



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103977403 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 13

(21) 申请号 201410147935. 2

(22) 申请日 2005. 02. 03

(30) 优先权数据

10/771, 552 2004. 02. 03 US

(62) 分案原申请数据

200580010631. 0 2005. 02. 03

(71) 申请人 阿莱克申药物公司

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 L·贝尔 R·P·罗特尔

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限

公司 11322

代理人 龙淳 李巍

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

A61K 45/00(2006. 01)

A61P 7/06(2006. 01)

A61P 7/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书14页 附图10页

(54) 发明名称

治疗溶血性疾病的方法

(57) 摘要

使用结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物, 例如抑制补体的抗体, 来治疗阵发性睡眠性血红蛋白血症或其它溶血性疾病。

1. eculizumab 在制备用于治疗与补体活性突破有关的血红蛋白尿的药物中的用途,其中所述药物包括三个制剂:第一制剂,包括4个周剂量为600mg的 eculizumab 制剂;第二制剂,包括1个周剂量为900mg的 eculizumab 制剂;第三制剂,包括1-59个每12天剂量为900mg的 eculizumab 制剂。

治疗溶血性疾病的方法

[0001] 本申请是 2005 年 2 月 3 日提交的申请号为 CN200580010631.0、名称为“治疗溶血性疾病的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求美国专利申请系列号 10/771,552 的优先权,并且本申请是其连续的部分,美国专利申请系列号 10/771,552 是 2004 年 2 月 3 日申请的,该专利全部公开内容在文中引用作为参考。

[0004] 背景

技术领域

[0005] 本公开涉及通过施用结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物来治疗溶血性疾病如阵发性睡眠性血红蛋白血症 (“PNH”) 的方法。

[0006] 相关领域的背景

[0007] 阵发性睡眠性血红蛋白血症 (“PNH”) 是一种罕见的血液疾病,其累及红细胞,因此与正常红细胞相比红细胞的破坏更快。PNH 由导致异常血细胞产生的骨髓细胞突变引起。更明确地说, PNH 是产生不同种群成熟血细胞的造血干细胞的疾病。该疾病的基础是导致不能合成糖基磷脂酰肌醇 (“GPI”) 锚的体细胞突变,其中糖基磷脂酰肌醇锚负责将蛋白质结合至细胞膜。所突变基因 PIG-A (A 型磷脂酰肌醇聚糖) 位于 X 染色体并且可能具有从缺失突变到点突变的几种不同的突变。

[0008] PNH 引起对补体蛋白质的敏感性并且该种敏感性在细胞膜上发生。PNH 细胞缺乏大量蛋白质,特别是必需的补体调节表面蛋白质。这些调节补体的表面蛋白质包括衰变加速因子 (“DAF”) 或 CD55 和膜反应性溶解抑制物 (“MIRL”) 或 CD59。

[0009] PNH 的特征为溶血性贫血 (红细胞数量减少)、血红蛋白尿 (在尿中存在血红蛋白,睡眠后特别明显) 和血红蛋白血症 (血液中存在血红蛋白)。患有 PNH 的个体为阵发,在这里定义为黑尿发生率。溶血性贫血归因于补体成分对红细胞的血管内破坏。其它已知的症状包括吞咽困难、疲劳、勃起功能障碍、血栓形成和复发性腹痛。

[0010] 由溶血性疾病引起的溶血通过游离血红蛋白的释放引起局部和全身一氧化氮 (NO) 缺乏。游离血红蛋白是非常有效的 NO 清除剂,这部分地因为非红细胞腔室内的 NO 的可接近性和血红素部分对 NO 的亲合力比氧大 10^6 倍。血管内溶血作用的发生通常产生足够的游离血红蛋白直至完全耗尽触珠蛋白。一旦超出了这种清除血红蛋白的蛋白质的能力,接着就会发生内源性 NO 的消耗。例如,在血管内溶血作用例如 PNH 的情况下, LDH 水平可以容易地超过其正常水平的 2-3 倍,游离血红蛋白将有可能达到 0.8-1.6g/l 的浓度。由于取决于触珠蛋白的同种异型体,触珠蛋白有可能仅结合大约 0.7-1.5g/l 的血红蛋白,所以将产生大量过量的游离血红蛋白。一旦超过了肾近端小管对血红蛋白重吸收的能力,接着将发生血红蛋白尿。血管内溶血作用过程中游离血红蛋白的释放导致 NO 过渡消耗,随后伴随增强的平滑肌收缩、血管收缩和血小板激活和聚集。与血红蛋白清除 NO 相关的 PNH 相关

病状包括腹部疼痛、勃起功能障碍、食管痉挛和血栓形成。

[0011] 溶血作用的实验室评价通常包括血液学、血清学和尿检验。血液学检验包括观察 RBC 形态异常的血涂片检查（以确定起因）以及对全血网织红细胞进行计数测量（以确定对 RBC 损失的骨髓补偿）。血清学检验包括检测乳酸脱氢酶（LDH；广泛进行检测）以及作为溶血作用的直接量度的游离血红蛋白（不广泛进行检测）。在其它器官中缺乏组织损伤情况下，LDH 水平能够用于诊断和监测患有溶血的患者。其它血清学检验包括胆红素或触珠蛋白，分别作为降解产物或清除储备的测量指标。尿检验包括胆红素、血铁黄素和游离血红蛋白，并且通常用于测量溶血作用的总体严重性，并且通常用于检测与溶血作用血管外病因学相对的血管内的分化，而不是常规监测溶血作用。另外，通常检测 RBC 数量、RBC（即细胞结合的）血红蛋白和血细胞比容以确定任何伴随性贫血的程度，而不是作为溶血活性本身的量度。

[0012] 尽管长期使用类固醇治疗会带来许多反面的副作用，但是类固醇已经被用于溶血性疾病的治疗并且可以在一些患者中有效地抑制溶血作用，尽管长期使用类固醇疗法会带来许多反面的副作用。受累患者可能需要输血，但输血具有感染的危险。可能还需要抗凝血治疗以防止血栓形成。已知骨髓移植可以治疗 PNH，然而，相匹配的骨髓通常极难找到并且此种治疗的死亡率高。

[0013] 提供能够安全可靠地消除和 / 或限制溶血性疾病如 PNH 及其影响的治疗将是有益的。

[0014] 发明概述

[0015] 根据本公开，使用结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物治疗阵发性睡眠性血红蛋白血症（“PNH”）或其它溶血性疾病。适宜化合物包括例如结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的抗体，如对补体成分 C5 特异的抗体。在特别有用的实施方案中，化合物是选自 h5G1.1-mAb(eculizumab)、h5G1.1-scFv(pexelizumab) 和 h5G1.1 的其它功能片段的抗 C5 抗体。已经惊奇地发现本方法可以在施用化合物 24 小时内使 PNH 患者得到改善。例如，如通过血红蛋白尿消退所指示，施用化合物 24 小时内溶血作用显著降低。

[0016] 抑制补体的化合物可以预防性施用于已知患有溶血性疾病的个体，以防止或有助于防止症状的出现。备选地，抑制补体的化合物可以作为一种治疗方案施用于已出现溶血性疾病症状的个体。

[0017] 另一方面，考虑了增加患有溶血性疾病的患者中补体敏感性 III 型红细胞的比例并因此增加红细胞总数的方法。本方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物施用于患有溶血性疾病的患者。通过增加 III 型红细胞数，可以减轻患有溶血性疾病的患者的症状，诸如疲劳和贫血。

[0018] 还在另一方面，本公开考虑了通过将化合物施用于受试者而使得患有溶血性疾病的受试者较少依赖于输血或者不依赖于输血，化合物选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物。已经令人惊讶地发现，根据本方法可以使患者不依赖于输血。意想不到的，在一些实施方案中输血不依赖性能够维持 12 个月或更长时间，长度超过了红细胞的 120 天生活周期。在其它实施方案中，输血不依赖性能够维持两年或更长。考虑到红细胞的长半寿期，为

了评价输血不依赖性需要治疗 6 个月或更长时间。

[0019] 在另一方面,本公开考虑了通过将化合物施用于受试者来治疗受试者体内一氧化氮 (NO) 失调的方法,化合物选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物。通过减少红细胞的溶解,本方法降低血液中游离血红蛋白的量,从而增加血清一氧化氮 (NO) 水平。在特别有用的实施方案中,NO 体内稳态得到恢复,其中归 NO 缺乏所致的症状消除。

[0020] 在另一方面,本公开考虑了通过将化合物施用于受试者来治疗受试者体内血栓形成的方法,化合物选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物。

[0021] 在另一方面,本公开考虑了通过将化合物施用于受试者而治疗患有溶血性疾病受试者的疲劳的方法,化合物选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物。

[0022] 在另一方面,本公开考虑了通过将化合物施用于受试者而治疗患有溶血性疾病受试者的勃起功能障碍的方法,化合物选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物。

[0023] 在另一方面,本公开考虑了通过将化合物施用于受试者而治疗患有溶血性疾病受试者的腹痛的方法,化合物选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物。

[0024] 还在在另一方面,本公开考虑了通过施用如下化合物治疗患有溶血性疾病的受试者的方法,所述施用即组合施用 1) 一种或多种已知增加血细胞生成的化合物(例如,或者通过加速产生、消除干细胞破坏或者消除干细胞抑制)与 2) 选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物的化合物。已知增加血细胞生成的适宜化合物包括,例如类固醇、免疫抑制剂(如环孢菌素)、抗凝剂(如华法林)、叶酸、铁等、促红细胞生成素(EPO)和抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、抗淋巴细胞球蛋白(ALG)、EPO 衍生物和达依泊汀 α (以 **Aranesp**[®] 商业性获得于 Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA (**Aranesp**[®] 是人造形式的 EPO,通过重组 DNA 技术在中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中产生))。在特别有用的实施方案中,促红细胞生成素(EPO)(已知增加血细胞生成的化合物)、EPO 衍生物或达依泊汀 α 可以与选自 h5G1.1-mAb、h5G1.1-scFv 和 h5G1.1 的其它功能片段的抗 C5 抗体组合施用。

