(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 389 093**

(51) Int. CI.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05712607 .0**
(96) Fecha de presentación: **03.02.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1720571**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

(54) Título: **Procedimiento de tratamiento de una enfermedad hemolítica**

(30) Prioridad:
03.02.2004 US 771552

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2012

(73) Titular/es:
ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
352 KNOTTER DRIVE
CHESHIRE, CT 06410, US

(72) Inventor/es:
BELL, LEONARD y
ROTHER, RUSSELL P.

(74) Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

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

Procedimiento de tratamiento de una enfermedad hemolítica

Antecedentes

Campo técnico

Se describe un procedimiento de tratamiento de una enfermedad hemolítica tal como, por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna ("HPN"), administrando un compuesto que se une a, o bloquea de otro modo, la generación y/o actividad de uno o más componentes del complemento.

Antecedentes de la técnica relacionada

La hemoglobinuria paroxística nocturna ("HPN") es un trastorno poco frecuente de la sangre en la que los glóbulos rojos están comprometidos y así se destruyen más rápidamente que los glóbulos rojos normales. La HPN resulta de una mutación de las células de la médula ósea roja que da como resultado la generación de glóbulos rojos anormales. Más específicamente, la HPN se cree que es un trastorno de células madre hematopoyéticas, que dan lugar a poblaciones distintas de células sanguíneas maduras. La base de la enfermedad parecen ser mutaciones somáticas que conducen a la incapacidad para sintetizar la unión glicosil-fosfatidilinositol ("GPI") que es responsable para unir proteínas a membranas celulares. El gen mutado, PIG-A (fosfatidilinositol glicano de clase A) reside en el cromosoma X y puede tener diferentes mutaciones, deleciones, variando de deleciones a mutaciones puntuales.

La HPN provoca una sensibilidad a las proteínas del complemento y esta sensibilidad tiene lugar en la membrana celular. Las HPN son deficientes en un número de proteínas, particularmente proteínas de superficie reguladoras del complemento esenciales. Estas proteínas de superficie reguladoras del complemento incluyen el factor acelerador de la desintegración ("DAF") o CD55 y un inhibidor de membrana de reactivo de lisis ("MIRL") o CD59.

La HPN se caracteriza por anemia hemolítica (un descenso del número de glóbulos rojos), hemoglobinuria (presencia de la hemoglobina en la orina particularmente evidente después de dormir) y hemoglobinemia (presencia de la hemoglobina en el torrente sanguíneo). Los individuos afectados por HPN se conocen por tener paroxismos, que se definen aquí como incidencias de orina de color oscuro. La anemia hemolítica se debe a destrucción intravascular de glóbulos rojos por componentes del complemento. Otros síntomas incluyen disfagia, fatiga, disfunción eréctil, trombosis y dolor abdominal recurrente.

La hemólisis que resulta de enfermedades hemolíticas causa deficiencia de óxido nítrico (NO) local y sistémica por la liberación de hemoglobina libre. La hemoglobina libre es un muy eficaz aceptor de NO, debido a en parte a la accesibilidad de NO en el compartimento no eritrocítico y a una afinidad 10^6 veces mayor del resto hemo por NO más que por oxígeno. La aparición de hemólisis intravascular a menudo genera suficiente hemoglobina libre para deplecionar completamente haptoglobina. Una vez que la capacidad de esta proteína aceptora de hemoglobina se excede, sigue el consumo de NO endógeno. Por ejemplo, en un entorno de hemólisis intravascular, tal como HPN, donde los niveles de LDH fácilmente pueden exceder 2-3 veces sus niveles normales, la hemoglobina libre obtendría probablemente concentraciones de 0,8-1,6 g/l. Dado que la haptoglobina puede unir solamente en algún sitio entre 0,7 a 1,5 g/l de hemoglobina dependiendo del alotipo de haptoglobina, se generaría un gran exceso de hemoglobina. Una vez la capacidad de reabsorción de hemoglobina por los túbulos proximales del riñón se excede, la hemoglobinuria continua. La liberación de la hemoglobina libre durante una hemólisis intravascular da como resultado consumo excesivo de NO con contracción del músculo liso, vasoconstricción y activación y agregación plaquetaria subsiguientes. Morbilidades relacionadas con HPN asociadas con acepción de NO por hemoglobina incluyen dolor abdominal, disfunción eréctil, espasmo esofágico y trombosis.

La evaluación de laboratorio de hemólisis incluye normalmente pruebas hematológicas, serológicas y de orina. Las pruebas hematológicas incluyen un examen del frotis de sangre para anormalidades morfológicas de RBC (para determinar causa) y la medida del recuento de reticulocitos en sangre completa (para determinar compensación de médula ósea por pérdida de RBC). Las pruebas serológicas incluyen lactato deshidrogenasa (LDH; ampliamente realizada) y hemoglobina libre (no ampliamente realizada) como una medida directa de hemólisis. Los niveles de LDH, en ausencia de daño tisular en otros órganos, puede ser útiles en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con hemólisis. Otras pruebas serológicas incluyen bilirrubina o haptoglobina, como las medidas de productos de degradación o de reserva de aceptores, respectivamente. El análisis de orina incluye bilirrubina, hemosiderina y hemoglobina libre y generalmente se usan para medir macroscópicamente gravedad de hemólisis y para diferenciación de etiologías extravasculares frente a las intravasculares de hemólisis más que seguimiento de hemólisis rutinario. Además, los números de RBC, la hemoglobina de RBC (es decir, unida a células) y el hematocrito se llevan a cabo generalmente para determinar la extensión de cualquier anemia acompañante más que como una medida de la actividad hemolítica per sé.

Se han empleado esteroides como una terapia para enfermedades hemolíticas y pueden ser efectivos para suprimir hemólisis en algunos pacientes, aunque el uso a largo plazo de terapia de esteroides lleva muchos efectos secundarios negativos. Los pacientes afectados pueden requerir transfusiones de sangre, que llevan riesgos de infección. La terapia anticoagulante también puede requerirse para evitar formación de coágulos sanguíneos. Se ha

conocido que el transplante de médula ósea cura HPN, sin embargo, las coincidencias de médula ósea son a menudo muy difíciles de encontrar y las tasas de mortalidad son altas con tal procedimiento.

JANE SALODOF MACNEIL ("Eculizumab could be paroxysmal nocturnal hemoglobinuria breakthrough", 19000101, [en Internet] 13 de diciembre de 2.002 (13-12-2.002), páginas 1-2, Medscape Medical News) es un informe de 13-12-2.002 en base a Resumen 154 presentado el 9-12-2.002 en el 44º Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH) y se refiere al uso de Eculizumab para el tratamiento de los síntomas de la HPN, en particular hemólisis. La terapia redujo la necesidad de transfusiones de sangre en el 68 %.

KAPLAN M: "ECULIZUMAB",CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS, PHARMAPRESS, EE.UU., vol.: 3, n.º: 7, 1 de julio de 2.002 (1-7-2.002), páginas 1017-1023 describe los ensayos clínicos usando eculizumab para una diversidad de enfermedades.

Sería ventajoso proporcionar un tratamiento que de forma segura y fiable elimine y/o limite enfermedades hemolíticas, tales como HPN y sus efectos.

Sumario

La invención se define por las reivindicaciones.

La hemoglobinuria nocturna paroxística ("HPN") y otras enfermedades hemolíticas se tratan usando un compuesto que se une a o bloquea de otra manera la generación y/o actividad de uno o más componentes del complemento. Compuestos adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos que unen o bloquean la generación y/o actividad de uno o más componentes del complemento, tales como, por ejemplo, un anticuerpo específico para complementar el componente C5. En realizaciones particularmente útiles, el compuesto es un anti-C5 seleccionado del grupo que consiste en h5G1.1-mAb (eculizumab), h5G1.1-scFv (pexelizumab) y otros fragmentos funcionales de h5G1.1. Se ha encontrado sorprendentemente que los procedimientos descritos proporcionan mejoras en el sujeto de HPN en un plazo de 24 horas tras la administración del compuesto. Por ejemplo, una hemólisis se redujo significativamente en un plazo de 24 horas tras la administración del compuesto como se indica por la resolución de hemoglobinuria.

El compuesto de inhibición del complemento se puede administrar profilácticamente en individuos conocidos por tener una enfermedad hemolítica para evitar o ayudar a evitar la aparición de síntomas. Alternativamente, el compuesto de inhibición del complemento puede administrarse como un régimen terapéutico para síntomas de experiencia individuales de una enfermedad hemolítica.

Se contempla un procedimiento de incrementar la proporción de glóbulos rojos de tipo III sensibles a complemento y por lo tanto el recuento de glóbulos rojos totales en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica. El procedimiento comprende administrar un compuesto que se une a o bloquea de otra forma la generación y/o actividad de uno o más componentes del complemento para un paciente afectado con una enfermedad hemolítica. Incrementando recuento de glóbulos rojos de tipo III, los síntomas tales como fatiga y anemia se pueden aliviar también en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica.

Se describe un procedimiento de volver a un sujeto afectado por una enfermedad hemolítica menos dependiente de transfusiones o independiente de transfusiones administrando un compuesto al sujeto, seleccionándose el compuesto del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento. Se ha encontrado sorprendentemente que los pacientes pueden volverse independientes de transfusiones de acuerdo con los presentes procedimientos. Inesperadamente, se puede mantener independencia de transfusión durante doce meses o más, mucho más allá del ciclo vital de 120 días de los glóbulos rojos. La independencia de transfusión puede mantenerse durante dos años o más. El tratamiento durante seis meses o más se requiere para la evaluación o independencia de transfusión dada la semivida larga de los glóbulos rojos.

También se describe un procedimiento de tratamiento de un desequilibrio de óxido nítrico (NO) en un sujeto administrando un compuesto al sujeto, seleccionándose el compuesto del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento. Reduciendo la lisis de los glóbulos rojos, los presentes procedimientos reducen la cantidad de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo, incrementando de este modo los niveles séricos de óxido nítrico (NO). Se puede restablecer homeostasis de NO en la que hay una resolución de los síntomas atribuible a deficiencia de NO.

También se describe un procedimiento de tratamiento de trombosis en un sujeto administrando un compuesto al sujeto, seleccionándose el compuesto del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento.

También se describe un procedimiento de tratamiento de fatiga en un sujeto afectado con una enfermedad

hemolítica administrando un compuesto al sujeto, seleccionándose el compuesto del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento.

También se describe otro procedimiento de tratamiento de disfunción eréctil en un sujeto afectado con una enfermedad hemolítica administrando un compuesto al sujeto, seleccionándose el compuesto del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento.

También se describe un procedimiento de tratamiento de dolor abdominal en un sujeto afectado con una enfermedad hemolítica administrando un compuesto al sujeto, seleccionándose el compuesto del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento.

También se describe un procedimiento de tratamiento de un sujeto afectado con una enfermedad hemolítica administrando: 1) uno o más compuestos que incrementan hematopoyesis (por ejemplo, bien reforzando la producción, bien eliminando la destrucción de células madre o bien eliminando la inhibición de células madre) en combinación con 2) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento. Compuestos adecuados para aumentar la hematopoyesis conocidos incluyen, por ejemplo, esteroides, inmunosupresores (tales como, ciclosporina), anticoagulantes (tales como, warfarina), ácido fólico, hierro y similares, eritropoyetina (EPO) y globulina antitimocítica (ATG), globulina antilinfocítica (ALG), derivados de EPO y darbepoetina alfa (comercialmente disponible como Aranesp® de Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA (Aranesp® es una forma elaborada por el hombre de EPO producida en células de ovario de hámster chino (CHO) por tecnología de ADN recombinante)). La eritropoyetina (EPO) (un compuesto conocido que se sabe que incrementa hematopoyesis), los derivados de EPO, o la darpopoetina alfa se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-C5 seleccionado del grupo que consiste en h5G1.1-mAb, h5G1.1-scFv y otros fragmentos funcionales de h5G1.1.

Se describe además un procedimiento de tratamiento de uno o más síntomas de enfermedades hemolíticas en un sujeto donde la proporción de tipo III de los glóbulos rojos del contenido de glóbulos rojos total del sujeto es mayor del 10 % antes de o durante el tratamiento, administrando un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento, administrándose dicho compuesto solo o en combinación con uno o más compuestos conocidos por aumentar la hematopoyesis, tales como EPO, derivados de EPO, o darbepoetina alfa.

