

SIB EX4788R

P065079SM:HRG/REC - G063261PT

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n°14809567.2, pubblicazione n°3071219

a nome di Shire Viropharma Incorporated

di 300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, U.S.A.

“METODI DI TRATTAMENTO DEL RIGETTO MEDIATO DA ANTICORPI IN PAZIENTI CON  
TRAPIANTO D’ORGANO CON INIBITORE DELLA C1-ESTERASI”

Jacopo de Benedetti  
USBM-043R B

## Descrizione

### Campo

[0001] La presente descrizione riguarda in generale metodi, composti e composizioni per trattare il rigetto di un trapianto d'organo nei pazienti e più in particolare, ma non esclusivamente, metodi e composizioni farmaceutiche per trattare o per prevenire il rigetto mediato da anticorpi nei pazienti con trapianto d'organo utilizzando un inibitore della C1-esterasi.

### Sfondo dell'invenzione

[0002] Ogni anno viene impedito a pazienti di ricevere un trapianto d'organo potenzialmente salvavita a causa di un preesistente anticorpo diretto contro gli antigeni leucocitari umani (HLA) di superficie cellulare del donatore. Tali pazienti sono considerati "sensibilizzati" nei confronti del loro organo da donatore, il che può essere il risultato di precedenti trapianti, gravidanza e/o trasfusioni di sangue. La presenza di determinati anticorpi specifici per il donatore (DSA) è una controindicazione al trapianto, indipendentemente da altri fattori che possono indicare una corrispondenza per un donatore. La presenza di DSA può causare il rigetto iperacuto (immediato) mediato da anticorpi (AMR) dell'organo da donatore dopo il trapianto e la possibile perdita dell'organo donato. Così, i pazienti aventi DSA (cioè, i pazienti sensibilizzati) trascorrono un tempo significativamente più lungo ad aspettare un organo da donatore accettabile. Così, i pazienti sensibilizzati affrontano non uno, ma almeno due ostacoli per la donazione di organi: (1) compatibilità del gruppo sanguigno e (2) sensibilizzazione. Inoltre, alcuni pazienti possono sviluppare anticorpi verso il loro organo da donatore dopo il trapianto, e tali DSA vengono chiamati "de novo". È ora noto che una maggioranza dei pazienti che perdono il loro trapianto per rigetto cronico lo fa come risultato dei DSA de novo.

[0003] Attualmente, vi sono poche possibilità di trattamento disponibili per i pazienti sensibilizzati con rigetto mediato da anticorpi. I trattamenti disponibili includono, per esempio, rituximab e plasmaferesi con o senza immunoglobulina endovenosa (IVIg).

[0004] Sebbene i trattamenti disponibili mostrino inizialmente un'efficacia variabile per trattare l'AMR, i loro effetti diminuiscono e non sono sostenuti in quasi metà dei pazienti. Così, l'effetto a lungo termine dei

trattamenti attualmente disponibili è scarso, e vi è un'enorme richiesta non soddisfatta nel campo di trattamenti efficaci per l'AMR e di trattamenti e composizioni che migliorino la sopravvivenza complessiva del trapianto per i pazienti riceventi trapianti d'organo con abbinamento donatore-ricevente positivo.

[0005] L'accesso dello studio clinico NCT01147302 di [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) descrive uno studio di fase II di ViroPharma per valutare la sicurezza, l'efficacia e la farmacologia dell'inibitore umano della C1-esterasi in pazienti con trapianto renale con rigetto acuto mediato da anticorpi (AMR).

[0006] L'accesso dello studio clinico NCT01134510 di [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) descrive uno studio di fase II di CSL-Behring della sicurezza e dell'efficacia del C1-INH umano fornito dopo il trapianto per ridurre o prevenire il rigetto mediato da anticorpi (AMR) dipendente dal complemento in pazienti adulti trapiantati con >30% di anticorpi reattivi al pannello che hanno subito desensibilizzazione con IVIg + rituximab e/o plasmateresi.

[0007] Cai et al., *British Medical Bulletin*, 105, 2013: 139-155, descrive che il C1-INH viene studiato negli studi clinici descritti in NCT01147302 e NCT01134510.

[0008] L'accesso dello studio clinico NCT01035593 di [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) descrive uno studio per verificare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia del C1-INH umano ricombinante combinato con plasmateresi (PP) ed immunoglobulina endovenosa (IVIg) in soggetti riceventi un trapianto renale con rigetto mediato da anticorpi (AMR) confermato mediante biopsia entro 30 giorni dal trapianto renale, in confronto a PP e IVIg da sole.

[0009] Tillou et al., *Kidney International* 78(2), luglio 2010: 152-159, descrive uno studio su animali in cui dei babbuini sono stati preimmunizzati con cellule mononucleate del sangue periferico da donatori allogeneici, e successivamente hanno ricevuto un trapianto renale dallo stesso donatore. I babbuini non trattati hanno rigettato l'allograpianto di rene il giorno 2. Anche se i babbuini trattati con 3x dosi giornaliere di C1-INH ricombinante non hanno esibito segni di rigetto durante il trattamento, il rigetto è avvenuto rapidamente dopo la cessazione del trattamento.

[0010] Nessuno dei suddetti documenti descrive alcuna informazione riguardo al dosaggio.

[0011] WO 2013/041677 descrive il trattamento dell'ischemia cerebrale utilizzando una combinazione di C1-INH ed immunoglobulina, quale l'immunoglobulina derivata da plasma umano (IVIg). Questo documento non

menziona il trattamento dell'AMR di un allotrapianto d'organo.

[0012] Ensor et al., Cardiac Transplantation, 2012, 23-40, descrive la conoscenza fondamentale di fisiopatologia, epidemiologia e diagnosi dell'AMR, compresa una rassegna delle terapie tradizionali. Non viene descritta nessuna dose del C1-INH.

[0013] EP 1240904 descrive il C1-INH umano per uso nel prevenire o nel ritardare il rigetto iperacuto e/o acuto di xenotrapianto. Non sono previsti gli allotrapianti.

[0014] Wagner et al., Nature Reviews Drug Discovery, 9(1), gennaio 2010: 43-56, descrive che è stato mostrato che il C1-INH è efficace nel prevenire un danno tissutale mediato dal complemento in alcuni modelli animali di trapianto.

#### Riassunto

[0015] La presente invenzione viene definita nelle rivendicazioni. La presente invenzione soddisfa le necessità nel campo fornendo metodi e composizioni per somministrare vantaggiosamente una proteina inibitrice della C1-esterasi (C1-INH) a pazienti con organi trapiantati che sperimentano o che sono a rischio di sperimentare un rigetto mediato da anticorpi (AMR) dell'organo trapiantato.

[0016] In un aspetto, l'invenzione fornisce un inibitore della C1-esterasi (C1-INH) per uso in un metodo di trattamento dell'AMR di un allotrapianto d'organo in un paziente che lo richieda, in cui il metodo comprende la somministrazione endovenosa del C1-INH ad una dose da 5000 unità a 25000 unità fornita in dosi suddivise nel corso di da 10 a 20 giorni. Viene utilizzata una quantità terapeuticamente efficace di un C1-INH. Secondo alcune forme di realizzazione della presente invenzione, il C1-INH viene somministrato ad una dose totale di 20000 U. Secondo alcune forme di realizzazione della presente invenzione, la dose totale di C1-INH viene somministrata in dosi suddivise nel corso di 13 giorni. Secondo alcune forme di realizzazione della presente invenzione, il C1-INH viene somministrato ad una dose totale di 20000 U suddivise nel corso di 13 giorni, in cui la dose iniziale è 5000 U, e sei dosi ulteriori di 2500 U di C1-INH vengono somministrate a giorni alterni dopo la dose iniziale.

[0017] Secondo alcune forme di realizzazione della presente descrizione, il metodo comprende la somministrazione precoce e/o di durata a breve termine di una quantità terapeuticamente efficace di un C1-INH.

Secondo alcune forme di realizzazione della presente descrizione, il metodo comprende l'uso di una quantità terapeuticamente efficace del C1-INH che è sufficiente a fornire un effetto terapeutico di lunga durata. Secondo alcune forme di realizzazione della presente descrizione, il metodo comprende la somministrazione precoce e/o di durata a breve termine di una quantità terapeuticamente efficace di un C1-INH, in cui la quantità terapeuticamente efficace del C1-INH è sufficiente a fornire un effetto terapeutico di lunga durata. Secondo alcune forme di realizzazione, il metodo per trattare l'AMR di un allotrapianto d'organo utilizzando un inibitore della C1-esterasi secondo la presente invenzione comprende la somministrazione di un C1-INH, in cui la somministrazione del C1-INH viene iniziata da 1 a 90 giorni da trapianto d'organo, trattamento con plasmateresi, trattamento con immunoglobulina endovenosa (IVIg) o diagnosi di AMR.

[0018] Il C1-INH può essere un C1-INH derivato da plasma umano, quale Cinryze®. Facoltativamente, l'inibitore della C1-esterasi è per uso in un metodo di trattamento dell'AMR di un allotrapianto d'organo secondo la presente invenzione, in cui il metodo può includere il sottoporre il paziente a plasmateresi per rimuovere i DSA. Il trattamento precoce a breve termine con C1-INH, che può essere un adiuvante alla plasmateresi, può ridurre il tasso di rigetto cronico di allotrapianti d'organo in confronto alla sola plasmateresi. In altre forme di realizzazione, il metodo può comprendere la somministrazione di immunoglobulina endovenosa (IVIg) e/o plasma congelato fresco. Secondo alcune forme di realizzazione della presente descrizione, in aggiunta o in alternativa possono essere somministrati globuli rossi impaccati. In un'ulteriore forma di realizzazione, il metodo può comprendere la somministrazione di una preparazione antilinfocitaria, rituximab, eculizumab, bortezomib o una loro combinazione. Secondo alcune forme di realizzazione, il metodo risulta in un effetto terapeutico della durata di almeno 3 mesi dopo la cessazione della terapia. Secondo alcune forme di realizzazione, l'effetto terapeutico comprende: una ridotta incidenza di glomerulopatia cronica e di glomerulopatia da trapianto o la prevenzione dell'AMR.

In alcune forme di realizzazione del metodo per trattare l'AMR di un allotrapianto d'organo utilizzando un inibitore della C1-esterasi secondo la presente descrizione, il paziente viene o è stato trattato con una o più altre terapie note per trattare l'AMR iperacuto e/o acuto (per esempio plasmateresi, trattamento con IVIg, trattamento

con uno o più tra una preparazione antilinfocitaria, rituximab, eculizumab, bortezomib o una loro combinazione, e preferibilmente plasmaferesi e trattamento con IVIg).

[0019] Secondo alcune forme di realizzazione della presente descrizione, vengono inoltre inclusi un C1-INH ed un ulteriore principio biologicamente attivo scelto nel gruppo composto da una preparazione antilinfocitaria, rituximab, bortezomib, eculizumab ed immunoglobulina (Ig) o una loro combinazione come preparazione combinata per uso concomitante o sequenziale in un metodo di trattamento del rigetto mediato da anticorpi (AMR) di un allotrapianto d'organo in un paziente che lo richieda. Un ulteriore principio biologicamente attivo preferito è l'immunoglobulina, per esempio l'immunoglobulina endovenosa.

[0020] Inoltre, l'inibitore della C1-esterasi è per uso in un metodo di trattamento dell'AMR di un allotrapianto d'organo in un paziente che lo richieda secondo la presente invenzione, in cui l'organo da trattare (cioè l'organo che deve essere o che è stato trapiantato nel paziente) può essere un organo solido. Inoltre, l'organo solido può essere scelto nel gruppo composto da rene, pancreas, intestino, cuore, polmone e fegato. In alcune forme di realizzazione, l'organo è il rene.

[0021] La presente descrizione fornisce inoltre una composizione farmaceutica per trattare o per ritardare la progressione dell'AMR di un allotrapianto d'organo in un paziente che lo richieda. La composizione farmaceutica può includere un C1-INH; un ulteriore principio biologicamente attivo, quale una preparazione antilinfocitaria, rituximab, eculizumab, immunoglobulina (Ig) e loro combinazioni; ed un mezzo veicolante farmaceuticamente accettabile.

[0022] La presente descrizione fornisce inoltre un kit comprendente: (i) un C1-INH; e (ii) un ulteriore principio biologicamente attivo scelto nel gruppo composto da una preparazione antilinfocitaria, rituximab, bortezomib, eculizumab ed immunoglobulina (Ig) o una loro combinazione, in cui i suddetti componenti (i) e (ii) vengono confezionati per una somministrazione concomitante o sequenziale ad un paziente, facoltativamente per uso in un metodo di trattamento del rigetto mediato da anticorpi (AMR) di un allotrapianto d'organo nel paziente. Un ulteriore principio biologicamente attivo preferito è l'immunoglobulina, per esempio l'immunoglobulina endovenosa.

[0023] Diversamente dai trattamenti attualmente disponibili nell'arte, l'invenzione fornisce un'efficace terapia precoce e/o di durata a breve termine per trattare l'AMR in soggetti riceventi un trapianto, così come in pazienti che attendono o che si sottopongono ad un trapianto d'organo, che fornisce un effetto terapeutico di lunga durata.

#### Breve descrizione dei disegni

[0024] Il precedente riassunto e la seguente descrizione dettagliata delle forme di realizzazione esemplificative possono essere ulteriormente compresi quando letti in combinazione con i disegni allegati, in cui:

la figura 1 illustra schematicamente gli effetti di un inibitore della C1-esterasi (C1-INH) sui sistemi di coagulazione, contatto e complemento. Come indicato qui: callicreina (KK); chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK); proteina legante il mannosio (MBP); serin proteasi associata all'MBP (MASP); attivatore tissutale del plasminogeno (tPA); e prodotto di degradazione della fibrina (FDP).

La figura 2 illustra schematicamente una progettazione esemplificativa per la somministrazione dell'inibitore C1-INH utilizzando Cinryze® come C1-INH. Come indicato qui: (a) AMR confermato mediante biopsia entro 12 mesi dopo il trapianto; (b) prima dose di Cinryze® o placebo entro 72 ore dopo la biopsia qualificante; (c) giorno 20 ( $\pm$  24 ore) dopo la prima dose di Cinryze® o placebo; e (d) giorno 90 ( $\pm$  24 ore) dopo la prima dose di Cinryze® o placebo.

La figura 3 è una tabella indicante gli standard di cura forniti ai soggetti in uno studio esemplificativo a seguito dell'andamento nella figura 2 in cui, su 14 soggetti, 7 sono stati trattati con placebo e 7 sono stati trattati con un C1-INH. Come indicato qui: plasma congelato fresco (FFP) e trasfusione di globuli rossi impaccati (PRBC).

Le figure 4A e 4B sono grafici che illustrano i livelli plasmatici della concentrazione di C1-INH funzionale (medie delle coorti) nei pazienti trattati dopo l'infusione con Cinryze® o placebo. La figura 4A mostra graficamente la concentrazione plasmatica media di C1-INH funzionale dopo l'infusione con Cinryze® o placebo nel corso di 13 giorni nello studio esemplificativo. La figura 4B mostra graficamente la concentrazione plasmatica media di C1-INH funzionale dopo l'infusione con Cinryze® o placebo il giorno 13 dello studio esemplificativo. Sia la figura 4A che la 4B sono medie corrette per ciascuna coorte, tali che sono stati sottratti i livelli basali di C1-INH funzionale.

La figura 5 rappresenta graficamente la variazione media della funzione renale (cioè, dell'eliminazione della creatinina) nei pazienti trattati con Cinryze® o placebo. L'eliminazione della creatinina è considerevolmente ridotta nei pazienti con AMR. Somministrando Cinryze®, in confronto al placebo, l'eliminazione della creatinina viene stabilizzata dopo approssimativamente 7 giorni e non cala alla stessa misura di quei pazienti trattati con il placebo. Ad ogni modo, è indicato che i pazienti nello studio esemplificativo vengono trattati con plasmateresi (e/o IVIg) e Cinryze® o placebo.

Le figure 6A e 6B mostrano fette di tessuto renale colorate con il colorante ematosilina ed eosina (EE) che illustrano e mostrano le differenze della presenza di glomerulopatia cronica (CG). La figura 6A indica una fetta di tessuto renale normale 6 mesi dopo il trapianto in un paziente trattato con Cinryze® che non manifesta CG (uno dei 6/7 pazienti). La figura 6B indica una fetta di tessuto renale 6 mesi dopo il trapianto che denota CG in un paziente trattato con placebo (uno dei 3/7 pazienti).

Le figure 7A e 7B forniscono immagini di microscopia elettronica (EM) di capillari peritubulari (PTC). La figura 7A rappresenta un'immagine EM normale esemplificativa di un PTC. La figura 7B rappresenta un'immagine EM di un PTC ottenuta 6 mesi dopo il trapianto che mostra glomerulopatia in un paziente trattato con placebo (uno dei 3/7 pazienti). Nella figura 7A, CL = lume capillare, E = epitelio e BS = membrana basale.

La figura 8 comprende tabelle dei livelli di antigene C1-INH e di C1-INH funzionale misurati nei soggetti il giorno 13 di uno studio esemplificativo, in cui i soggetti sono stati trattati con placebo o C1-INH oltre allo standard di cura (plasmateresi e/o IVIg). I livelli di antigene C1-INH riportati si basano su una misurazione della concentrazione in peso della proteina con conversione a U/ml utilizzando il fattore di conversione  $0,067\text{U/ml} = 1\text{mg/dl}$ .