[0025] 还在另一方面,本公开考虑了通过施用选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物的化合物来治疗受试者溶血性疾病的一种或多种症状的方法,其中受试者在治疗之前或治疗期间总的红细胞含量中 III 型红细胞的比列大于 10%,所述化合物可单独施用或与已知增加血细胞生成的一种或多种化合物如 EPO、EPO 衍生物或达依泊汀 α 组合施用。

[0026] 还在另一方面,本公开考虑了通过施用选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物的化合物,治疗血小板计数超过每毫升 40,000 个的受试者中溶血性疾病的一种或多种症状的方法,所述化合物可单独施用或与已知增加血细胞生成的一种或多种化合物如 EPO、EPO

衍生物或达依泊汀 α 组合施用。

[0027] 还在另一方面,本公开考虑了通过施用选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物的化合物,治疗网织红细胞计数超过 80×10^9 /升的受试者中溶血性疾病的一种或多种症状的方法,所述化合物可单独施用或与已知增加血细胞生成的一种或多种化合物如 EPO、EPO 衍生物或达依泊汀 α 组合施用。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1A 报道了在使用抗 C5 抗体治疗 PNH 患者期间所测量的溶血作用的生物化学参数。

[0030] 图 1B 图解描述使用抗 C5 抗体治疗对乳酸脱氢酶 (LDH) 水平的影响。

[0031] 图 2 显示了设计用于检测 PNH 患者血红蛋白尿阵发发生的尿色度。

[0032] 图 3 是与治疗前阵发率相比,eculizumab 治疗对患者阵发率的影响的图表。

[0033] 图 4 显示 PNH 患者的尿样和血红蛋白尿、吞咽困难、LDH、AST、药物代谢动力学 (PK) 和药效动力学 (PD) 的测量,反映了本方法对适宜完全阻断补体的溶血作用、症状和药效动力学的即时影响和肯定影响。

[0034] 图 5 图解描述抗 C5 抗体剂量方案随着时间对血红蛋白尿的影响。

[0035] 图 6a 和 6b 是比较使用抗 C5 抗体治疗之前或治疗期间每个患者每个月需要的输血单位数量的图表:图 6a 为血细胞减少症患者;图 6b 为非血细胞减少症患者。

[0036] 图 7 显示通过施用抗 C5 抗体和促红细胞生成素 (EPO) 对血小板减少患者的治疗。

[0037] 图 8 图解描述抗 C5 抗体的药效动力学。

[0038] 图 9 是抗 C5 治疗法期间完成的寻访生活质量问题的欧洲癌症治疗研究组织调查表 (“EORTC QLC-C30”) 的结果图表。

[0039] 图 10 是描绘抗 C5 抗体治疗对与 PNH 相关的不良症状的影响。

[0040] 发明详述

[0041] 本公开涉及在哺乳动物中治疗阵发性睡眠性血红蛋白血症 (“PNH”) 和其它溶血性疾病的方法。具体而言,文中所描述的治疗溶血性疾病的方法包括使用结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物。已经发现本方法提供了令人惊奇的结果。例如,一旦施用结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物,溶血作用迅速停止,同时治疗后血红蛋白尿显著降低。同样,溶血的患者能够获得对输血更少依赖或不依赖于输血达到延长的阶段 (12 个月或更长),适当超过了红细胞 120 天的生命周期。此外,在红细胞溶解的其它机制中 (非补体介导的和 / 或早期补体成分介导的例如 Cb3), III 型红细胞数可以急剧增加。令人惊奇的结果的另一个例子是症状消退,表明甚至在存在其它红细胞溶解机制的情况下血清 NO 水平增加也足够高。文中报道的这些结果和其它结果是出乎意料的,并且不能从溶血性疾病的现有治疗进行预测。

[0042] 结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物能够用于本方法。特别有用的特定类别的此类化合物包括人补体成分的特异性抗体,特别是抗 C5 抗体。抗 C5 抗体抑制补体级联反应并最终通过补体蛋白质复合物 C5b-9 阻止红细胞 (“RBC”) 溶解。通过抑制和 / 或减少 RBC 溶解,PNH 和其它溶血性疾病的影响 (包

括诸如血红蛋白尿、贫血、血红蛋白血症、吞咽困难、疲劳、勃起功能障碍、复发性腹痛和血栓形成的症状) 得到消除或减轻。

[0043] 在另一个实施方案中,可溶形式的蛋白质 CD55 和 CD59 能够单独或彼此组合施用于受试者以便抑制其替代途径中的补体级联反应。CD55 在 C3 水平进行抑制,从而阻止级联反应的进一步进行。CD59 阻止 C5b-8 复合物与 C9 结合形成膜攻击复合物(见下面论述)。

[0044] 补体系统与机体的其它免疫系统相联合以便防御细菌和病毒病原体的侵入。至少有 25 种蛋白质参与补体级联反应,它们作为血浆蛋白质和膜辅因子的复合物集合。补体成分通过在一系列错综复杂但精确的酶切割和膜结合事件中相互作用实现其免疫防御功能。所产生的补体级联反应导致产生具有调理、免疫调节和溶解功能的产物。例如,在 The Merck Manual, 第 16 版中提供了与补体活化作用相关的生物学活性的简要概述。

[0045] 补体级联过程经由经典途径、替代途径或凝集素途径进行。这些途径共用许多成分,并且虽然它们的起始步骤不同,但它们会合于并共享负责靶细胞活化和破坏的同一“末端补体”成分(C5 至 C9)。经典补体途径一般是通过抗体识别并结合至靶细胞上的抗原位点而起始的。替代途径通常是抗体不依赖性的,并且能够通过病原体表面上的特定分子起始。另外,凝集素途径一般由甘露糖结合凝集素(“MBL”)结合至高甘露糖底物进行起始。这些途径汇聚于一点,在这里补体成分 C3 由活性蛋白酶溶解产生 C3a 和 C3b。

[0046] C3a 是过敏毒素(见下面论述)。C3b 除了结合某些病毒和免疫复合物之外还结合细菌或其它细胞,并且标记它们以便从循环中去除。(该种作用中的 C3b 已知为调理素)。C3b 的调理功能通常被认为是补体系统最重要的抗感染作用。患有阻断 C3b 功能基因损害的患者易于受到广泛多种病原生物体的感染,而患有补体级联反应顺序较后事件损害的患者,即患有阻断 C5 功能的损害的患者仅更加倾向于奈瑟菌属(*Neisseria*) 感染,并且然后仅多少有点更容易感染(Fearon, Intensive Review of Internal Medicine, 第 2 版, Fanta 和 Minaker 编著, Brigham and Women's and Beth Israel Hospitals, 1983)。

[0047] C3b 还与每条途径中独特的其它成分形成复合物以便形成经典的或替代的 C5 转变酶,该酶溶解 C5 形成 C5a 和 C5b。因此 C3 被认为是补体反应连续事件中的中心蛋白质,因为其对于全部三种活化途径都是必需的(Wurzner 等人, Complement Inflamm, 8:328-340, 1991)。C3b 的该种特性受到血清蛋白酶因子 I 的调节,血清蛋白酶因子 I 作用于 C3b 产生 iC3b(失活的 C3b)。虽然 iC3b 仍然行使调理素的功能,但其不能形成活性 C5 转变酶。

[0048] pro-C5 前体在氨基酸 655 和 659 之后切割,产生作为氨基末端片段的 β 链(序列的氨基酸残基 +1 - 655) 和作为羧基末端片段的 α 链(序列的氨基酸残基 660 - 1658), 两者之间缺失 4 个氨基酸(序列的氨基酸残基 656-659)。C5 是糖基化的,其质量的大约 1.5-3% 属于糖类。成熟 C5 是通过二硫键连接的 999 个氨基酸的 115kDa α 链和 655 个氨基酸的 75kDa β 链的异源二聚体。C5 的正常血清浓度为大约 75 μ g/ml (0.4 μ M)。C5 作为单拷贝基因的单链前体蛋白质产物而合成(Haviland 等人, J. Immunol. 1991, 146:362-368)。经预测该基因转录物的 cDNA 序列编码 1658 个氨基酸的分泌的 pro-C5 前体和 18 个氨基酸的前导序列(见美国专利 6,355,245)。

[0049] C5 溶解释放 C5a, 其为有效的过敏毒素和趋化因子,并且导致溶解末端补体复合物 C5b-9 的形成。C5a 是通过替代的或经典的 C5 转变酶从 C5 的 α 链溶解形成的氨基末端

片段,包含 α 链最开始的 74 个氨基酸(即,序列的氨基酸残基 660-733)。C5a 的 11kDa 质量的大约 20%属于糖类。转变酶作用的溶解位点位于或者紧邻序列的氨基酸残基 733。在该溶解位点或与该溶解位点相邻的位点结合的化合物将具有阻断 C5 转变酶进入溶解位点的潜能并且因此可作为补体抑制剂起作用。