También se describe un procedimiento de tratamiento de uno o más síntomas de enfermedades hemolíticas en un sujeto que tiene un recuento de plaquetas por encima de 40.000 por microlitro, administrando un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos que se une a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento, dicho compuesto se administró solo o en combinación con uno o más compuestos que aumentan hematopoyesis, tales como EPO, derivados de EPO, o darbepoetina alfa.

También se describe un procedimiento de tratamiento de uno o más síntomas de enfermedades hemolíticas en un sujeto que tiene un recuento de reticulocitos por encima de 80 x 10^9 por litro, administrando un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento, dicho compuesto se administró solo o en combinación con uno o más compuestos conocidos por incrementar hematopoyesis, tales como EPO, derivados de EPO, o darbepoetina alfa.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra parámetros bioquímicos de hemólisis medidos durante el tratamiento de pacientes de HPN con un anticuerpo anti-C5.

La figura 1B representa gráficamente el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti-C5 en niveles de lactato deshidrogenasa (LDH).

La figura 2 muestra una escala de colores de orina ideada para someter a seguimiento la incidencia de paroxismo de hemoglobinuria en pacientes de HPN.

La figura 3 es una gráfica de los efectos de tratamientos de eculizumab en paroxismos de pacientes, según se comparan con propiedades de pretratamiento.

La figura 4 muestra muestras de orina de pacientes con HPN y medidas de hemoglobinuria, disfagia, LDH, AST, propiedades farmacocinéticas (PK) y propiedades farmacodinámicas (PD), reflejando los efectos inmediatos y positivos de los presentes procedimientos de hemólisis, síntomas o propiedades farmacodinámicas adecuadas para bloquear completamente complemento.

La figura 5 representa gráficamente el efecto de la pauta de dosificación de anticuerpos anti-C5 en hemoglobinuria a lo largo del tiempo.

Las figuras 6a y 6b son gráficas que comparan el número de unidades de transfusión requeridas por paciente por mes, antes de y durante el tratamiento con un anticuerpo anti-C5: La figura 6a representa pacientes citopénicos; y la figura 6b representa pacientes no citopénicos.

La figura 7 muestra la gestión de un paciente trombocitopénico administrando un anticuerpo anti-C5 y eritropoyetina (EPO).

La figura 8 representa gráficamente las características farmacodinámicas de un anticuerpo anti-C5.

La figura 9 es un gráfico de los resultados de los cuestionarios de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento de Cáncer ("EORTC QLC-C30") completado durante el régimen de terapia anti-C5 que trata los asuntos de calidad de vida.

La figura 10 es un gráfico que representa los efectos de los tratamientos de anticuerpos anti-C5 sobre síntomas adversos asociados con HPN.

Descripción detallada

Se describe un procedimiento de tratamiento de hemoglobinuria nocturna paroxística ("HPN") y otras enfermedades hemolíticas en mamíferos. Específicamente, los procedimientos de tratar las enfermedades hemolíticas, que se describen en el presente documento, implican usar compuestos para unir a o bloquear de otra forma la generación y/o actividad de uno o más componentes del complemento. Se ha encontrado que estos procedimientos proporcionan resultados sorprendentes. Por ejemplo, la hemólisis concluye rápidamente tras la administración del compuesto que se une a o que bloquea de otra forma la generación y/o la actividad de uno o más componentes del complemento, con la hemoglobinuria estando significativamente reducida después del tratamiento. Además, los pacientes hemolíticos pueden volverse menos dependientes de transfusiones o independientes de transfusiones durante periodos prolongados (doce meses o más), mucho más allá de los 120 días del ciclo vital de los glóbulos rojos. Además, el recuento de glóbulos rojos de tipo III puede incrementarse espectacularmente en medio de otros mecanismos de lisis de glóbulos rojos (no mediados por el complemento y/o mediados por componentes del complemento anteriores por ejemplo, Cb3). Otro ejemplo de un resultado sorprendente es que los síntomas se resolvieron, indicando que los niveles séricos de NO se incrementaron lo suficiente incluso en la presencia de otros mecanismos de lisis de glóbulos rojos. Estos y otros resultados indicados en el presente documento son inesperados y no podrían predecirse a partir de tratamientos anteriores de enfermedades hemolíticas.

Cualquier compuesto que se une a o bloquea de otro modo la generación y/o la actividad de uno o más componentes del complemento puede usarse en los procedimientos descritos. Una clase específica de tales compuestos que son particularmente útiles incluye anticuerpos específicos para un componente del complemento humano, especialmente anticuerpos anti-C5. El anticuerpo anti-C5 inhibe la cascada del complemento y, en última instancia,evita la lisis de glóbulos rojos ("RBC") por el complejo proteico del complemento C5b-9. Inhibiendo y/o reduciendo la lisis de RBC, los efectos de la HPN y otras enfermedades hemolíticas (incluyendo síntomas tales como hemoglobinuria, anemia, hemoglobinemia, disfagia, fatiga, disfunción eréctil, dolor abdominal recurrente y trombosis) se eliminan o disminuyen.

Se describe también que las formas solubles de las proteínas CD55 y CD59, singularmente o en combinación unas con otras, se pueden administrar a un sujeto para inhibir la cascada del complemento en su ruta alternativa. CD55 inhibe al nivel de C3, impidiendo de este modo la progresión adicional de la cascada. CD59 inhibe el complejo C5b-8 combinando con C9 para formar el complejo de ataque a la membrana (véase la discusión más adelante).

El sistema de complemento actúa en conjunción con otros sistemas inmunológicos del cuerpo para defender contra intrusión de patógenos víricos y bacterianos. Hay al menos 25 proteínas implicadas en la cascada del complemento, que se encuentran como una colección compleja de proteínas de plasma y cofactores de membrana. Los componentes del complemento logran sus funciones defensivas inmunitarias interaccionado en una serie de eventos de escisión enzimática y de unión a membrana intricados pero precisos. La cascada del complemento resultante conduce a la producción de productos con funciones opsónicas, inmunorreguladoras y líticas. Se proporciona un resumen conciso de las actividades biológicas asociadas con la activación del complemento, por ejemplo, en The Merck Manual, 16ª edición.

La cascada del complemento progresa por medio de la ruta clásica, la ruta alternativa o la ruta de lectina. Estas vías comparten muchos componentes y aunque difieren en sus etapas iniciales, ellas convergen y comparten los mismos componentes del "complemento terminal" (C5 a C9) responsables de la activación y destrucción de las células

objetivo. La ruta del complemento clásica se inicia típicamente por reconocimiento de anticuerpo de y por unión de anticuerpo a sitio antigénico en una célula objetivo. La ruta alternativa es usualmente independiente de anticuerpo y puede iniciarse por ciertas moléculas de superficies patógenas. Adicionalmente, la ruta de lectina se inicia típicamente por unión de lectina de unión a manosa ("MBL") a sustratos de manosa alta. Estas rutas convergen en el punto donde el componente del complemento C3 se escinde por una proteasa activa para proporcionar C3a y C3b.

C3a es una anafilotoxina (véase la discusión más adelante). C3b se une a bacterias y a otras células, así como a ciertos virus y complejos inmunes y los marca para eliminación de la circulación. (C3b en este papel se conoce como opsonina). La función opsónica de C3b generalmente se considera que es la acción anti-infectiva más importante del sistema del complemento. Los pacientes con lesiones genéticas que bloquean función C3b son propensos a infectarse por una amplia variedad de organismos patógenos, mientras que los pacientes con lesiones más tarde en la secuencia de cascada de complemento, es decir, pacientes con lesiones que bloquean funciones de C5, se encuentra que son propensos solamente a infección de Neisseria y después solamente son algo más propensas (Fearon, en Intensive Review of Internal Medicine, 2ª ed. Fanta and Minaker, eds. Brigham and Women's and Beth Israel Hospitals, 1983).

C3b también forma un complejo con otros componentes únicos para cada ruta alternativa para formar convertasa C5 clásica o alternativa, que escinde C5 en C5a y C5b. C3 se considera así por tanto como la proteína central en la secuencia de reacción de complemento dado que es esencial para todas las tres rutas de activación (Wurzner, y cols., Complemento Inflamm. 8: 328-340, 1991). Esta propiedad de C3b está regulada por la proteasa sérica Factor I, que actúa sobre C3b para producir iC3b (C3b inactivo). Aunque aún funcional como una opsonina, iC3b no puede formar una convertasa activa C5.

El precursor pro-C5 se escinde después de aminoácidos 655 y 659, para proporcionar la cadena beta como un fragmento aminoterminal (residuos de aminoácidos +1 a 655 de la secuencia) y la cadena alfa como un fragmento carboxiloterminal (residuos de aminoácidos 660 a 1658 de la secuencia), con cuatro aminoácidos (residuos de aminoácidos 656-659 de la secuencia) eliminados entre los dos. C5 está glicosilado, con aproximadamente 1,5-3 por ciento de su masa atribuida a carbohidrato. C5 maduro es un heterodímero de una cadena alfa de 115 kDa de 999 aminoácidos que es disulfuro unido a una cadena beta de 75 KDa de 655 aminoácidos. C5 se encuentra en suero normal a aproximadamente 75 µg/ml (0,4 µM). C5 se sintetiza como un producto de proteína precursora de cadena individual de un gen de copia única (Haviland y cols., J. Immunol. 1991, 146: 362-368). La secuencia de ADNc del transcrito de este gen predice un precursor pro-C5 segregado de 1658 aminoácidos junto con una secuencia líder de 18 aminoácidos (véase, patente de los EE.UU. 6.355.245).

La escisión de C5 libera C5a, una potente anafilotoxina y un potente factor quimiotáctico y conduce a la formación del complejo del complemento terminal lítico, C5b-9. C5a se escinde de la cadena alfa de C5 bien por convertasa alternativa o bien por convertasa clásica de C5 como un fragmento aminoterminal que comprende los primeros 74 aminoácidos de la cadena alfa (es decir, residuos de aminoácidos 660-733 de la secuencia). Aproximadamente el 20 por ciento de la masa de 11 kDa de C5a se atribuye a carbohidrato. El sitio de escisión por acción de convertasa está en, o está inmediatamente adyacente a, residuo aminoacídico 733 de la secuencia. Un compuesto que se une a, o es adyacente a, este sitio de escisión tendría el potencial para bloquear acceso de las enzimas de convertasa de C5 al sitio de escisión y de este modo actuar como un inhibidor del complemento.

C5b combina con C6, C7, y C8 para formar C5b-8 en la superficie de la célula objetivo. Tras la unión de varias moléculas de C9, se forma el complejo de ataque a membrana ("MAC", C5b-9, complejo de complemento terminal - TCC-). Cuando números suficientes de MAC se insertan en membranas de células objetivos, las aberturas que ellos crean (poros de MAC) median la lisis osmótica rápida de las células objetivo. Concentraciones menores, no líticas de MAC pueden producir otros efectos proinflamatorios. En particular, la inserción en membrana de pequeños números de los complejos C5b-9 en células endoteliales y plaquetas puede causar activación de células deletéreas. En algunos casos la activación puede preceder la lisis celular.

C5a y C5b-9 también tienen propiedades de activación celular pleiotrópicas, amplificando la liberación de factores inflamatorios corriente abajo, tales como enzimas hidrolíticas, especies de oxígeno reactivas, metabolitos de ácido araquidónico y diversas citocinas. C5 también se puede activar por otros medios distintos de actividad convertasa de C5. La digestión limitada con tripsina (Minta and Man, J. Immunol. 1977, 119: 1597-1602; Wetsel y Kolb, J. Immunol. 1982, 128: 2209-2216) y el tratamiento ácido (Yammamoto y Gewurz, J. Immunol. 1978, 120: 2008; Damerau y cols., Molec. Immunol. 1989, 26: 1133-1142) pueden también escindir C5 y producir C5b activo.

Como se menciona anteriormente, C3a y C5a son anafilotoxinas. Estos componentes del complemento pueden activar degranulación de mastocitos, lo que libera histamina y otros mediadores de inflamación, dando como resultado contracción del músculo liso, permeabilidad vascular incrementada, activación de leucocitos y otros fenómenos inflamatorios incluyendo la proliferación celular dando como resultado hipercelularidad. C5a también funciona como un péptido quimiotáctico que sirve para atraer granulocitos proinflamatorios al sitio de activación del complemento.