Le figure da 9A a 9H correlano graficamente i livelli di antigene C1-INH e di C1-INH funzionale misurati nei pazienti il giorno 13 dello studio esemplificativo (figura 8) in relazione al loro esito clinico a 6 mesi. Come utilizzati qui: CG indica quei pazienti che hanno avuto esiti scarsi (per esempio 3/7 pazienti nella coorte con placebo, 1/7 pazienti nella coorte con Cinryze®); antigene (AG); e funzionale (Funct). Inoltre, l'unico paziente della coorte con Cinryze® che ha manifestato CG ha avuto un evento avverso di shock emorragico dopo la

biopsia mentre riceveva una medicina anticoagulante. Le figure 9A e 9B correlano graficamente i livelli di antigene C1-INH corretti per il livello basale con la CG nei pazienti riceventi placebo (figura 9A) e Cinryze® (figura 9B). Le figure 9C e 9D correlano graficamente i livelli di C1-INH funzionale corretti per il livello basale con la CG nei pazienti riceventi placebo (figura 9C) e Cinryze® (figura 9D). Le figure 9E e 9F correlano graficamente i livelli di antigene C1-INH non aggiustati con la CG nei pazienti riceventi placebo (figura 9E) e Cinryze® (figura 9F). Le figure 9G e 9H correlano graficamente i livelli di C1-INH funzionale non aggiustati con la CG nei pazienti riceventi placebo (figura 9G) e Cinryze® (figura 9H). I livelli di antigene C1-INH riportati si basano su una misurazione della concentrazione in peso della proteina con conversione a U/ml utilizzando il fattore di conversione  $0,067\text{U/ml} = 1\text{mg/dl}$ .

Le figure 10A e 10B illustrano graficamente l'effetto della plasmaferesi sui livelli antigenici (figura 10A) e funzionali del C1-INH sierico (figura 10B). Come dimostrato nelle figure 10A e 10B, la plasmaferesi ha ridotto i livelli antigenici e funzionali del C1-INH sierico.

#### Descrizione dettagliata

[0025] Il rigetto mediato da anticorpi (AMR) è coinvolto nel fallimento del trapianto, per esempio, di allotrapianti di cuore, polmone, fegato, pancreas, intestino e rene nei pazienti. Poiché vi sono poche terapie sperimentali, e nessuna approvata, per il rigetto mediato da anticorpi (AMR) e gli esiti per i trapianti vengono rigorosamente monitorati dai Centers for Medicare and Medicaid (CMS), dalla maggior parte dei centri trapianto viene generalmente impedito ai pazienti con DSA che attendono un trapianto d'organo di ricevere organi da donatore a cui essi sono sensibilizzati. Per esempio, ogni anno a diverse migliaia di pazienti con malattia renale allo stadio terminale (ESRD) viene impedito di ricevere un trapianto renale potenzialmente salvavita a causa di un preesistente anticorpo (DSA) diretto contro gli antigeni leucocitari umani (HLA) di superficie cellulare del donatore.

[0026] La presenza di questi DSA circolanti, identificata attraverso analisi di abbinamento donatore-ricevente prima del trapianto (saggio di citotossicità dipendente dal complemento o citometria a flusso), è una controindicazione al trapianto. I DSA possono causare rigetto immediato, o "iperacuto", mediato da anticorpi

(AMR) portando alla distruzione mediata dal complemento ed infine alla perdita dell'organo trapiantato.

[0027] Quasi un terzo degli individui sulla lista d'attesa per un trapianto renale negli Stati Uniti (US) ha anticorpi circolanti diretti contro  $\geq 10\%$  degli HLA della popolazione. Questi pazienti sensibilizzati trascorrono un tempo significativamente più lungo ad aspettare un rene accettabile a cui essi non sono sensibilizzati (cioè, "negativi per l'abbinamento donatore-ricevente") per il trapianto in confronto a pazienti non sensibilizzati. Negli Stati Uniti, si stima che 6000 pazienti con ESRD (lista d'attesa) ed altri 3500 nuovi iscritti alla lista d'attesa all'anno hanno un donatore vivente disponibile ma non possono essere trapiantati a causa della sensibilizzazione o dell'incompatibilità del gruppo sanguigno. L'incapacità di trapiantare pazienti sensibilizzati con reni da donatori viventi disponibili aumenta ulteriormente la domanda per reni da donatori deceduti e, così, aumenta i tempi d'attesa per tutti i pazienti in lista.

[0028] L'accreditamento dei programmi di trapianto renale da parte dei Centers for Medicaid and Medicare Services (CMS) statunitensi si basa principalmente sugli esiti di un centro specifico che soddisfano o superano i valori di riferimento nazionali per il trapianto renale (tassi di sopravvivenza del trapianto ad 1 anno di  $\sim 95\%$ ). Quando il tasso di insuccesso del trapianto o di decesso del programma supera il 150% dei tassi attesi, il programma viene citato per non conformità e può perdere la certificazione dei CMS per eseguire trapianti di rene (si veda 42 CFR parte 482, §482.80 e §482.82 [2007]). Quindi, vi è della riluttanza ad eseguire trapianti di rene in pazienti altamente sensibilizzati o positivi per l'abbinamento donatore-ricevente. Questi pazienti, molti dei quali hanno un donatore vivente disponibile, gravano eccessivamente sulla lista d'attesa per i donatori deceduti, e molti moriranno in attesa di un trapianto. Tuttavia, un agente che è una terapia utile e/o un adiuvante per i pazienti desensibilizzati nella prevenzione o nel trattamento dell'AMR acuto può aiutare a cambiare i paradigmi nel trapianto, non solo consentendo l'accesso a trapianti potenzialmente salvavita, ma anche diminuendo la concorrenza della lista d'attesa per coloro senza un potenziale donatore vivente.

[0029] La diminuzione dei titoli di DSA nei pazienti positivi per l'abbinamento donatore-ricevente o altrimenti sensibilizzati attraverso l'uso di immunoglobulina endovenosa (IVIg), o di una combinazione di plasmaferesi ed IVIg, ha permesso la "desensibilizzazione" e la conversione ad un abbinamento donatore-ricevente negativo per

un trapianto renale di successo in alcuni pazienti.

[0030] Tuttavia, nonostante tali protocolli, più del 10% dei pazienti perderà il proprio trapianto immediatamente o molto precocemente dopo il trapianto a causa di rigetto iperacuto o AMR acuto aggressivo. Inoltre, il 30%-50% dei pazienti sperimenterà ancora AMR acuto, la maggior parte entro i primi da 1 a 3 mesi dopo il trapianto. Infatti, la sopravvivenza del trapianto ad 1 anno è stata del 60%-70% nei pazienti con DSA ed AMR in confronto ad approssimativamente il 95% nei pazienti senza alcun DSA. Tuttavia, per alcuni pazienti, i tassi di morbilità e di mortalità associati a dialisi giustificano i rischi di un trapianto renale con abbinamento donatore-ricevente positivo. Rimane una richiesta non soddisfatta di migliorare gli esiti complessivi di questi pazienti trapiantati a rischio elevato (positivi per l'abbinamento donatore-ricevente).

[0031] L'AMR acuto viene solitamente trattato con IVIg e plasmaferesi aggiuntive. Tuttavia, approssimativamente metà dei pazienti con diagnosi di AMR acuto precoce soffre di danno irreversibile al proprio allotrapianto renale, come evidenziato dalla glomerulopatia da trapianto (TG), che è spesso associata a fibrosi interstiziale, glomerulosclerosi ed ispessimento fibrointimale. La TG è un sottoinsieme di CG, poiché la TG si riferisce ad una glomerulopatia che colpisce specificamente l'organo trapiantato. Trattamenti quali IVIg e/o plasmaferesi hanno fornito attività a vita breve rispetto ad un effetto terapeutico di lunga durata, poiché alla fine tali trattamenti perdono la loro efficacia. Come utilizzato qui, il termine "attività a vita breve" si riferisce all'attività di un tipo di trattamento, per esempio nei confronti dell'AMR, che rimane efficace solo mentre si riceve la terapia d'intervento. Al contrario, il termine "effetto terapeutico di lunga durata" si riferisce all'attività di un tipo di trattamento, per esempio nei confronti dell'AMR, che rimane efficace per più di circa da 3 a 6 mesi dopo la cessazione della terapia (per esempio per più di circa 3, 4, 5, 6 mesi dopo la cessazione della terapia, o circa 6 mesi o circa 1 anno dopo la cessazione della terapia).

[0032] I pazienti con le precedenti caratteristiche di TG hanno una sopravvivenza del trapianto considerevolmente compromessa in confronto ai pazienti che non hanno alcuna evidenza di TG alla biopsia. Alcuni pazienti con grave AMR acuto possono richiedere una terapia di salvataggio comprensiva di rituximab (anticorpo anti-CD20) e/o bortezomib (inibitore del proteasoma) con o senza splenectomia come ultima

alternativa di trattamento. Rimane un'enorme richiesta non soddisfatta di un agente che tratti efficacemente l'AMR acuto (diminuendo la necessità di misure drastiche quali la splenectomia) e migliori la sopravvivenza del trapianto complessiva, così che ai pazienti con ESRD sensibilizzati possa essere concesso l'accesso al trapianto dopo la desensibilizzazione per un abbinamento donatore-ricevente positivo.

[0033] Per quanto riguarda lo sviluppo di terapie che possano superare i fallimenti nel campo, il miglioramento delle attuali terapie dell'AMR richiede l'indirizzamento alla sottostante risposta immunitaria dell'ospite che conduce alla TG mediata da DSA ed alla perdita finale dell'allograpianto. Plasmaferesi ed IVIg possono diminuire i titoli di DSA. Tuttavia, il loro uso può non essere indirizzato alla distruzione tissutale che avviene come risultato dell'attivazione del complemento. I complessi HLA-DSA attivano la via classica della cascata del complemento, portando infine alla formazione di complessi di attacco alla membrana ed al rilascio continuo di citochine infiammatorie. Come prova del ruolo del complemento nella distruzione del trapianto, l'accumulo del quarto prodotto di degradazione proteica del complemento (C4d) lungo i capillari peritubulari (PTC) è predittivo di AMR ed associato a scarsa sopravvivenza del trapianto allogenico. Dopo aggiustamento per i fattori di rischio comunemente associati ad insuccesso del trapianto, i pazienti che richiedono una biopsia dell'allograpianto renale per diminuita funzione renale e che hanno avuto DSA nel loro siero con colorazione per C4d alla biopsia hanno un rischio di perdita del trapianto che è tre volte superiore rispetto ai pazienti senza DSA o colorazione per C4d alla biopsia. Quindi, un inibitore del complemento si rivelerebbe una terapia e/o un adiuvante utile nel trattamento dell'AMR.

[0034] Il trapianto di un allograpianto vascolarizzato implica l'esposizione del soggetto ricevente agli HLA del donatore. Il processamento e la presentazione degli HLA del donatore determinano la risposta immunitaria del soggetto ricevente nei confronti dell'allograpianto trapiantato. Se l'antigene solubile del donatore viene presentato e riconosciuto da parte dei linfociti T CD4 di un soggetto ricevente, il rilascio di citochine (per esempio di IL-2) propagherà una risposta dei linfociti T citotossici causando un rigetto cellulare acuto. Il riconoscimento degli HLA del donatore da parte dei linfociti B causa la propagazione di una risposta dei linfociti B della memoria e la produzione di DSA. I complessi HLA-DSA stimolano la via classica del sistema del

complemento causando il rigetto mediato da anticorpi (figura 1).

[0035] I DSA possono complessarsi con il primo componente della via classica del complemento (C1) portando a C1q/r/s e C4 attivati, portando infine alla formazione di complessi di attacco alla membrana (C5b-9) ed al rilascio di citochine infiammatorie. Queste citochine (per esempio IL-2, IL-6 ed altre) richiamano neutrofilii ed altri mediatori (per esempio il fattore di crescita derivato dalle piastrine) per suscitare una risposta infiammatoria locale che può condurre a fibrosi (cicatizzazione irreversibile) dei tessuti, risposta endoteliale e danno, che portano a coagulazione e trombosi dei capillari e dei vasi maggiori all'interno del trapianto. Il grado e l'immediatezza del danno dipende da se (e a quale grado) i DSA sono preesistenti.

[0036] Il riconoscimento degli HLA del donatore da parte di DSA preesistenti (con attivazione della via classica del complemento) causa la perdita immediata (iperacuta) o precoce (entro 1-3 mesi - accelerata) dell'allotrapianto trapiantato. Tale patologia può essere alleviata in modo temporaneo mediante protocolli di desensibilizzazione prima del trapianto (per esempio plasmaferesi e/o IVIg) diretti al miglioramento di DSA, ma che forniscono solo attività a vita breve in approssimativamente il 50% di tali pazienti.

[0037] Inoltre, l'evidenza clinica indica che i pazienti che richiedono una biopsia dell'allotrapianto renale per diminuita funzione renale ed hanno DSA nel loro siero con colorazione per C4d (evidenza di attivazione del complemento) alla biopsia dell'allotrapianto renale hanno un rischio di perdita del trapianto tre volte superiore rispetto ai pazienti senza DSA o colorazione per C4d alla biopsia. Anche i dati da modelli animali supportano il ruolo del complemento nel rigetto dell'allotrapianto. In uno studio di allotrapianto in scimmie *Cynomolgus*, tra gli animali con DSA noti, il 54% delle scimmie con C4d presente all'istopatologia ha sviluppato la TG, in confronto ad un tasso di TG di solo il 4% nelle scimmie trapiantate senza alcuna evidenza di C4d alla biopsia.

[0038] Le proteine terminali del complemento (C5b-9) (il prodotto dell'attivazione della via classica del complemento mediata da anticorpi) possono provocare la produzione di fattori di crescita derivati da fibroblasti e piastrine dalle cellule endoteliali causando fibrosi intinale, un segno caratteristico di rigetto irreversibile dei trapianti renali. Un modello preclinico di topo di trapianto renale sensibilizzato ha mostrato una migliorata sopravvivenza del trapianto negli animali riceventi un inibitore di C5 come immunosoppressione adiuvante. In

uno studio su 16 soggetti umani sensibilizzati riceventi un trapianto renale a cui è stato somministrato l'anticorpo monoclonale anti-C5 eculizumab dopo il trapianto, solo 1/16 (6%) ha sviluppato AMR acuto entro il primo mese dopo il trapianto in confronto a ~40% dei controlli storici. Tuttavia, tutti hanno avuto una persistente colorazione per C4d e 4/16 (25%) hanno avuto variazioni significative corrispondenti ad attivazione di cellule endoteliali/TG. Il monitoraggio a lungo termine ha rivelato che quasi il 50% di questi pazienti ha avuto TG dopo la cessazione della terapia, in modo non diverso rispetto al controllo storico.

[0039] Componenti della trasduzione del segnale più prossimali della cascata classica del complemento possono avere un ruolo importante nell'alloimmunità. Per esempio, i topi carenti di proteine del complemento C3 o C4 hanno avuto risposte alloimmunitarie dei linfociti T e dei linfociti B compromesse nei confronti di trapianti cutanei eterogenei per complesso maggiore di istocompatibilità, mentre topi carenti di C5 non hanno esibito una risposta alloimmunitaria compromessa. Conseguentemente, vi è una maggiore efficacia teorica di C1-INH rispetto ad un agente inibente C5 per la prevenzione o per il trattamento dell'AMR. La presente invenzione fornisce una tale terapia, utilizzando un trattamento con C1-INH che fornisce un effetto terapeutico di lunga durata che soddisfa le richieste nel campo.

[0040] La presente invenzione riguarda un inibitore della C1-esterasi per uso in un metodo di trattamento del rigetto mediato da anticorpi (AMR) di un allotrapianto d'organo in un paziente che lo richieda, in cui il metodo include la somministrazione endovenosa del C1-INH ad una dose da 5000 unità a 25000 unità fornita in dosi suddivise nel corso di da 10 a 20 giorni. Gli allotrapianti d'organo che possono essere preservati dal rigetto secondo i metodi qui descritti includono gli organi solidi. Esempi rappresentativi di organi solidi includono cuore, fegato, polmone, pancreas, intestino e rene. In alcune forme di realizzazione, l'organo solido può essere il rene. Nella presente invenzione, il C1-INH viene utilizzato per trattare un AMR che consegue da un trapianto allogenico. In via esplicativa, il trapianto allogenico è un tipo di trapianto che si differenzia sostanzialmente dallo xenotrapianto. Il trapianto allogenico prevede il trapianto di organi che provengono dalla stessa specie (trapianto da uomo a uomo). Al contrario, lo xenotrapianto implica il trapianto di organi che provengono da specie differenti (per esempio trapianto d'organo da maiale a uomo). Coloro che hanno abilità ordinaria nell'arte

pertinente riconoscerebbero che la cessazione della terapia con C1-INH causerebbe l'AMR immediato nello xenotrapianto. Tuttavia, ciò non è attinente nell'allograpianto umano poiché non vi è sensibilizzazione incrociata tra specie.