[0050] C5b 与 C6、C7 和 C8 结合在靶细胞表面形成 C5b-8 复合物。一旦结合几种 C9 分子,则形成膜攻击复合物(“MAC”, C5b-9,末端补体复合物--TCC)。当足够数量的 MAC 插入到靶细胞膜时,它们产生的开口(MAC 孔)将介导靶细胞的快速渗透性溶解。较低的、非溶解浓度的 MAC 可以产生其它促炎症反应作用。具体而言,少量 C5b-9 复合物插入到内皮细胞膜和血小板膜中可引起有害的细胞活化。在一些情况下,活化可能发生细胞溶解。

[0051] C5a 和 C5b-9 还通过放大下游炎症因子的释放而具有多效的细胞活化特性,下游炎症因子例如水解酶、活性氧类别、花生四烯酸代谢产物和多种细胞因子。C5 除了通过 C5 转变酶活性激活之外,还可以通过其他方式被激活。有限胰蛋白酶消化(Minta 和 Man, J. Immunol. 1977, 119:1597-1602;Wetsel 和 Kolb, J. Immunol. 1982, 128:2209-2216)和酸处理(Yammamoto 和 Gewurz, J. Immunol. 1978, 120:2008;Damerou 等人, Molec. Immunol. 1989, 26:1133-1142)也能够断裂 C5 并产生有活性的 C5b。

[0052] 如上所述,C3a 和 C5a 是过敏毒素。这些活化的补体成分能够引发肥大细胞脱粒,这可释放组胺和其它炎症反应调节物,导致平滑肌收缩、血管渗透性增加、白细胞活化,以及其他炎症现象,包括导致细胞过多的细胞增殖。C5a 还能够作为趋化肽而行使将促炎粒细胞吸引至补体活化位点的作用。

[0053] 根据本公开,可以使用结合至任意人补体成分或阻断任意人补体成分产生和/或活化的任意化合物。在一些实施方案中,抗人补体成分的特异性抗体在此处是有用的。一些化合物包括直接针对补体成分 C-1、C-2、C-3、C-4、C-5、C-6、C-7、C-8、C-9、因子 D、因子 B、因子 P、MBL、MASP-1 和 MASP-2 的抗体,因此阻止了与 C5a 相关的过敏毒素活性的产生和/或阻止了与 C5b 相关的膜攻击复合物的组装。

[0054] 天然存在或可溶形式的抑制补体的化合物,例如 CR1、LEX-CR1、MCP、DAF、CD59、因子 H、眼镜蛇毒因子、FUT-175、补体结合抑制素和 K76C00H 也用于本方法。可以利用的结合至任意人补体成分或阻断任意人补体成分产生和/或活性的其它化合物包括但不限于蛋白质、蛋白质片段、肽、小分子、包括 ARC187(从 Archemix Corp., Cambridge, MA 商业获得)的 RNA 适体、L-RNA 适体、spiegelmer、反义化合物、丝氨酸蛋白酶抑制剂、可以用于 RNA 干扰(RNAi)的分子例如包括小干扰 RNA(siRNA)的双链 RNA、锁核酸(LNA)抑制剂、肽核酸(PNA)抑制剂等等。

[0055] 在功能上,一种适当类型的化合物抑制 C5 断裂,这可阻断有效促炎分子 C5a 和 C5b-9(末端补体复合物)的产生。优选地,化合物不阻止 C3b 的形成,C3b 的形成促进调理和免疫复合物清除的关键免疫保护功能。

[0056] 虽然可阻止这些膜攻击复合物分子的产生,但在 C5 的补体级联抑制作用保留了产生 C3b 的能力,这对于许多致病微生物的调理作用以及免疫复合物溶解和清除是至关重要的。作为用于溶血性疾病补体抑制作用的治疗因子,保留产生 C3b 的能力显得特别重要,因为增加的血栓形成易感性、感染、疲劳、嗜睡和受损的免疫复合物清除是疾病进程的预先存在的临床症状。

[0057] 文中使用的特别有用的化合物是直接或间接降低补体成分 C5 转变成补体成分 C5a 和 C5b 的抗体。一类有用的抗体是那些具有至少一个抗原结合位点并呈现出与人补体成分 C5 特异性结合的抗体。特别有用的补体抑制剂是以大于大约 30% 降低 C5a 和 / 或 C5b-9 产生的化合物。至少在 1982 年在本领域中就已经知道了具有所期望的阻断 C5a 产生能力的抗 C5 抗体 (Moongkarndi 等人, *Immunobiol.* 1982, 162:397; Moongkarndi 等人, *Immunobiol.* 1983, 165:323)。本领域已知的对 C5 或 C5 片段具有免疫反应的抗体包括抗 C5 β 链的抗体 (Moongkarndi 等人, *Immunobiol.* 1982, 162:397; Moongkarndi 等人, *Immunobiol.* 1983, 165:323; Wurznner 等人, 1991, 同上; Mollnes 等人, *Scand. J. Immunol.* 1988, 28:307-312); C5a (见例如 Ames 等人, *J. Immunol.* 1994, 152:4572-4581、美国专利号 4,686,100 和欧洲专利公布号 0411306) 和抗非人 C5 抗体 (见例如 Giclas 等人, *J. Immunol. Meth.* 1987, 105:201-209)。特别有用的抗 C5 抗体是 h5G1.1-mAb、h5G1.1-scFv 和 h5G1.1 的其它功能片段。制备 h5G1.1-mAb、h5G1.1-scFv 和 h5G1.1 的其它功能片段的方法描述于美国专利号 6,355,245 和“*Inhibition of Complement Activity by Humanized Anti-C5 Antibody and Single Chain Fv*”, Thomas 等人, *Molecular Immunology*, 第 33 卷, 第 17/18 期, 第 1389-1401 页, 1996, 其中公开的内容在文中整体引用作为参考。抗体 h5G1.1-mAb 目前正在以商品名 eculizumab 进行临床试验。

[0058] 按照 Sims 等人在美国专利号 5,135,916 中的教导,可以获得产生与补体成分 C5 反应的单克隆抗体的杂交瘤。按照已知方法使用纯化的补体 C5 成分作为免疫原制备了抗体。根据本公开,补体成分 C5、C5a 或 C5b 优选地用作免疫原。根据特别优选的有用实施方案,免疫原是 C5 的 α 链。

[0059] 特别有用的抗体具有先前段落中所论述的必需功能特性并且具有任意以下特征:

[0060] (1) 它们竞争结合至 C5 中与 5G1.1 特异性免疫反应的部分;

[0061] (2) 它们特异性结合至 C5 α 链—此种特异性结合和对结合的竞争作用可通过本领域众所周知的多种方法,包括表面胞质团共振方法 (Johns 等人, *J. Immunol. Meth.* 1993, 160:191-198) 确定;和

[0062] (3) 它们阻断 C5 与 C3 或 C4 的结合 (C3 和 C4 是 C5 转变酶的组成成分)。

[0063] 抑制至少一种补体成分的产生和 / 或活性的化合物可以以多种单位剂型进行施用。剂量将随所应用的特定化合物而改变。例如,不同的抗体可以具有不同的质量和 / 或亲和性,并且因此需要不同的剂量水平。制备成片段 (例如 Fab、F(ab')₂、scFv) 的抗体也将需要与相应完整免疫球蛋白不同的剂量,因为它们比完整免疫球蛋白质量更小,并且因此需要更低剂量以便在患者血液中达到相同的摩尔水平。

[0064] 剂量还将依赖于施用方式、所治疗患者的特殊症状、患者的总体健康情况、条件、大小和年龄以及开处方医师的判断而变化。

[0065] 抑制至少一种补体成分的产生和活性的化合物的施用将通常为与适当药物载体形成气溶胶形式、通过注射进行静脉输注、皮下注射、口服或舌下给药。如果期望可以使用其它施途径。

[0066] 此外还考虑到能够使用联合治疗,其中抑制补体的化合物与已知的溶血性疾病治疗方案相组合施用。此类治疗方案包括施用 1) 一种或多种已知增加血细胞生成的化合物

(例如,通过加速产生、消除干细胞破坏或消除干细胞抑制),与 2) 选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分的活性的化合物的化合物相组合。已知增加血细胞生成的适当化合物包括,例如类固醇、免疫抑制剂(如环孢菌素)、抗凝剂(如华法林)、叶酸、铁等、促红细胞生成素(EPO)和抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、抗淋巴细胞球蛋白(ALG)、EPO 衍生物和达依泊汀 α (以 **Aranesp**[®] 商业性获得于 Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA (**Aranesp**[®] 是人造形式的 EPO, 通过重组 DNA 技术在中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞中产生))。在特别有用的实施方案中,促红细胞生成素(EPO) (已知增加血细胞生成的化合物)、EPO 衍生物或达依泊汀 α 可以与选自 h5G1.1-mAb、h5G1.1-scFv 和 h5G1.1 的其它功能片段的抗 C5 抗体组合施用。

[0067] 适于注射的制剂可以在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第 17 版(1985) 中找到。此类制剂必须是无菌的和无热原的,并且通常包括药物有效载体例如盐水、缓冲(例如磷酸盐缓冲)盐水、Hank 溶液、Ringer 溶液、葡萄糖/盐水、葡萄糖溶液等等。如果需要,制剂可以包含可药用辅助物质,例如张力调节剂、润湿剂、杀菌剂、防腐剂、稳定剂等等。

[0068] 本公开考虑了通过施用一种或多种结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和/或活性的化合物在患有溶血性疾病的患者体内降低溶血作用的方法。降低溶血作用意思是指患者发生溶血的时间阶段降低大约 25% 或更多。以本领域技术人员已知的用于确定患者中溶血作用水平的任何多种方式评价治疗的效果。一种检测溶血作用的定性方法是观察血红蛋白尿的出现。非常令人惊讶的是,如通过血红蛋白尿快速减少所确定,按照本方法的治疗降低了溶血作用。