Cualesquiera compuestos que unan o bloqueen de otra manera la generación y/o la actividad de cualquiera de los componentes del complemento humano pueden utilizarse. Los anticuerpos específicos para un componente del

complemento humano son útiles en el presente documento. Algunos compuestos incluyen anticuerpos dirigidos contra los componentes de complemento C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, Factor D, Factor B, Factor P, MBL, MASP-1 y MASP-2, evitando así la generación de la actividad anafilotóxica asociada con C5a y/o evitando el ensamblaje del complejo de ataque de membrana asociado con C5b.

También útiles pueden ser las formas que se dan en la naturaleza o las formas solubles de los compuestos inhibidores del complemento tales como CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, Factor H, factor del veneno de la cobra, FUT-175, complestatina y K76 COOH. Otros compuestos que pueden utilizarse para unirse a o para bloquear de otra forma la generación y/o actividad de cualesquiera de los componentes del complemento humano incluyen, pero no se limitan a, proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, moléculas pequeñas, aptámeros de ARN incluyendo ARC187 (que está comercialmente disponible de Archemix Corp., Cambridge, MA), aptámeros de ARN-L, spiegelmers, compuestos antisentido, inhibidores de serina proteasas, moléculas que se pueden utilizar en interferencia de ARN (ARNi) tales como ARN de cadena doble incluyendo ARN de interferencia pequeño (ARNip), inhibidores de ácidos nucleicos inaccesibles (LNA), inhibidores de ácido peptidonucleico (PNA), etcétera.

Desde el punto de vista funcional, una clase de compuestos adecuada inhibe la escisión de C5, que bloquea la generación de moléculas proinflamatorias C5a y C5b-9 (complejo del complemento terminal). Preferentemente, el compuesto no impide la formación de C3b, que está al servicio de las funciones inmunoprotectoras críticas de opsonización y de aclaramiento del complejo inmunitario.

Aunque evitando la generación de estas moléculas de complejo de ataque de membrana, la inhibición de la cascada del complemento en C5 conserva la capacidad para generar C3b, que es crítica para la opsonización de muchos microorganismos patógenos, así como para la solubilización y el aclaramiento del complejo inmune. Mantener la capacidad para generar C3b parece ser particularmente importante como un factor terapéutico en inhibición del complemento para enfermedades hemolíticas, donde la susceptibilidad incrementada a trombosis, infección, fatiga, letargia y aclaramiento dañado de complejos inmunes son características clínicas pre-existentes de los procesos morbosos.

Los compuestos para usar particularmente útiles son anticuerpos que reducen, directa o indirectamente, la conversión del componente de complemento C5 en componentes del complemento C5a y C5b. Una clase de anticuerpos útiles son aquellos que tienen al menos un sitio de unión de antígenos y que presentan unión específica al componente del complemento humano C5. Los inhibidores de complemento particularmente útiles son compuestos que reducen la generación de C5a y/o de C5b-9 en más de aproximadamente el 30 %. Los anticuerpos anti-C5 que tienen la capacidad deseable para bloquear la generación de C5a se han conocido en la técnica desde al menos 1982 (Moongkamdi y cols. Immunobiol. 1982, 162: 397; Moongkamdi y cols. Immunobiol. 1983, 165: 323). Los anticuerpos conocidos en la técnica que son inmunorreactivos contra C5 o contra fragmentos de C5 incluyen anticuerpos contra la cadena beta de C5 (Moongkamdi y cols. Immunobiol. 1982, 162: 397; Moongkamdi y cols. Immunobiol. 1983, 165: 323; Wurzner y cols. 1991, supra; Mollnes y cols. Scand. J. Immunol. 1988, 28: 307-312); C5a (véanse por ejemplo, Ames y cols. J. Immunol. 1994, 152: 4572-4581, Patente de los Estados Unidos N.º: 4.686.100 y Publicación de la Patente Europea N.º: 0 411 306); y anticuerpos contra C5 no humano (véase por ejemplo, Giclas y cols. J. Immunol. Meth. 1987, 105: 201-209). Anticuerpos anti-C5 particularmente útiles son h5G1.1-mAb, h5G1.1-scFv y otros fragmentos funcionales de h5G1.1. Procedimientos para la preparación de h5G1.1-mAb, h5G1.1-scFv y otros fragmentos funcionales de h5G1.1 se describen en la Patente de los EE.UU. N.º: 6.355.245 y en "Inhibition of Complement Activity by Humanized Anti-C5 Antibody and Single Chain Fv", Thomas y cols., Molecular Immunology, vol. 33, N.º: 17/18, páginas 1389-1401, 1996. El anticuerpo h5G1.1-mAb está actualmente sufriendo ensayos clínicos con el nombre comercial eculizumab.

Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales reactivos con componente del complemento C5 pueden obtenerse de acuerdo con las enseñanzas de Sims, y cols., Patente de los EE.UU. N.º: 5.135.916. Los anticuerpos purificados se preparan usando componentes purificados del componente C5 del complemento como inmunógenos de acuerdo con procedimientos conocidos. El componente del complemento C5, C5a o C5b se puede usar como el inmunógeno. El inmunógeno puede ser la cadena alfa de C5.

Los anticuerpos particularmente útiles presentan las propiedades funcionales requeridas discutidas en el párrafo precedente y tienen cualquiera de las siguientes características:

(1) ellos compiten por unirse a partes de C5 que son específicamente inmunorreactivas con 5G1.1;

(2) ellos se unen específicamente a la cadena alfa C5 -- tal unión específica y tal competición para unión se pueden determinar por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo el procedimiento de resonancia de superficie de plasmón (Johne y cols., J. Immunol. Met. 1993, 160: 191-198); y

(3) ellos bloquean la unión de C5 bien a C3 o bien a C4 (que son componentes de las convertasas de C5).

El compuesto que inhibe la producción y/o actividad de al menos un componente del complemento puede administrarse en una diversidad de formas de dosificación unitarias. La dosis variará de acuerdo con el compuesto particular empleado. Por ejemplo, anticuerpos diferentes pueden tener masas diferentes y/o afinidades diferentes y así requerir diferentes niveles de dosificación. Anticuerpos preparados como fragmentos (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$,

scFv) también requerirán dosificaciones diferentes que las inmunoglobulinas intactas equivalentes, ya que son de masa considerablemente más pequeña que inmunoglobulinas intactas y así requieren dosificaciones más bajas para alcanzar los mismos niveles molares en la sangre del paciente.

La dosis variará también dependiendo de la forma de administración, los síntomas específicos del paciente que se trata, la salud general, afección, tamaño y edad del paciente y el juicio del médico que receta.

La administración del compuesto que inhibe la producción y/o actividad de al menos un componente del complemento estará generalmente en una forma de aerosol con un vehículo farmacéutico adecuado, por medio de infusión intravenosa por inyección, inyección subcutánea, oralmente o sublingualmente. Se pueden usar otras vías de administración si se desea.

Se considera adicionalmente que se puede usar una terapia de combinación en la que un compuesto inhibidor del complemento se administra en combinación con un régimen de terapia conocida para enfermedad hemolítica. Tales regímenes incluyen administración de 1) uno o más compuestos que incrementan hematopoyesis (por ejemplo, bien reforzando la producción, bien eliminando la destrucción de células madre o bien eliminando la inhibición de células madre) en combinación con 2) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos que se unen a uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la actividad de uno o más componentes del complemento. Compuestos adecuados conocidos para incrementar la hematopoyesis conocidos incluyen, por ejemplo, esteroides, inmunosupresores (tales como, ciclosporina), anticoagulantes (tales como, warfarina), ácido fólico, hierro y similares, eritropoyetina (EPO) y globulina antitimocítica (ATG), globulina antilinfocítica (ALG), derivados de EPO y darbepoetina alfa (comercialmente disponible como Aranesp® de Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA (Aranesp® es una forma elaborada por el hombre de EPO producida en células de ovario de hámster chino (CHO) por tecnología de ADN recombinante)). La eritropoyetina (EPO) (un compuesto conocido para incrementar hematopoyesis), los derivados de EPO, o la darpopoetina alfa se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-C5 seleccionado del grupo que consiste en h5G1.1-mAb, h5G1.1-scFv y otros fragmentos funcionales de h5G1.1.

Las formulaciones adecuadas para inyección se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17ª ed. (1985). Tales formulaciones deben ser estériles y apirógenas y generalmente incluirán un vehículo farmacéuticamente efectivo, tal como solución salina, solución salina tamponada (por ejemplo, tamponada por fosfato), solución de Hank, solución de Ringer, dextrosa/solución salina, soluciones de glucosa. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera, tales como, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, agentes bactericidas, conservantes, estabilizantes.

Se describen procedimientos de reducir hemólisis en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica administrando uno o más compuestos que se unen a o bloquean de otro modo la generación y/o actividad de uno o más componentes del complemento. Reducir hemólisis significa que la duración del tiempo que una persona sufre de hemólisis se reduce en aproximadamente el 25 % o más. La eficacia del tratamiento puede evaluarse en cualquiera de las diversas formas conocidas por aquellos expertos en la técnica para determinar el nivel de hemólisis en un paciente. Un procedimiento cualitativo para detectar hemólisis es observar las apariciones de hemoglobinuria. Bastante sorprendentemente, el tratamiento de acuerdo con los procedimientos descritos reduce hemólisis según se determinó por una reducción rápida en hemoglobinuria.

Una manera más cualitativa de medir hemólisis es medir niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) en el torrente sanguíneo del paciente. LDH cataliza la interconversión de piruvato y lactato. Los glóbulos rojos metabolizan glucosa a lactato, que se libera en la sangre y se capta por el hígado. Los niveles de LDH se usan como un indicador objetivo de hemólisis. Como aquellos expertos en la técnica apreciarán, las medidas de "límite superior de niveles normales" de LDH variarán de laboratorio a laboratorio dependiendo de un número de factores incluyendo el ensayo particular empleado y la forma precisa en que se dirige el ensayo. Hablando generalmente, sin embargo, los procedimientos descritos pueden reducir hemólisis en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica según se refleja por una reducción de niveles de LDH en los pacientes hasta dentro del 20 % del límite superior de los niveles de LDH normales. Alternativamente, los procedimientos descritos pueden reducir hemólisis en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica según se refleja por una reducción de los niveles de LDH en los pacientes mayor del 50 % del nivel de LDH pretratamiento de los pacientes, tal como mayor del 65 % del nivel de LDH pretratamiento de los pacientes.

Otra medida cuantitativa de la reducción en hemólisis es la presencia de glóbulos rojos deficientes en GPI (glóbulos rojos de tipo III). Como apreciarán aquellos expertos en la técnica, los glóbulos rojos de tipo III no tendrán ninguna expresión de proteínas de unión a GPI en la superficie celular. La proporción de células deficientes en GPI se puede determinar por citometría de flujo usando, por ejemplo, la técnica descrita en Richards, y cols., Clin. Appl. Immunol. Rev., vol. 1, páginas 315-330, 2001. Los procedimientos descritos pueden reducir hemólisis en un paciente afectado con un enfermedad hemolítica según se refleja por un incremento en glóbulos rojos de tipo III. Un incremento en niveles de glóbulos rojos de tipo III en el paciente mayor del 25 % del recuento total de glóbulos rojos podrá lograrse, más preferentemente se logra un incremento en niveles de glóbulos rojos de tipo III mayor del 50 % del recuento total de glóbulos rojos, lo más preferentemente se logra un incremento en niveles de glóbulos rojos de tipo III mayor

del 75 % del recuento total de glóbulos rojos.

Se describen también procedimientos de reducir uno o más síntomas asociados con HPN u otras enfermedades hemolíticas. Tales síntomas incluyen, por ejemplo, dolor abdominal, fatiga, disnea e insomnio. Los síntomas pueden ser el resultado directo de lisis de glóbulos rojos (por ejemplo, hemoglobinuria, anemia, fatiga, recuento bajo de glóbulos rojos, etc.) o los síntomas pueden resultar de niveles de óxido nítrico (NO) bajos en el torrente sanguíneo del paciente (p. ej., dolor abdominal, disfunción eréctil, disfagia, trombosis, etc.). Se ha comunicado recientemente que casi todos los pacientes con más del 40 % del clon de granulocitos de tipo III de HPN tienen trombosis, dolor abdominal, disfunción eréctil y disfagia, indicando una velocidad hemolítica alta (véase Moyo y cols., British J Haematol. 126: 133-138 (2004)).

