuestos reducen la expresión de una molécula de adhesión de células T, tal como Minociclina que reduce la expresión de LFA-1, ácido (acetil)-salicílico que reduce la expresión de L-selectina, Astilbina o Flavonoides que reducen la expresión de CD44 (véase también la Tabla 1 de este documento). Estos compuestos son compuestos no glucocorticoides preferidos que se aplican en el contexto de la presente invención, en donde se prefiere más Minociclina

El compuesto que actúa sobre el lado de las células endoteliales se caracteriza por

- (d) ser capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial,
- 20 (e) ser capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, y/o
- (f) inhibir o reducir la expresión de una molécula de adhesión endotelial,

- 25 Una "molécula de adhesión de células endoteliales" es una molécula que está presente en la superficie de una célula endotelial y que funciona o cumple una función en la adhesión de las células endoteliales a otras células tales como leucocitos, en particular células T o monocitos. Típicamente, una molécula de adhesión de una célula endotelial interactúa con una molécula de adhesión de células T. La molécula de adhesión de una célula T puede por lo tanto considerarse como ligando para la molécula de adhesión de células endoteliales. Una interacción entre una molécula de adhesión de células endoteliales y un ligando presente en la superficie de una célula T usualmente tiene lugar entre un sitio de unión de una molécula de adhesión de células endoteliales (es decir, un sitio de unión al ligando) y su ligando designado, es decir una molécula de adhesión de una célula T.

- 30 Una molécula de adhesión de células endoteliales descrita en este documento preferiblemente tiene un dominio de la superfamilia de inmunoglobulina. Dicha molécula de adhesión es preferiblemente una integrina que preferiblemente tiene un dominio de unión a RGD, tal como ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, GlyCAM-1, o MadCAM. Mediante las integrinas y/o selectinas, las células endoteliales se comunican e interactúan con, p. ej., células T tales como las células T que finalmente se extravasan y migran como se describió anteriormente.

- 35 Un compuesto no glucocorticoide de la presente invención, en una realización, se caracteriza por ser capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial. Como tal, un compuesto se une y por lo tanto preferiblemente desprende la molécula de adhesión endotelial de forma tal que la adhesión de células T en particular disminuye, preferiblemente las células endoteliales ya no son capaces de interactuar con una molécula de adhesión de células T. Como consecuencia de la unión de un compuesto a una molécula de adhesión de células endoteliales, una célula endotelial al menos se disminuye, preferiblemente ya no es capaz de interactuar con una molécula de adhesión de células T. Un compuesto no glucocorticoide preferido que se une a una molécula de adhesión endotelial es una molécula que es capaz de unirse a otra molécula, como lipocalina muteína, o un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, la molécula de unión puede dirigirse específicamente a la molécula de adhesión endotelial. Ya que un anticuerpo satisface ese criterio, un compuesto preferido que se une a una molécula de adhesión endotelial es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, como PF-00547659.

- 40 Un compuesto no glucocorticoide de la presente invención se caracteriza adicional o alternativamente por ser capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial. "Bloquear" significa prevenir que el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial interactúe con su ligando, preferiblemente con el sitio de unión de su ligando, en la célula T. Como consecuencia de que un compuesto bloquee el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, una célula endotelial por lo menos disminuye, preferiblemente ya no es capaz de interactuar con una molécula de adhesión de células T. Los ejemplos no limitativos de sitios de unión de una molécula de adhesión celular endotelial son sitios de unión para alfa4-integrinas, alfaL-beta2-integrinas, alfaL-integrinas, beta7-integrinas.

Los compuestos no glucocorticoides preferidos que bloquean el sitio de unión de una molécula de adhesión de células endoteliales son fragmentos solubles de moléculas de adhesión celular de células T, en donde dichos fragmentos

solubles preferiblemente se modifican como para unirse al sitio de unión de una molécula de adhesión de células endoteliales sin causar un efecto fisiológico tal como la transducción de una señal a la célula T.

Un compuesto no glucocorticoide preferido que bloquea el sitio de unión de una molécula de adhesión de células endoteliales es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que bloquea un sitio de unión de alfa4-integrinas, alfaL-beta2-integrinas, alfaL-integrina, beta7-integrinas en una molécula de adhesión de células endoteliales.

También se prefiere como un compuesto no glucocorticoide que se aplica en la presente invención, un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une a una molécula de adhesión de células endoteliales como ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, GlyCAM-1, MadCAM o PECAM-1.

- 10 Otro compuesto preferido no glucocorticoide que se aplica a la presente invención es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une a P-selectina (CD62P). Dicho anticuerpo es Inclacumab.

Otro compuesto no glucocorticoide preferido es trombina, preferiblemente a bajas concentraciones de pM, que bloquea los sitios de unión de moléculas de adhesión de células endoteliales. Otro compuesto no glucocorticoide preferido es pentosanpolisulfato (PPS) que bloquea el sitio de unión PSGL-1 en la molécula de adhesión de células endoteliales.

- 15 Un compuesto no glucocorticoide de la presente invención se caracteriza adicional o alternativamente por inhibir o reducir la expresión de una molécula de adhesión de células endoteliales. Dicho compuesto puede actuar sobre la expresión, incluida la transcripción y/o traducción de genes que codifican moléculas de adhesión de células endoteliales, como la supresión de la expresión génica, la interferencia con la transcripción, el empalme o la traducción. Esto podría, por ejemplo, lograrse por interferencia del ARN por métodos conocidos en la técnica. No obstante, se conocen otros compuestos que reducen la expresión de una molécula de adhesión endotelial, tal como rosuvastatina, una molécula pequeña, que reduce la expresión de VCAM-1.

La presente invención se refiere también a un método para identificar un compuesto para uso en un método de profilaxis y/o mitigación y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, que comprende:

- 25 (a) poner en contacto dicho compuesto con una célula T mamífera, una célula endotelial mamífera, una molécula de adhesión de células T y/o una molécula de adhesión endotelial; y
- (b) evaluar si dicho compuesto:
- (i) reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas;
- (ii) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T,
- 30 (iii) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T,
- (iv) inhibe o reduce la expresión de una molécula de adhesión de células T,
- (v) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial,
- (vi) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, y/o
- (vii) inhibe o reduce la expresión de una molécula de adhesión endotelial.

- 35 Se tiene como fin usar, por ejemplo, el sistema de flujo descrito en este documento para ese propósito. Una lista no exclusiva de otros ensayos *in vitro* posibles que se pueden usar para identificar un compuesto para uso en un método de profilaxis y/o mitigación y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir células T contra células diana en un paciente, se ilustra a continuación:

- Ensayos de trans migración (Rohnelt, Hoch et al. 1997, Ding, Xiong et al. 2000)

- 40 ▪ Ensayos de adhesión con moléculas de adhesión inmovilizadas (Gerli, Gresele et al. 2001, Valignat, Theodoly et al. 2013)

- Ensayos de adhesión con células endoteliales y células T bajo condiciones estáticas (Mobley y Shimizu 2001)

- Interferencia de dichos compuestos con moléculas de adhesión en células T en ensayos citométricos de flujo (Bucolo, Maltese et al. 2008)

- 45 Bucolo, C., A. Maltese, F. Maugeri, K. W. Ward, M. Baiula, A. Sparta y S. Spampinato (2008). "New coumarin-based anti-inflammatory drug: putative antagonist of the integrins alphaLbeta2 and alphaMb eta2". J Pharm Pharmacol 60(11): 1473-1479.

Ding, Z., K. Xiong y T. B. Issekutz (2000). "Regulation of chemokine-induced transendothelial migration of T lymphocytes by endothelial activation: differential effects on naive and memory T cells". *J Leukoc Biol* 67(6): 825-833.

Gerli, R., P. Gresele, O. Bistoni, C. Paolucci, L. Lanfranccone, S. Fiorucci, C. Muscat y V. Costantini (2001). "Salicylates inhibit T cell adhesion on endothelium under nonstatic conditions: induction of L-selectin shedding by a tyrosine kinase-dependent mechanism". *J Immunol* 166(2): 832-840.

Mobley, J. L. e Y. Shimizu (2001). "Measurement of cellular adhesion under static conditions". *Curr Protoc Immunol* capítulo 7: unidad 7 28.

Rohnelt, R. K., G. Hoch, Y. Reiss y B. Engelhardt (1997). "Immunosurveillance modelled in vitro: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium". *Int Immunol* 9(3): 435-450.

Valignat, M. P., O. Theodoly, A. Gucciardi, N. Hogg y A. C. Lellouch (2013). "T lymphocytes orient against the direction of fluid flow during LFA-1-mediated migration". *Biophys J* 104(2): 322-331.

Como se ejemplifica en la Tabla 1 de este documento, se han identificado muchas moléculas diana tanto en leucocitos y células endoteliales como en los correspondientes compuestos que interfieren, que están actualmente en desarrollo o ya se han aprobado para uso en seres humanos. En consecuencia, se contempla abarcar en la presente invención cualquier compuesto no glucocorticoide existente o futuro más allá de su modo de acción que demuestre efectos antiadhesivos sobre los leucocitos, y más preferiblemente las células T en el sistema de flujo que se define en este documento para la administración previa, concurrente y/o subsiguiente al tratamiento de un paciente con una terapia que comprende redirigir las células T contra células diana, p. ej., a través de la transducción de células T con un reclutamiento de células T o CAR mediante un compuesto que comprende un dominio específico de CD3, preferiblemente Blinatumomab, para la profilaxis o mitigación de EA del SNC causados por dicha terapia (respectiva) que comprende redirigir las células T contra células diana.

Por lo tanto, en otra realización, la presente invención se refiere a cualquier compuesto no glucocorticoide que demuestre efectos antiadhesivos en el rodamiento y la adhesión de leucocitos en el sistema de flujo descrito. Se espera que la adición de dicho compuesto o cualquier combinación de dichos compuestos al sistema de flujo neutralice la adhesión de leucocitos inducida al redirigir las células T contra células diana, p. ej., a través de la transducción de células T con un reclutamiento de células T o CAR mediante un compuesto que comprende un dominio de unión específico de CD3, preferiblemente adhesión de células T inducida por Blinatumomab a las células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos, p. ej., la velocidad de rodamiento de las células T se revierte hasta niveles comparables a aquellos sin adición de Blinatumomab al sistema de flujo. La presente invención se refiere además a una combinación de uno o más de dichos compuestos no glucocorticoides con el tratamiento de un paciente con una terapia que comprende redirigir las células T contra células diana, p. ej., a través de la transducción de células T con un reclutamiento de CAR o células T mediante un compuesto que comprende un dominio de unión específico de CD3 antes, concurrentemente con y/o después de dicho tratamiento para la profilaxis o mitigación de EA del SNC causados por dicha terapia (respectiva) que comprende redirigir las células T contra células diana. En otros términos, cualquier tratamiento combinatorio de (a) un compuesto(s) no glucocorticoide con propiedades antiadhesivas y una terapia que comprende redirigir las células T contra células diana, p. ej., a través de la transducción de células T con un reclutamiento de CAR o células T mediante un compuesto que comprende un dominio de unión específico de CD3 se contempla como abarcado por la presente invención. Incluso en otros términos, se contempla como requerimiento administrar cualquiera de dichos compuestos no glucocorticoides o cualquiera de sus combinaciones antes, en forma concurrente y/o subsiguiente al tratamiento de un paciente con una terapia que comprende redirigir las células T contra células diana, p. ej., a través de la transducción de células T con un reclutamiento de células T o CAR mediante un compuesto que comprende un dominio de unión específico de CD3 para la profilaxis o la mitigación de EA del SNC causados por dicha terapia (respectiva) que comprende redirigir las células T contra células diana.

En el contexto de la presente invención, "adhesión antileucocitaria" se define como cualquier medida, método y/o procedimiento profiláctico y/o intervencionista para prevenir, minimizar, reducir, influenciar, mitigar o modificar el rodamiento, la unión, adhesión transmigración o interacción de leucocitos con células endoteliales, preferiblemente células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos. Además, los compuestos incluidos en dichas medidas, métodos y/o procedimientos, o que ejercen cualquiera de los efectos enumerados anteriormente sobre los leucocitos, se definen en este documento como "compuestos con efectos de adhesión antileucocitaria" o "compuestos con propiedades antiadhesivas" o "compuestos de la invención" o "compuestos que reducen o inhiben la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas".

De acuerdo con la hipótesis actual, la adhesión de leucocitos al endotelio de los vasos sanguíneos es un pre-requisito necesario para la inducción de efectos adversos graves tales como EA del SNC que requieren la interrupción del tratamiento. Por lo tanto, un posible planteamiento de mitigación para EA, como EA del SNC, es, en el contexto de la presente invención, la adhesión antileucocitaria que apunta a reducir la adherencia endotelial de células T redirigidas y opcionalmente también otros leucocitos (es decir, linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, granulocitos y monocitos, que son los tipos más prominentes de células mamíferas de extravasación) después del comienzo de la infusión e incrementos graduales de la dosis del medicamento respectivo, es decir, la terapia que

comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, por ejemplo Blinatumomab, en donde la terapia es la causa de la activación de células endoteliales y la extravasación de leucocitos hacia el SNC (véase el análisis de este documento y los resultados derivados de los ejemplos anejos). La expresión "células T mamíferas" comprende o consiste en "células T redirigidas", ya que estas células T redirigidas son la causa de los EA explicados en este documento. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, "dicha célula T mamífera" es una "célula T mamífera redirigida". Redirigir las células T comprende que las células T estén equipadas con una especificidad receptora de antígenos que reconoce células diana que típicamente difiere de la especificidad receptora de antígenos natural clonotípica de las células T. Esto se puede lograr, p. ej., vinculando las células T con anticuerpos bi- o multi-funcionales o derivados de anticuerpos que comprenden un dominio de unión específico capaz de unirse específicamente a un receptor de células T, preferiblemente a CD3. También es posible (y se contempla explícitamente dentro del contexto de la presente invención) que dichas células T redirigidas se produzcan por transducción de células T con receptores antigénicos quiméricos (CAR), por ejemplo CAR que reconocen CD19 (véase a modo ilustrativo Knochenderfer et al., Nature Reviews 2013; Clinical Oncology; "Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors"). Una "célula T redirigida" incluye por lo tanto células T que se han puesto en contacto con anticuerpos bi- o multi-funcionales o derivados de anticuerpos que comprenden un dominio de unión específico capaz de unirse específicamente a un receptor de células T (preferiblemente CD3) o una célula T que se ha modificado genéticamente para expresar un receptor antigénico quimérico (es decir, un CAR de células T – véase el documento WO2007/131092).

En una realización particularmente preferida, dicha célula T redirigida es una célula T humana que se ha puesto en contacto con (está unida a) Blinatumomab (AMG103).

Por "terapia que comprende redirigir las células T contra células diana" se entiende una terapia, tal como un medicamento, que se caracteriza por la aparición y/o existencia de "células redirigidas", es decir, la terapia o bien comprende o consiste en células T redirigidas tales como, por ejemplo, una célula T genéticamente modificada que tiene un receptor antigénico quimérico CAR (opcionalmente formulado como una composición farmacéutica) y/o las células T redirigidas aparecen en el curso de la terapia ejemplificada por un medicamento que comprende un dominio de unión específico de CD3 como se define en este documento, preferiblemente un dominio de unión específico de CD3 junto con un dominio de unión que es específico de células B, más preferiblemente un dominio de unión específico de CD3 junto con un dominio de unión que es específico de un marcador de CD que se puede hallar en un linfoma de células B tal como CD19, CD22, CD20 o CD79a, en donde se prefiere CD19. Dicha terapia que comprende redirigir las células T contra células diana es una terapia con un anticuerpo monocatenario de CD3 X CD19 biespecífico y en una realización más preferida, dicha terapia que comprende redirigir las células T contra células diana es una terapia con Blinatumomab. También se contempla que dicha terapia con Blinatumomab abarca la administración de 5 a 10  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  o dosis superiores, como 15, 45 o 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ . Los dominios de unión específicos de CD-3 anteriormente mencionados se explican en gran detalle en otra parte de este documento.

Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) son proteínas de fusión que comprenden restos de reconocimiento de antígenos y dominios de activación de células T. Para el tratamiento de malignidades de las células B, se han descrito CD19 CAR que consisten en un dominio de unión específico de CD19 enlazado a, p. ej., CD3zeta, en estudios clínicos de B CLL (Porter et al. N Engl J Med. 2011; 365:725-33) y B ALL (Grupp et al. N Engl J Med. 2013). Como se observa con la infusión de un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3, la transferencia adoptiva de células T transducida por CD19 CAR en pacientes condujo a la erradicación rápida y sostenida de células B normales y malignas. También se describieron eventos adversos comunes asociados con terapia de células T CD19 CAR que incluyeron síndrome de liberación de citocinas y linfopenia, pero también se describieron casos de EA del SNC. Por lo tanto, la interferencia con adhesión y trans migración de células T CD19 CAR a/a través del endotelio del recubrimiento de los vasos sanguíneos es también un planteamiento útil para la profilaxis y/o mitigación de EA del SNC inducidos por células T CD19 CAR. Cabe destacar que el tratamiento con células T CAR que dirigen otros antígenos específicos de células B (p. ej., CD20) también se beneficiarán con medicación concomitante con compuestos con propiedades antiadhesivas para la profilaxis y/o mitigación de EA del SNC causados por dichas células T CAR. El "receptor de antígenos quimérico (CAR)" que se usa en la presente invención comprende un dominio de unión que es específico de células B, preferiblemente específico de un marcador CD que se puede hallar en linfoma de células B como CD19, CD22, CD20 o CD79a, en donde se prefiere CD19. Las células T que se han modificado genéticamente para expresar un receptor de antígenos quimérico CAR (una célula T CAR) se ejemplifican en el documento WO2007/131092. Se sabe mientras tanto que también una terapia que comprende CAR de células T desencadena eventos adversos clínicos y, en particular, EA del SNC.

La expresión "células diana" no se limita específicamente y se refiere preferiblemente a células diana de cáncer (en particular células de cáncer que expresan una diana adecuada que las hace susceptibles de ataque). Se prefieren más las células de linfoma B, en donde se prefieren más las células B positivas CD19 (células B de linfoma).

El término "mamífero" incluye, aunque sin limitarse a ello, ratón, rata, perro, caballo, camello, primates, etc., en donde se prefieren los primates y lo más preferiblemente los seres humanos.

Las "células endoteliales" mamíferas se pueden aislar de vasos o capilares grandes. La expresión "células endoteliales" incluye por lo tanto células endoteliales recién aisladas (por ejemplo HUVEC), células endoteliales comercialmente disponibles de distintos fabricantes (p. ej., PromoCell) y líneas celulares endoteliales, aunque se prefieren menos las líneas de células endoteliales. Se prefieren las células endoteliales humanas. Se prefieren particularmente las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y las células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC), en donde las HBMEC son las más preferidas.

Los eventos adversos se pueden clasificar en cinco grados de acuerdo con los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE). El grado 1 se refiere a EA leves, el grado 2 a EA moderados, el grado 3 a EA graves, el grado 4 a EA potencialmente mortales o incapacitantes, mientras que el grado 5 significa muerte relacionada con EA. Todos estos EA se contemplan dentro del marco de la presente invención y se incluyen en el término "eventos adversos clínicos" o "eventos adversos" o términos relacionados utilizados en la presente invención.

La expresión "eventos adversos clínicos" utilizada en la presente invención se refiere a aquellos causados por terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente que comprende en particular eventos adversos neurológicos. Dicho evento adverso neurológico, que algunas veces también se indica como "síntoma neurológico" o "efecto adverso neurológico" o "evento adverso del sistema nervioso central (EA del SNC)", incluye, entre otros, afecciones de un paciente humano tales como todas las formas de dolor, jaqueca, debilidad muscular/descoordiación, trastorno del equilibrio, trastorno/deterioro del habla, alteración/anomalías sensoriales, mareos, ataxia, apraxia, temblores, afasia, disfasia, confusión, desorientación, alucinaciones, síntomas cerebelares, encefalopatía, convulsiones (grand mal). Concretamente, los síntomas neurológicos se observan durante el tratamiento con una terapia que comprende redirigir las células T contra células diana, p. ej., a través de la transducción de células T con un reclutamiento de células T o CAR mediante un compuesto que comprende un dominio de unión específico de CD3, por ejemplo, confusión y desorientación. "Confusión", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a la pérdida de orientación que es la capacidad de ubicarse a uno mismo correctamente en el mundo en función del tiempo, la localización y la identidad personal, y a menudo la memoria, que es la capacidad de recordar correctamente eventos previos o adquirir material nuevo. Los pacientes usualmente tienen dificultades para concentrarse y el pensamiento no es solamente difuso e impreciso sino que a menudo se ve muy ralentizado. Los pacientes con síntomas neurológicos también sufren de pérdida de la memoria. Frecuentemente, la confusión lleva a pérdida de la capacidad de reconocer gente y/o lugares, o de leer la hora y la fecha. Las sensaciones de desorientación son comunes en confusión, y la capacidad de toma de decisiones se encuentra debilitada. Los síntomas neurológicos también comprenden habla imprecisa y/o dificultad para encontrar las palabras. Este trastorno puede debilitar la expresión y comprensión de la lengua además de la lecto-escritura. Además, el vértigo y los mareos pueden acompañar síntomas neurológicos en algunos pacientes.