[0041] Come qui utilizzati, i termini "trattamento", "trattare" e simili si riferiscono a mezzi per ottenere un effetto farmacologico o fisiologico desiderato, per esempio. L'effetto può essere profilattico in termini di prevenzione completa o parziale di una patologia, un aspetto, una malattia o un sintomo e/o può essere terapeutico in termini di una cura parziale o completa per una patologia e/o un effetto avverso attribuibile ad una patologia o ad una malattia. Senza essere limitati ad una qualsiasi teoria di operazione, si ritiene che il C1-INH utilizzato per il trattamento secondo l'invenzione prevenga e/o tratti l'AMR nei trapianti d'organo mediante l'inibizione di componenti del sistema del complemento.

[0042] Verrà inteso da quanto detto sopra che mediante la somministrazione di un inibitore della C1-esterasi (C1-INH) come descritto e definito qui, da solo o in combinazione con altri principi biologicamente attivi così come descritti e definiti qui e facoltativamente combinati con ulteriori passaggi di trattamento così come descritti e definiti qui, si possono ottenere il trattamento e/o la prevenzione dell'AMR di un allograpianto d'organo. I seguenti effetti possono essere ottenuti mediante la presente invenzione.

[0043] Un miglioramento o un incremento della sopravvivenza del trapianto in un paziente ricevente un trapianto d'organo positivo per l'abbinamento donatore-ricevente (per esempio un organo per cui il paziente ha DSA circolanti, che possono essere identificati attraverso analisi di abbinamento donatore-ricevente prima del trapianto (saggio di citotossicità dipendente dal complemento o citometria a flusso)). Questo può essere confrontato con un paziente che non viene trattato secondo l'invenzione, o con lo stesso paziente prima del trattamento secondo l'invenzione.

[0044] In alternativa, l'uso di C1-INH in un metodo di trattamento dell'AMR secondo la presente descrizione può quindi essere descritto come uso per migliorare o incrementare la sopravvivenza del trapianto in un paziente ricevente un trapianto d'organo (per esempio di un rene) positivo per l'abbinamento donatore-ricevente.

[0045] Poiché l'AMR dell'organo da donatore dopo il trapianto può condurre a glomerulopatia cronica (CG) e/o

a glomerulopatia da trapianto (TG), alla perdita dell'organo donato o a sopravvivenza ridotta del trapianto (o a ridotti tassi di sopravvivenza del trapianto ad 1 anno), in alternativa l'uso del C1-INH in un metodo di trattamento dell'AMR secondo la presente invenzione può quindi essere espresso come uso in un metodo per ridurre l'incidenza della glomerulopatia cronica (CG) e/o della glomerulopatia da trapianto (TG).

[0046] Nel contesto del trapianto renale, i metodi possono portare ad una funzione renale aumentata e/o sostenuta di un rene trapiantato in confronto ad un paziente che non viene trattato secondo l'invenzione, o allo stesso paziente prima del trattamento secondo l'invenzione. Pertanto, l'uso del C1-INH in un metodo di trattamento dell'AMR secondo la presente descrizione può essere espresso come uso per aumentare e/o sostenere la funzione renale di un rene trapiantato in un paziente.

[0047] Poiché si ritiene che l'uso di C1-INH secondo la presente descrizione prevenga e/o tratti l'AMR nei trapianti d'organo mediante l'inibizione di componenti del sistema del complemento, l'uso di C1-INH secondo la presente descrizione può anche essere descritto come uso per trattare o per prevenire la distruzione tissutale derivante dall'attivazione del complemento, per esempio in un paziente con allotrapianto.

[0048] Pertanto, secondo la presente descrizione, qualsiasi riferimento al C1-INH per uso nel trattamento o nella prevenzione dell'AMR può essere inteso ad essere un riferimento al C1-INH per uso in uno o più dei suddetti usi.

[0049] Inoltre, il termine "durata a breve termine", come utilizzato in relazione al trattamento, si riferisce alla durata delle attività di trattamento con un farmaco (per esempio al periodo di somministrazione), che può vantaggiosamente avvenire da circa 1 a 30 giorni. In alcuni aspetti, la durata a breve termine del trattamento può essere da circa 10 a 20 giorni. In un aspetto preferito, la durata a breve termine del trattamento può essere di circa 13 giorni (per esempio circa da 11 a 18, da 12 a 15 giorni).

[0050] Il termine "precoce", come utilizzato qui riguardo al trattamento, si riferisce alla tempistica del trattamento, che può vantaggiosamente avvenire o essere iniziato entro da 1 a 90 giorni da: (1) trapianto d'organo, (2) trattamento con lo standard di cura (plasmaferesi e/o IVIg) e/o (3) diagnosi di AMR. In aspetti preferiti, il trattamento può avvenire o essere iniziato in meno di circa da 5 a 10 giorni. Il trattamento può quindi

avvenire o essere iniziato in meno di circa da 5 a 10 giorni da (1) trapianto d'organo, (2) trattamento con lo standard di cura (plasmaferesi e/o IVIg) e/o (3) diagnosi di AMR, e può durare circa da 10 a 30 giorni.

[0051] La “glomerulopatia cronica” o “CG” è un marcatore clinico dell'AMR in un paziente con trapianto d'organo e, come utilizzato qui, si riferisce a manifestazioni dannose che si trovano nel tessuto renale compresi, per esempio, glomerulosclerosi, ispessimento della membrana basale glomerulare e laminazione, e/o infiammazione dei glomeruli in atto. Può anche essere presente vasculite peritubulare. L'uso del C1-INH secondo l'invenzione può portare ad una minore o diminuita incidenza di CG nei pazienti trattati in confronto ad un paziente che non viene trattato secondo l'invenzione, o allo stesso paziente prima del trattamento secondo l'invenzione. Questo effetto può essere osservato, per esempio, mediante osservazione del tessuto in campioni appropriati, per esempio utilizzando esame istologico o EM, come indicato negli esempi.

[0052] Il termine “glomerulopatia da trapianto” o “TG”, come utilizzato qui, si riferisce alla glomerulopatia cronica (CG) che si verifica nel contesto del trapianto. TG e CG possono essere utilizzati in modo intercambiabile per descrivere l'invenzione.

[0053] Sarà inteso che il paziente è generalmente un paziente con trapianto d'organo (per esempio un paziente con trapianto o con allotrapianto renale, per esempio che ha ricevuto o che deve ricevere un trapianto o un allotrapianto). Il paziente può sperimentare o può essere a rischio di AMR. L'AMR può originarsi come risultato di anticorpi specifici per il donatore (DSA) preesistenti, per esempio anticorpi specifici per il donatore presenti prima del trapianto o DSA de novo. Il paziente può essere trattato con una o più altre terapie per l'AMR (per esempio immunoglobulina endovenosa (IVIg) o una combinazione di plasmaferesi ed IVIg, o plasmaferesi) o può essere stato trattato con una o più altre terapie per l'AMR. Il trattamento è preferibilmente per diminuire i titoli di DSA, in cui gli anticorpi sono diretti nei confronti degli HLA dell'organo da trapiantare o che è stato trapiantato.

[0054] Così, i pazienti a rischio di AMR includono pazienti con determinati anticorpi specifici per il donatore (DSA). Ciò costituisce generalmente una controindicazione al trapianto, indipendentemente da altri fattori che possono indicare una corrispondenza per un donatore. Questi pazienti possono anche essere descritti come

“sensibilizzati”.

[0055] Il paziente può essere un paziente con malattia renale allo stadio terminale (ESRD). Il paziente con ESRD può avere un anticorpo (DSA) preesistente diretto contro gli antigeni leucocitari umani (HLA) di superficie cellulare del donatore (per esempio pazienti con ESRD sensibilizzati).

[0056] Se un paziente è sensibilizzato, può essere stato facoltativamente sottoposto ad un trattamento per desensibilizzarlo o può essere sottoposto a tale trattamento al momento del trattamento dell'invenzione (per esempio un trattamento per diminuire i titoli di DSA, per esempio immunoglobulina endovenosa (IVIg) o una combinazione di plasmateresi ed IVIg, o plasmateresi). Il paziente può quindi essere stato sottoposto ad un trattamento, o può essere sottoposto a tale trattamento per diminuire i titoli di DSA, per esempio sottoposto ad immunoglobulina endovenosa (IVIg) o ad una combinazione di plasmateresi, o a plasmateresi). Il trattamento desensibilizzante è preferibilmente un trattamento desensibilizzante per diminuire i titoli di DSA, in cui gli anticorpi sono diretti contro gli HLA dell'organo da trapiantare o che è stato trapiantato.

[0057] Laddove il paziente sia stato sottoposto ad un trattamento per diminuire i titoli di DSA, per esempio sottoposto ad immunoglobulina endovenosa (IVIg) o ad una combinazione di plasmateresi, o a plasmateresi, questo è preferibilmente entro la settimana, 2 settimane, 4 settimane, 1 mese, 6 settimane, 2 mesi o 6 mesi che precedono, o entro l'anno che precede, per esempio, l'inizio del trattamento dell'invenzione.

[0058] L'inibitore della C1-esterasi (C1-INH) è una proteina plasmatica endogena della famiglia degli inibitori delle serin proteasi (SERPIN) ed ha un'ampia attività inibitoria nelle vie metaboliche di complemento, contatto e coagulazione. Il C1-INH inibisce la via classica del sistema del complemento legando C1r e C1s, ed inibisce le serin proteasi associate alla lectina legante il mannosio nella via della lectina. Il C1-INH della presente invenzione può essere un C1-INH derivato da plasma o può essere un C1-INH prodotto per via ricombinante, e può essere isolato in entrambi i casi. Preferibilmente, il C1-INH dell'invenzione è un C1-INH derivato da plasma. Preferibilmente il C1-INH dell'invenzione è nanofiltrato.

[0059] I termini “unità” o “U”, come utilizzati qui, si riferiscono alla misura di materiale proteico (C1-INH) che è normalizzata per i livelli fisiologici nell'uomo (cioè, 1U/ml di siero è fisiologica). In alternativa, se non

indicato diversamente, una (1) unità indica 240 µg di materiale proteico.

[0060] Un C1-INH derivato da plasma nanofiltrato (Cinryze®; Viropharma) è approvato dall'FDA per profilassi di routine nei confronti di attacchi di angioedema nei pazienti adolescenti ed adulti con angioedema ereditario (HAE), una malattia caratterizzata da deficienza o disfunzione costituzionali dell'inibitore della C1-esterasi endogeno.

[0061] Cinryze® è noto essere ben tollerato nell'uomo attraverso l'esperienza nei pazienti con HAE studiati in studi clinici randomizzati, così come in uno studio clinico di estensione. Gli eventi avversi più frequenti riportati alle dosi utilizzate per l'HAE sono stati emicranie e nasofaringite. Il C1-INH è un agente terapeutico ideale, da solo o come parte di una terapia o composizione di combinazione, per malattie che implicano, per esempio, la via classica del complemento (per esempio malattie mediate da anticorpi) e la via della lectina (per esempio danno da ischemia/riperfusion), e si preferisce nell'invenzione. Viene anche citato conestat alfa; l'analogo ricombinante dell'inibitore della C1-esterasi umano (rhC1-INH) (che viene prodotto mediante tecnologia del DNA ricombinante nel latte di conigli transgenici). Il termine "quantità efficace", come utilizzato qui, si riferisce alla quantità di un composto o di una composizione che consegue un esito clinico vantaggioso quando il composto o la composizione vengono somministrati ad un paziente. Per esempio, quando una composizione dell'invenzione viene somministrata ad un paziente, per esempio con AMR, un "esito clinico vantaggioso" comprende una funzione renale aumentata e/o sostenuta e/o un aumento della longevità dell'allotrapianto del paziente (per esempio del rene trapiantato). Come utilizzato qui, il termine "funzione renale" viene definito in relazione alla capacità dei reni di un paziente di eliminare la creatinina dall'organismo. Così, per esempio, un paziente che mostra un'aumentata funzione renale si presenterebbe con una determinata capacità di eliminazione della creatinina (ml/min) (cioè, un livello basale), e tali capacità di eliminazione della creatinina o funzione renale aumenterebbero in grandezza dal livello basale durante il trattamento e dopo il trattamento. Qualsiasi incremento può essere statisticamente significativo, per esempio, ed include incrementi almeno del 10%, del 20%, del 50% e del 100%. Può essere realizzato qualsiasi confronto con un paziente che non viene trattato secondo l'invenzione, o con lo stesso paziente prima del trattamento secondo l'invenzione.

[0062] Un risultato vantaggioso può essere valutato anche, per esempio, determinando la presenza o il grado di CG e/o TG (una riduzione della presenza o del grado di CG e/o TG essendo un risultato vantaggioso). Nella misura in cui ciò possa essere quantificato, qualsiasi tale diminuzione può essere statisticamente significativa, per esempio, ed include una diminuzione almeno del 10%, del 20%, del 50% e del 100%. Può essere realizzato qualsiasi confronto con un paziente che non viene trattato secondo l'invenzione, o con lo stesso paziente prima del trattamento secondo l'invenzione.

[0063] L'esito clinico vantaggioso può essere ottenuto e valutato o determinato in qualsiasi istante. In linea con l'osservazione che l'invenzione fornisce un effetto terapeutico di lunga durata, l'esito clinico vantaggioso può essere ottenuto e valutato o determinato più di circa da 3 a 6 mesi dopo la cessazione della terapia (per esempio più di circa 3, 4, 5, 6 mesi dopo la cessazione della terapia, o circa 6 mesi o circa 1 anno dopo la cessazione della terapia). Come risultato dell'invenzione, il rene può mostrare (i) funzione aumentata e/o sostenuta e/o (ii) ridotti presenza e/o grado di CG e/o TG circa da 3 a 6 mesi dopo la cessazione della terapia (per esempio più di circa 3, 4, 5, 6 mesi dopo la cessazione della terapia, o circa 6 mesi o circa 1 anno dopo la cessazione della terapia). Può essere realizzato qualsiasi confronto con un paziente che non viene trattato secondo l'invenzione, o con lo stesso paziente prima del trattamento secondo l'invenzione.

[0064] Il termine "isolato", come utilizzato qui nel descrivere un materiale, per esempio, si riferisce ad un materiale rimosso dal suo ambiente originale (per esempio dall'ambiente naturale, se esso è presente in natura). Per esempio, un polipeptide presente in natura (cioè, una proteina) presente in un animale vivente non è isolato, ma lo stesso polipeptide, separato da alcuni o da tutti i materiali coesistenti nel sistema naturale, è isolato.

[0065] Inoltre, i "polipeptidi" o le "proteine" utilizzati nel mettere in pratica la presente invenzione possono essere proteine naturali, proteine sintetizzate, o possono essere preferibilmente proteine ricombinanti. Inoltre, le proteine qui descritte possono essere prodotti purificati naturalmente, o prodotti sintetizzati chimicamente, o prodotti ricombinanti da ospiti procariotici o eucariotici (per esempio da cellule di batterio, lievito, pianta superiore, insetto o mammifero). Tali proteine possono essere glicosilate o non glicosilate a seconda dei differenti ospiti utilizzati.

[0066] Per quanto riguarda le proteine ricombinanti utilizzate nel mettere in pratica l'invenzione, le proteine C1-INH ricombinanti (rC1-INH) possono essere espresse o prodotte mediante tecnologia del DNA ricombinante convenzionale utilizzando una sequenza polinucleotidica specifica per C1-INH, come noto nell'arte. Generalmente, tale procedura ricombinante comprende i seguenti passaggi:

- (1) trasfettare o trasformare le cellule ospiti appropriate con il polinucleotide o sue varianti codificanti la proteina C1-INH dell'invenzione o il vettore comprendente il polinucleotide;
- (2) sottoporre a coltura le cellule ospiti in un terreno appropriato; e
- (3) isolare o purificare la proteina dal terreno o dalle cellule.

In pratica, gli agenti dell'invenzione possono essere somministrati come unità di dosaggio separate o formulati per la somministrazione insieme, secondo procedure ben note a coloro che sono esperti nell'arte. Si veda, per esempio, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, ventesima edizione, A. Genaro et al., Lippencot, Williams & Wilkins, Baltimora, Maryland (2000).

[0067] Quando si applicano i metodi qui descritti mediante cosomministrazione, in cui vengono utilizzate formulazioni di dosaggio separate, il C1-INH ed il principio biologicamente attivo possono essere somministrati simultaneamente, o separatamente in momenti scaglionati, cioè consecutivamente. Le composizioni, le preparazioni ed i kit secondo la presente descrizione possono comprendere un C1-INH ed un altro principio biologicamente attivo come qui descritto per uso concomitante o sequenziale.

[0068] La somministrazione concomitante secondo l'uso della presente invenzione può includere la somministrazione di due o più agenti, composizioni o componenti dell'invenzione (per esempio i componenti delle composizioni dell'invenzione) simultaneamente e/o entro 12 ore l'uno dall'altro, entro 6 ore, entro 3 ore, entro 2 ore o entro 1 ora l'uno dall'altro, tipicamente entro la stessa visita presso un centro clinico. La somministrazione sequenziale può includere la somministrazione di due o più agenti, composizioni o componenti dell'invenzione (per esempio i componenti delle composizioni dell'invenzione) entro 1 mese, entro 2 settimane (per esempio entro  $14 \pm 2$  giorni), entro una settimana, entro 3 giorni, entro 2 giorni o entro 24 ore l'uno dall'altro.