Los procedimientos descritos proporcionan una reducción en uno o más síntomas asociados con HPN u otras enfermedades hemolíticas en un paciente que tiene un recuento de plaquetas por encima de 40.000 por microlitro (un paciente hipoplástico), preferentemente por encima de 75.000 por microlitro, lo más preferentemente por encima de 150.000 por microlitro. Los presentes procedimientos pueden aportar una reducción en uno o más síntomas asociados con HPN u otras enfermedades hemolíticas en un paciente donde la proporción de los glóbulos rojos de tipo III de HPN del contenido de glóbulos rojos total del sujeto es mayor del 10 %, tal como mayor del 25 % o por encima de 50 %. Los presentes procedimientos pueden proporcionar una reducción en uno o más síntomas asociados con HPN u otras enfermedades hemolíticas en un paciente que tiene un recuento de reticulocitos por encima de 80 x 10^9 por litro, tal como por encima de 120 x 10^9 por litro, o por encima de 150 x 10^9 por litro. Los pacientes en los últimos intervalos enumerados anteriormente tienen médula ósea activa y producirán números adecuados de glóbulos rojos. Mientras que en un paciente afectado con HPN u otra enfermedad hemolítica los glóbulos rojos pueden ser defectivos de una o más formas (por ejemplo, deficientes en GPI), los procedimientos descritos son particularmente útiles en proteger tales células de lisis que resultan de activación del complemento. Así, los pacientes dentro de los últimos intervalos se benefician más de los presentes procedimientos.

También se describe un procedimiento de reducir fatiga, incluyendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto que tiene o es susceptible de una enfermedad hemolítica un compuesto que se une a o que bloquea de otro modo la generación y/o la actividad de uno o más componentes del complemento. Reducir fatiga significa que la duración del tiempo que una persona sufre de fatiga se reduce en aproximadamente un 25 % más. La fatiga es un síntoma que se cree que está asociado con hemólisis intravascular ya que la fatiga cede cuando la hemoglobinuria se resuelve incluso en presencia de anemia. Reduciendo la lisis de glóbulos rojos, los procedimientos descritos reducen fatiga. Los pacientes en los intervalos mencionados anteriormente de glóbulos rojos de tipo III, reticulocitos y plaquetas se benefician más de los procedimientos precedentes.

Se describe además un procedimiento de reducir dolor abdominal contemplado, incluyendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto que tiene o es susceptible de una enfermedad hemolítica un compuesto que se une a o que bloquea de otro modo la generación y/o la actividad de uno o más componentes del complemento. Reducir dolor abdominal significa que la duración del tiempo que una persona sufre de dolor abdominal se reduce en aproximadamente el 25 % o más. El dolor abdominal es un síntoma que resulta de la incapacidad de los niveles naturales de haptoglobina de un paciente para procesar toda la hemoglobina libre liberada en el torrente sanguíneo como resultado de hemólisis intravascular, dando como resultado la acepción de NO y la distonía intestinal y espasmos intestinales. Reduciendo la lisis de glóbulos rojos, los procedimientos descritos reducen la cantidad de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo, reduciendo de este modo el dolor abdominal. Los pacientes en los intervalos mencionados anteriormente de glóbulos rojos de tipo III, reticulocitos y plaquetas se benefician más de los procedimientos precedentes.

Además, se describe un procedimiento de reducir disfagia, incluyendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto que tiene o es susceptible de una enfermedad hemolítica un compuesto que se une a o que bloquea de otro modo la generación y/o la actividad de uno o más componentes del complemento. Reducir disfagia quiere decir que la duración del tiempo que una persona tiene ataques de disfagia se reduce en aproximadamente el 25 % o más. La disfagia es un síntoma que resulta de la incapacidad de los niveles naturales de haptoglobina de un paciente para procesar toda la hemoglobina libre liberada en el torrente sanguíneo como resultado de hemólisis intravascular, dando como resultado la acepción de NO y espasmos esofágicos. Reduciendo la lisis de glóbulos rojos, los procedimientos descritos reducen la cantidad de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo, reduciendo de este modo disfagia. Los pacientes en los intervalos mencionados anteriormente de glóbulos rojos de tipo III, reticulocitos y plaquetas se benefician más de los procedimientos descritos.

Además, se describe un procedimiento de reducir disfunción eréctil, incluyendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto que tiene o es susceptible de una enfermedad hemolítica un compuesto que se une a o que bloquea de otro modo la generación y/o la actividad de uno o más componentes del complemento. Reducir la disfunción eréctil significa que la duración del tiempo que una persona sufre de disfunción eréctil se reduce en aproximadamente el 25 % o más. La disfunción eréctil es un síntoma que se cree que está asociado con la acepción de NO por hemoglobina libre liberada en el torrente sanguíneo como resultado de hemólisis intravascular. Reduciendo la lisis de los glóbulos rojos, los procedimientos descritos reducen la cantidad de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo, incrementando de este modo los niveles séricos de óxido nítrico (NO) y reduciendo la disfunción eréctil. Los pacientes en los intervalos mencionados anteriormente de glóbulos rojos de tipo III, reticulocitos y

plaquetas se benefician más de los procedimientos descritos.

Además, se describe un procedimiento de reducir hemoglobinuria, incluyendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto que tiene o es susceptible de una enfermedad hemolítica un compuesto que se une a o que bloquea de otro modo la generación y/o la actividad de uno o más componentes del complemento. Reducir hemoglobinuria significa una reducción en el número de veces que una persona tiene orina roja, marrón o más oscura, en la que la reducción es típicamente el 25 % o más. La hemoglobinuria es un síntoma resultante de la incapacidad de los niveles naturales de haptoglobina de un paciente para procesar toda la hemoglobina libre liberada en el torrente sanguíneo, como un resultado de hemólisis intravascular. Reduciendo la lisis de glóbulos rojos, los procedimientos descritos reducen la cantidad de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo y en la orina reduciendo de este modo hemoglobinuria. Bastante sorprendentemente, la reducción de hemoglobinuria tiene lugar rápidamente. Los pacientes en los intervalos mencionados anteriormente de glóbulos rojos de tipo III, reticulocitos y plaquetas se benefician más de los procedimientos descritos.

Además, se describe un procedimiento de reducir trombosis, incluyendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto que tiene o es susceptible de una enfermedad hemolítica un compuesto que se une a o que bloquea de otro modo la generación y/o la actividad de uno o más componentes del complemento. Reducir trombosis quiere decir que la duración del tiempo que una persona tiene ataques de trombosis se reduce en aproximadamente el 25 % o más. Trombosis es un síntoma que se cree que está asociado con la acepción de NO por hemoglobina libre liberada en el torrente sanguíneo como un resultado de hemólisis intravascular y/o con la carencia de CD59 en la superficie de plaquetas dando como resultado activación mediada por el complemento terminal de la plaqueta. Reduciendo la lisis de glóbulos rojos, los procedimientos descritos reducen la cantidad de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo, incrementando de este modo los niveles séricos de óxido nítrico (NO) y reduciendo trombosis. Además, el bloqueo del complemento evitará la activación mediada por complemento terminal de plaquetas y la trombosis. C5a se inhibirá también por este procedimiento lo que puede inducir agregación plaquetaria a través de receptores de C5a en plaquetas y en células endoteliales.

La trombosis se piensa que es multifactorial en etiología incluyendo acepción de NO por hemoglobina libre, la ausencia de inhibición del complemento terminal en la superficie de plaquetas circulantes y cambios en la superficie del endotelio por el grupo hemo libre. La liberación intravascular de hemoglobina libre puede contribuir directamente a trombosis de vasos pequeños. Se ha mostrado que NO inhibe la agregación plaquetaria, induce desagregación de plaquetas agregadas e inhibe la adhesión de plaquetas. En cambio, la acepción de NO por hemoglobina o la reducción de generación de NO por la inhibición de metabolismo de arginina da como resultado agregación plaquetaria. Las plaquetas de HPN también carecen del inhibidor CD59 de complemento terminal y múltiples estudios han mostrado que la deposición del complemento terminal (C5b-9) en plaquetas causa vesiculación de membranas y generación de microvesículas. Las microvesículas actúan como un sitio para la generación de los componentes de coagulación factor Va, factor Xa o el complejo protrombinasa. Se piensa que estas partículas pueden contribuir también a la génesis de la trombosis en HPN. Reduciendo la lisis de glóbulos rojos, los presentes procedimientos reducen la cantidad de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo, incrementando de este modo los niveles séricos de óxido nítrico (NO) y reduciendo trombosis. Además, la inhibición de complemento en C5 evitará activación de plaquetas y/o células endoteliales mediada por C5b-9 y C5a.

Los procedimientos descritos pueden reducir trombosis, especialmente en pacientes que tienen un recuento de plaquetas por encima de 40.000 por microlitro, preferentemente por encima de 75.000 por microlitro, lo más preferentemente por encima de 150.000 por microlitro. Los procedimientos descritos pueden disminuir el riesgo de trombosis en pacientes donde la proporción de glóbulos rojos de tipo III de HPN del contenido de glóbulos rojos total del sujeto es mayor del 10 %, tal como mayor del 25 %, o por encima del 50 %, por ejemplo por encima del 75 %. Los procedimientos descritos pueden disminuir el riesgo de trombosis por transfusión en pacientes que tienen un recuento de reticulocitos por encima de 80×10^9 por litro, tal como por encima de 120×10^9 por litro, o por encima de 150×10^9 por litro.

Además, se describe un procedimiento de reducir anemia, incluyendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto que tiene o es susceptible de una enfermedad hemolítica un compuesto que se une a o bloquea de otra manera la generación y/o actividad de uno o más componentes del complemento. Reducir anemia significa que la duración del tiempo que una persona tiene anemia se reduce en aproximadamente el 25 % o más. La anemia en enfermedades hemolíticas resulta de la capacidad reducida de la sangre para llevar oxígeno debido a la pérdida de masa de glóbulos rojos. Reduciendo la lisis de glóbulos rojos, los procedimientos descritos ayudan a incrementar los niveles de glóbulos rojos reduciendo de este modo la anemia.

Además, se describe un procedimiento de incrementar la proporción de glóbulos rojos de tipo III sensibles a complemento y por lo tanto de incrementar recuento de glóbulos rojos total en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica. Incrementando el recuento de RBC del paciente, se reducen la fatiga, la anemia y la necesidad del paciente de transfusiones sanguíneas. La reducción en transfusiones puede estar en la frecuencia de transfusiones, en la cantidad de las unidades de sangre transfundidas, o en ambas.

El procedimiento de incrementar el número de glóbulos rojos en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica incluye la etapa de administrar un compuesto que se une a o bloquea de otra manera la generación y/o

actividad de uno o más componentes del complemento para un paciente afectado con una enfermedad hemolítica. Los presentes procedimientos pueden aumentar el recuento de glóbulos rojos en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica, especialmente en pacientes que tienen un recuento de plaquetas por encima de 40.000 por microlitro, tal como por encima de 75.000 por microlitro, o por encima de 150.000 por microlitro. Los procedimientos pueden incrementar el recuento de glóbulos rojos en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica donde la proporción de HPN de tipo III de los glóbulos rojos del contenido total de glóbulos rojos del sujeto es mayor del 10 %, tal como mayor del 25 %, o está por encima del 50 %, por ejemplo por encima del 75 %. Los procedimientos descritos pueden incrementar el recuento de glóbulos rojos en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica que tiene un recuento de reticulocitos por encima de 80 x 10^9 por litro, tal como por encima de 120 x 10^9 por litro, o por encima de 150 x 10^9 por litro. Los procedimientos de la presente revelación pueden dar como resultado un decrecimiento en la frecuencia de las transfusiones en aproximadamente el 50 %, típicamente un decrecimiento en la frecuencia de las transfusiones en aproximadamente el 70 %, más típicamente un decrecimiento en la frecuencia de las transfusiones en aproximadamente el 90 %.

Se describe además un procedimiento de volver a un sujeto afectado por una enfermedad hemolítica menos dependiente de transfusiones o independiente de transfusiones administrando un compuesto al sujeto, seleccionándose el compuesto de un grupo que consiste en compuestos que unen uno o más componentes del complemento, compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento y compuestos que bloquean la generación de uno o más componentes del complemento. Como apreciarán aquellos expertos en la técnica, el ciclo de vida normal para un glóbulo rojo es aproximadamente 120 días. El tratamiento durante seis meses o más se requiere para la independencia de evaluación o transfusión dada la semivida larga de los glóbulos rojos. Se ha encontrado inesperadamente que en algunos pacientes la independencia de transfusiones puede mantenerse durante doce meses o más, en algunos casos más de dos años, mucho más allá de los 120 días de vida de los glóbulos rojos. Los procedimientos descritos pueden proporcionar una dependencia disminuida de transfusiones o independencia de transfusiones en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica, especialmente en pacientes que tienen un recuento de plaquetas por encima de 40.000 por microlitro, tal como por encima de 75.000 por microlitro, o por encima de 150.000 por microlitro. Los procedimientos descritos pueden proporcionar dependencia disminuida de transfusiones o independencia de transfusiones en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica donde la proporción de glóbulos rojos de tipo III de HPN en el contenido de glóbulos rojos total del sujeto es mayor del 10 %, tal como mayor del 25 %, o por encima del 50 % por ejemplo por encima del 75 %. Los procedimientos descritos pueden proporcionar dependencia disminuida de transfusiones o independencia de transfusiones en un paciente afectado con una enfermedad hemolítica que tiene un recuento de reticulocitos por encima de 80 x 10^9 por litro, tal como por encima de 120 x 10^9 por litro, o por encima de 150 x 10^9 por litro.