La expresión "eventos adversos clínicos" preferiblemente se caracteriza por (aunque sin limitarse a ello) uno o más de (i) trastorno cognitivo que comprende desorientación/confusión y/o problemas para encontrar las palabras/afasia, (ii) convulsiones, (iii) síntomas cerebelares parcialmente observados como una fase prodromal opcional de (i) o (ii) que comprende temblores cinéticos, ataxia, disartria y problemas con la escritura. Otros eventos adversos neurológicos son apraxia y alucinaciones. Se prefieren los problemas para encontrar las palabras en el contexto de la presente invención. Son de particular significación clínica los efectos adversos clínicos que causan la interrupción del tratamiento con terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente (preferiblemente terapia con Blinatumomab u otros fármacos de unión a CD3 o CAR), ya que el paciente tratado no puede por lo tanto beneficiarse plenamente con el tratamiento.

El "paciente" es un paciente mamífero, preferiblemente un primate, lo más preferiblemente un ser humano. En una realización preferida, se sospecha/asume que el paciente posee, o concretamente posee, células B CD19-positivas malignas. En el último caso, ya se ha diagnosticado que dicho paciente posee dichas células. Las células B CD19-positivas malignas están presentes en un paciente que desarrolla y/o padece linfoma y/o leucemia.

La presente descripción también se refiere a un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) para uso en un método para redirigir las células T contra células diana en un paciente, en donde dicho paciente está sujeto a terapia que comprende el "compuesto que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas". Una secuencia de ácido nucleico incluye entonces, aunque sin limitarse a ello, vectores, etc., que permiten la expresión de los CAR deseados en células T (véase, por ejemplo, el documento WO2007/131092).

Para evitar dudas, se ha de destacar que la descripción de la presente invención, incluidas todas las definiciones, etc. es totalmente aplicable a todas las realizaciones que forman parte de la presente invención (es decir están enlazadas con la esencia de la invención y en consecuencia recaen en el contexto de la presente invención), más allá de si estas realizaciones están bosquejadas como compuestos para realizaciones de uso o realizaciones de métodos de tratamiento o realizaciones de compuestos, realizaciones de kits, realizaciones de composiciones, realizaciones de uso, realizaciones de métodos, etc. Por consiguiente, todas las definiciones y realizaciones se pueden emplear y aplicar a todas las realizaciones descritas en la presente invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tiene como fin referirse a una cantidad del compuesto que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células

endoteliales mamíferas, que proporciona un tratamiento, mejoría o profilaxis de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente (es decir, que proporciona "eficacia terapéutica").

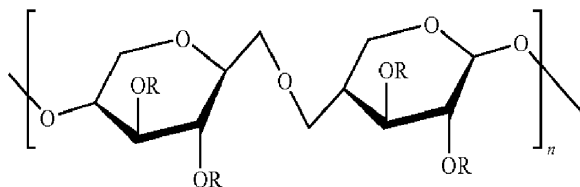
A continuación, se intenta ilustrar en más detalle la etiología de los eventos adversos del sistema nervioso central (EA del SNC) causados por un dominio de unión específico de CD3 y los criterios para emplear adhesión antileucocitaria como profilaxis y mitigación de dichos EA del SNC. Los EA del SNC que requieren la interrupción del tratamiento se explican actualmente de la mejor manera mediante la hipótesis de un patomecanismo de múltiples etapas que inicia la neuroinflamación transitoria meníngea y perivascular. El comienzo de la infusión con Blinatumomab y cualquier aumento gradual de la dosis inducen la rápida adhesión de células T de sangre periférica, junto con otros leucocitos de sangre periférica tales como linfocitos citolíticos naturales y monocitos, hacia las células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos. Este proceso ocurre independientemente de la presencia de células diana circulantes (es decir, sangre periférica), es decir, células B CD19-positivas normales y/o malignas. Asimismo, la redistribución de células T como resultado de la adhesión de células T al endotelio de los vasos sanguíneos parece ser por lo menos parcialmente independiente de la dosis de Blinatumomab, como se observó incluso con el nivel de dosis más bajo de 0,5 µg/m<sup>2</sup>/día que se ensayó. Por consiguiente, la redistribución de células T como consecuencia de un incremento transitorio en la adhesividad de las células T parece ser desencadenada por el cambio de exposición *per se* al comienzo de la administración del Blinatumomab y durante los incrementos de la dosis en lugar de ser por la exposición absoluta superior en una dosis más alta. Es muy probable que la adhesión endotelial de leucocitos de sangre periférica también tenga lugar en los vasos sanguíneos del SNC, en donde se han sugerido especialmente los microvasos meníngeos como sitio de entrada inicial para células inflamatorias de sangre periférica y como punto de partida potencial para los fenómenos inflamatorios.

Como se describe en más detalle en este documento, tres hallazgos clave respaldan este supuesto: (1) la redistribución de células T circulantes y otros leucocitos después del inicio de la infusión o el incremento gradual de la dosis en cualquier paciente, que implica una rápida reducción de los recuentos de células sanguíneas dentro de 45 minutos seguida por una recuperación de los recuentos de células sanguíneas al cabo de unos pocos días; (2) el incremento transitorio de adhesividad de células T circulantes hacia las células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos según lo medido por un aumento en la unión de proteínas de fusión ICAM-1-Fc solubles a LFA-1 en células T; y (3) el incremento transitorio de angiopoyetina-2 (Ang-2) en sangre periférica, que representa un marcador específico para la activación de células endoteliales (Fiedler y Augustin. Trends Immunol. 2006; 27:552-8).

Después de la adhesión de leucocitos a los microvasos meníngeos y vénulas postcapilares del cerebro, se cree que parte de estas células se extravasan hacia los espacios leptomeníngeos y perivascuales, respectivamente (Figuras 2A y B). Incluso en ausencia de extravasación de células T profundas, la adhesión de leucocitos a las células endoteliales del recubrimiento de los vasos sanguíneos *per se* puede inducir la fuga de vasos sanguíneos del SNC y síntomas neurológicos como convulsiones (Fabene et al. Nat Med. 2008; 14:1377-83).

El pentosanpolisulfato (PPS; C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O<sub>21</sub>S<sub>4</sub>), también conocido como Pentosán Polisulfato, Xilano Hidrógeno Sulfato, Xilano Polisulfato, es un derivado de carbohidrato macromolecular de tipo heparina que se produce en forma semisintética, que química y estructuralmente se asemeja a los glucosaminoglicanos. Es un polvo blanco inoloro, ligeramente higroscópico y soluble en agua al 50% a pH 6. Tiene un peso molecular de 4000 a 6000 Dalton. El PPS se comercializa, por ejemplo, con el nombre Elmiron® por Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc. y es hasta el momento el único medicamento oral aprobado por la FDA de EE. UU., para el tratamiento de cistitis intersticial, también conocida como síndrome de vejiga dolorosa. Para el tratamiento de esta afección, el PPS se administra por vía oral, no obstante, puede alternativamente administrarse por vía intravenosa.

El término "pentosanpolisulfato (o PPS)" abarca derivados de carbohidratos macromoleculares de tipo heparina producidos en forma semi-sintética.



En el sentido de la presente invención, el pentosanpolisulfato es una mezcla de polímeros lineales de xilosa enlazada a β1→4, usualmente sulfatada en las posiciones 2 y 3 y ocasionalmente sustituida en la posición 2 con 4-O-metil-α-D-ácido glucurónico -2,3-O-sulfato. Por consiguiente, el PPS puede también designarse como β1→4-D-Xilan-2,3-bis(hidrógeno sulfato).

A modo de ejemplo, un derivado de carbohidrato macromolecular de tipo heparina producido en forma semi-sintética tal como, en particular PPS, se puede producir (obtener), por ejemplo, de la siguiente manera: su esqueleto de polisacárido, xilano, se extrae, por ejemplo, de la corteza de haya u otras fuentes vegetales y luego se trata con

agentes sulfatantes tales como ácido clorosulfónico o cloruro de sulfurilo y ácido. Después de la sulfatación, el PPS habitualmente se trata con hidróxido de sodio para producir la sal de sodio que es una sal preferida de la presente invención. Los procesos para la producción de un derivado de carbohidrato macromolecular de tipo heparina producido en forma semisintética, tal como en particular PPS, se describen, por ejemplo, en los documentos US 2.689.848 o US 2010/0105889.

En el contexto de la presente invención, el PPS preferiblemente se administra por vía oral a un paciente, incluso más preferiblemente por vía intravenosa. Las dosis típicas son 100, 150, 200 o 300 mg, administrados 1-3 veces por día, con una cantidad máxima de 600 mg/día. Típicamente, la dosis diaria oscila entre 100 y 600 mg tal como 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 mg o incluso más. Por ejemplo, se pueden administrar 100 mg de PPS 3-6 veces. De modo similar, se pueden administrar 200 mg de PPS 2-3 veces. Alternativamente, se pueden administrar 300 mg de PPS 2 veces. Alternativamente, se puede administrar PPS en una cantidad, por ejemplo, entre 100 y 600 mg tal como 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 mg durante 24 horas mediante infusión, por ejemplo, usando un perfusor. En este último caso, una inyección en bolo de PPS en una cantidad, por ejemplo, de 100, 200 o 300 mg, puede preceder a una terapia que comprende re-dirigir las células T contra células diana en un paciente, seguido de administración de PPS de 100, 200 o 300 mg/día durante 24, 48 o 72 horas.

Se puede administrar PPS antes (p. ej., profilácticamente como una inyección en bolo), concurrentemente o subsiguientemente a la administración de una terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente como se describe en este documento. Ventajosamente, el PPS se puede administrar a un paciente cuando la terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente se repetirá o aumentará (p. ej., al comienzo de la infusión o cualquier etapa de la dosis). Un PPS particular preferido que se administró a un paciente mencionado en la presente invención es pentosanpolisulfato SP54® comúnmente conocido y disponible en el mercado (p. ej., de bene Arzneimittel GmbH).

Aparte del PPS, otros compuestos clínicamente disponibles con propiedades antiadhesivas conocidas son Minociclina y Natalizumab como se describe en este documento. Si bien P-selectina media la primera etapa (es decir, rodamiento) de la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, las etapas subsiguientes son mediadas por integrinas. Particularmente, las interacciones de LFA-1 y VLA-4 en las células T con ICAM-1 y VCAM-1 sobre las células endoteliales, respectivamente, cumplen una función prominente durante esta segunda fase de adhesión de leucocitos a las células endoteliales. Como tales, ya que LFA-1, VLA-4 e ICAM-1 pertenecen a la familia de integrinas y a la superfamilia de IgG, se prefieren los antagonistas de integrinas y los antagonistas de la superfamilia de IgG de la presente invención. Como inhibidores de moléculas pequeñas de LFA-1, las tetraciclinas están disponibles para uso clínico en seres humanos. Dentro de la familia de tetraciclinas, la Minociclina es el inhibidor mejor caracterizado de LFA-1 (Nikodemova et al. J Neuroimmunol. 2010; 219:33-7). La Minociclina es la más lipófila entre todas las tetraciclinas y posee prácticamente el 100% de biodisponibilidad después de la administración oral. También tiene la semivida más larga *in vivo* de aproximadamente 24 horas, lo cual es un pre-requisito para una exposición en suero ininterrumpida durante un periodo de tiempo prolongado. Asimismo, la Minociclina es la que mejor penetra en el SNC, lo que la hace particularmente adecuada para el tratamiento de trastornos del SNC. En ensayos clínicos, se demostró que la Minociclina contrarresta la neuroinflamación en esclerosis múltiple (Zhang et al. Can J Neurol Sci. 2008; 35:185-91) y mejora el desenlace neurológico en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo (Lampl et al. Neurology. 2007; 69:1404-10). En un estudio reciente de hallazgo de la dosis en Minociclina como agente neuroprotector en pacientes con apoplejía, se descubrió que las dosis diarias de hasta 10 mg/kg iv equivalentes a 700 mg por vía oral durante varios días eran seguras y se toleraban bien (Fagan et al. Stroke. 2010; 41:2283-7). En forma mecánica, la Minociclina reduce la expresión de LFA-1 en células T y actúa como quelante para cationes tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  que se requieren para la unión firme de LFA-1 a ICAM-1. Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, la Minociclina es un compuesto no glucocorticoide preferido de la presente invención.

Natalizumab es un anticuerpo aprobado para el tratamiento de esclerosis múltiple. Se une a VLA-4 en células T bloqueando así su interacción con VCAM-1 en células endoteliales. En consecuencia, la adhesión y extravasación de células T, especialmente hacia el cerebro, se disminuyen. Por ende, Natalizumab es otro compuesto no glucocorticoide preferido de la presente invención.

Una lista no exclusiva de otros compuestos con propiedades antiadhesivas propuestas que están o podrían estar disponibles para uso clínico en seres humanos se expone en la Tabla 1. Cada uno de estos compuestos es un compuesto no glucocorticoide preferido de la presente invención, en donde se prefieren más Minociclina y Natalizumab.

Un "dominio de unión específico de CD3", a veces también indicado en este documento como "dominio de unión de CD3", caracteriza un dominio de unión que comprende un marco/región marco y un "sitio de unión al antígeno" o un "sitio de interacción con el antígeno" que es capaz de interactuar específicamente con un antígeno de CD3. También se entiende que dicha unión/interacción define un "reconocimiento específico". La expresión "que interactúa específicamente" significa de acuerdo con la presente invención que el dominio de unión es capaz de unirse a un epítipo del antígeno de CD3, preferiblemente el antígeno de CD3épsilon y más preferiblemente el antígeno de CD3épsilon humano.

Tal como se emplea en este documento, "CD3" ilustra una molécula expresada como parte del complejo receptor de células T y tiene el significado típicamente que se le atribuye en la técnica anterior. En seres humanos, abarca en forma individual o independientemente combinada todas las subunidades de CD3 conocidas, por ejemplo CD3épsilon, CD3delta, CD3gama y CD3zeta. El antígeno de CD3épsilon humano se indica con el número de acceso en GenBank NM\_000733.

El término "marco (región)" incluye un andamio para sitios de unión al antígeno. Por ejemplo, dicho andamio podría ser provisto por la proteína A, en particular su dominio Z (aficuerpos), ImmE7 (proteínas de inmunidad), BPTI/APPI (dominios Kunitz), proteína de unión a Ras AF-6 (dominios PDZ), caribdotoxina (toxina de escorpión), CTLA-4, Min-23 (knotinas), lipocalinas (anticalinas), neokarzinostatina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición de consenso de ankirina o tiorredoxina (Skerra. Curr Opin Biotechnol. 2007; 18:295-304; Hosse et al. Protein Sci. 2006; 15:14-27; Nicaise et al. Protein Sci. 2004; 13:1882-91; Nygren y Uhlen. Curr Opin Struct Biol. 1997; 7:463-9). En el contexto de la presente invención, un marco preferido consiste en las porciones reconocidas en la técnica de una región variable de anticuerpo que existe entre las regiones determinantes de complementariedad más divergentes (es decir, hipervariables) (CDR) dentro de la región variable de un anticuerpo. Dichas regiones marco típicamente se denominan marcos 1 a 4 (FR1, FR2, FR3, and FR4) y proporcionan andamios para la presentación de las seis CDR (tres de la cadena pesada y tres de la cadena ligera) en espacio tridimensional, para formar una superficie de unión al antígeno.

El dominio de unión específico de CD3 en línea con la presente invención es un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3. Las técnicas para la producción de anticuerpos se conocen en el campo y se describen, p. ej., en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y en Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. El término "anticuerpo" también comprende inmunoglobulinas (Ig) de distintas clases (es decir, IgA, IgG, IgM, IgD e IgE) y subclases (tales como IgG1, IgG2, etc.). Como se describe en este documento, el término "anticuerpo" también incluye realizaciones tales como anticuerpos quiméricos, monocatenarios, desimmunizados y humanizados, así como fragmentos de anticuerpos, como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos o derivados de anticuerpos comprenden además fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv o anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos de un solo dominio variable o un solo dominio variable de inmunoglobulina que comprende exclusivamente un dominio variable, que podría ser VH o VL, que específicamente se une a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones V o dominios; véanse, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), anteriormente citados. Dicho dominio sencillo variable de inmunoglobulina abarca no solamente un polipéptido de un solo dominio variable de anticuerpo aislado, sino también polipéptidos más grandes que comprenden uno o más monómeros de una secuencia de polipéptidos de un solo dominio variable.

En una realización incluso más preferida, dicho anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 es Blinatumomab (MT103/AMG103). En otra realización preferida de la presente invención, dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19 x CD3 comprenden un primer dominio de unión capaz de unirse a un epítipo de CD3épsilon humano y a un segundo dominio de unión capaz de unirse a CD19 humano. Los antígenos CD humanos son fácilmente derivables de bases de datos públicamente disponibles. El antígeno de CD19 humano se indica, por ejemplo, con el número de acceso en GenBank AAA69966. Todos los anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19xCD3 específicos descritos en este documento, incluidas sus variantes, fragmentos, equivalentes, etc. son anticuerpos monocatenarios específicos de CD19xCD3 particularmente preferidos de la presente invención.

Como se emplea en este documento, un "anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 " indica una cadena de polipéptidos sencilla que comprende dos dominios de unión. Dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos se prefieren en el contexto de los métodos/esquemas de dosis de la presente invención. Cada dominio de unión comprende por lo menos una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo ("región VH o H"), en donde la región VH del primer dominio de unión se une específicamente a CD3épsilon y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente a CD19. Los dos dominios de unión se enlazan opcionalmente uno al otro por un espaciador de polipéptidos corto. Un ejemplo no limitativo de un espaciador de polipéptidos es Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) y sus repeticiones. Cada dominio de unión puede además comprender una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo ("región VL o L"), en donde la región VH y la región VL dentro de cada uno del primero y segundo dominios de unión está enlazada con la otra mediante un enlazador de polipéptidos, por ejemplo del tipo descrito y reivindicado en el documento EP 623679 B1, pero en cualquier caso lo suficientemente largo como para permitir que la región VH y la región VL del primer dominio de unión y la región VH y la región VL del segundo dominio de unión se unan entre sí de forma tal que, juntas, sean capaces de unirse específicamente al primero y segundo dominio de unión respectivos. Dichos anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19xCD3 se describen en gran detalle en los documentos WO 99/54440 y WO 2004/106381.

Preferiblemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico aplicado en los métodos/esquemas de dosis de la presente invención tiene la disposición del dominio (a) VL(CD19)-VH(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3). No obstante, también se contempla que los métodos de la invención se pueden llevar a cabo con anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de CD19xCD3 de otras disposiciones del dominio, como

- (b) VH(CD19)-VL(CD19)-VH(CD3)-VL(CD3),
- (c) VL(CD19)-VH(CD19)-VL(CD3)-VH(CD3),
- (d) VH(CD19)-VL(CD19)-VL(CD3)-VH(CD3),
- (e) VL(CD3)-VH(CD3)-VH(CD19)-VL(CD19),
- 5 (f) VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CD19)-VL(CD19),
- (g) VL(CD3)-VH(CD3)-VL(CD19)-VH(CD19), o
- (h) VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CD19)-VH(CD19).

Un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 preferido aplicado en los métodos de la presente invención comprende

- 10 (a) las CDR anti-CD3 de la cadena pesada que se muestran como CD3 CDR-H1 en SEQ ID NO: 11 (RYTMH), más preferiblemente en SEQ ID NO: 11 (GYTFTRYTMH), CD3 CDR-H2 en SEQ ID NO: 12 (YINPSRGYTNYNQKFKD) y CD3 CDR-H3 en SEQ ID NO: 13 (YYDDHYCLDY); y/o
- (b) las CDR anti-CD3 de la cadena ligera que se muestran como CD3 CDR-L1 en SEQ ID NO: 14 (RASSSVSYMN), CD3 CDR-L2 en SEQ ID NO: 15 (DTSKVAS) y CD3 CDR-L3 en SEQ ID NO: 16 (QQWSSNPLT); y/o
- 15 (c) las CDR anti-CD19 de la cadena pesada que se muestran como CD19 CDR-H1 en SEQ ID NO: 17 (SYWMN), más preferiblemente en SEQ ID NO: 17 (GYAFSSYWMN), CD19 CDR-H2 en SEQ ID NO: 18 (QIWPGDGDNTYNGKFKG) y CD19 CDR-H3 en SEQ ID NO: 19 (RETTTVGRYYYYAMDY); y/o
- (d) las CDR anti-CD19 de la cadena ligera que se muestran como CD19 CDR-L1 en SEQ ID NO: 20 (KASQSDYDGD SYLN), CD19 CDR-L2 en SEQ ID NO: 21 (DASNLVS) y CD19 CDR-L3 en SEQ ID NO: 22 (QQSTEDPWT).
- 20

Se prefiere más que el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 aplicado en los métodos de la presente invención comprenda las CDR de CD3 de la cadena pesada y la cadena ligera. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 aplicado en los métodos de la presente invención comprende las CDR de CD3 de las cadenas pesada y ligera, además de las CDR de CD19 de las cadenas pesada y ligera. Las CDR a las que se hace referencia en la presente invención concuerdan con el sistema de numeración Kabat. El esquema de numeración Kabat es un estándar ampliamente adoptado para numerar los residuos de un anticuerpo en un modo uniforme (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991).