[0069] Metodi adatti di introduzione delle composizioni qui descritte ad un paziente includono, ma non sono limitati a, le vie intradermica, intramuscolare, intraperitoneale, endovenosa, sottocutanea, intranasale, intraoculare, epidurale ed orale. Inoltre, le composizioni qui descritte possono essere somministrate mediante infusione o iniezione in bolo, mediante assorbimento attraverso le pareti epiteliali o mucocutanee (per esempio mucosa orale, mucosa rettale ed intestinale, ecc.). Come qui descritto, la somministrazione può inoltre essere sistemica o locale, e la somministrazione può essere acuta o cronica (per esempio giornalmente, settimanalmente, mensilmente, ecc.). La via endovenosa è esemplificata e preferita.

L'unità di dosaggio somministrata per via orale può essere sotto forma di compresse, compresse a forma di capsula, confetti, pillole, semisolidi, capsule di gelatina molle o dura, soluzioni, emulsioni, sospensioni acquose o oleose, o sciroppi. Esempi rappresentativi di forme di dosaggio per la somministrazione parenterale includono soluzioni o sospensioni iniettabili, supposte, formulazioni in polvere quali microcristalli o spray di aerosol. La composizione può anche essere incorporata in un sistema di rilascio transdermico convenzionale.

[0070] I metodi qui descritti si riferiscono alla somministrazione di composti comprendenti C1-INH. Tali composti possono essere presenti in una composizione, per esempio in una composizione farmaceutica.

[0071] Nei metodi qui descritti, le composizioni descritte possono essere somministrate ad una dose nell'intervallo da circa 10 unità (U) di composizione o composto per kg di peso corporeo (U/kg) a circa 250U/kg, per esempio per giorno di trattamento, o preferibilmente a giorni alterni. Una dose circa da 25 a 150U/kg, e preferibilmente circa da 50 a 125U/kg per giorno di trattamento, o preferibilmente a giorni alterni, dovrebbe essere efficace a produrre il risultato desiderato. A titolo d'esempio, una dose adatta per una somministrazione e.v. includerebbe un'infusione endovenosa iniziale di circa 100U/kg il giorno 1, cui seguono circa 50U/kg, per esempio 50U/kg, il giorno 3 (e facoltativamente circa 50U/kg, per esempio 50U/kg, nei trattamenti successivi, per esempio su un totale da 10 a 30, per esempio da 10 a 20 giorni o, preferibilmente, 13 giorni, (per esempio circa da 11 a 18, da 12 a 15 giorni)). I composti utilizzati nel metodo descritto possono essere somministrati tipicamente da 1 a 4 volte al giorno o a giorni alterni, in modo da rilasciare il suddetto regime di dosaggio.

[0072] Inoltre, il dosaggio delle composizioni qui descritte può essere espresso come quantità di composto o composizione suddivisa equamente o non equamente nel corso di un ciclo di trattamento. Per esempio, un ciclo di trattamento può durare circa da 1 a 30 giorni (per esempio da 10 a 20 giorni o, preferibilmente, 13 giorni (per esempio circa da 11 a 18, da 12 a 15 giorni)) e possono essere somministrate circa da 1000 a 25000 unità (U) della composizione in dosi suddivise nel corso di quel ciclo di trattamento. In alcuni aspetti, circa da 5000 a 20000 unità della composizione possono essere somministrate mediante e.v. in dosi suddivise da 10 a 20 giorni o, preferibilmente, 13 giorni (o circa 6000-25000 U, da 8000 a 22000 U, 10000-20000 U, 12000-18000 U, 14000-16000 U, 20000 U nel corso di, per esempio, da 10 a 20 giorni o, preferibilmente, 13 giorni (per esempio circa da 11 a 18, da 12 a 15 giorni)); è stato dimostrato che 20000 U nel corso di 13 giorni sono efficaci. Il C1-INH dell'invenzione è per uso in un metodo di trattamento dell'AMR di un allotrapianto d'organo in un paziente che lo richieda, in cui il C1-INH viene somministrato per via endovenosa ad una dose da 5000 a 25000 unità fornita in dosi suddivise nel corso di da 10 a 20 giorni. Secondo alcune forme di realizzazione della presente invenzione, il C1-INH per uso in un metodo di trattamento dell'AMR di un allotrapianto d'organo viene somministrato ad una dose totale di 2000 U suddivisa nel corso di 13 giorni, in cui la dose iniziale è 5000 U, e sei ulteriori dosi di 2500 U di C1-INH vengono somministrate a giorni alterni dopo la dose iniziale.

[0073] In alcune forme di realizzazione della presente descrizione, i dosaggi delle composizioni vengono definiti come quantità di composto o composizione che sono sufficienti a raggiungere una quantità di composto o composizione che è superiore almeno del 100% rispetto ai valori normali, per esempio determinata 1 ora dopo la somministrazione. In alcune forme di realizzazione, il livello superiore almeno del 100% rispetto ai valori normali è mantenuto durante il corso del trattamento, per esempio circa da 1 a 30 giorni (per esempio da 10 a 20 giorni o, preferibilmente, 13 giorni (per esempio circa da 11 a 18, da 12 a 15 giorni)).

[0074] Tuttavia, l'esatto regime di somministrazione dei composti qui descritti dipenderà necessariamente dalle necessità del singolo soggetto che viene trattato, dal tipo di trattamento somministrato e dal giudizio del medico specialista curante. Come qui utilizzati, i termini "soggetto" e "paziente" comprendono sia l'uomo che gli animali. Come comprenderanno coloro che sono esperti nell'arte, il dosaggio effettivamente somministrato

dipenderà dalla condizione che viene trattata, dall'età, dalla salute e dal peso del soggetto ricevente, dal tipo di trattamento concomitante, semmai presente, e dalla frequenza del trattamento. Inoltre, la quantità di dosaggio efficace può essere determinata da un esperto nell'arte sulla base di prove dell'attività empirica di routine per misurare l'attività biologica del/dei composto/i in un saggio biologico, e stabilendo così il dosaggio appropriato da somministrare.

[0075] Inoltre, il C1-INH per uso in un metodo di trattamento dell'AMR di un allotrapianto d'organo secondo la presente invenzione può essere somministrato come adiuvante a terapia di plasmferesi e/o IVIg. Per esempio, in un metodo esemplificativo, una composizione comprendente C1-INH (per esempio Cinryze®) può essere somministrata ad un paziente come 20000 unità fornite in dosi suddivise (ciascuna dose non eccedente circa 100U/kg) nel corso di da 10 a 20 giorni come adiuvante a plasmferesi e/o IVIg. Tale trattamento può ridurre il tasso di AMR cronico a 3-6 mesi dopo la cessazione della terapia.

[0076] In certe situazioni, il C1-INH utilizzato nel mettere in pratica l'invenzione può essere rilasciato come composizione farmaceutica che comprende un mezzo veicolante farmaceuticamente accettabile. Per esempio, viene qui descritta una composizione farmaceutica per trattare o per ritardare la progressione del rigetto mediato da anticorpi (AMR) di un allotrapianto d'organo in un paziente che lo richieda, la composizione comprendendo un inibitore della C1-esterasi (C1-INH); un ulteriore principio biologicamente attivo, quale una preparazione antilinfocitaria, rituximab, bortezomib, eculizumab, immunoglobulina (Ig) o una loro combinazione; ed un mezzo veicolante farmaceuticamente accettabile.

[0077] Come utilizzato qui, l'espressione "mezzo veicolante farmaceuticamente accettabile" comprende qualsiasi e tutti i solventi, diluenti o altri veicoli liquidi, adiuvanti di dispersione o di sospensione, agenti di superficie, agenti isotonici, agenti addensanti o emulsionanti, conservanti, leganti solidi, lubrificanti, riempitivi e simili adatti per la particolare forma di dosaggio desiderata. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, ventesima edizione, A.R. Genaro et al., parte 5, Pharmaceutical Manufacturing, pagg. 669-1015 (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimora, Maryland/Filadelfia, Pennsylvania) (2000)) descrive vari veicolanti utilizzati nella formulazione di composizioni farmaceutiche e tecniche note per la loro preparazione. Eccetto nel caso in

cui qualche mezzo veicolante farmaceutico convenzionale sia incompatibile con le composizioni qui descritte, quale per produzione di un effetto biologico indesiderato o altrimenti interazione in modo dannoso con qualsiasi altro componente di una formulazione comprendente il/i principio/principi attivo/i, il suo uso è contemplato essere nell'ambito di questa invenzione.

[0078] Più specificamente, nella produzione di forme di dosaggio solide, alcune composizioni farmaceutiche qui descritte possono essere miscelate con eccipienti inorganici o organici farmaceuticamente inerti, quali lattosio, saccarosio, glucosio, gelatina, malto, gel di silice, amido o suoi derivati, talco, acido stearico o suoi sali, latte scremato in polvere, oli vegetali, da petrolio, animali o sintetici, cera, grasso, polioli e simili. In soluzioni, emulsioni o sospensioni liquide o sciroppi si possono utilizzare eccipienti quali acqua, alcoli, soluzione acquosa salina, destrosio acquoso, polioli, glicerina, lipidi, fosfolipidi, ciclodestrine, oli vegetali, da petrolio, animali o sintetici. Le supposte possono includere eccipienti quali oli vegetali, da petrolio, animali o sintetici, cera, grasso e polioli. Le formulazioni per aerosol possono includere gas compressi adatti per questo scopo, quali ossigeno, azoto e biossido di carbonio. La composizione o la formulazione farmaceutica qui descritte possono anche contenere uno o più additivi compresi, senza limitazione, conservanti, stabilizzanti, per esempio stabilizzanti UV, emulsionanti, dolcificanti, sali per regolare la pressione osmotica, tamponi, materiali di rivestimento ed antiossidanti.

[0079] La presente descrizione fornisce inoltre forme di dosaggio terapeutico a rilascio controllato, a rilascio prolungato o a rilascio esteso per la composizione farmaceutica, in cui la composizione è incorporata in un sistema di rilascio. Questa forma di dosaggio controlla il rilascio del/dei principio/principi attivo/i in modo tale da poter mantenere una concentrazione efficace del/dei principio/principi attivo/i nel circolo sanguigno in un periodo di tempo prolungato, con la concentrazione nel sangue che rimane relativamente costante, per migliorare gli esiti terapeutici e/o per minimizzare gli effetti collaterali. Inoltre, un sistema a rilascio controllato fornirebbe minime variazioni da picco a valle nei livelli plasmatici del sangue del principio attivo dell'invenzione.

[0080] Inoltre, vari sistemi di rilascio sono noti e possono essere utilizzati per somministrare le composizioni che comprendono C1-INH, o C1-INH in combinazione con un materiale biologicamente attivo, quale

immunoglobulina (Ig), rituximab, bortezomib e/o eculizumab, per esempio. Inoltre, tali composizioni possono essere, per esempio, incapsulate in liposomi, microparticelle e microcapsule, per esempio.

[0081] I metodi qui descritti includeranno normalmente un monitoraggio medico per determinare l'effetto terapeutico o profilattico apportato al paziente che si sottopone al trattamento con il/i composto/i e/o la/le composizione/i descritti qui.

[0082] I risultati degli esperimenti descritti nel seguente esempio dimostrano che il C1-INH derivato da plasma disponibile in commercio può trattare o prevenire il rigetto di un trapianto d'organo nei pazienti che manifestano AMR. Questo esempio viene fornito solo per scopi illustrativi e non è inteso a limitare l'invenzione in alcun modo.

#### Esempi

[0083] Uno studio pilota controllato con placebo in doppio cieco randomizzato è stato utilizzato per valutare la sicurezza e l'effetto di Cinryze® (inibitore della C1-esterasi [umano]) per il trattamento del rigetto acuto mediato da anticorpi in soggetti riceventi trapianti di rene sensibilizzati per il donatore. Gli obiettivi dello studio sono stati: (a) verificare la sicurezza e la tollerabilità di Cinryze® in pazienti con trapianto renale con rigetto acuto mediato da anticorpi (AMR); (b) verificare l'effetto di Cinryze® per il trattamento dell'AMR acuto in pazienti con trapianto renale; e (c) esaminare la farmacocinetica e la farmacodinamica di Cinryze® in pazienti con trapianto renale con AMR acuto.

[0084] Nel presente studio, non vi sono stati alcuna interruzione del trattamento, alcun decesso ed alcun evento avverso grave correlato al farmaco dello studio.

[0085] Cinryze® è stato fornito come polvere liofilizzata di 500 U (C1-INH)/fiala. Sono stati utilizzati il prodotto Cinryze® ed acqua sterile per iniezioni approvata per la distribuzione commerciale. Ciascuna fiala di Cinryze® è stata ricostituita con acqua sterile per iniezione/i. Il placebo è consistito di cloruro di sodio allo 0,9% per infusione.

[0086] Dosaggio. I soggetti hanno ricevuto un totale di 7 dosi di farmaco dello studio (Cinryze® o placebo) nel corso di un periodo di 2 settimane (figura 2): un'infusione endovenosa iniziale (e.v.) di 5000 U di Cinryze® (da

non superare 100U/kg) o placebo il giorno 1, cui seguono 2500 U di Cinryze® (da non superare 50U/kg) o placebo e.v. nei giorni 3, 5, 7, 9, 11 e 13. Se la terapia di plasmateresi è avvenuta lo stesso giorno della somministrazione del farmaco dello studio, il farmaco dello studio è stato somministrato dopo il completamento della sessione di plasmateresi.

[0087] Disegno dello studio. Lo studio ha valutato la sicurezza e l'effetto di Cinryze® nel trattamento dell'AMR acuto in soggetti riceventi un trapianto renale sensibilizzati per gli HLA del donatore (figura 2). Per minimizzare la variabilità, lo studio è stato condotto solo presso istituzioni che utilizzano plasmateresi e/o immunoglobulina endovenosa (IVIg), se necessario, per la desensibilizzazione della positività per i DSA e trattamento dell'AMR acuto. I soggetti dello studio hanno avuto un trapianto renale che ha raggiunto un'adeguata funzione dopo il trapianto ed un primo episodio ("qualificante") di AMR confermato mediante biopsia con concomitante DSA identificati prima o dopo l'allograpianto renale più recente.

[0088] Come illustrato nella figura 2, le valutazioni dopo il trattamento sono state eseguite il giorno 20 ed il giorno 90. Il termine dello studio è stato definito come la data in cui l'ultimo soggetto ha completato la valutazione del giorno 90. I livelli del complemento e di C1-INH sono stati valutati a tempi prefissati fino al giorno 20 per le determinazioni PK/PD. Inoltre, è stato incluso un punto temporale di campionamento PK/PD facoltativo il giorno 25. Inoltre, 6 mesi dopo il trattamento è stata fornita un'ulteriore valutazione da 14 soggetti ugualmente randomizzati (n=7 placebo; n=7 Cinryze) trattati in modo simile presso un singolo centro trapianti per determinare l'esito clinico.

[0089] Somministrazione del farmaco dello studio. Sulla base dei dati preclinici e clinici disponibili, i livelli fisiologici di C1-INH sufficienti per l'inibizione della via del complemento provocata da complessi antigene-anticorpo sono superiori almeno del 100% rispetto ai valori normali. Dopo la somministrazione e.v. di 2000 U di Cinryze® nei soggetti sani, la variazione media dal livello basale nell'attività funzionale di C1-INH è stata approssimativamente del 50-60%. Dato che in 1 ml di plasma si trova 1 U di attività di C1-INH, per incrementare l'attività funzionale di C1-INH di almeno il 100% nei pazienti con AMR acuto, può essere richiesta una dose di circa 5000 U in un adulto medio. Dato che Cinryze® ha un'emivita di circa 60 ore nei pazienti con

HAE, dosi successive di 2500 U fornite a giorni alterni possono mantenere adeguati livelli di C1-INH funzionale per tutto il periodo di somministrazione. Quindi, i soggetti randomizzati al gruppo con Cinryze® in questo studio riceveranno una dose di carico di 5000 U (da non superare 100U/kg), cui seguono 2500 U (da non superare 50U/kg) a giorni alterni per un totale di 7 dosi. Questo regime bilancia l'evidente natura dipendente dalla dose di inibizione dell'attivazione del complemento provocata da complessi antigene-anticorpo, minimizzando al tempo stesso il rischio potenziale di coagulazione osservato in studi preclinici e clinici con altri composti C1-INH a dosi  $\geq 200$ U/kg.

[0090] Come esposto sopra, è stato somministrato un totale di 7 dosi di Cinryze® o placebo (soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% per infusione) come segue: (a) una dose iniziale di 5000 U di Cinryze® (da non superare 100U/kg) o placebo come singola infusione e.v. il giorno 1; e quindi (b) 2500 U di Cinryze® (da non superare 50U/kg) o placebo e.v. a giorni alterni per 2 settimane (giorni 3, 5, 7, 9, 11 e 13). Ciascuna dose del farmaco dello studio si è dovuta somministrare e.v. ad una velocità di approssimativamente 1 ml (corrispondente a 100 U di Cinryze®) al minuto, come tollerato. Quindi, la durata dell'infusione di 5000 U (50 ml) il giorno 1 è dovuta essere approssimativamente di 50 minuti, e la durata delle infusioni di 2500 U (25 ml) nei giorni 3, 5, 7, 9, 11 e 13 è dovuta essere approssimativamente di 25 minuti. Si sono dovuti registrare i momenti e le date di "inizio" ed "arresto" di ciascuna infusione del farmaco dello studio.