[0069] 测量溶血作用的更加定性的方式是测量患者血液中乳酸脱氢酶(LDH)的水平。LDH 催化丙酮酸和乳酸的互相转换。红细胞代谢葡萄糖形成乳酸,乳酸释放入血液并被肝脏摄入。LDH 水平用作溶血作用的目标指示物。如本领域的技术人员将理解,LDH 水平的“正常上限”的测量将依赖于大量因素,包括所应用的特定测定法和进行测定的精确方法而在不同实验室之间不同。一般而言,无论如何,正如患者中 LDH 水平降低至正常 LDH 水平上限的 20% 以内所反映出来的那样,本方法能够降低患有溶血性疾病的患者的溶血。备选地,本方法能够降低患有溶血性疾病的患者的溶血作用,反映为患者 LDH 水平降低大于患者治疗前 LDH 水平的 50%,优选地大于患者治疗前 LDH 水平的 65%,最优选地为大于患者治疗前 LDH 水平的 80%。

[0070] 溶血作用降低的另一种定量测量法是 GPI- 缺陷红细胞(III 型红细胞)的存在。如本领域技术人员将理解,III 型红细胞在细胞表面上没有 GPI 锚蛋白表达。GPI- 缺陷细胞的比例能够利用例如 Richards 等人(Clin. Appl. Immunol. Rev., 第 1 卷,第 315-330 页, 2001) 所描述的技术通过流式细胞仪进行确定。如通过 III 型红细胞增加所反映的那样,本方法能够降低患有溶血性疾病的患者的溶血作用。优选地,患者 III 型红细胞水平增加达到大于总红细胞数的 25%,更加优选地,患者 III 型红细胞水平增加达到大于总红细胞数的 50%,最优选地,患者 III 型红细胞水平增加达到大于总红细胞数的 75%。

[0071] 减轻一种或多种与 PNH 或其它溶血性疾病相关的症状也在本公开范围之内。此类症状包括例如腹痛、疲劳、呼吸困难和失眠。症状可以是红细胞溶解的直接结果(例如血红

蛋白尿、贫血、疲劳、低红细胞计数等等)或者症状可以源自患者血液中的低一氧化氮(NO)水平(例如腹痛、勃起功能障碍、吞咽困难、血栓形成等等)。最近已经报道,在具有超过40%PNH III型粒细胞克隆的患者中,几乎全部患者具有血栓形成、腹痛、勃起功能障碍和吞咽困难,表明具有高溶血率(见Moyo等人, *British J. Haematol.* 126:133-138(2004))。

[0072] 在特别有用的实施方案中,本方法使血小板计数超过40,000/微升(细胞减少患者)、优选地超过75,000/微升、最优选地超过150,000/微升的患者的一种或多种与PNH或其它溶血性疾病相关症状减轻。在其它实施方案中,本方法使得在受试者总红细胞含量的PNH III型红细胞的比例大于10%、优选地大于25%、最优选地为超过50%的情况下,患者中的一种或多种与PNH或其它溶血性疾病相关的症状减轻。还在其它实施方案中,本方法使得网织红细胞计数超过 80×10^9 /升、优选地超过 120×10^9 /升、最优选地超过 150×10^9 /升的患者中的一种或多种与PNH或其它溶血性疾病相关的症状的减轻。在上述最优选的范围内的患者具有活性骨髓并且将产生足够数量的红细胞。虽然在患有PNH或其它溶血性疾病的患者中红细胞可能在一种或多种途径上是有缺陷的(例如GPI缺陷),本方法在保护此类细胞免于源自补体活化的溶解中仍然是特别有用的。因此,在优选范围内的患者最能从本方法获得益处。

[0073] 在一方面,考虑了减轻疲劳的方法,该方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和/或活性的化合物施用于患有或者易患溶血性疾病的受试者的步骤。减轻疲劳意味着患者感受疲劳的时间阶段减少大约25%或更多。疲劳被认为是与血管内溶血作用相关的症状,因为甚至在贫血存在情况下,当血红蛋白尿消失,疲劳就会减轻。通过降低红细胞的溶解,本方法减轻了疲劳。III型红细胞、网织红细胞和血小板在上述优选范围内的患者最能从本方法获得益处。

[0074] 在另一方面,考虑了减轻腹痛的方法,该方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和/或活性的化合物施用于患有或者易患溶血性疾病的受试者的步骤。减轻腹痛意味着患者感受腹痛的时间阶段减少大约25%或更多。腹痛是因为患者天然水平触珠蛋白不能加工由于血管内溶血作用释放入血液的全部游离血红蛋白,导致NO消除和肠张力障碍和痉挛而产生的症状。通过降低红细胞的溶解,本方法减少了血液中游离血红蛋白的量,从而减轻腹痛。III型红细胞、网织红细胞和血小板在上述优选范围内的患者最能从本方法获得益处。

[0075] 在另一方面,考虑了减轻吞咽困难的方法,该方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和/或活性的化合物施用于患有或者易患溶血性疾病的受试者的步骤。减轻吞咽困难意味着患者吞咽困难发作的时间阶段减少大约25%或更多。吞咽困难是因为患者天然水平触珠蛋白不能加工由于血管内溶血作用释放入血液的全部游离血红蛋白,导致NO消除和食管痉挛而产生的症状。通过降低红细胞的溶解,本方法减少了血液中游离血红蛋白的量,从而减轻吞咽困难。III型红细胞、网织红细胞和血小板在上述优选范围内的患者最能从本方法获得益处。

[0076] 还在另一方面,考虑了减轻勃起功能障碍的方法,该方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和/或活性的化合物施用于患有或者易患溶血性疾病的受试者的步骤。减轻勃起功能障碍意味着患者经历勃起功能障碍的时间阶段减少大约25%或更多。勃起功能障碍被认为是与由于血管内溶血作用释放入血液的游离血

红蛋白引起的 NO 消除相关的症状。通过降低红细胞的溶解,本方法减少了血液中游离血红蛋白的量,从而增加血清 NO 水平并减轻勃起功能障碍。III 型红细胞、网织红细胞和血小板在上述优选范围内的患者最能从本方法获得益处。

[0077] 还在另一方面,考虑了减轻少血红蛋白尿的方法,该方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物施用于患有或者易患溶血性疾病的受试者的步骤。减轻血红蛋白尿意味着患者具有红、棕或黑尿的时间次数减少,其中减少一般大约 25% 或更多。血红蛋白尿是因为患者天然水平触珠蛋白不能加工由于血管内容血作用释放入血液的全部游离血红蛋白产生的症状。通过降低红细胞的溶解,本方法减少了血液和尿中游离血红蛋白的量,从而减轻血红蛋白尿。相当令人惊讶的是,血红蛋白尿的降低发生得非常快。III 型红细胞、网织红细胞和血小板在上述优选范围内的患者最能从本方法获得益处。

[0078] 还在另一方面,考虑了减轻血栓形成的方法,该方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物施用于患有或者易患溶血性疾病的受试者的步骤。减轻血栓形成意味着患者血栓形成发作的时间阶段减少大约 25% 或更多。血栓形成被认为与由于血管内容血作用释放入血液的游离血红蛋白引起的 NO 消除相关和 / 或与血小板表面缺乏 CD59 而导致末端补体介导的血小板活化相关的症状。通过降低红细胞的溶解,本方法减少了血液中游离血红蛋白的量,从而增加血清 NO 水平并减轻血栓形成。此外,封闭补体将避免末端补体介导的血小板活化和血栓形成。通过这种经由血小板和内皮细胞上的 C5a 受体可诱导血小板聚集的方法还将抑制 C5a。

[0079] 血栓形成在病因学上被认为是多因素的,包括游离血红蛋白所致的 NO 消除、循环血小板表面上末端补体抑制的缺乏和细胞游离血红素对内皮表面的改变。游离血红蛋白的血管内释放可以直接促成小血管血栓形成。已经表明,NO 可抑制血小板聚集、诱导聚集的血小板解聚并且抑制血小板粘附。相反,血红蛋白所致的 NO 消除或者通过抑制精氨酸代谢作用减少 NO 产生导致血小板聚集增加。PNH 血小板还缺乏末端补体抑制剂 CD59,并且多项研究已经显示,末端补体 (C5b-9) 沉积于血小板上引起膜囊泡化和微泡产生。微泡作为凝血成分因子 Va、Xa 或凝血酶原酶复合物产生的位点而起作用。应该认为这些颗粒还可以促成 PNH 中血栓的发生。通过降低红细胞的溶解,本方法减少了血液中游离血红蛋白的量,从而增加血清 NO 水平并减轻血栓形成。此外,在 C5 处抑制补体将阻止 C5b-9 和 C5a 介导的血小板和 / 或内皮细胞活化。

[0080] 在特别有用的实施方案中,本方法降低血栓形成,特别是在血小板计数超过 40,000/ 微升、优选地超过 75,000/ 微升、最优选地超过 150,000/ 微升的患者中。在其它实施方案中,本方法降低患者血栓形成,其中受试者总红细胞含量中 PNH III 型红细胞的的比例大于 10%,优选地大于 25%,更加优选地超过 50%,最优选地超过 75%。还在另一个实施方案中,本方法在网织红细胞计数超过 80×10^9 / 升、更加优选地超过 120×10^9 / 升、最优选地超过 150×10^9 / 升的患者中降低输血血栓形成。