Alternativamente, se prefiere que el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 aplicado en los métodos de la presente invención comprenda

- 30 (a) la cadena pesada variable de CD19 que se muestra en SEQ ID NO: 3 (la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 4); y/o
- (b) la cadena ligera variable de CD19 que se muestra en SEQ ID NO: 5 (la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 6); y/o
- (c) la cadena pesada variable de CD3 que se muestra en SEQ ID NO: 7 (la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 8); y/o
- 35 (d) la cadena ligera variable de CD3 que se muestra en SEQ ID NO: 9 (la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 10).

Más preferiblemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 aplicado en los métodos de la presente invención comprende las cadenas pesadas y ligeras variables de CD19 y/o las cadenas pesada y ligera variables de CD3. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 aplicado en los métodos de la presente invención comprende las cadenas pesada y ligera variables de CD19, además de las cadenas ligera y pesada variables de CD3.

En otra alternativa, se prefiere también que el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

- 45 (a) una secuencia de aminoácidos según lo representado en SEQ ID NO: 1;
- (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 2;

(c) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de identidad con una secuencia de ácido nucleico de (b), en donde dicha secuencia de aminoácidos es capaz de unirse específicamente a CD3 y CD19; y

- 5 (d) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico que se degenera como consecuencia del código genético a una secuencia de nucleótidos de (b), en donde dicha secuencia de aminoácidos es capaz de unirse específicamente a CD3 y CD19.

Se ha de entender que la identidad de secuencia se determina en toda la secuencia de aminoácidos. Para alineación de secuencias, por ejemplo, se pueden usar los programas Gap o BestFit (Needleman y Wunsch. J Mol Biol. 1970; 48:443-53; Smith y Waterman. Adv Appl Math. 1981; 2:482-9), contenidos en el paquete de software GCG (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE. UU. 53711). Es un método de rutina para los expertos en la técnica determinar e identificar una secuencia de aminoácidos que tiene, p. ej., 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19xCD3 descritos en este documento (preferiblemente Blinatumomab). Por ejemplo, de acuerdo con la hipótesis de oscilación de Crick, la base 5' en el anticodón no está tan espacialmente confinada como las otras dos bases, y podría por lo tanto tener un apareamiento de bases no estándar. En otros términos: la tercera posición en un triplete de codones puede variar de forma tal que dos tripletes que difieren en esta tercera posición puedan codificar el mismo residuo de aminoácidos. El experto en la técnica conoce dicha hipótesis (véase, p. ej., [http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble\\_Hypothesis](http://en.wikipedia.org/wiki/Wobble_Hypothesis); Crick. J Mol Biol. 1966; 19:548-55). Es además un procedimiento de rutina para el experto en la técnica determinar la actividad citotóxica de dicha secuencia de aminoácidos que tiene, p. ej., 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19xCD3 descritos en este documento. La actividad citotóxica del anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 o un constructo de anticuerpos que tiene, p. ej., 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19xCD3 descritos en este documento se puede determinar por los métodos ilustrados, p. ej., en el documento WO 99/54440.

Se prefiere particularmente que dicho anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 tenga la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1. Se prefiere también particularmente el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 descrito en el documento WO 99/54440, además de aquellos anticuerpos monocatenarios biespecíficos de CD19xCD3 descritos en el documento WO 2004/106381. Blinatumomab (o AMG 103 o MT103) es el más preferido.

La presente descripción se refiere además a un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 y/o a un método para

(a) tratar células CD19-positivas malignas, preferiblemente linfocitos, incluso más preferiblemente células B, en un paciente humano, y/o

- 35 (b) administrar un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 a un paciente humano;

en donde un compuesto con propiedades antiadhesivas se ha de administrar antes, en forma concurrente o subsiguiente al tratamiento de un paciente humano con dicho anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 para la profilaxis o mitigación de EA del SNC causados por dicho anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3, un compuesto que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas para uso en un método de profilaxis y/o mitigación y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir células T contra células diana en un paciente

La administración de la terapia que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente (preferiblemente el dominio de unión específico de CD3, más preferiblemente Blinatumomab), de (a) compuesto(s) con propiedades anti-adhesivas (compuesto que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas) y/o de (a) una o más composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier combinación de los componentes anteriormente mencionados, es preferiblemente una administración intravenosa. Se puede administrar como una inyección en bolo o como una infusión intravenosa continua (civ), prefiriéndose que sea continua. Una administración continua se refiere a una administración que esencialmente no tiene interrupción. "Esencialmente no tiene interrupción" incluye una administración continua que usualmente no tiene extensión espacial ni flujo interrumpido. A modo de ejemplo, el documento WO 2007/068354 describe un esquema de tratamiento. Otros esquemas de tratamiento que se contemplan en el contexto de la presente invención se describen en el documento PCT/EP2010/066207.

Se contempla también que el paciente se caracteriza por una relación de células B/T de menos de 1:5 (véase PCT/EP2010/066207) y/o un número de células B de menos de aproximadamente 50 células B por  $\mu$ l de sangre periférica. Como se describe en gran detalle en el documento PCT/EP2010/066207, la administración de un dominio de unión específico de CD3, en particular de un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19xCD3 a un paciente frecuentemente va acompañada de síntomas neurológicos si dicho paciente se caracteriza por una relación de

células B:T de menos de 1:5. No obstante, la profilaxis o mitigación descrita en este documento de estos efectos adversos neurológicos causados por un dominio de unión específico de CD3 a modo de medicamento concomitante con (a) compuesto(s) que tiene propiedades anti-adhesivas (como se define en la presente invención) es también aplicable a pacientes que se caracterizan por una relación de células B:T igual a o superior a 1:5 (véase PCT/EP2010/066207).

La presente invención también se refiere a un kit (farmacéutico) que comprende un "compuesto" no glucocorticoide que (a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o (b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, o que (c) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o (d) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial, (es decir, un compuesto que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas como se define en este documento) junto con un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 (preferiblemente Blinatumomab), e instrucciones, una etiqueta y/o un prospecto que indican que dicho compuesto es para uso en un método de profilaxis y/o tratamiento de eventos adversos clínicos causados por terapia que comprende redirigir células T contra células diana en un paciente. Adicional o alternativamente, dichas instrucciones, etiqueta y/o prospecto indican que una terapia que comprende redirigir células T contra células diana puede causar EA, en particular EA del SNC y que, por consiguiente, se recomienda, contempla o resulta necesario mitigar estos efectos con un compuesto que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas. Los compuestos y/o la terapia que comprenden redirigir las células T contra células diana preferiblemente se envasan en un kit o embalaje sellado. Se contempla también que este kit comprende además medios para administrar el contenido(s) a un paciente, y/o tampones, viales, bolsas de teflón o bolsas de infusión que normalmente se utilizan para la infusión de agentes terapéuticos. "Medios" allí incluye uno o más artículos seleccionados del grupo que consiste en una jeringa, una aguja hipodérmica, una cánula, un catéter, una bolsa de infusión para administración intravenosa, vehículos intravenosos, viales, tampones, estabilizadores, instrucciones escritas que ayudan al experto en la técnica a preparar las respectivas dosis e infusiones de la invención, etc. El kit (farmacéutico) anteriormente mencionado puede además comprender un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR).

#### Tablas

Tabla 1. Compuestos con propiedades antiadhesivas conocidas o propuestas que están o podrían estar disponibles para uso clínico en seres humanos.

Moléculas de adhesión de células endoteliales (también se indican como dianas en células endoteliales)			
Diana	Compuesto	Modo de acción	Referencia
P-selectina	PPS, molécula pequeña	Bloqueo del sitio de unión PSGL-1	Höpfner et al. J Pharm Pharmacol. 2003; 55: 697-706
	Inclacumab, mAb	Bloqueo del sitio de unión PSGL-1	Kling et al. Thromb Res. 2013
ICAM-1	Alicaforsen enema (ISIS2303), siRNA	Inhibición de la expresión de ICAM-1	Van Deventer et al. Aliment Pharmacol Ther. 2006; 23: 1415-25
MAdCAM	PF-00547659, mAb	Bloqueo del sitio de unión de $\beta$ 7-integrinas	Pullen et al. Br J Pharmacol. 2009;157:281-93
VCAM-1	Rosuvastatina, molécula pequeña	Reducción de la expresión de VCAM-1	Osaka et al. Biomed Res Int. 2013
PAR-1, fibrinógeno	Trombina (a concentraciones pM)	Efecto adhesivo antileucocitario, mantenimiento de la integridad de la barrera vascular	Ku y Bae. Inflamm Res. 2013
Moléculas de adhesión de células T (también se indican como dianas en células T)			
Diana	Compuesto	Modo de acción	Referencia

<b>Moléculas de adhesión de células endoteliales (también se indican como dianas en células endoteliales)</b>			
<b>Diana</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Referencia</b>
$\alpha_4$ -integrinas (p. ej., VLA-4, LPAM-1)	Natalizumab, mAb	Bloqueo del sitio de unión de VCAM-1, MAdCAM, fibrinógeno, condroitina	Haanstra et al. J Immunol. 2013
	AJM300, molécula pequeña	Bloqueo del sitio de unión al ligando	Thomas y Baumgart. Inflammopharmacology. 2012; 20: 1-18
$\alpha_L\beta_2$ -integrina (LFA-1)	Minociclina	Reducción de expresión de LFA-1, quelante iónico	Nikodemova et al. J Neuroimmunol. 2010; 219: 33-7
	SAR 1118, molécula pequeña	Bloqueo del sitio de unión de ICAM-1, -2, -3	Rao et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51: 5198-204
	BOL-303225-A, molécula pequeña	Antagonista	Bucolo et al. J Pharm Pharmacol. 2008; 60: 1473-9
<b>Diana</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Referencia</b>
$\alpha_L$ -integrinas (p. ej., LFA-1)	Efalizumab, mAb	Bloqueo del sitio de acción de ICAM-1	Koszik et al. J Dermatol Sci. 2010; 60: 159-66
$\beta_7$ -integrinas	Etrolizumab, mAb	Bloqueo del sitio de acción de VCAM-1 y MAdCAM	Stefanich et al. Br J Pharmacol. 2011; 162: 1855-70
$\alpha_5\beta_1$ -integrina (VLA-5)	Natramune (PDS-2865), PureWay-C, ácido ascórbico; molécula pequeña	Interferencia con $\alpha_5\beta_1$ -adhesión mediada por integrina	Weeks et al. Med Sci Monit. 2008; 14: BR279-85; Eylar et al. P R Health Sci J. 1996; 15: 21-6
L-selectina	Ácido (acetil-) salicílico	Reducción de expresión de L-selectina	Gerli et al. J Immunol. 2001; 166: 832-40
Integrinas (p. ej., LFA-1, VLA-4)	Ácido etilendiamintetracético (EDTA)	Quelante de iones	Welzenbach et al. J Biol Chem. 2002; 277: 10590-8
CD44	Ácido hialurónico (HA), sulfato de condroitina, anti-CD44 mAb	Bloqueo del sitio de unión de HA y E-selectina	Murai et al. Immunol Lett. 2004; 93: 163-70; Baaten et al. Front Immunol. 2012; 3: 23
	Astilbin, flavonoide	Reducción de expresión de CD44	Yi et al. Int Immunopharmacol. 2008; 8: 1467-74
CD162 (PSGL-1)	mAb	Bloqueo del sitio de unión de P-selectina	Moore. Leuk Lymphoma. 1998; 29: 1-15
Cinasas de la familia Src (p. ej., Lck, Fyn)	PP2 (4-Amino-5-(4-clorofenil)-7-( <i>t</i> -butil)pirazolo[3,4-d]pirimidina)	Inhibidor selectivo de cinasas de la familia Src	Feigelson et al. J Biol Chem. 2001; 276: 13891-901
<b>Dianas en células T y/o células endoteliales</b>			
<b>Diana</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Referencia</b>

Diana	Compuesto	Modo de acción	Referencia
Sialidasa	Inhibidores de sialidasa, p. ej., castanospermina; molécula pequeña	Bloqueo de desilación de, p. ej., LFA-1, ICAM-1	Feng et al. J Leukoc Biol. 2011; 90: 313-21
Moléculas de adhesión	Ligandos recombinantes de moléculas de adhesión respectivas	Bloqueo competitivo de unión al ligando natural	
	siRNA, shRNA	Reducción o inhibición de expresión de moléculas de adhesión respectivas	

mAb: anticuerpo monoclonal

Tabla 2. Características de células T humanas recién aisladas.

Marcador	CD3	CD4	CD8	CD11a	CD49d	CD162	CD69	CD25	HLA-DR
% células positivas $\pm$ SD	93,37 $\pm$ 9,41	68,87 $\pm$ 4,02	25,10 $\pm$ 4,50	99,93 $\pm$ 0,06	32,90 $\pm$ 2,04	99,87 $\pm$ 0,23	1,10 $\pm$ 0,52	49,60 $\pm$ 13,85	5,03 $\pm$ 2,15

La expresión de CD3, CD4, CD8, CD11a, CD49d, CD162 (PSGL-1), CD69, CD25 y HLA-DR en la superficie de células T humanas recién aisladas se determinó por citometría de flujo. Se expresan células CD3-positivas como la  $\pm$  SD de la media en porcentaje de todos los eventos de 3 mediciones independientes. Las células CD4, CD8, CD11a, CD49d, CD162, CD69, CD25, y HLA-DR-positivas se expresan como la  $\pm$  SD de la media en porcentaje de células CD3-positivas de 3 mediciones independientes.

El compuesto de la presente invención es un compuesto no glucocorticoide, es decir los glucocorticoides preferiblemente se excluyen. El término "glucocorticoide" significa compuestos que se unen, preferiblemente en forma específica, al receptor de glucocorticoides. Dicho término incluye uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en cortisona, cortisol (hidrocortisona), cloprednol, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, deflazacort, flucortolona, triamcinolona, dexametasona, beatametasona, cortivazol, parametasona y/o fluticasona, incluidos sus derivados farmacéuticamente aceptables.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. No debe interpretarse que estos ejemplos limitan el alcance de la presente invención. Los ejemplos se incluyen con fines ilustrativos.

**Ejemplo 1:** Mitigación exitosa de EA del SNC por adhesión antileucocitaria con PPS en pacientes con alto riesgo de suspensión del tratamiento de Blinatumomab debido a EA del SNC

Esquema de administración de medicación concomitante de Blinatumomab y PPS. En un estudio clínico de fase 1, tres pacientes fueron tratados con Blinatumomab a una dosis inicial de 5  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  durante 1 semana seguido de aumento de la dosis a 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$  por otras 3 a 7 semanas. Se administró PPS concomitante como 100 mg de infusión iv en bolo a 3 h  $\pm$  30 min antes del inicio de la infusión y el aumento de la dosis de Blinatumomab seguida de perfusión de 300 mg/día durante 48 h después del inicio de la infusión y el aumento de la dosis de Blinatumomab.

Paciente 109-036 (véase también la Figura 3E).

El paciente 109-036, un hombre caucásico de 62 años de edad, peso 96,8 kg, estatura 1,78 cm, presentaba linfoma folicular de grado I/II. Las terapias previas incluyeron CHOP (02/12 - 03/04), Dexa BEAM (03/05), Ciclofosfamida (03/08), y radioterapia seguidos de trasplante autólogo de células madre (03/08). El paciente alcanzó una respuesta completa (CR) después de 57 días de infusión iv de Blinatumomab. Si bien este paciente conllevaba alto riesgo de desarrollar EA del SNC debido a su baja relación de células B:T (véase el documento PCT/EP2010/066207), no fue necesario interrumpir el tratamiento a causa de EA del SNC.

Paciente 109-040 (véase también la Figura 3F).

El paciente 109-040, un hombre caucásico, 51 años, peso 94,0 kg, estatura 1,80 cm, presentaba un linfoma linfoplasmocítico (Morbus Waldenstrom). Las terapias previas habían incluido CVP (04/12 - 05/03), Leukeran (05/10 - 05/12), Rituximab (06/05 - 06/07), R-CHOP (06/07 - 06/10), Dexametasona BEAM (06/10), BEAM (06/12) y radioterapia seguida de trasplante autólogo de células madre (06/12). Las terapias adicionales previas comprendieron Rituximab + Bendamustina (09/04 - 09/12) y Rituximab (09/04 - 09/12). El paciente alcanzó una enfermedad estable (SD) después de 30 días de infusión intravenosa de Blinatumomab. Si bien este paciente conllevaba un gran riesgo de desarrollar EA del SNC debido a su baja relación de células B:T (véase PCT/EP2010/066207), no fue necesario interrumpir el tratamiento a causa de EA del SNC.

Paciente 109-042 (véase también la Figura 3D).

El paciente 109-042, una mujer caucásica, 49 años, peso 92,0 kg, estatura 1,69 cm, presentaba un linfoma folicular de grado I/II. Las terapias previas habían incluido R-CHOP (09/11 - 10/02) y Rituximab (10/03 - 10/04). La paciente alcanzó una respuesta completa (CR) después de 56 días de infusión intravenosa de Blinatumomab. Si bien esta paciente conllevaba un alto riesgo de desarrollar EA del SNC debido a su baja relación de células B:T (véase PCT/EP2010/066207), no fue necesario interrumpir el tratamiento a causa de EA del SNC.

**Ejemplo 2:** Sistema de cámara de flujo *in vitro* que imita la interacción de células T/células endoteliales desencadenada por Blinatumomab u otros fármacos de unión específicos de CD3

Cultivo de células endoteliales.

Se usaron células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC) (#1000, ScienCell Research Laboratories) o células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) (#C-12200, Promocell) como modelo de células endoteliales. HBMEC criopreservadas en el pasaje 1 ( $> 5 \times 10^5$  células/ml) se cultivaron primero en matraces de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> tratados con Nunclon recubierto con fibronectina (#156499, Nunc) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en un Heraeus Cytoperm 2 (Thermo Scientific) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se efectuó el sub-cultivo de HBMEC con el kit Detach (#C-41200, Promocell) que consiste en disolución salina balanceada tamponada con HEPES (#C-40000, Promocell), disolución de tripsina-EDTA (0,04% / 0,03%) (#C-41000, Promocell) y disolución de neutralización de tripsina (TNS, #C-41100, Promocell). En síntesis, el medio se aspiró de la capa de HBMEC y las células se lavaron con 2 ml de disolución salina balanceada tamponada con HEPES. La adición de 2 ml de disolución de tripsina-EDTA durante 1 - 5 min a temperatura ambiente condujo al desprendimiento de HBMEC del fondo del matraz. La inactivación de disolución de tripsina-EDTA se efectuó por adición de 2 ml de disolución de neutralización de tripsina a la suspensión celular. Las células se centrifugaron a 300 g durante 4 min en un Heraeus Megafuge 40 (Thermo Scientific) y se sembraron a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células por matraz de cultivo celular 75 cm<sup>2</sup> recubierto con gelatina (#L7230, Biochrom). Se cultivaron HBMEC para experimentos de rodamiento y adhesión en medio RPMI 1640 (#FG1215, Biochrom) enriquecido con suero Nu IV (10%) (#355505, BD Biosciences), FBS dializado (10%) (#SZ0115, Biochrom), MEM-vitaminas (1%) (#K0373, Biochrom), L-glutamina (1%) (#K0283, Biochrom), piruvato sódico (1%) (#L0473, Biochrom), heparina (10 U/ml) (#L6510, Biochrom) y factor de crecimiento celular epidérmico ECGS (30 µg/ml) (#02-102, Millipore). El cultivo de HUVEC se efectuó en medio de crecimiento de células endoteliales (#C-22010, Promocell) enriquecido con FBS dializado (10%) (#SZ0115, Biochrom) usando matraces de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> recubiertos con gelatina. El subcultivo de HUVEC se efectuó con el kit Detach (#C-40000, Promocell) y las células se sembraron a una densidad celular de  $4,0\text{--}7,5 \times 10^5$  células por 75 cm<sup>2</sup> de matraz de cultivo celular.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas y células T de sangre. El aislamiento de PBMC humanas de sangre se efectuó por centrifugación de gradiente de densidad como se describe en otra parte. En síntesis, 15 - 20 ml de sangre heparinizada recién extraída se transfirieron en Biocoll (#L6115, Biochrom) –tubos que contenían Leukosep (#227290, Greiner bio-one) y se centrifugaron en un Hettich Rotanta 460 RS Tipo 5606 (Hettich Laborapparate) a 1066 g durante 15 min. Después de eliminar la fracción de plasma, la fase que contenía PBMC se transfirió en un tubo nuevo y se lavó dos veces con tampón FACS (D-PBS #L1820, 5% FBS #SO115, Biochrom). Se efectuó la lisis de eritrocitos con tampón de lisis (8,29 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 1,00 g/l KHCO<sub>3</sub>, 0,037 g/l EDTA) durante 5 min a temperatura ambiente. Para purificación subsiguiente de células T intactas, se usó el kit II de aislamiento de células T humanas Pan (#130-091-156, Miltenyi Biotec) de conformidad con las instrucciones del fabricante.