[0091] Plasmaferesi, plasma congelato fresco ed IVIg. Per l'episodio qualificante di AMR si è dovuta eseguire la terapia di plasmaferesi. Indipendentemente dal programma di plasmaferesi, il farmaco dello studio si è dovuto somministrare nei giorni 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13. Inoltre, come dimostrato nella figura 3, ad alcuni pazienti è stato fornito lo standard di cura, come necessario, che ha incluso plasmaferesi, sostituzione del plasma sotto forma di plasma congelato fresco (FFP), sangue e/o IVIg (per esempio Cytogam, Gamunex, ecc.).

[0092] Farmacocinetica/farmacodinamica. Nel presente studio, è stata intrapresa un'analisi della farmacocinetica e della farmacodinamica di Cinryze® rispetto al placebo. In relazione alle analisi farmacocinetiche, sono stati determinati i livelli funzionali ed antigenici di C1-INH per i singoli soggetti. I parametri PK primari sono stati calcolati utilizzando dati della concentrazione contro il tempo corretti per il livello basale a seguito dell'ultima

dose (giorno 13) e tecniche non compartimentali, nel modo appropriato. I livelli di C1-INH funzionale sono stati analizzati nei pazienti ricevanti C1-INH o placebo per l'intero periodo temporale del trattamento (figura 4A). Come atteso, la quantità media della coorte di C1-INH funzionale corretta per i livelli basali è stata maggiore nei pazienti ricevanti il C1-INH (Cinryze®) nei giorni 3, 5, 7, 9, 11 e 13. Inoltre, la differenza della concentrazione plasmatica media di C1-INH funzionale corretta per il livello basale è evidente il giorno 13, quando la concentrazione è stata misurata per un periodo temporale più breve (figura 4B). Così, nei pazienti trattati con Cinryze® e plasmateresi (e/o IVIg), vi è stata una maggiore concentrazione di C1-INH funzionale (cioè, proteasi inibitrice attiva della via classica del complemento) in confronto al placebo (cioè, plasmateresi (e/o IVIg) da sole).

[0093] In relazione alle analisi farmacodinamiche, sono stati valutati i livelli di C1q, C4 e C4a del complemento per i singoli soggetti. Sono stati prelevati campioni di sangue per la determinazione delle concentrazioni plasmatiche di C1-INH funzionale ed antigenico e dei componenti del complemento C1q, C4 e C4a (tabella 1). Se si è dovuta eseguire la plasmateresi in un giorno di somministrazione, i campioni di sangue per le prove PK/PD si sono dovuti ottenere prima della plasmateresi, così come prima della somministrazione del farmaco dello studio (cioè, dopo la plasmateresi), ed in momenti temporali relativi all'inizio dell'infusione del farmaco dello studio.

Tabella 1. Studio degli effetti farmacocinetici e farmacodinamici di Cinryze® rispetto al placebo

	Cinryze®	Placebo
Antigene (U/ml)	0,477	0,118
Funzione (U/ml)	0,994	0,309
C1q (µg/ml)	37,9	17,2
C4 (ng/ml)	113	70
C4a (ng/ml)	55	400

[0094] In relazione alla tabella 1, i pazienti con Cinryze® hanno mostrato un aumentato C1-INH funzionale e l'inibizione del sistema classico del complemento, in cui i livelli basali sono stati sottratti per il calcolo della

media per dimostrare l'effetto complessivo della terapia con il farmaco dello studio in ciascuna coorte. In confronto al placebo, i pazienti con Cinryze® hanno mostrato livelli aumentati (sopra i livelli basali di ingresso) di C1-INH sia antigenico che funzionale nel plasma, indicando una maggiore concentrazione di C1-INH attivo e totale oltre i livelli a cui i pazienti hanno cominciato la loro somministrazione dello studio. I livelli di antigene C1-INH riportati si basano su una misurazione della concentrazione in peso della proteina con conversione a U/ml utilizzando il fattore di conversione  $0,067\text{U/ml} = 1\text{mg/1dl}$  (se non indicato diversamente). Infatti, l'intervallo non aggiustato (in cui non sono stati sottratti i livelli basali) per il C1-INH funzionale è stato di 1,59-2,02U/ml al termine della terapia con Cinryze®. Tuttavia, ciò non è stato statisticamente differente rispetto all'intervallo non aggiustato per i pazienti trattati con placebo. Tuttavia, vi è stata una differenza visibile della coorte quando esaminata per C1-INH superiore al loro livello d'ingresso.

[0095] I pazienti con Cinryze® hanno mostrato un'evidenza di inibizione sistemica del sistema del complemento nella fase fluida. I pazienti trattati con Cinryze® hanno mostrato una concentrazione plasmatica aumentata (livelli d'ingresso corretti per il livello basale) di C1q e C4, che sono proteine della via classica del complemento che mostrerebbero una concentrazione diminuita nel plasma se la via classica del complemento non venisse inibita. Tuttavia, poiché la concentrazione di C1q e C4 è aumentata, questo indica un certo livello di inibizione sistemica.

[0096] Infine, l'inibizione della via classica del complemento è confermata dalla concentrazione plasmatica diminuita di C4a in confronto al placebo. Di solito, a seguito dell'attivazione del sistema del complemento, C4 viene convertito in C4a, riducendo quindi la concentrazione plasmatica di C4. La presente analisi indica che, nei pazienti trattati con C1-INH esogeno (Cinryze®) aggiuntivo, si è manifestato un aumento della proteina funzionale C1-INH che, apparentemente, ha condotto all'inibizione sistemica del sistema del complemento. Nell'esaminare gli effetti fisiologici del trattamento con C1-INH, la figura 5 descrive le differenze nella funzione renale media (cioè, nell'eliminazione della creatinina) tra la coorte dei pazienti trattati con Cinryze® o placebo in combinazione con plasmaferesi (e/o IVIg) per il periodo temporale di 13 giorni.

[0097] La glomerulopatia cronica (CG) è un marcatore clinico di AMR in un paziente con trapianto. La figura 6A rappresenta tessuto renale normale a sei mesi. La figura 6B mostra la CG come risultato di AMR in atto. In quei pazienti trattati con placebo, 3 su 7 hanno manifestato CG, mentre in quei pazienti trattati con Cinryze® solo 1 su 7 ha manifestato CG. Questi studi tissutali sono stati confermati mediante microscopia elettronica (EM) del tessuto renale ottenuto (figura 7). La figura 7A rappresenta un'immagine EM normale di tessuto renale, mentre la figura 7B rappresenta una microfotografia elettronica di tessuto renale avente CG. Esaminando tali microfotografie elettroniche, è stato determinato che in quei pazienti trattati con placebo come adiuvante allo standard di cura (plasmaferesi e/o IVIg), 3 su 7 hanno manifestato una patologia corrispondente alla CG, mentre in quei pazienti trattati con Cinryze® come adiuvante alla terapia standard, 1 su 7 ha manifestato una patologia corrispondente alla CG.

[0098] Inoltre, i livelli di antigene C1-INH ed i livelli di C1-INH funzionale del giorno 13 nei pazienti trattati con placebo o Cinryze® sono stati correlati con gli esiti clinici a 6 mesi dei pazienti. Dapprima sono stati misurati i livelli funzionali e di antigene C1-INH del giorno 13 aggiustati (cioè corretti) e non aggiustati per il livello basale (figura 8). I dati da queste misurazioni sono stati quindi correlati graficamente con gli esiti clinici a 6 mesi degli stessi pazienti (figure da 9A a 9H). Come mostrato nelle figure 9A e 9B, vi è stata una minore incidenza di CG in quei pazienti trattati con Cinryze® (figura 9B) in confronto a quelli trattati con placebo (figura 9A), in cui i pazienti con Cinryze® hanno manifestato CG per il 14% ed i pazienti ricevuti placebo hanno manifestato CG per il 43%.

[0099] 6 mesi dopo il trattamento è stato anche determinato che quei pazienti mostranti bassi livelli di antigene C1-INH il giorno 13 sopra i loro livelli di ingresso basali mostrano anche la presenza di CG. Così, vi è stata una correlazione osservata tra l'antigene C1-INH corretto per il livello basale e la presenza di CG nel tessuto renale.

[0100] Inoltre, i livelli antigenici e funzionali di C1-INH sierico sono stati ridotti dalla plasmaferesi, come mostrato nelle figure 10A e 10B. Per esempio, come mostrato nella figura 10, la plasmaferesi ha diminuito i livelli medi sia antigenici che funzionali di C1-INH del 17,6% (figura 10A) e del 43,3% (figura 10B), rispettivamente.

[0101] La presente descrizione fornisce metodi per utilizzare un C1-INH (per esempio Cinryze®) come terapia e/o terapia aggiuntiva ad una cura standard (cioè, plasmaferesi e IVIg: entrambe le quali sono indirizzate verso anticorpi specifici per il donatore) per trattare l'AMR in pazienti trapiantati con allotrapianto. Un aspetto inaspettato della presente invenzione è che il trattamento precoce e/o di durata a breve termine con C1-INH nei pazienti con trapianto porta ad un beneficio a più lungo termine dopo che la somministrazione del trattamento con C1-INH è stata interrotta.

[0102] Inoltre, il regime di dosaggio ha fornito vantaggi inattesi. Non è attualmente noto se i pazienti con trapianto renale potrebbero mai ottenere un livello di proteina funzionale C1-INH sufficiente abbastanza da ridurre efficacemente l'attivazione del complemento per via sistemica o all'interno dell'allotrapianto trapiantato. Infatti, è stata scelta la somministrazione di 20000 unità fornite in dosi suddivise nel corso di 13 giorni. Questa dose è stata soddisfacente non solo clinicamente, ma anche nell'incremento dei livelli funzionali di C1-INH sierico sopra il livello basale.

[0103] Conseguentemente, il presente studio ha dimostrato che laddove i pazienti con trapianto renale vengano trattati con 20000 unità di Cinryze® nel corso di 13 giorni: (a) il regime di dosaggio è stato ben tollerato dai pazienti con trapianto renale; (b) tali pazienti hanno mantenuto livelli sopra-fisiologici di C1-INH come risultato del trattamento con Cinryze®; (c) tali pazienti hanno dimostrato un precoce miglioramento della funzione renale; e (d) tali pazienti hanno mostrato minore glomerulopatia a 6 mesi rispetto al placebo. Quindi, il metodo di trattamento testato ha fornito un effetto terapeutico di lunga durata nei confronti dell'AMR in confronto ai trattamenti attualmente nel campo.

[0104] Anche se alcune forme di realizzazione della presente invenzione sono state descritte e/o esemplificate sopra, varie altre forme di realizzazione saranno evidenti a coloro che sono esperti nell'arte dalla descrizione precedente. Quindi, la presente invenzione non è limitata alle particolari forme di realizzazione descritte e/o esemplificate.

[0105] Inoltre, i termini di transizione "comprendente", "costituito essenzialmente da" e "composto da", quando utilizzati nelle rivendicazioni allegate, in forma originale e modificata, definiscono l'ambito delle rivendicazioni

in relazione a ciò che, non elencato in ulteriori elementi o passaggi delle rivendicazioni, semmai presenti, viene escluso dall'ambito della/e rivendicazione/i. Il termine "comprendente" è inteso ad essere comprensivo o senza limiti e non esclude alcun ulteriore elemento, metodo, passaggio o materiale non elencato. Il termine "composto da" esclude qualsiasi elemento, passaggio o materiale diverso da quelli specificati nelle rivendicazioni e, in quest'ultimo caso, impurezze solitamente associate al/ai materiale/i specificato/i. Il termine "costituito essenzialmente da" limita l'ambito di una rivendicazione ad elementi, passaggi o materiale/i specificati ed a quelli che non influenzano materialmente la/le caratteristica/che nuova/e e di base dell'invenzione rivendicata. Tutte le composizioni ed i metodi qui descritti che realizzano la presente invenzione, in forme di realizzazione alternative, possono essere più specificamente definiti da qualsiasi dei termini di transizione "comprendente", "costituito essenzialmente da" e "composto da."

## RIVENDICAZIONI

1. Inibitore della C1-esterasi (C1-INH) per uso in un metodo di trattamento del rigetto mediato da anticorpi (AMR) di un allotrapianto d'organo in un paziente che lo richiede, in cui il metodo comprende la somministrazione endovenosa del C1-INH ad una dose da 5000 unità a 25000 unità fornita in dosi suddivise nel corso di da 10 a 20 giorni.
2. C1-INH per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il metodo comprende la somministrazione di C1-INH, in cui la somministrazione di C1-INH viene iniziata entro da 1 a 90 giorni da trapianto d'organo, trattamento con plasmaferesi, trattamento con immunoglobulina endovenosa (IVIg) o diagnosi di AMR.
3. C1-INH per l'uso secondo le rivendicazioni 1 o 2, in cui il C1-INH è derivato da plasma o prodotto per via ricombinante.
4. C1-INH per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il paziente è stato sottoposto a plasmaferesi o è attualmente sottoposto a plasmaferesi.
5. C1-INH per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui:
  - (i) il metodo comprende inoltre il sottoporre il paziente a plasmaferesi;
  - (ii) il metodo comprende inoltre la somministrazione di plasma congelato fresco;
  - (iii) il metodo comprende inoltre la somministrazione di immunoglobulina endovenosa; e/o
  - (iv) il metodo comprende inoltre la somministrazione di una preparazione antilinfocitaria, rituximab, bortezomib, eculizumab o una loro combinazione.
6. C1-INH per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui l'organo è un organo solido, in cui facoltativamente l'organo solido viene scelto nel gruppo composto da rene, pancreas, intestino, cuore, polmone, fegato ed una loro combinazione.
7. C1-INH per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'organo è un rene.
8. C1-INH per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il C1-INH viene somministrato ad una dose totale di 20000 U.
9. C1-INH per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui la dose totale di C1-INH viene

somministrata in dosi suddivise nel corso di un periodo di 13 giorni.

10. C1-INH per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il metodo risulta in un effetto terapeutico che dura almeno 3 mesi dopo la cessazione della terapia.

11. C1-INH secondo la rivendicazione 10, in cui l'effetto terapeutico comprende una ridotta incidenza di glomerulopatia cronica e di glomerulopatia da trapianto, o la prevenzione dell'AMR.

12. C1-INH per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il C1-INH viene somministrato ad una dose totale di 20000 U suddivisa nel corso di 13 giorni, in cui la dose iniziale è di 5000 U, e sei ulteriori dosi di 2500 U di C1-INH vengono somministrate a giorni alterni dopo la dose iniziale.

13. C1-INH per l'uso secondo qualsiasi rivendicazione precedente, comprendente inoltre la somministrazione di plasmateresi e/o immunoglobulina endovenosa (IVIg).