Se describen también procedimientos de incrementar los niveles de óxido nítrico (NO) en un paciente que tiene HPN o alguna otra enfermedad hemolítica. Estos procedimientos de incrementar los niveles de NO incluyen la etapa de administrar a un sujeto que tiene o es susceptible de una enfermedad hemolítica un compuesto que se une a o bloquea de otra manera la generación y/o actividad de uno o más componentes del complemento. Los niveles bajos de NO surgen en pacientes afectados con HPN u otras enfermedades hemolíticas como resultado de acepción de NO por hemoglobina libre liberada en el torrente sanguíneo como resultado de hemólisis intravascular. Reduciendo la lisis de glóbulos rojos, los procedimientos descritos reducen la cantidad de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo, incrementándose de este modo los niveles séricos de NO. La homeostasis de NO podrá restaurarse como se evidencia por la resolución de síntomas atribuibles a deficiencias de NO.

Ejemplos

Once pacientes participaron en ensayos de terapia evaluando los efectos de anticuerpo anti-C5 sobre la HPN y sobre síntomas asociados con la misma. Los pacientes de HPN eran dependientes de transfusiones y hemolíticos. Los pacientes se definieron como dependientes de transfusiones con una historia de cuatro o más transfusiones en doce meses. El número promedio de transfusiones dentro del conjunto de pacientes fue nueve en los doce meses anteriores. El número promedio de unidades de transfusión usadas en los doce meses anteriores fue de treintaidós para el conjunto de pacientes.

Durante el periodo de cuatro semanas, cada uno de los 11 pacientes recibió 600 mg de infusión intravenosa de anticuerpos anti-C5 durante aproximadamente treinta minutos. El anticuerpo anti-C5 específico usado en el estudio fue eculizumab. Los pacientes recibieron 900 mg de eculizumab 1 semana más tarde después 900 mg cada dos semanas. Las primeras 12 semanas del estudio constituyeron el estudio piloto. Tras la finalización del estudio de doce semanas de la fase aguda inicial, todos los pacientes participaron en un estudio de extensión llevado a cabo a un total de 64 semanas. Diez de los once pacientes participaron en un estudio de extensión llevado a cabo a un total de dos años.

Se probó el efecto de tratamientos de anticuerpos anti-C5 en glóbulos rojos de tipo III ("RBC"). "Tipo de HPN" se refiere a la densidad de proteínas unidas a GPI expresadas en la superficie celular. Tipo I es expresión normal, tipo II es expresión intermedia y tipo III no tiene ninguna expresión de proteína de unión a GPI en la superficie celular. La proporción de células deficientes en GPI se determina por citometría de flujo en la manera descrita en Richards, y cols., Clin. Appl. Immunol. Rev., vol. 1, páginas 315-330, 2001. Según se comparan por condiciones pre-terapia, los glóbulos rojos de tipo III de HPN se incrementaron más del 50 % durante la extensión del estudio. El incremento de

un valor medio de glóbulos rojos de tipo III pre-estudio del 36,7 % de todos los glóbulos rojos a un valor medio de glóbulos rojos de tipo III del 58,4 % de todos los glóbulos rojos en 64 semanas indicó que la hemólisis había disminuido abruptamente. Véase Tabla 1, más adelante. La terapia de eculizumab protegió RBC de tipo III de HPN de lisis mediada por complemento, prolongando la supervivencia de las células. Esta protección de las células afectadas por HPN redujo la necesidad de transfusiones, redujo los paroxismos y redujo la hemólisis general en todos los pacientes en el ensayo.

Tabla 1

Poblaciones de células de HPN pre- y post-tratamiento con eculizumab en todos los pacientes

	Proporción de células de HPN (%)			
Tipo de células de HPN	línea base	12 semanas	64 semanas	valor de p[a]
RBC de tipo III	36,7 +/- 5,9	59,2 +/- 8,0	58,4 +/- 8,5	0,005
RBC de tipo II	5,3 +/- 1,4	7,5 +/- 2,1	13,2 +/- 2,4	0,013
WBC de tipo III	92,1 +/- 4,6	89,9 +/- 6,6	91,1 +/- 5,8	N.S.
Plaquetas de tipo III	92,4 +/- 2,4	93,3 +/- 2,8	92,8+/- 2,6	N.S.

[a]comparación de cambio promedio desde la línea base hasta 64 semanas

Durante el curso del estudio de extensión de dos años, se constató que glóbulos rojos de HPN con una deficiencia completa de proteínas unidas a GPI (glóbulos rojos de tipo III) se incrementaron progresivamente durante el periodo de tratamiento a partir de una media de 36,7 % hasta 58,9 % (p = 0,001) mientras que los glóbulos rojos deficientes en HPN (tipo II) se incrementaron desde el 5,3 % hasta el 8,7 % (p = 0,01). No hubo cambio concomitante en la proporción de neutrófilos de HPN en cualquiera de los pacientes durante la terapia de eculizumab, indicando que el incremento en la proporción de glóbulos rojos de HPN se debió a una reducción en hemólisis y transfusiones más que a un cambio en el/los clon(es) de HPN en sí mismo(s).

El efecto de tratamientos de anticuerpos anti-C5 sobre los niveles de lactato deshidrogenasa ("LDH") se midió en todos los once pacientes. LDH cataliza la interconversión de piruvato y lactato. Los glóbulos rojos metabolizan glucosa a lactato, que se libera en la sangre y se capta por el hígado. Los niveles de LDH se usan como un indicador objetivo de hemólisis. Los niveles de LDH se disminuyeron en más del 80 % según se comparan con los valores de pre-tratamiento. Los niveles de LDH se bajaron desde un valor medio de pre-estudio de 3111 u/l a un valor medio de 594 u/l durante el estudio piloto y un valor promedio de 622 u/l después de 64 semanas (p = 0,002 para comparación a 64 semanas; véanse las figuras 1A y 1B).

De forma similar, niveles de aspartato aminotransferasa (AST), otro marcador de hemólisis de glóbulos rojos, disminuyeron desde un valor de línea base promedio de 76 ui/ml a 26 ui/ml y 30 ui/ml durante las 12 y 64 semanas de tratamiento, respectivamente (p = 0,02 para comparación a 64 semanas). Los niveles de haptoglobina, hemoglobina y bilirrubina y los números de reticulocitos, no cambiaron significativamente desde los valores de pre-estudio durante el periodo de tratamiento de 64 semanas.

Las tasas de paroxismo se midieron y compararon con los niveles de pre-tratamiento. Paroxismo como se usa en esta revelación se define como incidencias de orina de color oscuro con un nivel colorimétrico de 6 o más en una escala de 1-10. La figura 2 muestra la escala de color de orina ideada para realizar seguimientos de la incidencia de paroxismos de hemoglobinuria en pacientes con HPN antes y durante el tratamiento. Según se compara con los niveles de pretratamiento, el porcentaje de paroxismos se redujo en un 93 % (véase, figura 3) desde 3,0 paroxismos por paciente por mes antes del tratamiento con eculizumab hasta 0,1 paroxismos por paciente por mes durante las 12 semanas iniciales y 0,2 paroxismos por paciente por mes durante el tratamiento de 64 semanas (figura 3 (p < 0,001)).

La actividad hemolítica sérica en nueve de los once pacientes se bloqueó completamente durante todo el periodo de tratamiento de 64 semanas con niveles valle de eculizumab en el equilibrio variando desde aproximadamente 35 µg/ml hasta 350 µg/ml. Durante el estudio de extensión, 2 pacientes no mantuvieron niveles de eculizumab necesarios para bloquear el complemento consistentemente. Esta interrupción en la actividad hemolítica sérica tuvo lugar en los últimos 2 días del intervalo de dosificación de 14 días, un patrón que se repitió entre dosis múltiples. En uno de los pacientes, como se ve en la figura 4, la interrupción del bloqueo del complemento dio como resultado hemoglobinuria, disfagia y LDH y AST incrementados, lo que correlaciona con el retorno de actividad hemolítica sérica. En la siguiente dosis, los síntomas se resolvieron (figura 5) y la reducción en el intervalo de dosis desde 900 mg cada 14 días hasta 900 mg cada 12 días dio como resultado una recuperación del control del complemento que

se mantuvo durante el estudio de extensión a 64 semanas en ambos pacientes. Este paciente mostró una resolución de 24 horas de disfagia y hemoglobinuria. Una reducción en el intervalo de dosificación de 14 a 12 días fue suficiente manteniendo los niveles de eculizumab por encima de 35 µg/ml y de manera eficaz y consistentemente bloqueó la actividad hemolítica sérica durante el resto del estudio de extensión para ambos pacientes.

La necesidad de transfusiones de los pacientes se redujo también por el tratamiento con eculizumab. La figura 6a compara el número de unidades de transfusión requerido por paciente por mes, antes y durante el tratamiento con un anticuerpo anti-C5 para los pacientes citopénicos, mientras que la figura 6b compara el número de unidades de transfusión requerido por paciente por mes, antes y durante el tratamiento con un anticuerpo anti-C5 para pacientes no citopénicos. Una reducción significativa en la necesidad de transfusión se observó también en todo el grupo (tasas de transfusión promedio disminuidas de 2,1 unidades por paciente durante un periodo de 1 año antes de tratamiento a 0,6 unidades por paciente por mes durante las 12 semanas iniciales y 0,5 unidades por paciente por mes durante el periodo de tratamiento de 64 semanas combinado), con pacientes no citopénicos siendo los que más se benefician. De hecho, cuatro de los pacientes no trombocitopénicos con recuentos de plaquetas normales (> 150.000 por microlitro) llegaron a ser independientes de transfusiones durante tratamiento de 64 semanas.

El efecto de eculizumab administrado en combinación con eritropoyetina (EPO) también se evaluó en un paciente trombocitopénico. Se administró EPO (NeoRecormon®, Roche Pharmaceuticals, Basel, Suiza) en una cantidad de 18.000 u.i., tres veces por semana, comenzando en la semana 23 del estudio. Como se muestra en la figura 7, la frecuencia de las transfusiones requeridas por este paciente se redujo significativamente y pronto se detuvo.

Durante el estudio de extensión de dos años, 10 de los 11 pacientes a partir del estudio inicial de 3 meses continuaron recibiendo 900 mg de eculizumab cada dos semanas. (Uno de los pacientes interrumpió la terapia con eculizumab después de 23 meses.) Seis de los 11 pacientes tenían un recuento de plaquetas normales (ninguna evidencia clínica de fallo de médula) mientras que 5 de los 11 tenían plaquetas bajas. Para el paciente que interrumpió la terapia con eculizumab después de 23 meses, se controló exitosamente la hemólisis intravascular por eculizumab, pero el paciente continuó transfundiéndose incluso después de la terapia con eritropoyetina. Este paciente tenía la hipoplasia más grave al comienzo de la terapia de eculizumab con un recuento de plaquetas por debajo de 30 x 10^9/l, sugiriendo que las transfusiones en curso son probablemente un resultado del fallo de médula ósea subyacente.

Los resultados del estudio de dos años de extensión demostraron también que hubo un decrecimiento estadísticamente significativo en requerimientos de transfusión para los pacientes. Tres pacientes permanecieron independientes de transfusiones durante el periodo de dos años completo y cuatro pacientes trombocitopénicos llegaron a ser independientes de transfusiones, tres tras el tratamiento con EPO (NeoRecormon®). Se encontró que la reducción en requerimientos de transfusión era más pronunciada en pacientes con una reserva medular buena.