Caracterización de células T humanas aisladas por citometría de flujo.

Las células T aisladas se caracterizaron por citometría de flujo para expresión superficial de moléculas de adhesión y marcadores de activación. La tinción FACS y los procedimientos de lavado se efectuaron a 4°C en tampón FACS frío (D-PBS con 5% FBS). Para analizar las moléculas de adhesión expuestas a la superficie, se tiñeron  $3 \times 10^5$  células T en 100 µl de tampón FACS con anti-CD11a-APC (1:10) (#550852, BD Biosciences), anti-CD49d-PE (1:10) (#560972, BD Biosciences) y anti-CD162-PerCP-eFluor710 (1:20) (#46-1629, eBioscience). La activación posible de células T se vigiló tiñendo  $3 \times 10^5$  células T con anti-CD69-PE (1:40) (#555531, BD Biosciences), anti-CD25-APC (1:40) (#340907,

BD Biosciences) y anti-HLA-DR-FITC (1:40) (#555811, BD Biosciences). Asimismo, anti-CD3-V450 (1:40) (#560365, BD Biosciences), anti-CD4-APC-Cy7 (1:40) (#341115, BD Biosciences) y anti-CD8-V500 (1:40) (#560774, BD Biosciences) se incluyeron en ambas tinciones para caracterizar las subpoblaciones de células T. La tinción separada de  $3 \times 10^5$  células T con DAPI (1 µg/ml) (#A1001.0010, Applichem) permitió el monitoreo de la viabilidad celular. A la tinción durante 30 min le siguió el lavado de las células dos veces con tampón FACS. Las muestras teñidas se sometieron a análisis FACS en un instrumento FACSCanto II (BD Biosciences) y se efectuó el análisis estadístico usando el software FACSDiva (BD Biosciences). Se registraron 10.000 eventos y las células CD4-, CD8-, CD11a-, CD49d-, CD162-, CD69-, CD25-, y HLA-DR-positivas se expresaron como porcentaje de células CD3-positivas.

El cultivo de células endoteliales bajo condiciones de flujo con el sistema de bomba ibidi Pump System. El ibidi Pump System (#10902, ibidi) se usó para cultivo de células endoteliales bajo condiciones de flujo, además de para ensayos de adhesión y rodamiento de células T humanas en células endoteliales. El sistema consiste en la bomba ibidi (#10905, ibidi) y la unidad fluidica ibidi Fluidic Unit (#10903, ibidi) que trabajan juntas para generar un flujo unidireccional del medio en un portaobjetos sujetado con una altura del canal definida. El sistema es controlado por el software de control de la bomba ibidi (#10908, notebook + software, ibidi). Para cultivo de HBMEC o HUVEC bajo condiciones de flujo, se sembraron HBMEC o HUVEC a una densidad celular de  $2,5 \times 10^6$  células/ml en un portaobjetos µ-slide I<sup>0.4</sup> Luer Collagen IV (#80172, ibidi) o µ-slide I<sup>0.4</sup> Luer ibiTreat (#80176, ibidi), respectivamente de conformidad con las instrucciones del fabricante y se cultivaron con un conjunto de perfusión "amarillo/verde" (#10964, ibidi) durante 48 h bajo tensión de cizalladura de pared de 5 o 10 dyn/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Para el cultivo de más de un µ-slide I<sup>0.4</sup> Luer con una unidad fluidica individual, se conectaron hasta cuatro µ-slides entre sí con los conectores en serie para µ-slides (#10830, ibidi). Para pre-incubación adicional de HBMEC con pentosanpolisulfato SP54® (100 mg/ml disolución de inyección, bene Arzneimittel GmbH), se añadió PPS al medio de cultivo de células HBMEC (200 µg/ml) 24 h antes de cualquier experimento. La pre-estimulación de histamina de HBMEC se efectuó antes de los experimentos de rodamiento y adhesión con  $10^{-5}$  M histamina (#H7125-1G, Sigma-Aldrich) en medio de cultivo de células HBMEC durante 30 min a 37°C.

Incubación de células T humanas con compuestos que median la adhesión antileucocitaria. Para mayor interferencia con efectos de adhesión mediada por AMG 103, las células T se pre-incubaron con compuestos que median potencialmente la adhesión antileucocitaria antes de los experimentos de rodamiento y adhesión. Por lo tanto, Tysabri (Natalizumab, 20 mg/ml disolución, Elan Pharma International Ltd.) o Minocin (Minociclina, 100 mg/vial, Triax Pharmaceuticals) se añadieron a la suspensión de células T y se incubaron a 37°C.

Interacción de células T humanas con HBMEC o HUVEC bajo condiciones de flujo: configuración del ensayo para experimentos de rodamiento y adhesión. Se llevaron a cabo experimentos bajo condiciones definidas de flujo hidrodinámico usando células T humanas recién aisladas HBMEC o HUVEC cultivadas en flujo como se describió anteriormente, y se analizaron con un sistema microscópico que consistía en el microscopio inverso Ti-E (#MEA53100, Nikon), la cámara digital Orca Flash 2.8 (#C-11440-10C, Hamamatsu), el software NIS-Elements AR versiones 3.22.00 y 4.10.03 (#MQS31200 y #MQS31100, Nikon), el sistema de bomba ibidi (#10902, ibidi), la incubadora de cultivo celular Galaxy 14S (#C014S-120-0000, Eppendorf), el sistema de calefacción 8 (#10925, ibidi) y la unidad I de incubación de gas CO<sub>2</sub> (#10920, ibidi). El microscopio Ti-E se equipó con un sistema TI-ND6-PFS Perfect Focus System (#MEP59390, Nikon) permitiendo la corrección de varianzas parafocales. Los eventos de rodamiento y adhesión se monitorearon con un objetivo 10 x (CF1 PlanFluor DL-10 X phase, #MRH20101, Nikon). El sistema de calefacción 8 y la unidad I de incubación de gases CO<sub>2</sub> arrancaron por lo menos 3 h antes de comenzar cualquier experimento, pre-calentando la incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se pre-calentó también el medio RPMI 1640 (#FG1215, Biochrom) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para experimentos de rodamiento y adhesión, el portaobjetos µ-slide I<sup>0.4</sup> Collagen IV con HBMEC cultivadas en flujo o el µ-slide I<sup>0.4</sup> ibiTreat con HUVEC cultivadas en flujo se desconectó del conjunto de perfusión, se enjuagó con RPMI 1640 pre-calentado con PPS (200 µg/ml) o sin PPS y se dispuso en la entrada del µ-slide de la incubadora bajo microscopio. Se centrifugaron  $6 \times 10^6$  células T humanas recién aisladas en tubos V de PC (#347759, Nunc) a 300 g durante 4 min. Las células T se resuspendieron en medio RPMI 1640 con PPS (200 µg/ml) o sin PPS hasta una densidad de células T final de  $1 \times 10^6$  células/ml. Estas células se usaron o bien directamente para experimentos de rodamiento con o sin adición de AMG 103 (10 ng/ml) a la suspensión celular, o se pre-incubaron adicionalmente en tubos V de PC a 37°C durante 45 min en presencia o ausencia de AMG 103. Dicha suspensión de células T preparada se llenó en un conjunto de perfusión "blanco" (#10963, ibidi) que se conectó a la unidad fluidica y al µ-slide. Se aplicaron dos configuraciones diferentes para los experimentos de rodamiento y adhesión de células T en HBMEC o HUVEC a una tensión de cizalladura de 1 dyn/cm<sup>2</sup>:

1. Rodamiento de células T en células endoteliales durante 45 seg (condición a corto plazo)

2. Rodamiento de células T en células endoteliales durante 45 - 120 min (condición a largo plazo, en donde la unidad fluidica está dispuesta en la incubadora de cultivo celular)

Interacción de células T humanas con HBMEC o HUVEC bajo condiciones de flujo, adquisición de datos y análisis.

Las interacciones de células T con células endoteliales se monitorearon por adquisición de imágenes con la cámara digital Orca Flash 2.8 que a su vez se controló con el software NIS-Elements 3.22.00. Se efectuó la adquisición en un lapso de tiempo de 45 seg (sin demora) para puntos de tiempo individuales que resultan en hasta 45 marcos/seg. a una resolución de 1920x1440. Dichas secuencias de imágenes registradas de 45 seg de duración se sometieron al módulo de rastreo automatizado de NIS-Elements AR 4.10.03 o a rastreo manual con NIS-Elements AR 3.22.00. Los datos de rastreo generados se exportaron a Microsoft Excel y se analizaron en más detalle aplicando filtros en parámetros tales como encabezamiento promedio, velocidad promedio y longitud del trayecto para cada objeto rastreado. Posteriormente, se calculó la desviación típica de la media  $\pm$  de la velocidad de rodamiento de todas las células filtradas. Cuando se usó rastreo manual, se seleccionaron 10 - 40 células T, se rastrearon manualmente y se determinó la desviación típica de  $\pm$  de la velocidad.

Tinción para inmunofluorescencia de HBMEC o HUVEC.

Después del rodamiento y la adhesión de células T en HBMEC o HUVEC bajo condiciones de flujo, las células endoteliales se fijaron usando 150  $\mu$ l de disolución al 4% de paraformaldehído (#P-6148, Sigma-Aldrich) durante 30 min a 4°C. Se enjugaron los  $\mu$ -slides con 150  $\mu$ l de D-PBS y se sometieron a tinción para inmunofluorescencia. Las HBMEC se bloquearon primero con 150  $\mu$ l de reactivo bloqueante de avidina (#PHA-70871, reactivo 1, Dianova) durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con 150  $\mu$ l de D-PBS seguido de incubación con 150  $\mu$ l de reactivo bloqueante de biotina (#PHA-70871, reactivo 2, Dianova). Todos los siguientes procedimientos de tinción se efectuaron en 150  $\mu$ l de D-PBS con 5% FBS a temperatura ambiente en la oscuridad, y se efectuaron etapas de lavado en 150  $\mu$ l de D-PBS. Se incubaron los  $\mu$ -slides con 5  $\mu$ g/ml de VCAM-1 antihumano de conejo policlonal (#106777, abcam) durante 1 h. Después de lavar, se añadieron 20  $\mu$ g/ml de IgG-DyLight350 anticonejo de cabra durante 1 h seguido de lavado e incubación con 15  $\mu$ g/ml de P-selectina IgG1 antihumana de ratón (#BBA30, R&D Systems) durante 2 h. Después de lavar, se añadió IgG-Alexa488 antirratón de cabra (1:100) (#A10680, Invitrogen) durante 1 h. La tinción de ICAM-1 se realizó con 10  $\mu$ g/ml de ICAM-1 biotina antihumana de conejo policlonal (#AB7815, abcam) durante 1 h, seguido de lavado e incubación con estreptavidina-Cy3 (1:100) (#016-160-084, Dianova) durante 1 h. La tinción de la superficie celular de ICAM-1 y P-selectina en HUVEC fijadas con PFA se efectuó como se describe para HBMEC. Finalmente, HBMEC o HUVEC se sometieron a análisis microscópico usando luz UV y un objetivo CFI Plan Apochromat DM 20 x Lambda (#MRD30205, Nikon) con un módulo de fase PH-2 (#MEH41200, Nikon). La tinción de VCAM-1 se monitoreó con un filtro de bloque CFL EPI-FL UV-2A (#MBE41200, Nikon), la tinción de P-selectina con un bloque de filtro CFL EPI-FL GFP-B (#MBE44740, Nikon) y la tinción de ICAM-1 con un bloque de filtro EPI-FL Cy3 (#MXU96213, Nikon). La adquisición de imágenes se efectuó con el software NIS-Elements.

Análisis de datos estadístico.

Dependiendo de cuántos grupos de datos se compararon, se usó una prueba de la t emparejada o un ANOVA de una vía combinado con una prueba posterior Tukey para analizar la significación estadística en Prism (software GraphPad). Se consideró un valor  $P < 0,05$  como estadísticamente significativo.

Las células T pre-incubadas con 10 ng/ml de Blinatumomab (+AMG 103) durante 45 min exhibieron una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento significativamente reducida de  $237 \pm 45$   $\mu$ m/seg en HUVEC en condiciones de corto plazo en comparación con el control negativo (-AMG 103;  $283 \pm 82$   $\mu$ m/seg). Simultáneamente, la pre-incubación con 10 ng/ml de Blinatumomab aumentó el número de células T que se adherían firmemente a HUVEC por 2,6 veces. Adicionalmente, se observó la activación de HUVEC como lo muestra el aumento de la expresión de la superficie de las moléculas de adhesión ICAM-1 y P-selectina cuando las células T correspondientes se pre-incubaron con 10 ng/ml de Blinatumomab en comparación con niveles de expresión basal en HUVEC que solamente tenían contacto con células T intactas. Estos hallazgos demostraron una mayor interacción y adhesión firme de células T incubadas con Blinatumomab con/a HUVEC, a su vez activando y aumentando de este modo la adhesividad de estas células (Figura 5).

Cuando se usa HBMEC, la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de células T se redujo significativamente hasta  $209 \pm 40$   $\mu$ m/seg en presencia de 10 ng/ml de Blinatumomab (+AMG 103) en condiciones a largo plazo en comparación con el control negativo (-AMG 103;  $323 \pm 78$   $\mu$ m/seg). Esta reducción se observó 45 min después de la adición de Blinatumomab al sistema de flujo, mientras que no se detectó velocidad de rodamiento de las células T inmediatamente después de la adición de Blinatumomab (0 min). Las HBMEC que interactuaron con células T estimuladas con Blinatumomab demostraron un incremento en la expresión de la superficie de las moléculas de adhesión ICAM-1, P-selectina y VCAM-1 después del rodamiento de células T a los niveles de expresión basales en HUVEC que solamente tuvieron contacto con células T intactas. Estas observaciones demostraron un aumento de interacción de células T inducido por Blinatumomab con HBMEC y el aumento simultáneo de adhesividad a HBMEC que oportunamente (es decir, después de 45 min) se correlacionó con cursos de tiempo de redistribución de células T en estudios clínicos (Figura 6).

La influencia de PPS en la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de células T según lo observado 45 min después de la adición de 10 ng/ml de Blinatumomab al sistema de flujo se evaluó en condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento

de las células T en HBMEC de  $430 \pm 92 \mu\text{m}/\text{seg}$  (-AMG 103) a  $281 \pm 96 \mu\text{m}/\text{seg}$  (+AMG 103), la posterior adición de PPS al sistema de flujo revirtió esta reducción a una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $483 \pm 157 \mu\text{m}/\text{seg}$  según lo observado en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +PPS;  $442 \pm 156 \mu\text{m}/\text{seg}$ ). La expresión de la superficie celular de P-selectina en HBMEC aumentó cuando se añadió Blinatumomab al sistema de flujo, mientras que la posterior adición de PPS (es decir, pre-incubación de HBMEC) condujo a un menor incremento. Por consiguiente, la prevención de interacción de células T con HBMEC por PPS también disminuyó el incremento mediado por células T de activación y adhesividad de HBMEC (Figura 7).

Como se describió en detalle anteriormente para PPS en combinación con HBMEC pre-estimuladas con histamina, el sistema de flujo se usó también para analizar la interferencia de PPS con interacciones de células T inducidas por AMG 103 con HBMEC no estimuladas. La influencia de PPS en la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T se evaluó bajo condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en HBMEC de  $399 \pm 153 \mu\text{m}/\text{seg}$  (-AMG 103) a  $263 \pm 66 \mu\text{m}/\text{seg}$  (+AMG 103) 40 min después de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab al sistema de flujo, la adición posterior de PPS al experimento revirtió esta reducción a una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $465 \pm 116 \mu\text{m}/\text{seg}$  como se observó también en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +PPS;  $514 \pm 159 \mu\text{m}/\text{seg}$ ). Por consiguiente, PPS previno el incremento inducido por Blinatumomab de interacciones de células T con células endoteliales (Figura 8).

Como se describió en detalle anteriormente para PPS en combinación con HBMEC pre-estimuladas con histamina, el sistema de flujo se usó también para analizar la interferencia de natalizumab con interacciones de células T inducidas por AMG 103 con HBMEC no estimuladas. Con este fin, se incubaron células T recién aisladas con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  natalizumab en medio RPMI 1640 durante 10 min a 37°C antes de los experimentos de rodamiento y adhesión. La influencia de natalizumab sobre la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T se evaluó en condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en HBMEC de  $482 \pm 149 \mu\text{m}/\text{seg}$  (-AMG 103) a  $359 \pm 102 \mu\text{m}/\text{seg}$  (+AMG 103) a 40 min después de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab al sistema de flujo, la adición posterior de natalizumab al experimento revirtió esta reducción hasta una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $444 \pm 110 \mu\text{m}/\text{seg}$  como también se observó en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +natalizumab;  $445 \pm 81 \mu\text{m}/\text{seg}$ ). Por lo tanto, natalizumab previno el incremento inducido por Blinatumomab de células T con células endoteliales (Figura 9).

Como se describió en detalle anteriormente para PPS en combinación con HBMEC pre-estimuladas con histamina, el sistema de flujo se usó también para analizar la interferencia de la minociclina con interacciones de células T inducidas por AMG 103 con HUVEC no estimuladas. Con este fin, se incubaron células T recién aisladas con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de minociclina en PBS de Dulbecco durante 2 h a 37°C antes de los experimentos de rodamiento y adhesión. La influencia de la minociclina sobre la velocidad media de rodamiento de las células inducida por Blinatumomab se evaluó bajo condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en HUVEC de  $169 \pm 49 \mu\text{m}/\text{seg}$  (-AMG 103) a  $127 \pm 41 \mu\text{m}/\text{seg}$  (+AMG 103) 40 min después de la adición de 10 ng/ml de Blinatumomab al sistema de flujo, la adición posterior de minociclina al experimento revirtió esta reducción hasta una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $217 \pm 92 \mu\text{m}/\text{seg}$  como también se observó en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +minociclina;  $233 \pm 29 \mu\text{m}/\text{seg}$ ) (Figura 10). Incluso en otro experimento, la influencia de la minociclina sobre el aumento inducido por Blinatumomab de números absolutos de células T que se adhieren firmemente a HUVEC se evaluó bajo condiciones a largo plazo. El número de células T adherentes 40 min después de la adición de 10 ng/ml de Blinatumomab al sistema de flujo aumentó significativamente (2,1 veces) en presencia de Blinatumomab (+AMG 103) en comparación con células T solas (-AMG 103). La posterior adición de minociclina al experimento (+AMG 103, +minociclina) revirtió el aumento del número de células T adherentes a un nivel comparable o incluso inferior al observado en ausencia de Blinatumomab (-AMG 103;  $\pm$ minociclina) (Figura 11). Por lo tanto, la minociclina previno el incremento inducido por Blinatumomab de interacciones de células T con células endoteliales.

Como se describió detalladamente anteriormente para PPS en combinación con HBMEC pre-estimuladas con histamina, el sistema de flujo se usó también para analizar la interferencia de un anticuerpo anti-ICAM-1 con interacciones de células T inducidas por AMG 103 con HBMEC no estimuladas. Con este fin, se incubaron HBMEC con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anticuerpo ICAM-1 antihumano de ratón (#MAB2146Z, Millipore) durante 30 min a 37°C antes de los experimentos de rodamiento y adhesión. La influencia del anticuerpo anti-ICAM-1 sobre la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T se evaluó bajo condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en HBMEC de  $407 \pm 90 \mu\text{m}/\text{seg}$  (-AMG 103) a  $335 \pm 48 \mu\text{m}/\text{seg}$  (+AMG 103) 30 min después de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab al sistema de flujo, la posterior adición del anticuerpo anti-ICAM-1 al experimento revirtió esta reducción hasta una  $\pm$  SD de la media de rodamiento de las células T SD de  $416 \pm 97 \mu\text{m}/\text{seg}$  tal como como se observó en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +anti-ICAM-1 Ab;  $378 \pm 64 \mu\text{m}/\text{seg}$ ). Por consiguiente, el anticuerpo anti-ICAM-1 previno el incremento inducido por Blinatumomab de interacciones de células T con células endoteliales (Figura 12).

Como se describió en detalle anteriormente para PPS en combinación con HBMEC pre-estimuladas con histamina, el sistema de flujo también se usó para analizar la interferencia de un anticuerpo anti-P-selectina con interacciones de células T inducidas por AMG 103 con HBMEC no estimuladas. Con este fin, se incubaron HBMEC con 10 µg/ml de anticuerpo P-selectina antihumano de ratón (#MAB2154, Millipore) durante 30 min a 37°C antes de los experimentos de rodamiento y adhesión. La influencia del anticuerpo anti-P-selectina sobre la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T se evaluó bajo condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en HBMEC de  $449 \pm 90$  µm/seg (-AMG 103) a  $370 \pm 55$  µm/seg (+AMG 103) 40 min después de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab al sistema de flujo, la posterior adición del anticuerpo anti-P-selectina al experimento revirtió esta reducción hasta una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $440 \pm 95$  µm/seg como también se observó en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +anti-P-selectina Ab;  $494 \pm 105$  µm/seg). Por lo tanto, el anticuerpo anti-P-selectina previno el incremento inducido por Blinatumomab de las interacciones de células T con células endoteliales (Figura 13).