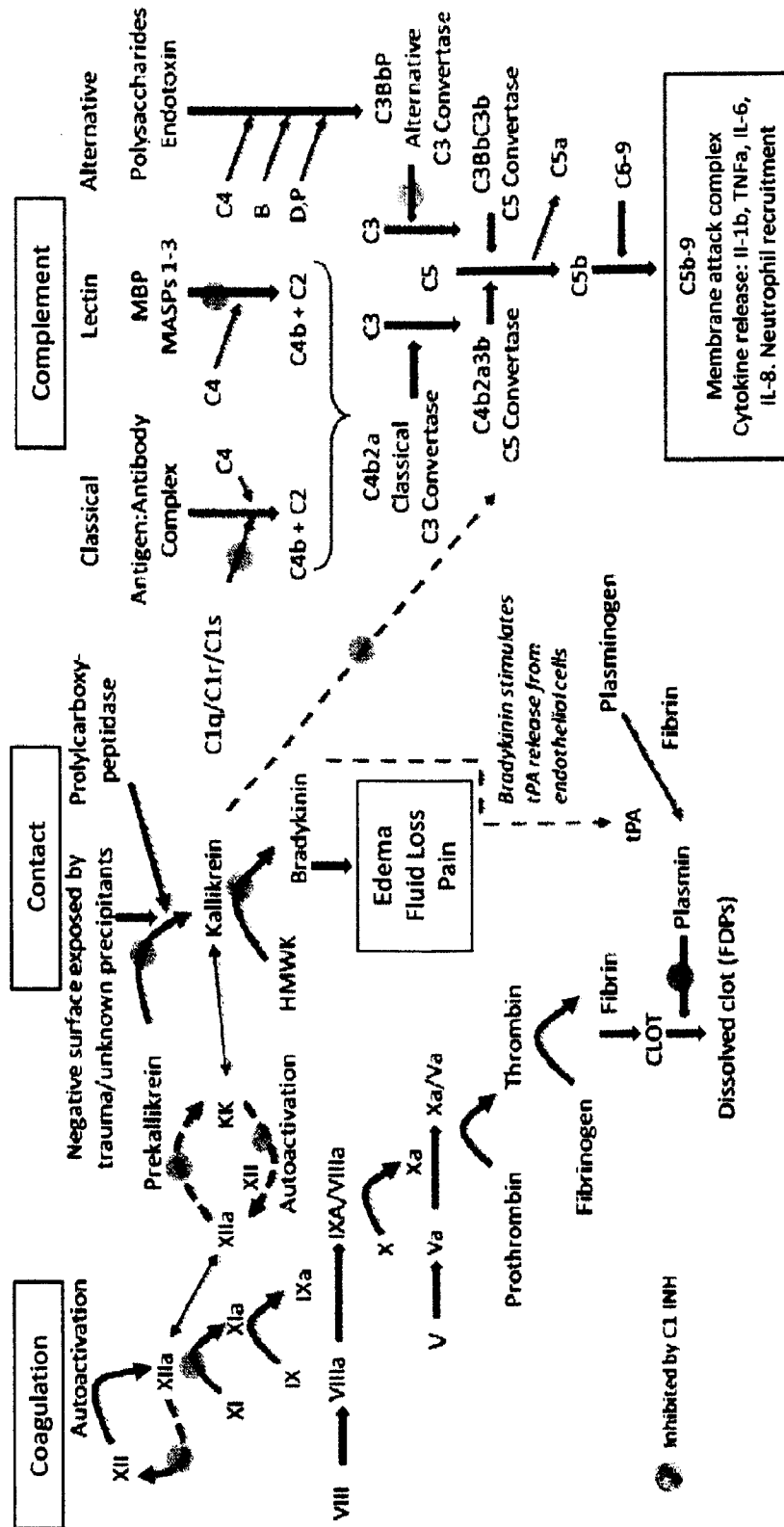
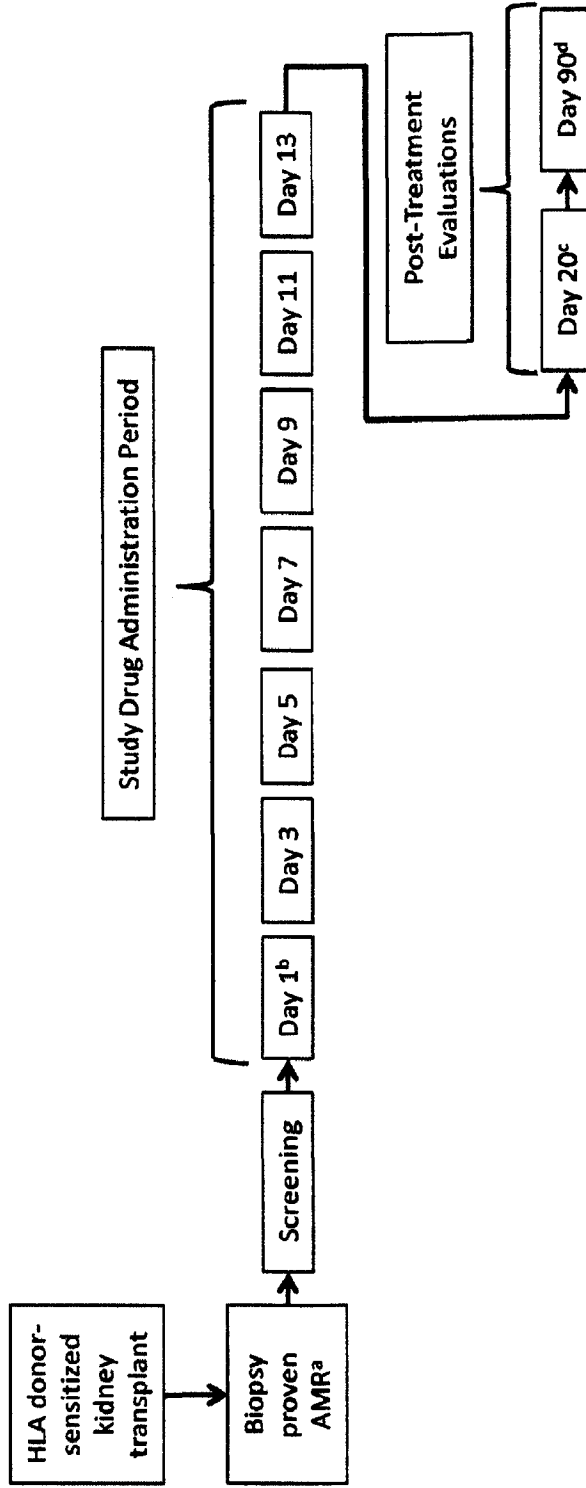


Figure 1

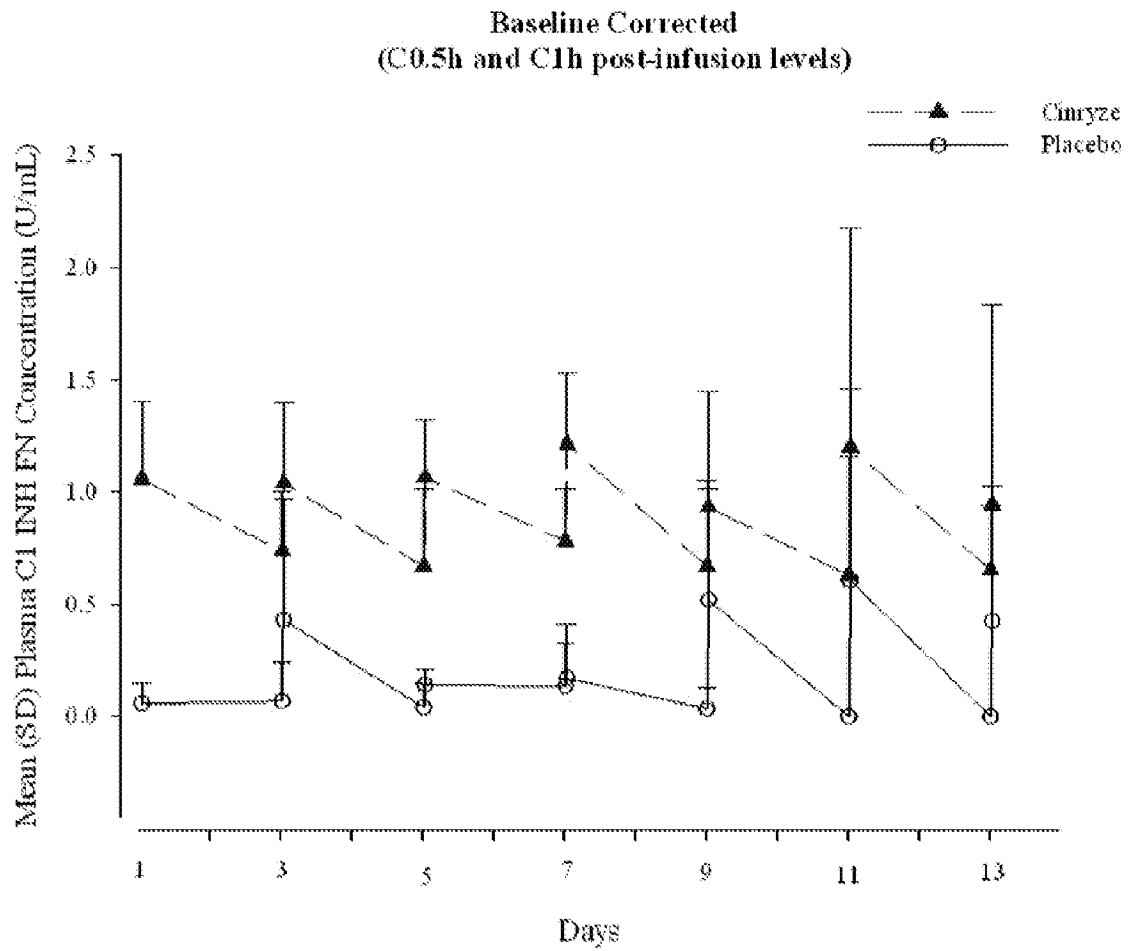


**Figure 2**

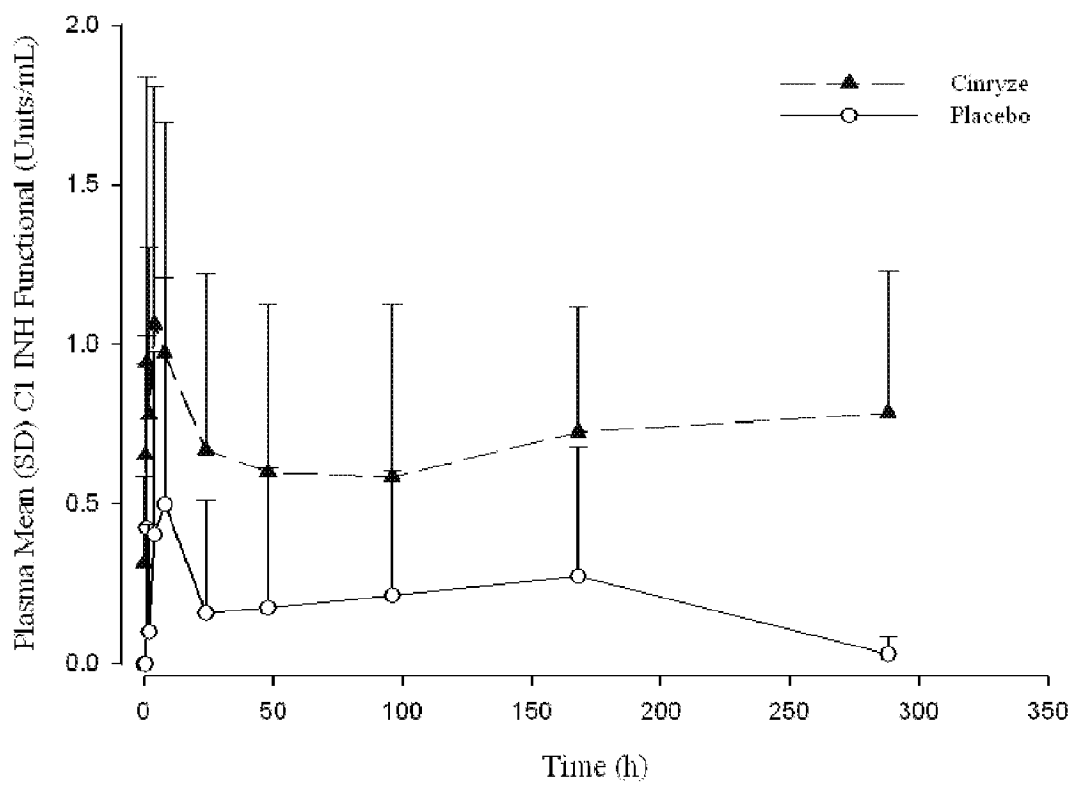
Subject Number	Plasmapheresis day(s)	Plasmapheresis # day 1-20	plasma replacement(days 1-20)	blood (days 1-20)	IVIg (days 1-20)	IVIg product
2010102	2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13-19	14	2 units FFP on days 11 and 13	none	none	n/a
2010104	2, 4, 5, 9, 15	11	2 units FFP on days 1, 9, 10	2 units PRBC on day 12	none	n/a
2010105	1, 2, 3, 5, 7	5	2 units FFP on days 2 and 3	none	none	n/a
2010106	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12	8	2 units FFP on days 2, 3, 4, 5	none	none	n/a
2010107	1, 2, 4, 6, 8, 12	6	none	none	none	n/a
2010108	2, 4, 6, 8, 11	5	none	none	6, 7000 mg on days 2, 4, 6, 8, 11	cytogram
2010109	1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12	8	none	1 unit PRBC on day 5	5000 mg on days 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 and 12	cytogram
2010110	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, 20	12	2 units FFP on days 1, 2, 3, 4, 9	1 unit PRBC on day 10	7000 mg on days 6, 11, 13, 15	cytogram
2010111	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 19	16	2 units FFP on days 1 through 12 daily	1 unit PRBC on days 2, 8, 9	7000 mg on days 14, 16, 17, 19 and 21	cytogram
2010112	1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15	9	2 units FFP on days 1 and 2	none	9, 10000 mg on days 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20	cytogram
2010113	2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17	10	2 units FFP on days 2, 3, 5, 6	none	4000 mg on days 1 through 11	cytogram
2010114	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14	11	2 units FFP on days 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13	1 unit PRBC on days 2, 3, 6, 9, 12	1,000 mg days 5, 6, 7, 9, 13, 15 and 50,000 mg days 11, 16, 17, 18, and 19	30,000 units of gammaex, 1000 mg of cytogram
2010115	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14	12	2 units FFP on days 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	1 unit PRBC on days 1 and 10	6000 mg on days 2 through 12 and 15	cytogram
2010116	1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13	8	none	1 unit PRBC on days 2 and 6	6000 mg on days 1, 7, 9, 11 and 13	cytogram
2010201	n/a	0	none	none	none	n/a
2010202	n/a	6	none	none	70 mg on days 1 and 2	unspecified
2010401	1, 3, 5, 7, 9, 11, 13	7	none	none	none	n/a
2010501	4, 6, 8, 12, 14, 16	6	none	none	none	n/a

Ave PLASMAPHERESIS DAYS / COHORT  
 CIPHERZE = 6 days  
 Phlebotomy = 7-14 days

Figure 3

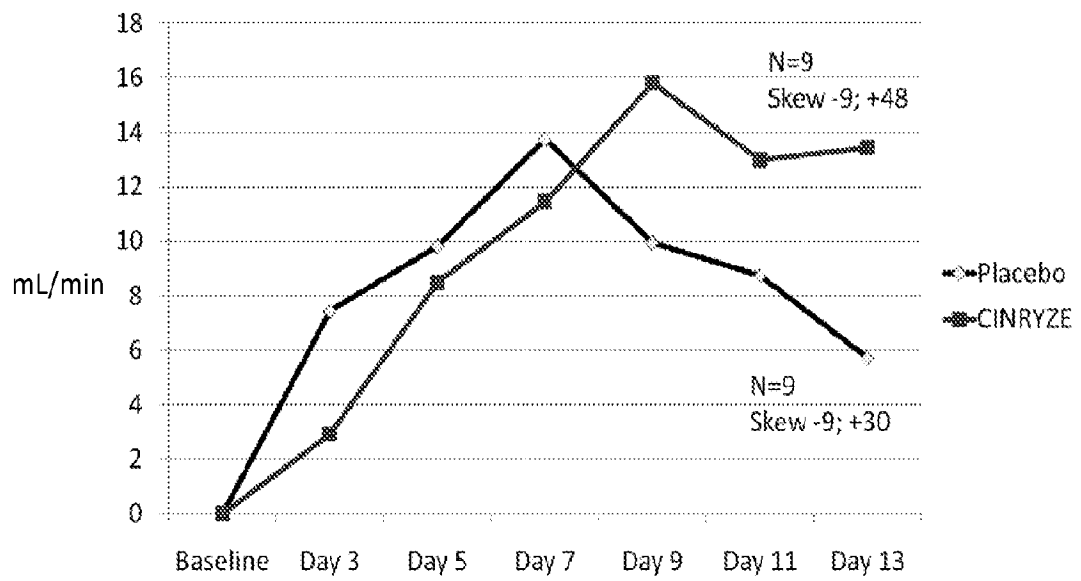
**Figure 4A**

**Day 13**  
**Baseline Corrected**

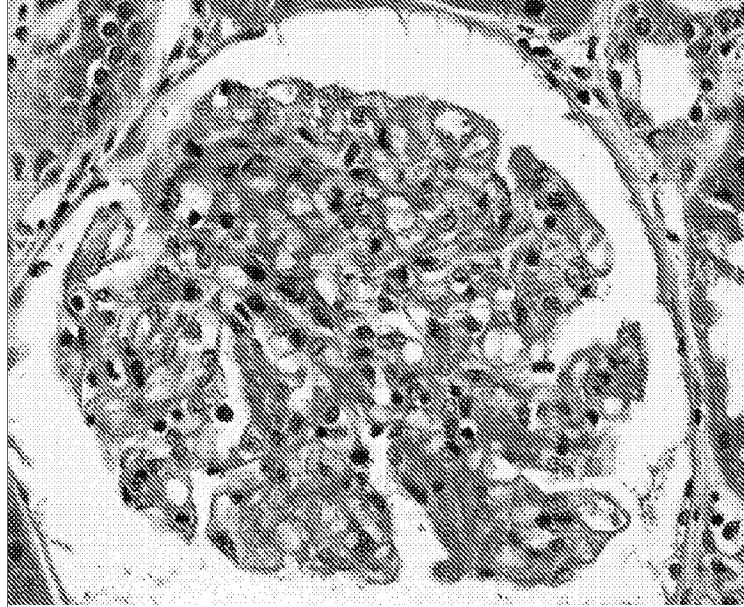


**Figure 4B**

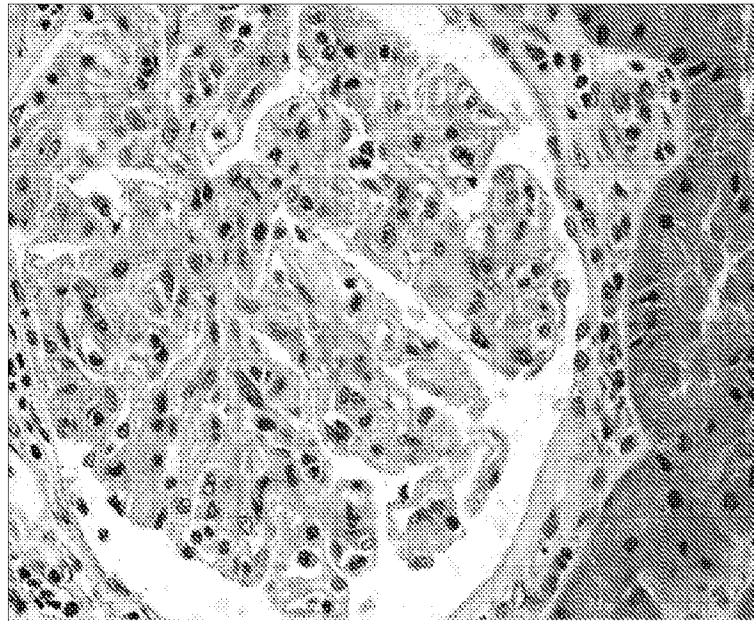
6/15



**Figure 5**



**Figure 6A**



**Figure 6B**



**Figure 7A**



**Figure 7B**

## Subjects Treated with Placebo

	Baseline Adjusted		Unadjusted	
	C1 INH Antigen (U/mL)	C1 INH Functional (U/mL)	C1 INH Antigen (U/mL)	C1 INH Functional (U/mL)
2010102	0	23	10.1	169
2010105	6	127	15	181
2010108	0	0	15	197
2010110	1.6	49	17	134
2010112	0	42	13.8	115
2010113	2.5	24	16.9	105
2010115	7	13	21.2	127