Se midieron los niveles farmacodinámicos y se registraron de acuerdo con dosis de eculizumab. El análisis farmacodinámico de eculizumab se determinó midiendo la capacidad de las muestras de suero del paciente lisando eritrocitos de pollo en un ensayo hemolítico de complemento de suero humano total estándar. Brevemente, las muestras de paciente de suero control humano (Quidel, San Diego CA) se diluyeron al 40 % vol./vol. con solución salina tamponada con gelatina-veronal (GVB2+, Advanced Research technologies, San Diego, CA) y se añadieron por triplicado a una placa de 96 pocillos de tal forma que las concentraciones finales de suero en cada pocillo fueron del 20 %. La placa se incubó después a temperatura ambiente mientras se lavaron eritrocitos de pollo (Lampire Biologics, Malvern, PA). Los eritrocitos de pollo se sensibilizaron por la adición de anticuerpo policlonal anti-glóbulos rojos de pollo (al 0,1 % vol./vol.). Las células se lavaron y se resuspendieron en tampón GVB2+. Se añadieron eritrocitos de pollo (2,5 x 10^6 células/30 µl) a la placa conteniendo suero control humano o muestras de pacientes y se incubaron a 37 ºC durante 30 min. Cada placa contenía seis pocillos adicionales de eritrocitos de pollo preparados de forma idéntica de los que cuatro pocillos se incubaron con suero al 20 % que contenía EDTA 2 mM como el blanco y se incubaron dos pocillos con tampón de GVB2+ solo como un control negativo para hemólisis espontánea. La placa se centrifugó después y el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano nueva. La liberación de hemoglobina se determinó a D.O. 415 nm usando un lector de microplaca. La hemólisis porcentual se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Hemólisis porcentual} = 100 \times \frac{\text{(D.O. de muestra del paciente - D.O. del blanco)}}{\text{(D.O. de control de suero humano - D.O. del blanco)}}$$

La gráfica de las propiedades farmacodinámicas (figura 8), el estudio de los efectos fisiológicos, muestra el porcentaje de la actividad hemolítica sérica (es decir, el porcentaje de la lisis celular) a lo largo del tiempo. La lisis celular se redujo espectacularmente en la mayoría de los pacientes por debajo del 20 % de la actividad del complemento de suero normal mientras estuvieron en tratamiento con eculizumab. Dos pacientes mostraron una interrupción en la actividad del complemento, pero el bloqueo del complemento se restableció permanentemente reduciendo el intervalo de dosificación a 12 días (véase, figura 4).

La mejora de los temas de calidad de vida se evaluó también usando los cuestionarios ("QLC-C30 EORTC") de la European Organization for Research and Treatment of Cancer Core (http://www.eortc.be). Cada uno de los pacientes participantes completó el cuestionario QLC-30 antes y durante la terapia con eculizumab. En general, se observaron mejoras en el estado de salud global, funcionamiento físico, funcionamiento de rol, funcionamiento emocional, funcionamiento cognitivo, fatiga, dolor, disnea e insomnio. (Véase figura 9).

Los pacientes en el estudio de dos años experimentaron una reducción en síntomas adversos asociados con HPN. Por ejemplo, como se expone en la figura 10, hubo un decrecimiento demostrado de dolor abdominal, disfagia y disfunción eréctil después de administración de eculizumab en aquellos pacientes que notificaron aquellos síntomas antes de administración de eculizumab.

REIVINDICACIONES

1. Eculizumab para uso en el tratamiento de un paciente afectado con hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), en el que el eculizumab se va a administrar por vía intravenosa al paciente con la siguiente pauta de dosificación:

(i) 600 mg cada semana durante cuatro semanas;

(ii) 900 mg 1 semana más tarde;

(iii) 900 mg cada dos semanas; y posteriormente,

(iv) 900 mg cada 12 días,

en el que dicho paciente presenta una interrupción en la actividad hemolítica sérica cuando se trata con una pauta de dosificación de acuerdo con los puntos (i) a (iii).

2. Eculizumab para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el eculizumab se va a administrar en combinación con uno o más compuestos que aumentan la hematopoyesis.

3. Eculizumab para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichos uno o más compuestos que aumentan la hematopoyesis se seleccionan del grupo que consiste en: esteroides, inmunodepresores, anticoagulantes, ácido fólico, hierro, eritropoyetina, globulina antitimocítica y globulina antilinfocítica.

4. Eculizumab para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paciente se caracteriza por una o más características seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) la proporción de los glóbulos rojos de tipo III del recuento de glóbulos rojos total del paciente es mayor del 10%;

(b) la proporción de los glóbulos rojos de tipo III del contenido de glóbulos rojos total del paciente es mayor del 25%;

(c) la proporción de los glóbulos rojos de tipo III del contenido de glóbulos rojos total del paciente es mayor del 50%;

(d) el recuento de plaquetas del paciente es mayor de 40.000 por microlitro;

(e) el recuento de plaquetas del paciente es mayor de 75.000 por microlitro;

(f) el recuento de plaquetas del paciente es mayor de 150.000 por microlitro;

(g) el recuento de reticulocitos del paciente es mayor de 80 x 10^9 por litro;

(h) el recuento de reticulocitos del paciente es mayor de 120 x 10^9 por litro;

(i) el recuento de reticulocitos del paciente es mayor que 150 x 10^9 por litro;

(j) el paciente tiene un clon de granulocitos de tipo III mayor del 40%; y

(k) el paciente tiene un nivel de LDH mayor que o igual a 1,5 veces el límite superior de un nivel de LDH normal en una persona.

5. Uso de eculizumab en la preparación de un medicamento para tratar un paciente con hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), en el que el eculizumab se va a administrar por vía intravenosa al paciente con la siguiente pauta de dosificación:

(i) 600 mg cada semana durante cuatro semanas;

(ii) 900 mg 1 semana más tarde;

(iii) 900 mg cada dos semanas; y posteriormente,

(iv) 900 mg cada 12 días,

en el que dicho paciente presenta una interrupción en la actividad hemolítica sérica cuando se trata con una pauta de dosificación de acuerdo con los puntos (i) a (iii).

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el eculizumab se va a administrar en combinación con uno o más compuestos que aumentan la hematopoyesis.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichos uno o más compuestos que aumentan la

hematopoyesis se seleccionan del grupo que consiste en: esteroides, inmunodepresores, anticoagulantes, ácido fólico, hierro, eritropoyetina, globulina antitimocítica y globulina antilinfocítica.

8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el paciente se caracteriza por una o más características seleccionadas del grupo que consiste en:

(l) la proporción de los glóbulos rojos de tipo III del recuento de glóbulos rojos total del paciente es mayor del 10 %;

(m) la proporción de los glóbulos rojos de tipo III del contenido de glóbulos rojos total del paciente es mayor del 25 %;

(n) la proporción de los glóbulos rojos de tipo III del contenido de glóbulos rojos total del paciente es mayor del 50 %;

(o) el recuento de plaquetas del paciente es mayor de 40.000 por microlitro;

(p) el recuento de plaquetas del paciente es mayor de 75.000 por microlitro;

(q) el recuento de plaquetas del paciente es mayor de 150.000 por microlitro;

(r) el recuento de reticulocitos del paciente es mayor de 80 x 10^9 por litro;

(s) el recuento de reticulocitos del paciente es mayor de 120 x 10^9 por litro;

(t) el recuento de reticulocitos del paciente es mayor de 150 x 10^9 por litro;

(u) el paciente tiene un clon de granulocitos de tipo III mayor del 40 %; y

(v) el paciente tiene un nivel de LDH mayor que o igual a 1,5 veces el límite superior de un nivel de LDH normal en una persona.

Figura 1A.

Parámetros Bioquímicos de Hemólisis Durante el Tratamiento con Eculizumab

Marcadores Bioquímicos	**Intervalo normal**	**Tiempo de Análisis**			**valor de p[a]**
		Pre-estudio[b]	**12 semanas**	**64 semanas**	
LDH (ui/l)	150-480	3110,7 +/- 598,4	594,0 +/- 31,7	622,4 +/- 41,1	0,002
AST (ui/l)	10-40	76,2 +/-16,0	26,2 +/- 2,3	30,1 +/- 3,2	0,02
Haptoglobina (g/l)	0,5-2	< 0,06	< 0,06	0,14 +/- 0,07°	N.S.[d]
Hemoglobina (g/dl)	11,5-18	10,0 +/- 0,4	10,3 +/- 0,4	10,4 +/- 0,4	N.S.
Bilirrubina	3-15	25,9 +/- 4,3	28,2 +/- 4,4	28,7 +/- 4,0	N.S.
Reticulocitos (x $10^{-3}/mm^3$)	20-80	161,4 +/- 25,9	191,2 +/- 23,6	189,6 +/- 21,8	N.S.

[a]a partir de comparaciones de cambio promedio desde pre-estudio hasta 64 semanas

[b]los valores representan promedios durante periodo de 52 semanas antes del tratamiento salvo para AST que representa el promedio de línea base

[c]10 de 11 pacientes estaban por debajo del límite detectable de haptoglobina (< 0,06 g/l); 1 paciente tenía un valor de 0,69 g/l.

[d]no significativo

ES 2 389 093 T3

Figura 1b

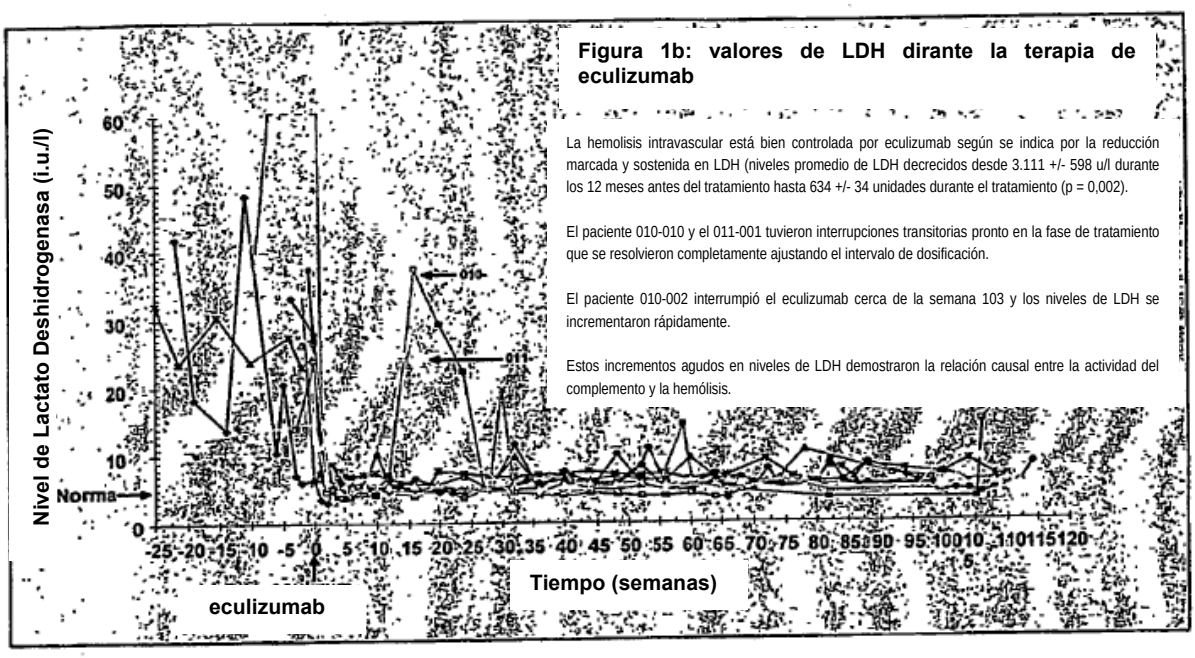


Figura 1b: valores de LDH dirante la terapia de eculizumab

La hemolisis intravascular está bien controlada por eculizumab según se indica por la reducción marcada y sostenida en LDH (niveles promedio de LDH decrecidos desde 3.111 +/- 598 u/l durante los 12 meses antes del tratamiento hasta 634 +/- 34 unidades durante el tratamiento (p = 0,002).

El paciente 010-010 y el 011-001 tuvieron interrupciones transitorias pronto en la fase de tratamiento que se resolvieron completamente ajustando el intervalo de dosificación.

El paciente 010-002 interrumpió el eculizumab cerca de la semana 103 y los niveles de LDH se incrementaron rápidamente.

Estos incrementos agudos en niveles de LDH demostraron la relación causal entre la actividad del complemento y la hemólisis.