[0081] 还在另一方面,考虑了减轻贫血的方法,该方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物施用于患有或易患溶血性疾病的受试者的步骤。减轻贫血意味着患者患有贫血的时间阶段降低大约 25% 或更多。溶血性疾病中的贫血源于由于红细胞损失而造成的血液携带氧的能力降低。通过减少红细胞的溶

解,本方法有助于红细胞水平增加,从而减轻贫血。

[0082] 在另一方面,考虑了增加患有溶血性疾病的患者中补体敏感性 III 型红细胞的比例并因此增加总红细胞计数的方法。通过增加患者 RBC 计数,患者的疲劳、贫血和对输血的需求降低了。输血的减少可以是输血频率下降、所输的血液单位数量减少,或者两者。

[0083] 在患有溶血性疾病的患者中增加红细胞计数的方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物施用于患有溶血性疾病的患者的步骤。在特别有用的实施方案中,本方法在患有溶血性疾病的患者中、尤其是血小板计数超过 40,000/ 微升、优选地超过 75,000/ 微升、最优选地超过 150,000/ 微升的患者中增加红细胞计数。在其它实施方案中,本方法在患有溶血性疾病的患者中增加红细胞计数,其中受试者总红细胞含量中 PNH III 型红细胞的比例大于 10%、优选地大于 25%、加优选地超过 50%、最优选地超过 75%。还在另一个实施方案中,本方法在患有溶血性疾病的患者中增加红细胞计数,其中患者的网织红细胞计数超过 80×10^9 / 升、更加优选地超过 120×10^9 / 升、最优选地超过 150×10^9 / 升。在一些实施方案中,本公开的方法可以使得输血频率降低大约 50%,代表性地为输血频率降低大约 70%,更加代表性地为输血频率降低大约 90%。

[0084] 还在另一方面,本公开考虑了通过将化合物施用于受试者使得患有溶血性疾病的受试者较少依赖输血或者不依赖于输血的方法,其中化合物选自结合至一种或多种补体成分的化合物、阻断一种或多种补体成分产生的化合物和封闭一种或多种补体成分活性的化合物。如本领域的技术人员将理解,红细胞的正常生命周期为大约 120 天。考虑到红细胞具有长的半寿期,为了评价输血不依赖性需要治疗 6 个月或更长。已经意外地发现,在一些患者中输血不依赖性能够维持 12 个月或更长,在一些情况下超过 2 年,长度超过红细胞 120 天的生命周期。在特别有用的实施方案中,本方法在患有溶血性疾病的患者中提供了降低的输血依赖性或者不依赖于输血,尤其是在血小板计数超过 40,000/ 微升、优选地超过 75,000/ 微升、最优选地超过 150,000/ 微升的患者中。在其它实施方案中,本方法在患有溶血性疾病的患者中提供了降低的输血依赖性或者输血不依赖性,其中受试者总红细胞含量中 PNH III 型红细胞的比例大于 10%、优选地大于 25%、更加优选地超过 50%、最优选地超过 75%。还在其它实施方案中,本方法在患有溶血性疾病的患者中提供了降低的输血依赖性或者输血不依赖性,其中患者的网织红细胞计数超过 80×10^9 / 升、更加优选地超过 120×10^9 / 升、最优选地超过 150×10^9 / 升。

[0085] 在患有 PNH 或一些其它溶血性疾病的患者中增加一氧化氮 (NO) 水平的方法也在本公开的范围之内。这些增加 NO 水平的方法包括将结合至一种或多种补体成分或阻断一种或多种补体成分的产生和 / 或活性的化合物施用于患有或者易患溶血性疾病的受试者的步骤。由于通过血管内溶血作用而释放入血液中的游离血红蛋白对 NO 的清除,在患有 PNH 或一些其它溶血性疾病的患者中出现低 NO 水平。通过减少红细胞溶解,本方法降低了血液中游离血红蛋白的量,从而增加了血清 NO 水平。在特别有用的实施方案中,如通过因 NO 缺乏所致症状的消退证明 NO 体内稳态得到恢复。

实施例

[0086] 11 名患者参与治疗试验以评价抗 C5 抗体对 PNH 及与其相关的症状的效果。PNH 患者是输血依赖性的并且是溶血性的。在 12 个月内有 4 次或更多次输血史的患者定义为

输血依赖性的。在先前 12 个月中患者群体中输血中位数为 9。在先前 12 个月中，患者群体所使用的输血单位中位数为 24。

[0087] 在 4 周的疗程中，11 名患者的每一名每周接受静脉输注抗 C5 抗体 600mg，输注大约 30 分钟。用于本研究的特异抗 C5 抗体是 eculizumab。患者接受 900mg eculizumab，1 周后以两周一次接受 900mg eculizumab。本研究最开始的 12 周构成初步研究。完成 12 周的初期急性期后，全部患者参加总共进行 64 周的扩展研究。11 名患者中的 10 名患者参加总共进行 2 年的扩展研究。

[0088] 测试了抗 C5 抗体治疗对 PNH III 型红细胞 (“RBC”) 的影响。“PNH 型”是指表达于细胞表面的 GPI 锚定蛋白质的密度。I 型是正常表达，II 型是中间表达，而 III 型为细胞表面无 GPI 锚定蛋白质表达。以 Richards 等人 (Clin. Appl. Immunol. Rev., 第 1 卷, 第 315-330 页, 2001) 所描述的方式，通过流式细胞仪确定 GPI 缺陷细胞的比例。与治疗前的状况相比较，在扩展研究期间 PNH III 型红细胞增加大于 50%。研究前 III 型红细胞平均值为全部红细胞的 36.7%，在 64 周 III 型红细胞平均值为 58.4%，这种增加表明溶血作用急剧降低 (见下表 1)。Eculizumab 治疗保护了 PNH III 型 RBC 不进行补体介导的溶解，延长细胞存活。在所试验全部患者中，PNH 累及细胞的这种保护作用降低了对输血的需求、阵发和溶血作用。

[0089] 表 1 全部患者中的 eculizumab 治疗前和治疗后 PNH 细胞群

[0090]

PNH 细胞类型	PNH 细胞比例(%)			P 值 ^a
	基线	12 周	64 周	
III 型 RBC	36.7 +/- 5.9	59.2 +/- 8.0	58.4 +/- 8.5	0.005
II 型 RBC	5.3 +/- 1.4	7.5 +/- 2.1	13.2 +/- 2.4	0.013
III 型 WBC	92.1 +/- 4.6	89.9 +/- 6.6	91.1 +/- 5.8	N. S.
III 型血小板	92.4 +/- 2.4	93.3 +/- 2.8	92.8 +/- 2.6	N. S.

[0091] ^a 从基线到 64 周平均值改变的比较

[0092] 在 2 年扩展研究过程中，发现在治疗期间 GPI 连接的蛋白质完全缺陷的 PNH 红细胞 (III 型红细胞) 逐渐增加，从平均值 36.7% 增加至 58.9% (p=0.001)，而部分缺陷 PNH 红细胞 (II 型) 从 5.3% 增加至 8.7% (p=0.01)。在 eculizumab 治疗期间任何患者的 PNH 嗜中性粒细胞比例无伴发改变，表明 PNH 红细胞比例增加是由于溶血作用和输血的降低，而不是 PNH 克隆自身的改变。

[0093] 在全部 11 名患者中测量了抗 C5 抗体治疗对乳酸脱氢酶水平 (“LDH”) 的影响。LDH 催化丙酮酸转化为乳酸。红细胞将葡萄糖代谢成乳酸，乳酸被释放入血液并被肝脏摄入。LDH 水平用作溶血作用的目标指示物。与治疗前的水平相比，LDH 水平降低大于 80%。在初步研究期间，LDH 水平从研究前的平均值 3111U/L 降低至平均值 594U/L，并且 64 周后平均值为 622U/L (对于 64 周比较 p=0.002；见图 1A 和 1B)。

[0094] 同样，在治疗的 12 和 64 周期间，红细胞溶血作用的另一个标志物—天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平从平均基线值 76IU/L 分别降低至 26IU/L 和 30IU/L (对于 64 周比较

p=0.02)。在 64 周治疗期间,触珠蛋白、血红蛋白和胆红素的水平,以及网织红细胞的数量与研究前的值相比无显著变化。

[0095] 测量了阵发率并与治疗前水平进行了比较。如本公开中所使用,阵发定义为黑尿发生率,在评分 1-10 中黑尿的色度水平为 6。图 2 显示了尿颜色评分,将评分设计成用于监测治疗前和治疗期间患有 PNH 的患者中血红蛋白尿阵发发生率。与治疗前水平相比较,阵发百分率降低 93%(见图 3),在初期 12 周期间从 eculizumab 治疗前的每个患者每月 3.0 次阵发减少至每个患者每月 0.1 次阵发;在 64 周治疗期间降低至每个患者每月 0.2 次阵发(图 3(p<0.001))。

[0096] 在整个 64 周治疗期间,11 名患者的 9 名中血清溶血活性被完全阻断,平衡时的 eculizumab 的谷水平从大约 35 μ g/ml 变成 350 μ g/ml。在扩展研究期间,2 名患者没有维持持续阻断补体所必需的 eculizumab 水平。血清溶血活性中的这种突破发生于 14 天给药间隔的最后 2 天,在多次给药之间重复出现此模式。如图 4 中可见,在其中一个患者中,补体阻断的突破导致血红蛋白尿、吞咽困难和 LDH 和 AST 增加,这与重新出现血清溶血相关。在下次给药时,症状缓解(图 5),并且将给药间隔从每 14 天 900mg 降低至每 12 天 900mg,则重新实现补体控制,在两个患者中该种补体控制维持整个扩展研究阶段直至 64 周。该患者显示可以 24 小时消除吞咽困难和血红蛋白尿。对于两个患者的扩展研究中的剩余时间,给药间隔从 14 天降低到 12 天足以维持 eculizumab 水平在 35 μ g/ml 以上,并且可有效并持续阻断血清溶血活性。