## Subjects Treated with Cinryze®

	Baseline Adjusted		Unadjusted	
	C1 INH Antigen (U/mL)	C1 INH Functional (U/mL)	C1 INH Antigen (U/mL)	C1 INH Functional (U/mL)
2010104	7	78	17	164
2010106	8	129	16	185
2010107	9	180	14	202
2010109	15	105	27	191
2010111	6.8	87	22.5	173
2010114	3.9	73	20.7	169
2010116	6.6	44	22.9	166

Figure 8

10/15

### C1 INH Ag (Baseline Corrected)

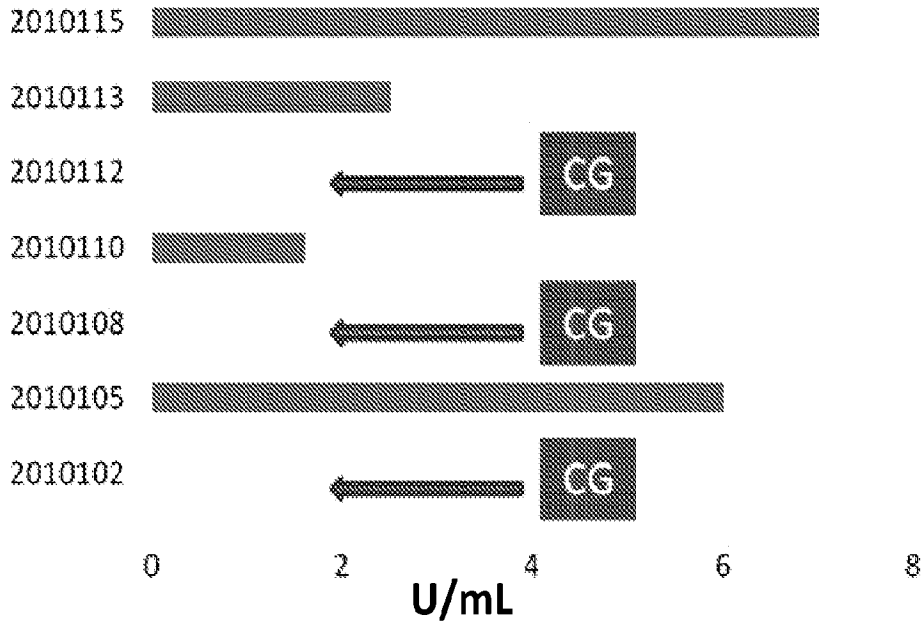


Figure 9A

### C1 INH Ag (Baseline Corrected)

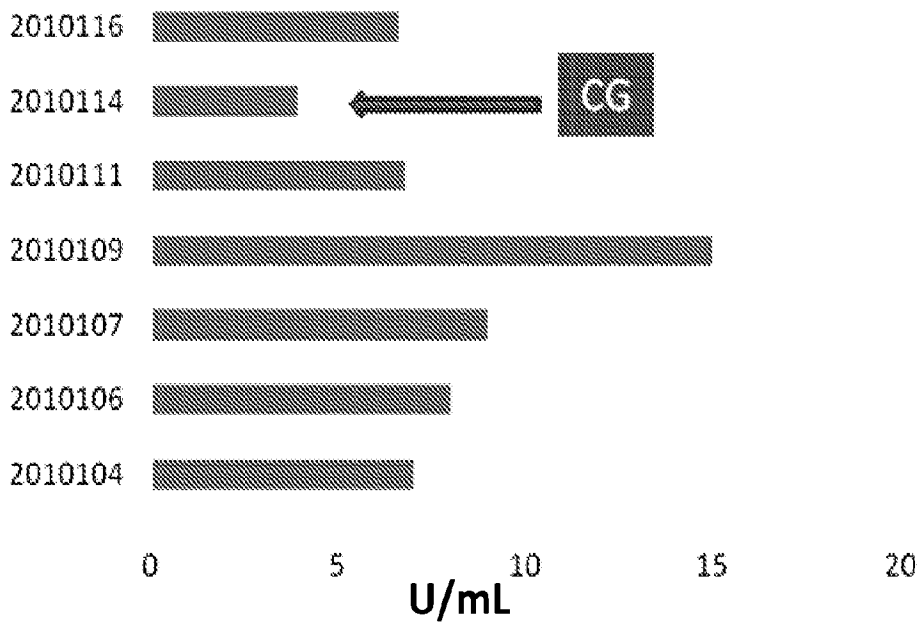


Figure 9B

### C1 INH Fncct (Baseline Corrected)

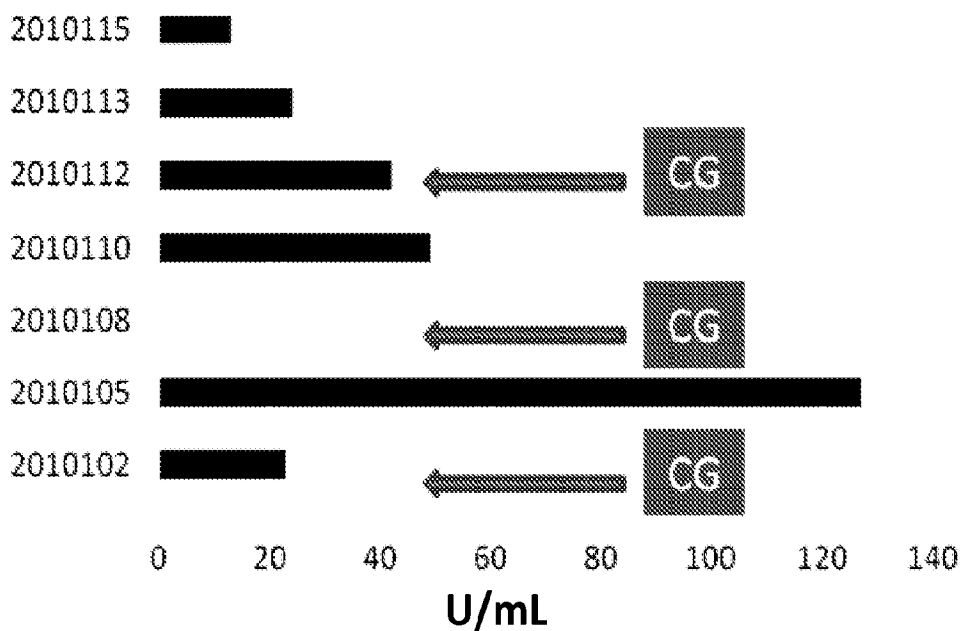


Figure 9C

### C1 INH Fncct (Baseline Corrected)

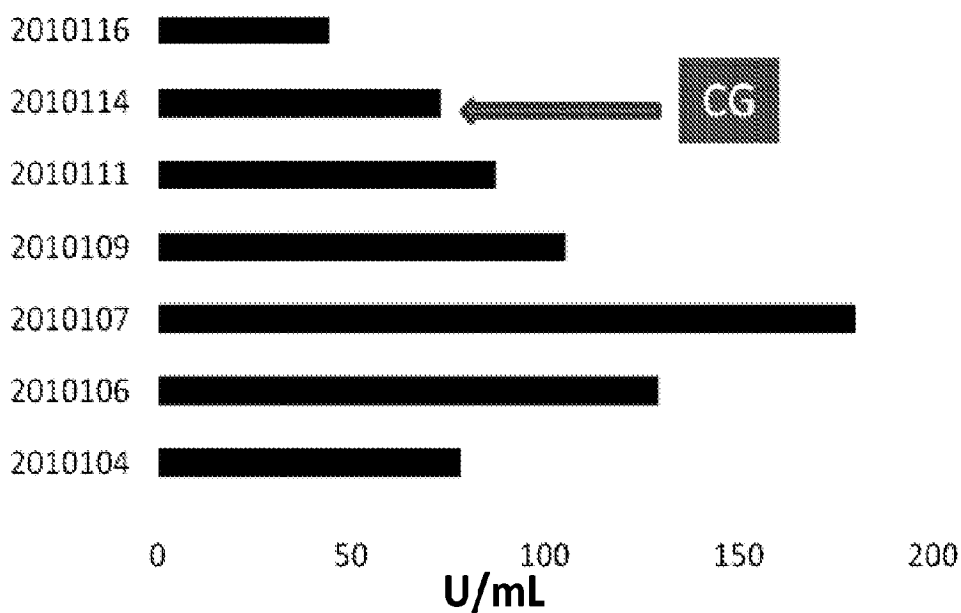


Figure 9D

12/15

### C1 INH Ag (Unadjusted)

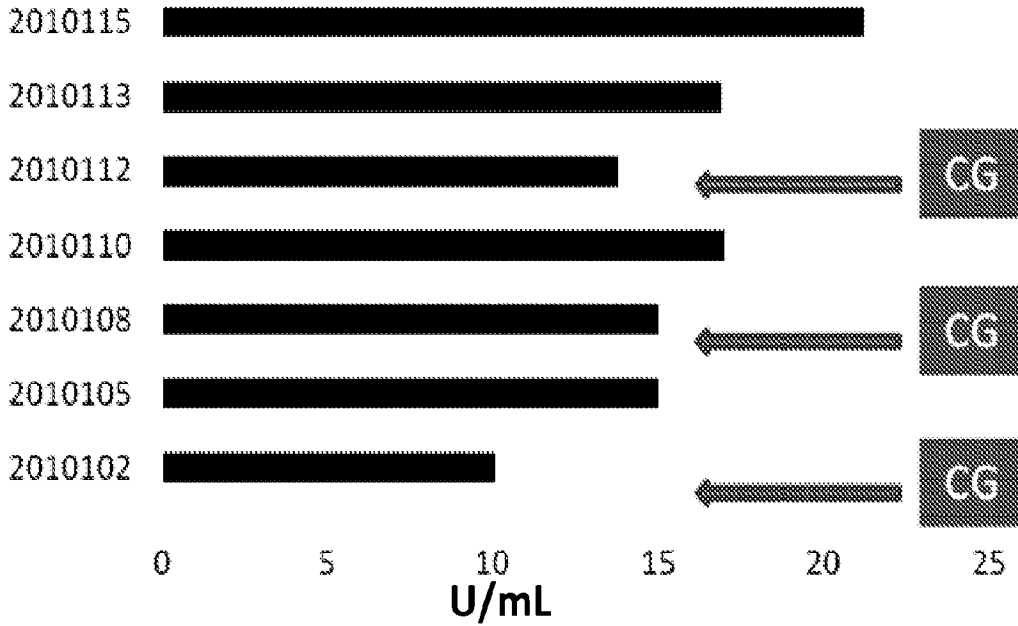


Figure 9E

### C1 INH ag (Unadjusted)

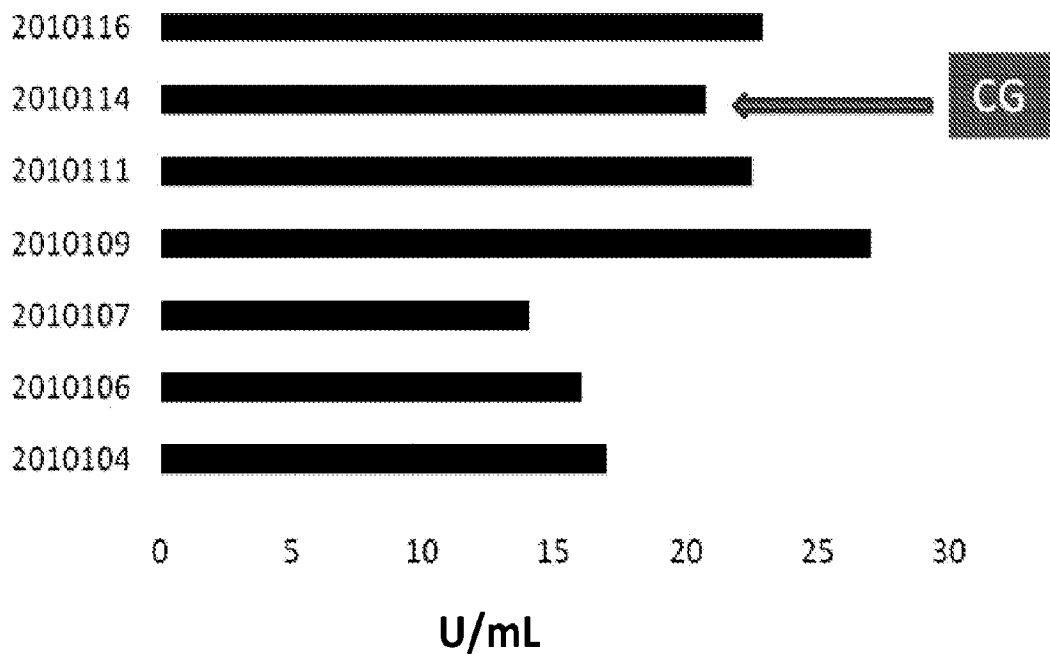


Figure 9F

### C1 INH Function (Unadjusted)

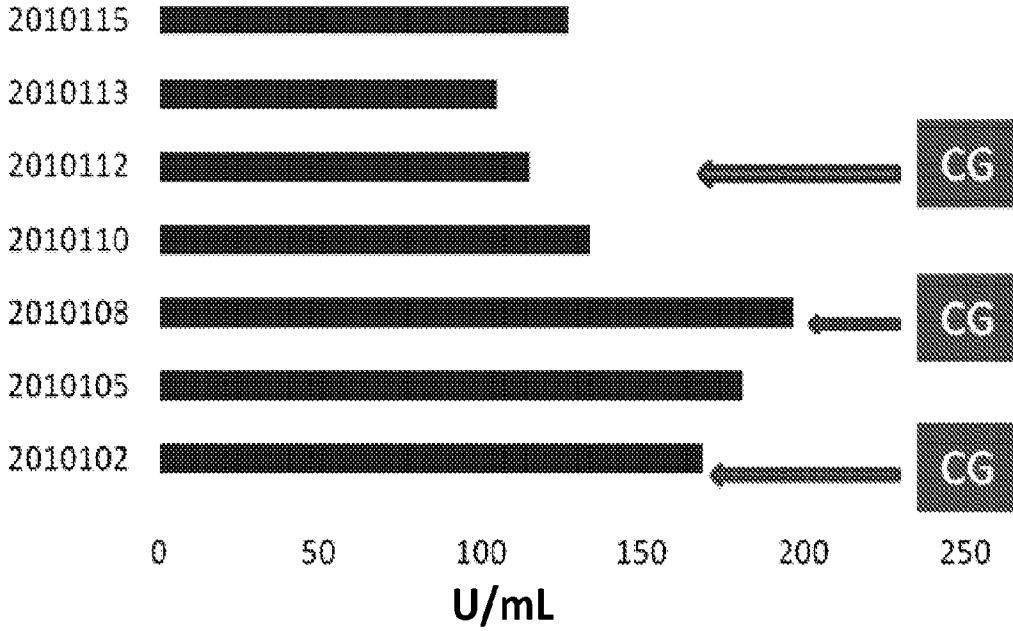


Figure 9G

### C1 INH Fnc (Unadjusted)

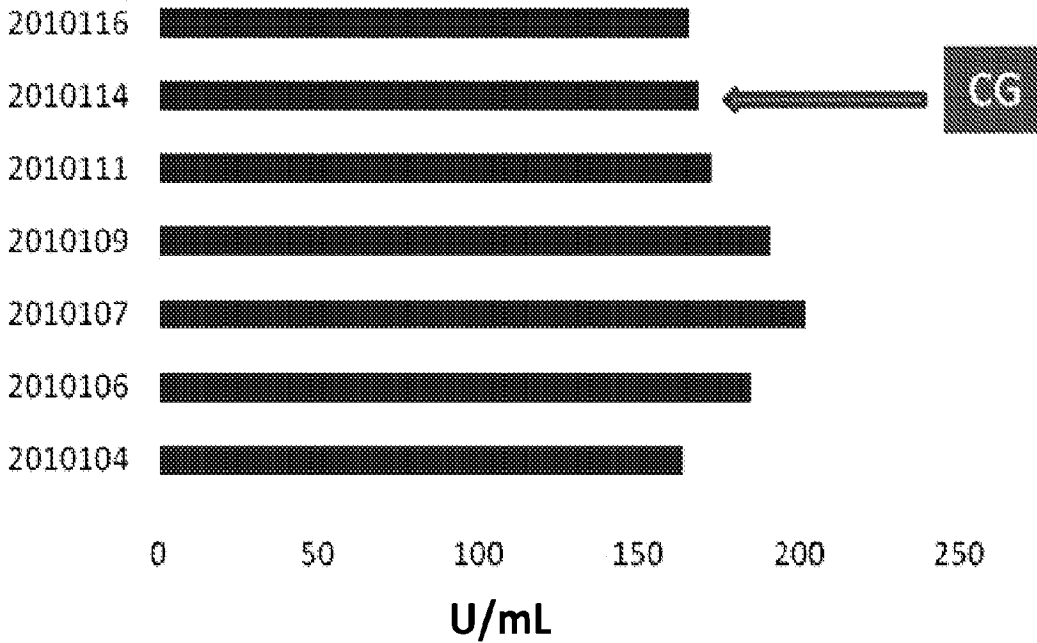
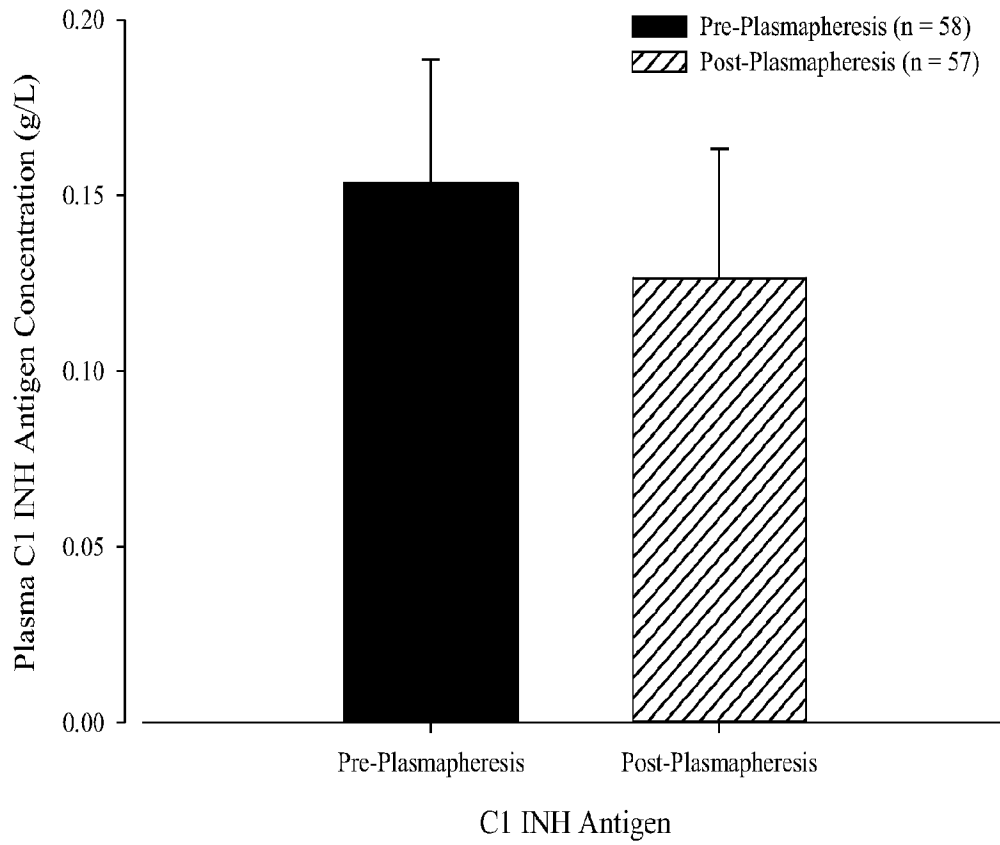
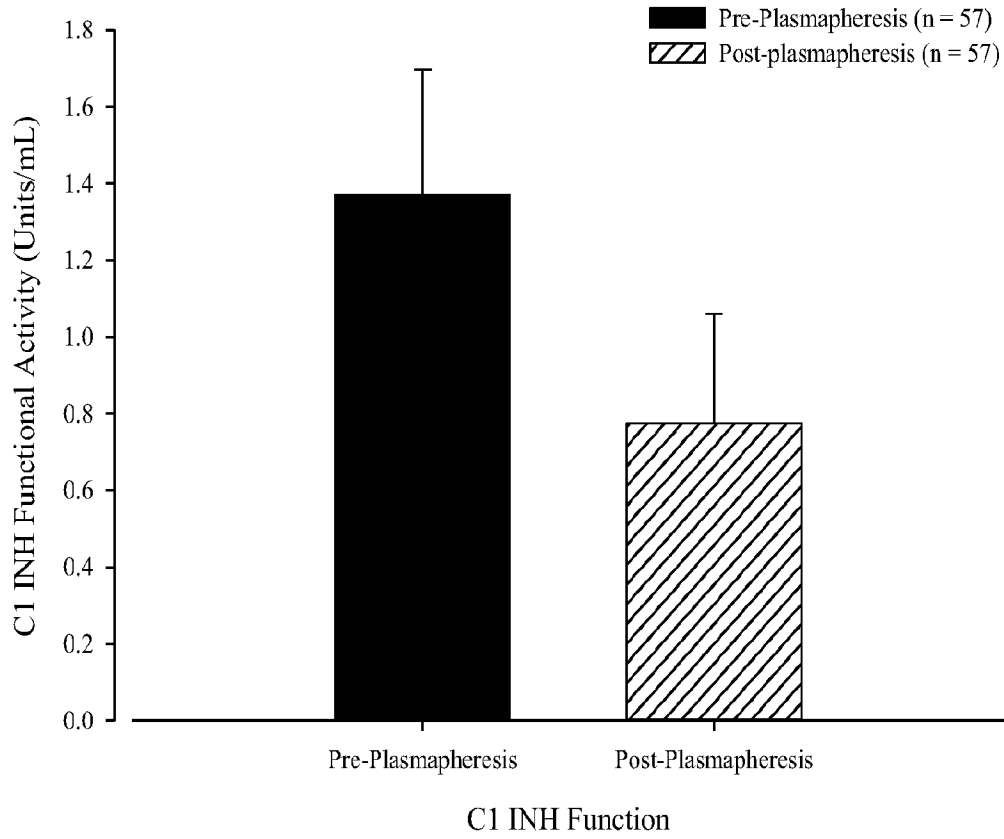


Figure 9H



**Figure 10A**

15/15



**Figure 10B**

## LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 1/15

FIGURA 1

“Figure 1” = Figura 1

“Coagulation” = Coagulazione

“Contact” = Contatto

“Complement” = Complemento

“Autoactivation” = Autoattivazione

“Negative surface exposed by trauma/unknown precipitants” = Superficie negativa esposta mediante trauma/precipitanti non noti

“Prolylcarboxy-peptidase” = Prolilcarbossipeptidasi

“Prekallikrein” = Precallicreina

“Kallikrein” = Callicreina

“Bradykinin” = Bradichinina

“Fluid Loss” = Perdita di fluido

“Pain” = Dolore

“Bradykinin stimulates tPA release from endothelial cells” = La bradichinina stimola il rilascio di tPA dalle cellule endoteliali

“Classical” = Classica

“Lectin” = Lectina

“Alternative” = Alternativa

“Antigen:Antibody Complex” = Complesso antigene:anticorpo

“MASPs 1-3” = MASP 1-3

“Polysaccharides” = Polisaccaridi

“Endotoxin” = Endotossina

Jacopo de Benedetti

USBM-043R B

“C4b2a Classical C3 Convertase” = C3-convertasi classica C4b2a

“C38bP Alternative C3 Convertase” = C3-convertasi alternativa C38bP

“C4b2a3b C5 Convertase” = C5-convertasi C4b2a3b

“C38bC3b C5 Convertase” = C5-convertasi C38bC3b

“Prothrombin” = Protrombina

“Thrombin” = Trombina

“Fibrinogen” = Fibrinogeno

“Fibrin” = Fibrina

“CLOT” = Coagulo

“Plasminogen” = Plasminogeno

“Plasmin” = Plasmina

“Dissolved clot (FDPs)” = Coagulo dissolto (FDP)

“Inhibited by C1 INH” = Inibito da C1-INH

“C5b-9 Membrane attack complex Cytokine release: IL-1b, TNFa, IL-6, IL-8. Neutrophil recruitment” =  
Complesso di attacco alla membrana C5b-9. Rilascio di citochine: IL-1b, TNFa, IL-6, IL-8. Reclutamento dei  
neutrofili

TAVOLA 2/15

FIGURA 2

“Figure 2” = Figura 2

“HLA donor-sensitized kidney transplant” = Trapianto di rene sensibilizzato per HLA del donatore

“Biopsy proven AMR<sup>a</sup>” = AMR<sup>a</sup> confermato da biopsia

“Study Drug Administration Period” = Periodo di somministrazione del farmaco dello studio

“Screening” = Selezione

“Day” = Giorno

“Post-Treatment Evaluations” = Valutazioni dopo il trattamento

TAVOLA 3/15

FIGURA 3

“Figure 3” = Figura 3

“Subject number” = Numero del soggetto

“Plasmapheresis day(s)” = Giorno/i di plasmaferesi

“Plasmapheresis # day 1-20” = Numero di giorni di plasmaferesi 1-20

“plasma replacement (days 1-20)” = Sostituzione del plasma (giorni 1-20)

“Blood (days 1-20)” = Sangue (giorni 1-20)

“IVIg (days 1-20)” = IVIg (giorni 1-20)

“IVIg product” = Prodotto di IVIg

“2 units FFP on days 11 and 13” = 2 unità di FFP nei giorni 11 e 13

“2 units FFP on days 2, 9, 10” = 2 unità di FFP nei giorni 2, 9, 10

“2 units FFP on days 2 and 3” = 2 unità di FFP nei giorni 2 e 3

“2 units FFP on days 2, 3, 4, 5” = 2 unità di FFP nei giorni 2, 3, 4, 5

“2 units FFP on days 1, 2, 3, 4, 9” = 2 unità di FFP nei giorni 1, 2, 3, 4, 9

“2 units FFP on days 1 through 12 daily” = 2 unità di FFP nei giorni da 1 a 12 quotidianamente

“2 units FFP on days 1 and 2” = 2 unità di FFP nei giorni 1 e 2

“2 units FFP on days 2, 3, 5, 6” = 2 unità di FFP nei giorni 2, 3, 5, 6

“2 units FFP on days 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13” = 2 unità di FFP nei giorni 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13

“2 units FFP on days 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11” = 2 unità di FFP nei giorni 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

“none” = nessuno

“2 units PRBC on day 12” = 2 unità di PRBC il giorno 12

“1 unit PRBC on day 5” = 1 unità di PRBC il giorno 5

“1 unit PRBC on day 10” = 1 unità di PRBC il giorno 10