Como se describió en detalle anteriormente para PPS en combinación con HBMEC pre-estimuladas con histamina, el sistema de flujo se usó también para analizar la interferencia de un anticuerpo anti-CD11a con interacciones de células T inducidas por AMG 103 con HBMEC no estimuladas. Con este fin, se incubaron células T recién aisladas con 5 µg/ml de anticuerpo CD11a antihumano de ratón (#217640, Calbiochem) en medio RPMI 1640 durante 10 min a 37°C antes de los experimentos de adhesión y rodamiento. La influencia del anticuerpo anti-CD11a sobre la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T se evaluó bajo condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en HBMEC de  $304 \pm 40$  µm/seg (-AMG 103) a  $214 \pm 44$  µm/seg (+AMG 103) 10 min después de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab al sistema de flujo, la adición posterior del anticuerpo anti-CD11a al experimento revirtió esta reducción hasta una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $261 \pm 56$  µm/seg como también se observó en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +anti-CD11a Ab;  $278 \pm 48$  µm/seg). Por consiguiente, el anticuerpo anti-CD11a previno el incremento inducido por Blinatumomab de las interacciones de células T con células endoteliales (Figura 14).

Como se describió anteriormente en detalle para PPS en combinación con HBMEC pre-estimuladas con histamina, el sistema de flujo se usó también para analizar la interferencia de un anticuerpo anti-CD162 con interacciones de células T inducidas por AMG 103 con HBMEC no estimuladas. Con este fin, se incubaron células T recién aisladas con 10 µg/ml de anticuerpo CD162 antihumano de ratón (#ab78188, abcam) en medio RPMI 1640 durante 10 min a 37°C antes de los experimentos de rodamiento y adhesión. Alternativamente, en lugar de incubar células T con el anticuerpo anti-CD162, las células T se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo control isotipo de ratón (IgG1, κ; MOPC-21; #M5284, Sigma-Aldrich) en medio RPMI 1640 durante 10 min a 37°C antes de los experimentos de adhesión y rodamiento. La influencia del anticuerpo anti-CD162 en la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T se evaluó bajo condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en HBMEC de  $539 \pm 149$  µm/seg (-AMG 103) a  $428 \pm 89$  µm/seg (+AMG 103) 45 min después de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab al sistema de flujo, la posterior adición del anticuerpo anti-CD162 al experimento revirtió esta reducción hasta una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $637 \pm 191$  µm/seg como también se observó en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, +anti-CD162 Ab;  $528 \pm 170$  µm/seg). En cambio, la adición del anticuerpo control isotipo en presencia de AMG 103 resultó en una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $258 \pm 65$  µm/seg (+AMG 103, + IgG1 de ratón, κ) y no revirtió la reducción inducida por AMG 103 de la velocidad media de rodamiento de las células T observada para el anticuerpo anti-CD162. Por lo tanto, el anticuerpo anti-CD162 previno específicamente el incremento inducido por Blinatumomab de las interacciones de células T con células endoteliales interfiriendo selectivamente con la unión de CD162 a P-selectina. Esta prevención no pudo ser inducida por el anticuerpo control isotipo de ratón inespecífico (Figura 15).

Como se describió anteriormente en detalle para PPS en combinación con HBMEC pre-estimuladas con histamina, el sistema de flujo se usó también para analizar la interferencia de P-selectina recombinante con interacciones de células T inducidas por AMG 103 con HBMEC no estimuladas. Con este fin, las células T recién aisladas se incubaron con 5 µg/ml de P-selectina humana recombinante (#ADP3-050, R&D Systems) en medio RPMI 1640 durante 15 min a 37°C antes de los experimentos de rodamiento y adhesión. La influencia de P-selectina recombinante sobre la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T se evaluó bajo condiciones a largo plazo. Si bien AMG 103 redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en HBMEC de  $386 \pm 77$  µm/seg (-AMG 103) a  $340 \pm 68$  µm/seg (+AMG 103) 45 min después de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab al sistema de flujo, la posterior adición de P-selectina recombinante al experimento revirtió esta reducción hasta una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $402 \pm 93$  µm/seg como se observó también en ausencia de AMG 103 (es decir, -AMG 103, + P-selectina rec.;  $384 \pm 70$  µm/seg). Por lo tanto, P-selectina recombinante previno el incremento inducido por Blinatumomab de interacciones de células T con células endoteliales (Figura 16).

**Ejemplo 3:** Dosis y esquemas de medicamentos concomitantes que siguen el principio de adhesión antileucocitaria para mitigar EA del SNC

Esquema de administración para medicamentos concomitantes de PPS intravenoso con tratamiento de Blinatumomab para uso en seres humanos.

- 5 Los pacientes recibieron una inyección en bolo de 100 mg de PPS 3 h  $\pm$  30 min antes del inicio de la infusión y cualquier etapa de dosis de Blinatumomab. Inmediatamente después de la inyección en bolo, la administración intravenosa de PPS continuó con perfusor a 300 mg/día durante 72 h.

Esquema de administración para medicación concomitante de PPS con tratamiento de Blinatumomab para uso en seres humanos.

- 10 Los pacientes reciben 900 mg de PPS a diario por vía oral como 300 mg (p. ej., 3x100 mg) tres veces por día, comenzando 7 días antes del inicio de la infusión y cualquier etapa de dosis de Blinatumomab. La administración oral de 900 mg de PPS diarios continúa durante 72 h después del inicio de la infusión y cualquier etapa de dosis de Blinatumomab.

Esquema de administración para medicación concomitante de Minociclina intravenosa con tratamiento de Blinatumomab para uso en seres humanos.

- 15 Los pacientes reciben 10 mg/kg de Minociclina por infusión intravenosa a corto plazo 48 h, 24 h y 3 h  $\pm$  30 min antes, y 24 h, 48 h y 72 h después del inicio de la infusión y cualquier etapa de la dosis de Blinatumomab.

Esquema de administración para medicación concomitante de Minociclina con tratamiento de Blinatumomab para uso en seres humanos.

Los pacientes reciben 700 mg de Minociclina por vía oral una vez por día 48 h, 24 h y 3 h  $\pm$  30 min antes, y 24 h, 48 h y 72 h después del inicio de la infusión y cualquier etapa de la dosis de Blinatumomab.

- 20 Esquema de administración para medicación concomitante de Natalizumab intravenoso con tratamiento de Blinatumomab para uso en seres humanos.

Los pacientes reciben 300 mg de Natalizumab por infusión intravenosa a corto plazo 24 h antes de comenzar la infusión y cualquier etapa de la dosis de Blinatumomab.

#### **Ejemplo 4:** sistema de cámara de flujo *in vitro* que usa moléculas de adhesión recombinantes

- 25 Recubrimiento de proteínas recombinantes.

Se disolvieron proteínas recombinantes (rhICAM-1 #ADP4-050, rhVCAM-1 #ADP5-050 o rhP-selectina #ADP3-050, R&D Systems) en ddH<sub>2</sub>O de conformidad con las instrucciones del fabricante. Antes de los experimentos de rodamiento, se diluyeron proteínas recombinantes en PBS de Dulbecco con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (#L1815, Biochrom) y se recubrieron en un  $\mu$ -slide VI<sup>0.4</sup> Luer ibiTreat (#80606, ibidi) durante la noche a 4°C. Antes de usar, los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS de Dulbecco y se bloquearon donde se indica con FBS al 20% (#10270, Gibco) en PBS por 2 h a temperatura ambiente. La disolución bloqueante se reemplazó por medio RPMI 1640 (#FG1215, Biochrom) sin suplementos.

Aislamiento y cultivo de células T humanas.

- 35 El aislamiento y la caracterización de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y células T de sangre se efectuó como se describe en el Ejemplo 2 (pág. 48, 1-31). Se desarrollaron células T Jurkat E6.1 (#88042803, European Collection of Cell Cultures) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 (#FG1215, Biochrom) que contenía FBS al 10 % (#10270, Gibco) y penicilina/estreptomicina (#A2213, Biochrom).

40 Para los experimentos de rodamiento que usan células T recién aisladas, estas células se suspendieron en medio RPMI 1640 (#FG1215, Biochrom) sin suplementos hasta una concentración final de 1x10<sup>6</sup> células/ml al comienzo del experimento (t = 0 min; adición de 10 ng/ml Blinatumomab (AMG 103)) y se incubaron durante 35 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células luego se volcaron en un conjunto de perfusión "blanco" (#10963, ibidi) que se conectó a una unidad fluidica y al  $\mu$ -slide, y se registraron secuencias de imágenes de 45 seg de duración a t = 40 min, 45 min y 50 min, como se describe en el Ejemplo 2 (pág. 50, 18-23).

45 Para experimentos de rodamiento que usan células T Jurkat E6.1, estas células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (#FG1215, Biochrom) sin suplementos hasta una concentración final de 1,5-3x10<sup>5</sup> células/ml. Las células T Jurkat E6.1 se privaron o bien toda la noche en FBS al 0,5% en medio RPMI 1640 o durante 40 min en medio RPMI 1640 sin suplementos antes de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab (AMG 103, t = 0 min). Las células se incubaron durante 35 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y luego se volcaron en un conjunto de perfusión "blanco" (#10963, ibidi) que se conectó a una unidad fluidica y al  $\mu$ -slide. Se registraron secuencias de imágenes de 45 seg de duración a t = 40 min, 45 min y 50 min como se describe en el Ejemplo 2 (pág. 50, 18-23).

Incubación de células T humanas con un inhibidor de transducción de señales de células T.

Para interferencia con efectos de adhesión inducidos por AMG 103, las células T se pre-incubaron con un inhibidor de Src cinasa que bloquea específicamente la transducción de señales del complejo receptor de células T. Con este fin, el inhibidor PP2 (#529576, Merck, 15  $\mu$ M) o su vehículo control DMSO (#D2650, Sigma-Aldrich) se añadieron a la suspensión de células T ( $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640) que luego se incubó durante 40 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> antes de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab (AMG 103, t = 0 min).

Interacción de células T humanas con moléculas de adhesión recombinantes bajo condiciones de flujo: configuración del ensayo para experimentos de rodamiento, adquisición y análisis de datos.

Se efectuaron experimentos bajo condiciones definidas de flujo hidrodinámico usando o bien células T humanas recién aisladas o células T Jurkat E6.1 y  $\mu$ -slide VI<sup>0.4</sup> Luer ibiTreat (#80606, ibidi) recubiertos con distintas proteínas recombinantes como se describió anteriormente. La configuración del ensayo se describió en detalle en el Ejemplo 2 (pág. 49, 23-37). Los experimentos de rodamiento de células T se efectuaron a una tensión de cizalladura de 1,1 dyn/cm<sup>2</sup>. Las interacciones de células T con proteínas recombinantes se registraron como se describió anteriormente y los datos se analizaron como se describe en detalle en el Ejemplo 2 (pág. 50, 23-30).

Análisis de datos estadísticos.

Dependiendo de cuántos grupos de datos se compararon, una prueba de la t no aparejada o un ANOVA de una vía combinados con una prueba posterior de Tukey se usaron para analizar la significación estadística en Prism (GraphPad Software). Un valor de P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Todos los valores se indican como la  $\pm$  SD de la media.

Las células T recién aisladas incubadas con 10 ng/ml Blinatumomab (+AMG 103) demostraron una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T significativamente reducida a t = 45 min en ICAM-1 humanas recombinantes (recubierta a 12,5  $\mu$ g/ml, con bloqueo; -AMG 103:  $383 \pm 144$   $\mu$ m/seg frente a +AMG 103:  $314 \pm 79$   $\mu$ m/seg), en VCAM-1 humanas recombinantes (recubiertas a 10  $\mu$ g/ml, con bloqueo; -AMG 103:  $418 \pm 136$   $\mu$ m/seg frente a +AMG 103:  $353 \pm 72$   $\mu$ m/seg), y a t = 50 min en P-selectina humana recombinante (recubiertas a 20  $\mu$ g/ml, con bloqueo; -AMG 103:  $402 \pm 115$   $\mu$ m/seg frente a +AMG 103:  $293 \pm 73$   $\mu$ m/seg) en condiciones a semi-corto plazo en comparación con el control negativo (-AMG 103) (Figura 17A-C).

Las células T Jurkat E6.1 incubadas con 10 ng/ml Blinatumomab (+AMG 103) demostraron una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T significativamente reducida a t = 45 min en ICAM-1 / VCAM-1 recombinante humana (recubiertas a 12,5 y 10  $\mu$ g/ml, respectivamente; -AMG 103:  $640 \pm 91$   $\mu$ m/seg frente a +AMG 103:  $518 \pm 98$   $\mu$ m/seg), y en P-selectina recombinante humana (recubierta a 20  $\mu$ g/ml; -AMG 103:  $500 \pm 81$   $\mu$ m/seg frente a +AMG 103:  $413 \pm 104$   $\mu$ m/seg) en condiciones a semi-corto plazo cuando se comparó con el control negativo (-AMG 103) (Figura 17D,E).

Por lo tanto, Blinatumomab también aumenta las interacciones de células T con moléculas de adhesión humanas recombinantes tanto para células T recién aisladas como para la línea de células T comunes.

La influencia del inhibidor de Src cinasa PP2 sobre la reducción inducida por Blinatumomab de la velocidad media de rodamiento de las células T se evaluó bajo condiciones a semi-corto plazo. Si bien AMG 103 en presencia del vehículo control DMSO redujo significativamente la  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T en  $\mu$ -slides recubiertos con VCAM-1 (recubiertos a 20  $\mu$ g/ml) de  $259 \pm 35$   $\mu$ m/seg (-AMG 103) a  $205 \pm 45$   $\mu$ m/seg (+AMG 103) a t = 40 min después de la adición de 10 ng/ml Blinatumomab, la pre-incubación y presencia de 15  $\mu$ M PP2 en el experimento revirtió esta reducción hasta una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T de  $256 \pm 50$   $\mu$ m/seg. El tratamiento con PP2 en ausencia de AMG 103 resultó en una  $\pm$  SD de la media de la velocidad de rodamiento de las células T comparable de  $267 \pm 66$   $\mu$ m/seg (-AMG 103, +PP2). Por consiguiente, el inhibidor de Src cinasa PP2 previno el incremento inducido por Blinatumomab de interacciones de células T con VCAM-1 humana recombinante (Figura 18).

# REIVINDICACIONES

1. Un compuesto no glucocorticoide que

(a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o

(b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T,

5 y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas, para uso en un método de profilaxis y/o tratamiento de eventos adversos neurológicos causados por la administración de un medicamento que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, en donde dicho medicamento es un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde el compuesto no glucocorticoide se ha de administrar antes y en forma concomitante con (i) una dosis inicial, (ii) una re-exposición; y/o (iii) un incremento de dicha administración

10 de un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde dichos eventos adversos neurológicos son uno o más de desorientación/confusión, problemas para encontrar las palabras/afasia, convulsiones, temblores cinéticos, ataxia, disartria y problemas de escritura, en donde dicho paciente es un mamífero.

2. Un compuesto no glucocorticoide que

(a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o

15 (b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial,

y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales, para uso en un método de profilaxis y/o tratamiento de eventos adversos neurológicos causados por la administración de un medicamento que comprende redirigir las células T contra células diana en un paciente, en donde dicho medicamento es un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde el compuesto no glucocorticoide se ha de administrar antes y en forma concomitante con (i) una dosis inicial, (ii) una re-exposición; y/o (iii) un incremento de dicha administración

20 de un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3, en donde dichos eventos adversos neurológicos son uno o más de desorientación/confusión, problemas para encontrar las palabras/afasia, convulsiones, temblores cinéticos, ataxia, disartria y problemas de escritura, en donde dicho paciente es un mamífero.

3. Un kit que comprende un compuesto no glucocorticoide que

25 (a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o

(b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, o que

(c) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o

(d) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial,

30 y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas, junto con un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3.

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto no glucocorticoide que

(a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o

(b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, o que

(c) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o

35 (d) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial,

y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas, junto con un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3.

5. Un anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso en un método para redirigir células T contra células diana en un paciente, en donde dicho paciente se somete a terapia que comprende un compuesto no glucocorticoide que

40

(a) es capaz de unirse a una molécula de adhesión de células T, y/o

(b) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión de células T, o que

(c) es capaz de unirse a una molécula de adhesión endotelial, y/o

(d) es capaz de bloquear el sitio de unión de una molécula de adhesión endotelial,

y que reduce o inhibe la unión de células T mamíferas a células endoteliales mamíferas, en donde dicho paciente es un mamífero.

- 5 6. El compuesto no glucocorticoide para uso según la reivindicación 1 o 2, el kit según la reivindicación 3, la composición farmacéutica según la reivindicación 4 o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según la reivindicación 5, en donde dicho anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 es MT103/AMG103.
- 10 7. El compuesto no glucocorticoide para uso según la reivindicación 1, 2 o 6, o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según la reivindicación 5 o 6, en donde dicho paciente se caracteriza por una relación de células B/T de menos de 1:5 o una cantidad de células B de menos de aproximadamente 50 células B por  $\mu$ l de sangre periférica.
- 15 8. El compuesto no glucocorticoide para uso según la reivindicación 1, 2, 6 o 7, el kit según la reivindicación 3 o 6, la composición farmacéutica según la reivindicación 4 o 6, o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dicho compuesto no glucocorticoide es PPS, Minociclina o Natalizumab.
- 20 9. El compuesto no glucocorticoide para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 6 a 8, el kit según la reivindicación 3, 6 u 8, la composición farmacéutica según la reivindicación 4, 6 u 8, o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dichas células T mamíferas son células T mamíferas redirigidas.
- 25 10. El compuesto no glucocorticoide para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 6 a 9, el kit según la reivindicación 3, 6, 8 o 9, la composición farmacéutica según la reivindicación 4, 6, 8 o 9, o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde dichas células endoteliales mamíferas se aíslan de los vasos o capilares grandes.
- 30 11. El compuesto no glucocorticoide para uso según la reivindicación 10, el kit según la reivindicación 10, la composición farmacéutica según la reivindicación 10, o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según la reivindicación 10, en donde dichas células endoteliales mamíferas se seleccionan entre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) o células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC).
- 35 12. El compuesto no glucocorticoide para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 6 a 11, el kit según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 6 u 8 a 11, la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 6 u 8 a 11, o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde dicha molécula de adhesión de células T se selecciona entre integrinas (como  $\alpha$ 4-integrinas;  $\alpha$ 4L- $\beta$ 2-integrinas,  $\alpha$ 4L-integrinas,  $\beta$ 7-integrinas), selectinas (como L-selectina), CD44, CD162 y/o cinasas de la familia Src.
- 40 13. El compuesto no glucocorticoide para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 6 a 12, el kit según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 6 u 8 a 12, la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 6 u 8 a 12, o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde dicha molécula de adhesión endotelial se selecciona entre selectinas (como E- o P-selectina); moléculas de adhesión celular CAM (como ICAM-1, MAdCAM, VCAM-1) y/o PAR-1.
- 40 14. El compuesto no glucocorticoide para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 6 a 13, o el anticuerpo monocatenario biespecífico de CD19 x CD3 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en donde dicho paciente es un primate, preferiblemente un ser humano.