[0097] 通过用 eculizumab 治疗还可以降低患者对输血的需求。图 6a 比较了用抗 C5 抗体治疗血细胞减少症患者之前或期间每个患者每月所需要的输血单位数,图 6b 比较了用抗 C5 抗体治疗非血细胞减少症患者之前或期间每个患者每月所需要的输血单位数。在所有组中都显示出对输血需求的显著降低(平均输血率从治疗前 1 年期间的每个患者每月 2.1 个单位降低至开始 12 周内的每个患者每月 0.6 个单位和合并 64 周治疗期内的每个患者每月 0.5 个单位),非血细胞减少症患者受益最多。事实上,4 名具有正常血小板计数($\geq 150,000$ /微升)的非血栓血细胞减少患者在 64 周治疗期间成为输血不依赖性。

[0098] 在血栓血细胞减少症患者中评价了与促红细胞生成素(EPO)联合施用的 eculizumab 的效果。EPO(**NeoRecormon**[®], Roche Pharmaceuticals, Basel, 瑞士)以每周三次 18,000 I.U. 的量在研究的 23 周开始时施用。如图 7 中所示,该患者所需的输血频率显著降低,并且很快停止。

[0099] 对于 2 年扩展研究,来自最初 3 个月研究的 11 名患者中的 10 名患者每隔一周持续接受 900mg eculizumab。(一名患者在 23 个月后中断了 eculizumab 治疗。)11 名患者中的 6 名患者血小板正常(无骨髓衰竭的临床证据),而 11 名患者中的 5 名患者血小板低。对于 23 个月后中断 eculizumab 治疗的患者,血管内容血作用受到 eculizumab 成功控制,但是患者仍然继续输血,甚至持续到促红细胞生成素治疗之后。患有最严重细胞减生的患者在 eculizumab 治疗开始时血小板计数低于 30×10^9 /L,表明正在进行的输血可能是潜在骨髓衰竭的结果。

[0100] 2 年扩展研究的结果还证明了这些患者的输血需求具有统计学上显著的降低。在全部 2 年治疗期间,3 名患者保持了输血不依赖性,并且 4 名血细胞减少症患者变成输血不

依赖性的,3名是在用 EPO (**NeoRecormon[®]**) 治疗后。在具有优良骨髓储备的患者中发现输血需求降低最显著。

[0101] 依照 eculizumab 剂量测量并记录了药效动力学水平。通过在标准总人血清补体溶血测定法中测量患者血清样品溶解鸡红细胞的能力,确定了 eculizumab 的药效动力学分析。简而言之,用明胶巴比妥缓冲盐水 (GVB2+, Advanced Research technologies, San Diego, CA) 将患者样品或人对照血清 (Quidel, San Diego CA) 稀释成 40% (体积 / 体积), 并且一式三份加入到 96 孔板中,使每孔血清最终浓度为 20%。然后将板在室温孵育,同时洗涤鸡红细胞 (Lampire Biologics, Malvern, PA)。通过加入抗鸡红细胞多克隆抗体 (0.1% (体积 / 体积)) 使鸡红细胞致敏。然后洗涤细胞并重悬于 GVB2+ 缓冲液中。将鸡红细胞 (2.5×10^6 细胞 / 30 μ L) 加入包含人对照血清或患者样品的板中,并且在 37°C 孵育 30 分钟。每块板包含 6 个额外的、同样制备的鸡红细胞孔,其中 4 个孔作为空白与包含 2mM EDTA 的 20% 血清孵育,而 2 个孔用 GVB2+ 缓冲液单独孵育作为自发溶血作用的阴性对照。然后将板离心并将上清液转移至新的平底 96 孔板中。使用微孔板读取仪在 OD415nm 处测定血红蛋白释放。使用以下公式确定溶血百分比:

[0102] 溶血百分比 = $100 \times (\text{患者样品 OD} - \text{空白 OD}) / (\text{人血清对照 OD} - \text{空白 OD})$

[0103] 药效动力学的图表 (图 8), 生理效应的研究, 显示了一段时间内的血清溶血活性百分数 (即细胞溶解百分数)。在 eculizumab 治疗期间, 绝大多数患者中细胞溶解急剧降低至正常血清补体活性的 20% 以下。2 名患者呈现补体活性突破, 但是补体阻断通过降低给药间隔至 12 天而一直得到恢复 (见图 4)。

[0104] 利用欧洲癌症治疗研究组织 (European Organization for Research and Treatment of Cancer Core) (<http://www.eortc.be>) 的调查表 (“EORTC QLC-C30”) 评价了生活质量的改善问题。每个参加研究的患者在 eculizumab 治疗之前和期间完成 QLC-30 调查表。在总体健康状况、身体机能、功能机能、情绪机能、认知机能、疲劳、疼痛、呼吸困难和失眠观察到总体改善。(见图 9)。

[0105] 在 2 年的研究中, 患者经历与 PNH 相关的有害症状的减轻。例如, 如在图 10 中所阐明, 证明在施用 eculizumab 之前具有腹痛、吞咽困难和勃起功能障碍症状的那些患者中, 施用 eculizumab 之后这些症状显著减轻。

[0106] 虽然已经在文中描述了本发明的优选实施方案和其它实施方案, 但更多的实施方案可以被本领域技术人员所理解而不脱离本发明的范围。

在 Eculizumab 治疗期间溶血的生物化学参数

生物化学标志	正常范围	分析时间		P-值 ^a
		研究前 ^b	64 周	
LDH (IU/L)	150 - 480	3110.7 +/- 598.4	622.4 +/- 41.1	0.002
AST (IU/L)	10 - 40	76.2 +/- 16.0	30.1 +/- 3.2	0.02
触珠蛋白 (g/L)	0.5 - 2	<0.06	0.14 +/- 0.07 ^c	N.S. ^d
血红蛋白 (g/dL)	11.5 - 18	10.0 +/- 0.4	10.3 +/- 0.4	N.S.
胆红素	3 - 15	25.9 +/- 4.3	28.2 +/- 4.4	N.S.
网织红细胞 (x10 ³ /mm ³)	20 - 80	161.4 +/- 25.9	191.2 +/- 23.6	N.S.

^a 自研究前至 64 周的平均变化的比较
^b 数值代表治疗前 52 周阶段内的平均值, 对于参数 ATS 例外, 其数值代表基线平均
^c 11 个患者中有 10 个患者的触珠蛋白低于可检测限 (<0.06 g/L); 1 个患者的数值为 0.69 g/L.
^d 不显著