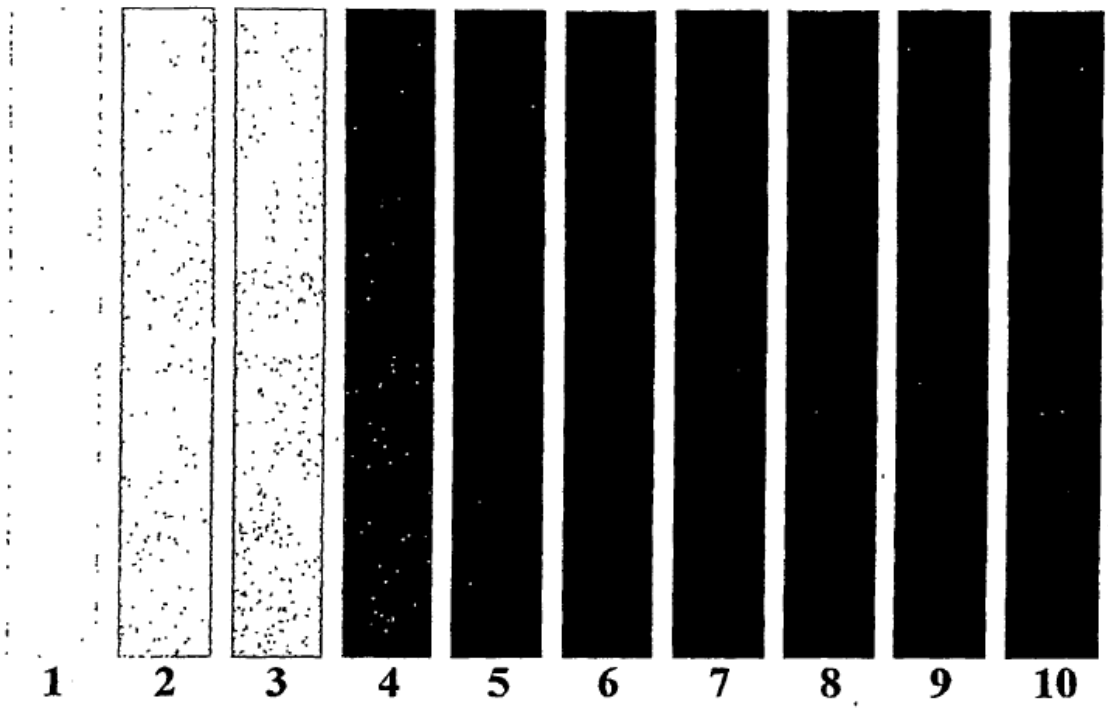
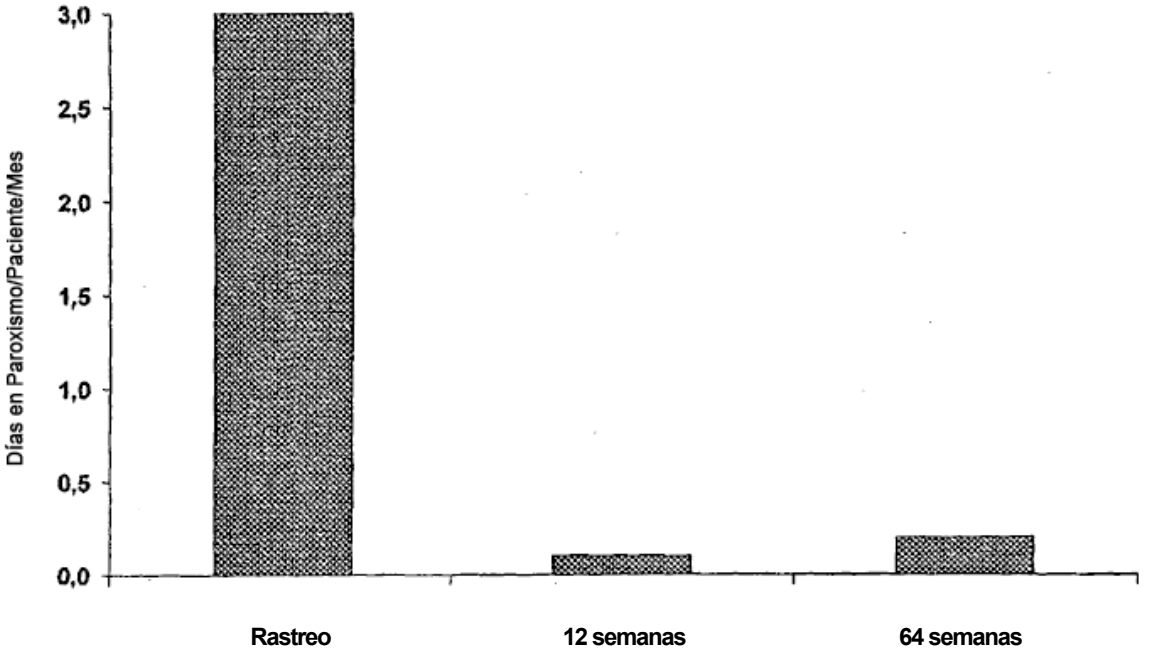


Figura 2

Figura 3.

Efecto de Eculizumab en Tasa de Paroxismos (n = 8)



Las barras representan las tasas de paroxismo (número de paroxismos por paciente por mes) durante el período de rastreo (pre-tratamiento con eculizumab), y durante las primeras 12 semanas y las 64 semanas completas de tratamiento con eculizumab. Tres pacientes no se incluyeron en el análisis ya que bien los valores de orina de pretratamiento no se recogieron inadvertidamente (2 pacientes) o bien un agente quelante de hierro que dio como resultado orina coloreada artificialmente se administró durante el estudio de extensión (1 paciente).

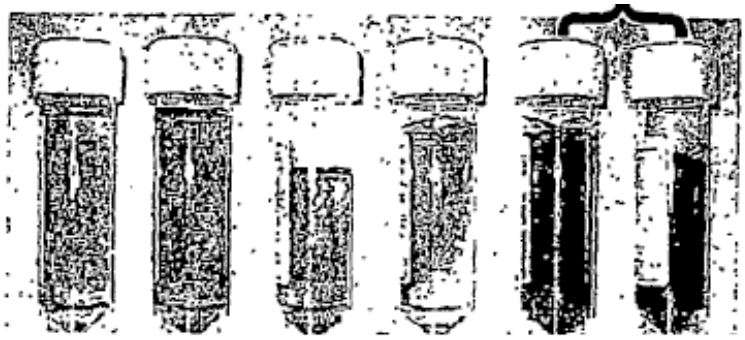
Figura 4.

Análisis de la Interrupción del Complemento

hemoglobinuria

disfagia

Primera Orina de la Mañana



Visita	4							5			9
Día	0*	1-8	9	10	11	12	13	0*	1-2		0*
Orina	10	2-3	3	3	3	3	9	10	3		2
LDH	2624	-	784	—	-	697	1687	2917	—		495
AST	119	-	38	—	-	31	87	—,	—		—
PK	28	-	51	—	-	35	31	23	—		51
PD	72	-	1	—	-	2	56	56	-		2

*Dosis de eculizumab

Fig. 5. Calidad de Orina del Paciente 010-010 frente al Tiempo

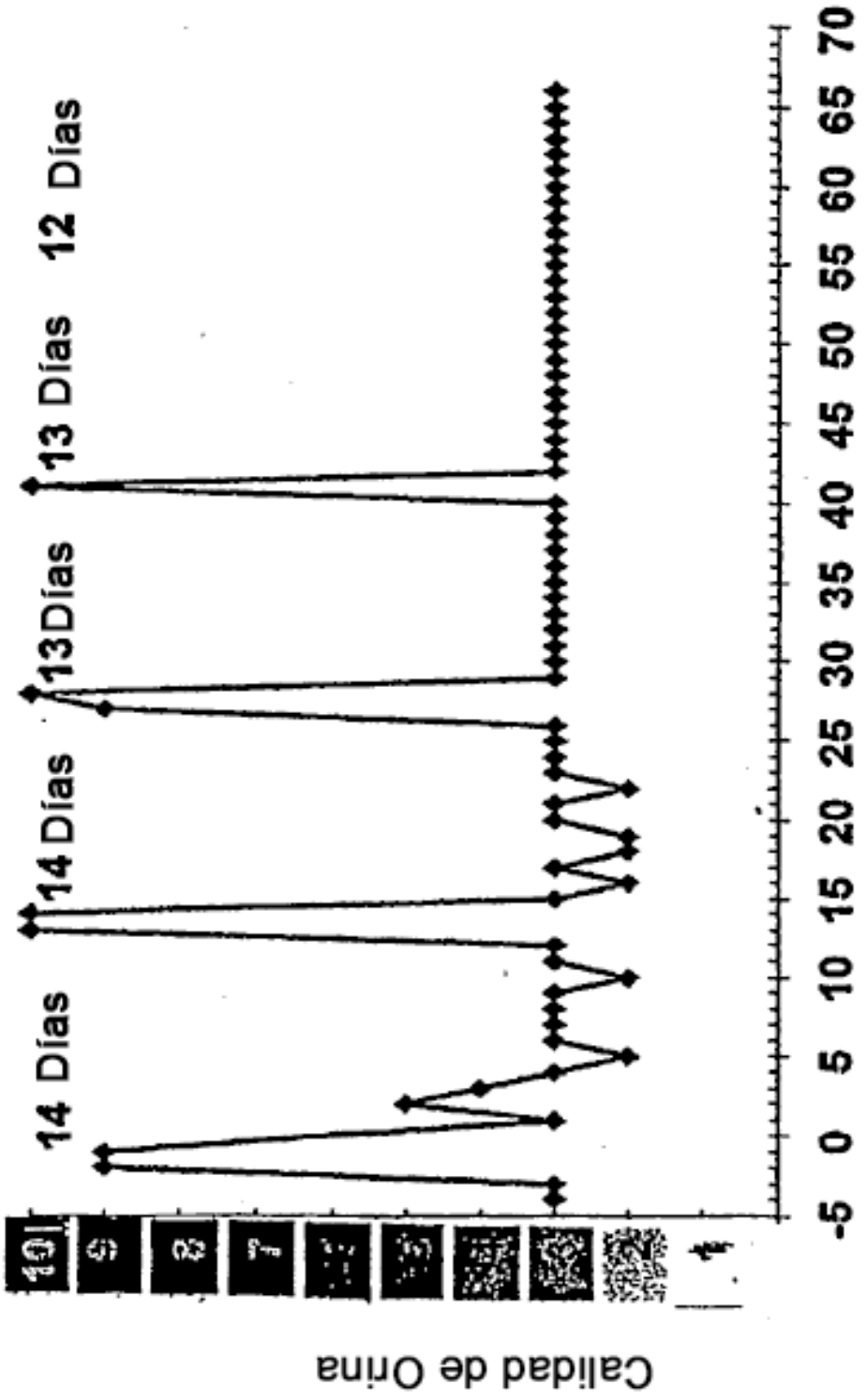
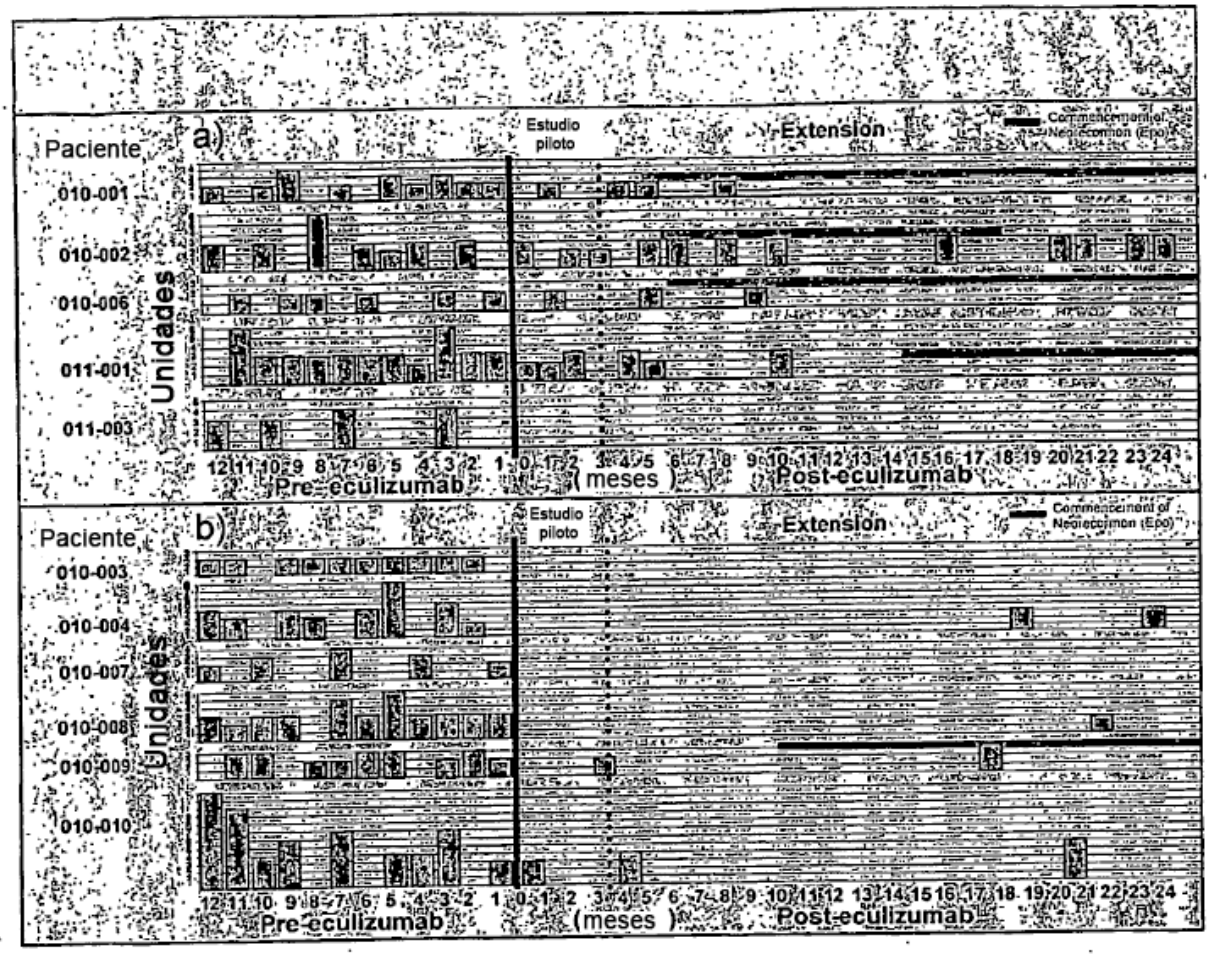