Figura 1

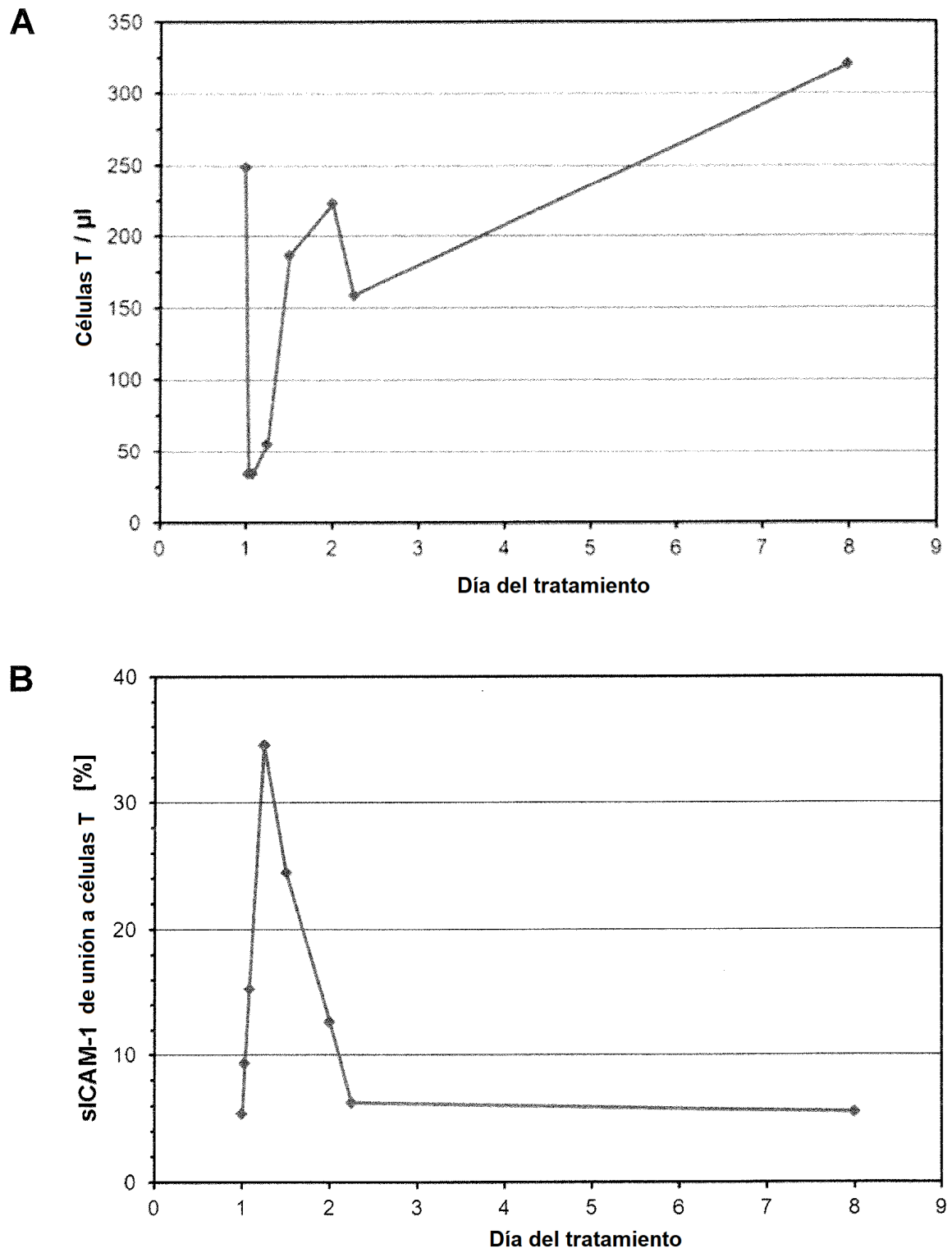


Figura 1, continuación

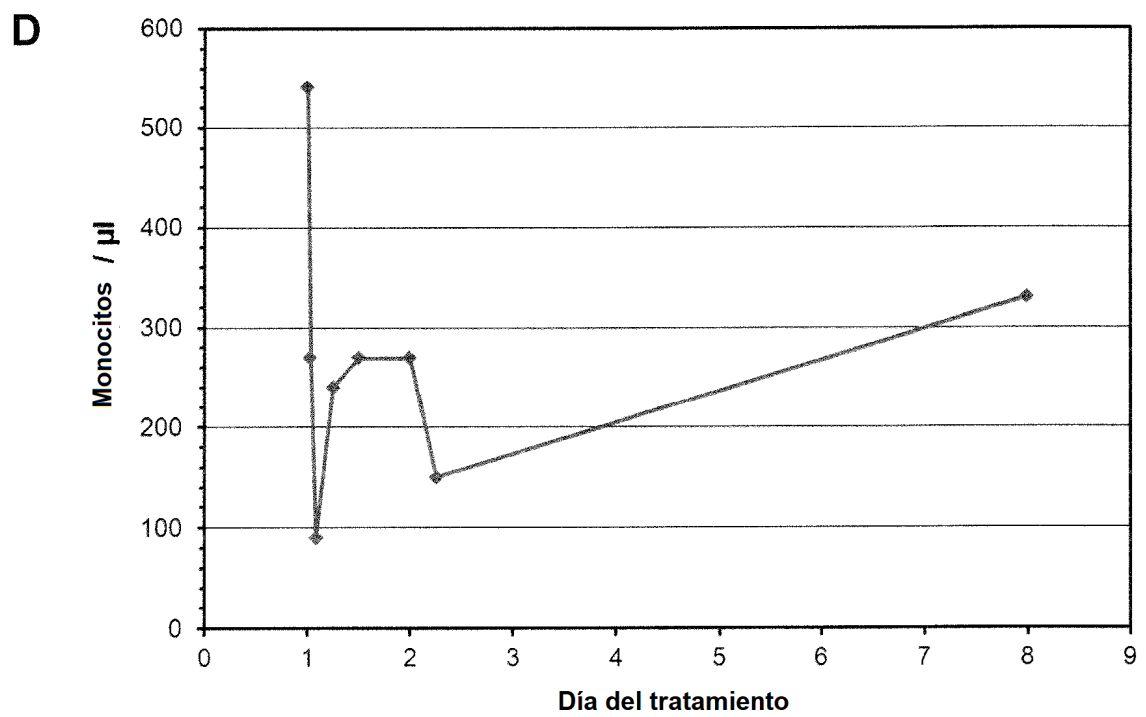
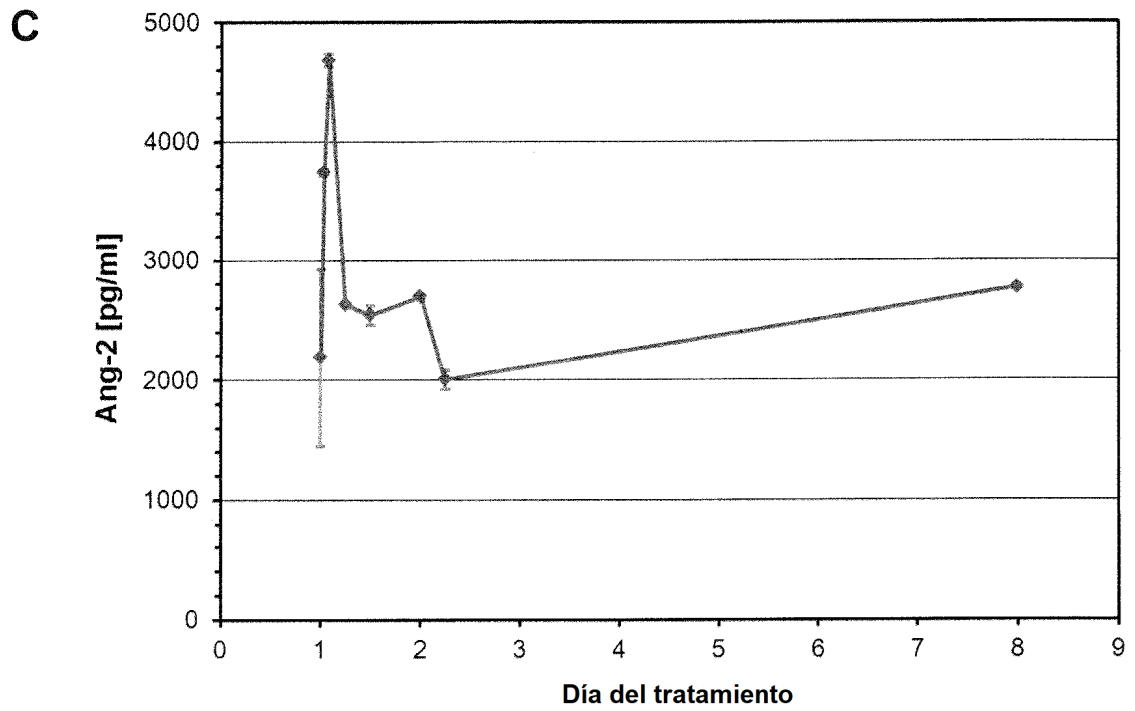
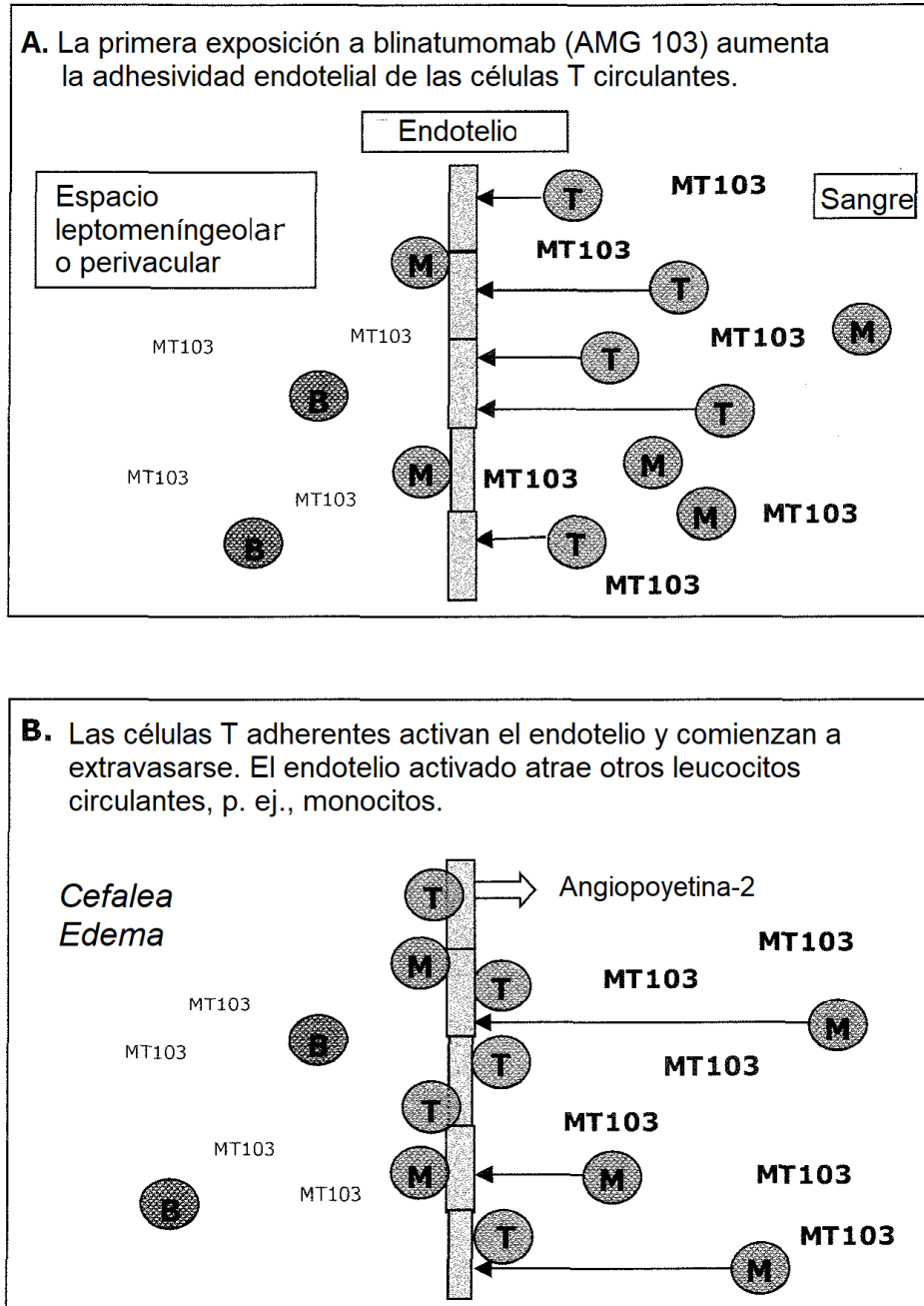


Figura 2



**Figura 3**

Pacientes sin co-medición PPS:

A. Paciente 109-026

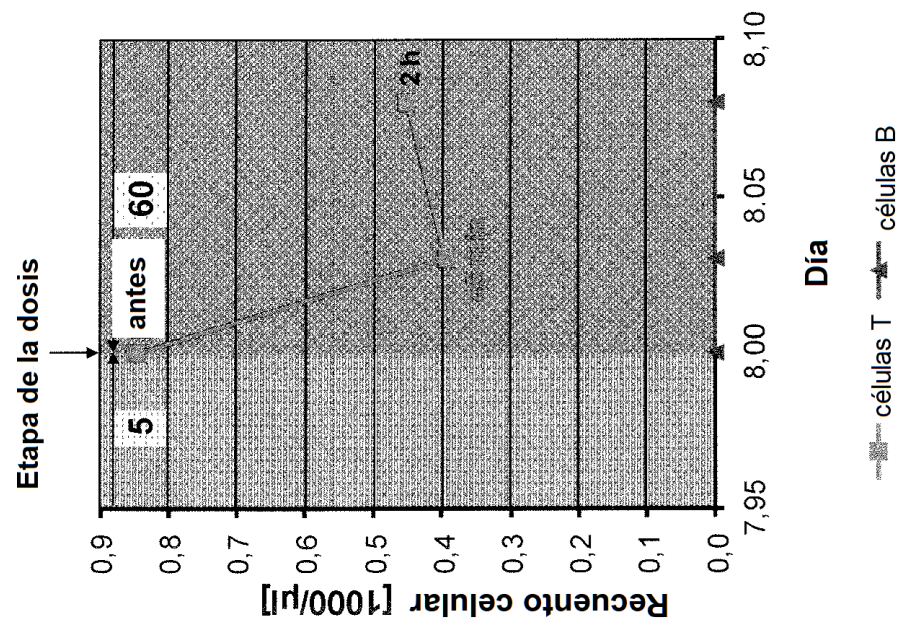


Figura 3, continuación

B. Paciente 153-001 sin co-medición PPS

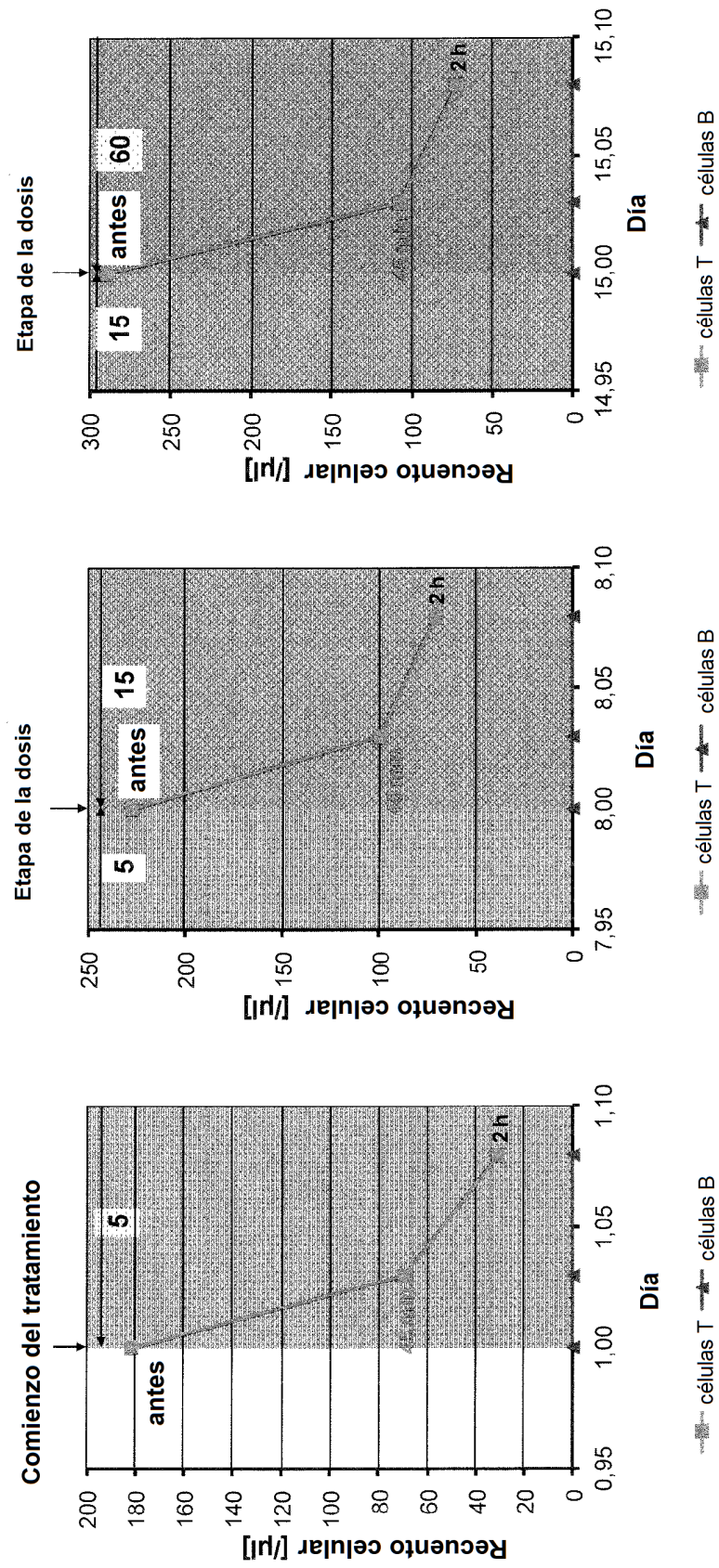


Figura 3, continuación

C. Paciente 109-033 sin co-medición PPS

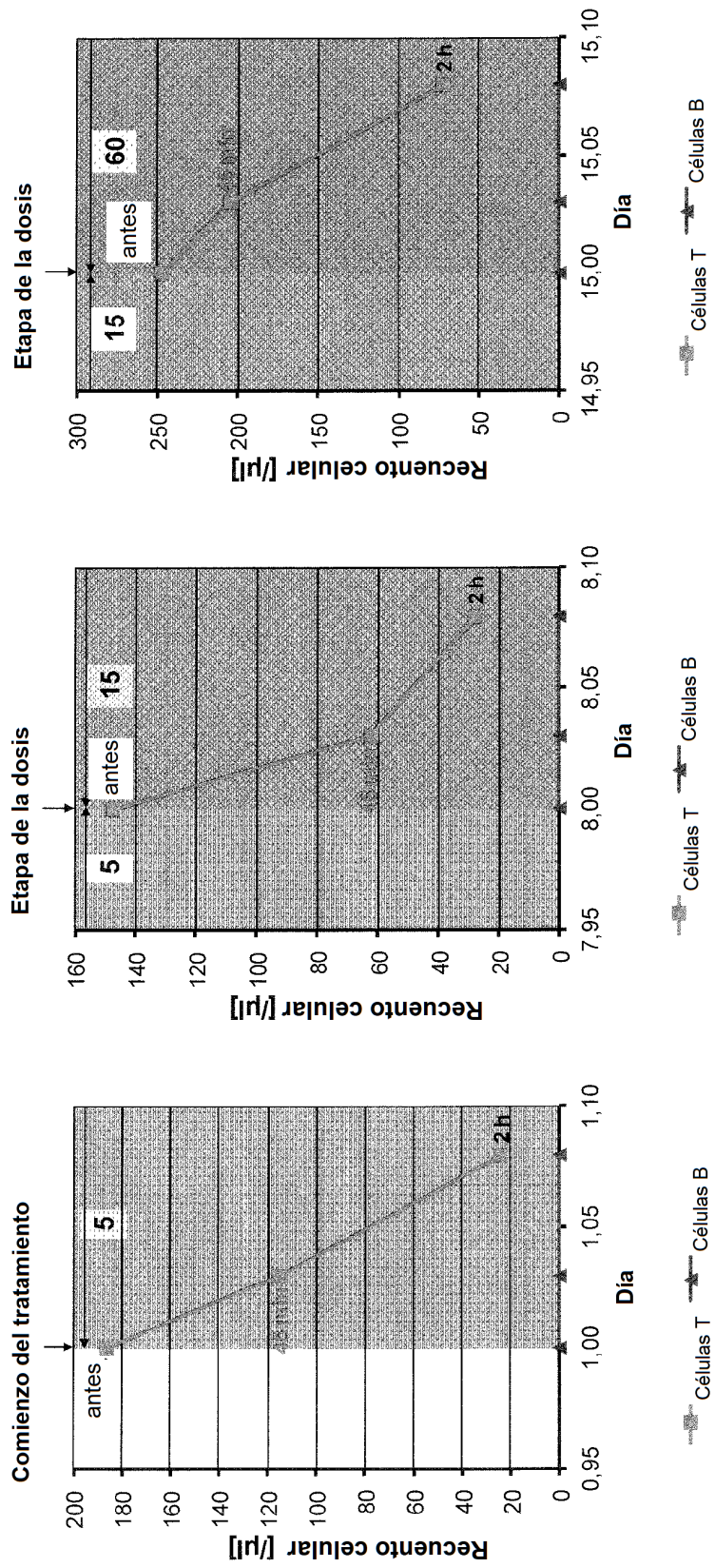
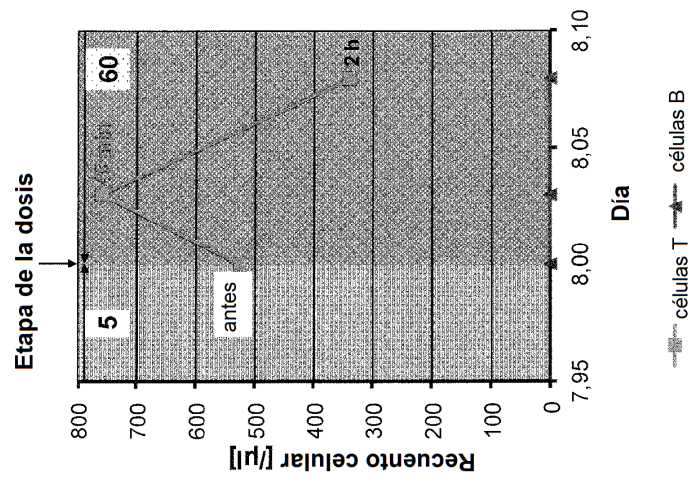