图 1A

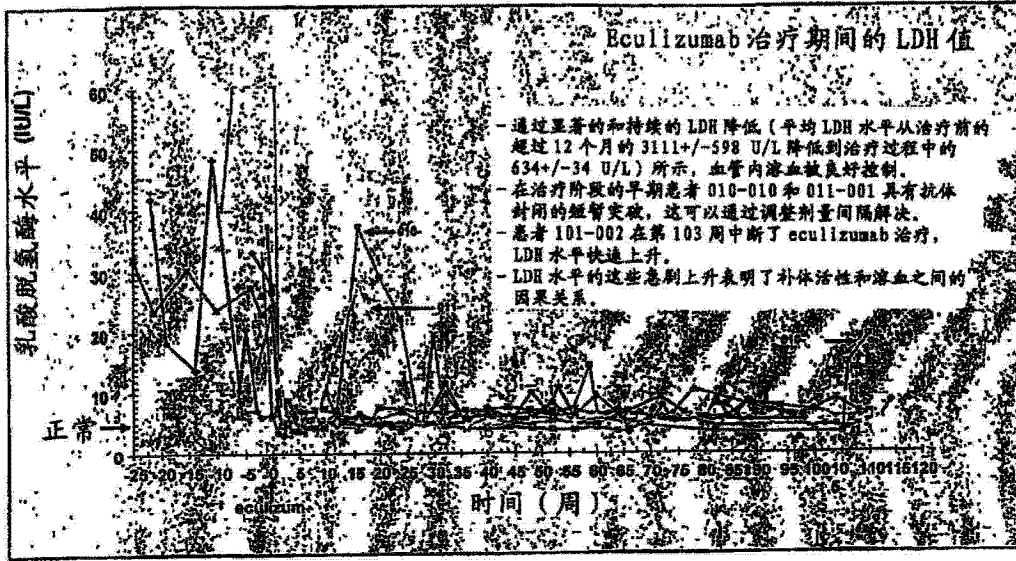


图 1B

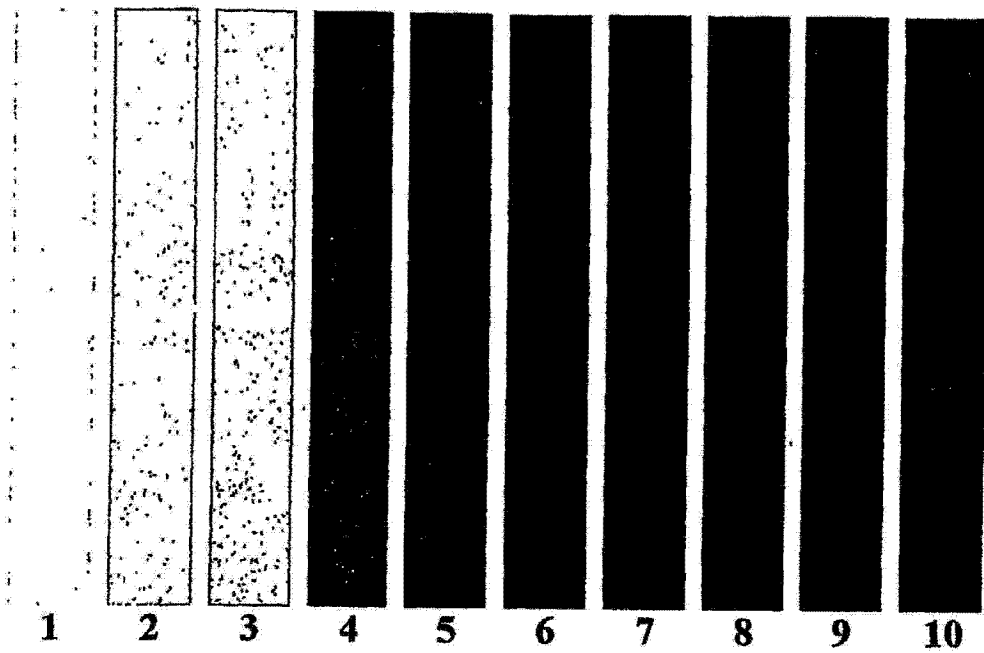
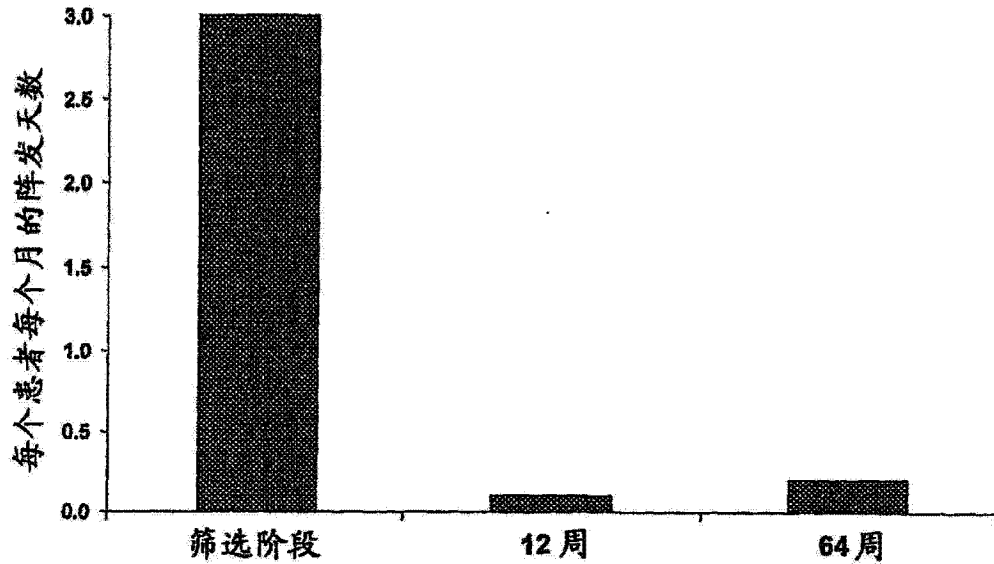


图 2

Eculizumab 对阵发率的影响 (n=8)



柱代表在筛选阶段 (eculizumab 治疗前)、eculizumab 治疗前 12 周以及 eculizumab 治疗的全部 64 周期间的阵发率 (每个患者每个月的阵发天数)。3 位患者没有包括在本分析中, 因为他们的治疗前尿的数值因不经意而没有收集到 (两位患者) 或者在扩展研究中施用了产生人工有色尿液的铁螯合剂 (1 位患者)。