Figura 6.

Unidades Transfundidas Pre- y Post-Eculizumab en (a) Pacientes Citopénicos y (b) Pacientes No Citopénicos



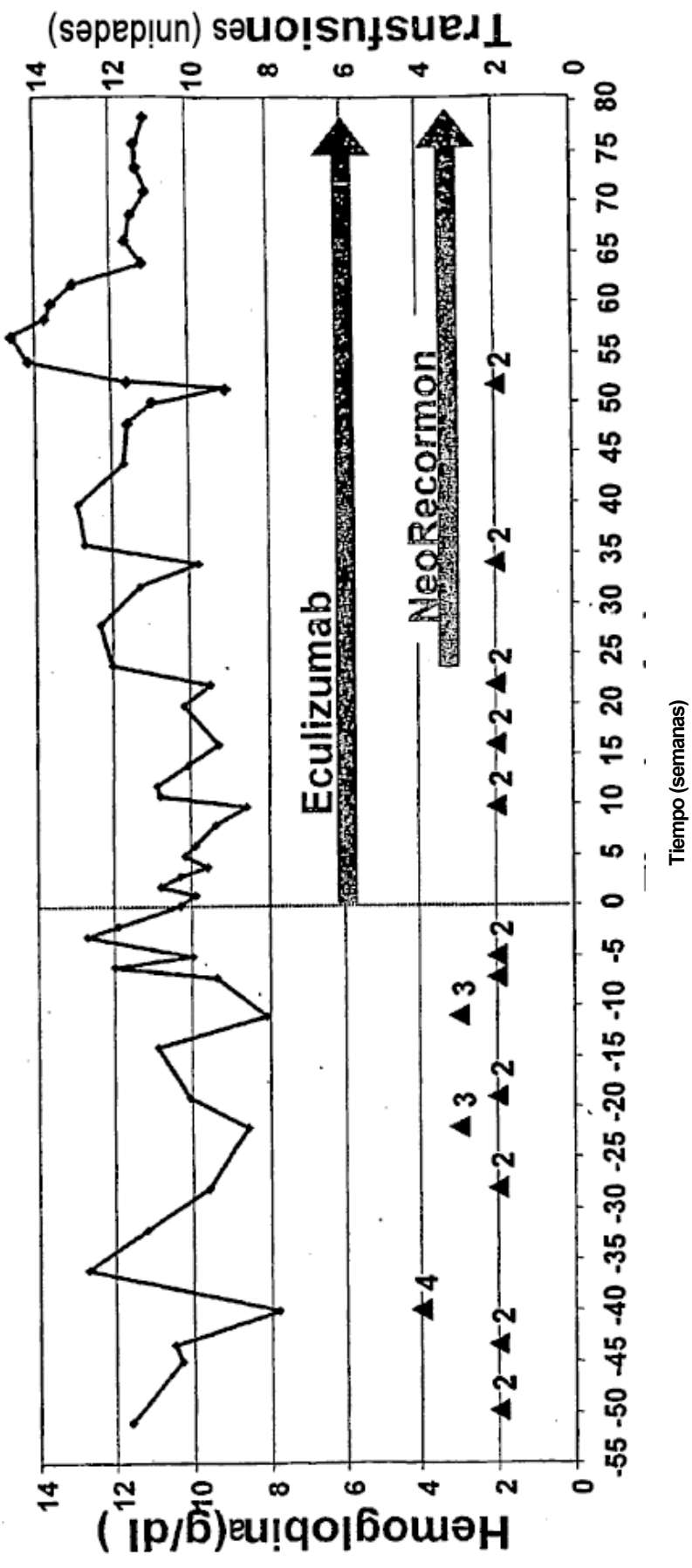
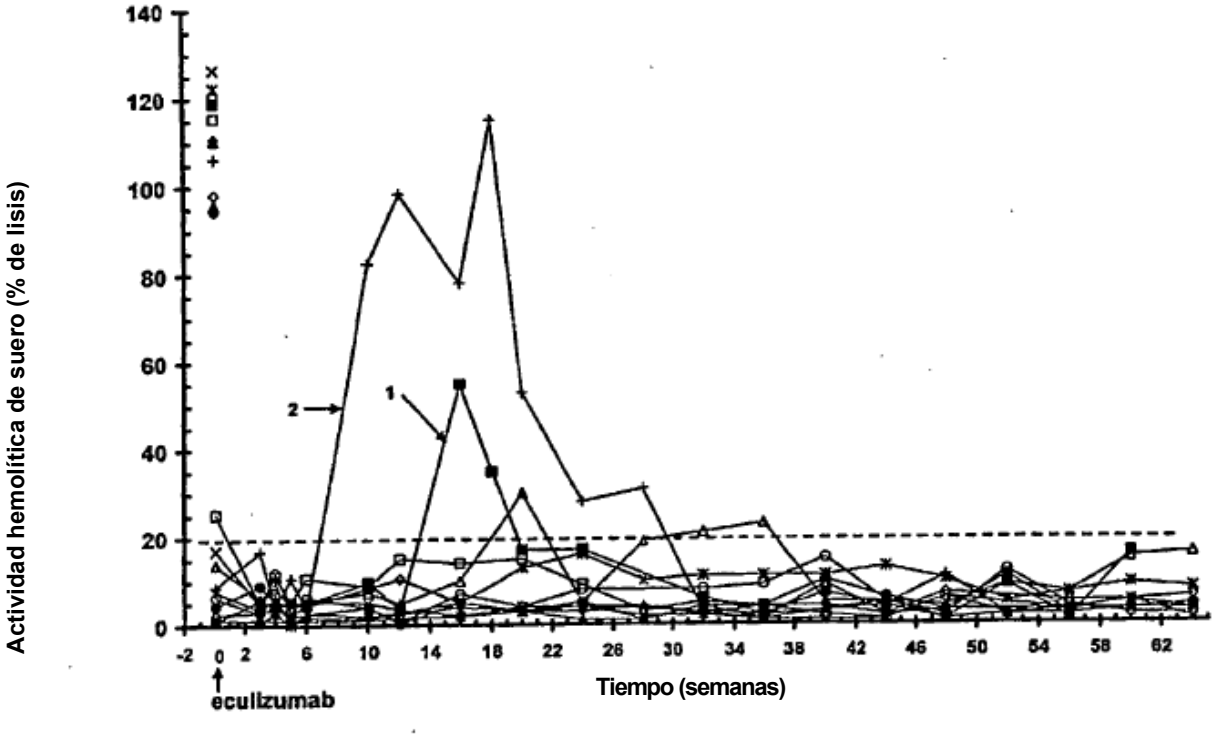


Figura 7 Gestión de paciente trombocitopénico con eritropoyetina Paciente 010-001 (hipoplásico; 80 a 100 x 10^9 plaquetas/l)

Transfusiones reducidas con eculizumab e independencia de transfusiones con eculizumab y eritropoyetina combinadas (NeoRecormon 18.000 U 3x/semana)

Figure 8.

Propiedades Farmacodinámicas de Eculizumab Pre- y Post-dosis



La figura 8 muestra actividad sérica hemolítica (PD) durante el periodo de tratamiento de 64 semanas como se determina por la capacidad del suero para lisar eritrocitos de pollo presensibilizados por anticuerpos. El porcentaje de actividad hemolítica al que se considera que el complemento está inhibido efectivamente (≤ 20 %) se indica por la línea discontinua. Se identificaron dos pacientes que demostraron valores de actividad hemolítica de suero valle menores del 20 % (pacientes 1 y 2).

Figura 9.

Propiedades Farmacodinámicas de Eculizumab Pre- y Post-dosis

Dominio (a)	Puntuación de Línea Base Promedio (b)	Cambio de 64 Semanas desde Línea Base (c)	valor p (d)
Estado de Salud Global	56,1	13,8	0,009
Funcionamiento Físico	70,9	14,3	< 0,001
Funcionamiento Emocional	70,5	12,5	< 0,001
Funcionamiento de Rol	66,7	14,5	0,003
Funcionamiento Cognitivo	77,3	10,3	0,001
Fatiga	47,5	-17,8	< 0,001
Disnea	39,4	-16,6	0,002
Insomnio	30,3	-8,2	0,031
Dolor	21,2	-8,2	0,023
Estreñimiento	3,0	4,1	< 0,001

a) la calidad de vida se valoró usando el instrumento QLQ-C30 de la European Organization for Research and Treatment of Cancer

b) los números representan valores promedio de puntuaciones transformadas linealmente

c) los valores representan promedios de mínimos cuadrados; cambio positivo indica mejora para el Estado de Salud Global y las Escalas Funcionales, mientras que un cambio negativo indica incrementos para Escalas de Síntomas

d) los valores son de un modelo de análisis de covarianza mixto con visita como un efecto fijado, paciente como un efecto al azar y valor de línea base como una covariable

Figura 10.

Síntomas Pre- y 2 Años Post-Eculizumab

Paciente	Pre-Eculizumab			Post-Eculizumab		
	Dolor Abdominal.	Disfagia	Disfunción Eréctil	Dolor Abdominal.	Disfagia	Disfunción Eréctil
010-001	Cada 4 - 8 semanas	Cada 4 - 8 semanas	Cada 4 - 8 semanas	Ninguno	Ninguno	Ninguno
010-002	Ninguno	Ninguno	□	Ninguno	Ninguno	
010-003	Cada semana	Cada semana	Cada semana	Ninguno	Ninguno	Ninguno
010-004	Cada 4 - 6 semanas	Ninguno	—	Ninguno	Ninguno	••
010-006	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
010-007	Ninguno V	Al menos cada 4 semanas		Ninguno -	Ninguno	
010-008	Ninguno	Cada 10 semanas	Cada 10 semanas	Ninguno	Ninguno	Intermitente
010-009	Ninguno	Ninguno	Ninguno 1	Ninguno » •	Ninguno	Ninguno
010-010	Cada 4 semanas	Cada 4 semanas	Ninguno	Ninguno	2 2 episodios en 2 años*	Ninguno
011-001	Ninguno	Ninguno	—	Ninguno	Ninguno	—
011-003	Ninguno	Ninguno	—	Ninguno	Ninguno	—

*** Este paciente experimentó una interrupción transitoria en el bloqueo del complemento con un retorno de hemólisis y síntomas. Incrementar la frecuencia de dosificación a 12 días re-estableció el bloqueo del complemento completo y evitó síntomas adicionales.**