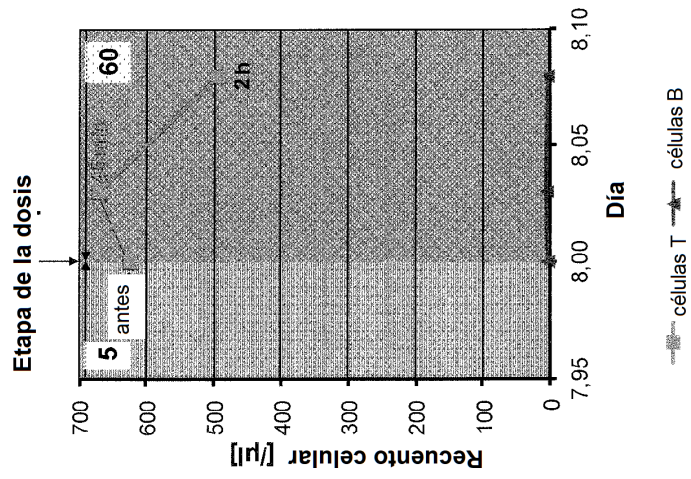
Figura 3, continuación

Pacientes con co-medición PPS

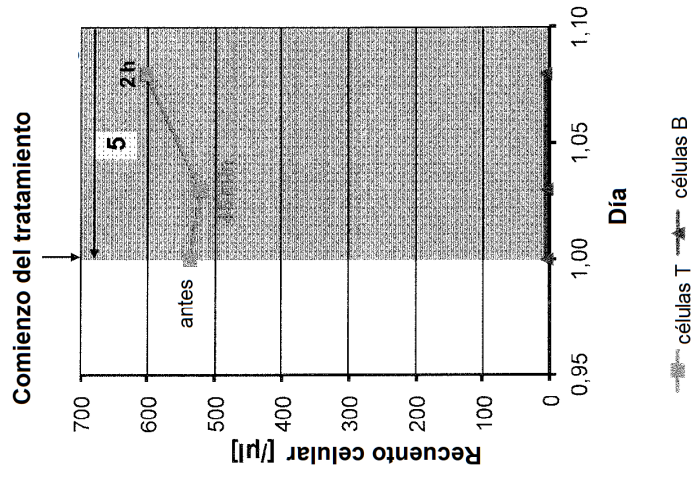
D. Paciente 109-042



E. Paciente 109-036



F. Paciente 109-040



**Figura 4**

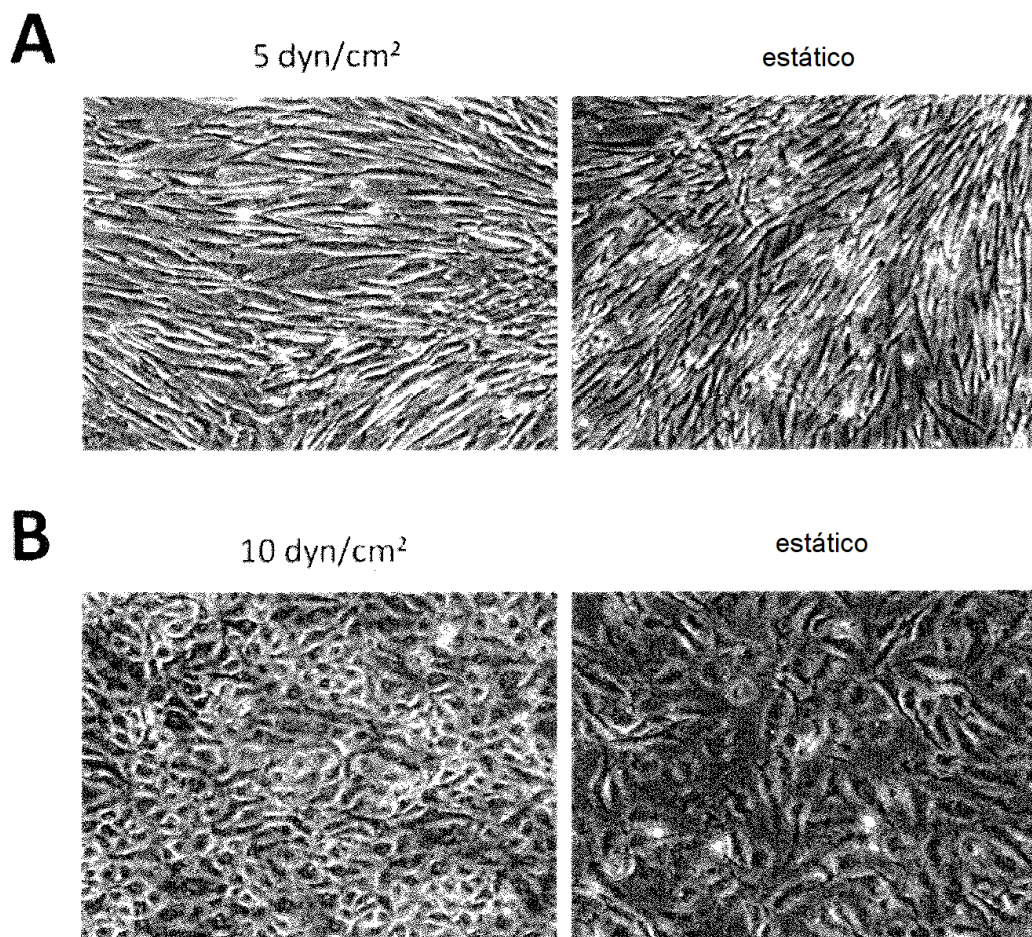
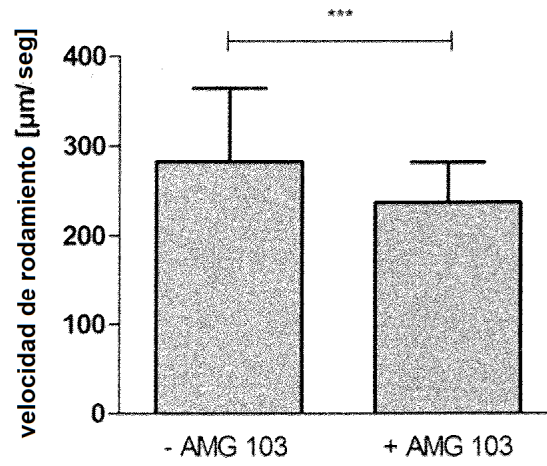
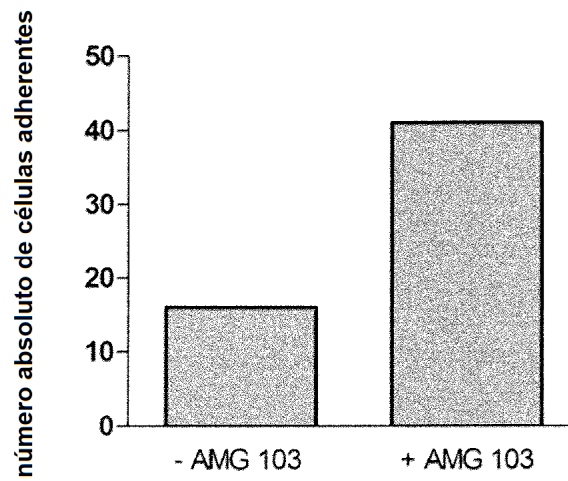


Figura 5

**A**



**B**



**C**

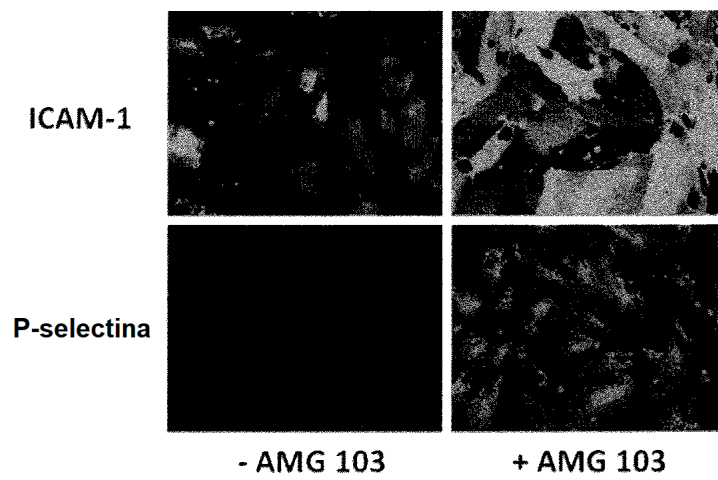


Figura 6

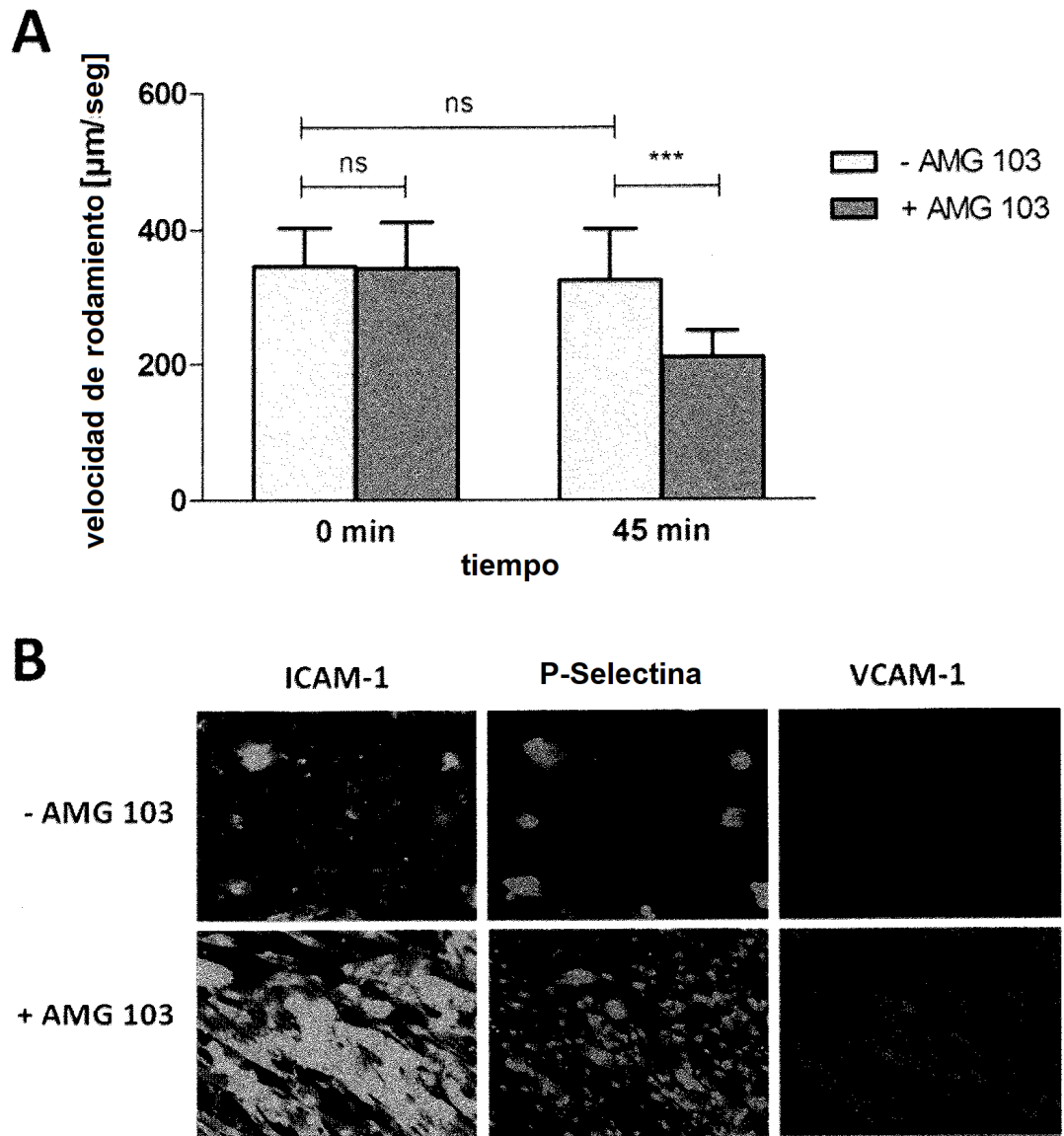


Figura 7

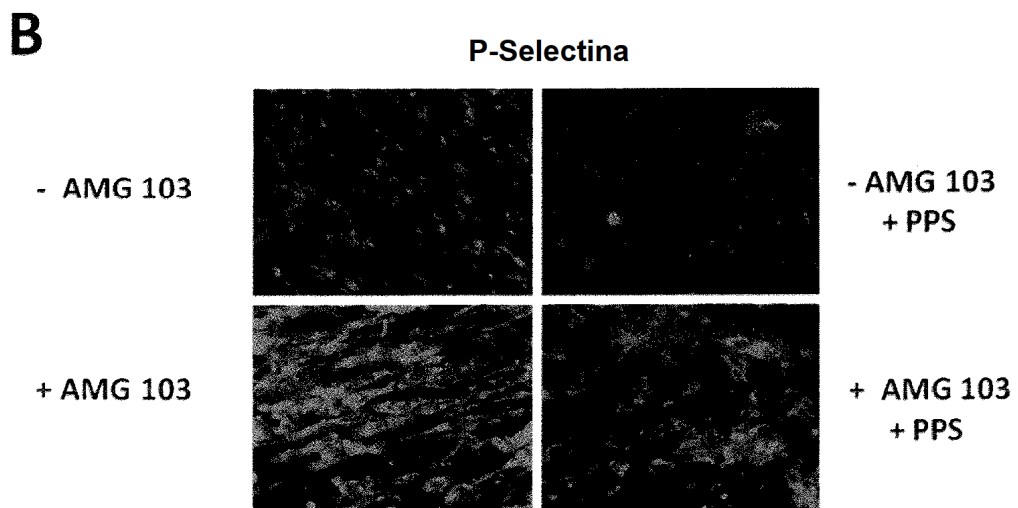
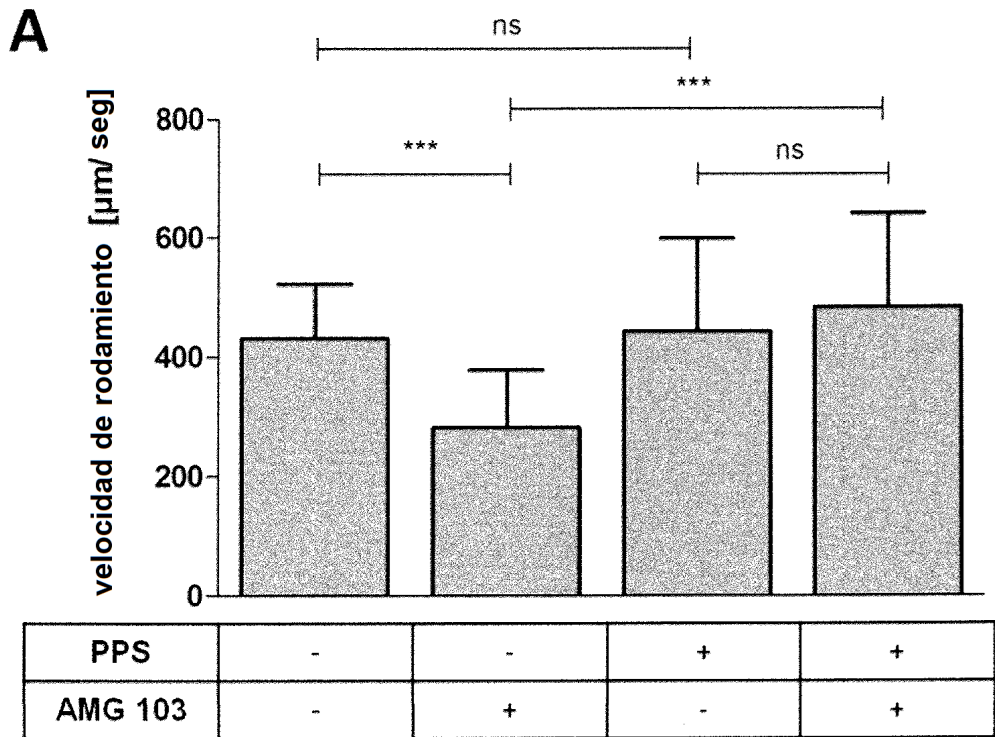