图 3

补体突破封闭的分析

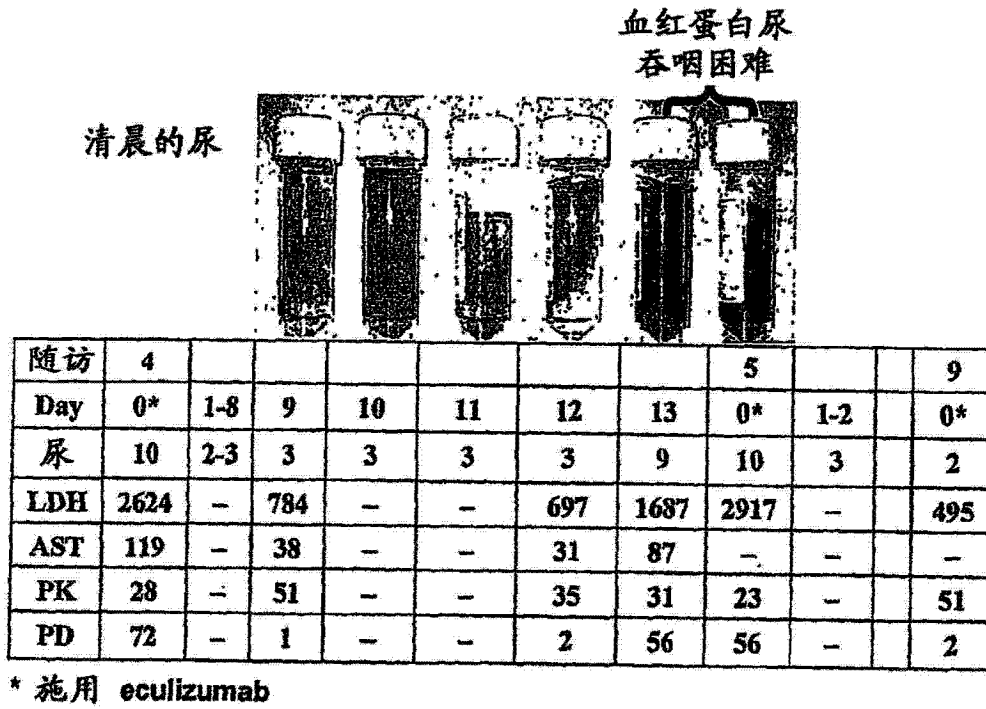


图 4

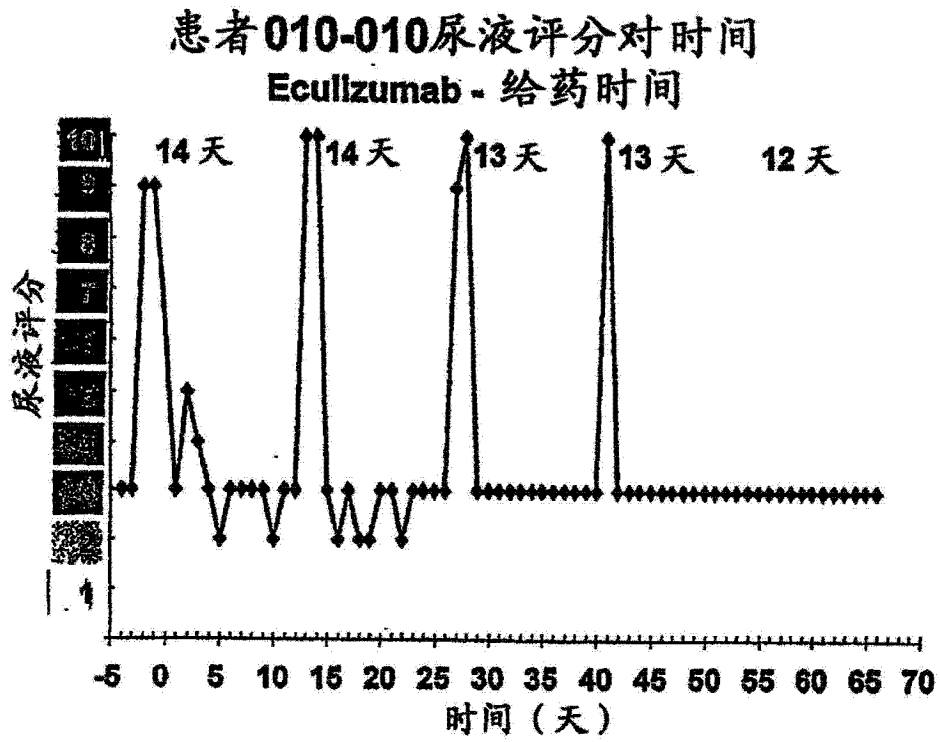


图 5

在 (a) 血细胞减少症患者和 (b) 非血细胞减少症患者中
Eculizumab 施用前和施用后的输血单位

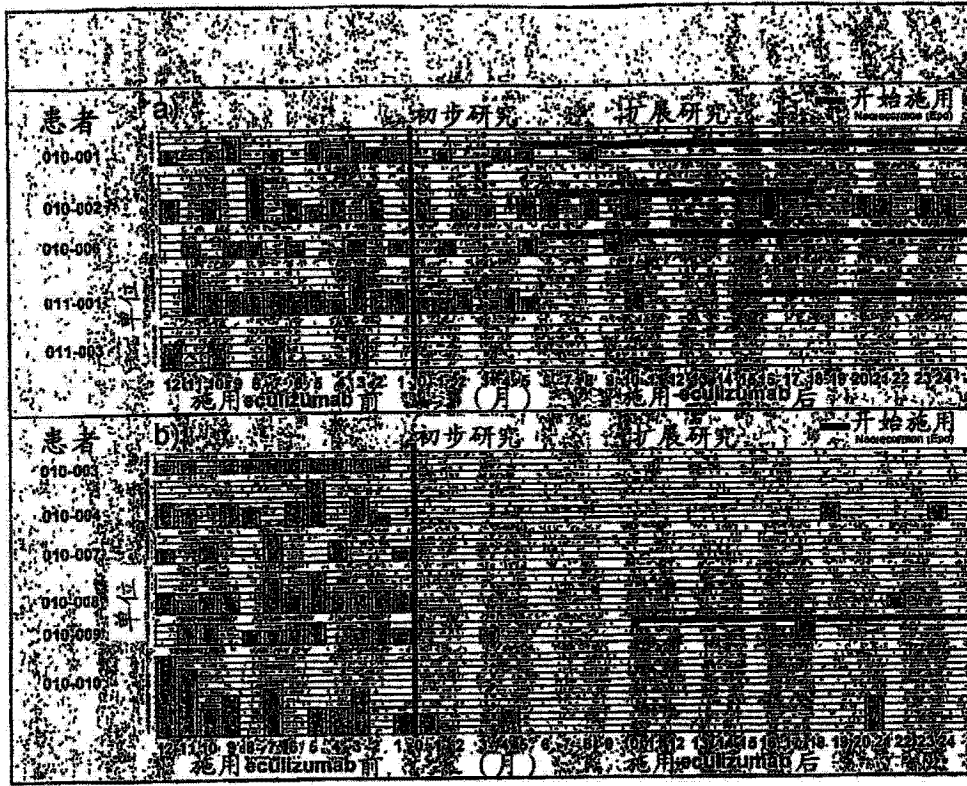
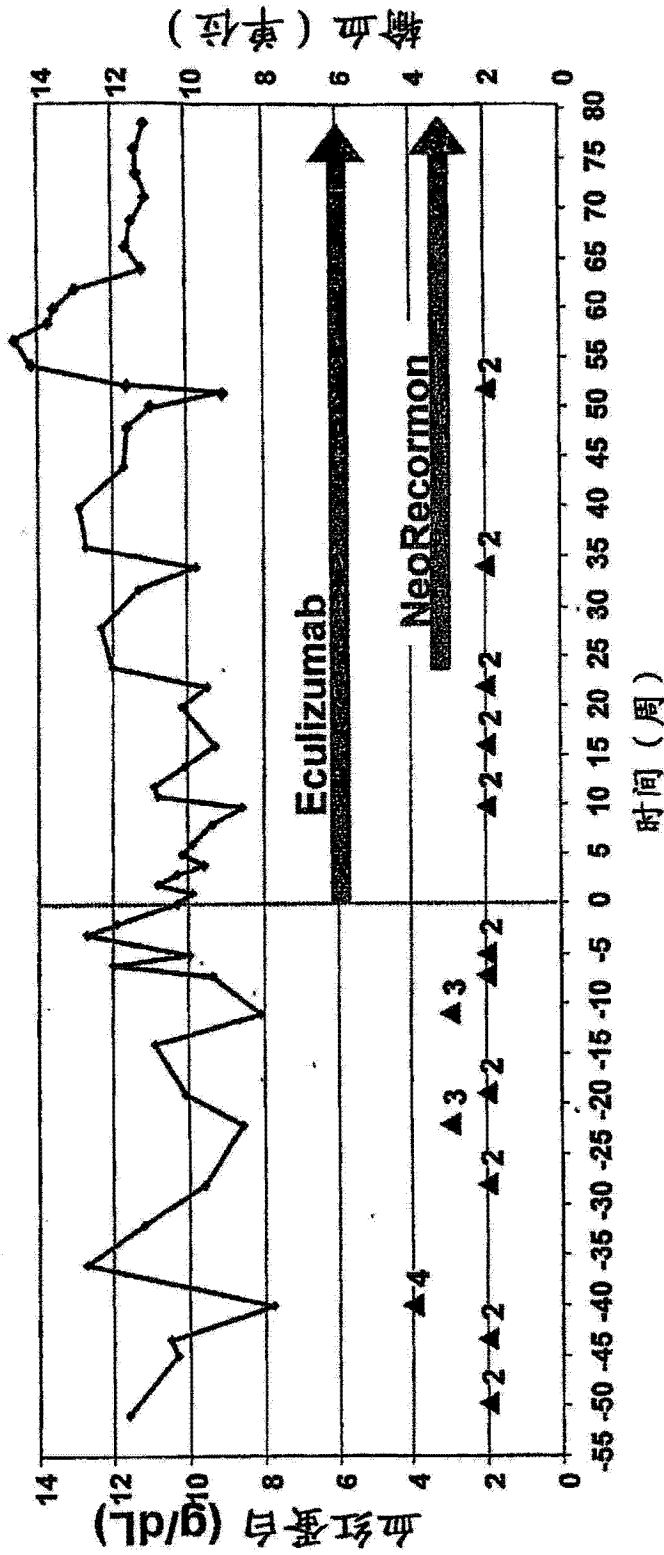


图 6

用红细胞生成素对血小板减少患者的治疗
 患者 010-001 (细胞减少; 血小板为 $80 - 100 \times 10^9/l$)



随着 eculizumab 治疗输血减少, 并且随着 eculizumab 和红细胞生成素 (NeoRecormon 18,000U 3x/周) 的组合治疗则不依赖输血

图 7

施用前和施用后 Eculizumab 药效动力学

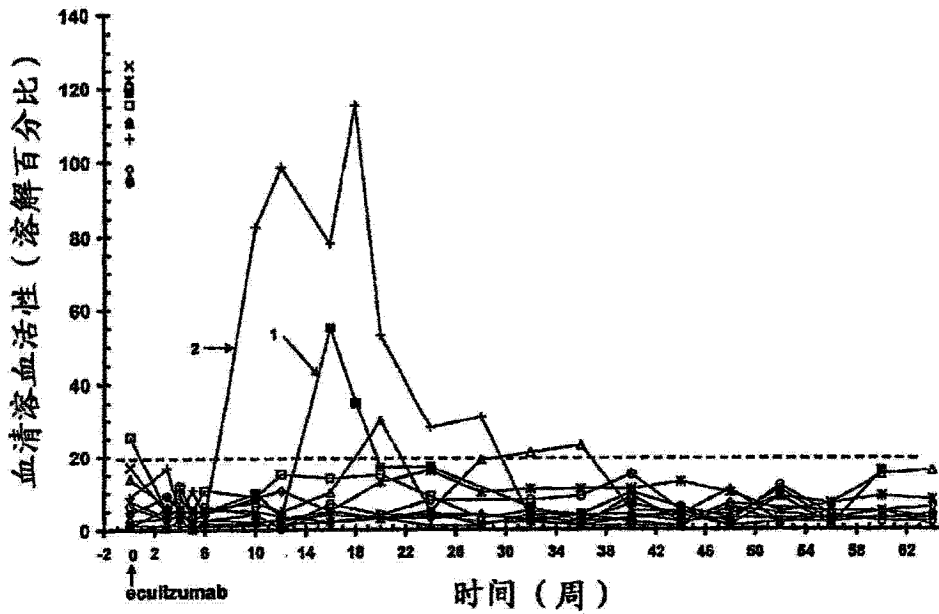


图 8 显示了在 64 周治疗阶段中的血清溶血活性 (PD)，溶血活性如通过血清溶解抗体致敏的鸡红细胞的能力所确定，在补体被有效抑制的情况下的溶血活性百分数 (<20%) 用虚线表示。鉴定出了谷血清溶血活性值小于 20% 的患者 (患者 1 和 2)。

图 8

施用前和施用后 Eculizumab 药效动力学

范围 (a)	平均基线 分值 (b)	64 周时与基线 期的变化 (c)	p- 值 (d)
总体健康状况	56.1	13.8	0.009
身体机能	70.9	14.3	<0.001
情绪机能	70.5	12.5	<0.001
功能机能	66.7	14.5	0.003
认知机能	77.3	10.3	0.001
疲劳	47.5	-17.8	<0.001
呼吸困难	39.4	-16.6	0.002
失眠	30.3	-8.2	0.031
疼痛	21.2	-8.2	0.023
便秘	3.0	4.1	<0.001

- a) 使用欧洲癌症治疗研究组织的 QLQ-C30 手段评估生活质量。
- b) 数字代表线性变化分值的平均值。
- c) 数值代表最小平方的平均值；正变化表示总体健康状况的改善，而负变化表示症状等级的提高。
- d) 数值来自协方差分析模型，其中随访作为固定效应，患者作为随机效应并且基线值作为斜变量。

图 9

施用 Eculizumab 前和施用 2 年后的症状

患者	施用 Eculizumab 前			施用 Eculizumab 后		
	腹痛	吞咽困难	勃起功能障碍	腹痛	吞咽困难	勃起功能障碍
010-001	每 4-8 周一次	每 4-8 周一次	每 4-8 周一次	无	无	无
010-002	无	无	-	无	无	-
010-003	每周一次	每周一次	每周一次	无	无	无
010-004	每 4-6 周一次	无	-	无	无	-
010-006	无	无	无	无	无	无
010-007	无	至少每 4 周一次	-	无	无	-
010-008	无	每 10 周一次	每 10 周一次	无	无	间歇
010-009	无	无	无	无	无	无
010-010	每 4 周一次	每 4 周一次	无	无	在 2 年内 2 次 *	无
011-001	无	无	-	无	无	-
011-003	无	无	-	无	无	-

* 该患者经历了补体封闭的短暂突破，溶血和症状重新出现。提高给药频率至 12 天重新建立起完全的补体封闭并阻止更多症状的发生

图 10