“1 unit PRBC on days 2, 8, 9” = 1 unità di PRBC nei giorni 2, 8, 9

“1 unit PRBC on days 2, 3, 8, 9, 12” = 1 unità di PRBC nei giorni 2, 3, 8, 9, 12

“1 unit PRBC on days 1 and 10” = 1 unità di PRBC nei giorni 1 e 10

“1 unit PRBC on days 2 and 6” = 1 unità di PRBC nei giorni 2 e 6

“6-7000 mg on days 2, 4, 6, 8, 11” = 6-7000 mg nei giorni 2, 4, 6, 8, 11

“5000 mg on days 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 and 12” = 5000 mg nei giorni 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 e 12

“7000 mg on days 6, 11, 13, 15” = 7000 mg nei giorni 6, 11, 13, 15

“7000 mg on days 14, 16, 17, 19 and 21” = 7000 mg nei giorni 14, 16, 17, 19 e 21

“9-10000 mg on days 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 19, 20” = 9-10000 mg nei giorni 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 19, 20

“4000 mg on days 1 through 11” = 4000 mg nei giorni da 1 a 11

“1000 mg days 5, 6, 7, 9, 13, 15 and 50,000 mg days 11, 16, 17, 18 and 19” = 1000 mg nei giorni 5, 6, 7, 9, 13, 15 e 50000 mg nei giorni 11, 16, 17, 18 e 19

“6000 mg on days 2 through 12 and 15” = 6000 mg nei giorni da 2 a 12 e 15

“6000 mg on days 1, 7, 9, 11 and 13” = 6000 mg nei giorni 1, 7, 9, 11 e 13

“70 mg on days 1 and 2” = 70 mg nei giorni 1 e 2

“cytogam” = Cytogam

“50,000 units of gamunex 1000 mg of cytogam” = 50000 unità di Gamunex, 1000 mg di Cytogam

“unspecified” = non specificato

“Ave plasmapheresis” = Plasmaferesi media

“Days/cohort” = Giorni/coorte

“Cinryze = 9 days” = Cinryze = 9 giorni

“Placebo = 7.44 days” = Placebo = 7,44 giorni

TAVOLA 4/15

FIGURA 4A

“Figure 4A” = Figura 4A

“Baseline Corrected (C0.5h and C1h post-infusion levels)” = Livello di riferimento corretto (livelli di C 0,5 h e

C 1h dopo l'infusione)

“Mean (SD) Plasma C1 INH FN Concentration (U/mL)” = Concentrazione di C1-IHN-FN del plasma (U/ml)  
media (DS)

“Days” = Giorni

TAVOLA 5/15

FIGURA 4B

“Figure 4B” = Figura 4B

“Day 13” = Giorno 13

“Baseline Corrected” = Corretto per il livello di riferimento

“Plasma Mean (SD) C1 INH Functional (Units/mL)” = C1-INH funzionale medio (DS) del plasma (unità/ml)

“Time (h)” = Tempo (h)

TAVOLA 6/15

FIGURA 5

“Figure 5” = Figura 5

“Skew” = Tendenza

“mL/min” = ml/min

“Baseline” = Livello di riferimento

“Day” = Giorno

TAVOLA 7/15

FIGURA 6A

“Figure 6A” = Figura 6A

FIGURA 6B

“Figure 6B” = Figura 6B

TAVOLA 8/15

FIGURA 7A

“Figure 7A” = Figura 7A

FIGURA 7B

“Figure 7B” = Figura 7B

TAVOLA 9/15

FIGURA 8

“Figure 8” = Figura 8

“Subjects Treated with Placebo” = Soggetti trattati con placebo

“Baseline adjusted” = Regolato per il livello di riferimento

“Unadjusted” = Non aggiustato

“C1 INH Antigen (U/mL)” = Antigene C1-INH (U/ml)

“C1 INH Functional (U/mL)” = C1-INH funzionale (U/ml)

“Subjects Treated with Cinryze<sup>®</sup>” = Soggetti trattati con Cinryze<sup>®</sup>

TAVOLA 10/15

FIGURA 9A

“Figure 9A” = Figura 9A

“C1 INH Ag (Baseline Corrected)” = Ag C1-INH (corretto per il livello di riferimento)

“U/mL” = U/ml

FIGURA 9B

“Figure 9B” = Figura 9B

“C1 INH Ag (Baseline Corrected)” = Ag C1-INH (corretto per il livello di riferimento)

“U/mL” = U/ml

TAVOLA 11/15

FIGURA 9C

“Figure 9C” = Figura 9C

“C1 INH Fnc (Baseline Corrected)” = C1-INH funzionale (corretto per il livello di riferimento)

“U/mL” = U/ml

FIGURA 9D

“Figure 9D” = Figura 9D

“C1 INH Fnct (Baseline Corrected)” = C1-INH funzionale (corretto per il livello di riferimento)

“U/mL” = U/ml

TAVOLA 12/15

FIGURA 9E

“Figure 9E” = Figura 9E

“C1 INH Ag (Unadjusted)” = Ag C1-INH (non aggiustato)

“U/mL” = U/ml

FIGURA 9F

“Figure 9F” = Figura 9F

“C1 INH Ag (Unadjusted)” = Ag C1-INH (non aggiustato)

“U/mL” = U/ml

TAVOLA 13/15

FIGURA 9G

“Figure 9G” = Figura 9G

“C1 INH Function (Unadjusted)” = Funzione di C1-INH (non aggiustato)

“U/mL” = U/ml

FIGURA 9H

“Figure 9H” = Figura 9H

“C1 INH Function (Unadjusted)” = Funzione di C1-INH (non aggiustato)

“U/mL” = U/ml

TAVOLA 14/15

FIGURA 10A

“Figure 10A” = Figura 10A

“Pre—plasmapheresis” = Prima della plasmafèresi

“Post—plasmapheresis” = Dopo la plasmafèresi

“Plasma C1 INH Antigen Concentration (g/L)” = Concentrazione di antigene C1-INH del plasma (g/l)

“C1 INH Antigen” = Antigene C1-INH

TAVOLA 15/15

FIGURA 10B

“Figure 10B” = Figura 10B

“Pre—plasmapheresis” = Prima della plasmafèresi

“Post—plasmapheresis” = Dopo la plasmafèresi

“C1 INH Functional Activity (Units/mL)” = Attività funzionale di C1-INH (unità/ml)

“C1 INH Function” = Funzione di C1-INH

Si dichiara che la presente traduzione è perfettamente conforme al testo originale.

p.c. Shire Viropharma Incorporated

Il mandatario

Società Italiana Brevetti S.p.A.

Jacopo de Benedetti

USBM-043R B