Figura 8

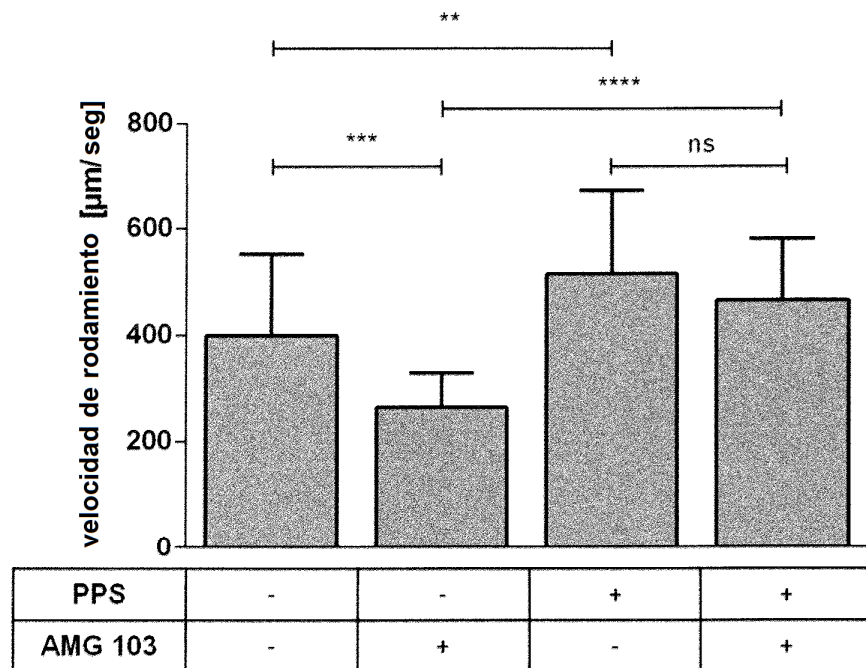


Figura 9

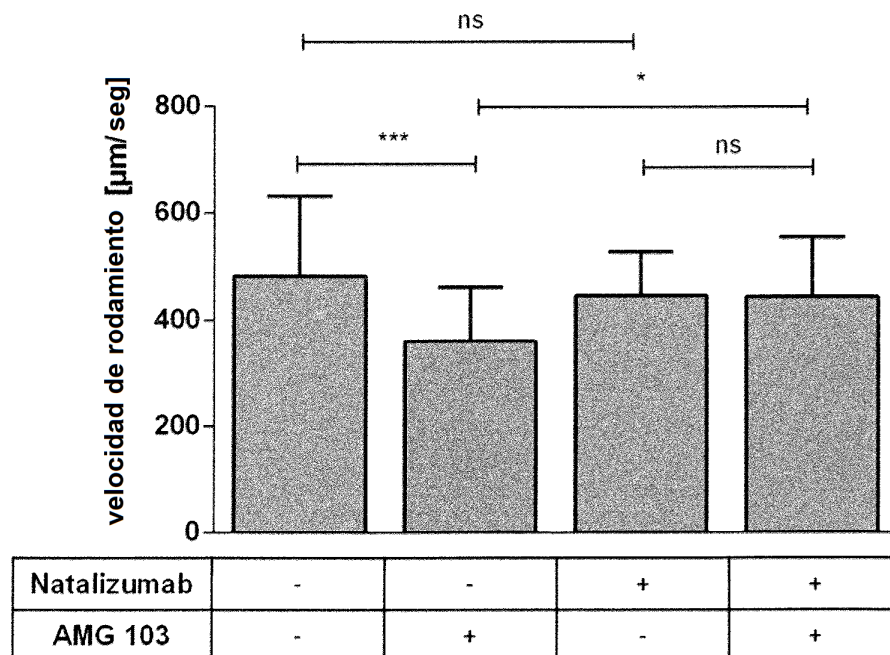


Figura 10

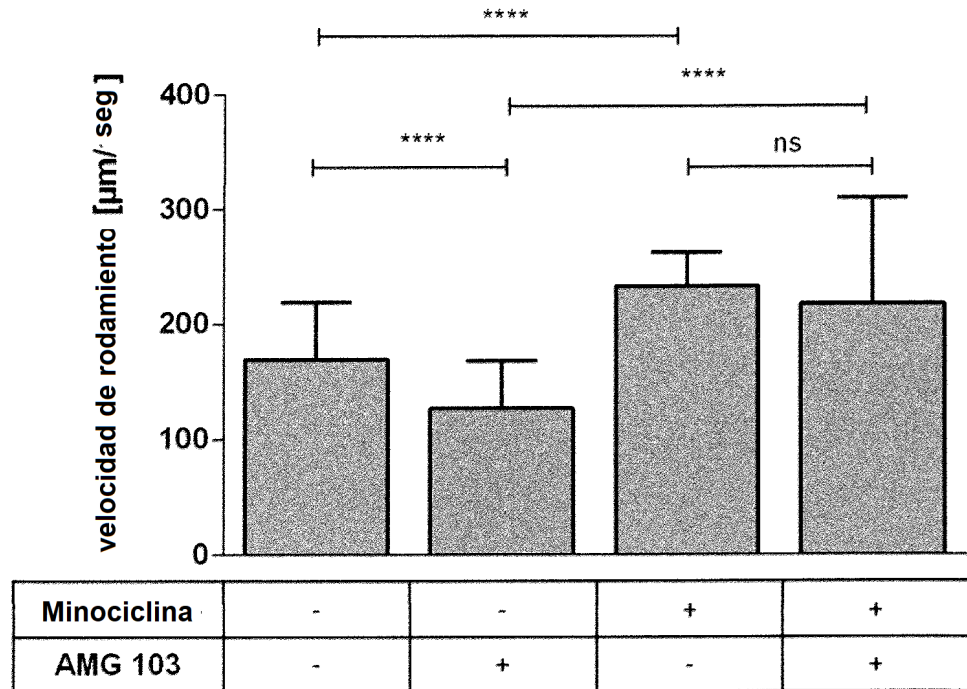


Figura 11

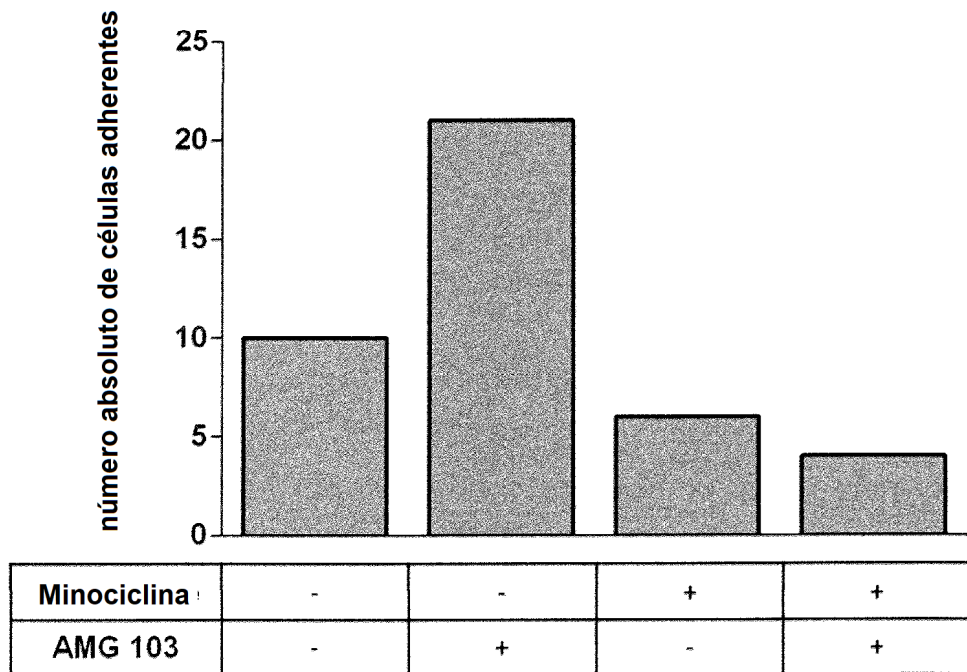


Figura 12

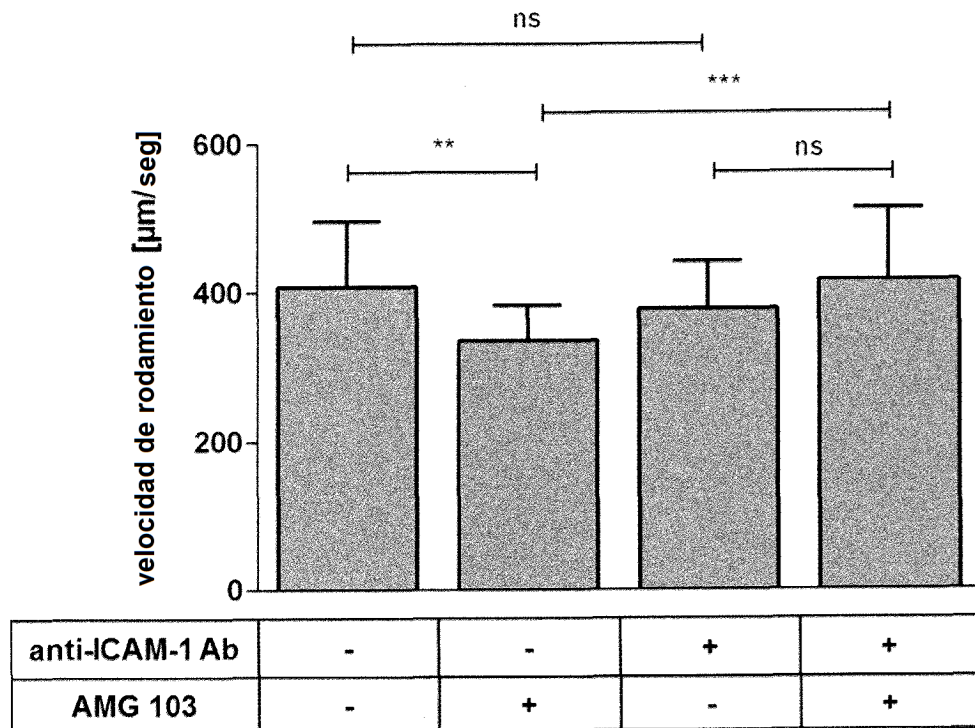


Figura 13

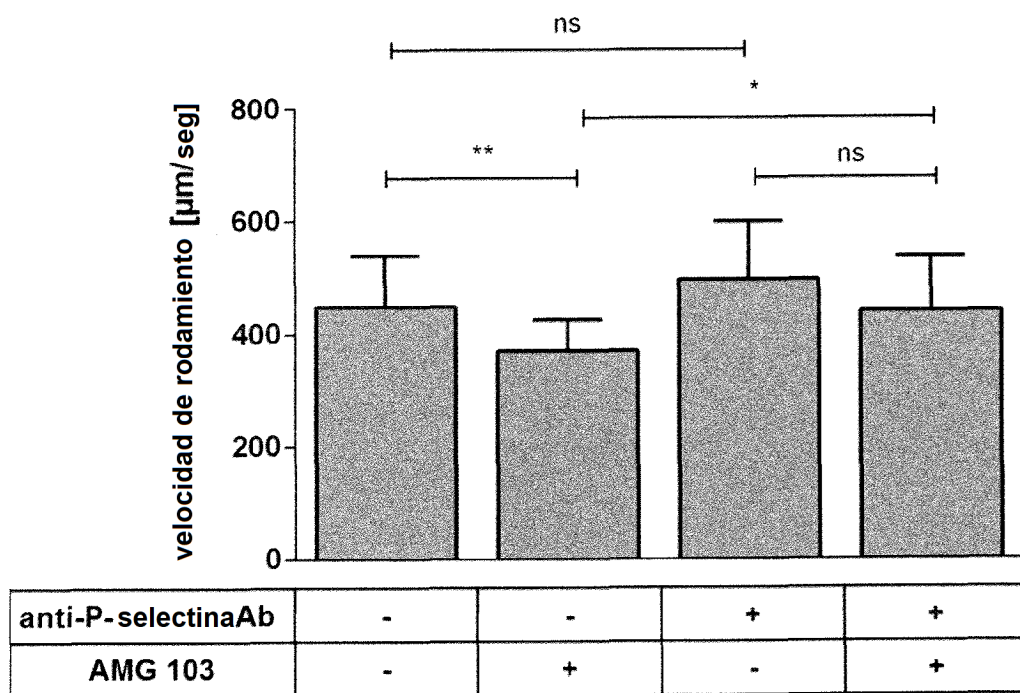


Figura 14

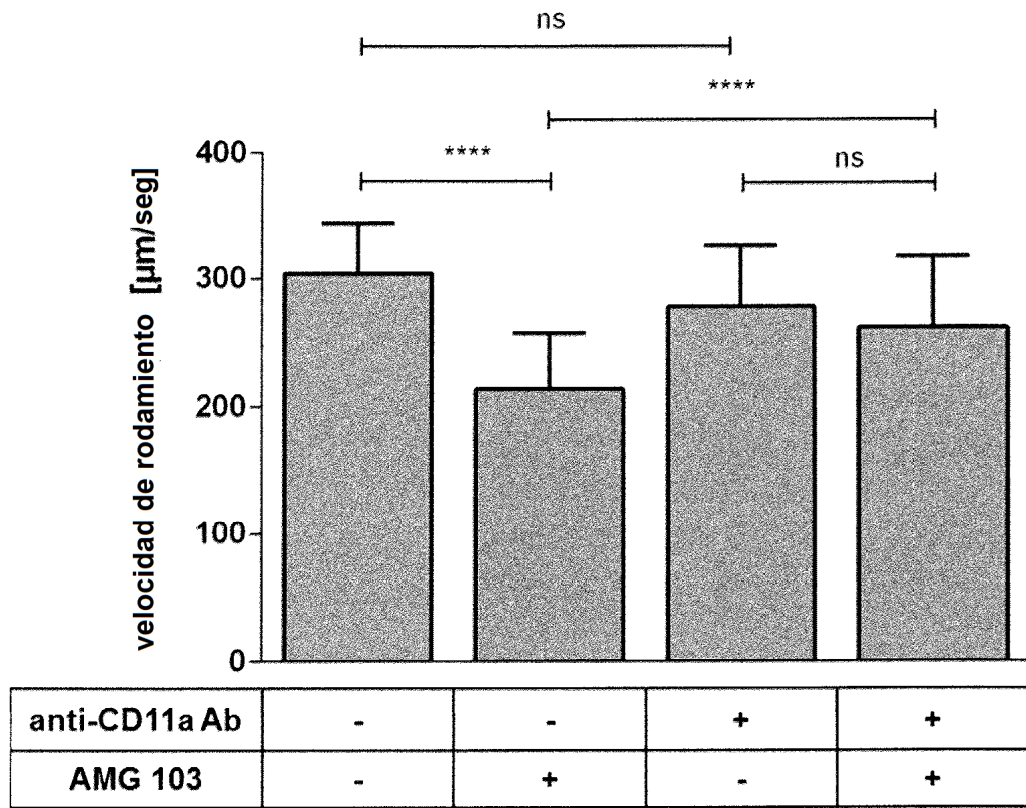


Figura 15

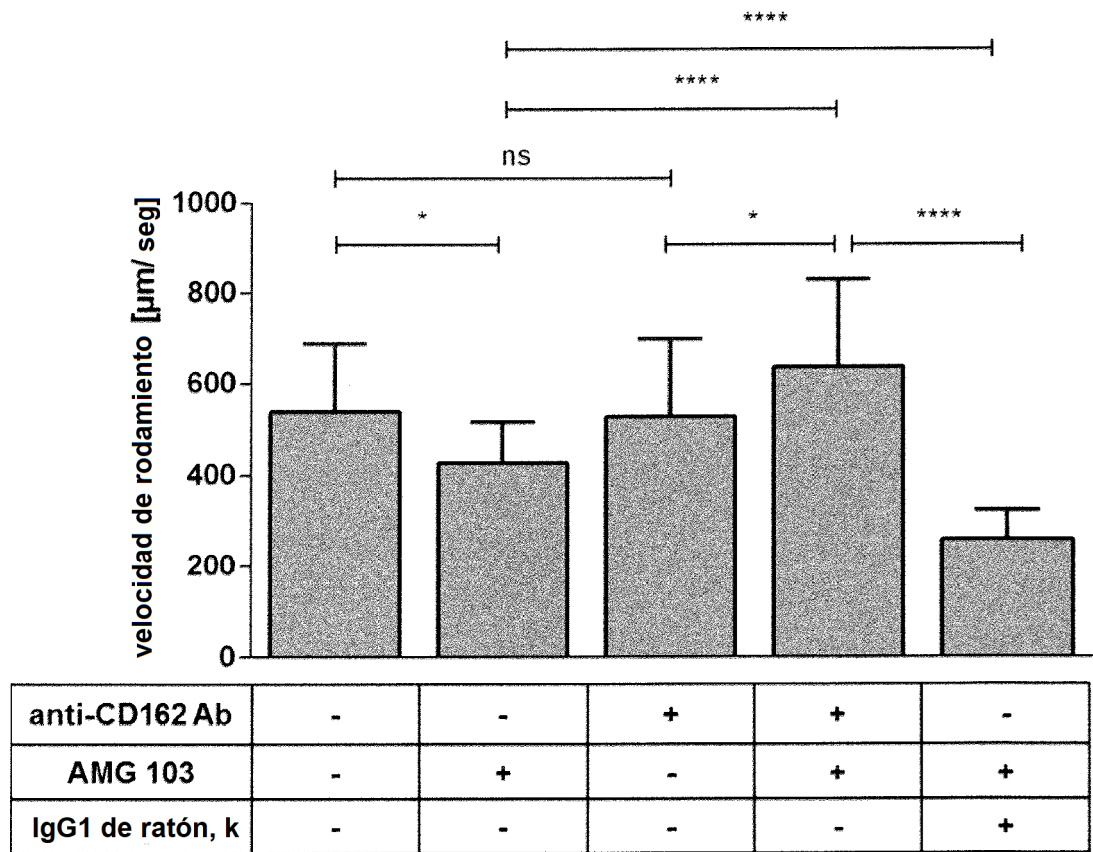


Figura 16

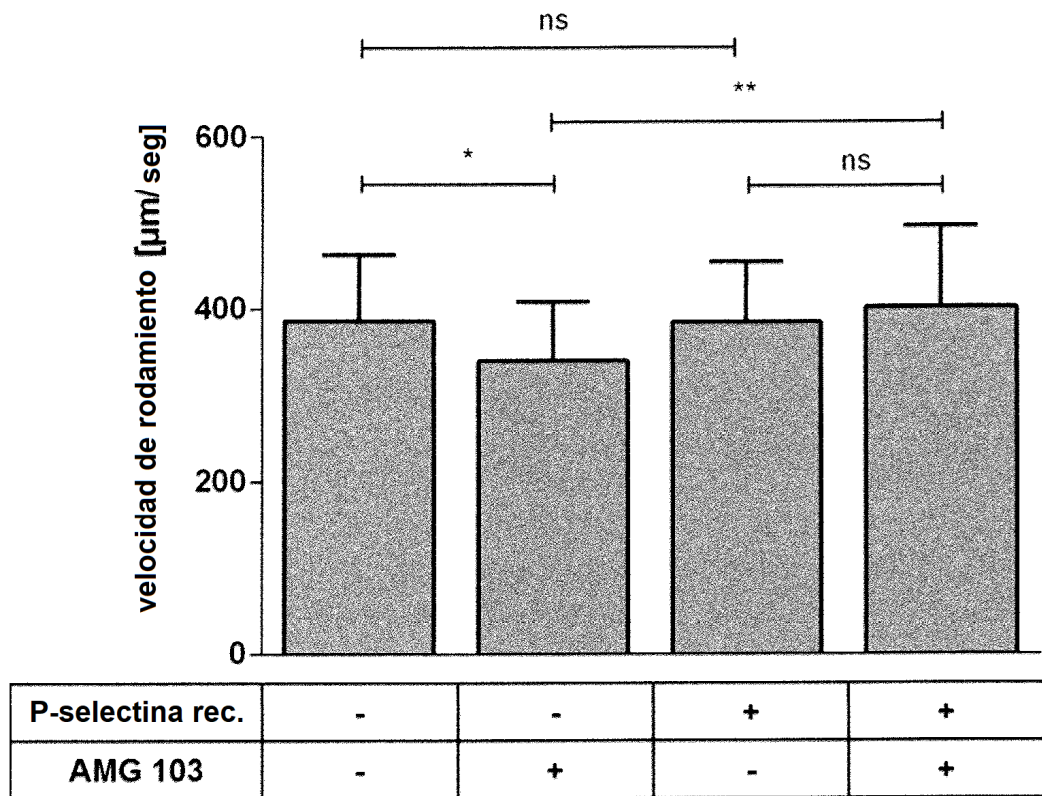


Figura 17

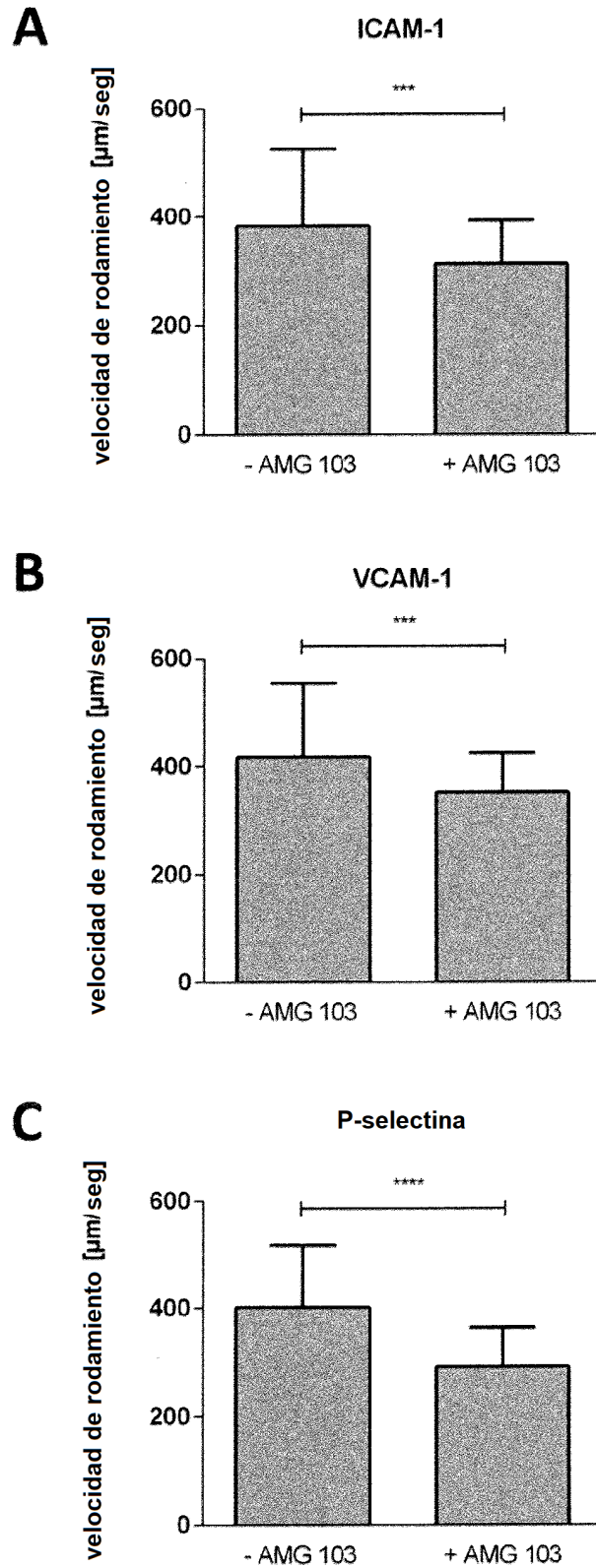
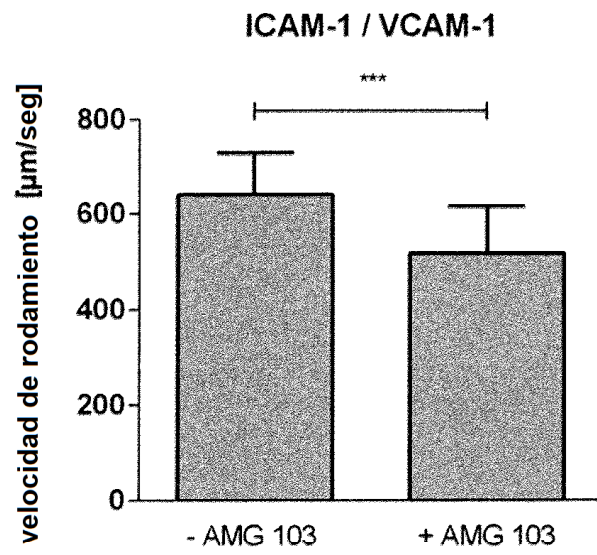


Figura 17, continuación

**D**



**E**

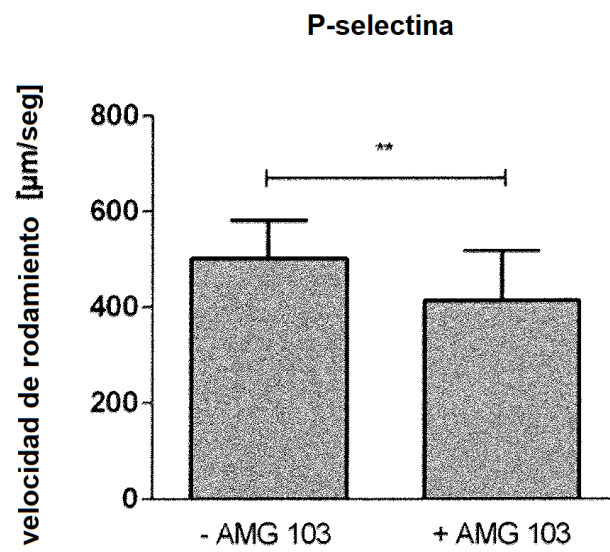


Figura 18

